pISSN 2733-4554
eISSN 2733-4562

J. Dairy Sci. Biotechnol. 2023;41(4):179-190
https://doi.org/10.22424/jdsb.2023.41.4.179

REVIEW

프로바이오틱스를 첨가한 반려동물 사료 개발에 관한 연구 및 현황: 총설

김현주[1†] · 천정환[2†] · 오형석[3] · 김현진[3] · 정은아[3] · 서건호[3] · 송광영[3,4*]

[1]부천대학교 반려동물과
[2]인제대학교 반려동물보건학과
[3]건국대학교 수의과대학 및 원헬스연구소
[4]서정대학교 반려동물과 및 동물보건과

Research and Status on the Development of Companion Animal Food with the Addition of Probiotics: A Review

Hyun-Ju Kim[1†], Jung-Whan Chon[2†], Hyungsuk Oh[3], Hyeon-Jin Kim[3], Eunah Jung[3], Kun-Ho Seo[3], and Kwang-Young Song[3,4*]

[1]Department of Companion Animal, Bucheon University, Bucheon, Korea
[2]Department of Companion Animal Health, Inje University, Gimhae, Korea
[3]Center for One Health and College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Seoul, Korea
[4]Department of Companion Animal and Department of Animal Health, Seojeong University, Yangju, Korea

Received: December 15, 2023
Revised: December 19, 2023
Accepted: December 19, 2023

†These authors contributed equally to this study.

*Corresponding author :
Kwang-Young Song
Department of Companion Animal and Department of Animal Health, Seojeong University, Yangju, Korea
Tel : +82-31-860-5075
Fax : +82-31-860-5074
E-mail : drkysong@gmail.com

Copyright © 2023 Korean Society of Dairy Science and Biotechnology.
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ORCID
Hyun-Ju Kim
https://orcid.org/0009-0005-7784-6121
Jung-Whan Chon
https://orcid.org/0000-0003-0758-6115
Hyungsuk Oh
https://orcid.org/0000-0002-1213-9515

Abstract

Currently, various probiotics are being used to improve the nutrition of companion animals. They are widely sold as additives in companion animal foods because of the numerous gastrointestinal and immune health benefits for dogs and cats. Therefore, extensive research is being conducted to improve quality and safety during manufacturing and to extend the shelf life of companion animal foods by adding probiotics. The manufacturing process must be conducted such that the characteristics and efficacy of probiotics added to food are optimally beneficial for companion animals. Therefore, this review aims to address the overall characteristics of the probiotic strains used and to examine the various methods through which probiotics are added to companion animal foods.

Keywords

probiotics, companion animals, bioactive food, functional feed

서 론

반려동물 영양에서 프로바이오틱스(직접 먹이는 미생물)는 개와 고양이의 위장 및 면역 건강에 미치는 영향으로 인해 반려동물 사료에 가치를 더하는 기능성 성분으로 판매되고 있다. 각 프로바이오틱스 균주가 발휘하는 유익한 효과의 성격은 대사 특성에 따라 달라지며 아마도 가장 중요한 것은 충분한 수의 생존 세포가 숙주의 대장에 도달하는 것이다. 반려동물 사료 제조 공정은 식품 안전을 개선하고 유통기한을 연장하도록 설계되었지만, 이는 직접 공급되는 미생물의 생존에는 역효과를 나타내었다. 그러므로, 프로바이오틱스를 함유한 효과적인 반려동물 사료 제조를 위한 전제조건은 각 유익한 박테리아 균주가 생존하는 데 필요한 조건을 이해하는 것이다. 따라서 상업용 반려동물 사료에 사용되는 프로바이오틱스 균주의 고유한 특성을 이해할 뿐만 아니라 반려동물 사료에 프로바이오틱스를 적용하는 것과 생존 가능성에 대한 관련 문제에 관한 많은 관심이 증가하고 있는 실정이다.

최근 미국의 반려동물 소유 통계에 따르면 미국 가구의 70%가 적어도 한 마리의 반려동물을 소유

Hyeon-Jin Kim
https://orcid.org/0000-0002-7914-7771
Eunah Jung
https://orcid.org/0009-0002-5756-8070
Kun-Ho Seo
https://orcid.org/0000-0001-5720-0538
Kwang-Young Song
https://orcid.org/0000-0002-5619-8381

하고 있으며 이는 거의 9천만 가구에 해당된다[1]. 2021년에 미국인들은 반려동물 사료, 수의학적 관리, 용품, 비의료 반려동물 관리 서비스를 구매하여 반려동물에 총 1,236억 달러를 투자하였다. 이는 반려동물이 사회에서 매우 가치 있는 구성원이 되었음을 분명히 보여주는 것이다. 지난 2세기 동안 반려견들의 사회적 역할은 주로 노동(예: 후견인, 수송, 목축, 사냥)에서 다양한 특수 작전(예: 구조, 경찰, 군대), 치료 관리(예: 사냥)로 진화하였다. 질병 감지, 감각 장애자 지원, 정서적 지원, 일반적인 동반자 관계를 통해 인간과 동물의 유대 관계를 심화시키고 반려 동물에 대한 의인화 된 시각이 높아지고 있다[2]. 미국 생활에서 반려동물의 중요성이 점점 더 커지고 있음을 고려할 때, 오늘날 많은 반려동물은 가족의 구성원으로 간주되며, 단순히 생산과 성능에만 그치는 것이 아니라 반려동물의 건강, 장수 및 삶의 질을 향상시키는 목표로 먹이를 주고 양육되고 있다.

반려동물을 위한 사료 공급 전략의 변화는 아마도 필수 영양소 제공을 넘어 긍정적인 건강 결과를 제공하는 것으로 간주되는 기능성 식품 및 간식의 신흥 시장에서 가장 분명하게 나타날 것으로 예상된다[3]. 기능성 성분에는 예방적 또는 치료적 역할을 함으로써 반려동물 사료에 가치를 더할 수 있는 식물 추출물, 다양한 정도의 발효성을 지닌 섬유질, 관절 보충제, 비필수 영양소 또는 미생물 및 효모 유래 제품이 포함될 수 있을 것이다[4]. 이들 중 직접 공급 미생물(dried-fed microbials; 일반적으로 “프로바이오틱스”라고 함)은 수 세기 동안 요구르트, 치즈, 와인, 빵과 같은 인간의 주요 식품을 발효하는 데 사용되어 왔으며 최근에야 보충제와 같은 건강 증진 식품으로 받아들여지고 있다[5]. 반려동물에 대한 프로바이오틱스의 효능은 상대적으로 새로운 연구 분야이며, 이러한 유익한 미생물을 함유한 제품의 효능을 보장하려면 새로운 적용 전략, 고유한 프로바이오틱스 균주 선택 및 잠재적인 건강상의 이점을 입증하는 형태의 혁신이 필요하다. 따라서 반려동물 사료에 대한 프로바이오틱스의 다양한 공급원과 적용 및 생존 가능성에 대한 관련 문제를 이해하는 것이 요구되고 있다. 본 총설 논문에서는 이미 발표된 여러가지 과학적인 자료 및 문헌 등을 조사하여 재정리하였다.

