

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2019년 2월 7일 (07.02.2019)

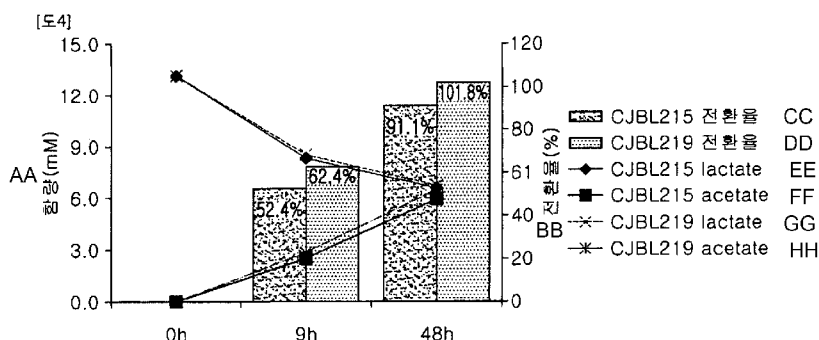


(10) 국제공개번호
WO 2019/027073 A1

- (51) 국제특허분류: *A23K 10/16* (2016.01) *A23K 50/10* (2016.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2017/008455
- (22) 국제출원일: 2017년 8월 4일 (04.08.2017)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (71) 출원인: 씨제이제일제당(주) (CJ CHEILJEDANG CORPORATION) [KR/KR]; 04560 서울시 중구 동호로 330 CJ제일제당센터, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 오은선 (OH, Eun Seon); 13462 경기도 성남시 분당구 산운로 98, 804동 904호, Gyeonggi-do (KR). 김유진 (KIM, Yu Jin); 16509 경기도 수원시 영통구 에듀타운로 108, 1527호, Gyeonggi-do (KR). 박민아 (PARK, Min Ah); 16459 경기도 수원시 권선구 세류로 60, 115동 204호, Gyeonggi-do (KR). 우서형 (WOO, Seo Hyung); 16519 경기도 수원시 영통구 중부대로448번길 28, 207동 1901호, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 리앤목 특허법인 (Y.P.LEE, MOCK & PARTNERS); 06292 서울시 강남구 언주로30길 13 대림아크로텔 12층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK,

(54) Title: FEEDSTUFF ADDITIVE CONTAINING *BACILLUS SUBTILIS* AND *BACILLUS LICHENIFORMIS*, FEEDSTUFF COMPOSITION CONTAINING SAME ADDITIVE, AND PREPARATION METHOD FOR SAME FEEDSTUFF ADDITIVE

(54) 발명의 명칭: 바실러스 서브틸리스 및 바실러스 리체니포미스를 포함하는 사료 첨가제, 상기 첨가제를 포함하는 사료 조성물 및 상기 사료첨가제의 제조 방법



AA ... Content(mM)
BB ... Conversion rate(%)
CC ... CJBL215 conversion rate
DD ... CJBL219 conversion rate
EE ... CJBL215 lactate
FF ... CJBL215 acetate
GG ... CJBL219 lactate
HH ... CJBL219 acetate

(57) Abstract: The present application relates to a feedstuff additive containing *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*, a feedstuff composition containing the feedstuff additive, and a preparation method for the feedstuff additive

(57) 요약서: 본 출원은 바실러스 서브틸리스 및 바실러스 리체니포미스를 포함하는 사료첨가제, 상기 사료첨가제를 포함하는 사료 조성물, 및 상기 사료 첨가제의 제조 방법에 관한 것이다.

[다음 쪽 계속]



MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서와 별도로 규칙 13의2에 의하여 제출한 기탁된
생물학적 물질에 관한 표시와 함께 (규칙 13의2.4(d)(i)
및 48.2(a)(viii))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 바실러스 서브틸리스 및 바실러스 리체니포미스를 포함하는 사료 첨가제, 상기 첨가제를 포함하는 사료 조성물 및 상기 사료첨가제의 제조 방법

기술분야

- [1] 본 출원은, 바실러스 서브틸리스 및 바실러스 리체니포미스를 포함하는 사료 첨가제, 상기 첨가제를 포함하는 사료 조성물 및 상기 사료 첨가제의 제조 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 소와 같은 반추동물은 섭취하는 조사료의 양이 비육우의 경우 사료의 약 20%, 낙농우의 경우 약 60%를 차지하고 있으며, 섭취한 조사료는 제1위인 반추위내에서 미생물에 의해 분해되고 필요한 영양소 및 에너지가 흡수된다. 영양적/생리적 측면에서 보면, 반추동물은 반추위에 서식하는 미생물과 동물의 조직이 필요로 하는 단백질, 에너지, 지방산, 광물질 및 비타민 등의 많은 부분을 조사료로부터 섭취한다. 조사료는 생초, 건초 또는 사일리지의 형태로 동물에 급여되고 건조상태에서 20~30% 이상의 조섬유를 함유하고 있으며 비교적 분해되기 어려운 헤미셀룰로오스, 리그닌, 셀룰로오스로 이루어져 있다. 이런 조사료의 소화율을 높여 사료가치를 증진시키기 위하여 과거부터 여러 연구가 이루어 졌는데 대표적으로 물리적 처리방법(침지, 분쇄, 가압 증기처리, 팽창, 감마선 조사, 펠렛팅)과 화학적 처리방법(가성소다, 요소, 암모니아, 석회, 수산화칼슘, 수산화칼륨, 탄산나트륨, 염소, 오존, 과산화수소 등), 생물학적 처리방법(발효, 효소처리, 사일리지 등)이 있다. 그러나 이 중 물리적 처리방법은 가공에 많은 비용이 드는 문제점이 있고, 화학적 방법은 가공비용의 증가는 물론 취급 시 위험성이 따르며 토양을 오염시키거나 동물의 정상적인 생리현상에 변화를 줄 수 있는 문제점이 있어 지양하고 있는 실정이다. 따라서 섬유소를 분해하는 효소나 그러한 효소를 많이 생산하는 미생물을 첨가하는 생물학적 처리방법을 많이 활용하고 있으며 특히 셀룰로오스의 분해율을 높이기 위한 연구가 많이 이루어지고 있다.
- [4] 낙농우와 비육우에게 조사료만으로는 부족한 에너지 요구량을 충족시키고, 생산성을 향상시키기 위하여 부피가 작고 에너지 함량이 높으며 조사료에 비해 소화가 잘 되는 농후사료를 함께 급여한다. 하지만 농후사료를 많이 급여하는 경우 전분이 분해되는 과정에서 젖산의 농도가 증가하게 되고 이는 반추위내 pH를 급격히 감소시켜 반추위 유용 미생물의 생장에 악영향을 미치게 되고, 과산증으로까지 이어져 사료섭취량 감소, 소화장애, 심한 탈수증상과 설사를 유발하게 된다.

[5] 따라서, 셀룰로오스 및 젖산 분해능을 높일 수 있는 사료첨가제의 개발이 요구된다.

[6] [선행기술문헌]

[7] [특허문헌]

[8] 대한민국 특허 등록 제10-1721900호

[9]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[10] 본 출원의 일 목적은 바실러스 서브틸리스 및 바실러스 리체니포미스를 포함하는 유지방 개선에 도움되며, 유량 증진에도 유용한 사료 첨가제를 제공하는 것이다.

[11] 본 출원의 다른 일 목적은 본원에 기술된 바실러스 서브틸리스 및 바실러스 리체니포미스를 포함하는 사료첨가제가 포함된 사료 조성물을 제공하는 것이다.

[12]

과제 해결 수단

[13] 이하, 본 출원에 대해 보다 상세히 설명한다. 본 명세서에 기재되어 있지 않은 내용은 본 출원의 기술 분야 또는 유사 분야에서 숙련된 자이면 충분히 인식하고 이해할 수 있으므로 그 설명을 생략한다.

[14]

[15] 본 출원의 일 양태는, 바실러스 서브틸리스 및 바실러스 리체니포미스를 포함하는 유지방 및 유량 증진용 사료 첨가제에 관한 것이다.

[16] 바실러스 서브틸리스는 소화효소, 예를 들어, 셀룰라아제 및/또는 만나아제를 생산하여 섬유소 등을 분해할 수 있는 것이라면 본원에서 사용할 수 있다. 바실러스 서브틸리스는 주로 토양, 퇴장, 또는 고추장 속에서 서식하며, 그람 양성균이며, 호기성 간균이다. 바실러스 서브틸리스의 예로, 바실러스 서브틸리스 CJBS62(*Bacillus subtilis* CJBS62), 또는 바실러스 서브틸리스 CJBS16을 들 수 있다. 특히 바실러스 서브틸리스 CJBS62를 사용할 수 있다. 바실러스 서브틸리스 CJBS62는 KCCM(한국 미생물 보존 센터: 대한민국 서울시 서대문구 홍제내-2가-길, 유림 빌딩 45)에 2017. 6. 22. 자로 기탁명: KCCM12039P로 기탁되었다. 바실러스 서브틸리스 CJBS62 균주의 16s 리보솜 DNA의 염기서열(5'→3')은 서열번호 3과 같다.

