



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0047407
(43) 공개일자 2021년04월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 1/20 (2006.01) A23K 10/16 (2017.01)

C12R 1/24 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 1/20 (2013.01)

A23K 10/16 (2016.05)

(21) 출원번호 10-2019-0130686

(22) 출원일자 2019년10월21일

심사청구일자 2019년10월21일

(71) 출원인

산청군농업기술센터

경상남도 산청군 산청읍 물안실로 8 (병정리)

경상국립대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

김삼철

경상남도 진주시 가호로44번길 7, 101동 1304호(호탄동, 대동디지털황토아파트)

민형규

경상남도 산청군 산청읍 산엔청로 1

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인충정

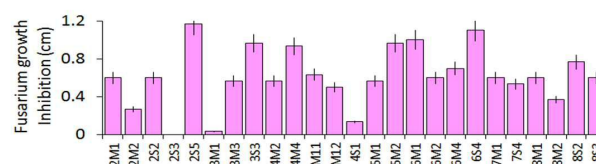
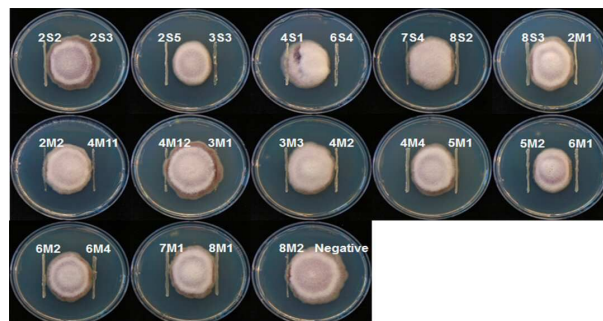
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 옥수수 사일리지 첨가제용 락토바실러스 브레비스 5M2 및 락토바실러스 부크네리 6M1 및 이를 이용한 사일리지 제조방법

(57) 요약

본 발명은 락토바실러스 브레비스 5M2 균주 및 락토바실러스 부크네리 6M1 균주를 제공한다. 본 발명에 따른 락토바실러스 브레비스 5M2 균주 및 락토바실러스 부크네리 6M1 균주는 사일리지 첨가제로 활용되어, 옥수수 사일리지의 소화율 개선과 곰팡이 독소 저감을 통해 가축의 생산성과 건강 개선에 기여할 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12R 1/24 (2013.01)

(72) 발명자

김진우

경상남도 진주시 석갑로53번길 10, 108동 1005호(
평거동, 들말대경아파트)

강수정

경상남도 산청군 산청읍 중앙로 41, 107동 203호(
산청삼한사랑채)

김경현

경상남도 진주시 창렬로43번길 8, 2(인사동)

명세서

청구범위

청구항 1

옥수수 사일리지 첨가제용 락토바실러스 브레비스 5M2 균주(기탁번호 KACC 92268P).

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 균주는 서열번호 1의 16s rRNA 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는, 균주.

청구항 3

옥수수 사일리지 첨가제용 락토바실러스 부크네리 6M1 균주(기탁번호 KACC 92269P).

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 균주는 서열번호 2의 16s rRNA 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는, 균주.

청구항 5

락토바실러스 브레비스 5M2 균주(기탁번호 KACC 92268P) 및 락토바실러스 부크네리 6M1 균주(기탁번호 KACC 92269P)로부터 선택되는 1종 이상의 균주를 포함하는 옥수수 사일리지 첨가제 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 락토바실러스 브레비스 5M2 균주 및 락토바실러스 부크네리 6M1 균주는 4:6~6:4의 중량비로 혼합되는 것을 특징으로 하는, 옥수수 사일리지 첨가제 조성물.

청구항 7

옥수수 사일리지에 락토바실러스 브레비스 5M2 균주(기탁번호 KACC 92268P) 및 락토바실러스 부크네리 6M1(기탁번호 KACC 92269P) 균주로부터 선택되는 1종 이상의 균주를 첨가하는 것을 특징으로 하는, 옥수수 사일리지 제조방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 락토바실러스 브레비스 5M2 균주 및 락토바실러스 부크네리 6M1 균주는 4:6~6:4의 중량비로 혼합되는 것을 특징으로 하는, 옥수수 사일리지 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 옥수수 사일리지 첨가제용 락토바실러스 브레비스 5M2 및 락토바실러스 부크네리 6M1 및 이를 이용한 사일리지 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 2016년 기준 국내 농업 생산액(49조 8,640억)의 약 38.6%를 축산업이 차지하고 있고, 특히 조사료를 주 사료로 하고 있는 한우와 젓소의 비중은 약 14.5%로 매우 큰 비중을 차지하고 있다. 최근 국제유가 상승으로 바이오 에너지용 곡물수요 증가로 옥수수 등 국제곡물 가격이 상승하고 있을 뿐만 아니라, FTA 체결 등으로 인한 수입 개방으로 양축농가들은 많은 어려움에 직면하고 있는 실정이다.

[0004] 이에 항생제를 대체할 자원의 개발 및 연구가 많이 진행 중이며, 그 중 살아있는 미생물 공급원을 통해 장내 미생물 균 총과 가축의 생산성 개선시킬 수 있는 생균제가 각광받고 있으며, 농가 현장 수요가 급증하고 있다. 국내 생균제 시장은 약 500억 규모의 큰 비중을 차지하고 있으며, 생균제의 종류와 수는 해마다 증가하고 있다.

[0005] 한편, 최근 농촌사회의 급격한 고령화로 영농가능 인구가 지속적으로 감소하고 있으며, 휴경지가 증가하고 있다. 특히 산청군은 산간지역이 많은 지역적 특성으로 인해 많은 농경지가 천수답으로 구성되어 있어서, 농업용수 공급에 애를 겪고 있을 뿐만 아니라 고령화로 인한 인력부족 등으로 벼를 대신하여 사료용 옥수수를 재배하는 농가들이 증가하고 있다. 사료용 옥수수의 재배는 타 작물에 비해 자동화가 잘 되어 있어서 고령화로 인한 인력부족을 완화할 수 있을 뿐만 아니라 휴경지의 이용효율 개선에도 도움이 될 것으로 판단된다.

