

## Microbiological and Chemical Changes of Complete Feed during Spoilage

Kwonjung Yi<sup>1†</sup>, Jae-Sung Yeon<sup>1†</sup>, Juhyeon Kim<sup>1</sup>, Sam Churl Kim<sup>2</sup>, Hyung-In Moon<sup>3</sup>, Che Ok Jeon<sup>4</sup>, Sang Suk Lee<sup>5</sup>, Dong-Woon Kim<sup>6</sup> and Soo-Ki Kim<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Science and Technology, Konkuk University, Seoul 05029, Korea

<sup>2</sup>Department of Animal Science, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Korea

<sup>3</sup>Department of Medicinal Biotechnology, Dong-A University, Busan 49315, Korea

<sup>4</sup>School of Biological Sciences, Chung-Ang University, Seoul 06974, Korea

<sup>5</sup>Department of Animal Science and Technology, Suncheon National University, Suncheon 57922, Korea

<sup>6</sup>National Institute of Animal Science, RDA, Wanju 55365, Korea

Received September 26, 2015 / Revised October 19, 2015 / Accepted October 20, 2015

Commercial complete feeds contain enough nutrients to support animal growth and it is easy to be spoiled under proper temperature and humid conditions. The aim of this study was to investigate microbiological and chemical changes on complete feed for milking cow under open-air exposure with moisture 33% at 30°C during 15 days. pH decreased 6.29 to 4.66 and water activity decreased gradually 0.99 to 0.95. Bacteria increased  $6.2 \times 10^6 \sim 1.6 \times 10^7$  to  $2.1 \times 10^9$  CFU/g at 5 days and showed  $10^8$  CFU/g until 15 days. Fungi increased  $10^3$  CFU/g to  $8.0 \times 10^4$  CFU/g. During the processing of spoilage, bacteria such as *Acinetobacter oleivorans*, *Pediococcus acidilactici*, *Acinetobacter oleivorans*, *Weissella cibaria*, and *Methylobacterium komagatae* were identified and fungi such as *Fusarium* sp. and *Mucor* sp. were also identified. Moisture content increased until 10 days ( $p < 0.01$ ). Crude protein was not changed so much whereas crude fat decreased 6.0% to 5.5% ( $p < 0.01$ ). Crude fiber and crude ash changed 2.0~3.0% and 4.5~4.8% levels with no significance, respectively. Gross energy was not almost changed at 4,400 kcal/g. During spoilage, lactate and propionate increased whereas acetate was not detected. Protease and lipase activities increased significantly during spoilage ( $p < 0.01$ ). Zearalenone content increased 59.2 µg/kg to 623.8 µg/kg, showing 10.5 times more production. During feed spoilage, pH decreased with microbial growth and various chemical changes were occurred.

**Key words** : Feed, microorganism, monitoring, spoilage, zearalenone

### 서론

사료의 부패(Spoilage)는 독성물질과 암모니아, 황화수소 등 유해물질을 생성하면서 유기물질의 변화를 초래하는 과정으로 정의할 수 있다[4, 24]. 옥수수, 콩, 보리를 비롯한 사료작물은 성장하면서 토양환경의 미생물에 의하여 자연히 노출되어, 수확 시에 다양한 세균과 곰팡이로 오염되게 마련이다. 사료 원료들의 제조과정 중, 고온의 펠렛 성형과 팽창을 통해 대부분 미생물이 사멸하게 된다. 그러나 제조 후부터 사료의 유통과정 동안 공기 중의 미생물에 의하여 오염되거나 사료 내 잔존하는 미생물들이 다시 증식하게 되고 적당한 환경 조건하에서는 사료의 부패가 발생한다. 가축의 배합사료에는 옥

수수, 대두박, 소맥피, 옥태분말 등 곡류와 아미노산, 비타민, 다양한 미네랄 등을 포함하고 있어 미생물에 의하여 변질되기가 쉽다. *Fusarium*의 경우 곰팡이독소(Mycotoxin)를 생산하는 적정 조건은 곡류의 종류에 따라 조금씩 다르나 온도는 20~30°C이고 수분활성도( $a_w$ )는 0.97~0.99의 범위로 알려져 있다 [31].

사료 내 곰팡이독소 규제는 국가별로 조금씩 다르다. 국내에서는 아플라톡신(aflatoxin) B1, B2, G1 그리고 G2의 허용기준을 어린송아지 및 어린병아리용, 젓먹이 및 젓뎨돼지용, 육계전기용, 비유젓소용 배합사료의 경우 10 ppb, 프리믹스 사료를 제외한 기타 배합사료의 경우 20 ppb, 단미사료의 경우 50 ppb로 규제하고 있다. 오크라톡신(ochratoxin) A는 배합사료의 경우 200 ppb, 단미사료의 경우 250 ppb 이하로 규제하고 있다. 그밖에 제랄레논(zearalenone), 디옥시니발레놀(deoxynivalenol), 푸모니신(fumonisin), T-2 독신(T-2 toxin), HT-2 독신(HT-2 toxin) 등은 권고기준이 존재하지만 규제는 이루어지고 있지 않다. 한편 “사료 등의 기준 및 규격(2015)”에 의하면 일반사료 내 세균의 오염은 살모넬라만 불검출을 기준으로 규제하고 있다. 반면 EU의 경우 “COMMISSION REGULATION (EU) No 142/2011”에 의하면 일반사료에서

<sup>†</sup>Authors contributed equally.

\*Corresponding author

Tel : +82-2-450-3728, Fax : +82-2-458-3728

E-mail : sookikim@konkuk.ac.kr

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.

살모넬라, 클로스트리듐 등은 불검출을 기준으로 규제하고 있으며, 장내세균은 허용기준을 10~300 CFU/g으로 규제하고 있어 국내와 비교하면 강화되어 있다.

