



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0125862  
(43) 공개일자 2024년08월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A23K 10/16 (2017.01) A23K 10/20 (2016.01)  
A23K 30/20 (2016.01) A23K 40/10 (2016.01)  
A23K 50/00 (2016.01) C12N 1/20 (2006.01)  
C12R 1/46 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A23K 10/16 (2016.05)  
A23K 10/20 (2016.05)

(21) 출원번호 10-2024-0102624(분할)

(22) 출원일자 2024년08월01일

심사청구일자 2024년08월01일

(62) 원출원 특허 10-2021-0046583

원출원일자 2021년04월09일

심사청구일자 2021년04월09일

(71) 출원인

단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단

충청남도 천안시 동남구 단대로 119, 단국대학교 천안캠퍼스내(안서동)

충북대학교 산학협력단

충청북도 청주시 서원구 충대로 1 (개신동)

충남대학교 산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

김현범

충청남도 천안시 서북구 성거읍 성거길 20, 105동 1806호 (북천안자이언트)

송민호

서울특별시 강남구 삼성로 212, 22동 106호(대치동, 은마아파트)

조진호

전라북도 전주시 덕진구 만성로 150, 104동 1402호(만성동, 중흥에스클래스더퍼스트)

(74) 대리인

특허법인 무한

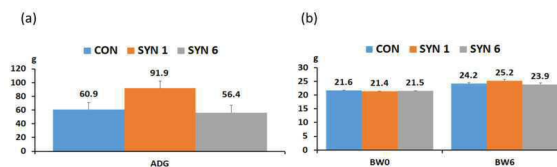
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 곤충 장관 유래 락토코커스 락티스를 포함하는 사료 첨가용 조성물

(57) 요약

본 발명은 곤충 장관 유래 락토코커스 락티스(Lactococcus lactis subsp. lactis) 균주(기탁번호: KCTC14396BP) 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는, 사료 첨가용 조성물, 이를 포함하는 사료 첨가제, 동물용 사료 및 이를 이용한 동물 사육 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

*A23K 30/20* (2016.05)  
*A23K 40/10* (2016.05)  
*A23K 50/00* (2016.05)  
*C12N 1/205* (2021.05)  
*A23V 2002/00* (2023.08)  
*A23V 2200/332* (2013.01)  
*C12R 2001/46* (2021.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                                |
|-------------|--------------------------------|
| 과제고유번호      | 1711096618                     |
| 과제번호        | 2019M3A9F3065226               |
| 부처명         | 과학기술정보통신부                      |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국연구재단                         |
| 연구사업명       | 바이오. 의료기술개발(R&D)               |
| 연구과제명       | 산업동물 장내 마이크로바이옴 बैं크 구축 및 지원개발 |
| 기 여 율       | 20/100                         |
| 과제수행기관명     | 한국생명공학연구원                      |
| 연구기간        | 2021.01.01 ~ 2021.12.31        |

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                                                  |
|-------------|--------------------------------------------------|
| 과제고유번호      | 1711106801                                       |
| 과제번호        | 2019R1F1A106330612                               |
| 부처명         | 과학기술정보통신부                                        |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국연구재단                                           |
| 연구사업명       | 기본연구(통합Ez)                                       |
| 연구과제명       | Synbiotics 기반 돼지 장관 미생물 미세 리모델링에 의한 생산성 향상 기전 연구 |
| 기 여 율       | 80/100                                           |
| 과제수행기관명     | 단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단                                |
| 연구기간        | 2020.03.01 ~ 2021.02.28                          |

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

곤충 장관 유래 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) 균주(기탁번호: KCTC14396BP) 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하고,

상기 곤충은, 메뚜기, 여치, 방아깨비, 풀무치 또는 배짱이인, 동물의 체중 증가용 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 균주는, 항생제 내성, 생산량 증대 및 섬유소 분해능을 모두 갖는 것을 특징으로 하는, 동물의 체중 증가용 조성물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조성물은 동결 건조시켜 분말화된 것인, 동물의 체중 증가용 조성물.

#### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 조성물을 유효성분으로 포함하는, 동물의 체중 증가용 사료 첨가제.

#### 청구항 5

제5항의 사료 첨가제를 포함하는, 체중 증가용 동물용 사료.

#### 청구항 6

제6항에 있어서,

상기 동물은, 돼지, 말, 당나귀, 양, 염소, 개, 고양이, 낙타, 토끼, 닭, 오리, 칠면조, 거위, 꿩, 메추리 및 쥐 로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인, 동물용 사료.

#### 청구항 7

제6항의 동물용 사료를 동물에 급여하는 단계를 포함하는, 동물 사육 방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 기술은 산업동물이 사용하기 어려운 섬유소(Cellulose)를 분해하여 에너지원으로 이용하기 위한 기술분야로, 곤충 장관 유래 락토코커스 락티스를 포함하는 사료 첨가용 조성물 및 이를 포함하는 사료 첨가제, 이를 포함하는 동물용 사료, 그리고 이를 동물에 급여하여 동물 생산성을 향상시키는 동물 사육 방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 축산업에서는 가축의 생산성을 증대시키기 위해 관련 연구가 지속적으로 이뤄지고 있다. 특히, 가축의 질병 감염을 저감시켜 폐사율을 낮추는 방안이나 저렴한 사료를 이용하여 육류의 양과 질을 향상시키기 위해 사료 또는 사료첨가물 개발에 대한 수요가 높아지고 있는 추세이다.

[0003] 가축 사육시 미생물에 의한 가축이 감염되어 발병된 가축뿐만 아니라 함께 사육하던 다른 가축까지 폐사되는 경우가 있어 사료에 항생제를 첨가하여 이를 예방해왔다. 통상적으로 항미생물 작용을 가진 천연물질, 반합성물질 또는 합성물질을 통칭하는 의미로 사용된다. 항생제는 동물의 질병을 치료 또는 예방하는 목적 이외에도 동물

의 성장을 촉진시키기 위한 성장 촉진제로도 사용되고 있다. 우리나라 축산업에 있어서, 모넨신과 같은 이오노포(ionophore)계 항생제, 클로로포름 및 할로겐 화합물 등이 대표적인 항생물질로 이용된다. 항생물질을 성장 촉진제로서 사료에 첨가하여 동물에게 투여하면 동물의 성장을 촉진시키고, 사료 이용 효율(feed utilization)을 개선함과 동시에 집단으로 사육되고 있는 동물들에게서 세균에 의한 감염성 질환의 유병율을 낮출 수 있다. 즉, 항생제는 동물에게서 감염성 질환을 예방하여 감염성 질환에 대한 유병율 및 사망률을 감소시키고, 성장 속도를 증가시킴으로써 육류, 달걀, 우유 등의 가격을 낮출 수 있는 경제적 효과를 가져올 뿐만 아니라 항생제 소비를 증가시켜 제약산업 측면에서도 긍정적인 영향을 미친다.

