

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2022년 6월 23일 (23.06.2022)



(10) 국제공개번호

WO 2022/131493 A1

- (51) 국제특허분류:
A23K 10/18 (2016.01) A23K 10/30 (2016.01)
C12N 1/20 (2006.01) A23K 10/33 (2016.01)
C12N 1/14 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2021/012817
- (22) 국제출원일: 2021년 9월 17일 (17.09.2021)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2020-0175372 2020년 12월 15일 (15.12.2020)KR
- (71) 출원인: 주식회사 잇다 (ITDA INC.) [KR/KR]; 58215 전라남도 나주시 금천면 영산로 5576-19, Jeollanam-do (KR).
- (72) 발명자: 조진한 (CHO, Jinhan); 10125 경기도 김포시 고촌읍 신곡로 48, 504동 1504호, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 김남혁 (KIM, Nam Hyuk); 06182 서울시 강남구 영동대로 405, 4층(대치동, 세원빌딩) 국제특허 본, 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, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

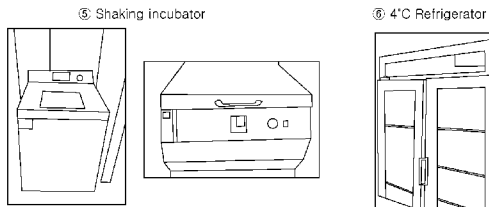
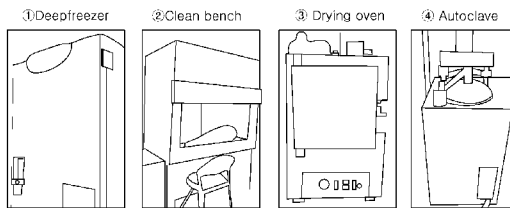
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, 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))

(54) Title: FUNCTIONAL FERMENTED-GREEN TEA COMPOSITE PROBIOTIC, AND PRODUCTION METHOD FOR SAME

(54) 발명의 명칭: 기능성 발효 녹차 복합 생균제 및 이의 제조방법



(57) Abstract: The present invention relates to a functional fermented-green tea composite probiotic which has an excellent balance of viable cell count and enzyme activity, and a production method for same.

(57) 요약서: 효소역가와 생균수에 탁월한 길항력이 있는 기능성 발효녹차 복합 생균제 및 이의 제조방법에 관한 것이다.



WO 2022/131493 A1

명세서

발명의 명칭: 기능성 발효 녹차 복합 생균제 및 이의 제조방법 기술분야

- [1] 본 발명은 기능성 발효녹차 복합생균제에 관한 것으로, 보다 상세하게는 효소역가와 생균수에 탁월한 길항력이 있는 기능성 발효녹차 복합생균제 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 일반적으로 가축의 질병을 예방하고 가축의 생산성을 높이기 위하여 그동안 성장 촉진제로서 항생제를 많이 사용하여 왔으며, 이러한 항생제 오남용으로 인하여 환경은 점점 오염되어 왔다. 따라서 최근 축산업은 친환경 사육을 달성하기 위하여 항생제 사용을 전면적으로 제한하고 있으며, 항생제는 가축의 성장촉진 목적이 아닌 치료 목적으로 사용되도록 그 규제가 강화되어 항생제를 대신할 수 있는 대안이 절실히 필요한 실정이다. 더 나아가 최근 국민 의식의 변화, 안전 축산물에 대한 요구, 고급 축산물 또는 브랜드화 요구 및 축산 환경 개선, 질병의 예방 측면에서 천연 기능성 물질 및 유용 미생물을 이용한 미생물제 및 발효 사료 등의 중요성이 부각되고 있다.
- [3] 성장 촉진제로서의 항생제를 대체할 수 있는 물질로 다양한 천연물질들이 연구되어 왔으며, 특히 발효라는 공정을 통하여 그 효능이 배가되는 연구결과가 최근 보고되고 있다. 생리활성이 우수한 식물체에는 발효과정을 통하여 미생물에 의하여 다양한 반응들이 일어나고 그 결과 생리활성이 적게는 1배에서 많게는 13배까지 증가하였다((Process Biochemistry 40:2757-2762; Lin et al, 2005; Plant Food for Human Nutrition 61:157-160; Sato et al, 2006; Applied Microbiology and Biotechnology 75:763-768; Wang et al, 2007)).
- [4] 미생물제 또한 항생제의 대체 물질로서 동물의 장내 미생물 균총의 균형을 유지시켜 동물에게 이로운 영향을 미칠 수 있는 미생물 사료 첨가제이며, 유익한 미생물의 장내 우점을 유도하여 동물의 건강을 증진시키고 동물의 성장을 촉진시킬 수 있다고 알려져 있다(FULLER, 1989). 미생물제의 사료 내 첨가가 설사 방지와 더불어 자돈의 생산성을 증진시키는 효과가 있으며(Pollman 등, 1980; Collington 등, 1988), 자돈뿐만 아니라 육성·비육돈에서도 성장능력 개선에 효과가 있다고 보고되었다 (Baird, 1977). 또한 미생물제의 첨가는 장내 효소의 활성시켜 사료내 영양소의 이용율을 향상시킬 수 있었으며 (Collinston 등, 1988; Scheuermann, 1993), 면역 능력을 향상시켜 동물의 건강을 증진시킬 수 있다고 보고되어 있다 (Kato 등, 1983; Fuller, 1989).
- [5] 한편, 녹차의 주요 생리활성물질은 폴리페놀(polyphenol)의 일종인 카테킨(catechin)으로, 녹차 폴리페놀 함량의 70% 이상을 차지하며(Khokhar and Magnusdottir, 2002), 종류로는 flavonoiddhk 이의 유도물질인 flavanol, flavanones,