부패된 사료를 가축이 섭취하면 소화장애, 장기 손상 및 번식장애를 일으켜 성장을 억제시키고 가축의 생산성을 떨어뜨린다. *Fusarium*속 곰팡이에서 발생하는 제랄레논은 젖소에서 불임, 수태율 및 유량 감소 등을 초래하고, 육우에게 제랄레논이 포함된 사료를 급여하였을 때 생식 상피세포와 정자에 악영향을 미친다[11, 37]. 또한 제랄레논 및 그 대사산물이 발정주기 또는 임신기간 중에 작용하여, 젖소, 돼지, 양 등 가축의 번식기능에 나쁜 영향을 미친다[17, 30]. 제랄레논과 같이 *Fusarium*속 곰팡이가 생산하는 독소인 디옥시니발레논은 젖소의 유량 및 증체에 영향을 주지 않고 우유로 전이되지 않으며, 소의 건강이나 사양성적에도 크게 영향을 미치지 않는 것으로 보고되었다[6, 17]. 그러나 돼지의 경우 디옥시니발레논은 사양성적 및 사료효율을 감소시킨다[9].

국내에서 사료 내 곰팡이독소의 부패오염 조사에 대한 보고 건수는 많지 않으나 아플라톡신, 니발레놀(nivalenol), 디옥시니발레놀, T-2 독신 및 제랄레논 등의 곰팡이독소의 오염 조사 결과가 보고된 바 있다[2]. Song 등은 국내 양돈장의 사료 내 아플라톡신 오염도를 조사한 결과 젓먹이, 젓뎀돼지용 배합사료의 경우 검사 사료 265개 중 11개(약 4.2%)에서 10 ppb를 넘는 아플라톡신 농도를 확인하였다고 보고하였다[33]. 그러나 사료의 부패과정 중 미생물학적, 화학적, 영양학적으로 발생하는 다양한 변화 측면에서는 그다지 보고되어 있지 않다. Kim 등은 특히 여름철 고온 다습한 조건일수록 사료 내 미생물은 증식속도가 빠르게 나타나고 유익한 생균제인 내열성이 강한 *Bacillus subtilis* 균주를 사용하면, 여름철 사료빈 내에 병원성 세균과 곰팡이의 오염을 억제할 수 있는 것으로 보고하였다[22].

따라서 본 연구는 착유우용 배합사료를 이용하여 적절한 온도와 습도를 갖춘 후 공기에 노출시키면서, 사료 내 미생물 및 화학적 변화를 분석하여 부패과정을 모니터링하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험설계 및 샘플링

착유우용 시판사료의 영양학적 및 일반성분 조성은 Table 1과 같으며, 이 사료를 1회 개봉한 후 당일 밀봉하여 2달간 냉장 보관한 샘플을 본 실험에 사용하였다. 사료 샘플은 3반복으로 제조하였으며, 부패가 일어나기 쉽도록 수분을 최종 33%로 조정하여 30℃에 보관하면서 샘플링을 하였다. 생균수, pH 및 수분활성도 측정은 샘플 채취 후 바로 분석하였으며, 그 밖의 항목 측정은 샘플 채취 후 분석 시까지 -20℃에 보관한 것을 사용하였다.

Table 1. Ingredient and nutrient composition of experimental diet

Ingredient	%
Corn	25.80
Wheat	16.67
Corn gluten feed	10.00
Soybean meal	15.90
Rapeseed meal	5.00
Palm kernel expeller	14.90
Sesame oil meal	2.10
Rumen-protected fat	1.00
Molasses	4.00
Limestone	1.50
Calcium sulfate	0.26
Calcium phosphate	0.87
Salt	0.50
Sodium bicarbonate	0.50
Magnesium oxide	0.05
Potassium chloride	0.20
Celmanax <sup>1</sup>	0.20
Vitamin and mineral premix <sup>2</sup>	0.55
Total	100.00
Item	%
DM	86.65
CP	18.02
Fat	4.08
Fiber	5.70
Ash	6.51
Calcium	1.02
Phosphorus	0.55
NDF	19.71
ADF	9.38

<sup>1</sup>Yeast culture, Glucosamine, Glucomannans, Mannan-oligosaccharide, Nucleotide, Galactosamine, β-Glucan

<sup>2</sup>Vitamin-mineral premix contained (DM basis) 10,000,000 IU/kg of vitamin A; 2,000,000 IU/kg of vitamin D<sub>3</sub>; 20,000 IU/kg of vitamin E; 50,000 mg/kg of Fe; 10,000 mg/kg of Cu; 64,000 mg/kg of Mn; 40,000 mg/kg of Zn; 600 mg/kg of I; 600 mg/kg of Se; 100 mg/kg of Co

### 생균수, pH 및 수분활성도

부패가 진행되는 동안 사료 내의 생균수, pH 및 수분활성도의 변화를 알아보기 위해 모든 시료를 제조한 날을 포함하여 5일 간격으로 15일 동안 생균수, pH 및 수분활성도를 측정하였다. 시료를 약 15 g을 채취한 후 바로 Aquaspector (AQS-31, NAGY Messsysteme GmbH, Germany)로 수분활성도를 25℃에서 측정하였다. 생균수의 측정을 위해 모든 샘플에서 1 g의 시료를 채취하여 멸균 증류수 9 ml로 희석(1:9)한 후 단계 희석하여서 NA, MRS, LB, YM 및 PDA 평판배지에서 생균수를 측정하였다. 모든 배지는 Difco사(USA)의 것을 사용하였으며 그 지침에 따라 제조하였다. NA, MRS, LB 평판배지는 37℃에

서 24시간, YM 평판배지는 30°C에서 48시간, PDA 평판배지는 25°C에서 72시간 동안 배양하였다. 또한, 10배로 희석한 사료의 pH를 pH/ISE meter 735P (Istek, Inc., Republic of Korea)로 측정하였다.

### 일반성분 분석

시료에 대하여 총에너지는 Bomb calorimeter (Model C2000, IKA, Germany)로 측정하였으며 수분, 조단백, 조지방, 조섬유 및 조회분은 AOAC 방법[3]에 따라 분석하였다.