[17] 바실러스 리체니포미스는 젖산을 분해하여 아세트산을 합성할 수 있는 것이라면 본원에서 사용할 수 있다. 일 예에서, 상기 바실러스 리체니포미스를 젖산 함유 배지에서 9 시간 내지 48 시간 배양한 경우, 상기 바실러스 리체니포미스의 초기 젖산량 대비 아세테이트 전환율은 30% 내지 70%, 구체적으로 50% 내지 65%일 수 있고, 또는, 상기 바실러스 리체니포미스의 젖산

소모량 대비 아세테이트 전환율은 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 또는 80% 이상일 수 있다. 상기 초기 젖산량 대비 전환율은 하기의 식 1을 참고할 수 있으며, 상기 젖산 소모량 대비 아세테이트 전환율은 하기의 식 2를 참고할 수 있다:

[18] [식 1]

[19] 초기 젖산 대비 아세테이트 전환율 = (아세트산 생성량/ 초기 젖산 량)*100

[20] [식 2]

[21] 젖산 소모량 대비 전환율(%) = (아세트산 생성량/ 젖산 소모량)*100

[22]

[23] 바실러스 리체니포미스는 추가로, 셀룰라아제 및/또는 만나아제를 생산할 수 있는 균주일 수 있다.

[24] 바실러스 리체니포미스는 주로 된장, 또는 고추장 속에서 서식하며, 그람 양성균이며, 호기성 간균이다. 바실러스 리체니포미스의 예로, 바실러스 리체니포미스 CJBL215(*Bacillus licheniformis* CJBL215) 및 바실러스 리체니포미스 CJBL219(*Bacillus licheniformis* CJBL219) 를 들 수 있다. 특히 바실러스 리체니포미스 CJBL219 를 사용할 수 있다. 바실러스 리체니포미스 CJBL215 및 바실러스 리체니포미스 CJBL219는 각각 KCCM (한국 미생물 보존 센터: 대한민국 서울시 서대문구 홍제내-2가-길, 유림 빌딩 45)에 2017. 6. 22. 자로 기탁명: KCCM12040P 및 KCCM12041P 로 기탁되었다. 바실러스 리체니포미스 CJBL215 및 바실러스 리체니포미스 CJBL219의 16s 리보솜 DNA의 염기서열(5'→3')은 각각 서열번호 1 및 2와 같다.

[25] 본 출원에 따른, 바실러스 서브틸리스 및 바실러스 리체니포미스를 포함하는 사료 첨가제는, 반추동물의 반추위 pH 를 안정화 시킬 수 있으며, 반추동물의 사료 소화율을 높일 수 있다. 또한, 상기 사료 첨가제는, 착유우가 생산하는 우유 내 유지방 개선에 효과적일 뿐 아니라, 생산되는 유량을 효율적으로 증가시킬 수 있다.

[26] 사료 첨가제 1g 당 바실러스 서브틸리스와 바실러스 리체니포미스는 각각 독립적으로, 1×10^7 cfu 이상, 구체적으로 1×10^8 cfu 이상, 보다 구체적으로 1×10^9 cfu 이상 포함될 수 있다. 상기 농도이면, 섬유소를 효과적으로 분해하고 유지방 증가에 효과적인 사료 첨가제를 제공할 수 있다.

[27] 사료 첨가제의 사용량은, 0.1g 내지 1kg/마리/1일, 구체적으로 5g 내지 900g/마리/1일, 보다 구체적으로 10 g 내지 800 g/마리/1일일 수 있다.

[28] 바실러스 서브틸리스와 바실러스 리체니포미스의 중량비는 1:9 내지 9:1, 구체적으로는 2:8 내지 8:2, 구체적으로는 3:7 내지 7:3, 보다 구체적으로는 1:2 내지 2:1 일수 있다.

[29] 사료 첨가제는 액상 또는 고상일 수 있고, 액상인 경우, 바실러스 서브틸리스와 바실러스 리체니포미스는, 바실러스 서브틸리스의 균체, 바실러스 리체니포미스의 균체, 이의 배양액, 또는 이의 농축액 형태로 존재할 수 있다.

고상인 경우, 바실러스 서브틸리스의 균체, 바실러스 리체니포미스의 균체, 이의 배양액, 또는 이의 농축액 등을 포함할 수 있으며, 예를 들면, 열 또는 동결 건조 등에 의해 제조된, 분말, 정제, 펠릿제, 과립, 피복제 등의 형태를 가질 수 있다.

- [30] 본 출원의 다른 양태는, 본원에 기술된 사료 첨가제를 포함하는 사료 조성물에 관한 것이다. 사료 조성물 중 사료 첨가제의 함량은 사료 조성물의 중량을 기준으로 0.1 중량% 내지 50 중량%, 구체적으로는 0.1 중량% 내지 40 중량%, 보다 구체적으로는 1 중량% 내지 20 중량%의 범위로 포함될 수 있다.
- [31] 사료 조성물은 본원의 사료 첨가제 외에, 동물의 성장 촉진에 유효한 성분, 영양 성분, 영양 보조 성분, 보존 안정성을 높이는 성분, 피복제 성분 등의 임의 성분을 추가 포함할 수 있다. 사료 조성물은, 다른 생균제; 아밀라아제, 리파아제 등의 효소; L-아스코르브산, 엽화콜린, 이노시톨 등의 비타민; 엽화칼륨, 시트르산철, 산화마그네슘, 인산염류 등의 미네랄; 리신, 알라닌, 메티오닌 등의 아미노산; 푸마르산, 부티르산, 락트산 등의 유기산 또는 이의 염; 비타민 C, 비타민 E 등의 항산화제, 프로피온산칼슘 등의 곰팡이 방지제; 레시틴, 글리세린 지방산 에스테르 등의 유화제; 색소 등을 포함할 수 있다.
- [32] 본원에서 사료는 동물 사료일 수 있고, 구체적으로 반추 동물 사료일 수 있으며, 반추 동물의 예로는 소, 물소, 산양, 양, 염소 또는 사슴일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 섭취시키는 사료의 양은 동물의 종류, 체중, 연령, 성별, 건강 상태, 사료의 성분 등에 따라 적절히 조절할 수 있다.
- [33]
- [34] 본 출원의 또 다른 양태는, 본원에 기술된 사료 첨가제의 제조 방법에 관한 것으로, 상기 제조 방법은, 바실러스 서브틸리스와 바실러스 리체니포미스를 배양하고, 상기 균주들의 배양된 균체, 이의 배양액, 또는 이의 농축액을 건조하는 것을 포함할 수 있다. 상기 배양은 구체적으로 균주를 접종한 후 30°C 내지 50°C에서, 2 시간 내지 60 시간 동안, 예를 들어, 32°C 내지 40°C에서, 5 시간 내지 50 시간 동안 배양하는 것을 포함할 수 있다. 상기 배양은 보다 구체적으로, 균주를 접종한 후 30°C 내지 50°C에서, 2 시간 내지 60 시간 동안, 예를 들어, 32°C 내지 40°C에서 5 시간 내지 50 시간 동안 1차 배양하여 균주가 배양물 1g 당 1×10^7 cfu 이상이 되도록 하고, 이후, 상기 배양물에 옥수수, 소맥피, 대두박, 당밀 중 하나 이상의 원료를 첨가하여 30°C 내지 50°C에서, 2 시간 내지 60 시간 동안, 예를 들어, 32°C 내지 40°C에서 5 시간 내지 50 시간 동안 2차 배양하는 것을 포함할 수 있다. 상기 건조는, 배양된 균체, 이의 배양액, 또는 이의 농축액을 40°C 내지 70°C에서 5 시간 내지 120 시간 동안, 예를 들어, 40°C 내지 60°C에서, 5 시간 내지 60 시간 동안 건조하는 것일 수 있다. 상기 제조 방법은 일 구체예에서, 상기 건조 후 추가로 분쇄하는 공정을 포함할 수 있다.
- [35] 본 출원의 또 다른 양태는, 바실러스 서브틸리스 및 바실러스 리체니포미스를 포함하는 사료 첨가제를 동물에게 투여하는 것을 포함하는, 동물의 유지방 및 유량을 증가시키는 방법에 관한 것이다. 당해 양태에 대한 구체적인 설명은

본원에 기재된 다른 양태에서 기재된 바와 같다.

- [36] 본 출원의 또 다른 양태는, 바실러스 서브틸리스 및 바실러스 리체니포미스를 포함하는 사료 첨가제를 동물에게 투여하는 것을 포함하는, 동물, 특히 반추 동물의 반추위 pH를 안정화시키는 방법에 관한 것이다. 당해 양태에 대한 구체적인 설명은 본원에 기재된 다른 양태에서 기재된 바와 같다.

- [37] 본 출원의 또 다른 양태는, 바실러스 서브틸리스 및 바실러스 리체니포미스를 포함하는 사료 첨가제를 동물에게 투여하는 것을 포함하는, 동물, 특히 반추 동물의 소화율 증진 방법에 관한 것이다. 당해 양태에 대한 구체적인 설명은 본원에 기재된 다른 양태에서 기재된 바와 같다.

[38]

발명의 효과

- [39] 본 출원에 따른 사료 첨가제는 동물, 특히 반추 동물의 유지방 개선에 도움이 될 뿐만 아니라 하절기 고온 스트레스에 따른 유지방 감소 현상을 개선시킬 수 있다. 또한, 반추위 내 젖산 분해에 효과가 있어 젖산으로 인한 반추위 pH 감소와 이로 인한 고산증 예방에도 유용할 것으로 판단된다.