본 론

1. 프로바이오틱스의 역사적 유래

프로바이오틱스는 인류 문명 초기부터 식품에 존재해 왔다. 음식 속 박테리아에 대한 우리의 지식은 빠르면 8,000-10,000년 전 부패와 중독 사례가 발생했을 때 시작된 것으로 추정된다[6]. 그러나 19세기 중반이 되어서야 루이 파스퇴르(Louis Pasteur)가 산(acid)을 형성하는 미생물과 우유 시큼함과 와인 발효에 미치는 미생물의 역할을 과학계에 알렸다[7]. 이 발견은 다른 미생물을 식별하고 식품 시스템에서 눈에 보이지 않지만 중요한 역할을 밝히는 것을 목표로 하는 일련의 실험을 촉발시켰다. 거의 반세기 후인 1907년에 노벨상을 받은 과학자 엘리 메치니코프(Elie Metchnikoff)는 발효유에 있는 젖산균이 특정 건강상의 이점, 특히 노화의 시작을 지연시키는 역할을 한다고 제안하였다[8]. 이는 응고된 우유(요구르트)를 정기적으로 섭취하는 불가리아의 100세 노인을 관찰한 데서 비롯되었다. 메치니코프는 자신의 저서 중 하나인 “생명의 연장”에서 락토바실러스가 질병과 노화 증상의 원인이 되는 부패성 신진 대사 폐기물에 대응하는 역할을 할 수 있다고 제안했으며, 따라서 건강 증진을 위해 특정 박테리아를 섭취한다는 개념이 태어났다. 이 흥미로운 이론은 향후 수십 년 동안 연구자들이 미생물 섭취 뒤에 숨은 건강 증진 메커니즘에 초점을 맞추도록 많은 영감을 주었다.

락토바실러스 외에도 포자형성균도 같은 시기에 발견되었다. 1876년에 Ferdinand Cohn은 박테리아를 *Bacillus subtilis*로 인식하고 명명했으며, Robert Koch가 *Bacillus anthrax*의 생활사를 기술한 직후였다[9]. *Bacillus coagulans*(원래 *Lactobacillus sporogenes*로 명명됨)는 나중에 아이오와 농업 실험소에서 응유에 들어 있는 것으로 기술되었으며, 이 유기체는 1932년에 성공적으로 분리되었다[10]. 바실러스(*Bacillus*) 미생물의 독특한 포자 형성 조건은 환경에서 생존할 수 있을 뿐만 아니라 연유의 진공 건조와 같은 특정 산업 공정을 견딜 수 있는 것으로 평가되었다. 이는 포자화

된 박테리아가 산업적 식품 생산 과정에서 생존할 수 있는 잠재력을 가지고 있다는 초기 증거를 제공하였다.

21세기로 접어들면서 1994년 식이보충제 건강 및 교육법이 통과되면서 인간을 위한 프로바이오틱스로 판매되는 제품의 판매가 기하급수적으로 증가하였다[11]. 프로바이오틱스 강화 식품의 세계 시장은 2020년부터 2027년까지 연평균 7.9%의 성장률을 보이며 480억 달러에서 940억 달러로 성장할 것으로 예상된다[12]. 인간을 위한 기능성 식품에 대한 관심의 급증은 반려동물 식품 산업에서도 유사한 발전을 불러일으켰지만, 개를 위한 프로바이오틱스 사용에 대한 연구는 훨씬 적다. 예를 들어, PubMed 오픈 액세스 데이터베이스는 1990년부터 2021년 사이에 "인간" 및 "프로바이오틱스"에 대해 20,000개 이상의 출판물을 반환하는 반면, "개" 및 "프로바이오틱스"에 대해서는 대략 250개 정도의 출판물이 검색되었다. 인간에 비해 이용 가능한 연구의 규모가 작음에도 불구하고, 프로바이오틱스는 여전히 반려동물 보조제, 식품 및 간식으로 개를 위한 것으로 홍보되고 있으며 임상 실습에 사용하기 위해 수의사로부터 어느 정도의 정보를 수집하였다[13]. 빠르게 성장하는 이 시장에서는 새로운 프로바이오틱스 균주, 가공을 통한 생존 가능성, 인간에게서 관찰된 것과 유사한 건강상의 이점을 제공하는 능력에 대한 면밀한 평가가 필요하다.

2. 프로바이틱스의 정의 및 규제 현황

프로바이오틱스(probiotic)라는 용어는 "앞"을 의미하는 라틴어 전치사 "pro"와 "생명"을 의미하는 그리스어 "biotikós"에서 유래되었다. 지난 수십 년 동안 프로바이오틱스의 정의는 프로바이오틱스의 의도된 용도와 이점의 다양한 측면을 통합하도록 개선되고 있다. "프로바이오틱스"라는 용어는 반려동물 사료를 언급할 때 종종 "직접 공급되는 미생물"과 같은 의미로 사용된다. 그러나 가장 최근의 정의와 이 장의 맥락으로 사용되는 정의는 "적절한 양을 투여했을 때 숙주에게 건강상의 이점을 제공하는 살아있는 미생물"이다[14].

동물 사료에 허용되는 프로바이오틱스 균주로 승인을 받기 위한 기준에는 성분의 구성 분석, 독성학적 잠재력, 잠재적 건강 부작용에 초점을 맞춘 동물 노출 평가를 검증하기 위한 프레임워크가 포함된다[15]. 미국 식품의약국(FDA) 수의학 센터는 미국사료관리관협회(AAFCO)와 함께 1989년 처음으로 동물 사료에 사용하기 위한 박테리아 및 효모 유기체 목록을 발행하였다. 이 목록은 수년에 걸쳐 개정되어 다음을 기반으로 한 새로운 유기체를 포함하였다. 주로 돼지와 가금류에 대한 연구가 가능하였다. 현재 반려동물에게 사용하기에 안전한 것으로 간주되는 비독성 세균 종이 41종에 달한다[16]. 이들 미생물은 세포벽의 구조, 산소 내성, 포자 형성 여부 등의 생리학적 특성에 따라 더 분류될 수 있다. 이러한 미생물이 공통적으로 공유하는 특성과 이를 독특하게 만드는 특성은 특정 식품 응용 분야에서의 잠재적인 용도를 평가하는 데 중요하다.