### 효소활성

효소활성을 측정하기 위하여 사료 5 g을 Methanol 30 ml로 상온에서 1시간 추출한 후 8,000× g에서 10분 동안 원심분리하였다. 이 상등액을 여과지(ADVANTEC Toyo No. 1, Toyo Roshi Kaicha, Japan)로 여과하여 단백질분해효소(protease) 활성 측정에 사용하였다. 사료 내의 단백질분해효소 활성은 Tyrosine을 이용한 Folin과 Ciocalteu의 방법(1927)을 사용하였다[14]. Methanol 추출액 1 ml에 기질로써 Casein 5 ml를 첨가하여 30분간 37°C에서 진탕 배양하였다. 그 후, 110 mM의 Trichloroacetic acid를 5 ml 넣고 또 다시 37°C에서 30분간 진탕 배양하였다. Syringe filter (0.45 µm)를 이용하여 여과한 용액 2 ml, 500 mM Sodium carbonate solution 5 ml, Folin & Ciocalteu's phenol reagent 1 ml의 순서로 넣은 후 37°C에서 30분간 진탕 배양하였다. 다시 한번 Syringe filter (0.45 µm)로 여과한 후 Elisa reader (Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader, BioTek, USA)를 이용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. L-tyrosine 용액으로 작성한 표준곡선에 흡광도를 대입하여 Tyrosine의 생성량을 구하였고, 1 unit은 1분간 1 µg의 Tyrosine을 생성하는 능력으로 계산하였다.

지방분해효소(Lipase) 활성 측정에는 상기 여과액을 감압 농축기(RE111, Büchi, Germany)로 5배 농축한 샘플을 사용하였다. Lipase 활성은 50 mM *p*-Nitrophenyl butyrate 0.3 ml, 에탄올 1.2 ml, 50 mM Tris-HCl buffer 28.5 ml 그리고 메탄올로 추출한 시료 1.5 ml를 넣었다. 37°C에서 30분간 반응시킨 후 Elisa reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도 측정값으로 반응 산물인 *p*-Nitrophenol (*p*-NP)의 양을 계산하였으며 *p*-NP 용액으로 표준곡선을 이용하였다. 효소활성 1 unit은 1분간 1 µM의 *p*-NP를 생성하는 능력으로 계산하였다.

### 미생물의 분리 및 동정

실험 사료 내 주로 자생하고 있는 미생물을 동정하기 위하여 각 실험 일자 별로 사료 샘플을 채취하였다. 각 샘플을 희석한 후 평판배지에 도말하여 콜로니 중 형태학적으로 서로 다른 세균과 곰팡이를 분리하였다. 분리한 세균에 대한 16S rRNA 염기서열은 Biofact (Daejeon, Korea)에 의뢰하여 분석

하였으며 Primer 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')와 Primer 1492R (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T -3')을 사용하여 PCR로 증폭한 후 Primer 337F (5'-GAC TCC TAC GGG AGG CWG CAG-3')를 사용하여 ABI 3730XL DNA analyzer로 염기서열을 분석하였다. 곰팡이에 대한 5.8S rRNA 염기서열은 Macrogen (Seoul, Korea)에 의뢰하여 분석하였으며 Primer ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT TGC GG-3')와 ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3')을 사용하여 PCR로 증폭한 후 동일한 Primer를 사용하여 ABI 3730XL DNA analyzer로 염기서열을 분석하였다. 상동성 검색은 NCBI의 BLAST를 이용하였다.

### 유기산 분석

Adesogan 등의 방법에 따라 유기산 분석을 실시하였다[1]. 물로 추출한 사료를 1.5 ml 튜브에 넣고 15분간 5,645× g로 원심분리 하여 그 상등액을 이용하였다. 젯산과 VFA는 UV detector (L-2400, Hitachi, Japan)와 컬럼(Metacarb 87H, Varian, Palo Alto, CA, USA)을 장착한 HPLC (L-2200, Hitachi, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다.

### 통계처리

본 실험 결과는 SAS program (ver. 9.1 Statistics Analytical System)의 General Linear Model 방법을 이용하여 분산분석을 하였다. 각 기간의 평균값을 비교하기 위해 Duncan's multiple range test를 이용하여 유의성 검정을  $p < 0.05$  수준에서 실시하였다.

## 결과 및 고찰

### 사료의 pH, 수분활성도 및 미생물학적 변화

사료가 부패되면서 일어나는 과정에서 pH, 수분활성도 및 미생물의 성장을 관찰하였다. pH는 실험 개시 시점에 6.29에서 5일째에 4.66으로 떨어진 후 15일까지 비슷한 수준으로 유지되었다(Fig. 1A). 수분활성도는 0.99에서 시작하여 15일에는 0.95까지 감소하였다(Fig. 1B). 수분이 약 20%를 넘어서면 수분활성도는 급격하게 1.0에 가까워지는 것이 보고되었다[25]. 본 실험에서도 수분을 약 33%로 조정하였기 때문에 수분활성도가 1.0에 가까운 것으로 사료된다. 사료부패에서 곰팡이의 경우, 5°C와 같은 낮은 온도에서는 0.90~0.96 수준의 높은 수분활성을 필요로 한다. 하지만 온도가 25°C로 높아지게 되면 0.80~0.88 수준의 비교적 낮은 수분활성에서도 곰팡이의 성장이 가능하게 된다[27, 28].