[0004] 이와 같이 축산업에서 항생제는 가축의 생산성 향상에 큰 기여를 해왔으나 최근 가축 체내에 항생제 잔류되거나, 내성을 가진 슈퍼 박테리아가 출현하는 등 문제발생으로 국내외에서 사료 내 항생제 사용에 대한 제한이나 규제가 이뤄지면서 항생제 사용이 규제되고 있으며, 특히 치료 목적이 아닌 가축 생산성 향상을 위하여 배합 사료 내 항생제를 포함시키는 것은 전면적으로 금지되고 있다. 이에 따라 항생제를 대체하기 위한 물질로 생균제가 부각되고 있으며, 최근 연구된 여러 논문에 따르면 생균제는 유해균을 억제할 뿐만 아니라 사육 동물의 성장성, 생산성 및 면역건강기능에도 간접적인 영향을 미치므로 프로바이오틱스에 대한 연구는 최근까지도 활발하게 이뤄지고 있는 추세이다.

[0005] 생균제는 동물약품 및 사료 보조제로 사용되고 있으며, 생균제로 사용되는 세균으로는 유산균류(락토바실러스 속 균, 비피도박실러스 속 균)과 바실러스 속 균, 스트렙토코커스 속 균 등이 연구되어 상용화되고 있으며, 곰팡이로는 효모, 아스퍼질러스 속 균 등이 활용되고 있다.

[0006] 한편, 가축 사육시 주로 곡물을 원료로 한 사료와 섬유질이 풍부한 조사료가 급여되고 있어 셀룰레이스(cellulase)는 가축 사료 급여시 중요한 소화효소로서 작용하게 되고, 가축들이 사료를 섭취했을 때 이들 효소가 소화 및 흡수율을 높여 사료의 효율을 증대시키는 작용을 하게 된다. 셀룰레이스는 반추위 가축에 있어서 중요한 효소로서, 셀룰로스의  $\beta$ -1, 4 글리코시드 결합을 가수분해하여 셀로비오스를 생기게 하는데, 곰팡이, 세균, 고등식물, 연체동물 등에 많이 존재한다. 소와 같은 반추위동물들은 반추위에 서식하는 미생물들이 섬유소를 분해함으로써 생성되는 분해산물을 에너지원으로 이용할 수 있으나, 이를 제외한 대부분의 산업동물은 섬유소 분해효소를 장관 내로 분비하지 못하기 때문에 섬유소를 에너지원으로 이용하기 어려운 문제가 있다.

[0007] 반면, 주변에서 흔히 볼 수 있는 곤충들은 식물을 섭취하며 성장에 활용할 수 있으므로 본 발명자들은 이로부터 착안하여 곤충의 장관 미생물들을 분리하고 섬유소 분해능을 갖는지 여부를 확인하는 실험을 통해 섬유소 분해능 미생물을 선정하고, 선정된 미생물 중 잠재적 유해인자를 갖는 균주를 제외했으며, 최종적으로 동물모델에서 성장성 및 생산성 향상이 있는지 활용가능성을 검증함으로써 본 발명을 완성하였다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국 특허 공개공보 10-2013-0129735호

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 곤충 장관 유래 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) 균주(기탁번호: KCTC14396BP) 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는, 동물의 체중 증가용 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물을 사료 첨가용 조성물에 이용을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물을 유효성분으로 포함하는, 사료 첨가제를 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 사료 첨가제를 포함하는 동물용 사료를 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 동물용 사료를 동물에 급여하는 단계를 포함하는, 동물 사육방법을 제공하는 것이다.

[0014] 그러나, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른

과제들은 아래의 기재로부터 해당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

### 과제의 해결 수단

- [0015] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 곤충 장관 유래 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) 균주(기탁번호: KCTC14396BP) 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는, 동물의 체중 증가용 조성물을 제공한다.
- [0016] 또한, 본 발명은 상기 *L.lactis* 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 사료 첨가용 조성물이 제공된다.
- [0017] 일 측에 따르면, 상기 곤충은 메뚜기, 여치, 방아깨비, 풀무치 또는 배짱이일 수 있다.
- [0018] 일 측에 따르면, 상기 동물은 인간을 제외한 동물일 수 있고, 바람직하게는 가축일 수 있다.
- [0019] 일 측에 따르면, 상기 균주는 항생제 내성, 생산량 증대 및 섬유소 분해능을 모두 갖는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.
- [0020] 일 측에 따르면, 상기 조성물은 동결 건조시켜 분말화 된 것일 수 있다.
- [0021] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 상기 조성물을 유효성분으로 포함하는, 사료첨가제가 제공된다.
- [0022] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따르면, 상기 사료 첨가제를 포함하는 동물용 사료가 제공된다.
- [0023] 일 측에 따르면, 상기 동물은 돼지, 말, 당나귀, 양, 염소, 개, 고양이, 낙타, 토끼, 닭, 오리, 칠면조, 거위, 꿩, 메추리 및 쥐 로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나일 수 있다.
- [0024] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따르면, 상기 동물용 사료를 동물에 급여하는 단계를 포함하는, 동물 사육방법이 제공된다.
- [0025] 일 측에 따르면, 상기 사육방법은 동물의 체중 증가 방법으로 이용될 수 있다.