3. 프로바이오틱스 균주의 선택 기준

안전 및 규제 지침을 준수하는 것 외에도 일반적으로 프로바이오틱스 후보는 위장관에서 직면하게 되는 두 가지 주요 화학적 스트레스 요인인 산 및 담즙염에 대해 어느 정도 저항성을 가져야 한다[17]. 개의 소화 시스템은 병원성 미생물을 효과적으로 비활성화하고 다양한 종류의 섭취된 물질에서 영양분을 추출하는 메커니즘으로 진화하였다. 개의 위장관 생리학에 대한 종합적인 검토가 가능하며 잠재적인 프로바이오틱 미생물에 가장 큰 스트레스를 가할 수 있는 조건(예: 가장 낮은 위 pH, 가장 긴 위 및 상부 장 통과 시간)을 식별하는 데 유용한 참고 자료로 사용된다[18]. 예를 들어, 다른 관련 생화학적 성분(예: 소화 효소 및 담즙염)은 시험관 내 개 위장 모델 개발에 사용되었다[19]. 이러한 조건은 개의 식이에 사용하기 위한 미생물 스크리닝에도 적용될 수 있다.

또한 상업적으로 가공된 식품에 적용하려는 모든 균주는 열, 유통기한 연장, 식품 자체의 화학적

조성(예: 매트릭스 산도, 산소 존재, 수분활성도 또는 미생물 억제제의 존재와 같은 공정 관련 스트레스에 대해 높은 탄력성을 보여야 한다[20]. 반려동물 소유자에게 음식의 일부로 프로바이오틱스를 먹이는 것은 반려동물에게 매일 투여하는 편리함을 제공하는 동시에 기존 식품에 비해 제품의 인지된 가치를 높인다[21]. 그러나 이러한 특성을 고려하지 않고 프로바이오틱스를 선택하는 경우 상업용 식품 응용 분야에서 개별 균주의 탄력성은 여전히 의문의 여지가 있다. 시장에서 얻은 반려동물 사료의 프로바이오틱스 무결성을 조사한 연구에서 샘플링된 상업용 제품의 53%가 라벨의 균주 식별 및 집락 형성 단위 보증과 관련하여 심각하게 부적합한 것으로 나타났다[22]. 이는 동물이 섭취할 때 생존 가능성을 보장하기 위해 프로바이오틱스 균주의 검증이 필요함을 강조하는 것이다.

유기체가 장까지 안전하게 전달될 수 있는 경우 박테리아의 대사 활동은 계통에 따라 다르다. 모든 박테리아 종이나 특정 종의 계통이 동일한 대사 경로를 선호하는 것은 아니다[23]. *Enterococcus, Lactobacillus* 및 *Bifidobacterium*은 동물에게 가장 일반적으로 사용되는 프로바이오틱스로서 젖산을 1차 최종 산물로 생성한다. 전통적으로 젖산을 생성하는 박테리아 균주는 그람 양성 혐기성 또는 조건성 혐기성이며 포자를 형성하지 않는다[24]. 이들 균주는 또한 숙주 미생물군에 영향을 미칠 수 있는 과산화수소 및 박테리오신과 같은 다른 물질도 생산한다[25]. 개에게 부여되는 건강상의 이점은 최근 여러 리뷰에 요약되어 있으며, 대변의 질 개선과 겉보기 총 소화관 소화율, 미생물 발효 최종 산물 및 면역체계 반응에 대한 혼합 효과가 포함된다[26]. 그러나 식품 응용을 위한 영양 세포로서 요리 및 위장 통과와 관련된 스트레스로 인해 부상 및 사망에 더 취약하다. 이러한 미생물의 생존은 마이크로캡슐화와 같은 세포 보호 기술을 사용하여 향상될 수 있다[27]. 이는 비포자성 프로바이오틱스를 포함하는 기능성 식품의 미래를 위해 매우 중요한 연구 분야로 성장하고 있다.

4. 고유한 프로바이오틱스 생존 메커니즘

많은 박테리아 종은 자신을 보호하기 위해 빠르게 변화하고 때로는 적대적인 조건에 대처할 수 있는 능력을 가지고 있다[28]. 가장 효과적인 적응 중 하나는 영양이 부족한 환경, 낮은 수분 활성도, 불리한 온도 또는 극한 pH에 반응하여 포자를 형성하는 것이다[29]. 포자화된 형태에서 미생물은 낮은 대사 및 호흡 활동을 특징으로 하는 휴면 상태로 퇴행한다[30]. *Clostridia* 및 *Bacillus* 종과 같은 그람 양성 박테리아는 박테리아 세포 내에 두꺼운 보호 장벽을 형성할 수 있다. 포자의 주요 층에는 코어, 펩티도글리칸이 풍부한 생식 세포벽 및 피질, 단백질성 코트 및 엑소스포륨이 포함된다. 환경 감지 메커니즘을 통해 포자 외부 막에 위치한 영양분 및 비영양소 수용체의 활성화와 같은 유리한 성장 조건이 감지되면 포자가 발아할 수 있다[31]. 대사적으로 휴면하는 미생물은 가공 조건에 대한 내성이 증가하고 저장 중 유통기한이 증가하기 때문에 조리 식품에서의 생존과 관련하여 유리할 수 있다[32]. 또한 포자는 영양 세포에 비해 더 높은 내열성을 나타내며 낮은 pH 조건과 외부 프로테아제 존재 하에서 지속된다. 박테리아가 적절한 환경에 도달하면 포자는 발아 과정을 시작하고 대사 활성 상태로 복원된다[33].

Bacillus spp.는 지난 10년 동안 송아지, 육계 및 새끼 돼지의 사료에서 평가된 포자 형성 속(genus)이다[34]. 이러한 연구의 주요 발견에는 반추 동물 소화관을 통한 포자 생존 검증, 성장 성능 개선 및 겉보기 전체 소화관 소화율 증가가 포함된다. 이 균주가 승인된 미생물 목록에 포함되어 있음에도 불구하고 반려동물의 식단에 *B. coagulans*에 대한 문서화된 보고는 단 하나뿐이다[33,35]. 그럼에도 불구하고 *B. coagulans*를 함유한 제품은 전국 매장에서 소비자가 구매할 수 있다. 예를 들어, *B. coagulans* GBI-30, 6086은 젖산을 생성하고 그람 양성이며 포자를 형성하는 막대 모양의 미호기성 박테리아이다. 이 균주는 미국 특허 번호 7,713,726에 따라 Ganeden Biotech(현재 위스콘신주 벨로이트 소재 Kerry의 자회사)의 연구자에 의해 개발되었다. 이는 2012년에 일반적으로 안전하다고 인정되는(GRAS) 지위를 부여받았으며 Food Chemical Codex(USP Monograph FCC 10)에 최초의 프로바이오틱 균주가 되었다. 분리체 이름 GBI-30, 6086은 ATTC(American Type