[0006] 그러나 자급 조사료의 40% 이상을 저질 조사료(벚짚, 보릿짚 등)가 차지하고 국내 현실을 고려하였을 때, 옥수수를 이용한 양질의 조사료 생산 확대 및 이용 기술 개발의 필요성이 증가하고 있다. 그러나 국내에서 옥수수 사일리지용 미생물 첨가제 개발에 대한 연구는 미비한 실정이다.

[0007] 이러한 조사료는 일시에 다량 생산되므로 연중 안정적인 급여를 위해서는 저장이 필수적이다. 수분을 제거한 저장이 가능한 건조와 비교하여, 수분이 있는 상태에서 저장을 하는 것이 사일리지(silage, 담근먹이)이다.

[0008] 상기 사일리지는 식물체 또는 토양 중에 있는 젖산균이 혐기 상태에서 정상 젖산 발효(homolactic acid fermentation)를 일으켜 젖산을 생성함으로써 산도를 급격히 저하시켜, 발효 초기 단계에서 다른 호기성 균의 번식을 억제하고 계속해서 일어나는 혐기화 초기의 부티르산 발효를 억제함으로써 사료의 저장성, 영양성 및 기호성을 증진시키게 된다. 그러나 사일리지 제조시의 작물의 생육상태, 기상상태 등에 따라 균일한 품질의 사일리를 수득하는 것에 어려움이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 국내특허 제2005-0045439호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명자들은 옥수수 사일리지의 발효를 위한 첨가제로 활용될 수 있는 미생물 제제를 개발하고자 예의 연구한 결과, 본 발명의 락토바실러스 브레비스 5M2(Lactobacillus brevis 5M2, 기탁번호 KACC 92268P) 균주 및 락토바실러스 부크네리 6M1(Lactobacillus buchneri 6M1, 기탁번호 KACC 92269P) 균주에 항균 활성이 있고, 사료로 섭취시 소화율을 증가시키는 효과가 있다는 것을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

[0012] 이에, 본 발명의 목적은 옥수수 사일리지 첨가제용 락토바실러스 브레비스 5M2 균주 및 락토바실러스 부크네리

6M1 균주를 제공하는 데 있다.

[0013] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 옥수수 사일리지 첨가제용 락토바실러스 브레비스 5M2 균주(기탁번호 KACC 92268P)를 제공한다.

[0016] 본 발명의 일구현예로서, 상기 균주는 서열번호 1의 16S rRNA 유전자를 포함하는 것을 특징으로 한다(서열번호 1).

[0017] 또한 본 발명은 옥수수 사일리지 첨가제용 락토바실러스 부크네리 6M1 균주(기탁번호 KACC 92269P)를 제공한다.

[0018] 본 발명의 일구현예로서, 상기 균주는 서열번호 2의 16S rRNA 유전자를 포함하는 것을 특징으로 한다(서열번호 2).

[0019] 또한, 본 발명은 락토바실러스 브레비스 5M2 균주(기탁번호 KACC 92268P) 및 락토바실러스 부크네리 6M1 균주(기탁번호 KACC 92269P)로부터 선택되는 1종 이상의 균주를 포함하는 옥수수 사일리지 첨가제 조성물을 제공한다.

[0020] 본 발명의 일구현예로서, 상기 락토바실러스 브레비스 5M2 균주 및 락토바실러스 부크네리 6M1 균주는 4:6~6:4의 중량비로 혼합되는 것을 특징으로 한다.

[0021] 또한, 본 발명은 옥수수 사일리지에 락토바실러스 브레비스 5M2 균주(기탁번호 KACC 92268P) 및 락토바실러스 부크네리 6M1 균주(기탁번호 KACC 92269P)로부터 선택되는 1종 이상의 균주를 첨가하는 것을 특징으로 하는, 옥수수 사일리지 제조방법을 제공한다.

[0022] 본 발명의 일구현예로서, 상기 락토바실러스 브레비스 5M2 균주 및 락토바실러스 부크네리 6M1 균주는 4:6~6:4의 중량비로 혼합되는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0024] 본 발명에 따른 락토바실러스 브레비스 5M2 균주 및 락토바실러스 부크네리 6M1 균주는 항균활성과 섬유소 분해능력이 우수한 균주로 선별된 것이고, 상기 락토바실러스 브레비스 5M2 균주 및 락토바실러스 부크네리 6M1 균주를 혼합하여 사일리지에 첨가한 결과, 섬유소 함량이 감소하고 건물소화율 및 섬유소소화율이 증가하였으며, 효모균 수를 감소시키는 것이 나타났으므로, 상기 균주를 사일리지 첨가제로 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 옥수수 사일리지 시료에서 분리한 유산균의 항진균 활성을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
 도 2는 옥수수 사일리지 시료에서 분리한 유산균의 에스테라제 활성을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
 도 3은 본 발명의 균주의 공시균주와의 계통발학적 유연관계도를 나타낸 도면이다.
 도 4는 호기적 상태에 노출시킨 옥수수 사일리지의 pH 변화를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
 도 5는 호기적 상태에 노출시킨 후 유산균 수의 변화를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
 도 6은 호기적 상태에 노출시킨 후 옥수수 사일리지의 효모균 수의 변화를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 병원성 균에 대한 항균 효과 및 소화율 개선 효과를 갖는 사일리지 제조를 위한 옥수수 사일리지 첨가제용 락토바실러스 브레비스 5M2 균주(기탁번호 KACC 92268P) 및 옥수수

사일리지 첨가제용 락토바실러스 부크네리 6M1 균주(기탁번호 KACC 92269P)를 제공한다.