### 발명의 효과

- [0026] 본 발명의 사료 첨가용 조성물 또는 이를 포함하는 사료 첨가제, 동물용 사료를 급여한 동물의 섬유소 분해능을 향상시켜 양분 흡수율이 증가된다. 본 발명의 사료 첨가용 조성물 또는 조성물을 포함하는 사료 첨가제를 동물에 급여하는 경우, 동물의 생산성을 향상시키는 효과를 기대할 수 있다. 또한, 기존에 낮은 섬유소 분해능으로 인해 사용하지 못했던 사료도 급여할 수 있으므로, 사용가능한 사료 범위를 넓힐 수 있다.
- [0027] 아울러, 사료 급여시 동물 체내 항생제 잔류 및 항생제 내성균 생성 등 문제점을 생균제인 본 발명을 이용함으로써 해결할 수 있다.
- [0028] 본 연구에서 발굴된 유용유전자 및 미생물 유전자원을 제공하여, 기업체와 이들 유전자원의 축산응용에 관한 활발한 공동연구 및 제품개발을 통해 새로운 시장 창출 기반과 산업화할 수 있는 기반을 제공할 수 있다.
- [0029] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

### 도면의 간단한 설명

- [0030] 도 1은 곤충 장관 유래 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) 균주(기탁번호: KCTC14396BP)와 아종의 ANI(Average Nucleotide Identity) 결과를 도시한 것이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 락토코커스 락티스 균주의 잠재적 유해인자를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3는 본 발명의 일 실시예에 따른 락토코커스 락티스 균주의 게놈지도(Genome map)를 도시한 것이다.
- 도 4은 본 발명의 일 실시예에 따른 메뚜기 장관 유래 락토코커스 락티스 균주를 포함하는 생균제 급여에 따른 일당증체량(ADG) 및 급여 전후의 체중변화를 나타낸 것이다.
- 도 5는 메뚜기 장관 유래 락토코커스 락티스를 포함하는 생균제 급여에 따른 건물(DM; Dry Matter), 에너지(E), 조단백질(CP; Crude Protein) 및 조섬유(CF; Crude Fiber)에 대한 소화율을 각각 나타낸 것이다.
- 도 6는 Taxonomic-based analysis를 통한 대조군 및 신바이오틱 급여처리군의 마우스의 급여처리전후 균총 차이

를 확인한 것이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 사료 첨가용 조성물을 급여시 대조군과의 균총의 변화를 비교한 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0031] 이하에서, 첨부된 도면을 참조하여 실시예들을 상세하게 설명한다. 그러나, 실시예들에는 다양한 변경이 가해질 수 있어서 특허출원의 권리 범위가 이러한 실시예들에 의해 제한되거나 한정되는 것은 아니다. 실시예들에 대한 모든 변경, 균등물 내지 대체물이 권리 범위에 포함되는 것으로 이해되어야 한다.
- [0032] 실시예에서 사용한 용어는 단지 설명을 목적으로 사용된 것으로, 한정하려는 의도로 해석되어서는 안 된다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [0033] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.
- [0034] 또한, 첨부 도면을 참조하여 설명함에 있어, 도면 부호에 관계없이 동일한 구성 요소는 동일한 참조부호를 부여하고 이에 대한 중복되는 설명은 생략하기로 한다. 실시예를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 실시예의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.
- [0035] 본 발명자는 동물 성장 저해 원인이 양분 흡수율을 낮추는 섬유소 등의 분해 효율이 낮은 점에 있다고 판단하였다. 따라서, 본 기술의 목적은 산업동물에게 섬유소 분해능을 가진 미생물을 급여하여 성장과 생산성을 높이기 위함이며, 산업동물 적용에 가장 적합한 균주를 찾기 위해 마우스 모델을 이용한 평가를 진행함으로써 동물의 성장과 생산성에 영향을 주는 미생물 총을 검증하여 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0036] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 곤충 장관 유래 락토코커스 락티스 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* K\_LL\_001) 균주(기탁번호: KCTC14396BP) 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는, 사료 첨가용 조성물이 제공된다.
- [0037] 본 발명의 락토코커스 락티스 균주(*Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* K\_LL\_001)는 메뚜기 분변으로부터 분리된 곤충 장관 유래의 균주로, 본 발명자에 의해 한국생명공학연구원 생물자원센터에 2020년 12월 4일자로 기탁되었다(KCTC14396BP). 이 때, 상기 락토코커스 락티스 균주의 유전자 발현수준의 측정은 RT PCR(real-time PCR) 및 효소 결합 면역 침강분석법(ELISA) 중에서 선택되는 방법으로 수행되는 것일 수 있으며, 당업계에 유전자 발현수준 측정법으로 공지된 다양한 방법을 이용할 수 있다.
- [0038] 상기 락토코커스 락티스 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* K\_LL\_001) 균주를 분리, 동정하기 위해 먼저 메뚜기 장관 내 미생물을 분리하고 생체 외(In vitro) 검증을 통해 섬유소 분해능을 가지면서, 가축의 장관 환경과 비슷한 내산성 및 내담즙성 환경에서 생존하는 박테리아를 1차적으로 선별하였다. 그 후, 컴퓨터 시뮬레이션 방법인 실리코(In silico) 상의 전장유전체분석을 통해 잠재적 유해인자 및 유전자를 분석함으로써 유해성이 없는 섬유소 분해능 박테리아를 2차적으로 선별하였다. 선별된 박테리아를 생체 내(In vivo) 실험인 동물 급여를 통해 섬유소 분해능이 개선된 곤충 장관 유래 미생물 총을 검증하였으며, 최종적으로 락토코커스 락티스 균주 (*Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* K\_LL\_001) 또는 이의 배양액이 포함된 사료 첨가용 조성물이 동물의 성장 및 생산성 향상에 영향을 미치는 것을 확인하였다.
- [0039] 상기 사료 첨가용 조성물은 건조 또는 액체 상태의 제제 형태일 수 있으며, 하나 이상의 효소 제제를 추가로 포함할 수 있다. 이 때, 효소 제제는 사료 첨가용 조성물이 제제화된 형태에 따라 건조 또는 액체 형태로 포함되는 것일 수 있으며, 동물의 성장성, 항병원성 기능을 가질 수 있다.
- [0040] 일 측에 따르면, 상기 곤충은 메뚜기, 여치, 방아깨비, 풀무치 또는 베짚이일 수 있으며, 넓은 범주로는 귀뚜라미, 굽둥이 등 메뚜기목(Orthoptera)의 곤충을 포함하는 개념일 수 있다.
- [0041] 일 측에 따르면, 상기 균주는 항생제 내성, 생산량 증대 및 섬유소 분해능을 모두 갖는 것을 특징으로 하는 것

일 수 있다. 상기 항생제는 에리쓰로마이신, 옥사실린, 앰피실린, 세포탁심, 테트라사이클린 등을 들 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 생산량 증대는, 사료 급여대상 동물의 생산량 증대를 의미하는 것으로, 동물의 육,란,유,모,모피 중 적어도 하나의 생산 또는 수확의 증가를 의미하는 것일 수 있다. 상기 섬유소는 탄수화물 계통이지만 야채류에 많이 포함되어 있는 난분해성 탄수화물로 셀룰로오즈, 헤미셀룰로오즈, 리그닌 등으로 구성되어 있으며, 그 중 셀룰로오즈의 함유량이 가장 높다. 상기 균주의 섬유소 분해능은 섬유소 분해 효소의 생산을 의미하는 것일 수 있고, 생산된 섬유소 분해 효소 활성의 증대를 의미하는 것일 수도 있다. 궁극적으로는, 사료 급여 대상 동물에 상기 균주가 포함된 사료를 급여시 섬유소의 분해 효과가 증가하여 사료 내 섬유소를 에너지원으로 활용 가능해지는 것을 의미하는 것일 수 있다.

