

보 문

가축의 보조사료 개발을 위한 *Bacillus* spp.의 분리 및 특성

박해석¹ · 조승화¹ · 임은정¹ · 김윤순¹ · 문성현² · 조호성² · 김현영³ · 조용식⁴ · 조성호^{1*}

¹재단법인발효미생물산업진흥원, ²전북대학교 수의학과 및 생체안전성연구소, ³순창장류사업소,
⁴농촌진흥청 국립농업과학원 발효식품과

Isolation and characterization of a *Bacillus* spp. for manufacturing the feed additives in livestock

Hae Suk Park¹, Seung Wha Jo¹, Eun Jung Yim¹, Yun Sun Kim¹, Sung Hyun Moon², Ho Seong Cho², Hyun-Young Kim³, Yong Sik Cho⁴, and Sung Ho Cho^{1*}

¹Microbial Institute for Fermentation Industry, Sunchang 56048, Republic of Korea

²College of Veterinary Medicine and Bio-Safety Research Institute, Chonbuk National University, Iksan 42281, Republic of Korea

³Institute of Sunchang Fermented Soybean Products, Sunchang 56048, Republic of Korea

⁴Fermented Food Science Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, Wanju 55365, Republic of Korea

(Received November 27, 2015; Accepted December 21, 2015)

ABSTRACT: The aims of this study were to isolate spore-forming *Bacillus* strains that exhibit high digestibility and anti-pathogenic bacteria toward feed for calves. Total 136 spore-forming strains were isolated from finished feeds and their ingredients. Among them, 93 strains were identified as *Bacillus* species when analyzed by 16S rRNA sequencing. For industrial use, three strains named as *Bacillus licheniformis* SHS14, *B. subtilis* LCB7, *B. amyloliquefaciens* LCB10 were selected after evaluating the industrial standards that are related with heat and acid resistance, enzyme activities, and anti-pathogenic activities against *Salmonella dublin* ATCC15480 and *E. coli* K99. After each culture, 3 selected strains were mixed together at 1:1:1 (v/v/v) ratio and then prepared as the mixed starter culture for feeding. The changes in microbial community were analyzed via 16S rRNA metagenomics. The initial community ratio among three strains was maintained even after manufacturing into final products. Also, in vitro, enzymatic and anti-pathogenic activities were almost same as those when cultured in single culture, and results of anti-pathogenic activities conducted with calves showed 90% activities against lincomycin, which would be indicative of a promising feed starter.

Key words: *Bacillus*, fermented feed, spore forming bacteria, starter culture

*Bacillus*속은 흙, 물, 먼지 및 공기로부터 분리되며, 항생제, 산업적 화학물질 및 효소의 상업적 생산에 이용된다(Veith *et al.*, 2004). 특히, *Bacillus*속에는 알칼리성 단백질 분해효소를 분비하는 *B. clausii*, 항진균제로 농업에서 이용되는 *B. pumilus*, 장류발효에 이용되는 *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* 단백질 분해효소 생산에 이용되는 *B. licheniformis* 등이 있다(Sanders *et al.*, 2003).

*Bacillus*속 일부는 이미 상업적인 이용(항생제, 아미노산, 효소 및 장류 제조)으로 인해 안전성이 입증되었을 뿐만 아니

라, *B. anthracis*, *B. cereus*를 제외한 *Bacillus*속들은 병원성균으로 고려되지는 않고 있다(Sanders *et al.*, 2003). *Bacillus*속을 이용하여 가축사료에 적용한 다양한 연구결과들을 보면 *Bacillus*속은 항병원성물질을 생성하며, 환경조건에 대한 포자의 저항성은 세균이 가축의 장내에서 생존할 수 있고, 동결하지 않고 상업적 제품에서 오랜 기간 생존 가능하다(Sanders *et al.*, 2003). 또한 *Bacillus* 속은 포자를 형성하며, 세균의 포자는 열, 빛, pH, 화학물질에 대해 내성을 가지는 안정성을 보여 주며 이는 사료첨가제로서 포자형성세균을 이용하는 주된 이유 중 하나이다(Leser *et al.*, 2008).

생균제로 많이 이용되고 있는 세균은 유산균 속과 포자형

*For correspondence. E-mail: sunghej3@nate.com;
Tel.: +82-63-650-2021; Fax: +82-63-653-9590

성세균인 *Bacillus* 속 등이 있다(Paik et al., 2002). 상업적으로 이용되는 포자형성세균으로 *Lactobacillus sporogenes*, *B. clausii*, *B. cereus*, *B. pumulis*, *Brevibacillus laterosporus*, *B. subtilis*, *Enterococcus faecium*, *B. polymyxa* 등이 알려져 있고, 상품으로 제조되어 판매되고 있다. 생균제로의 특성을 가지고 있는 걸로 평가되는 *Bacillus*는 약 77종이 알려져 있다(Sanders et al., 2003).