- [0028] 상기 5M2 균주의 16S rRNA를 암호화하는 유전자(rDNA)의 서열은 서열번호 1로 표시되는 것이고, 상기 6M1 균주의 16S rRNA를 암호화하는 유전자(rDNA)의 서열은 서열번호 2로 표시되는 것이다.
- [0029] 본 발명의 상기 균주들은 옥수수 사일리지 시료에서 맥류분은곰팡이균에 대한 항진균 활성도 및 에스테라제 활성이 우수한 균주를 분리 동정한 것이다.
- [0030] 하기 실시예를 통하여 알 수 있듯이, 본 발명에 따른 락토바실러스 브레비스 5M2 균주 및 락토바실러스 부크네리 6M1 균주는 식물체 사일리지 발효를 위한 첨가제로 사용시 pH 유지 효과가 우수하여 사일리지의 부패가 거의 나타나지 않고, 발효 효율을 증가시켜, 섬유소 함량을 감소시킴으로써 소화율을 증가시킬 수 있으며, 다른 병원성 균의 번식을 효과적으로 억제하여 사료 저장성을 증진시킬 수 있다. 따라서 가축의 기호성을 향상시키며, 효소 활성이 우수하여 가축의 소화율을 효과적으로 개선하는 효과가 있다. 그리고 이러한 효과는 특히 상기 락토바실러스 브레비스 5M2 균주 및 락토바실러스 부크네리 6M1 균주를 함께 사용하는 경우 더욱 증대됨을 확인하였다.
- [0031] 따라서 본 발명은 락토바실러스 브레비스 5M2 균주 및 락토바실러스 부크네리 6M1 균주로부터 선택되는 1종 이상의 균주를 포함하는 옥수수 사일리지 첨가제 조성물을 제공한다.
- [0032] 또한 본 발명은 옥수수 사일리지에 락토바실러스 브레비스 5M2 균주 및 락토바실러스 부크네리 6M1 균주로부터 선택되는 1종 이상의 균주를 첨가하는 것을 특징으로 하는, 옥수수 사일리지 제조방법을 제공한다.
- [0033] 상기 락토바실러스 브레비스 5M2 균주 및 락토바실러스 부크네리 6M1 균주는 2종 모두 혼합되어 사용되는 것이 바람직하고, 4:6~6:4의 중량비로 혼합될 수 있으며, 가장 바람직하게는 5:5의 비율로 혼합될 수 있다.
- [0034] 본 발명의 첨가제 조성물은 옥수수 사일리지에 사용되는 것이나, 이에 제한되는 것은 아니며 필요에 따라 당업자에 의해 적절히 선택될 수 있다.
- [0035] 상기 식물체 사일리지용 첨가제 조성물은 락토바실러스 브레비스 5M2 균주 및 락토바실러스 부크네리 6M1 균주 자체, 상기 균주를 포함하는 배양원액, 또는 상기 배양원액의 회석액의 형태로 첨가할 수 있다.
- [0036] 본 발명에 있어서, 상기 옥수수 사일리지 제조방법은 당업계에서 사용되는 일반적인 방법으로서, 예를 들어 옥수수의 발효를 위한 복수의 발효 단계들을 포함하는 것을 특징으로 한다. 상기 복수의 발효 단계들은, 예를 들어 혐기성균인 초산균의 발효 단계 및 이후 젖산균의 발효 단계 등을 포함할 수 있으며, 당업자에 의해 적절한 조건으로 수행될 수 있다.
- [0037] 따라서 본 발명의 한 구체예에 따르면, 본 발명은 옥수수의 발효를 위한 복수의 발효 단계들을 포함하고, 상기 복수의 발효 단계 중 적어도 하나의 발효 단계에서 옥수수에 락토바실러스 브레비스 5M2 균주 및 락토바실러스 부크네리 6M1 균주 중 적어도 하나를 첨가하는 것을 특징으로 하는 식물체 사일리지 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0039] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [0041] **[실시예]**
- [0042] **실시예 1: 옥수수 사일리지 맞춤형 미생물 선발**
- [0043] **1.1. 목적**
- [0044] 본 실시예 1에서는 산청지역에서 재배된 사료용 옥수수에서 우수한 유용 미생물을 선발하고, 이들 미생물의 특성을 확인하였다.
- [0046] **1.2. 분석 방법**
- [0047] 유용 미생물을 선발하기 위해서, 산청군 소재 8개 농장에서 제조된 옥수수 사일리지 시료를 채취하여 사일리지

1 g에 증류수 100 ml를 넣어 shaking incubator에서 rpm 220으로 1시간동안 혼합한 후, MRS에 분주하고 28℃의 CO₂ incubator에서 약 3-4일간 배양하였다.

[0048] 배양종료 후 각 균주의 콜로니를 개별적으로 스트릭하여 2차 배양을 실시하였다. Esterase 활성 검정을 위해, 각 선발된 유산균을 MRS broth에서 2-3일간 배양한 후 원심분리기에서 배양액을 spin down시키고 균주만 따로 분리하여 NaCl, buffer 및 esterase 기질(p-nitrophenyl)을 혼합한 후, 2시간동안 배양하고 spectrum photometer로 esterase 활성을 측정하였다.

[0049] 또한 항균활력 검정을 위해서는 실험에 이용할 곰팡이를 약 4일간 배양한 후 곰팡이 배양이 끝나면 PDA agar 중앙에 곰팡이 균사를 접종하고 일정거리에 유산균 콜로니를 스트릭하여 3-4일간 배양하고, 곰팡이와 유산균의 거리계산을 통해 항균능력을 측정하였다.

[0051] 1.3. 조사항목

[0052] 유산균의 항진균 활성을 알아보기 위해, 8개 농장에서 수집한 옥수수 사일리지 샘플에서 유산균을 분리하고 맥류붉은곰팡이균에 대한 항진균 활성도를 조사하였다.

[0053] 에스테라제 활성검정은 일반적으로 사용되는 방법에 따라 수행하였다(Perez-Martin등; International journal of food microbiology 163: 153-158). 기질 p-니트로페닐 옥타노에이트를 에스테라제 활성검정에 사용하였으며, 측정값은 일반적으로 사용되는 Miller 단위공식을 사용하여 계산하였다(Miller; Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1972). 가장 높은 활성을 보이는 유산균을 선택하였다.

[0054] 이후 선택된 항진균활성이 높은 유산균을 대상으로 16S rRNA 영역 염기서열분석을 통하여 동정하였다.

[0056] 1.4. 결과

[0057] 도 1은 유산균(락토바실러스 균주)의 항진균활성을 조사한 결과를 나타낸 것이다. 유산균의 항진균활성은 산청군 소재 8개 농장에서 수집한 옥수수 사일리지 샘플에서 총 25개의 유산균을 분리하였고, 6개의 유산균(2S5, 3S3, 4M4, 5M2, 6M1 및 6S4)이 맥류붉은곰팡이균에 대해 항진균 활성이 0.9 cm 이상으로 나타났다.