Culture Collection) 지정 번호 PTA-6086을 사용하여 최적 성장 온도 30℃를 의미한다. 이 균주의 포자는 최대 90℃의 온도에 저항성이 있으며, 시험관 내 및 생체 내 평가에서 결정된 바와 같이 위산 및 담즙염에 의한 손상에 저항하면서 체내에서 발아할 수 있다[36]. 또한 독성 및 게놈 특성과 관련하여 이 균주의 안전성이 잘 확립되어 있다[37]. 따라서 이 균주와 이와 유사한 다른 균주를 반려동물 사료 제품에 통합할 수 있는 강력한 후보로 만들 수 있다.

5. 프로바이오틱스 생존 가능성 향상

적절한 프로바이오틱스 균주를 신중하게 선택하고 공정 조건을 통해 생존을 검증하더라도 제조업체는 제품 유효 기간이 끝날 때까지 생존 가능성을 보장하지 못할 수 있다. 유통 전반, 소매 상품화, 소비자 가정에서의 식품 취급 및 보관과 같은 통제되지 않은 상황은 시간이 지남에 따라 불리한 조건과 그에 따른 생존력 손실에 기여할 수 있다. 따라서 제품의 의도된 유효 기간 동안 직접 섭취한 미생물의 생존을 더욱 뒷받침하기 위해 추가 조치를 취할 수 있다. 마이크로캡슐화는 불리한 외부 조건에 대한 추가적인 장벽으로 프로바이오틱스 세포를 물리적으로 보호하는 기술이다. 분무 건조는 대규모 생산을 위한 캡슐화 방법 중 하나이다. 이 공정에는 액체 폴리머 용액에 세포를 분산시키고, 혼합물을 균질화하고, 용매(일반적으로 물)를 증발시켜 건조된 마이크로캡슐의 매트릭스를 형성하는 과정이 포함된다. 마이크로캡슐화는 또한 박테리아 배양 유제를 펙테이트, 카파-카라기난, 로커스트 빈 검, 젤란 검 또는 한천과 같은 외부 겔화제와 함께 공압출함으로써 달성될 수 있다[38]. 공압출된 재료는 탈수 및 냉각되면 캡슐을 형성하는 작은 물방울로 분해된다.

캡슐화 재료는 식품에 사용하도록 승인되어야 하고 미생물에 무독성이며 식품 매트릭스에 적합해야 한다. 예를 들어, 인산염, 아세트산염, 구연산염과 같은 단일 전하 이온이 존재하면 이온 경쟁을 통해 알긴산칼슘 캡슐이 조기 파괴될 수 있다. 더욱이 알지네이트는 일반적으로 낮은 pH 값과 열에 매우 민감하며 가교 구조를 잃어 이러한 조건에서 매우 쉽게 보호제로서의 기능을 손상시킬 수 있다[39]. 많은 반려동물 사료 매트릭스에는 무기 미네랄 염이 포함되어 있고 약산성인 경향이 있기 때문에 이는 특정 매트릭스에서 알지네이트 캡슐화의 성능이 저하될 수 있다. 다성분 마이크로캡슐을 생성하기 위해 알지네이트와 키토산 및 폴리-L-라이신을 결합하면 프로바이오틱스의 안정성을 향상시키는 동시에 캡슐 구조를 파괴하는 물질의 파괴적인 효과를 줄일 수 있다고 제안되었다[40]. 달걀흰자, 레시틴, 유청 단백질 및 카르복시메틸 셀룰로오스도 식품 응용 분야에서 프로바이오틱스 캡슐화를 위한 알지네이트 벽대를 강화할 수 있는 호환 가능한 물질로 제안되었다.

전분은 또한 성공적인 캡슐화 기질 역할을 하는 것으로 나타났다[41]. 전분을 캡슐화제로 고려할 때 전분 아밀로스:아밀로펙틴 비율이 효과에 영향을 미치는 것으로 보고되었다. 예를 들어, 아밀로스 함량이 높은 옥수수 전분 과립은 천연 곡물 전분에 비해 열 및 소화 효소에 대한 저항성이 더 뛰어났다[42]. 캡슐화 기술의 혁신에는 프리바이오틱스, 프로바이오틱스 및 기타 생리활성 성분을 반려동물 사료 및 간식에 공동 캡슐화하는 것과 같은 다중 성분 기질이 포함된다. 캡슐화된 형태가 되면, 프로바이오틱스는 다음 섹션에서 논의되는 바와 같이 식품 생산 과정에 도입될 수 있다.

6. 상업적으로 가공된 반려동물 사료에 프로바이오틱스의 적용

원하는 균주와 제제를 선택한 후, 프로바이오틱스가 동물에게 이점을 부여하기 전에 극복해야 할 몇 가지 장애물이 있다. 식품에 포함된 프로바이오틱스의 경우 가장 강렬한 스트레스 요인 중 하나는 열처리이다. 대부분의 반려동물 사료는 유통 기한을 연장하고 바로 먹을 수 있는 완제품에 병원성 미생물이나 독소가 남아 있을 위험을 줄이기 위해 어느 정도 조리되거나 상업적으로 멸균된다. 열처리의 기본 전제는 미생물 활동을 줄이거나 파괴하는 것인데, 이는 직접 공급되는 미생물을 포함시키는 데 역효과를 낼 수 있다. 미생물 박멸은 식품안전현대화법[43], 살모넬라로 오염된 반려동물 사료

에 대한 FDA의 무관용 정책, 밀봉된 용기에 담겨 포장된 저산성 통조림 식품의 열처리에 대한 21 CFR Part 113과 같은 연방 규정에 의해 시행된다. 따라서, 표적 병원성 종이 효과적으로 비활성화되도록 식품 안전 계획 내에서 그에 따라 공정 제어가 개발된다.