실험 시작일에 배합사료 내 서식하는 생균수는 약  $10^7$  CFU/g으로 나타났다(Fig. 1C). 이는 배합사료를 개봉한 후 2달 정도 지난 샘플이기 때문으로 이미 공기 중의 오염된 세균이 증식하였음을 나타낸다. 모든 배지에서 5일 후에 생균수가

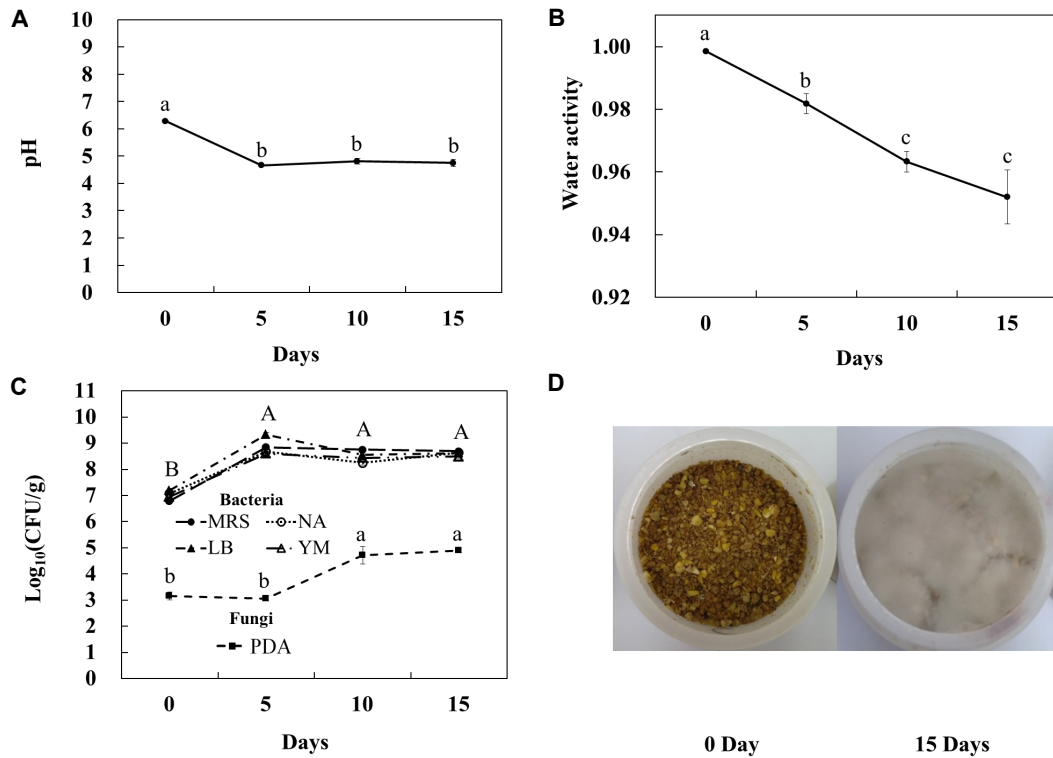


Fig. 1. Change of pH (A), water activity (B), microbial growth (C), and complete feed for dairy milking cow before and after spoilage (D). Means±SD with different superscripts mean significant differences based on Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

증가하면서 MRS와 YM배지에서는 각각  $7.0 \times 10^8$ ,  $4.0 \times 10^8$  CFU/g로 증가하여 비슷한 수준으로 유지되었다. NA배지에서는  $4.9 \times 10^8$  CFU/g로 증가한 생균수가 15일째에도 비슷하게 유지되었다. LB배지에서도 5일째에  $2.1 \times 10^9$  CFU/g으로 증가한 생균수가 계속 유지되었다. 실험 5일 후부터 모든 배지에서 생균수가 증가하였는데 이는 수분함량, 수분활성도, pH 및 온도 등이 모두 미생물의 증식에 최적의 환경을 만들어 주었기 때문으로 보인다[16]. 실험 15일째에 실험사료에 곰팡이가 많이 증식된 것이 육안으로도 확인되었다(Fig. 1D). 시작일에 곰팡이는  $1.5 \times 10^3$  CFU/g로 측정되었으며, 10일차부터는  $6.0 \times 10^4$  CFU/g, 15일차에  $8.0 \times 10^4$  CFU/g로 증가하였다. 부패가 진행되는 동안, 후기에는 미생물의 총균수는 더이상 증가하지 않지만 미생물이 생산하는 대사산물은 계속 증가되는 것으로 사료된다.

### 사료 내 미생물의 동정

Fig. 1C에서 사료 내 오염 세균을 동정하고자 형태학적으로 서로 다른 세균의 콜로니를 LB에서 3종, MRS에서 3종, NA에서 2종, YM에서 3종을 분리하여 16S rRNA의 염기서열을 분석하여 동정하였다(Table 2). *Acinetobacter oleivorans* (SK3806, SK3812)는 토양 및 논에서 분리되는 균이다[20]. *Pantoea agglomerans* (SK3807)는 식물 표면, 동물의 분변 및 장내에서 분리되며 인체에서 순환계, 면역계 등에 질병을 유발하는 식물

병원균이다[8]. *Lactobacillus paraplantarum* (SK3808)와 *Pediococcus acidilactici* (SK3809, SK3811)는 생균제 등으로 활용되는 유익균이다[29, 34]. *Pediococcus lolii* (SK3810)는 사일리지에서 주로 분리되는 균이며[12], *Weissella cibaria* (SK3814, SK3815)는 동물의 분변, 김치 등에서 분리되며 생균제로 활용되는 유익균이다[19]. *Methylobacterium komagatae* (SK3816)은 메탄올을 이용하는 균으로 식품가공장 등에서 분리된다[5, 21]. LB, MRS, NA 배지에 주로 관찰된 각각의 균주는 *A. oleivorans* SK3806, *P. acidilactici* SK3809, *A. oleivorans* SK3812이었다. YM 배지의 경우 0-10일차에는 *W. cibaria* SK3814, 15일차에는 *M. komagatae* SK3816이 주로 성장하였다. 곰팡이는 PDA에서 7개를 분리하였고 *Mucor*속 2종(F15, F16), *Fusarium*속 3종(F104, F107, F109) 및 *Hyphopichia burtonii* F106, *Alternaria alternata* F113 등으로 동정되었으며, *Fusarium*속과 *Mucor*속 곰팡이가 주를 이루었다. *Mucor circinelloides*는 접합진균증을 일으키는 병원성 곰팡이이며[13, 18] *Fusarium*속 곰팡이는 곰팡이독소 중 주로 제랄레논과 디옥시니발레논 등을 생성하는 것으로 알려져 있다[10, 23, 32]. *H. burtonii*는 식품 부패에 관련하여 풍미를 잃게 하는 styrene을 생성하며[15], *A. alternata*는 곰팡이 독소인 푸모니신 B1을 생성한다[7].