[0058] 도 2는 에스테라제 활성검정을 조사한 것이다. 에스테라제 활성검정은 일반적으로 사용되는 방법에 따라 수행하였는데, 기질 p-니트로페닐 옥타노에이트를 에스테라제 활성검정에 사용하였으며, 측정값은 일반적으로 사용되는 Miller단위공식을 사용하여 계산하였다(Miller, 1972). 가장 높은 활성을 보이는 3개의 유산균(5M2, 6M1 및 7M1)을 선택하였다.

[0059] 하기 표 1은 16S rRNA 염기서열분석으로 통한 유산균의 동정결과를 나타낸 것이다.

표 1

Isolates	Nucleotide (bp)	Species	Identity (%)
2S5	1,431	<i>Lactobacillus buchneri</i>	99.86
3S3	1,413	<i>L. buchneri</i>	100
4M4	1,406	<i>L. brevis</i>	100
5M2	1,404	<i>L. brevis</i>	100
6M1	1,414	<i>L. buchneri</i>	100
6S4	1,385	<i>L. buchneri</i>	99.93

[0063] 항진균활성이 높은 6개 유산균(2S5, 3S3, 4M4, 5M2, 6M1 및 6S4)의 16S rRNA 영역 염기서열분석을 통한 동정결과, 2S5, 3S3, 6M1 및 6S4는 *Lactobacillus buchneri*로 그리고 4M4와 5M2는 *Lactobacillus brevis*로 동정되었다.

- [0064] 따라서, 결과로부터 유산균 5M2와 6M1을 최종 선발하여 사용하였다.
- [0066] 선발된 미생물의 동정(identification)을 위하여 genomic DNA를 분리하여 16S rDNA 유전자 PCR 및 sequencing을 통하여 동정하였다.
- [0067] 상기 분리된 균주의 16S rDNA 염기서열 분석을 위하여, 상기 균주의 균체를 회수한 다음, 이로부터 genomic DNA를 추출하였다. 추출된 genomic DNA는 universal primer 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3')을 사용하여 16S rDNA를 증폭하였으며, 염기서열을 분석은 (Macrogen, Daejeon, Korea)에 의뢰하여 실시하였다. 분석한 염기서열 결과는 NCBI BLAST database(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi/>)를 통해 분석하였다.
- [0068] 16S rDNA gene 염기서열 분석 결과를 토대로 *Lactobacillus* 공시 균주의 16S rDNA gene 염기서열 비교를 통해 neighbor-joining method를 사용하여 작성한 계통발생학적 유연관계도(phylogenetic tree)는 도 3과 같다.
- [0069] 따라서, 공시균주들과의 상이성이 인정되어 상기 균주 5M2 및 6M1을 각각 *Lactobacillus brevis* 5M2와 *Lactobacillus buchneri* 6M1로 명명하고, 각각 한국농업미생물자원센터(Korean Agricultural Culture Collection, KACC)에 2019년 6월 17일자로 기탁하였다.
- [0070] 1) *Lactobacillus brevis* 5M2 (KACC 92268P)
- [0071] 2) *Lactobacillus buchneri* 6M1 (KACC 92269P)
- [0073] **실시예 2. 옥수수 사일리지 제조 및 품질 평가**
- [0074] **2.1. 목적**
- [0075] 실시예 1에서 선발된 유용 미생물을 이용하여 옥수수 사일리지를 제조하여 품질 평가를 실시하였다.
- [0077] **2.2. 방법**
- [0078] 사일리지 제조를 위해서, 실시예 1에서 선발된 균주 5M2(*Lactobacillus brevis*)와 6M1(*Lactobacillus buchneri*)를 1:1의 비율로 혼합한 미생물첨가제를 이용하여 옥수수 사일리지를 제조하였다. 사일리지 제조를 위한 옥수수는 건물이 28%일 때 수확하여 4~6 cm 길이로 절단하여 사일리지 제조에 이용하였다. 처리구로는 무첨가구와 미생물 첨가구(5M2와 6M1 혼합)를 두었으며 발효기간은 72일로 두었고, 4반복으로 500 kg 곤포사일리지를 제조하였다.
- [0079] 발효 전 옥수수 사일리지 영양소 함량을 분석하였으며, 발효 72일 후 개봉을 하여 영양소 함량, 발효 특성, 미생물 균수 및 저장성을 분석하였다. 또한 호기적 상태에서 7일간 보관하며 pH, 유산균, 및 yeast 수의 변화를 조사하였다.
- [0081] **2.3. 조사항목**
- [0082] 사일리지 영양소 함량을 확인하기 위해, 건조 분쇄한 시료는 AOAC 법(1990)에 준하여 분석(건물, 조단백질, 조지방, 조회분)하고, Van Soest 등(1991)에 따라 neutral detergent fiber와 acid detergent fiber 함량을 분석하였다.
- [0083] 또한 사일리지 발효특성을 확인하기 위해, 사일리지 20 g에 증류수 200 mL를 혼합하여 사일리지 추출물을 제조한 후 pH meter를 이용하여 pH를 측정하고, 사일리지 추출물을 원심 분리하여 상층액을 이용하여 암모니아태질소, lactate 및 휘발성 지방산(volatile fatty acid) 함량을 측정하였다.
- [0084] 미생물 수를 확인하기 위해, 사일리지 추출물을 MRS broth와 PDA agar에 분주하여 배양한 후 lactic acid bacteria(LAB)와 yeast와 mold를 각각 분석하였으며, 배양조건으로 LAB는 CO₂ incubator를 이용하여 39℃에서 24시간 배양하고, yeast와 mold는 incubator를 이용하여 호기적 상태에서 39℃에서 24시간 배양하였다.
- [0085] 아울러, 상기 사일리지의 호기적 안전성을 검토하기 위해서, Wire type의 온도계가 연결된 data logger를 이용

하여 측정하였다.

2.4. 결과

사일리지 제조 전 옥수수의 영양소 함량과 소화율을 표 2에 나타내었다(% , 건물). 대조구와 유산균을 첨가한 처리구의 영양소 함량과 소화율을 차이가 없었다.