[40]

도면의 간단한 설명

- [41] 도 1은 본 출원의 일 실시예에 따른 바실러스 서브틸리스 CJBS62 균주, 바실러스 리체니포미스 CJBL215, CJBL219 균주의 전자 현미경 사진이다.
- [42] 도 2는 본 출원의 일 실시예에서 젖산 소모 균주의 선발에 이용된 배지의 색 변화를 도시한다. 여기서, 배지의 색이 노란색(좌측)에서 보라색(우측)으로 변하면 배지 내 균주가 젖산을 소모한 것으로 판단하였다.
- [43] 도 3은 본 출원의 일 실시예에서, 각 균주별 아세테이트로의 전환율을 보여주는 막대그래프이다.
- [44] 도 4는 본 출원의 일 실시예에서, 9h, 48h 배양에 따른, 바실러스 리체니포미스 CJBL215, CJBL219 균주의 젖산 양, 아세테이트 양(좌측 y축)과, 아세테이트로의 전환율(우측 y축)을 도시하는 그래프이다.
- [45] 도 5는 본 출원의 일 실시예에 따른 바실러스 서브틸리스 CJBS62 균주, 바실러스 리체니포미스 CJBL215, CJBL219 균주의 용혈성 확인 결과를 나타내는 사진이다.
- [46] 도 6은 본 출원의 일 실시예에 따른 사료첨가제를 농후사료에 첨가시 배양 시간에 변화에 따른 젖산 농도의 변화를 보여주는 그래프이다.
- [47] 도 7은 본 출원의 일 실시예에 따른 사료첨가제를 농후사료에 첨가시 배양 시간에 변화에 따른 아세테이트 농도의 변화를 보여주는 그래프이다.
- [48] 도 8은 본 출원의 일 실시예에 따른 사료첨가제를 농후사료에 첨가시 pH 안정화 효과를 대조구와 비교하여 보여주는 막대 그래프이다.
- [49] 도 9는 본 출원의 일 실시예에 따른 사료첨가제를 농후사료에 첨가시

소화율개선 정도를 보여주는 막대 그래프이다.

- [50] 도 10은 본 출원의 일 실시예에 따른 사료첨가제를 TMR 사료에 첨가시 소화율개선 정도를 보여주는 막대 그래프이다.

[51]

발명의 실시를 위한 형태

- [52] 이하, 본 출원을 실시예를 들어 상세히 설명하고자 하나, 이는 본 출원의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 본 출원이 이에 한정되는 것은 아니다.

[53]

[54] [실시예]

[55] <실시예 1: 균주 분리 및 선발>

[56] (1) 시료 확보 및 균주 분리

- [57] 전통 장류인 된장, 고추장 등의 시료를 확보하여, 확보된 시료를 단계적으로 희석하여 BHI(Brain Heart Infusion, Difco) 고체배지에 도말 후 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 각 시료에서 분리된 균주들을 새로운 배지에 옮겨 배양하는 방법으로 순수 분리하였으며, 순수 분리되어 배양된 균을 총 중량대비 20중량% 글리세롤이 첨가된 배지에 담아 -70°C 이하에서 보존하였다. 이 중 아래의 방법으로 셀룰라아제 활성이 우수한 균주와, 젖산을 분해하여 아세트산을 생산하는 능력이 우수한 균주들을 분리하였다.

[58]

[59] (2) 형태학적, 생화학적 특성 조사

- [60] 상기 분리된 균주의 동정을 위하여, 일차적으로 형태학적, 생화학적 조사를 수행하였다. 형태학적인 특징으로 그람 염색결과 분리된 균주들 모두 그람 양성이었으며, 전자현미경 촬영결과, 간균임을 확인하였다(도 1).

- [61] 분리된 균주들의 생화학적 특성을 분석하기 위하여 API 50 CHB system(biomerieux Vitek, Inc, 프랑스)을 사용하여, 각 균주의 당 발효 패턴을 분석하여 표 1에 나타내었다.

[62] [표1]

당	결 과			당	결 과		
	CJBL2 15	CJB L219	CJB S62		CJBL2 15	CJBL2 19	CJB S62
control	-	-	-	Esculine	+	+	+
Glycerol	+	+	+	Salicine	+	+	-
Ertythritol	-	-	-	Cellobiose	+	+	-
D-Arabinose	-	-	-	Maltose	+	+	+
L-Arabinose	+	+	+	Lactose	-	+	-
Ribose	+	+	+	Melibiose	-	-	-
D-Xylose	+	-	-	Saccharose	+	+	+
L-Xylose	-	-	-	Trehalose	+	+	+
Adonitol	-	-	-	Inuline	-	-	+
β Methyl-xyloside	-	-	-	Melezitose	-	-	-
Galactose	-	+	-	D-Raffinose	+	-	+
D-Glucose	+	+	+	Amidon	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	Glycogene	+	+	-
D-Mannose	+	+	-	Xylitol	-	-	-
L-sorbose	-	-	-	β Gentiobiose	-	-	-
Rhamnose	-	+	-	D-Turanose	+	+	-
Dulcitol	-	-	-	D-Lyxose	-	-	-
Inositol	+	-	+	D-Tagatose	+	+	-
Mannitol	+	+	+	D-Fucose	-	-	-
Sorbitol	-	+	+	L-Fucose	-	-	-
α Methyl-D-mannosi de	-	-	-	D-Arabitol	-	-	-
α Methyl-D-glucosid e	+	+	-	L-Arabitol	-	-	-
N Acetyl	-	-	-	Gluconate	-	-	-

gllucosamine							
Amygdaline	+	+	-	2 ceto-gluconate	-	-	-
Arbutine	+	+	-	5 ceto-gluconate	-	-	-

[63] + 양성, - 음성

[64]

[65] 균주의 당 발효 패턴을 분석한 결과, CJBL215 는 바실러스 리체니포미스에 속하는 것으로 나타났으며(신뢰도 99.7%), CJBL219 도 바실러스 리체니포미스에 속하는 것으로 나타났다(신뢰도 99.9%). 또한 CJBS62는 바실러스 서브틸리스/아밀로리퀴펜서스에 속하는 것으로 나타났다(신뢰도 99.6%).

[66]

[67] (3) 균주 동정

[68] 균주의 보다 정확한 동정을 위하여, DNA 염기서열에 의한 분자계통분류학적 방법을 실시하였다. 염기서열분석은 PCR premix(바이오니아, 대한민국)와 유니버설 프라이머 27F(5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3')와 1492R(5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3')을 사용하여 16s rDNA의 유전자 증폭을 시켰다. 유전자 증폭 시 총 반응액은 20 μ l로 맞추어 94°C 1분, 56°C 1분, 72°C 1분을 총 30회 반복하여, 증폭된 DNA 염기서열을 분석하였다. 분리 균주의 분석된 16s rDNA의 염기서열은 서열번호 1 내지 3과 같다. 상기 분석결과, CJBL215와 CJBL219는 바실러스 리체니포미스, CJBS62는 바실러스 서브틸리스와 99% 상동성을 가지는 미생물로 동정되었다. 이에 상기 분리된 균주를 '바실러스 리체니포미스 CJBL215', '바실러스 리체니포미스 CJBL219', '바실러스 서브틸리스 CJBS62'로 각각 명명하였다. 상기와 같은 방법으로 동정된 본 발명의 신규한 미생물들은 한국미생물보존센터(KCCM)에 2017년 6월 22일자로 바실러스 리체니포미스 CJBL215, 바실러스 리체니포미스 CJBL219, 바실러스 서브틸리스 CJBS62를 각각 기탁명, KCCM12040P, KCCM12041P, KCCM12039P로 기탁하였다.

[69]

[70] <실시예 2: 분리 균주의 소화효소 활성 측정>

[71] (1) 균주의 소화 효소 활성

[72] 복합 소화 효소 활성이 있는 균주를 선별하기 위해, 분리된 장류 유래균에 대해서 만나아제(mannase), 셀룰라아제 2종에 대한 효소 활성 평가를 실시하였다. 효소 활성 평가는 각 효소에 대한 기질이 들어있는 배지를 사용하여 투명환(clear zone) 형성 정도에 따라 효소 활성 능력을 측정하였다.

[73] 상기 분리한 균주를 BHI(Brain Heart Infusion, Difco) 액체 배지에서 24시간 배양 후 얻어진 배양액을 채취하여 효소 활성 분석을 위한 조효소액으로 사용하였고, 아래와 같이 각 효소별 각각의 기질이 들어있는 배지를 사용하여 기질 분해

정도를 판정하였다.

[74] 1) 만나아제 활성 측정

[75] 1% 만난(logust bean gum, sigma, USA)이 첨가된 기질배지(Yeast extract 3g/L, Peptone 5g/L, KH_2PO_4 1g/L, Agar 20g/L, Ph 5)를 제조하였다. 조효소액을 1.5 μL 씩 기질배지에 점적한 후, 37°C에서 15~18 시간 반응 후 투명환 형성 정도에 따라 효소의 활성능력을 측정하였고, 그 결과를 표 2에 나타내었다.

[76] 2) 셀룰라아제 활성 측정

[77] 1% CMC(carboxymethylcellulose) 기질이 첨가된 YM 배지를 제조하였다.