[0042] 추가적으로, 상기 균주는 내산성, 내담즙성 및 내열성을 갖는 것일 수 있고, 병원성 미생물 감염 저항성을 갖는 것일 수 있다.

[0044] 일 측에 따르면, 상기 조성물은 동결 건조시켜 분말화 된 것일 수 있다. 본 발명의 사료 첨가용 조성물은 동결 건조시켜 분말화 된 것이 바람직하나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 조성물은 액상 제형도 가능하고, 목적에 따라 당해 기술분야에 공지된 제형으로 이용 가능하다.

[0045] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 상기 조성물을 유효성분으로 포함하는, 사료첨가제가 제공된다.

[0046] 상기 사료 첨가제는 전술한 사료 첨가용 조성물을 직접 제제화하거나 말분, 밀분, 녹말, 텍스트린 등의 회석제 및 벳짚, 곡류, 왕겨 및 탈지 쌀겨와 같은 겨, 오일 및 지방분이 풍부한 종자 케이크 등 공지된 사료용 원료와 함께 제제화된 것일 수 있다.

[0047] 본 발명의 사료 첨가제에는 사료 첨가용 조성물 외에도 질병의 예방, 사료효율의 증진, 소화율 증진 및 성장촉진 효과, 기호성 증진 효과 등을 위해 공지된 첨가물을 더 포함할 수 있으며, 비제한적 예로 첨가물은, 비타민제, 영양 보충제, 효소제, 아미노산제, 항균제, 유기산제, 식물 추출물, 유화제, 감미제, 향균방지제, 기타 점토 광물질제 등일 수 있다.

[0048] 또한, 상기 사료 첨가제는 사료에 직접 혼합하거나 사료와 별도로 경구 급여할 수 있다. 사료 첨가제는 사료와 별도로 투여가능한 형태로 제조될 수 있다. 이 때, 투여가능한 형태는 당해 기술분야에 공지된 식용 담체와 조합하여 제조된 즉시 방출 또는 서방성 제형일 수 있다. 이러한 식용 담체는 고체 또는 액체, 예를 들어 옥수수 전분, 락토스, 수크로스, 콩 플레이크, 땅콩유, 올리브유, 참깨유 및 프로필렌 글리콜일 수 있다. 고체 담체가 사용될 경우, 추출물의 투여형은 정제, 캡슐제, 산제, 토로키제 또는 함당정제 또는 미분산성 형태의 탭 드레싱 일 수 있다. 액체 담체가 사용될 경우, 연 젤라틴 캡슐제, 또는 시럽제 또는 액체 현탁액제, 에멀전제 또는 용액제의 투여 형태일 수 있다. 또한, 투여 형태는 보조제, 예를 들어 보존제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제, 용액 촉진제 등을 함유할 수 있다.

[0049] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따르면, 상기 사료 첨가제를 포함하는 동물용 사료가 제공된다. 상기 동물용 사료는 당해 기술에 통용되는 사료 또는 사료를 이루는 일부 구성성분과 전술한 사료 첨가제가 물리적으로 배합 또는 혼합된 형태임이 바람직하다.

[0050] 이 때, 동물은 사료 급여가 가능한 인간 이외의 동물이면 특별히 한정되지는 않는다. 예를 들어, 가축, 집에서 기르는 새, 애완동물의 사육, 양식되는 각종 동물을 포함하는 개념일 수 있다.

[0051] 일 측에 따르면, 상기 동물은 돼지, 말, 당나귀, 양, 염소, 개, 고양이, 낙타, 토끼, 닭, 오리, 칠면조, 거위, 꿩, 메추리 및 쥐 로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나일 수 있다. 동물 중 소 또는 젖소, 흑우 등은 섬유소 분해능을 갖고 있으나, 이를 향상시키기 위한 목적으로 추가적으로 급여할 수도 있다. 비제한적인 예로, (식)육용 동물, 채란용 동물, 채모피용 동물일 수 있다. 본 발명의 사료 조성물의 급여가 적합한 동물은 육,란,유,모,모피 등을 이용하는 동물이다. 육용 동물로서는, 계, 우, 돈, 염소, 마, 양, 시카, 쿠마, 순록, 토끼, 타조, 집오리, 칠면조, 메추리 등의 가축, 집에서 기르는 새외, 매스, 뱀장어, 마래미 등의 양식어류, 등을 들 수 있다. 채란용 동물로서는, 상술한 조류, 어류를 들 수 있다. 채유용 동물로서는, 소, 염소, 말, 등을 들 수 있다. 채모, 채모피용 동물로서는, 우, 마, 돈, 양, 염소, 시카, 쿠마, 순록, 개, 묘, 토, 밍크, 텐, 여우, 너구리, 갯털 채취 조류 등을 들 수 있다. 이들의 동물 중(안)에서, 본 발명의 사료 첨가용 조성물을 투여함에 특별히 적합한 동물은 식육용이나 채란용으로서 이용되는 동물이며, 육용계, 육우, 젖육우, 육 돈, 염소, 말, 토끼, 타조, 집오리, 칠면조, 메추리 등의 가축, 집에서 기르는 새류이며, 특히 육용계, 채란용 계, 육우, 육

돈, 타조 등이 있다.

[0052] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따르면, 상기 동물용 사료를 동물에 급여하는 단계를 포함하는, 동물 사육방법이 제공된다. 하기 실시예를 통해 후술된 바와 같이, 본 발명의 사료 첨가제를 기존 동물용 사료에 일정량 첨가하여 동물에 급여하는 경우, 동물의 성장과 생산성을 향상시키는 효과를 가진다.