표 2

분석 항목	처리구 ¹		SEM	p-value
	대조구	유산균 처리구		
건물	28.3	28.5	0.437	0.689
조단백질	8.64	8.70	0.604	0.897
조지방	3.38	3.48	0.098	0.240
조회분	4.74	4.59	0.200	0.401
Neutral detergent fiber	47.0	46.9	0.652	0.860
Acid detergent fiber	21.2	21.3	0.747	0.798
Hemicellulose	25.9	25.6	0.462	0.471
IVDMD ²	66.8	66.2	2.965	0.758
IVNDFD	44.9	45.2	3.828	0.936

¹대조구, 무첨가구; 유산균 처리구, L. brevisand 와 L. buchneri를 1:1로 1×10^5 cfu/g 처리한 처리구

²IVDMD, 간접 건물 소화율; IVNDFD, 간접 NDF 소화율

72일간 발효된 옥수수 사일리지의 영양소 함량과 in vitro 소화율을 조사한 결과는 표 3에 나타내었다(건물, %).

표 3

Item	처리구 ¹		SEM	p-value
	대조구	유산균 처리구		
건물	26.8	26.8	0.382	1.000
조단백질	8.98	8.96	0.160	0.833
조지방	4.27	4.23	0.349	0.907
조회분	4.69	4.58	0.125	0.193
Neutral detergent fiber	49.3	45.6	1.482	0.013
Acid detergent fiber	27.5	25.0	0.859	0.006
Hemicellulose	21.8	20.7	0.836	0.100
IVDMD ²	62.5	65.2	1.186	0.029
IVNDFD	44.4	48.4	0.408	<.001

¹대조구, 무첨가구; 유산균 처리구, L. brevisand 와 L. buchneri를 1:1로 1×10^5 cfu/g 처리한 처리구

² IVDMD, in vitro dry 건물소화율; IVNDFD, in vitro neutral detergent fiber 소화율.

건물, 조단백질, 조지방, 조회분 및 hemicellulose 함량은 시험구간에 차이가 없었다 ($P>0.05$). 하지만, 유산균 처리구가 대조구보다 NDF(45.6% vs. 49.3%, $P<0.05$)와 ADF(25.0% vs. 27.5%, $P<0.05$)함량은 낮게 나타났으며, IVDMD(65.2% vs. 62.5%, $P<0.05$)와 IVNDFD(48.4% vs. 44.4%, $P<0.001$)함량은 높게 나타났다. 이는 유산균 처리구에 접종한 *L. brevis*와 *L. buchneri*가 발효 되면서 섬유소 분해효소를 분비하여 섬유소 함량이 낮아지고 그에 따라서 소화율이 증가하였다.

72일간 발효된 옥수수 사일리지의 발효특성과 미생물을 조사한 결과는 표 4와 같았다(% , 건물).

표 4

Item	Treatment ¹		SEM	p-value
	CON	MIX		
발효특성				
pH	3.80	3.78	0.029	0.363
Ammonia-N, % DM	0.06	0.05	0.005	0.537
Lactate, % DM	13.0	13.0	0.123	0.474
Acetate, % DM	2.09	2.49	0.128	0.019
Propionate, % DM	ND	ND	-	
Butyrate, % DM	ND	ND	-	
Lactate: acetate	6.22	5.22	0.314	0.002
미생물 성장, log10 cfu/g				
유산균	6.82	6.89	0.123	0.474
효모균	5.89	5.79	0.041	0.029
곰팡이	ND	ND	-	

¹ 대조구, 무첨가구; 유산균 처리구, *L. brevis*와 *L. buchneri*를 1:1로 1×10^5 cfu/g 처리한 처리구

pH, ammonia-N, lactate 및 Lactic acid bacteria 함량은 시험구간에 유의적인 차이가 없었다($P>0.05$). 그러나, 유산균 처리구가 대조구보다 acetate(2.49% vs. 2.09%, $P<0.05$) 함량은 높게 나타났으며, lactate : acetate(5.22% vs. 6.22%, $P<0.05$)비율과 효모균(5.79% vs. 5.89%, $P<0.05$) 수는 낮게 나타났다. 이는 유산균 처리구에 접종된 hetero형 유산균인 *L. brevis*와 *L. buchneri*가 발효되면서 천연항균물질인 acetate를 생성하여 곰팡이균의 일종인 효모균의 성장이 저해되어 유산균 처리구가 대조구 보다 낮게 나타내는 것으로 생각되었다.

호기적 상태에서 7일간 노출시킨 옥수수 사일리지의 pH는 도 4와 같았다(대조구(Δ), 유산균 처리구($\blacktriangle$)).

대조구와 유산균 처리구의 pH 변화에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($P>0.05$). 따라서 일평균 기온이 10 °C 이하인 11월~3월 사이에는 사일리지의 부패가 거의 없을 것임이 확인되었다.

또한 호기적 상태에서 7일간 노출시킨 후 유산균 수를 도 5에 나타내었다(대조구(Δ), 유산균 처리구($\blacktriangle$)).

1일차부터 4일차까지는 대조구와 유산균 처리구의 유산균 수는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($P>0.05$). 그러나 5일차(6.58 vs. 6.30, $P<0.01$)와 7일차(6.31 vs. 6.13, $P<0.05$)에서는 유산균 처리구가 대조구 보다 높은 유산균 수를 보여주었다. 이는 유산균 처리구에 접종된 hetero형 유산균인 *L. brevis*와 *L. buchneri*가 발효되면서 천연항균 물질인 acetate를 생성하여 곰팡이균의 일종인 효모균의 성장이 저해되어 대조구보다 유산균 처리구가 호기적 상태에서 유산균의 감소율이 적다는 것을 알 수 있다.