antocyanindins, flavones, polyphenolic acid 등이 있다 (Graham, 1992. 녹차의 유용성분은 항산화작용 (Kim 등, 2004; Robak and Gryglewski, 1998)과 항균력 (Shi, 2002), 콜레스테롤 저하효과 (Yang and Koo, 1997; Jin 등, 2004)가 있고, 최근 인체 연구에서 암 예방 효과가 있음이 증명되었고 (Yang and Laudau, 2002), 또한 LDL 및 총콜레스테롤 수준을 줄인다고 보고되었다 (Davies 등, 2003).

- [6] 일반적으로, 돼지고기는 쇠고기에 비해 값이 저렴하면서도 양질의 단백질을 함유하고 있기 때문에 소비자들에게 인기가 높은 식품이다. 한편, 최근 소득 수준이 향상됨에 따라 소비자들의 육류 선호도는 양보다 질적인 부분에 관심이 높아지고 있고, 모든 축산물에 대한 수입자유화가 이루어짐에 따라 수입 물결은 더욱 거세지고 세계는 점점 단일 시장화 되고 있다. 이에 따라 축산물 생산에 있어 생산비의 절감과 함께 품질의 고급화로 값싼 수입산 육류와 차별화를 시키는 것이 시급하며, 수입산 육류와의 경쟁에서 살아남기 위해서는 값이 저렴하고 품질이 우수하며 위생적이며, 안전한 브랜드 육의 생산이 절실히 요구되고 있다.
- [7] 본 발명에 활용한 녹차는 중국과 한국, 일본 등에서 기원전 2,700년경부터 기호차로서 음용되어 왔을 뿐만 아니라, 최근에는 녹차에 함유된 여러 성분들의 약리적인 메카니즘이 점차 밝혀짐에 따라 그 가치가 재인식되고 있으며, 특히 녹차에 있어서 주요성분의 하나인 폴리페놀류 (EC, EgC, ECg, EgCg)의 항종양, 항산화 생체내 활성 산소에 의한 산화방지, 혈당저하, 혈액에 콜레스테롤 저하 및 식품의 부패예방 등 인체에 건강상 다양한 기능성 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 또한, 녹차는 환경호르몬 억제 효과, 대장균 O-157 및 식중독균 억제효과, 다이어트 효과, 피부미용 효과, 알코올과 담배해독 해소작용 등 영양 및 기호식품으로 널리 알려져 있다. 녹차 비알콜성 음료로서 영양 및 기호식품일 뿐만 아니라 인간의 질병 예방 및 치료는 물론 생리조절과 영양공급의 관점에서 볼 때 신체조절기능을 가진 식품이기도 하다. 현대 생명과학기술의 발전에 따라 녹차의 약리효과가 더욱 분명해지고 있다. 혈관강화작용은 카테킨 류에 대해서 다양한 생리활성이 연구되고 있으며, 이중에 카테킨에 대한 활성, 즉 혈압강화작용, 항산화작용, 암 발생 억제효과, HIV 역전사효소 억제작용, 콜레스테롤의 재흡수 억제 및 충치예방 등 여러가지 약리효과에 대한 보고가 있으며, 혈소판응집 저해활성도 보고 등 그 효과와 효능이 과학적으로 증명되고 있어 천연물질로서 이용가능성이 높다.
- [8] 따라서, 본 발명자들은 상기와 같은 점을 착안하여 유용미생물을 활용하여 생물학적 과정을 통한 기능성 발효녹차 복합 생균제를 제조하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [9] 본 발명의 목적은 가축의 성장을 촉진하고, 질병 예방 및 병원성 미생물의 생육을 억제하여 유익균의 증식을 촉진시킬 수 있는 기능성 발효녹차