외부 세포막과 펩티도글리칸 벽의 손상, 세포질 막 무결성의 손실, 세포 소기관, RNA, DNA 및 효소의 변성을 포함하여 영양 세포에 대한 열 작용에 대해 제안된 여러 메커니즘이 있다. 유기체와 열처리 강도에 따라 열의 작용으로 인해 이러한 현상이 하나 이상 발생할 수 있으며, 궁극적인 목표는 병원성 세포를 복구 불가능하게 손상시키는 것이다. 포자를 형성하는 미생물은 영양세포에 비해 더 큰 습열 저항성을 나타내는 것으로 보고되었다[44]. 포자의 내열성을 제어하는 메커니즘은 완전히 밝혀지지 않았다. 그러나 알려진 열 저항 요인에는 Ca^{2+}와 같은 2가 양이온의 축적과 포자 코어의 탈수 상태가 포함된다. Dipicolinic acid(DPA)는 양이온을 킬레이트화하여 중요한 역할을 하며, 이는 코어 중심의 낮은 수분 환경과 높은 미네랄 밀도를 유지하는 데 도움이 된다[45]. 포자 형성 과정에서 DPA를 암호화하는 유전자를 보유한 미생물은 내열성이 증가하는 경향이 있다.

1) 압출쿠킹

압출쿠킹은 오늘날 반려동물 사료의 상업적 생산에 가장 널리 사용되는 기술로, 시장 점유율 측면에서 가장 큰 반려동물 사료 범주를 나타낸다. 압출 반려동물 사료는 지속적으로 높은 처리량 시스템에서 생산되는 영양 밀도가 높고 맛이 좋으며 상온 보관이 가능한 제품이다. 압출은 사전 조절된 원료가 배럴을 통해 회전하는 스크류에 의해 운반되고 작은 개구부를 통해 강제로 통과되어 증기 플래시오프 및 팽창을 일으키는 고온, 단시간, 고전단 공정이다. 기존 제품의 압출기는 단일 또는 이중 나사 구성으로 사용할 수 있으며 특정 시스템에서 사용자 정의 가능한 나사 프로파일을 생성하기 위해 결합할 수 있는 다양한 나사 요소가 있다. 운반 과정 전반에 걸쳐 열 에너지(보통 사전 컨디셔닝 단계에서 주입되는 증기 형태)와 기계적 에너지(재료와 접촉하는 회전 나사의 전단력에 의해 생성됨)로 인해 배럴 내부 온도가 상승한다. 전분의 젤라틴화, 재료의 조리 등이 있으며, 원료에 포함되어 있을 수 있는 부패 및 병원성 미생물을 파괴하는 핵심 단계 역할을 한다[46]. 압출 중 식품 덩어리에 적용되는 특정 기계적 에너지에 대한 특정 열 에너지의 비율이 반려동물 사료 건사료의 구조적 특성에 영향을 미치는 것으로 입증되었다[46]. 병원체와 대리 미생물의 열적 파괴가 광범위하게 연구되었지만, 특정 기계적 에너지가 미생물에 미치는 영향에 대해서는 알려진 바가 거의 없다. 압출은 다른 식품 가공과 다르게 미생물 생존에 영향을 미칠 수 있다.

Bacillus spp.와 같은 호열성 유기체는 더 높은 내열성을 나타내고 따라서 멸균을 달성하기 위한 공정 개발을 위한 신뢰할 수 있는 지표가 되므로 공정 검증 연구에 더 적합한 것으로 제안된다[47]. 단일 스크류 압출 중 살모넬라균에 대한 대체 유기체로서 *Bacillus thermophilus*의 적합성을 비교하기 위해 압출기 배럴 출구 온도, 매시 공급 수분 함량 및 배럴 유지 시간에 대한 다양한 설정을 결합하여 15가지 공정 조합을 만드는 실험이 수행되었다. 동물 사료의. 연구 결과, 수분 함량 24.5%, 체류 시간 3초, 금형 온도 82℃ 이상에서 사료를 압출한 경우 살모넬라균이 생존하지 않는 것으로 나타났다. 반면, 포자 형성자인 *Bacillus stearothermophilus*는 수분 24.5%-34.5%, 체류 시간 3-11초, 압출기 다이 온도 77℃-100℃의 모든 가공 조건에서 검출되었다. 이 연구는 포자화된 미생물이 압출에서 살아남는 동시에 병원성 세포를 파괴할 수 있는 가능성을 보여준다.

2) 레토르트 요리

대부분의 반려동물 사료에 대한 레토르트 조리에는 밀봉된 용기에 담긴 저산성(pH>4.6), 고습도(>0.85 aw) 제품을 압력 용기에 주입하여 최소 121℃까지 가열하는 작업이 포함된다[48]. 모든 영양 병원체와 부패 미생물은 물론 *Clostridium botulinum* 포자를 제거하여 최종 제품을 상업적으로

무균 상태로 만든다. 식품 구성과 포장 유형에 따라 레토르트의 온도는 3-10분 동안 상승하고 121℃에서 최소 2분 동안 유지된다. 이 병원체가 원료 매트릭스 내에 존재할 경우 이 병원체의 포자 수를 12-log10 감소시킬 수 있을 만큼 보류 시간이 길어야 한다. 그런 다음 압력이 감소하고 용기가 안전하게 열릴 수 있을 때까지 찬물을 주입하여 용기 내부 온도를 냉각시킨다. 강철 또는 알루미늄 캔은 반려동물 사료 레토르트 시스템에 사용되는 가장 일반적인 포장이지만, 최근 포장 기술의 발전으로 다양한 출발 물질(일반적으로 폴리에틸렌 및 그 파생물)로 만든 파우치, 컵 및 욕조로 확장되었다. 이 방법을 사용하여 가공된 식품의 과거 시장 회수와 관련된 보툴리누스 중독의 공중 보건 위험을 완화하기 위해 제조업체에 대한 연방 규정이 21 CFR Part 113에 제정되었다. 요리하는 동안 식품 용기 내부에 존재하는 미생물에 의도적으로 가혹한 조건이 가해지기 때문에 가장 견고한 살아있는 미생물이라도 레토르트 적용에는 적합하지 않다. 그러나 프리바이오틱스와 포스트바이오틱스 성분을 포함하면 기능성에 대한 기회가 존재한다.

3) 동결건조

동결 건조된 반려동물 사료 및 간식은 생체 이용률이 높고 열 처리가 적은 제품에 대한 시장 수요가 증가함에 따라 지난 10년 동안 인기를 얻었다. 동결건조는 열이 없고 동결건조를 사용한 느린 물 제거 속도, 즉 액체상을 통과하지 않고 얼음이 증기로 직접 상전이하기 때문에 상대적으로 온화한 탈수 공정으로 간주된다. 이는 먼저 식품 준비를 냉동하고, 밀봉된 용기에 고진공을 적용하여 압력을 낮추고, 얼음이 제품에서 승화되어 응축 장치에 수집되어 시스템에서 제거되도록 함으로써 달성된다. 생존 가능한 미생물을 파괴하는 것을 목표로 하는 대부분의 반려동물 사료 제조 기술과는 반대로, 동결건조는 세균 배양 보존을 위해 선호되는 방법으로 널리 사용된다. 미생물의 저장을 용이하게 하기 위해 세포수를 제거하여 미생물을 가역적으로 비활성화할 수 있다. 이로 인해 동결건조 반려동물 사료 응용 분야는 직접 공급되는 미생물 응용 분야에 적합한 후보가 될 수 있다.