조효소액을 1.5 μL 씩 기질 배지에 점적하여 37°C에서 15~18 시간 동안 반응시켰다. 투명환을 측정하기 위해 0.2% 콩고 레드(Congo red) 용액으로 30분 동안 염색하였으며, 1M NaCl 수용액으로 탈색하였다. 균주 주위의 기질이 분해되어 생기는 투명환의 형성 정도에 따라 효소의 활성 능력을 측정하였고, 그 결과를 표 2에 나타내었다.

[78] 상기 평가를 바탕으로 선발 균주 중 만나아제 활성이 우수하면서 셀룰라아제 활성이 가장 우수한 바실러스 서브틸리스 CJBS16, CJBS62 균주를 선발하였다.

[79] [표2]

선발 균주의 소화효소 활성 (단위 : mm)

	CJBS16	CJBL215	CJBL219	CJBS62
만나아제	5	0	2.5	3.5
셀룰라아제	2	3	2	3.5

[80] (2) 배양 상등액 내의 셀룰로스 분해 활성

[81] 선발된 균주의 배양 상등액에서의 셀룰로스 분해능을 확인하기 위해, 균주를 24시간 배양하여 10,000rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 0.2 μm 주사기필터를 이용하여 필터링하였다. 이 상층액을 Cellulose 가 함유된 배지(Carboxymethylcellulose sodium salt 10g/L, Bacto agar 15g/L)에 20 μL 떨어뜨리고 37°C에서 1일 반응한 후, 0.4% 콩고 레드 용액을 부어 20분간 염색한다. 염색 후 1M NaCl 용액으로 탈색하여 투명환의 크기를 측정하여 배양 상등액 내의 셀룰로스 분해능을 확인하였고, 그 결과를 표 3에 나타내었다. 선발된 바실러스 서브틸리스 CJBS62 균주가 배양 상등액 평가에서도 가장 우수함을 확인하였다.

[82] [표3]

선발 균주의 배양상등액내 셀룰로스 분해 활성 (단위 : mm)

	CJBS16	CJBL215	CJBL219	CJBS62
셀룰로스 분해 활성	16.5	16.5	14	24

[83] <실시예 3 : 젖산 소모 균주 및 아세테이트 생산 균주 선발>

[84] 젖산을 소모하는 균주를 선별하기 위해, 젖산을 첨가한 배지를 이용하여 배양 후 BCP 발색법을 통하여 젖산 소모 유무를 정성적인 방법으로 확인하였다. 발색을 위한 Bromophenol blue (BCP) 및 15mM 젖산을 함유한 배지(15mM lactate, Yeast extract 10g/L, Peptone 20g/L, NaCl 10g/L, Bromophenol blue (BCP) 0.0004g/L)를 제조하였다. Microcentrifuge tube에 상기 배지를 1.5ml씩 분주한 후, BHI(Brain Heart Infusion, Difco) 배지에서 전배양된 균주들을 각각 50 μ l 접종하였다. 상기 균주들을 튜브 내에서 37°C에서 4~5일 정치 배양하였다. 배지의 색을 관찰하여 배지의 색이 노란색에서 보라색으로 변하면 배지 내의 젖산을 소모한 것으로 판단하여 1차로 젖산 소모균을 선별하였다. 시료에서 분리된 177주의 균주들을 배양한 결과, CJBS16, CJBL215, CJBL219, CJBS62 총 4주를 선발하였다(도 2).

[85] 상기 선발된 CJBS16, CJBL215, CJBL219 및 CJBS62를 BHI(Brain Heart Infusion, Difco) 배지에 접종하고, 37°C, 200rpm에서 16시간 배양하여 균을 활성화시켰다. 15mM 젖산을 함유한 배지(15mM 젖산, Yeast extract 10g/L, Peptone 20g/L, NaCl 10g/L)에 상기 균을 5% 접종하여, 37°C, 200rpm에서 48시간 배양하였다. 배양 종료 후 배양액의 10% BCP를 첨가하여 젖산 소모 유무를 다시 한번 확인하였다. 상기 4종 균주 모두 젖산을 소모한다는 것을 확인하였다 (배양액 색 변화: 노란색->보라색).

[86]

[87] <실시예 4 : 젖산 소모 및 아세테이트 생산 함량 측정>

[88] (1) 아세테이트 생산량 측정

[89] 상기 선발된 CJBS16, CJBL215, CJBL219 및 CJBS62를 BHI(Brain Heart Infusion, Difco) 배지에 접종하고, 37°C, 200rpm에서 16시간 배양하여 균을 활성화시켰다. 15mM 젖산을 함유한 배지(15mM 젖산, Yeast extract 10g/L, Peptone 20g/L, NaCl 10g/L)에 상기 균을 5% 접종하여, 37°C, 200rpm에서 48시간 배양하였다.

[90] 상기 배양액을 원심분리하여 회수한 상등액 1ml에 25% metaphosphoric acid 0.2ml을 첨가하였다. 10,000rpm에서 5분간 원심분리하여 회수한 상등액을 0.2 μ m 필터로 필터링 후 GC(Agilent Technologies 7890A)를 이용하여 아세테이트 함량을 분석하였다.

[91] 젖산을 소모하는 균주 4종에 대해 젖산을 소모하여 아세테이트를 생성한 함량을 측정하였고, 그 전환율을 식 1에 의해 환산하였다. 그 결과, CJBL219균주의 전환율이 59.4%로 전환율이 가장 높았으며, CJBL215 균주의 전환율은 44.9% 였다(표 4, 도 3).

[92] [식 1]

[93] 초기 젖산 대비 아세테이트 전환율 = (아세트산 생성량/ 초기 젖산 량.) * 100

[94] [표4]

배지 내 젖산 소모 후 아세테이트 생성량 및 전환율

균주 No.	아세테이트함량(mM)	식 1에 의한 전환율(%)
CJBL219	8.91	59.4
CJBL215	6.74	44.9
CJBS16	3.74	24.9
CJBS62	1.99	13.3

[95] (2) 선발균주의 젖산 소모량 및 아세테이트 생성량 측정

[96] 선발균주의 배지 내 젖산 소모량 및 아세테이트 생성량을 정량하고자 하였다.

[97] 상기 선발된 CJBS16, CJBL215, CJBL219 및 CJBS62를 BHI(Brain Heart Infusion, Difco) 배지에 접종하여, 37°C, 200rpm에서 16시간 배양하여 균을 활성화 시켰다.

[98] 15mM 젖산을 함유한 배지(15mM 젖산, Yeast extract 10g/L, Peptone 20g/L, NaCl 10g/L)에 상기 배양된 균을 5중량% 접종하여, 37°C, 200rpm에서 48시간 배양하면서, 9시간, 48시간에 각각 샘플링하였다.

[99] 1) 젖산의 정량

[100] 상기 배양액을 원심분리하여 회수한 상등액을 0.2um 필터로 필터링하여 준비하였다. 필터링된 배양상등액을 microcentrifuge tube에 담아 Cedex Bio(ROCHE)의 젖산 bio(ROCHE) 장비를 이용하여 젖산 함량을 측정하였고, 그 결과를 표 5에 나타내었다.

[101]

[102] 2) 아세테이트의 정량

[103] 상기 배양액을 원심분리하여 회수한 상등액 1ml에 25% metaphosphoric acid 0.2ml을 첨가하였다. 10,000rpm에서 5분간 원심분리하여 회수한 상등액을 0.2um 필터로 필터링 후 GC(Agilent Technologies 7890A)를 이용하여 아세테이트 함량을 분석하였고, 그 결과를 표 5, 도 4 및 도 5에 나타내었다.

[104] [식 2]

[105] 소모된 젖산 대비 아세테이트 전환율 = (아세트산 생성량/ 젖산 소모량)*100

[106] 표 5를 참고하면, CJBL215 균주는 48시간 배양 시, 초기 젖산량 중에서 49.8%의 젖산을 소모하였으며, 소모된 젖산의 약 91.1%를 아세테이트로 전환시켰다. CJBL219균주는 48시간 배양시, 초기 젖산량 중에서 48.6%의 젖산을 소모하였으며, 소모된 젖산을 모두 아세테이트로 전환시켰다(도 4).

[107] [표5]

시간 경과에 따른 배지 내 젖산 함량, 아세테이트 함량 및 전환율

		0h	9h	48h
CJBL215	젖산양(mM)	13.12	8.35	6.59
	아세테이트 양(mM)	0	2.50	5.94
	식 2에 의한 전환율(%)		52.4	91.1
CJBL219	젖산 양(mM)	13.12	8.52	6.74
	아세테이트 양(mM)	0	2.87	6.49
	식 2에 의한 전환율(%)		62.4	101.8

[108]

[109] <실시예 5: 균주의 안전성>

[110] (1) 균주의 용혈성 확인

[111] β-용혈이란 유해균 중 인지질 효소를 생산하여 적혈구에 의해서 공급되는 인지질을 가수분해하여 적혈구를 용혈시키는 작용이다. 분리균주의 용혈성을 알아보기 위하여 혈액한천평판배지(sheep blood 5%, ㈜한일코메드, 대한민국)를 이용하였다. 준비된 혈액한천평판배지에 선형 접종(streaking)한 후, 37°C에서 24시간 배양하여 용혈 여부를 확인한 결과, 도 5와 같이 용혈성을 나타내지 않았음을 확인할 수 있었다.