B. subtilis, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*는 QPS (Qualified Presumed Safety)에 등재되어 있고 EFSA (2010)에 독성이 없는 것으로 보고되고 있다. 다수의 *Bacillus*속은 성장 촉진, 사료 이용률 증진 및 동물사료의 생균제로 알려져 있다(Larsen et al., 2014).

생균제는 항생제를 대체하기 위해 개발되어, 체내에 축적되지 않고, 병원성 미생물의 내성을 일으키지 않으며, 가축의 생산성을 개선시키는 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Kim and Song, 2013; Shin, 2014). 생균제는 장내에서 증식하는 유해균의 증식 또는 정착을 저지하거나 직접 생체의 정상화 또는 장내 균총의 정상화를 돕고, 그 대사산물이 장내 유해세균에 의해 생성되는 균체 독소 등의 유해물질을 무독화하거나 그 생성을 저지하는 것으로 알려져 있다(Kim and Song, 2013).

송아지에서 설사를 일으키는 주요 세균성 질환의 경우 대장균증과 살모넬라감염증이 있다. 대장균증의 경우 발생율은 52.7%, 폐사율은 73.8%를 보였고, 살모넬라감염증은 발생율이 13.8%, 폐사율이 67.9%를 보였다. 송아지 일령별 질병발생은 1개월령 이내에서 52.5%로 다수를 차지하고 있었고, 1-3개월령 사이가 25.1%, 4-6개월령 사이가 22.4%를 보였다(Kang et al., 2001).

본 연구에서는 송아지의 설사병 원인 균인 대장균과 살모넬라균에 대해 항균활성이 있고 장내에서 유해미생물 억제 및 소화 효율 증진 효과를 가져올 수 있는 생균제로 가능성을 탐색하고자 포자형성 유용 균인 *Bacillus* sp.를 선발하여 사료첨가제로의 활용가능성을 평가 하였다.

재료 및 방법

Bacillus 균주 분리

분리 원은 발효사료 제조기업에서 종균 증식에 사용되는 원료인 당밀과 1차 배합사료의 원료로 쓰이는 버섯 분, 대두 박과 1차 배양액, 축우용 발효 사료 완제품을 수집하여 종류에 따라 상온 또는 냉장 보관하여 실험에 사용하였다.

시료 10 g을 멸균 생리식염수(0.85% NaCl) 90 ml에 첨가하

고 균질기(HG-400V)로 5분 동안 교반하였다. 백 필터로 여과된 현탁액을 10⁸배까지 단계별 희석하여 NA (Nutrient agar) 배지에 희석 배수 별로 100 µl씩 도말하고, 배양기(37°C)에서 24시간 동안 배양한 후, 단일 집락(colony)을 분리하였다. 각각의 분리 균주는 NA 배지에 희석 평판법으로 순수분리된 것을 확인하였고, 전형적인 *Bacillus* sp. 집락 형태인 백색의 집락주위로 반투명의 광택환을 보이는 136균주를 선발하여 16S rRNA 염기서열로 동정하였다. 동정된 균주는 NB (Nutrient broth) 배지에 접종한 후, 진탕배양기(37°C, 180 rpm)에서 24시간 동안 배양하였다. 배양액 1 ml를 30분간 원심 분리(4°C, 12,000 rpm)하여 상등액만을 취하여 냉장 보관하였고, 분리된 세포는 25% glycerol 용액 1 ml를 첨가하여 -80°C에서 동결 보관하였다.

Bacillus 균주 특성 분석

분리 동정된 *Bacillus* 균주의 특성평가로는 효소활성, 항균활성, 내열성, 내산성, 내담즙성 및 당이용 능력을 분석하였다. 발효 사료에는 다양한 부산물이 첨가됨으로 효소활성이 우수한 균주를 선발하기 위해 균주 배양액을 활용하여 아래와 같은 효소활성을 측정하였다. 또한 균주 배양액을 원심 분리하여 얻은 상등액으로 2차 효소활성을 측정하였다. 효소의 활성은 다음과 같이 측정하였다. NB broth에서 24시간 진탕 배양(37°C, 180 rpm)된 배양액을 실험에 사용하였다. Protease activity는 2% skim milk 최소 배지 활용하여 측정하였다. 각 균주 배양액 100 µl를 6 mm cork borer로 구멍을 뚫은 배지에 주입하였다. 37°C에서 24시간 동안 반응시킨 후, 투명환 직경을 측정하여 protease activity를 측정하였다. 같은 방법으로 amylase activity는 1.5% starch 최소 배지를 사용하였으며, 24시간 반응 후, lügol solution을 첨가하여 발색 반응 후, 투명환의 직경(mm)을 측정하였다. Cellulase activity는 1.5% carboxymethyl cellulose 최소배지를 사용하였다. 동일 조건에서 배양 후 2% Congo Red 용액을 반응시키고, 1 M NaCl로 세척하여 투명환의 직경을 측정하였다. Lipase Activity는 1% glyceryl tributyrat를 최소배지를 활용하여 배양 상등액을 주입하고 투명환의 직경을 측정하였다. 항생제 내성 균주의 출현으로 인해 축산분야에서의 항생제 사용이 엄격하게 규제되고 있으며, 세계적인 추세에 따라 2011년 하반기부터 국내에서 완전히 사용이 금지되고 있기 때문에, 소의 장내 설사를 유발하는 유해미생물인 *Salmonella dublin* ATCC15480 (Szczawinska et al., 1991) 과 *E. coli* K99 (Yousif et al., 2013)를 전북대 수의학과로부터 분양 받아 agar diffusion assay법을 통하여 항균활성 균주를 선발하였다. NA 배지를 bottom 배지로 제조하고, 0.7% soft