[0053] 상기 동물의 다른 비제한적인 예로서, 본 발명의 사료 조성물은 작은 새, 작은 동물 등의 애완동물, 잉어, 금붕어, 열대어 등의 관상어, 쥐, 마우스 등의 실험용 동물, 동물원 등에서 사육되어 있는 각종 동물을 포함할 수 있으며, 이 때, 동물의 특성 또는 목적에 따라 급여가 아닌 투여 형태로 제공될 수 있다.

[0055] 이하, 본 발명을 실시예에 의해서 보다 상세히 설명한다. 그러나 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명이 하기 실시예 및 실험예에 의해서 한정되는 것은 아니다.

[0057] 실시예

[0058] 실시예 1: 메뚜기 장관 세균 배양 및 분리

[0059] '원검주 메뚜기농장'으로부터 200마리의 메뚜기를 수령하고, 개별 사육을 통해 분변 샘플링을 개체별로 진행하였다. 메뚜기 장관 내용물을 37℃의 호기 및 혐기 상태에서 총 4가지 배지(Bacto Brain Heart Infusion(BHI, BD, 241830), Luria-Bertani Agar(LB, MBcell, MB-L4487), Difco Nutrient Agar(NA, BD, 213000), Trypton Soya Agar (TSA, Oxoid, CM0131))를 사용하여 24시간 배양 후, 세균을 분리하였다.

[0060] 상기 분리된 세균의16S rRNA gene의 초 가변영역인 V1 - V9을 타겟으로 이 부분을 증폭하기 위해 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') 와 27F (5' -AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') 프라이머(Universal Primer)를 사용하였다. PCR(Polymerase Chain Reaction)의 조성 및 조건은 하기 표1 및 2에 나타난 바와 같다.

표 1

|        |                                       |  |          |
|--------|---------------------------------------|--|----------|
| [0061] | PCR 조성                                |  | μl       |
|        | 5X PrimeSTAR Buffer                   |  | 10       |
|        | dNTP                                  |  | 4        |
|        | Primer (forward)                      |  | 1        |
|        | Primer (reverse)                      |  | 1        |
|        | PrimeSTAR HS DNA Polymerase (Takara社) |  | 1        |
|        | 증류수(D.W)                              |  | 31       |
|        | Template                              |  | 1 Colony |
|        | Final volume(PCR tube)                |  | 50       |

표 2

|        |                  |     |        |            |
|--------|------------------|-----|--------|------------|
| [0062] | PCR 조건           |     |        |            |
|        | 단계               | 온도  | 시간     | 사이클(cycle) |
|        | 개시(Initiation)   | 95℃ | 1min   | 1          |
|        | 변성(Denaturation) | 95℃ | 30sec  | 35         |
|        | 결합(Annealing)    | 58℃ | 1min   |            |
|        | 신장 (Extension)   | 72℃ | 1.5min |            |
|        | 종결(Termination)  | 72℃ | 5min   | 1          |
|        |                  | 4℃  | ∞      |            |

[0064] 실시예 2: 셀룰레이스(Cellulase) 생산 균주 선별 및 생체 외(in vitro) 검증

[0065] 메뚜기 분변에서 섬유소 분해능이 있는 것으로 알려진 락토코커스 락티스(Lactococcus lactis subsp. lactis)

균주를 분리 및 동정하였다. (*L. lactis* subsp. *lactis* K\_LL\_001, 이하 LL\_001).

[0066] 실제 셀룰레이스 생산 여부를 확인하기 위해 실시예 1의 배지 4종 중 TSA의 배지에 0.2%의 카복시메틸셀룰로스 염(Carboxymethylcellulose sodium salt, CMC, SIGMA사 제품번호 C5678)를 첨가하여 준비한 후, 분리한 균주를 접종하여 37℃, 48시간 동안 배양시켰다. 셀룰레이스를 생산하는 균주의 경우 CMC 테스트의 염색 및 탈색과정에서 세균 집락 주변에 투명한 클리어 존(Clear zone)을 형성하므로, LL\_001 균주의 콜로니를 확인한 후, 0.1%의 콩고 레드(Congo Red)로 20분간 염색시키고, 1M의 NaCl로 20분간 탈색시킨 뒤 바로 클리어 존을 관찰하였다. 실험결과 LL\_001 균주는 셀룰레이스를 생산하는 균주로 확인되었다. 확인된 LL\_001 균주는 메뚜기 분변에서 TSA 배지에 혐기조건으로 37℃, 24시간 배양하여 최초 균주 분리를 진행했으며, 분리된 균주는 MRS 배지(Difco 사, B288130)에 37℃, 24시간 호기배양한 뒤 50% 글리세롤(Glycerol)과 1:1 혼합하여 영하 72℃에 보관하였다.

### [0068] 실시예 3: 전장유전체 기반 ANI(Average Nucleotide Identity) 평가

[0069] \*알고리즘(OrthoANI)을 지표로 LL\_001 균주의 유전체의 유사도를 측정하였다. 측정된 LL\_001 균주의 ANI 값(value)을 분석한 결과, 도 1과 같이 LL\_001 균주는 종래 락토코커스 락티스 아종들과 시퀀스 유사율이 높지 않은 것으로 확인되었다.

### [0071] 실시예 4: 전장유전체 분석을 통한 균주의 잠재적 유해유전자 확인 평가

[0072] 상기 실시예 2의 테스트를 통해 셀룰레이스 생산을 확인한 LL\_001 균주의 잠재적 유해유전자를 확인하기 위하여 MRS 배지(Difco 사, B288130)에 37℃, 24시간 호기배양한 뒤 전체 DNA(genomic DNA)를 추출하였다. 추출된 DNA는 유전체 분석 플랫폼(PacBio RS II Platform, Pacific Biosciences, USA)을 이용하여 전장유전체 분석을 진행하였다. 시퀀싱된 데이터는 드노보(de-novo) 방식으로 어셈블리(assembly) 한 뒤 콘티그(contig)를 완성하였다. 하나의 콘티그로 어셈블리된 LL\_001 균주의 데이터 분석은 병원성 인자 분석(Virulence factor DB; VFDB) 및 항생제 내성인자 분석(Comprehensive Antibiotics Resistance DB; CARD)을 통하여 진행하였다. 그 결과, LL\_001 균주의 유전체는 하나의 염색체로 구성되며 길이는 총 2,018,259 bp이고, GC-content는 38.8%임을 확인하였다(도 3). 또한, LL\_001 균주의 염색체에는 1,985개의 단백질 코딩 유전자(protein-coding gene)가 포함됨을 확인하였다. 또한, LL\_001 균주가 갖는 독성인자(virulence factor) 및 항균저항(AMR) 유전자는 발견되지 않았으므로, 잠재적 유해유전자가 없음을 확인하였다. (도 2)