### 사료의 영양학적 변화

사료의 수분은 실험 당일 33%에서 10일까지 증가하였다

Table 2. Identification of contaminated microorganisms in complete feed

Microorganism/ Isolated media	Stock #	Homology	Query	Max	References
			Coverage	Identity	
<b>Bacteria/</b>					
LB	SK3806	<i>Acinetobacter oleivorans</i>	100	100	[20]
	SK3807	<i>Pantoea agglomerans</i>	100	99	[8]
	SK3808	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	100	100	[34]
MRS	SK3809				
	SK3811	<i>Pediococcus acidilactici</i>	100	99	[29]
	SK3810	<i>Pediococcus lolii</i>	100	99	[12, 36]
NA	SK3812	<i>Acinetobacter oleivorans</i>	100	99	[20]
	SK3813	<i>Pediococcus acidilactici</i>	100	99	[29]
YM	SK3814, SK3815	<i>Weissella cibaria</i>	100	100	[19, 26]
	SK3816	<i>Methylobacterium komagatae</i>	99	99	[5, 21]
<b>Fungi/</b>					
PDA	F15	<i>Mucor circinelloides</i> f. <i>circinelloides</i>	99	94	[18]
	F16	<i>Mucor circinelloides</i>	98	95	[13]
	F104	<i>Fusarium verticillioides</i>	100	100	[10]
	F106	<i>Hyphopichia burtonii</i>	100	100	[15]
	F107	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	100	[32]
	F109	<i>Fusarium subglutinans</i>	100	100	[35]
	F113	<i>Alternaria alternata</i>	100	100	[7]

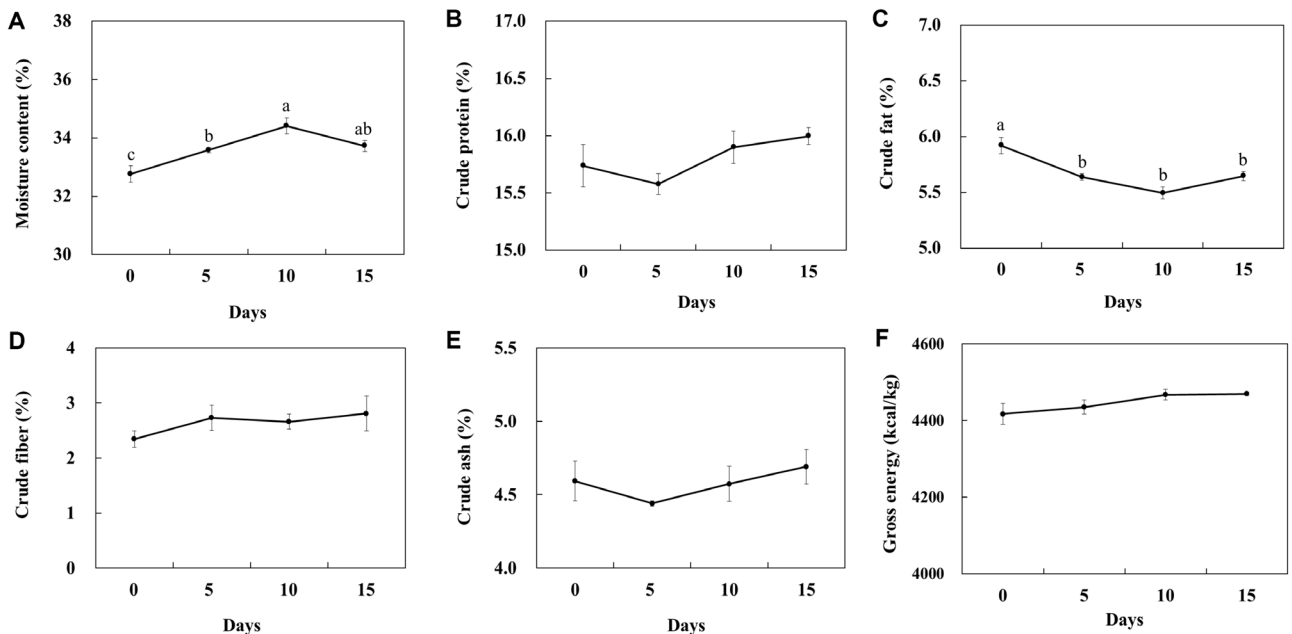


Fig. 2. Change of nutrients during spoilage. Moisture content (A), crude protein (B), crude fat (C), crude fiber (D), crude ash (E), and gross energy(kcal/kg) (F). Means±SD with different superscripts mean significant differences based on Duncan’s multiple range test ( $p < 0.05$ ).

( $p < 0.01$ ) (Fig. 2A). 수분의 증가는 미생물 증식으로 인하여 대사산물인 물이 생성되었기 때문인 것으로 판단된다. 조단백질 함량은 15.5~16.0% 수준을 보였으며 5일부터 증가하는 경향을 보였으나 통계적 유의차는 나타나지 않았다(Fig. 2B). 조지

방은 초기에 6.0%에서 5.5%로 유의적으로 감소하였다( $p < 0.01$ ) (Fig. 2C). 조섬유와 조회분은 각각 2.0~3.0%와 4.5~4.75% 수준을 유지하였다(Fig. 2D와 E). 한편 총에너지는 4,400 kcal/g 수준으로 유지되었다(Fig. 2F).

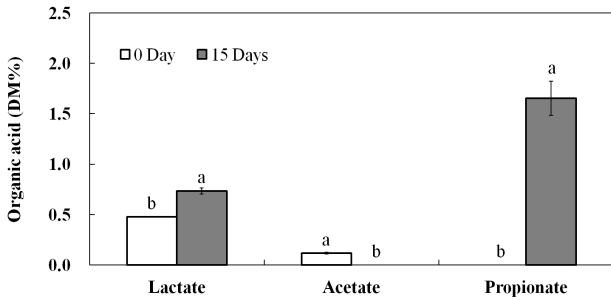


Fig. 3. Change of lactate, acetate, and propionate during spoilage. Means±SD with different superscripts mean significant differences based on Duncan's multiple range test ( $p<0.05$ ).