복합생균제 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.

- [10] 본 발명의 다른 목적은 동일한 사육기간 동안 증체량 및 사료 효율을 현저히 증가되고, 생산성을 향상시킬 수 있는 발효녹차 복합생균제를 포함하는 사료를 제공하는 것이다.
- [11] 한편, 본 발명이 해결하고자 하는 과제들은 이상에서 언급된 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

- [12] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 실시예에 따르면 녹차, 홍삼박, 대두박, 옥수수, 소맥피 및 당밀을 포함하는 배지에 고초균 (*Bacillus subtilis*), 황국균(*Aspergillus oryzae*), 락토바실러스 아시도필루스(*Lactobacillus acidophilus*), 스트렙토코커스 서머필러스(*Streptococcus thermophilus*) 및 효모균(*Saccharomyces cerevisiae*)을 접종하여 발효시킨 기능성 발효녹차 복합생균제가 제공된다.
- [13] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 발효는 35 내지 40°C의 저온에서 50시간 이상 진행되고, 두 번 이상 반복될 수 있다.
- [14] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 배지 100 중량부에 대하여, 녹차는 10 내지 30 중량부이고, 홍삼박은 5 내지 30 중량부이고, 대두박은 30 내지 50 중량부이고, 옥수수는 10 내지 30 중량부이고, 소맥피는 10 내지 30 중량부이고, 당밀은 1 내지 10 중량부일 수 있다.
- [15] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 전술한 기능성 발효녹차 복합생균제를 포함하는 사료가 제공된다.
- [16] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따르면, 녹차, 홍삼박, 대두박, 옥수수, 소맥피 및 당밀을 포함하는 배지에 고초균 (*Bacillus subtilis*), 황국균(*Aspergillus oryzae*), 락토바실러스 아시도필루스(*Lactobacillus acidophilus*), 스트렙토코커스 서머필러스(*Streptococcus thermophilus*) 및 효모균(*Saccharomyces cerevisiae*)을 각각 1×10^{10} /ml 수준으로 분사 및 접종한 후, 35 내지 40°C 조건에서 50시간 혐기 및 호기적 유산균 발효하여 배양물을 제조하는 발효 단계, 및 상기 제조된 배양물에 사카로마이세스 세레비지아(*Saccharomyces cerevisiae*) KCTC 7915균, 바실러스 서브틸러스 (*Bacillus subtilis*) KCTC 3239균, 바실러스 코아굴란스 (*Bacillus coagulans*) KCTC 1015균을 각각 1×10^{12} /ml 수준으로 분사 및 접종한 후, 35 내지 40°C 조건에서 수분 함량이 10 내지 20%될 때까지 건조하는 건조 단계를 포함하는 기능성 발효녹차 복합생균제의 제조방법이 제공된다.
- [17] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 발효 단계는 두 번 이상 수행될 수 있다.
- [18] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따르면, 전술한 방법으로 제조된 기능성 발효녹차 복합생균제가 제공된다.
- [19] 또한, 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따르면, 전술한 복합생균제를 포함하는

사료가 제공된다.