### [0074] 실시예 5: 마우스 이식(xenotransplantation) 효과 검증

#### [0075] 실시예 5-1. 생산성 평가

[0076] 마우스 15마리를 각 5마리씩 대조군(CON), 비교군(SYN6;K\_LL\_006)급여처리군(SYN1;K\_LL\_001)으로 처리구로 나누었다. SYN6은 SYN1과 같은 메뚜기 장관에서 분리된 *L. lactis* 균주이며, SYN1의 효능을 비교하기 위해 사용되었다. 각 처리구 별로 각각 MRS 배지 배양액 1ml, K\_LL\_001 1ml( $1 \times 10^8$  cfu/ml), K\_LL\_006 1ml( $1 \times 10^8$  cfu/ml)을 급여한 후, 일 1회 개별 체중을 측정하여 일당증체량(Average Daily Gain; ADG)를 계산하였다. 섬유소 분해능을 갖는 곤충 장관유래 미생물(Probiotics)을 신바이오틱(Synbiotics) 형태로 마우스에 급여한 급여처리군은 대조군 및 비교군에 비해 ADG 및 체중이 증가한 것을 확인하였다(도 4)

[0077] 도 4의 (a)는 대조군 및 급여처리군의 ADG를 측정한 것이고, (b)는 대조군 및 급여처리군의 급여처리 전 및 6주 후 체중변화를 측정한 것이다. 생산성 평가 결과, 같은 메뚜기 분변에서 분리한 비교군 SYN6은 일당증체량과 종료체중이 대조군과 유사한 것을 확인하였다. 반면 SYN1은 일당증체량이 대조군 대비 155% 증가하였으며, 대조군, 비교군 SYN6과 비교하여 종료체중이 가장 많이 나가는 양상을 보여 SYN1이 생산성 향상에 효과적인 것으로 판단하였다.

#### [0079] 실시예 5-2. 소화율 평가

[0080] 6주간 실험하는 동안, 마지막 2주차부터 각 사료에 소화율 지시제로 이용하기 위해, 소화되지 않는 산화크롬 0.3%를 배급하여 급여하고, 산화크롬사료 급여 3일차부터 처리구별로 분변을 누적 샘플링 하였다. 누적된 분변

샘플은 분쇄시키고 50℃에서 24시간 건조 전/후 무게를 측정하여 건물 소화율을 계산하였다. 그 후, 건조시킨 분변 및 사료 샘플을 이용하여 체적 열량계(Bomb calorimeter)로 에너지를 측정했으며, 켈달법(Kjeldahl Method)을 이용하여 AOAC 가이드라인에 따라 조섬유를 측정하고, 각 측정된 값을 소화율 공식에 대입하여 계산하였다. 계산 결과, 도 5와 같이 섬유소 분해능을 갖는 메뚜기 장관유래 미생물을 신바이오틱 형태로 마우스 급여한 처리구(SYN1)은 대조군과 비교하여 건물(DM; Dry Matter) 소화율이 유의적으로 증가하는 것을 확인했으며, 그 외에도 에너지(E), 조단백질(CP; Crude Protein) 및 조섬유(CF; Crude Fiber)에 대한 소화율도 증가하는 경향이 나타남을 확인하였다.

#### [0082] 실시예 5-3. RT-PCR 평가

[0083] 상기 실시예 5-1 및 5-2의 6주간 실험을 종료한 후, 각 처리군별로 부검하여 조직상태를 육안으로 확인 비교하였다. 부검 마우스 회장 말단 3cm 상단으로부터 10cm를 적출하고, 내용물을 식염수로 세척한 후 장 점막 상피 세포를 샘플링하였다. 샘플링한 상피세포에서 RNA를 추출한 후 cDNA로 합성한 후 RT-PCT를 이용하여 하우스키퍼 유전자 (Housekeeping gene)로 GAPDH(Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase) 발현량을 측정하고, 장점막에서 병원성 미생물의 침투 억제 및 세포 누출을 방지하기 위한 밀착연접(Tight junction)의 주요 구성인 오클루딘(Occludin) 및 ZO-1의 발현량을  $2^{-\Delta\Delta CT}$  방법으로 비교분석하였다. RT-PCR은 하기 표 3의 조성 및 표 4의 조건으로 수행했으며, 증폭에 사용된 프라이머는 각각 하기 표 5와 같았다.

표 3

| RT-PCR 조성              | $\mu\text{l}$ |
|------------------------|---------------|
| SYBR GREEN             | 5             |
| 증류수(D.W)               | 3             |
| Primer (forward)       | 0.5           |
| Primer (reverse)       | 0.5           |
| Template               | 1             |
| Final volume(PCR tube) | 50            |

표 4

| RT-PCR 조건                        |         |          |     |
|----------------------------------|---------|----------|-----|
| 단계                               | 온도      | 시간       | 사이클 |
| 개시(Initiation)                   | 95℃     | 3min     | 1   |
| 변성(Denaturation)                 | 95℃     | 30sec    | 35  |
| 결합(Annealing)                    | 60℃     | 15sec    |     |
| 신장 (Extension)                   | 72℃     | 15sec    |     |
| 신장(Fully extension)              | 72℃     | 30sec    | 1   |
| 멜팅 커브 분석(melting curve analysis) | 60℃-95℃ | 0.5℃/sec | 1   |

표 5

| 유전자           | Forward                 | Reverse                 |
|---------------|-------------------------|-------------------------|
| GADPH         | CATCACTGCCACCCAGAAGACTG | ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAG |
| Occludin(OCN) | ACTGGGTCAGGGAATATCCA    | TCAGCAGCAGCCATGTACTC    |
| ZO-1          | GTTGGTACGGTGCCCTGAAAGA  | GCTGACAGGTAGGACAGACGAT  |

[0087] 메뚜기 장관유래 미생물 및 생균제 급여에 따른 장점막 밀착연접(Tight junction) 관련 단백질 발현량을 측정한 결과 하기 표 6과 같이 나타나 대조군에 비해 급여처리군에서 장점막 면역단백질 발현량이 더 많은 점을 확인하였다. 이를 통해 섬유소 분해능을 갖는 곤충 장관유래 미생물을 신바이오틱 형태로 급여 처리를 통해 더 견고한 장점막 세포 결합을 이루고 있음을 검증하였다.