열을 사용하지 않고 제품을 탈수하므로 동결건조는 조리 공정으로 간주되지 않는다. 그러나 동결건조 반려동물 사료 제제에 사용되는 성분은 제품 디자인에 따라 미리 조리된 상태이거나 생상태일 수 있다. 반려동물 사료에 사용되는 많은 프로바이오틱스 제제는 처음에는 세포 중심부에서 수분이 제거될 때 세포막과 단백질의 손상을 방지하는 데 도움이 되는 보호 매체의 도움으로 동결 건조를 통해 보존된다. 이는 프로바이오틱 배양균의 유통기한을 연장하고 유통기한이 긴 식품에 적용할 수 있는 다운스트림 통합을 가능하게 한다. 식품 매트릭스에 혼합할 때, 이전에 탈수된 프로바이오틱스는 동결 건조될 때 세포 수분 함량이 이미 낮기 때문에 영양 박테리아보다 유리하다. 식품 매트릭스에서 대부분의 수분 제거는 박테리아 핵심 내의 물이 아닌 세포 주변의 물에서 이루어진다. 영양 세포의 경우 세포 손상의 주요 메커니즘은 세포 내 얼음 형성 중에 세포막 구조가 파괴되는 것이다[49]. 그람 음성균에 비해 그람 음성균의 생존율이 낮다는 보고도 있는데, 이는 그람 음성균의 세포벽 내 지질다당류의 존재와 펩티도글리칸 층이 더 얇기 때문인 것으로 생각된다[50]. 그러나 살아있는 세포에 대한 동결건조의 손상 효과는 식품 매개 병원체의 위험을 완화할 만큼 크지 않다. 따라서 많은 동결건조 반려동물 사료 및 간식, 특히 원료 성분을 함유한 식품은 식품 안전을 위해 동결건조 주기와 관계없이 방사선 조사 또는 고압 가공과 같은 추가 가공을 거칠 수 있다.

4) 베이킹

베이킹에는 빵, 스낵, 케이크, 토르티야, 페이스트리, 파이, 반려동물 간식, 반려동물 사료 등을 포함한 다양한 제품과 공정이 포함된다. 구운 제품은 전통적으로 시리얼 가루로 구성되어 있지만 반려동물 식품 산업에서는 육류 기반 제제도 일반적이다. 식품 보존을 위한 베이킹은 인류 문명에 기록된 가장 오래된 조리 방법 중 하나로 간주되며, 실제로 1860년 최초의 개 비스킷을 상업화하는 데

사용된 최초의 공정이었다.

기본적으로 베이킹 공정은 재료를 결합하여 반죽을 형성하고, 제품을 원하는 모양으로 형성하고, 생 반죽을 오븐에서 건열을 사용하여 요리하고, 구운 제품을 포장하기 전에 주위 온도에서 냉각하는 것으로 구성된다. 산업 규모 환경의 오븐 유형에는 가스 연소, 석유 연소 및 전기가 있으며, 철망 벨트로 반죽을 운반하는 단일 또는 다중 패스 운반 시스템이 장착되어 있다. 반죽 표면으로의 열 전달은 전도, 대류 및 복사를 통해 발생하며, 이로 인해 제품 표면에서 수분이 증발되고, 이어서 크러스트 층이 형성된다. 베이커리 제품의 표준 베이킹 시간은 오븐 설계, 시작 수분 함량, 반죽 밀도, 온도 및 원하는 완제품 특성(색상, 크기, 모양 및 질감)에 따라 2-30분이다. 베이킹은 일반적으로 압출 및 통조림 레토르트에 비해 처리량이 낮지만 메일라드 반응 생성물 형성으로 인해 바람직한 색상 및 향미가 발생하는 등의 이점을 제공한다.

베이킹 중에 살아있는 미생물이 직면하는 주요 스트레스 요인은 열이다. 일반적인 베이킹의 지속 시간과 높은 온도는 일반적으로 대장균이나 살모넬라 병원체를 비활성화하는 데 충분하지만, 병원균이나 직접 공급되는 미생물의 비활성화를 위한 상업용 베이킹 공정의 다양성에 대한 공식적인 과학적 검증은 철저하게 연구되지 않았다. 사용 가능한 데이터 전체에서 *Salmonella enterica* serovars의 ≥5 log CFU/g 감소는 17분 베이킹으로 입증되었으며, 머핀의 전기 오븐에서 190.6℃에서 21분 베이킹으로 6.1 log CFU/g 감소가 입증되었다[51]. 218.3℃에서 13분 동안 기존 오븐에서 구운 햄버거 빵에서 >6 log CFU/g을 달성하려면 더 높은 온도가 필요하였다[52]. 이는 미생물의 고유한 열 저항 특성 외에도 반죽 매트릭스의 특성과 오븐 유형에 따라 달라질 수 있는 미생물 생존의 가변성을 보여준다. 우리가 아는 한, 구운 반려동물 사료 및 간식에 포함된 병원균의 불활성화에 대한 그러한 연구는 수행되지 않았다. 그러나 압출과 같은 다른 열 공정 기술에서 수집한 학습 내용을 통해 휴면 및 마이크로캡슐화된 프로바이오틱 제제와 더 높은 열 저항 특성을 가진 프로바이오틱 제제가 베이킹 환경에 더 적합할 것이라고 기대하는 것이 합리적이다.

열 스트레스를 피하기 위해 식용 필름이나 구운 제품 표면의 코팅에 프로바이오틱 세포를 포획하는 것이 유망한 접근 방식이다. 알긴산나트륨을 기반으로 한 필름 형성 용액을 사용하여 농축 유청 단백질은 프로바이오틱스를 젤에 현탁시켜 구운 식품에 국소 코팅제로 사용할 수 있다. 기능성 전분 기반 코팅은 마이크로캡슐화된 락토바실러스 아시도필루스(*Lactobacillus acidophilus*)를 사용하여 성공적으로 구현되었으며 코팅이 94% 물, 5% 전분, 1% 마이크로캡슐화된 프로바이오틱스로 구성되어 덩어리에 적용되고 180℃에서 16분 동안 베이킹되었을 때 63% 생존을 달성하였다[53]. *Lactobacillus plantarum*(균주 CIDCA 83114)의 생존율은 알긴산 나트륨 필름(생존 세포 수의 6-log 감소)과 비교하여 옥수수 전분 기반 필름(생존 세포 수의 4 로그 감소)으로 적용했을 때 30℃에서 40분간 베이킹하는 동안 유지력이 향상된 것으로 보고되었다. 이는 전분 기반 현탁액이 베이킹 조건에서 프로바이오틱스 생존력을 보호하는 데 다른 필름보다 더 효과적일 수 있음을 시사한다. 그러나 광범위한 직접 미생물 제제, 반려동물 사료 및 간식 제제에 사용되는 원료, 적용 전략 및 가공 조건으로 인해 프로바이오틱스 생존 가능성에 대한 검증이 상업화 과정의 일부로 포함되어야 한다.