**사료의 젖산, 아세트산, 프로피온산의 변화**

실험 개시 시 건물함량(Dry matter)이 67.0%인 사료 내 젖산(Lactate)과 아세트산(Acetate)의 함량은 각각 0.5, 0.1 DM% 이었으며 프로피온산(Propionate)은 검출되지 않았다(Fig. 3). 15일차의 사료의 건물함량은 66.3%로 젖산 함량은 0.7 DM%로 약간 증가하였으며 아세트산은 검출되지 않았다( $p<0.01$ ). 실험 초기에 검출되지 않았던 프로피온산의 경우 15일차에 1.7 DM%로 측정되었다. 본 실험에서는 사료가 부패되면서 젖산과 프로피온산은 증가하였고 아세트산은 검출되지 않았으나, 그 밖의 다양한 휘발성 지방산 분석 결과로부터 부패과정 동안의 화학적 변화를 종합적으로 고찰할 필요가 있다.

**사료의 protease 및 lipase 활성 변화**

단백질분해효소 활성은 실험 개시 시 17.4 units/mg에서 10일째까지 23.3 units/mg로 1.3배 증가하여 15일째에는 유의적인 차이를 보이지 않았다(Fig. 4A). 지방분해효소 활성은 실험 개시점에서 41.5 units/mg으로 5일째까지 유의적인 변화를 보이지 않다가, 그 이후 122.3 units/mg으로 증가하였다(Fig. 4B). 한편 사료부패에 amylase 활성이 관여하고 있다는 보고는 없으며, 본 연구에서도 사료의 메탄올 추출물과 물 추출물을 가지고 그 활성을 측정하였으나 검출되지 않았다. 부

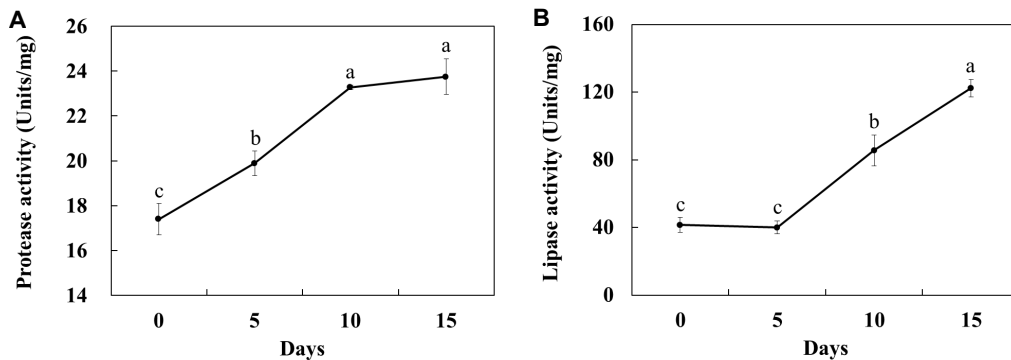


Fig. 4. Change of protease (A) and lipase (B) activities. Means±SD with different superscripts mean significant differences based on Duncan's multiple range test ( $p<0.05$ ).

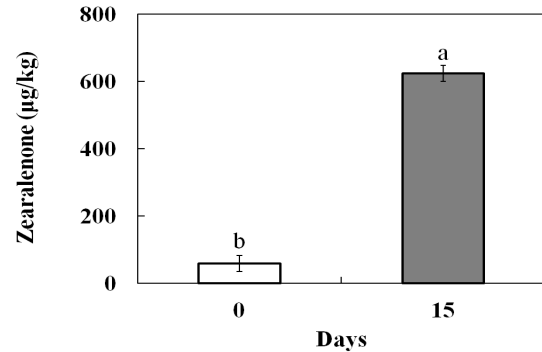


Fig. 5. Change of zearalenone content. Means±SD with different superscripts mean significant differences based on Duncan's multiple range test ( $p<0.05$ ).

패가 진행됨에 따라 Fig. 4A와 같이 단백질분해효소 활성이 높아졌으나 Fig. 2B의 조단백질 함량은 유의적인 감소가 관찰되지 않았다. 그 이유로서 부패 개시 5일 동안 미생물 단백질이 증가하였기 때문인 것으로 추측된다. 한편 지방분해효소 활성은 증가하였으므로 Fig. 2C의 조지방 함량은 감소되는 것으로 판단되었다.

**사료 내 제랄레논 함량 변화**

디옥시니발레논의 경우 착유우의 유량, 건강 및 생산성에 영향을 그다지 미치지 않고 우유로 전이되지 않기 때문에[6, 17], 본 실험에서는 착유우 및 여러 축종에 다양한 영향을 미치는 제랄레논의 농도를 측정하였다. 곰팡이독소 중 제랄레논은 실험 개시 샘플에서 59.2 µg/kg으로 낮았지만 15일째에는 623.8 µg/kg로 약 10.5배 증가하였다(Fig. 4). 이는 농림축산식품부가 고시(2015)한 곰팡이독소 권고기준인 500 µg/kg 이상의 수준이다. 오스트리아나 프랑스의 기준은 50~60 µg/kg으로 이것과 비교하면 초과된 수준이지만, 일본과 캐나다에서는 1,000~3,000 µg/kg 이하로 규제하고 있다[37].

결론적으로 사료 내 pH의 감소와 생균수의 증가는 실험 개시 이후 5일째에 일어났다. 그 이후에는 수분 및 단백질분해

효소와 지방분해효소 활성의 증가로 사료의 생화학적 변화가 계속 진행되고 있는 것을 확인할 수 있었다. 또한 제랄레논은 사료가 부패함에 따라 10.5배 이상 증가하여 우리나라의 사료 내 권고기준을 넘어서는 수준으로 나타났다. 국내에서 현재 규제가 이루어지고 있는 사료 내 아플라톡신, 오크라톡신 이외에도 앞으로는 제랄레논 허용기준에 대하여 고찰할 필요가 있다고 사료된다.