발명의 효과

- [20] 본 발명의 기능성 발효녹차 복합생균제는 발효 대사 과정에서 분비된 아밀라아제(Amylase), 프로티아제(Protease), 셀룰라제(Cellulase), 피타제(Phytase) 등의 유익한 효소가 다량 함유되어 전분, 단백질 및 식물성 섬유성의 분해를 촉진할 수 있는 이점이 있다.
- [21] 또한, 본 발명의 기능성 발효녹차 복합생균제는 항균력이 있는 천연 항생물질이 분비되어 병원성 대장균, 살모넬라 등의 병원성 미생균의 생육을 억제하는 효과가 있다.
- [22] 또한, 본 발명의 기능성 발효녹차 복합생균제는 발효 대사 산물로 핵산, 글루타민 등의 천연향미제를 포함함으로써, 기호성을 증진시키는 효과가 있다.
- [23] 또한, 본 발명의 기능성 발효녹차 복합생균제는 유해균의 성장을 억제하여 유익균의 증식을 촉진하고, 정상적인 장내균총을 형성 및 유지할 수 있는 효과가 있다.
- [24] 또한, 본 발명의 기능성 발효녹차 복합생균제를 포함하는 사료로 가축을 사육하는 경우 암모니아, 아질산, 황화수소 등의 유해가스를 감소시킬 수 있으며, 배변 상태를 개선하여 연변을 방지하고, 더불어 악취제거와 주위 환경이 개선되는 효과가 있다.
- [25] 또한, 본 발명의 기능성 발효녹차 복합생균제를 포함하는 사료로 가축을 사육하는 경우, 가축의 면역기구를 자극하여 항체 생성을 증진시키고, 체세포수를 감소시키는 대식세포가 활성화되는 효과가 있으며, 궁극적으로 가축의 면역력이 증가되는 이점이 있다.

도면의 간단한 설명

- [26] 도 1은 본 발명의 일 실시예에서 적용한 장비의 실제 사진이다.
- [27] 도 2는 본 발명의 일 실시예에서 사용한 배양기이다.
- [28] 도 3은 본 발명의 일 실시예에서 사용한 제 1 발효기이다.
- [29] 도 4는 본 발명의 일 실시예에서 사용한 제 1 건조기이다.
- [30] 도 5는 본 발명의 일 실시예에서 사용한 제 2 발효기이다.
- [31] 도 6은 본 발명의 일 실시예에서 사용한 제 2 건조기이다.
- [32] 도 7은 본 발명의 일 실시예에서 사용한 제품 BIN이다.
- [33] 도 8은 본 발명의 일 실시예에서 사용한 분쇄기이다.
- [34] 도 9는 본 발명의 일 실시예에서 사용한 포장이다.
- [35] 도 10은 본 발명의 일 실시예에서 사용한 제품 및 원료 적재 창고이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [36] 이하, 본 발명에 대하여 상세히 설명하기로 한다. 이에 앞서, 본 명세서 및 특허청구범위에 사용된 용어 또는 단어는 통상적으로 사전적인 의미로 한정해서 해석되어서는 안되며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선의

방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다. 따라서, 본 명세서에 기재된 실시예에 기재된 구성은 본 발명의 가장 바람직한 일 실시예에 불과할 뿐이고, 본 발명의 기술적 사상을 모두 대변하는 것은 아니므로, 본 출원시점에서 있어서 이들을 대체할 수 있는 다양한 균등물과 변형예들이 있을 수 있음을 이해하여야 한다.