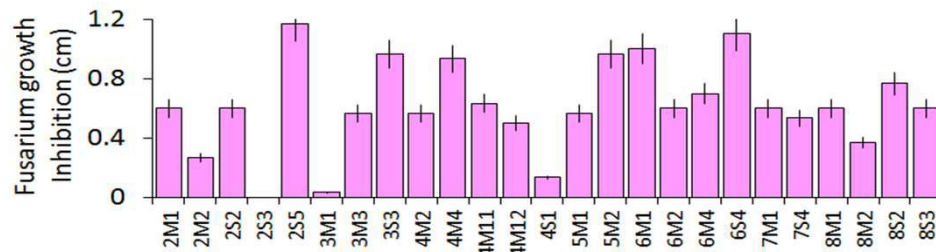
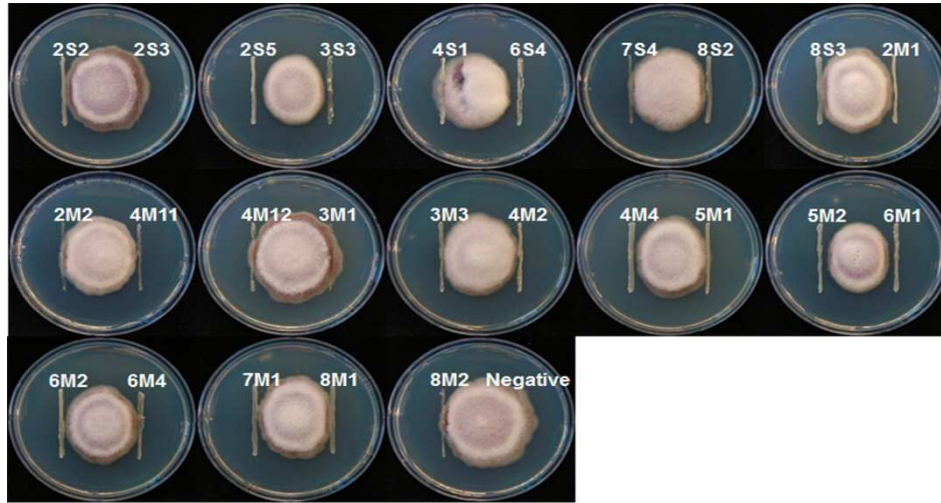
아울러 호기적 상태에서 7일간 노출시킨 후 옥수수 사일리지의 효모균 수를 확인한 결과를 도 6에 나타내었다.

그 결과 모든 기간에서 유산균 처리구가 대조구에 비하여 효모균의 수가 유의적으로 낮게 나타났다($P < 0.05$). 이는 *L. brevis*와 *L. buchneri*의 발효산물인 acetate의 항균효과로 인해 효모 수가 유산균 처리구에서 낮게 나타났는데, 호기적인 상태에 노출되면 호기적 미생물인 효모균이 성장을 다시 시작하는 것을 의미하는 것이다. 그러나 유산균 처리구에 접종된 hetero형 유산균인 *L. brevis*와 *L. buchneri*가 발효 되면서 천연항균물질인 acetate로 인하여 효모균의 성장이 저해되어 유산균 처리구가 대조구에 비하여 효모균 수가 낮게 나타났다.

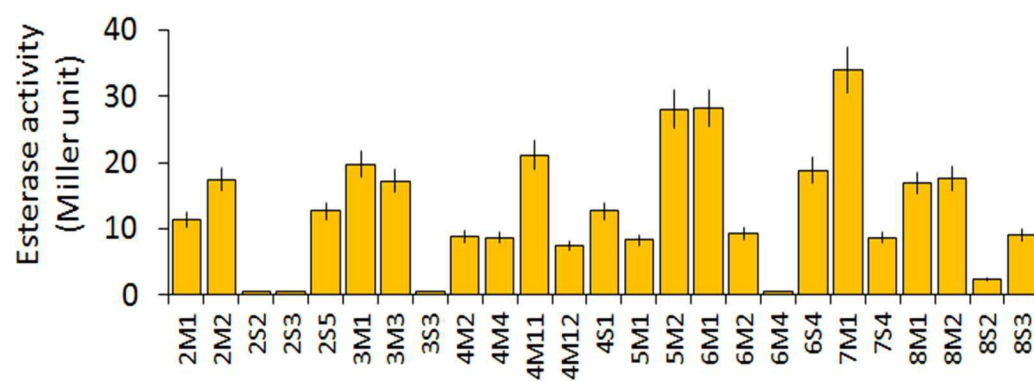
- [0116] 본 발명에서는 8농장에서 수거한 옥수수 사일리지로부터 항균활성과 섬유소 분해 능력이 우수한 균주 2종 (*Lactobacillus brevis* 5M2; *Lactobacillus buchneri* 6M1)을 선발하였으며, 1:1 비율로 혼합한 미생물 첨가제를 제조하였다.
- [0117] 상기 미생물 첨가제를 접종한 옥수수 사일리지의 섬유소 함량(NDF, ADF)은 감소한 반면, 건물소화율(IVDMD)과 섬유소소화율(IVNDFD)은 크게 증가하였다.
- [0118] 또한 신규한 미생물 첨가제를 접종한 옥수수 사일리지에서 acetate 함량이 증가하였는데, 이는 항균활성이 증가한 것으로 판단되며, 이로 인해 효모균 수는 감소하였다.
- [0119] 아울러 호기적 상태에서 신규한 미생물 첨가제를 접종한 옥수수 사일리지의 유산균 수는 서서히 감소하는 반면, 효모균 수는 적었는데, 이것은 사일리지의 안전성이 개선되었기 때문으로 판단되었다.
- [0120] 따라서 본 발명에서 개발된 신규한 유용미생물은 옥수수 사일리지의 소화율과 항균활성 개선에 유리하게 작용하는 것으로 확인되었다.
- [0121] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.
- [0123] 기탁기관명 : 국립농업과학원
- [0124] 수탁번호 : KACC92268P
- [0125] 수탁일자 : 20190702
- [0127] 기탁기관명 : 국립농업과학원
- [0128] 수탁번호 : KACC92269P
- [0129] 수탁일자 : 20190702