### 감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 연구사업(세부과제번호: PJ010906)의 지원에 의해 연구되었음.

### References

- Adesogan, A. T., Krueger, N., Salawu, M. B., Dean, D. B. and Staples, C. R. 2004. The influence of treatment with dual-purpose bacterial inoculants or soluble carbohydrates on the fermentation and aerobic stability of bermudagrass. *J. Dairy Sci.* **87**, 3407-3416.
- Ahn, J. S., Kim, D. H., Kim, H. J., Jang, H. S., Kim, Y. M. and Choi, H. B. 2011. Simultaneous analysis and survey for contamination of nivalenol, deoxynivalenol, T-2 toxin and zearalenone in feed. *J. Fd. Hyg. Safety* **26**, 1-11.
- AOAC. 2010. *Official Methods of Analysis Association of Official Analytical Chemists*, Arlington, VA, USA
- Bartov, I., Paster, N. and Lisker, N. 1982. The nutritional value of moldy grains for broiler chicks. *Poultry Sci.* **61**, 2247-2254.
- Cao, Y. R., Wang, Q., Jin, R. X., Tang, S. K., Jiang, Y., He, W. X. and Jiang, C. L. 2011. *Methylobacterium soli* sp. nov. a methanol-utilizing bacterium isolated from the forest soil. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **99**, 629-634.
- Charmley, E., Trenholm, H. L., Thompson, B. K., Vudathala, D., Nicholson, J. W. G., Prelusky, D. B. and Charmley, L. L. 1993. Influence of level of deoxynivalenol in the diet of dairy cows on feed intake, milk production, and its composition. *J. Dairy Sci.* **76**, 3580-3587.
- Chen, J., Mirocha, C. J., Xie, W., Hogge, L. and Olson, D. 1992. Production of the mycotoxin fumonisin B1 by *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3928-3931.
- Cruz, A. T., Cazacu, A. C. and Allen, C. H. 2007. *Pantoea agglomerans*, a plant pathogen causing human disease. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 1989-1992.
- Dersjant-Li, Y., Verstegen, M. W. and Gerrits, W. J. 2003. The impact of low concentrations of aflatoxin, deoxynivalenol or fumonisin in diets on growing pigs and poultry. *Nutr. Res. Rev.* **16**, 223-239.
- Desjardins, A. E. and Proctor, R. H. 2007. Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. *Int. J. Food Microbiol.* **119**, 47-50.
- D'mello, J. P. F., Placinta, C. M. and Macdonald, A. M. C. 1999. *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Anim. Feed Sci. Technol.* **80**, 183-205.
- Doi, K., Nishizaki, Y., Fujino, Y., Ohshima, T., Ohmomo, S. and Ogata, S. 2009. *Pediococcus lolii* sp. nov., isolated from ryegrass silage. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**, 1007-1010.
- Fingeroth, J. D., Roth, R. S., Talcott, J. A. and Rinaldi, M. G. 1994. Zygomycosis due to *Mucor circinelloides* in a neutropenic patient receiving chemotherapy for acute myelogenous leukemia. *Clin. Infect. Dis.* **19**, 135-137.
- Folin, O. and Ciocalteu, V. 1927. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *J. Biol. Chem.* **73**, 627-650.
- Groenewald, M. and Smith, M. T. 2010. Re-examination of strains formerly assigned to *Hyphopichia burtonii*, the phylogeny of the genus *Hyphopichia*, and the description of *Hyphopichia pseudoburtonii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**, 2675-2680.
- Hocking, A. D. and Christian, J. H. B. 1995. Microbial ecology interactions in the processing of foods, pp. 553-574. In: Barbosa-Canovas, G. V. and Welti-Chanes, J. (eds.), *Food preservation by moisture control: Fundamentals and applications*. Technomic Publishers: Lancaster, Pennsylvania, U.S.A.
- Hussein, H. S. and Brasel, J. M. 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* **167**, 101-134.
- Iwen, P. C., Sigler, L., Noel, R. K. and Freifeld, A. G. 2007. *Mucor circinelloides* was identified by molecular methods as a cause of primary cutaneous zygomycosis. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 636-640.
- Kang, M. S., Piao, M., Shin, B. A., Lee, H. C. and Oh, J. S. 2006. Adhesion of *Weissella cibaria* to the epithelial cells and factors affecting its adhesion. *J. Bacteriol. Virol.* **36**, 151-157.
- Kang, Y. S., Jung, J., Jeon, C. O. and Park, W. 2011. *Acinetobacter oleivorans* sp. nov. is capable of adhering to and growing on diesel-oil. *J. Microbiol.* **49**, 29-34.
- Kato, Y., Asahara, M., Goto, K., Kasai, H. and Yokota, A. 2008. *Methylobacterium persicinum* sp. nov., *Methylobacterium komagatae* sp. nov., *Methylobacterium brachiatum* sp. nov., *Methylobacterium tardum* sp. nov. and *Methylobacterium gregans* sp. nov., isolated from freshwater. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**, 1134-1141.
- Kim, G. H., Yi, K. J., Lee, A. R., Jang, I. H. Song, I. G., Kim, D. W. and Kim, S. K. 2014. Viability of probiotics in feed under high temperature conditions and their growth inhibitory effect on contaminant microbes. *Kor. J. Microbiol.* **50**, 345-350.
- Kriek, N. P., Kellerman, T. S. and Marasas, W. F. 1981. A comparative study of the toxicity of *Fusarium verticillioides* (= *F. moniliforme*) to horses, primates, pigs, sheep and rats. *Onderstepoort J. Vet. Res.* **48**, 129-131.
- Kung, L., Sheperd, A. C., Smagala, A. M., Endres, K. M., Bessett, C. A., Ranjit, N. K. and Glancey, J. L. 1998. The effect of preservatives based on propionic acid on the fermentation and aerobic stability of corn silage and a total mixed ration. *J. Dairy Sci.* **81**, 1322-1330.