표 6

[0088]

|          |      | Fold Change |                    |                         |
|----------|------|-------------|--------------------|-------------------------|
|          |      | $\Delta Ct$ | $\Delta \Delta Ct$ | $2^{-\Delta \Delta Ct}$ |
| Occludin | CON  | 12.00       | 0.00               | 1.00                    |
|          | SYN1 | 10.28       | -1.71              | 3.28                    |
| ZO-1     | CON  | 13.33       | 0.00               | 1.00                    |
|          | SYN1 | 9.72        | -3.60              | 12.16                   |

[0090]

실시예 5-4. 형태학 평가

[0091]

실험 종료 부검시, 마우스 회장 말단부위로부터 3cm 적출한 뒤 1.5cm씩 반을 잘라 10% 포르말린 버퍼에 담가 조직을 고정시킨 후 파라핀 블록 및 슬라이드를 만들어 H&E 염색시킨 후 현미경으로 확인하였다. 장관 발달 및 손상도를 비교하기 위한 용모 및 음와 길이와 비율을 비교한 결과, 섬유소 분해능을 갖는 곤충 장관유래 미생물을 신바이오틱 형태로 급여한 급여처리군은 대조군과 유의적인 차이가 나지 않은 것으로 나타났으며, 이를 통해 미생물을 신바이오틱 형태로 급여시에도 장관 발달에 대한 유해성이 없음을 확인하였다.

[0093]

실시예 6: 16S rRNA 유전자 분석

[0094]

마우스 분변샘플 0.2g으로부터 DNA를 추출하고(QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit QIAGEN社) 16S rRNA 유전자를 타겟하는 프라이머를 이용하여 16S rRNA 유전자 앰플리콘(Amplicon)을 제작하였으며, 앰플리콘을 클리닝(Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega社)한 뒤 일루미나 마이식(Illumina MiSeq chemistry) 기반의 16S rRNA 유전자 앰플리콘 시퀀싱(16S rRNA gene amplicon sequencing)을 실시하였다(Taxonomic-based analysis).

[0095]

신바이오틱 급여처리 전에는 대조군과 급여처리군간의 군총 차이가 크게 나지는 않았지만, 3주, 6주 기간이 지남에 따라 군총 구성 및 군총별 비율의 차이가 드러나는 것을 확인하였다.

[0096]

도 6는 분석을 통해 대조군과 급여처리군 마우스 분변샘플 내 군총 구성 및 비율을 확인한 것으로, 도 6의 (a)는 생물 분류 문(Phylum) 단위에서, (b)는 속(genus) 단위로 군총별 비율의 차이를 비교한 것이다.

[0097]

도 7에 도시한 바와 같이, 신바이오틱 급여 6주 후 급여처리군에서 오스실로스피라(Oscillospira) 및 라크노스피라시에(Lachnospira)는 대조군 대비 유의적으로 증가했으며, 수테렐라(Sutterella)는 유의적으로 감소한 것을 확인하였다.

[0098]

오스실로스피라(Oscillospira)는 탄수화물 분해능을 가지고 있으며 단쇄지방산 생성을 통해 에너지 생성에 도움을 줄 수 있다. 또한 라크노스피라시에(Lachnospira)는 에너지 생성 및 면역 체계에 관여하여 장 염증 질병의 감소를 돕는 역할을 한다. 이에 반하여 장 염증 관련 기능을 하는 수테렐라(Sutterella)는 감소함에 따라 마우스의 장 안정성을 향상시킬 수 있다. 즉, 급여처리군의 오스실로스피라(Oscillospira), 라크노스피라시에(Lachnospira)의 유의적 증가와 수테렐라(Sutterella)의 유의적 감소를 통해, 급여처리로 마우스의 에너지 생성과 면역체계가 향상되어 장내 안정성이 유도되고, 궁극적으로 마우스의 성장에 긍정적인 영향을 미쳤음을 확인하였다.

[0100]

이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기를 기초로 다양한 기술적 수정 및 변형을 적용할 수 있다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

[0101]

그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

## 수탁번호

[0103]

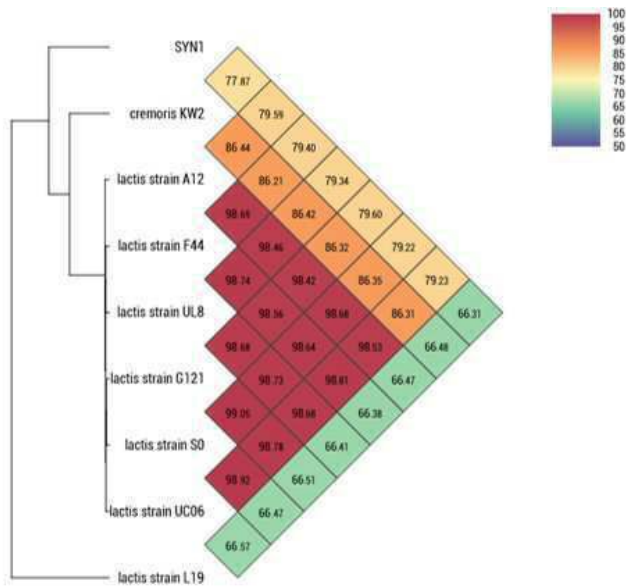
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC14396BP