[112]

[113] (2) 균주의 항생제 감수성 확인

[114] 선발 균주의 항생제 감수성을 확인하고자 실험을 진행하였다. 선발균주를 BHI(Brain Heart Infusion, Difco) 배지에 접종하여, 37°C, 200rpm에서 16시간 배양하였다. 배양된 균을 멸균된 면봉에 적셔 Mueller Hinton II Agar plate(Difco)에 도말한다. 균이 도말된 평판배지에 항생제 디스크를 올려 37°C에서 15~18시간 배양한다. 항생제 검사를 위해 Ampicillin, Clindamycin, Gentamicin, Kanamycin, Tetracyclin, Vancomycin, Erythromycin, Ampicillin/Sulbactam, Chloramphenicol, Streptomycin 디스크(OXOID)를 준비하여 실험을 수행하였다. 배양 후 항생제 디스크 주위의 성장저해영역(clear zone) 형성 정도에 따라 항생제 감수성을 확인하였다. 선발 균주의 항생제 감수성 검사에 대한 결과, 선발 균주는 위의 항생제에 내성을 갖지 않는 것으로 확인되었다(표 6).

[115] [표6]

항생제에 따른 균주의 성장저해도

항생제(Antibiotics)	항생제를 중심으로 한 성장저해영역 반지름(mm)		
	CJBL215	CJBL219	CJBS62
Amp10 (Ampicillin)	10	8	10
C30 (Clindamycin)	14	4	9
CN120 (Gentamicin)	18	12	12
K30 (Kanamycin)	13	9	10
TE30 (Tetracycline)	5	8	12
VA30 (Vancomycin)	9	6	7
E15 (Erythromycin)	13	13	11
SAM20 (Ampicillin/Sulbactam)	15	12	13
S10 (Chloramphenicol)	3	3	6
DA2 (Streptomycin)	6	7	9

[116]

[117] <실시에 6. 균주를 포함하는 사료첨가제의 제조>

[118] 상기 바실러스 균주 CJBL215, CJBL219 및 CJBL62 (*Bacillus licheniformis* 2종, *Bacillus subtilis* 1종)를 각각 Tryptic Soy broth 9L 에 접종한 후 36°C에서 36시간 배양하였다. Tryptic Soy agar 배지에 상기 균주를 도말하여 콜로니 수를 측정하였을 때, 각 균주 당 1g 중 1×10^9 cfu 이상이 될 때까지 각 균주를 배양하였다. 또한 고상발효의 원료로는 옥수수 20kg, 소맥피 30kg, 대두박 45kg, 및 당밀 5kg이 혼합된 혼합물을 준비하였다. 상기 배양한 바실러스 균주 3종의 배양액을 각각 9 L씩 혼합하여 총 27L의 배양액 혼합액을 만들고, 고상발효 원료 100kg에 추가하였다. 상기 균주가 고상발효 원료 내에서 고르게 발효될 수 있도록 교반을 하면서 34°C 온도에서 48시간 동안 발효되었다. 발효가 끝난 후, 50°C 온도에서 48시간 동안의 건조 과정을 거친 뒤 분쇄하여 사료첨가제를 얻었다.

[119]

[120] <실시에 7. 사료 첨가제의 기질별 반추위 발효 성상에 미치는 효과 측정>

[121] 하기, 건물소화율 개선 및 아세트산 증진 효과 실험은 다음과 같이 반추위 모형 정치배양 시스템을 이용하여 진행하였다.

[122] * 처리구: 200ml 세럼바틀에 상기 실시예 6 에서 제조한 사료 첨가제 50mg과 0.5g의 기질을 투입하고 이산화탄소 가스로 환원시킨 버퍼 37.5ml과 반추위액

12.5ml을 이산화탄소 가스로 혐기 상태를 유지하였다. 이산화탄소 가스를 약 30초 동안 충전시킨 후, 고무마개로 세럼바틀 입구를 막고 알루미늄캡으로 밀봉하였다. 이를 39°C 정치배양기에서 24시간 배양하였다. 이 때 기질은 농후사료 또는 TMR(Total Mixed Ration, 완전배합사료)을 사용하였으며, 사료첨가제는 기질 0.5g 당 10 wt%의 비율만큼 첨가하였다. 버퍼용액은 인산수소나트륨(Sodium Phosphate, monobasic, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 9.3g/L, 탄산수소나트륨(Sodium bicarbonate, NaHCO_3) 9.8g/L, 염화나트륨(Sodium chloride, NaCl) 0.47g/L, 염화칼륨(Potassium chloride, KCl) 0.57g/L, 염화마그네슘(Magnesium chloride, MgCl_2) 0.256g/L, 염화칼슘(Calcium chloride, CaCl_2) 0.106g/L, 카제인(Caseine, N-Z-Amine) 2.5g/L, 및 레자주린(resazurine) 용액 1.25ml/L을 혼합하여 제조하였다.

- [123] * 대조구: 사료첨가제가 추가되지 않은 기질이 준비되었으며, 상기 처리구와 동일한 조건에서 배양되었다.
- [124] 상기 처리구 및 대조구를 39°C 정치배양기에서 배양한 후, 각각의 젖산 함량, 아세테이트 함량, pH, 및 건물소화율을 다음 방법으로 측정하였다:
- [125] 젖산 함량은 배양액을 원심분리하여 회수한 상등액을 0.2um 필터로 필터링한 후 microcentrifuge tube에 담아 Cedex Bio(ROCHE)의 젖산 bio(ROCHE) 장비를 이용하여 측정하였다. 아세테이트 함량은 배양액을 원심분리하여 회수한 상등액 1ml에 25% metaphosphoric acid 0.2ml을 첨가하고, 10,000rpm에서 5분간 원심분리하여 회수한 상등액을 0.2um 필터로 필터링 후 GC(Agilent Technologies 7890A)를 이용하여 측정하였다. 건물소화율은 아래 식 3으로 계산하였다.
- [126] [식 3]
- [127] $\text{건물소화율}(\%) = (\text{배양전 기질량} - \text{배양후 기질량}) / \text{배양전 기질량} * 100$
- [128] 상기 '배양 전 기질량' 또는 '배양 후 기질량'은, 배양 전 또는 배양 후 배양액을 진공펌프를 이용하여 Filter paper에 필터링 한 후 건조하여(60°C, overnight) 측정하였다.
- [129]
- [130] 처리구 및 대조구에서, 배양시간에 따라 측정된 젖산의 농도 변화 및 아세테이트의 농도 변화를 각각 도 6 및 도 7에 나타내었다.
- [131]
- [132] 도 6를 참고하면, 상기 처리구에서의 최소 젖산 농도는, 상기 대조구에서의 최소 젖산 농도보다 약 10% 더 낮았다. 또한, 도 7을 참고하면, 상기 처리구에서의 최대 아세테이트 농도는, 상기 대조구에서의 최대 아세테이트 농도보다 약 2.5배 높았다.
- [133] 처리구 및 대조구의 pH 및 건물소화율(%)을 각각 도 8, 도 9 및 도 10에 나타내었다.
- [134] 도 8을 참고하면, 대조구의 pH는 초기 대비 0.5 감소하였으나, 처리구의 pH는 초기 대비 0.42 감소하였는 바, 본 출원에 따른 사료첨가제가 반추위안정화에

효과를 나타냄을 확인 할 수 있었다.

- [135] 또한, 도 9 및 도 10을 참고하면, 농후사료 및 TMR을 각각 기질로 사용한 경우에, 대조구의 건물소화율 대비 처리구의 건물소화율이 각각 4% 및 1.3% 높은 것으로 측정되었다. 즉, 본 출원에 따른 사료첨가제는 반추위 내 소화율을 개선시킬 수 있을 뿐 아니라, 아세트산 합성량을 증가시킬 수 있는 바, 이는 유지방 증가에 긍정적 영향을 줄 수 있다는 것을 의미한다.

[136]

- [137] <실시예 8. 유지방 증진용 사료 첨가제가 착유우의 생산성에 미치는 효과>

- [138] 하기, 착유우 사양시험에 사용된, 본 출원에 따른 사료 첨가제는 상기 실시예 6에서 언급된 방법으로 제조되었다. 공지된 낙농사양시험을 통하여, 본 출원의 사료첨가제가 착유우의 우유 생산성에 미치는 영향에 대해 평가하였다. 착유우 72두를 대조구(36두)와 처리구(36두)로 배치하였으며, 4주의 시험기간 동안 대조구에는 기존의 사료만을 투여하고 처리구에는 본 출원에 따른 사료첨가제를 탑 드레싱 형태로 두당 20g/day씩 기존사료에 섞어 급여하였다. 개시 전과 급여 후의 유지방, 유단백 및 유량을 측정하여 그 결과를 표 7, 표 8, 표 9에 나타내었다.

- [139] 상기 사료첨가제를 착유우에 지속적으로 두당 20g/day씩 급여한 결과, 하기 표 7에 나타난 바와 같이 유지방이 0.3%p 증가한 것으로 확인하였다. 또한 하기 표 8에서 볼 수 있듯이 대조구에서는 유단백의 변화가 없었으나, 처리구에서 0.1%p 개선됨을 확인 할 수 있었다. 유량의 측정시에도 대조구에서는 변화가 없었으나, 처리구에서는 0.4kg 증가하였다(표 9).

- [140] 상기 결과를 통하여, 본 출원에 따른 사료첨가제는 유지방, 유단백 및 유량을 모두 긍정적으로 개선시킬 수 있으며, 결과적으로는 착유우의 우유 생산성과 우유의 질을 높일 수 있다는 점을 확인하였다.