agar (TSB)를 제조하여 OD값 0.4-0.5로 배양된 유해미생물을 주입하여 top agar로 하여 bottom agar에 각 25 ml 분주하였다. 천공하고, 준비된 분리배양액 100 µl를 홀에 주입하고 37°C에서 12 h 배양한 후 투명화의 직경을 측정하였다. 사료에 첨가 가능한 기능성 균주로의 역할을 가지기 위해서는 분말사료 제조 공정에서 필수적인 열처리 부분에 대해서 생존해야 한다. Autoclave로 100°C에서 30분간 살균하여 생존율 10% 이상인 균종을 선발하고자 하였다. 생균을 포함한 사료를 투여시 위산(pH 1-2)에 견디어 장까지 도달해서 정상적인 기능을 발휘할 수 있어야 한다. NaCl 0.4 g + HCl 1.4 ml = 200 ml volumetric flask 표선을 맞춘 인공위액에 균주배양액을 넣고 4시간 교반한 후 교반 전과 교반 후의 미생물 생균수를 계수하였다. 내담즙성은 TSB 배지에 OXGALL을 0, 0.5, 1.5, 2.5, 3.5%로 0 h, 6 h, 12 h, 24 h 주기로 평가하여 600 nm에서 OD값을 측정하였다. 당이용능은 생화학적 동정 kit인 API50 CH kit (bioMérieux)를 이용하여 분석하였다.

균주 동정

평가를 통하여 최종적으로 선발된 *Bacillus* 균주 3종에 대하여 보다 정확한 동정을 위해 *gyrA*, *rpoB* primer (De Clerck *et al.*, 2004)를 사용하여 multi-locus phylogenetic analysis를 하였다. PCR은 95°C에서 1분 initial denaturation을 수행한 뒤, 95°C에서 30초, 53°C에서 30초, 72°C에서 1분 간 총 35 사이클 반복 수행하였다. PCR 완료 후 1% TBE agarose gel에서 전기영동 하여 밴드를 확인하였고, gel purification kit (Bioneer)를 사용하여 정제하였다. 염기서열 분석은 Macrogen Inc.에 의뢰하였다.

Raw data는 DNASTAR (DNASTAR Inc.) 프로그램을 사용하여 assemble 수정을 하였고, 수정된 sequence는 ClustalW2 (EBI) 프로그램을 사용하여 reference strain과 정렬시켰다. Genetic distance는 Kimura's two-parameter model을 사용하여 확인하였고, neighbor-joining phylogenetic trees는 MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011) 프로그램을 사용하였다.

혼합 종균 재생능 평가

최종 선발된 *Bacillus* 속 3종을 1:1:1 비율로 혼합한 종균을 제조하였고, 제조한 혼합 종균에 대한 효소활성과 항균활성을 평가하고, 보존 후 재생능 검증을 위해 대용량 염기서열 분석법인 next generation sequencing을 사용하여 16S rRNA metagenomics 분석을 실시하였다. DNA library는 Ion 16S™ Metagenomics Kit (Life Technologies)를 사용하여 제품의 사

용 설명서에 따라 준비하였다.

DNA fragment sample에 Platinum® PCR SuperMix High Fidelity와 Library Amplification Primer Mix를 혼합하여 95°C에서 5분 initial denaturation을 수행한 뒤, 95°C에서 15초, 58°C에서 15초, 70°C에서 1분 간 총 18 사이클 반복 수행하였다. 증폭된 DNA fragment sample은 AMPure bead (Beckman Coulter)를 사용하여 정제되었다.

증폭된 DNA fragment sample은 Ion Library Quantitation Kit (Life technologies™)의 제품 사용 설명서에 따라 serially dilution으로 준비되었고 control로 *E. coli* DH10B Control 400 Library (Ion Torrent, Life technologies™)이 사용되었다. 준비된 sample은 7500 Fast System Real-time PCR machine (ABI)을 사용하여 정량하였다.