25. Labuza, T. P., Kaanane, A. and Chen, J. Y. 1985. Effect of temperature on the moisture sorption isotherms and water activity shift of two dehydrated foods. *J. Food Sci.* **50**, 385-391.
26. Lee, K. W., Park, J. Y., Jeong, H. R., Heo, H. J., Han, N. S. and Kim, J. H. 2012. Probiotic properties of *Weissella* strains isolated from human faeces. *Anaerobe* **18**, 96-102.
27. Marín, S., Companys, E., Sanchis, V., Ramos, A. J. and Magan, N. 1998. Effect of water activity and temperature on competing abilities of common maize fungi. *Mycol. Res.* **102**, 959-964.
28. Marín, S., Sanchis, V., Teixido, A., Saenz, R., Ramos, A. J., Vinas, I. and Magan, N. 1996. Water and temperature relations and microconidial germination of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* from maize. *Can. J. Microbiol.* **42**, 1045-1050.
29. Millette, M., Dupont, C., Archambault, D. and Lacroix, M. 2007. Partial characterization of bacteriocins produced by human *Lactococcus lactis* and *Pediococcus acidilactici* isolates. *J. Appl. Microbiol.* **102**, 274-282.
30. Minervini, F. and Dell'Aquila, M. E. 2008. Zearalenone and reproductive function in farm animals. *Int. J. Mol. Sci.* **9**, 2570-2584.
31. Popovski, S. and Celar, F. A. 2013. The impact of environmental factors on the infection of cereals with *Fusarium* species and mycotoxin production - a review. *Acta Agric. Slov.* **101**, 105-116.
32. Richard, E., Heutte, N., Sage, L., Pottier, D., Bouchart, V., Lebailly, P. and Garon, D. 2007. Toxigenic fungi and mycotoxins in mature corn silage. *Food Chem. Toxicol.* **45**, 2420-2425.
33. Song, Y. K., Jung, B. Y., Choi, J. S., Moon, O. K., Lee, S. H., Chung, D. H., Pak, S. I. and Park, C. K. 2010. Survey on aflatoxins in pig feeds in Korean pig farms. *Kor. J. Vet. Public Health* **34**, 237-243.
34. Takahashi, S., Egawa, Y., Simojo, N., Tsukahara, T. and Ushida, K. 2007. Oral administration of *Lactobacillus plantarum* strain Lq80 to weaning piglets stimulates the growth of indigenous lactobacilli to modify the lactobacillal population. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **53**, 325-332.
35. Viljoen, A., Wingfield, M. J. and Marasas, W. F. O. 1994. First report of *Fusarium subglutinans* f. sp. pini on pine seedlings in South Africa. *Plant Dis.* **78**, 309-312.
36. Wieme, A., Cleenwerck, I., Van Landschoot, A. and Vandamme, P. 2012. *Pediococcus lolii* DSM 19927T and JCM 15055T are strains of *Pediococcus acidilactici*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **62**, 3105-3108.
37. Zinedine, A., Soriano, J. M., Molto, J. C. and Manes, J. 2007. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. *Food Chem. Toxicol.* **45**, 1-18.

## 초록 : 배합사료의 부패 동안 발생하는 미생물학적 및 영양학적 변화

이권정<sup>1\*</sup> · 연제성<sup>1\*</sup> · 김주현<sup>1</sup> · 김삼철<sup>2</sup> · 문형인<sup>3</sup> · 전체옥<sup>4</sup> · 이상석<sup>5</sup> · 김동운<sup>6</sup> · 김수기<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>건국대학교 동물자원과학과, <sup>2</sup>경상대학교 축산학과, <sup>3</sup>동아대학교 의약생명공학과, <sup>4</sup>중앙대학교 생명과학과, <sup>5</sup>순천대학교 동물자원과학과, <sup>6</sup>국립축산과학원)

가축의 배합사료는 가축의 성장을 유지하기 위한 충분한 영양소를 함유하고 있어 적절한 온도와 습도하에서 부패되기 쉽다. 착유우 사료를 여름철 고온 다습한 환경 조건인 수분 33%, 온도 30°C에서 15일 동안 부패시키면서 일어나는 미생물 및 화학적 변화를 조사하였다. pH는 최초 6.29에서 4.66으로, 수분활성은 0.99에서 0.95으로 각각 감소하였다. 세균은  $6.2 \times 10^6 \sim 1.6 \times 10^7$  CFU/g에서 5일째에 최대  $2.1 \times 10^9$  CFU/g까지 증가하였으며 이후  $10^8$  CFU/g 수준을 유지하였다. 곰팡이는 약  $10^3$ 에서  $8.0 \times 10^4$  CFU/g으로 증가하였다. 세균은 *Acinetobacter oleivorans*, *Pediococcus acidilactici*, *Acinetobacter oleivorans*, *Weissella cibaria* 및 *Methylobacterium komagatae*이 성장하였고, 곰팡이는 *Fusarium*속과 *Mucor*속이 분리되었다. 10일까지는 수분 함량은 증가하였고( $p < 0.01$ ), 조단백질 함량은 큰 변화가 없었으나 조지방은 약 6.0%에서 5.5%로 감소하였다( $p < 0.01$ ). 조섬유와 조회분은 각각 2.0~3.0%, 4.5~4.8%의 범위에서 변화되었으나 유의적인 차이는 없었다. 총에너지는 4,400 kcal/kg로 거의 변화가 없었다. 사료가 부패되면서 젖산과 프로피온산은 증가하였고 아세트산은 검출되지 않았다( $p < 0.01$ ). 제랄레논은 59.2 µg/kg에서 623.8 µg/kg으로 약 10.5배가 증가하였다. 결론적으로 사료부패가 일어나는 동안은 pH 감소, 세균수의 증가 및 다양한 화학적 변화가 관찰되었다.