- [141] [표7]

사료첨가제의 유지방 개선 효과

	대조구	처리구
개시 전(3주 평균)	4.7 %	4.7 %
급여 후(4주 평균)	4.7 %	5.0 %
유지방 개선효과(%p)	0.0	0.3

[142]

[143] [표8]

사료첨가제의 유단백 개선 효과

	대조구	처리구
개시 전(3주 평균)	3.4 %	3.2 %
급여 후(4주 평균)	3.4 %	3.3 %
유단백 개선효과(%p)	0.0	0.1

[144]

[145] [표9]

사료첨가제의 유량 개선 효과

	대조구	처리구
개시 전(3주 평균)	27.9 kg	31.9 kg
급여 후(4주 평균)	28.0 kg	32.3 kg
유량 개선효과(kg)	0.1	0.4

[146]

[147] <실시에 9. 유지방 증진용 사료첨가제가 하절기 고온스트레스시 착유우 생산성에 미치는 효과>

[148] 하기, 착유우 사양시험에 사용된, 본 출원에 따른 사료 첨가제는 상기 실시예 6에서 언급된 방법으로 제조되었다. 공지된 낙농사양시험을 통하여, 고온 스트레스 환경에서 본 출원에 따른 사료첨가제가 착유우의 우유 생산성에 미치는 영향에 대해 평가하였다. 통상적으로 낙농우가 고온 스트레스 환경에 노출되는 기간을 선정하여(5/26~6/23, 4주), 해당 기간 동안에 착유우 150두에게 본 출원에 따른 사료첨가제가 0.2wt% 포함된 사료를 급여하여 급여 전/후를 비교하였다.

[149] 고온 스트레스가 없는 환경에서 4주 동안, 어떠한 사료첨가제도 포함되지 않은 사료가 급여된 착유우를 대조군으로 설정하였으며, 고온 스트레스 환경에서 4주 동안, 상기 사료첨가제가 0.2wt% 포함된 사료가 급여된 착유우를 처리구로 설정하였다. 각각의 처리구와 대조구에게 급여된 기본 사료 조성은 동일하였다.

[150] [표10]

사료첨가제가 하절기 유생산성에 미치는 효과

	유지방	유량
대조구	3.7 %	36.2 kg
처리구	3.9 %	36.7 kg
개선효과	0.2 %p	0.5 kg

- [151] 상기 표 10을 참고하면, 대조구에서 측정된 유지방 및 유량에 비하여, 처리구에서 측정된 유지방 및 유량은 각각 0.2%p 및 0.5kg가 증가한 것을 확인할 수 있었다.
- [152] 통상적으로 착유우가 고온 스트레스 환경에 노출되는 경우, 착유우로부터 생산되는 유량과 유지방이 감소하는 것이 일반적이다. 하지만, 본 발명에 따른 사료첨가제가 제공된 착유우에서는, 고온 스트레스 환경에 노출되더라도 유지방 및 유량 감소 현상이 나타나지 않고, 오히려 유지방 및 유량이 개선될 수 있다.

[153]

출원인 또는 대리인 파일 참조번호	P17-6153	국제출원번호
-----------------------	----------	--------

기탁된 미생물 또는 기타 생물학적 물질의 표시사항

(특허협력조약 규칙 제13조의2)

A. 하기의 표시사항은 명세서 _____2_____ 쪽, _____16_____ 줄에 기재된 기탁된 미생물 또는 기타 생물학적 물질에 관한 것임.	
B. 기탁물의 확인 이외의 추가적 기탁물은 다음 별도의 페이지에 기재 ☐	
기탁기관의 명칭 KCCM 한국 미생물 배양소	
기탁기관의 주소(우편번호 및 국명 포함) 대한민국 120-091 서울 서대문구 홍제내-2가-길 45 유림 빌딩	
기탁일자 2017년 06월 22일	기탁번호 KCCM12039P
C. 추가적 표시사항(기재사항이 없으면 공란으로 제출) 별도의 추가 페이지 계속 ☐	
D. 표시사항이 지정하고 있는 지정국(표시사항이 모든 지정국을 위한 사항이 아닌 경우)	
E. 표시사항의 별도 제출(기재사항이 없으면 공란으로 제출)	
하기의 표시사항은 후에 국제사무국에 제출될 것임(표시사항의 일반적 성질을 특정할 것)	

수리관청 사용란	국제사무국 사용란
☐ 당해 용지는 국제출원과 함께 접수되었음	☐ 당해 용지는 국제출원과 함께 접수되었음:
담당관	담당관

[154]

출원인 또는 대리인 파일 참조번호	P17-6153	국제출원번호
-----------------------	----------	--------

기탁된 미생물 또는 기타 생물학적 물질의 표시사항

(특허협력조약 규칙 제13조의2)

A. 하기의 표시사항은 명세서 _____ 3 _____ 쪽, _____ 24 _____ 줄에 기재된 기탁된 미생물 또는 기타 생물학적 물질에 관한 것임.	
B. 기탁물의 확인	
이외의 추가적 기탁물은 다음 별도의 페이지에 기재 ☐	
기탁기관의 명칭 KCCM 한국 미생물 배양소	
기탁기관의 주소(우편번호 및 국명 포함) 대한민국 120-091 서울 서대문구 홍제내-2가-길 45 유림 빌딩	
기탁일자 2017년 06월 22일	기탁번호 KCCM12040P
C. 추가적 표시사항(기재사항이 없으면 공란으로 제출) 별도의 추가 페이지 계속 ☐	
D. 표시사항이 지정하고 있는 지정국(표시사항이 모든 지정국을 위한 사항이 아닌 경우)	
E. 표시사항의 별도 제출(기재사항이 없으면 공란으로 제출)	
하기의 표시사항은 후에 국제사무국에 제출될 것임(표시사항의 일반적 성질을 특정할 것)	

수리관청 사용란 ☐ 당해 용지는 국제출원과 함께 접수되었음 담당관	국제사무국 사용란 ☐ 당해 용지는 국제출원과 함께 접수되었음: 담당관
---	---

[155]

출원인 또는 대리인 파일 참조번호	P17-6153	국제출원번호
-----------------------	----------	--------

기탁된 미생물 또는 기타 생물학적 물질의 표시사항

(특허협력조약 규칙 제13조의2)

A. 하기의 표시사항은 명세서 _____ 3 _____ 쪽, _____ 24 _____ 줄에 기재된 기탁된 미생물 또는 기타 생물학적 물질에 관한 것임.	
B. 기탁물의 확인 이외의 추가적 기탁물은 다음 별도의 페이지에 기재 ☐	
기탁기관의 명칭 KCCM 한국 미생물 배양소	
기탁기관의 주소(우편번호 및 국명 포함) 대한민국 120-091 서울 서대문구 홍제네-2가-길 45 유림 빌딩	
기탁일자 2017년 06월 22일	기탁번호 KCCM12041P
C. 추가적 표시사항(기재사항이 없으면 공란으로 제출) 별도의 추가 페이지 계속 ☐	
D. 표시사항이 지정하고 있는 지정국(표시사항이 모든 지정국을 위한 사항이 아닌 경우)	
E. 표시사항의 별도 제출(기재사항이 없으면 공란으로 제출)	
하기의 표시사항은 후에 국제사무국에 제출될 것임(표시사항의 일반적 성질을 특정할 것)	

수리관청 사용란

☐ 당해 용지는 국제출원과 함께 접수되었음

담당관

국제사무국 사용란

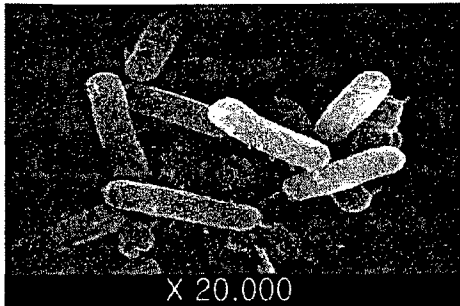
☐ 당해 용지는 국제출원과 함께 접수되었음:

담당관

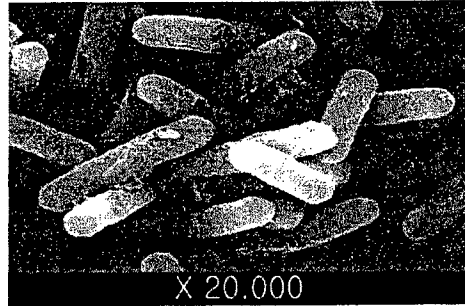
청구범위

- [청구항 1] 바실러스 서브틸리스 및 바실러스 리체니포미스를 포함하는 유지방 및 유량 증진용 사료첨가제.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 바실러스 서브틸리스는 바실러스 서브틸리스 CJBS62(*Bacillus subtilis* CJBS62(KCCM12039P))를 포함하는, 유지방 및 유량 증진용 사료첨가제.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 바실러스 리체니포미스는 바실러스 리체니포미스 CJBL215(*Bacillus licheniformis* CJBL215(KCCM12040P)) 및 바실러스 리체니포미스 CJBL219(*Bacillus licheniformis* CJBL219(KCCM12041P))로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 유지방 및 유량 증진용 사료첨가제.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 사료첨가제 1g당 상기 바실러스 서브틸리스 및 바실러스 리체니포미스를 각각 1×10^7 cfu 이상 포함하는, 유지방 및 유량 증진용 사료첨가제.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 바실러스 리체니포미스는, 젖산 함유 배지에서 9시간 내지 48시간 배양되어 아세테이트를 생성하는 것이고, 상기 바실러스 리체니포미스의 초기 젖산량 대비 아세테이트 전환율은 30% 내지 70%인, 유지방 및 유량 증진용 사료 첨가제.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 바실러스 서브틸리스 및 상기 바실러스 리체니포미스의 배합 중량비가 1:9 내지 9:1 인, 유지방 및 유량 증진용 사료 첨가제.
- [청구항 7] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 사료첨가제를 포함하는 사료 조성물.