Emulsion PCR은 qPCR로 정량한 sample DNA에 Ion PGM™ Template OT2 400 Reagent Mix를 혼합한 뒤 Ion Sphere Particles (ISPs)를 첨가하여 준비되었다. Emulsion PCR은 OneTouch™2 (Life Technologies)로 수행되었다. Emulsion PCR 완료 후 회수된 ISPs Pellet은 Dynabeads MyOne Strep-tavidin C1 beads (Life technologies™)를 사용해 정제되었고, Qubit® 2.0 Fluorometer를 사용하여 ISP 농도를 확인하였다.

Sequencing은 Ion PGM™ Sequencing Reagent 400 kit를 이용해 준비되었다. ISP sample에 control ISP를 혼합하여 15,500 × g에서 4분간 원심분리 하였고, 수거된 ISP pellet은 sequencing primer와 혼합하여 95°C에서 2분, 37°C에서 2분 간 incubation 하였다. Sequencing sample은 Ion 316™ Chip Kit V2 (Life technologies™)에 loading 되었고, sequencing은 Ion PGM™ (Life Technologies) 장비를 사용하여 수행되었다. Sequencing 완료 후 raw data는 Ion PGM™을 통하여 Torrent Suite Server (ver. 4.6)에 저장 되었고, 1차적인 sequencing 분석이 진행 되었다. Torrent Suite Server에서 raw data를 export 하여 Ion Reporter™ (Life Technologies, ver. 4.6) program을 사용하여 16S rRNA metagenomics 분석을 수행하였다.

송아지에서의 항균력 평가

선발 균주의 송아지에서의 항균력 평가를 위해 3개월 송아지 15마리를 대상으로 다음 5개 group으로 나누어 실험을 수행하였다. Group 1은 대조군(3마리), group 2는 혼합 종균 급여(3마리), group 3은 혼합 종균과 살모넬라 급여(3마리), group 4는 lincomycin과 살모넬라 급여(3마리), group 5는 살모넬라만 급여(3마리) 하였다. 총 평가는 20일간 수행하였으며, 살모넬라균은 10⁹ CFU/ml 농도로 200 ml를 실험개시 3일, 6일, 9일째 급여하였다. Lincomycin은 체중 10 kg당 1일 0.2 g

을 투여하였다. 분석은 송아지로부터 분변을 무균적으로 채취하여 -70°C에서 보관 후 RT-PCR (real-time PCR)을 통해 확인하였다. 분변으로부터 생존 상태의 살모넬라균의 분리를 위해 Propidium monoazideTM (PMA, Biotium)을 30 µM 농도로 넣고 PMA-LiteTM LED photolysis device (E9002, Biotium)를 이용하여 465-475 nm의 LED 광원을 15분간 조사하였다(Banihashemi *et al.*, 2012). 살모넬라균의 DNA 추출은 AccuPrep® Stool Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer)를 사용하였고 살모넬라균의 정량 검사는 PowerChek Salmonella Real-time PCR Kit (Kogene Biotech)를 이용하였다. 통계분석은 SPSS Win 12.0 프로그램을 이용하여 유의수준 95%에서 검정하였다. 음성 대조군인 정상 사료급여균, 혼합 중균 배양액 급여균, 혼합 중균 배양액과 살모넬라균 동시 급여균, lincomycin과 살모넬라균 동시 급여균 및 살모넬라 단독 급여균의 실험 4, 7, 10, 20일에서의 살모넬라균의 양을 의미하는 real-time PCR의 Ct값 평균치를 비교하기 위해 one-way ANOVA를 이용하였다.

결과 및 고찰

Bacillus 균주 선발

발효사료에 적용가능한 *Bacillus* 속 중균 선발전략은 효소활성과 항균활성이 상대적으로 우수한 균주를 선발하는 방법이다(Fig. 1). 그 결과 발효사료용 원료인 당밀, 벼싧분, 대두박과 최종 발효사료로부터 *Bacillus* 균주의 전형적인 집락 형태를 보이는 세균 136종을 선택하여 16S rRNA 염기서열 분석법에

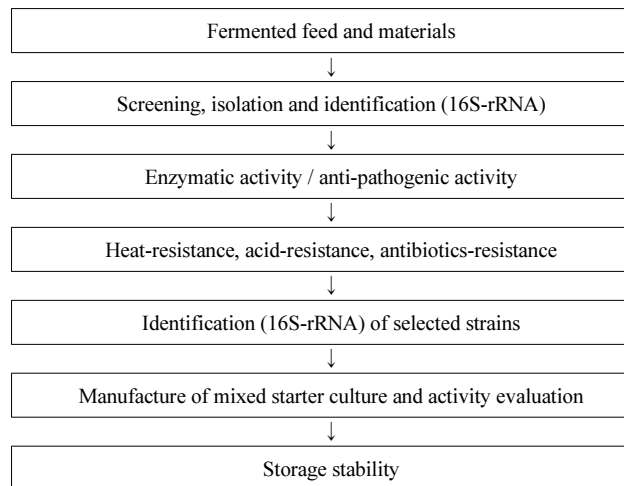


Fig. 1. Scheme for isolation and identification of *Bacillus* spp. used for producing fermented feed.