- [37] 본 발명의 일 실시예에 따라, 녹차, 홍삼박, 대두박, 옥수수, 소맥피 및 당밀을 포함하는 배지에 유익균, 보다 구체적으로 고초균 (*Bacillus subtilis*), 황국균(*Aspergillus oryzae*), 락토바실러스 아시도필루스(*Lactobacillus acidophilus*), 스트렙토코커스 서머필러스(*Streptococcus thermophilus*) 및 효모균(*Saccharomyces cerevisiae*)을 접종하여 발효시킨 기능성 발효녹차 복합생균제가 제공된다.
- [38] 이때, 본 발명에 적용할 수 있는 배지는 녹차, 홍삼박, 대두박, 옥수수, 소맥피, 당밀을 포함할 수 있으며, 필요에 따라, 곡물류, 조강류, 식물성 유박류, 동물성 사료 원료, 기타 사료 원료, 정제품 등을 추가로 적용할 수 있다.
- [39] 본 발명에 적용할 수 있는 녹차는 건조된 녹차잎을 그대로 사용하거나, 분쇄하여 분말화한 녹차분말을 사용할 수 있다.
- [40] 본 발명에 적용할 수 있는 홍삼박은 홍삼에 들어있는 성분들을 추출하고 남은 찌꺼기로, 홍삼 자체를 사료 첨가제로 사용하는 것은 경제적인 측면에서 실현 가능성이 거의 없으며, 홍삼 추출물을 생산하는 과정에서 생산되는 홍삼박을 사용하는 경우 경제성이 우수하기 때문에 사료 첨가제로 사용이 가능하다. 또한, 홍삼박에는 식이섬유가 풍부하며, 홍삼의 일부 성분과 풍미를 함유하고 있어, 매우 우수한 소재이다. 또한 홍삼박에는 생리 활성이 우수한 산성다당체가 상당량 잔류하고 있으며, 산성다당체 외에 다양한 탄수화물이 함유되어 있어 미생물의 성장을 촉진시킬 수 있다. 또한, 홍삼박을 배지에 포함하는 경우 배양 효율이 30~40%까지 증가하고, 효모균 내의 아미노산도 함께 증가한다. 따라서 홍삼추출과정에서 부산물로 얻어진 홍삼박에는 다양한 생리활성 물질이 잔류하여 가축의 사료 첨가제로 활용이 가능하며, 또한 발효 과정을 통하여 그 효능을 증진시켜 가축의 생산성을 향상시킬 수 있다.
- [41] 본 발명에 적용할 수 있는 대두박은 대두로부터 기름을 생기는 산물로서, 식물성 단백질의 다량 함유하고 있어, 가축의 사료로 사용하는 경우 우수한 식물성 단백질 공급원이 될 수 있다.
- [42] 본 발명에 적용할 수 있는 옥수수는, 옥수수를 건조하고 낱알을 분리하여 사용하거나, 분리된 낱알을 분쇄하여 분말로 사용할 수 있다.
- [43] 본 발명에 적용할 수 있는 소맥피는 밀을 빵아 체로 찌서 남은 찌꺼기로, 대두박과 더불어 우수한 단백질 공급원으로 사용될 수 있다.
- [44] 본 발명에 적용할 수 있는 당밀은 사탕무나 사탕수수에서 사탕을 뽑아내고 남은 검은 빛의 즙액으로, 발효 원료로 사용될 수 있다.