도면

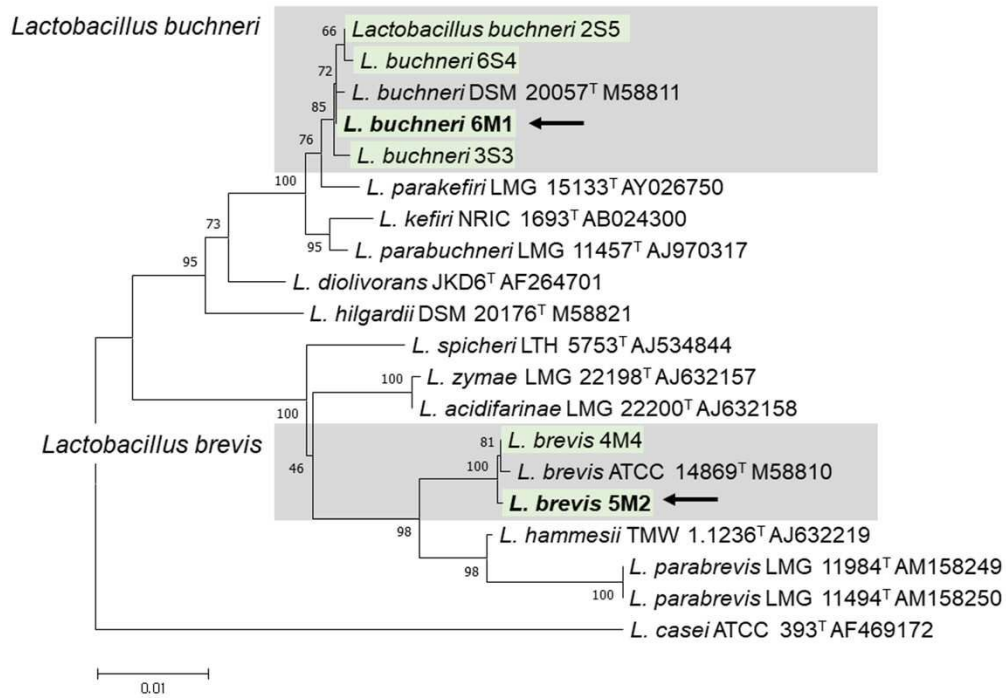
도면1



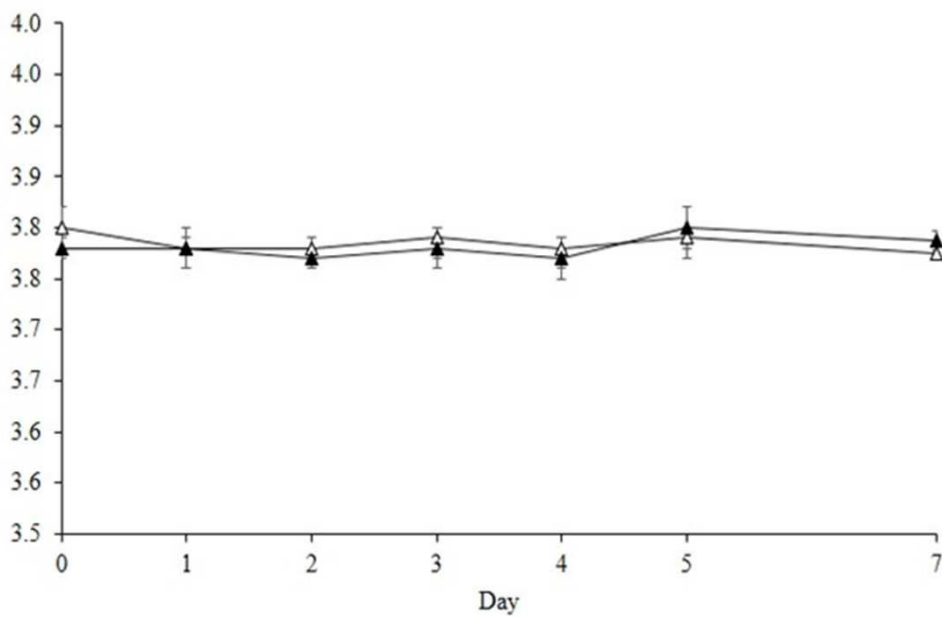
도면2



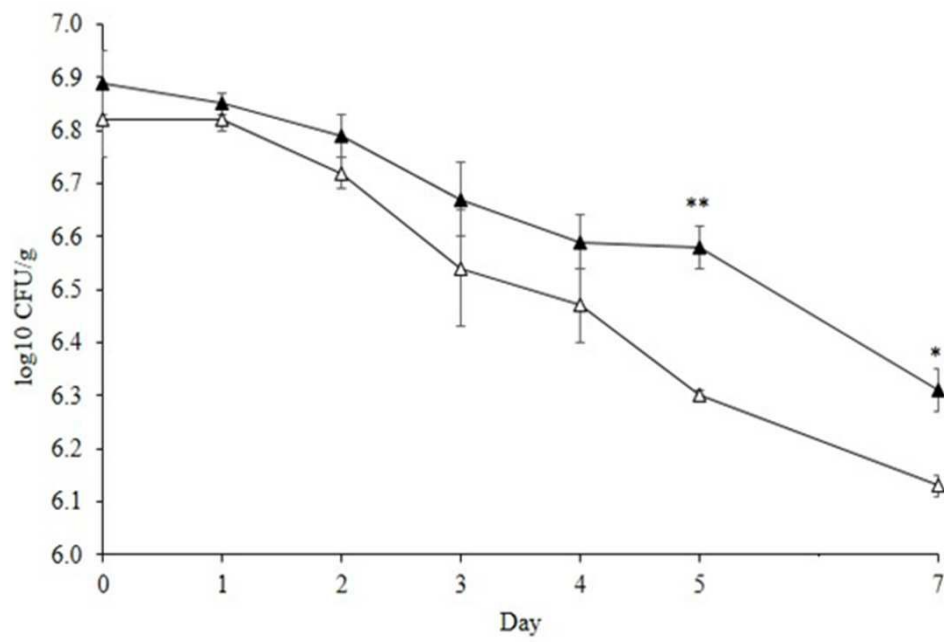
도면3



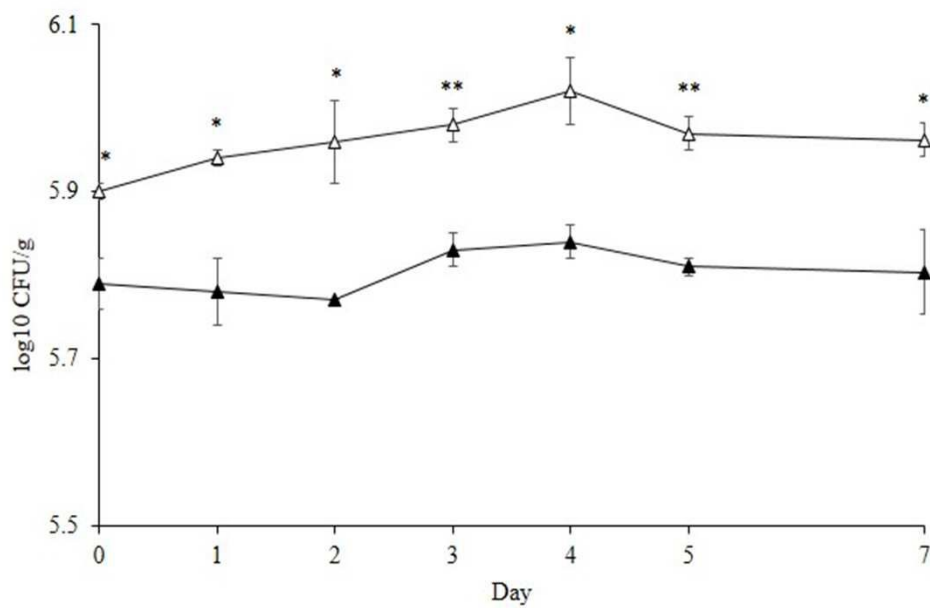
도면4



도면5



도면6



서열 목록

- <110> Sancheong-gun County office
Gyengsang national university office of academy and industry collaboration
- <120> Lactobacillus brevis 5M2 and Lactobacillus buchneri 6M1 for corn
silage additive
- <130> P19094
- <160> 2