의해 동정한 결과, *Bacillus* 속 93종, *Paenibacillus* 속 14종, 유산균 14종, 기타세균 15종이었다. 유산균은 주로 *Lactobacillus* 속, *Leuconostoc* 속, *Lactococcus* 속이었고, 기타 세균은 *Staphylococcus* 속, *Alicyclobacillus* 속, *Enterococcus* 속, *Moraxella* 속, *Klebsiella* 속이었다. 동정된 136종에 대하여 효소활성과 항균활성을 평가하여 상대적으로 활성이 우수한 10종을 선발하였다(Table 1). 선발된 10종 중에서 최종 *Bacillus* 속 3종을 선정하였으며, 선정된 3종에 대해 확인 동정을 16S rRNA 염기서열 분석법 실시한 결과, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*로 동정되었다(Fig. 2).

Table 1. Enzymatic and antimicrobial activity of spore forming bacteria 10 strain

NO	Strain	Enzymatic activity ^a (halo size. mm)				Antimicrobial activity ^b (halo size. mm)	
		Amylase	Protease	Cellulase	Lipase	<i>E. coli</i> K99	<i>S. dublin</i> ATCC15480
1	<i>B. subtilis</i> SHNA5	13	20	14	11	12	15
2	<i>B. amyloliquefaciens</i> SHNA11	16	24	13	-	10	15
3	<i>B. licheniformis</i> SHNA21	9	15	10	-	10	10
4	<i>B. licheniformis</i> SHNA22	8	15	11	-	10	15
5	<i>B. subtilis</i> SHS11	-	24	14	11	12	9
6	<i>B. licheniformis</i> SHS13	-	10	11	10	8	-
7	<i>B. licheniformis</i> SHS14	11	-	12	10	14	9
8	<i>B. subtilis</i> SHS15	-	25	15	11	-	-
9	<i>B. subtilis</i> LCB7	11	-	-	13	10	20
10	<i>B. amyloliquefaciens</i> LCB10	15	-	-	12	25	18

^{a,b} -, not detected

^{a,b} Supernatant of cultures were used analysis samples.

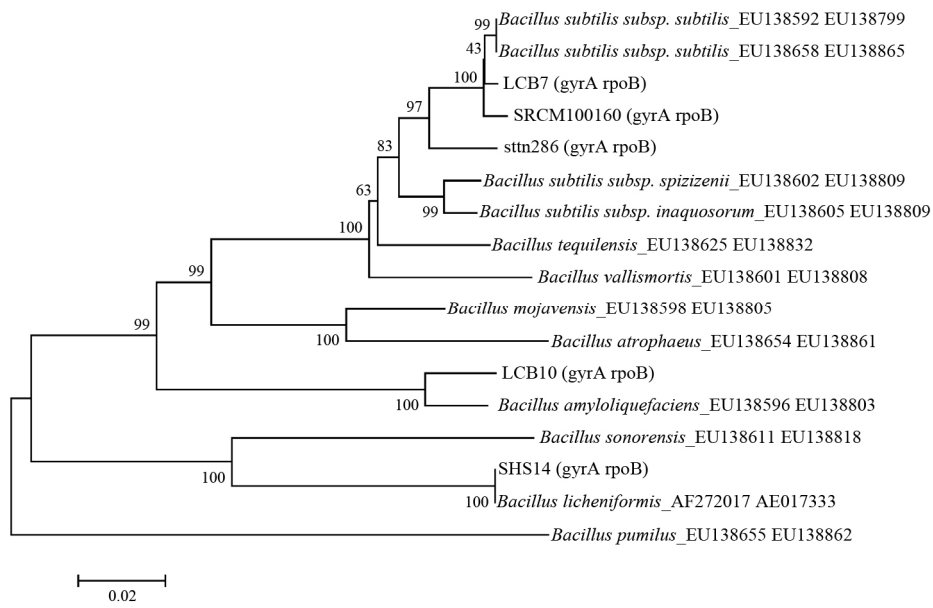


Fig. 2. Molecular phylogenetic analysis of strain LCB7, LCB10, SHS14 by Maximum likelihood method.