수탁일자 : 20211204

## 도면

### 도면1



### 도면2

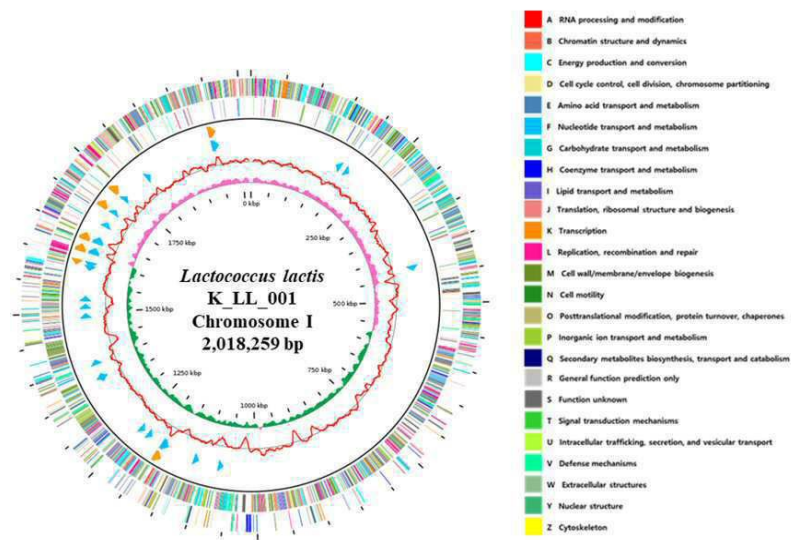
#### Virulence Factors

| Genome | Name                      | Contig no. | Length  | Form     | % Identity | BLAST results     |
|--------|---------------------------|------------|---------|----------|------------|-------------------|
| 1      | <i>Lactococcus lactis</i> | 1          | 2018259 | circular | 95         | No hits found     |
| 3      | <i>Lactococcus lactis</i> | 1          | 3752028 | linear   | 95         | 8 virulence genes |
|        |                           | 2          | 1958347 | circular | 95         | No hits found     |
|        |                           | 3          | 862598  | linear   | 95         | No hits found     |
|        |                           | 4          | 46379   | circular | 95         | No hits found     |
| 4      | <i>Lactococcus lactis</i> | 1          | 1995099 | circular | 95         | No hits found     |
| 5      | <i>Lactococcus lactis</i> | 1          | 2375093 | circular | 95         | No hits found     |
| 6      | <i>Lactococcus lactis</i> | 1          | 2017811 | circular | 95         | No hits found     |

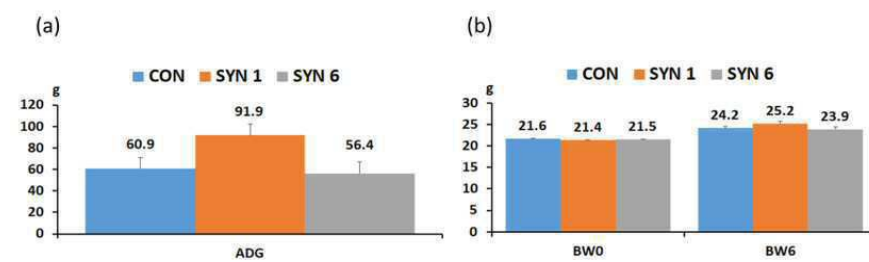
#### Antimicrobial Resistance

| Genome | Name                      | Contig no. | Length  | Form     | % Identity | BLAST results | AMR  |
|--------|---------------------------|------------|---------|----------|------------|---------------|------|
| 1      | <i>Lactococcus lactis</i> | 1          | 2018259 | circular | 95         | No hits found |      |
| 3      | <i>Lactococcus lactis</i> | 1          | 3752028 | linear   | 95         | No hits found |      |
|        |                           | 2          | 1958347 | circular | 95         | No hits found |      |
|        |                           | 3          | 862598  | linear   | 95         | No hits found |      |
|        |                           | 4          | 46379   | circular | 95         | No hits found |      |
| 4      | <i>Lactococcus lactis</i> | 1          | 1995099 | circular | 95         | No hits found |      |
| 5      | <i>Lactococcus lactis</i> | 1          | 2375093 | circular | 95         | 1 AMR gene    | ImrD |
| 6      | <i>Lactococcus lactis</i> | 1          | 2017811 | circular | 95         | No hits found |      |

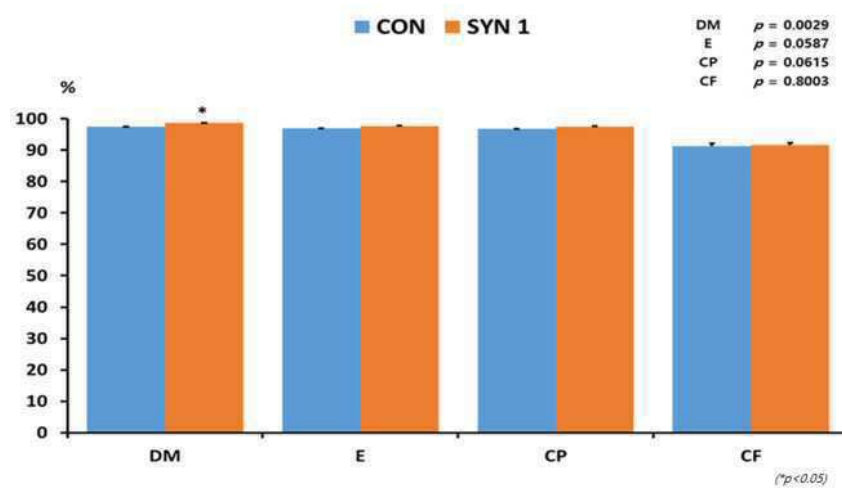
도면3



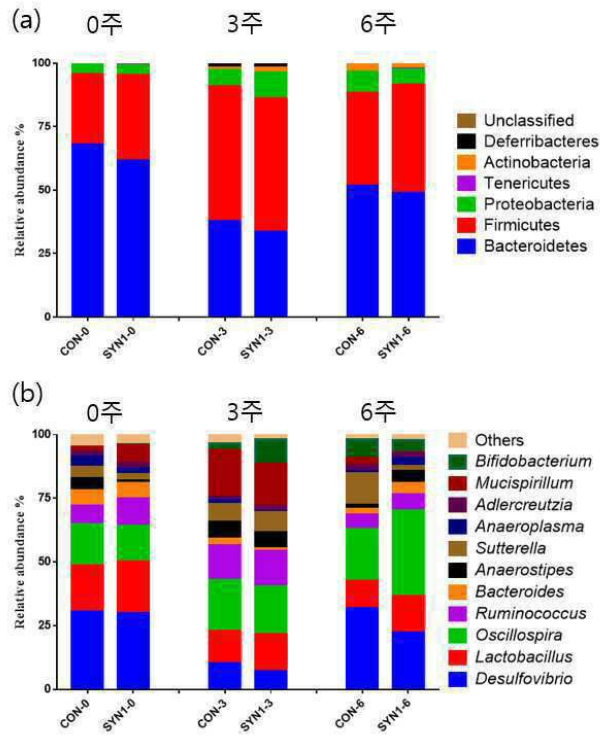
도면4



도면5



도면6



도면7