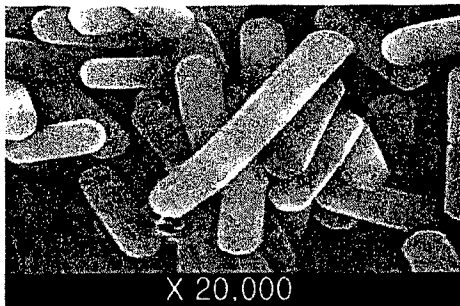
[도1]



바실러스 리체니포미스
(*Bacillus licheniformis*)
CJBL215

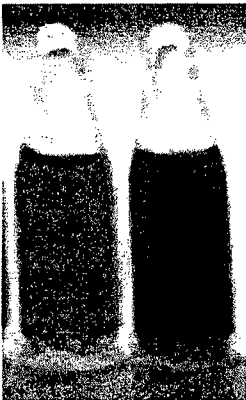


바실러스 리체니포미스
(*Bacillus licheniformis*)
CJBL219



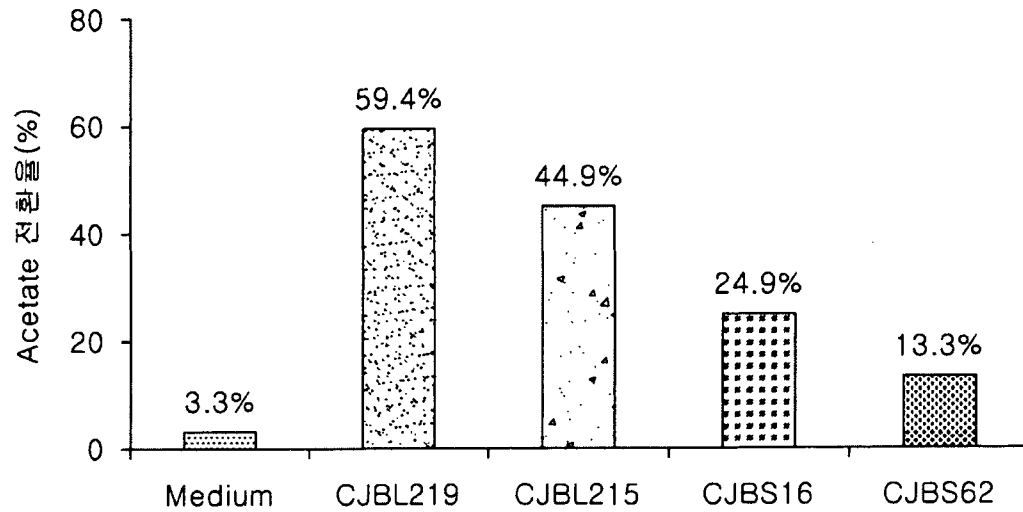
바실러스 서브틸리스
(*Bacillus subtilis*)
CJBS62

[도2]

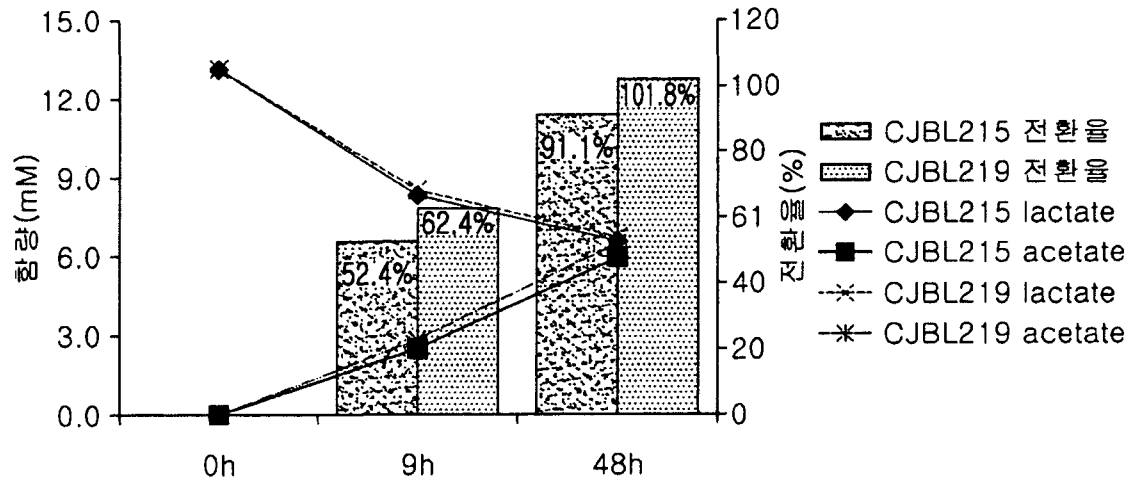


Control Lactate
소모균

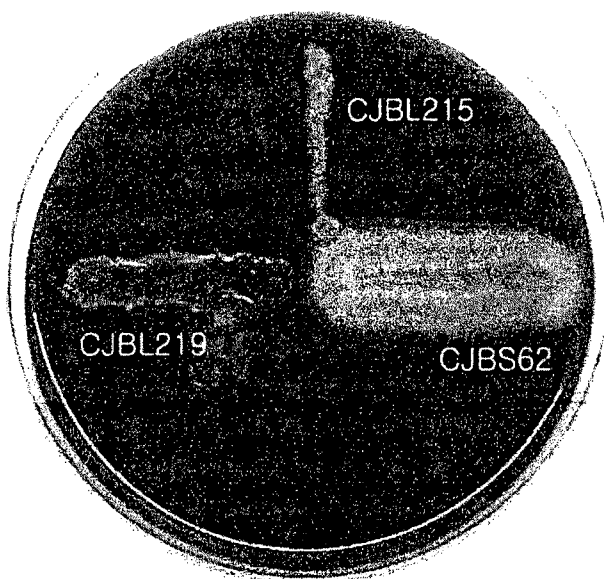
[도3]



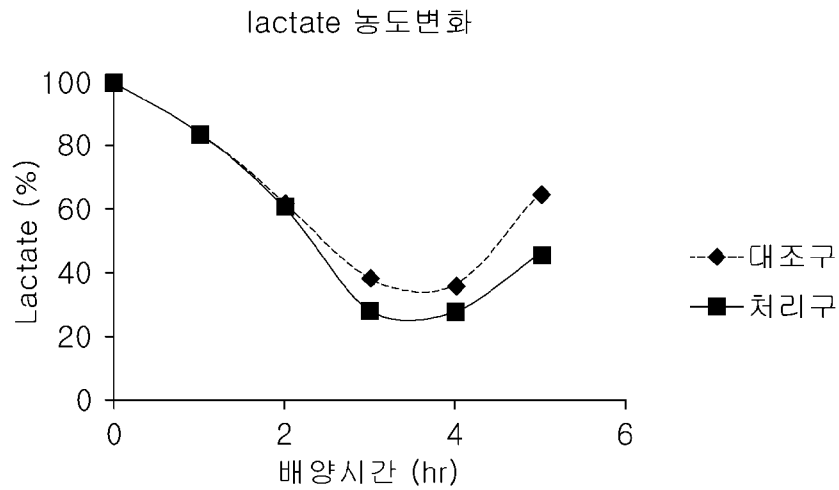
[도4]



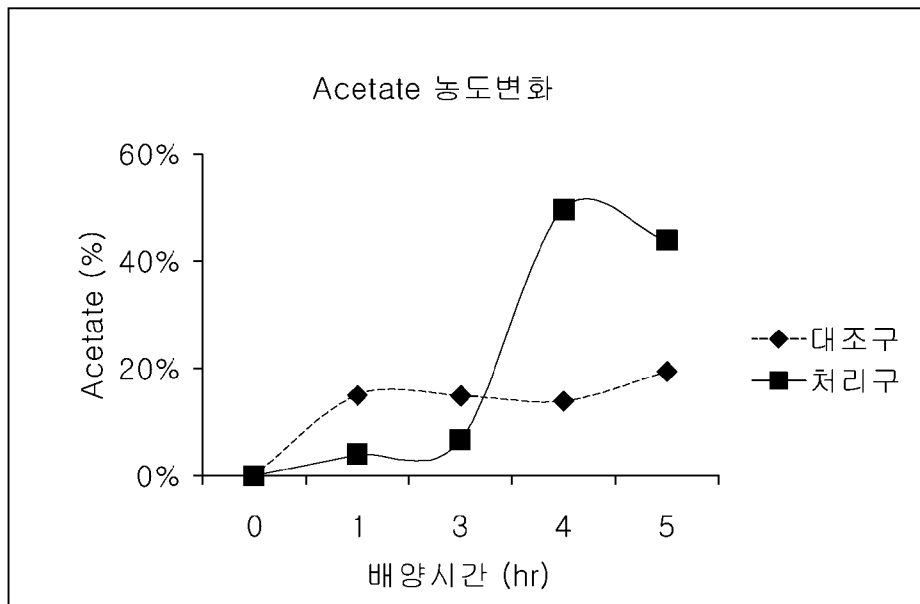
[도5]