Table 2. Sugar utilization of 3 selected strains and mixed starter culture

NO	sugar	SHS14	LCB7	LCB10	Mixed starter culture	NO	sugar	SHS14	LCB7	LCB10	Mixed starter culture
0	CONTROL					25	ESC	+		+	+
1	GLY			+	+	26	SAL		+	+	+
2	ERY	+	-			27	CEL	+	+	+	+
3	DARA		-			28	MAL	+	+	+	+
4	LARA	+	+	+	+	29	LAC		-	+	
5	RIB			+		30	MEL	-	-	+	-
6	DXYL			+		31	SAC	+	+	+	+
7	LXYL	-	-			32	TRE	+	+	+	+
8	ADO	-	-		-	33	INU		-		
9	MDX		-		-	34	MLZ		-		
10	GAL		-			35	RAF			+	
11	GLU	+	+	+	+	36	AMD		+	+	+
12	FRU	+	+	+	+	37	GLYG		+	+	+
13	MNE	+	+	+	+	38	XLT	-	-		
14	SBE	-	-			39	GEN			+	
15	RHA	-	-			40	TUR				
16	DUL	-	-			41	LYX	-	-		-
17	INO		-	+	+	42	TAG	+	+		+
18	MAN	+		+	+	43	DFUC	-	-		-
19	SOR			+	+	44	LFUC	-	-		-
20	MDM	-	-			45	DARL	-	-		-
21	MDG	+		+		46	LARL		-		-
22	NAG	+	+	-	+	47	GNT				
23	AMY		+		+	48	2KG	-	-	-	-
24	ARB		+		+	49	5KG	-	-		-

Table 3. Heat resistance of 3 selected strains for producing mixed starter culture

NO.	Strain	Before heat treatment (CFU/ml)	After heat treatment ^a (CFU/ml)	Survival rate (%)
1	SHS14	1.0×10^8	1.08×10^7	10.8
2	LCB7	4.3×10^7	5.3×10^6	12.3
3	LCB10	4.5×10^8	5.1×10^7	11.3

^a Condition of heat treatment is at 100°C for 30 min.

Table 4. Acid resistance of 3 selected strains for producing mixed starter culture

NO.	Strain	Before reaction (CFU/ml)	After reaction ^a (CFU/ml)	Survival rate ^b (%)
1	SHS14	1.1×10^8	1.1×10^5	-
2	LCB7	1.6×10^8	6.0×10^5	-
3	LCB10	1.1×10^7	2.12×10^6	19.3

^a Reaction solutions (pH 2.01) was made up total volum 200 ml with NaCl 0.4 g and HCl 1.4 ml and reaction was done for 4 h by mixing.

^b -, Very low percentages below 0.5%

Bacillus 균주 특성 분석

선발한 *Bacillus* 균주 3종에 대해 당이용 능(Table 2), 내열성(Table 3), 내산성(Table 4), 및 내담즙성 평가를 실시하였다. 3종인 SHS14, LCB7, LCB10에 대하여 내열성 평가결과, 19% 이상의 생존율을 보였으며, 내산성을 평가한 결과, LCB10만이 19.3%의 생존율을 보여주었다. 이러한 결과는 *B. licheniformis*가 pH 1.4-2.0 정도에서 거의 사멸하고 pH 3 이상에서는 80% 이상의 생존율을 보였다는 결과와 유사하였다(Kim *et al.*, 2005). 내담즙성 평가 결과는 *B. licheniformis* SHS14와 *B. subtilis* LCB7 균주는 24 h 후 OXGALL 1.5%의 농도에서 증식이 활발하였으며, 오히려 *B. amyloliquefaciens* LCB10 균주는 OXGALL 0.5%의 농도에서 증식이 활발하였다.

혼합 종균 특성 분석

발효사료 제조용 종균으로 선발된 3종의 *Bacillus* 균주를 혼합하여 제조한 종균의 항균활성과 효소활성을 분석하였다. 항균활성과 효소활성이 높은 선발한 3종의 *Bacillus* 균주를 각각 NB broth에 배양하여 배양액을 1:1:1로 혼합하여 다시 37°C, 24 h, 180 rpm 조건에서 증균 배양하고 0.45 µl syringe filter로 filtering하여 효소활성과 항균활성을 평가하였다(Table

5). 그 결과 효소활성은 amylase, protease, cellulose, lipase 모두에 대해 단일 종균과 비교해도 유의적 차이가 없도록 우수한 활성을 보였으며, 항균활성은 시중에서 상품으로 사용되는 대표적인 항생제인 lincomycin을 대조구로 하여 *E. coli* K99와 *S. dublin* ATCC15480에 대해 평가한 결과, 대조구와 유사한 활성을 보여주었다(Table 5). 최종적으로 제조한 혼합 종균의 보존안정성을 확인하기 위해 혼합 종균을 동결분말상태로 제조 후에 증균 전후의 미생물 군집의 변화를 pyrosequencing 방법으로 확인하였다(Fig. 3). 그 결과, 증균 전에는 인위적으로 3종을 1:1:1 (*B. subtilis* : *B. licheniformis* : *B. amyloliquefaciens*)로 혼합 함으로서 3종의 균주가 거의 동량의 비율(21% : 28% : 23%)로 존재하였으나, 증균 후에는 *B. subtilis*의 비율이 37%로 상승하였고, *B. amyloliquefaciens*와 *B. licheniformis*는 각 22%로 약간 감소하였다. 그러나 증균 전후에 *Bacillus* 균주 3종의 조성비율의 큰 차이점이 없는 것으로 보아, 보존 중에 안정성이 확보됨을 확인하였다.