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 1404

<212> DNA

<213> 16S rRNA gene *Lactobacillus brevis* 5M2

<400> 1

cgagcttccg ttgaatgacg tgcttgcact gatttcaaca atgaagcgag tggcgaactg 60

gtgagtaaca cgtggggaat ctgcccagaa gcaggggata acacttggaa acaggtgcta 120

ataccgtata acaacaaaat ccgcatggat ttgttttgaa aggtggcttc ggctatcact 180

tctggatgat cccgcggcgt attagttagt tggtaggta aaggcccacc aagacgatga 240

tacgtagccg acctgagagg gtaatcggcc acattgggac tgagacacgg cccaaactcc 300

tacgggaggc agcagtaggg aatcttcac aatggacgaa agtctgatgg agcaatgccg 360

cgtgagttaa gaagggtttc ggctcgtaa actctgtgt taaagaagaa cacctttgag 420

agtaactgtt caagggttga cggtatata ccagaaagcc acggctaact acgtgccagc 480

agccgcggtata acgttaggt ggcaagcgtt gtccggattt attgggcgta aagcgagcgc 540

aggcggtttt ttaagtctga tgtgaaagcc ttcggcttaa ccggagaagt gcatcggaaa 600

ctgggagact tgagtgcaga agaggacagt ggaactccat gtgtagcggg ggaatgcgta 660

gatatatgga agaaccacag tggcgaaggc ggctgtctag tctgtaactg acgtgaggc 720

tcgaaagcat ggtagcgaa caggattaga taccctggta gtccatgccg taaacgatga 780

gtgctaagtg ttggagggtt tccgcccttc agtctgcag ctaacgcatt aagcactccg 840

cctggggagt acgaccgcaa ggttgaaact caaaggaatt gacgggggcc cgcacaagcg 900

gtggagcatg tggtttaatt cgaagctacg cgaagaacct taccaggtct tgacatcttc 960

tgccaatctt agagataaga cgttccttc ggggacagaa tgacaggtgg tgcattggtg 1020

tcgtcagctc gtgtctgag atgttgggtt aagtcgccga acgagcgcaa cccttattat 1080

cagttgccag cattcagttg ggcaactctg tgagactgcc ggtgacaaac cggaggaagg 1140

tgggatgac gtcaaatcat catgccccct atgacctggg ctacacacgt gctacaatgg 1200

acggtacaac gattcgcgaa gtctgaggc taagctaata tcttaaagcc gtctcagtt 1260

cggattgtag gctgcaactc gcctacatga agttggaatc gctagtaatc gcggatcagc 1320

atgcccggt gaatacgttc ccgggccttg tacacaccgc ccgtcacacc atgagagttt 1380

gtaacaccca aagccggtga gata 1404

<210> 2

<211> 1414

<212> DNA

<213> 16S rRNA gene *Lactobacillus buchneri* 6M1

<400> 2

cgctctccg ttgatgattt taggtgcttg cacttgaaag atttaacatt gagacgagtg	60
gcgaactggt gagtaacacg tgggtaacct gcccttgaag taggggataa cacttgghaa	120
caggtgctaa taccgtataa caacaaaaac cacctggttt tggtttaaaa gacggcttcg	180
gctgtcactt taggatggac ccgcggcgta ttagcttggt ggtaaggtaa cggcctacca	240
aggcgatgat acgtagccga cctgagaggg taatcgccca cattgggact gagacacggc	300
ccaaactcct acgggaggca gcagtaggga atcttcaca atggacgaaa gtctgatgga	360
gcaacccgc gtgagtgat aagggtttcg gctcgtaaaa ctctgttgtt ggagaagaac	420
aggtgtcaga gtaactgttg acatcttgac ggtatccaac cagaaagcca cggctaacta	480
cgtgccagca gccgcggtaa tacgtagggt gcaagcgttg tccggattta ttgggcgtaa	540
agcgagcgca ggcggttttt taggtctgat gtgaaagcct tcggcttaac cggagaagtg	600
catcgaaaac cgggagactt gagtgcagaa gaggacagtg gaactccatg ttagcggtg	660
aaatgcgtag atatatggaa gaacaccagt ggcaaggcg gctgtctggt ctgtaactga	720
cgctgaggct cgaagcatg ggtagcgaac aggattagat accctggtag tccatgccgt	780
aaacgatgag tgctaagtgt tggagggttt ccgcccttca gtgctgcagc taacgcatta	840
agcactccgc ctggggagta cgaccgaag gttgaaactc aaaggaattg acggggggccc	900
gcacaagcgg tggagcatgt ggtttaattc gatgtacgc gaagaacctt accaggtctt	960
gacatcttct gccaacctaa gagattagc gttcccttcg gggacagaat gacaggtggt	1020
gcatggttgt cgtcagctcg gtctgtgaga tgttgggtta agtcccgaac cgagcgcaac	1080
ccttattgtt agttgccagc attcagttgg gcactctagc aagactgccg gtgacaaacc	1140
ggaggaaggt ggggatgacg tcaaatcatc atgccctta tgacctgggc tacacacgtg	1200
ctacaatgga cggtaacaac agtcgcgaaa ccgcgaggtc aagctaattc cttaaagccg	1260
ttctcagttc ggattgtagg ctgcaactcg cctacatgaa gttggaatcg ctagtaatcg	1320
tggatcagca tgccacggtg aatacgttcc cgggccttgt acacaccgcc cgtcacacca	1380
tgagagtttg taacacccaa agccggtgag gtaa	1414