결론 및 요약

프로바이오틱스는 반려동물의 건강과 웰빙 증진에 기여하는 점점 더 많은 기능성 성분 중 하나이지만, 상업적으로 가공된 식품에 생존 가능한 미생물을 전달하는 것은 프로바이오틱스가 판매하는 생존 가능성과 효능을 보장하는 데 많은 어려움을 안겨준다. 일반적으로 반려동물 사료 제조 공정은 식품 안전을 향상시키고 유통기한을 연장하도록 설계되어 있다. 하지만 이러한 공정이 직접 공급되는 미생물의 생존에는 좋은 않은 효과를 줄 수도 있다. 따라서 의도한 적용에 적합한 적절한 균주를 선택하는 것이 매우 중요하다. 상업용 반려동물 사료 응용 분야에 사용되는 프로바이오틱스 균주를

선택할 때 고려해야 할 가장 중요한 특성 중에는 균주의 생리학적 특성(특히 내열성, 산소 내성, 산 및 담즙 저항성), 안정화 방법(예: 포자 형성, 동결 건조 또는 캡슐화), 가공조건(시간, 온도, 압력, 수분, 수분활성도, pH 포함), 도포방법, 포장 및 보관조건 등을 포함한다. 새로운 프로바이오틱스 균주로 작업할 때, 그리고 가공 조건, 제품 제형 또는 포장 디자인에 수정이 있을 때 프로바이오틱스 생존력 검증을 수행해야 한다.

Conflict of Interest

The authors declare no potential conflict of interest.

References

1. Acuff H, Aldrich CG. A review of application strategies and efficacy of probiotics in pet food. In: Kamboh AA, editor. Antibiotics and probiotics in animal food: impact and regulation. London, UK: IntechOpen; 2022.
2. Bradshaw JWS, Casey RA. Anthropomorphism and anthropocentrism as influences in the quality of life of companion animals. Anim Welf. 2007;16:149-154.
3. Hasler CM. Functional foods: benefits, concerns and challenges: a position paper from the American council on science and health. J Nutr. 2002;132:3772-3781.
4. Di Cerbo A, Morales-Medina JC, Palmieri B, Pezzuto F, Cocco R, Flores G, et al. Functional foods in pet nutrition: focus on dogs and cats. Res Vet Sci. 2017;112:161-166.
5. Gasbarrini G, Bonvicini F, Gramenzi A. Probiotics history. J Clin Gastroenterol. 2016;50:S116-S119.
6. Gogineni VK, Morrow LE, Gregory PJ, Malesker MA. Probiotics: history and evolution. J Infect Dis Prev Med. 2013;1:1-7.
7. Berche P. Louis Pasteur, from crystals of life to vaccination. Clin Microbiol Infect. 2012;18:1-6.
8. Metchnikoff E. The prolongation of life. Nature. 1908;77:289-290.
9. Drews G. The roots of microbiology and the influence of Ferdinand Cohn on microbiology of the 19th century. FEMS Microbiol Rev. 2000;24:225-249.
10. Sarles WB, Hammer BW. Observations on Bacillus coagulans. J Bacteriol. 1932;23:301-314.
11. Dietary Supplement Health and Education Act of 1994. Public law 103-417. 103rd Congress. Stat 4325 (codified at 21 U.S.C. § 301.9) [Internet]. 1994 [cited 2023 Nov 4]. Available from: https://ods.od.nih.gov/About/DSHEA_Wording.aspx
12. Fortune Business Insights. Probiotics market size, share & covid-19 impact analysis, by microbial genus (Lactobacillus, Bifidobacterium, and yeast), application (functional foods & beverages, dietary supplements, and animal feed), distribution channel (supermarkets/hypermarkets, pharmacies/health stores, convenience stores, online retail, and others), and regional forecast, 2020-2027 [Internet]. 2020 [cited 2023 Nov 1]. Available from: https://www.fortunebusinessinsights.com/industry-reports/prob

iotics-market-100083
13. Schmitz SS. Value of probiotics in canine and feline gastroenterology. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2021;51:171-217.
14. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, et al. The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2014;11:506-514.
15. Bajagai YS, Klieve AV, Dart PJ, Bryden WL. Probiotics in animal nutrition: production, impact and regulation. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2016. p. 179.
16. Association of American Feed Control Officials [AAFCO]. Official publication. Champaign, IL: Association of American Feed Control Officials; 2022.
17. Shewale RN, Sawale PD, Khedkar CD, Singh A. Selection criteria for probiotics: a review. Int J Probiotics Prebiotics. 2014;9:17-22.
18. Kararli TT. Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. Biopharm Drug Dispos. 1995;16:351-380.
19. Duysburgh C, Ossieur WP, De Paepe K, Van den Abbeele P, Vichez-Vargas R, Vital M, et al. Development and validation of the simulator of the canine intestinal microbial ecosystem (SCIME). J Anim Sci. 2020;98:skz357.
20. Tripathi MK, Giri SK. Probiotic functional foods: survival of probiotics during processing and storage. J Funct Foods. 2014;9:225-241.
21. Urala N, Schutz H, Spinks J. Consumer perceptions of "functional food" in the United States. J Food Prod Mark. 2011;17:407-419.
22. Marteau P. Evidence of probiotic strain specificity makes extrapolation of results impossible from a strain to another, even from the same species. Ann Gastroenterol Hepatol. 2011;2:1-3.
23. Song D, Ibrahim S, Hayek S. Recent application of probiotics in food and agricultural science. In: Rigobelo EC, editor. Probiotics. London, UK: IntechOpen; 2012.
24. Holzapfel WH, Haberer P, Geisen R, Björkroth J, Schillinger U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. Am J Clin Nutr. 2001;73:365S-373S.
25. Baffon L. Probiotics and prebiotics for the health of companion animals. In: Di Gioia D, Biavati B, editors. Probiotics and prebiotics in animal health and food safety. Cham, Switzerland: Springer; 2018. p. 175-195.
26. Terpou A, Papadaki A, Lappa IK, Kachrimanidou V, Bosnea LA, Kopsahelis N. Probiotics in food systems: significance and emerging strategies towards improved viability and delivery of enhanced beneficial value. Nutrients. 2019;11:1591.
27. Pedraza-Reyes M, Ramirez N, Vidales L, Robleto E. Mechanisms of bacterial spore survival. In: Abel-Santos E, editor. Bacterial spores: current research and applications. Poole, UK: Caister Academic Press; 2012. p. 73-88.
28. Checinska A, Paszczynski A, Burbank M. Bacillus and other spore-forming genera:

variations in responses and mechanisms for survival. Annu Rev Food Sci Technol. 2015;6:351-369.
29. Errington J. Regulation of endospore formation in Bacillus subtilis. Nat Rev Microbiol. 2003;1:117-126.
30. Cabrera-Martinez RM, Tovar-Rojo F, Vepachedu VR, Setlow P. Effects of overexpression of nutrient receptors on germination of spores of Bacillus subtilis. J Bacteriol. 2003;185:2457-2464.
31. Konuray G, Erginkaya Z. Potential use of Bacillus coagulans in the food industry. Foods. 2018;7:92.
32. Setlow P. Germination of spores of Bacillus species: what we know and do not know. J Bacteriol. 2014;196:1297-1305.
33. Zhou X, Wang Y, Gu Q, Li W. Effect of dietary probiotic, Bacillus coagulans, on growth performance, chemical composition, and meat quality of Guangxi yellow chicken. Poult Sci. 2010;89:588-593.
34. Acuff HL, Aldrich CG. Evaluation of graded levels of Bacillus coagulans GBI-30, 6086 on apparent nutrient digestibility, stool quality, and intestinal health indicators in healthy adult dogs. J Anim Sci. 2021;99:skab137.
35. Honda H, Gibson GR, Farmer S, Keller D, McCartney AL. Use of a continuous culture fermentation system to investigate the effect of GanedenBC30 (Bacillus coagulans GBI-30, 6086) supplementation on pathogen survival in the human gut microbiota. Anaerobe. 2011;17:36-42.
36. Salvetti E, Orrù L, Capozzi V, Martina A, Lamontanara A, Keller D, et al. Integrate genome-based assessment of safety for probiotic strains: Bacillus coagulans GBI-30, 6086 as a case study. Appl Microbiol Biotechnol. 2016;100:4595-4605.
37. Burgain J, Gaiani C, Linder M, Scher J. Encapsulation of probiotic living cells: from laboratory scale to industrial applications. J Food Eng. 2011;104:467-483.
38. Chuang JJ, Huang YY, Lo SH, Hsu TF, Huang WY, Huang SL, et al. Effects of pH on the shape of alginate particles and its release behavior. Int J Polym Sci. 2017; 2017:1-9.
39. Khosravi Zanjani MA, Ehsani MR, Ghiassi Tarzi B, Sharifan A. Promoting probiotics survival by microencapsualtion with hylon starch and genipin cross-linked coatings in simulated gastro-intestinal condition and heat treatment. Iran J Pharm Res. 2018; 17:753-766.
40. O'Riordan K, Andrews D, Buckle K, Conway P. Evaluation of microencapsulation of a Bifidobacterium strain with starch as an approach to prolonging viability during storage. J Appl Microbiol. 2001;91:1059-1066.
41. Muhammad Z, Ramzan R, Zhang R, Zhang M. Resistant starch-based edible coating composites for spray-dried microencapsulation of Lactobacillus acidophilus, comparative assessment of thermal protection, in vitro digestion and physicochemical characteristics. Coatings. 2021;11:587.
42. United States Food & Drug Administration [FDA]. Preventive control guidance for industry final rule for animal food [Internet]. 2017 [cited 2023 Nov 5]. Available

from: https://www.fda.gov/food/food-safety-modernization-act-fsma/fsma-final-rule-preventive-controls-animal-food#:~:text=This%20rule%20requires%20animal%20food,minimize%20or%20prevent%20those%20hazards.

43. Kort R, O'Brien AC, van Stokkum IHM, Oomes SCJM, Crielaard W, Hellingwerf KJ, et al. Assessment of heat resistance of bacterial spores from food product isolates by fluorescence monitoring of dipicolinic acid release. Appl Environ Microbiol. 2005;71:3556-3564.
44. Beaman TC, Gerhardt P. Heat resistance of bacterial spores correlated with protoplast dehydration, mineralization, and thermal adaptation. Appl Environ Microbiol. 1986;52:1242-1246.
45. Pacheco PDG, Putarov TC, Baller MA, Peres FM, Loureiro BA, Carciofi AC. Thermal energy application on extrusion and nutritional characteristics of dog foods. Anim Feed Sci Technol. 2018;243:52-63.
46. Okelo PO, Joseph SW, Wagner DD, Wheaton FW, Douglass LW, Carr LE. Improvements in reduction of feed contamination: an alternative monitor of bacterial killing during feed extrusion. J Appl Poult Res. 2008;17:219-228.
47. Li Y, Hsieh F, Fields ML, Huff HE, Badding SL. Thermal inactivation and injury of clostridium sporogenes spores during extrusion of mechanically deboned turkey mixed with white corn flour. J Food Process Preserv. 1993;17:391-403.
48. Guo N, Wei Q, Xu Y. Optimization of cryopreservation of pathogenic microbial strains. J Biosaf Biosecur. 2020;2:66-70.
49. Miyamoto-Shinohara Y, Sukenobe J, Imaizumi T, Nakahara T. Survival of freeze-dried bacteria. J Gen Appl Microbiol. 2008;54:9-24.
50. Channaiah LH, Holmgren ES, Michael M, Sevart NJ, Milke D, Schwan CL, et al. Validation of baking to control Salmonella serovars in hamburger bun manufacturing, and evaluation of Enterococcus faecium ATCC 8459 and Saccharomyces cerevisiae as nonpathogenic surrogate indicators. J Food Prot. 2016;79:544-552.
51. Channaiah LH, Michael M, Acuff JC, Phebus RK, Thippareddi H, Olewnik M, et al. Validation of the baking process as a kill-step for controlling Salmonella in muffins. Int J Food Microbiol. 2017;250:1-6.
52. Altamirano-Fortoul R, Moreno-Terrazas R, Quezada-Gallo A, Rosell CM. Viability of some probiotic coatings in bread and its effect on the crust mechanical properties. Food Hydrocoll. 2012;29:166-174.
53. González-Forte L, Bruno E, Martino M. Application of coating on dog biscuits for extended survival of probiotic bacteria. Anim Feed Sci Technol. 2014;195:76-84.