송아지 적용 평가

개발한 혼합 종균에 대한 항균활성을 송아지에서 평가하였다. 분변에서의 생존상태의 살모넬라 검출을 위해 PMA-Lite™

Table 5. Enzymatic and anti-pathogenic activities of mixed starter culture

Sample ^a	Enzymatic activity (mm) ^b				Antimicrobial activity (mm)	
	Amylase	Protease	Cellulase	Lipase	<i>E. coli</i> K99	<i>S. dublin</i> ATCC15480
Mixed starter culture	13	20	14	11	16	18
Lincomycin	-	-	-	-	17	20

^a Lincomycin was not tested about enzymatic activity and supernatant of cultures were used analysis samples.

^b -, not tested

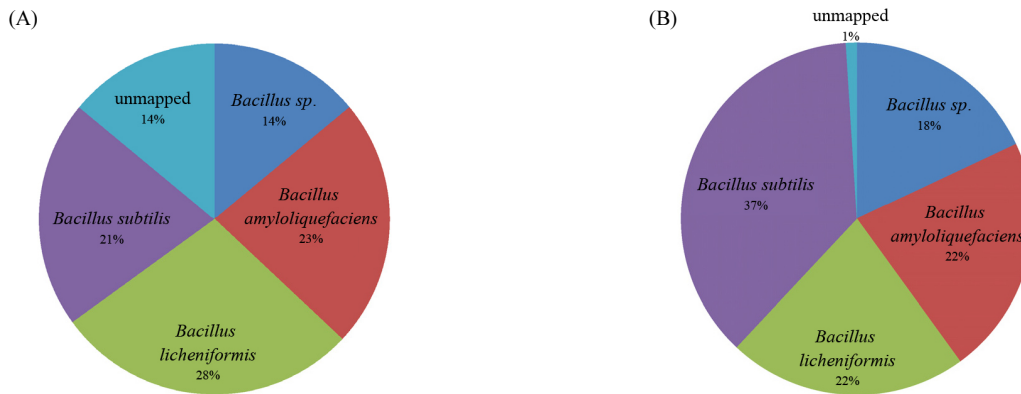


Fig. 3. NGS analysis and distribution of microbes. (A) before culture of 1:1:1 mixed starter culture; (B) after culture for 24 h.

Table 6. Detection of *Salmonella dublin* from calves' feces

Group	Treatment ^a	Ct			
		Day 4	Day 7	Day 10	Day 20
1	NC	40.28±2.96	39.84±1.99	39.43±1.22	39.80±1.21
2	Mixed starter culture	39.83±2.10	40.43±1.07	39.77±2.14	39.53±0.79
3	Mixed starter culture + <i>Salmonella</i>	31.24±1.90	29.56±0.89	27.44±0.51	36.29±0.92
4	Lincomycin + <i>Salmonella</i>	32.26±1.99	29.20±0.84	29.97±1.02	36.11±0.65
5	<i>Salmonella</i>	17.58±2.17	18.34±1.99	14.68±1.77	26.39±1.62

^a *Salmonella* was fed by 200 ml (10⁹ CFU/ml) on 3, 6, and 9 day from the start of test. The data represent the mean±SD of at least three independent experiments.

LED Photolysis Device (Biotium Inc.)를 전처리하였고 real-time PCR (Fast 7500, Life Technologies)을 통해 얻은 Ct값으로 살모넬라균의 분변 내 함유량을 측정하였으며, Ct값이 40 이상을 음성으로 평가하였다(Table 6). 무처리 대조군(NC)인 group 1과 혼합 중균만 급여한 group 2는 전반적으로 Ct값이 39-40 사이로 살모넬라가 거의 검출되지 않은 반면에 혼합 중균을 급여하면서 살모넬라균을 투여한 group 3은 살모넬라 투여 후 Ct값이 일시적으로 낮아지기는 하나 정상 수준으로 회복하는 결과를 확인할 수 있었다. 이는 살모넬라만 접종한 group 5와 비교하여 큰 차이를 보여주고 있다.

살모넬라 투여에 대한 혼합 중균의 방어효과를 보여주는 group 3은 기존에 사용하던 lincomycin 투여군인 group 4와 비교할 때 전 기간에 걸쳐 10% 이내의 차이를 확인할 수 있었으며, 이는 개발된 혼합 중균이 기존 항생제인 lincomycin 대비하여 90% 이상의 효과를 갖고 있다는 것을 보여주고 있다.