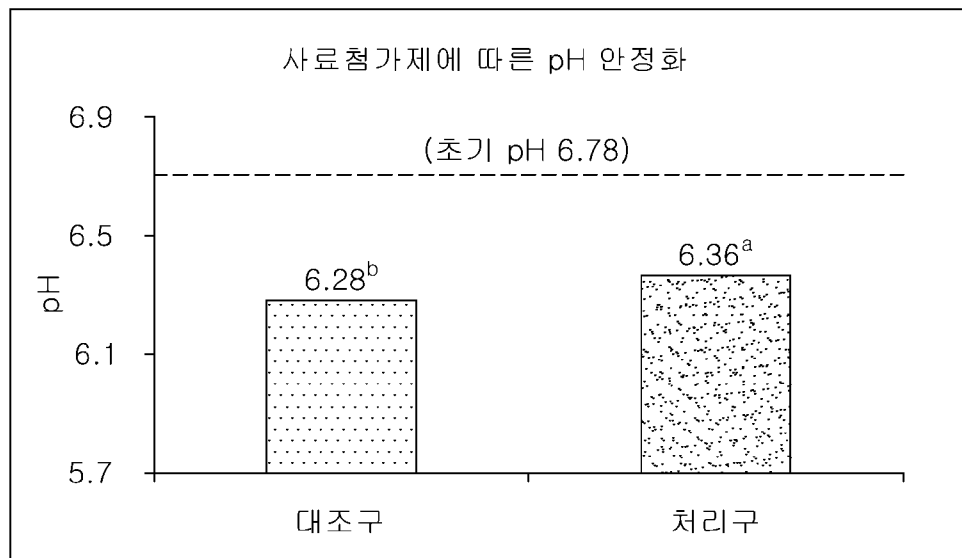
[도6]



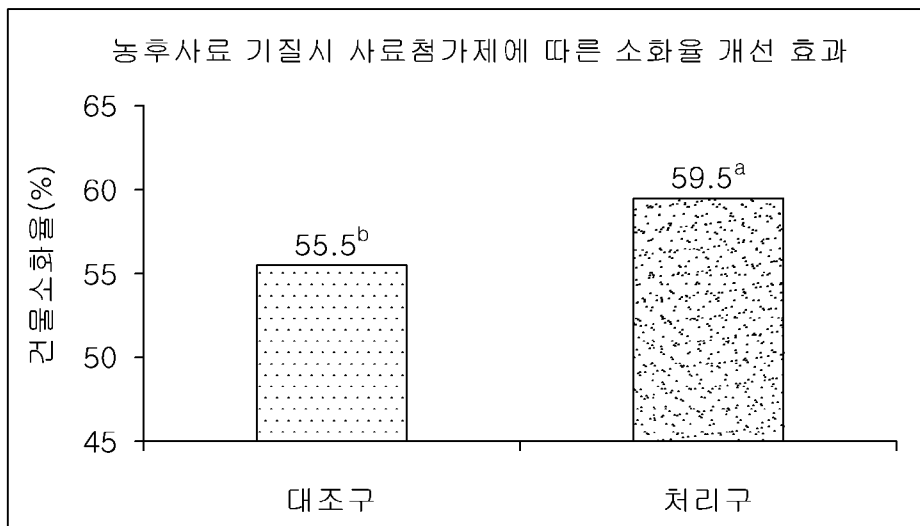
[도7]



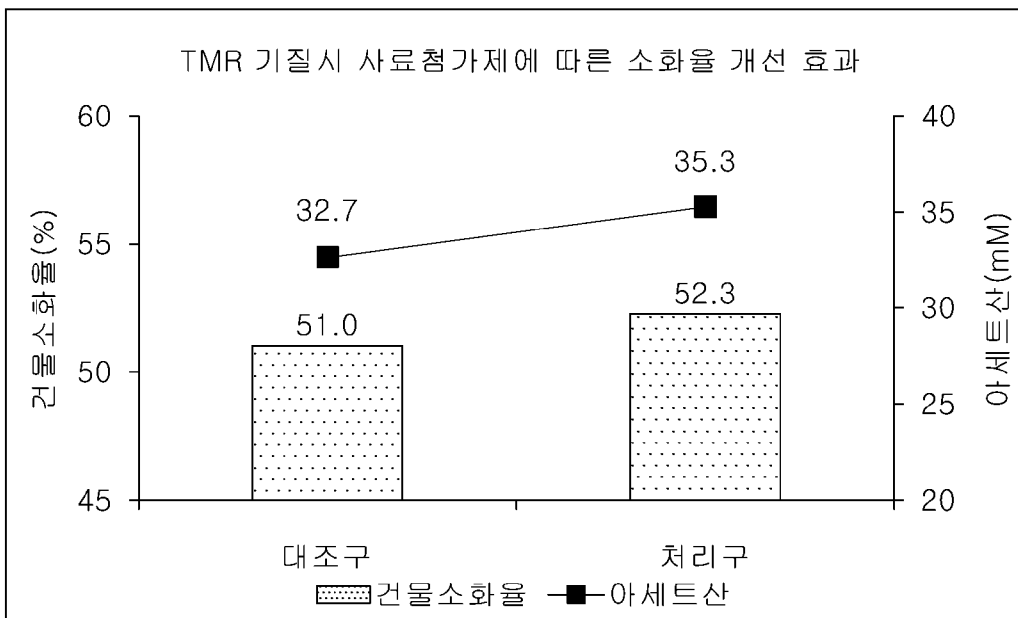
[도8]



[도9]



[도10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/008455

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A23K 10/16(2016.01)i, A23K 50/10(2016.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A23K 10/16; A23K 1/14; A23K 1/18; A23K 1/00; A23K 10/33; A23K 1/16; A23K 50/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: Bacillus subtilis, Bacillus licheniformis, milk fat, flow rate, feed additive

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2015-0085410 A (AN, Jeong Su) 23 July 2015 See abstract; claims 3-5; paragraphs [0009]-[0019] and [0066].	1,4-7
A		2-3
Y	WO 2011-115306 A1 (CALPIS CO., LTD.) 22 September 2011 See abstract; claims 1-9 and 24-28.	1,4-7
Y	KR 10-0643375 B1 (KIM, Seong Je) 10 November 2006 See abstract; claims 1-3; page 3.	1,4-7
Y	KR 10-0351754 B1 (EASY BIO SYSTEM, INC.) 29 November 2002 See abstract; claim 2; tables 3 and 8; experimental example 4.	1,4-7
A	KIM, Yu Jin, "Enjoying an Innovative Dairy Fat Increase by using CJ's Own Technology", Monthly Dairy for May 2017, May 2017, vol. 171, pages 28-33 See the entire document.	1-7



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 APRIL 2018 (26.04.2018)

Date of mailing of the international search report

26 APRIL 2018 (26.04.2018)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/008455

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2015-0085410 A	23/07/2015	KR 10-1552569 B1	14/09/2015
WO 2011-115306 A1	22/09/2011	AR 080587 A1	18/04/2012
		JP 2013-115306 A1	04/07/2013
		TW 201136528 A	01/11/2011
KR 10-0643375 B1	10/11/2006	NONE	
KR 10-0351754 B1	29/11/2002	KR 10-2001-0077679 A	20/08/2001

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A23K 10/16(2016.01)i, A23K 50/10(2016.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A23K 10/16; A23K 1/14; A23K 1/18; A23K 1/00; A23K 10/33; A23K 1/16; A23K 50/10

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 바실러스 서브틸리스, 바실러스 리체니포미스, 유지방, 유량, 사료첨가제

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2015-0085410 A (안정수) 2015.07.23 요약; 청구항 3-5; 단락 [0009]-[0019] 및 [0066] 참조.	1,4-7
A		2-3
Y	WO 2011-115306 A1 (CALPIS CO., LTD.) 2011.09.22 요약; 청구항 1-9 및 24-28 참조.	1,4-7
Y	KR 10-0643375 B1 (김성제) 2006.11.10 요약; 청구항 1-3; 페이지 3 참조.	1,4-7
Y	KR 10-0351754 B1 (주식회사 이지바이오 시스템) 2002.11.29 요약; 청구항 2; 표 3 및 8; 실험예 4 참조.	1,4-7
A	김유진, `CJ의 자체기술 활용으로 획기적인 유지방증가를 맞보다`, 월간낙농 2017년 5월호, 2017.05, 171면, 페이지 28-33 전체 문헌 참조.	1-7

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2018년 04월 26일 (26.04.2018)

국제조사보고서 발송일

2018년 04월 26일 (26.04.2018)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

김연정

전화번호 +82-42-481-3325



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2015-0085410 A	2015/07/23	KR 10-1552569 B1	2015/09/14
WO 2011-115306 A1	2011/09/22	AR 080587 A1	2012/04/18
		JP 2013-115306 A1	2013/07/04
		TW 201136528 A	2011/11/01
KR 10-0643375 B1	2006/11/10	없음	
KR 10-0351754 B1	2002/11/29	KR 10-2001-0077679 A	2001/08/20