적 요

가축산업분야에서 항생제의 사용이 금지됨에 따라, 질병 예방을 통한 축산농가의 생산성 향상을 위해 사료첨가제인 미

생물제제의 개발과 같은 예방적 수단이 필요하게 되었다. 본 연구는 가축의 생산성을 높이기 위해 사료 분해 능력이 좋고 항균활성이 뛰어난 포자 형성 *Bacillus* 균주 3종인 *B. subtilis* LCB7, *B. licheniformis* SHS14, *B. amyloliquefaciens* LCB10을 우수 균주로 선발하였다. 최종적으로 선발한 *Bacillus* 3종을 1:1:1 비율로 혼합하여 혼합 중균을 제조하여 항균시험(*in vitro*) 결과, 단일 3종 및 lincomycin과 비교하여 유사한 활성을 보여주었으며, 송아지를 이용하여 항균활성 시험(*in vivo*)을 실시한 결과에서도 lincomycin 투여 대비 90% 수준의 높은 활성을 보여주었다. 개발한 혼합 중균의 안정적 보존을 위해 혼합 중균을 제조하여 다시 중균을 통하여 미생물군집 분석을 통하여 확인한 결과, 초기 군집비율과 증균 후 군집비율이 매우 유사하게 유지되었다. 이로서 본 연구에서는 선발된 *Bacillus* 균주 3종을 이용하여 제조한 혼합 중균이 사료첨가제용 미생물제제로서 이용 가능성을 최종 확인하였다.

감사의 말

본 연구는 농촌진흥청 연구사업(과제번호 PJ00999002)의 지원 사업과 2014년 전라북도 R&D지원사업의 지원(20140312-

B2-004)에 의해 수행되었습니다.

References

- Banihashemi, A., Dyke, M., and Huck, P.** 2012. Long-amplicon propidium monoazide - PCR enumeration assay to detect viable *Campylobacter* and *Salmonella*. *J. Appl. Microbiol.* **113**, 863–873.
- De Clerck, E., Gevers, D., De Ridder, K., and De Vos, P.** 2004. Screening of bacterial contamination during gelatin production by means of denaturing gradient gel electrophoresis, focused on *Bacillus* and related endospore-forming genera. *J. Appl. Microbiol.* **96**, 1333–1341.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ).** 2010. Scientific opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed. *EFSA J.* **8**, 1944.
- Kang, M.I., Han, D.U., Chung, Y.U., Chung, D.Y., Lee, C.Y., Lee, C.G., Wee, S.H., and Cho, J.J.** 2001. Survey on Korean-native calves diseases and mortality. *Korean J. Vet. Serv.* **24**, 223–241.
- Kim, J.W., Jun, K.D., Kang, J.S., Jang, J.S., Ha, B.J., and Lee, J.H.** 2005. Characterization of *Bacillus licheniformis* as a probiotic. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **20**, 359–362.
- Kim, K.H. and Song, M.K.** 2013. Effects of feeding level of feedstuffs fermented with complex probiotics on growth of Holstein male calves. *Korean Bull. Animal Biotechnol.* **5**, 1–9.
- Larsen, N., Thorsen, L., Kpikpi, E.N., Lauridsen, B.S., Cantor, M.D., Nielsen, B., Brockmann, E., Derkx, P.M.F., and Jespersen, L.** 2014. Characterization of *Bacillus* spp. strains for use as probiotic additives in pig feed. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 1105–1118.
- Leser, T.D., Knarreborg, A., and Worm, J.** 2008. Germination and outgrowth of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* spores in the gastrointestinal tract of pigs. *J. Appl. Microbiol.* **104**, 1025–1033.
- Paik, H.D., Jung, M.Y., Jung, H.Y., Kim, W.S., and Kim, K.T.** 2002. Characterization of *Bacillus polyfermenticus* SCD for oral bacteriotherapy of gastrointestinal disorders. *Korean J. Food Sci. Technol.* **34**, 73–78.
- Sanders, M.E., Morelli, L., and Tompkins, A.** 2003. Sporeformers as human probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, and *Brevibacillus*. *Comp. Rev. Food Sci. Food Safety* **2**, 101–110.
- Shin, T.S.** 2014. Development of supplementary fodder as an alternative of antibiotics using by heat-resistance microbes. Busan National University.
- Szczawinska, M.E., Thayer, D.W., and Phillips, J.G.** 1991. Fate of unirradiated *Salmonella* in irradiated mechanically deboned chicken meat. *Int. J. Food Microbiol.* **14**, 313–324.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S.** 2011. MEGA5 : Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Cell* **28**, 2731–2739.
- Veith, B., Herzberg, C., Steckel, S., Feesche, J., Maurer, K.H., Ehrenreich, P., Baumer, S., Henne, A., Liesegang, H., Merkl, R., et al.** 2004. The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **7**, 204–211.
- Yousif, A.A., Mahmood, N.M., and Al-Taai, N.A.** 2013. Immunization of mice with killed *E. coli* K99 vaccine for protection against colibacillosis. *Int. J. Microbiol. Res.* **5**, 482–485.