- [45] 한편, 배지에 추가로 적용할 수 있는 곡물류의 비제한적인 예로는 마이로, 밀, 보리, 귀리, 호밀, 현미, 메밀, 조, 수수, 피 등을 들 수 있다.
- [46] 또한, 배지에 추가로 적용할 수 있는 조강류의 비제한적인 예로는 탈지 쌀겨, 밀기울, 말분, 밀, 배아, 보리겨, 스크리닝, 펠렛, 옥수수겨, 옥수수 배아 등을 들 수 있다.
- [47] 또한, 배지에 추가로 적용할 수 있는 식물성 유박류의 비제한적인 예로는 콩가루, 아마박, 면실박, 낙화생 박, 홍화박, 야자박, 팜박, 호마박, 해바라기박, 유채박, 케이폭박, 겨자박 등을 들 수 있다.
- [48] 또한, 배지에 추가로 적용할 수 있는 동물성 사료의 비제한적인 예로는 어분(북양 밀, 수입 밀, 홀 밀, 연안 밀), 피쉬솔블, 육분, 어골분, 혈분, 분해모, 골분, 가축용 처리 부산물, 페더 밀, 누에, 탈지 분유, 카제인, 건조 유장 등을 들 수 있다.
- [49] 또한, 배지에 추가로 적용할 수 있는 기타 사료 원료의 비제한적인 예로는 식물 경엽류(알팔파, 헤이큐브, 알팔파잎 분말, 유사 아카시아 분말 등), 옥수수 가공 공업부산물(콘 글루텐, 밀, 콘 글루텐 피드, 콘스테인프리카 등), 전분 가공품, 설탕, 발효 공업 산물(효모, 맥주박, 맥아근, 알코올박, 장유박 등), 농산 제조 부산물(감귤 가공박, 두부박, 커피박, 코코아박 등), 그 외(카사바, 잠두콩, 구아밀, 해조, 크릴, 스피룰리나, 클로렐라, 광물 등) 등을 들 수 있다.
- [50] 또한, 배지에 추가로 적용할 수 있는 정제품의 비제한적인 예로는, 단백질(카제인, 알부민 등), 아미노산, 당질(전분, 셀룰로오스, 슈크로우스, 글루코오스 등), 미네랄, 비타민 등을 들 수 있다.
- [51] 아울러, 본 발명자들은 수많은 시행착오를 거쳐 배지로써 녹차, 홍삼박, 대두박, 옥수수, 소맥피 및 당밀이 모두 포함되도록 혼합 사용하는 경우에 각 물질들이 서로 상호작용을 통해 길항작용을 발휘하고, 궁극적으로 내열성 및 균 활성화 기능이 최대가 됨을 확인하였다.
- [52] 한편, 본 발명의 일 실시예에 따라, 배지 100 중량부에 대하여, 녹차는 10 내지 30 중량부이고, 홍삼박은 5 내지 30 중량부이고, 대두박은 30 내지 50 중량부이고, 옥수수는 10 내지 30 중량부이고, 소맥피는 10 내지 30 중량부이고, 당밀은 1 내지 10 중량부를 사용할 수 있으며, 바람직하게는 보성녹차 15 중량부, 홍삼박 10 중량부, 대두박 40 중량부, 옥수수 15 중량부, 소맥피 15 중량부 및 당밀 5 중량부를 사용할 수 있다. 이러한 범위를 만족하는 경우, 전술한 바와 같이 내열성 및 균 활성화 기능이 최대가 되어 유익균의 증식을 촉진시킬 수 있으며 궁극적으로 가축의 면역 기구를 자극하여 항체형성을 증진시키고 체세포수는 감소하면서 대식세포가 활성화될 수 있다.
- [53] 본 발명에 있어서, 고초균 (*Bacillus subtilis*)은 포자를 형성하는 균주로써, 열에 강하여 고온 조건에서 생존율이 우수하다. 또한 배지에 포함되는 경우 아밀라제, 포타아제 등의 효소를 생산하는 능력이 향상될 뿐만 아니라, 항생 및 항균 물질을 생성하고, 비타민 B군을 합성하며 유기산을 생산할 수 있다.

- [54] 본 발명에 있어서, 황국균(*Aspergillus oryzae*)은 오랜 세월동안 인류에 공헌해 온 유익한 곰팡이로써, 효소 분비로 인한 녹말 당화력과 단백질 분해력이 뛰어나다. 또한 배지로 사용되는 경우 구연산, 초산, 젖산 등의 유기산을 생성할 수 있어, 이후 가축 위산 내의 pH를 안정화시킬 수 있다. 또한 항균성 대사 산물을 생성하여 유해 미생물의 증식을 억제시킬 수 있으며, 암모니아의 발생 억제와 축분 발효를 촉진하여 축사 환경을 개선하고 고급 유기질을 비료화시킬 수 있다.
- [55] 본 발명에 있어서, 락토바실러스 아시도필루스(*Lactobacillus acidophilus*)는 프로바이오틱의 일종의 유산균으로 내산성이며 정장 작용, 항암효과, 혈중 콜레스테롤 저하, 비타민 B군의 합성능력에 탁월하다.
- [56] 본 발명에 있어서, 스트렙토코커스 서머필러스(*Streptococcus thermophilus*)는 유산균의 증식 및 유해균의 억제에 도움을 줄 수 있는 이점이 있다.
- [57] 본 발명에 있어서, 효모균(*Saccharomyces cerevisiae*)은 단백질과 미량 광물질을 다량 함유하고 있어, 사료로 사용시 가축 장내에서 소화 흡수되어 쉽게 이용될 수 있다. 한편, 본 발명의 일 실시예에 따라 효모균은 대사생성물을 다량 함유한 효모배양물로도 사용될 수 있으며, 이러한 효모배양물의 첨가는 축산물의 생산성을 크게 향상시킬 수 있다.
- [58] 또한, 효모균(*Saccharomyces cerevisiae*)은 핵산을 함유하고, 효모의 성장 중에 핵산염과 글루타민산 등의 존재로 기호성이 향상되는 이점이 있다.
- [59] 아울러, 효모균(*Saccharomyces cerevisiae*)은 산소에 대한 친화성이 강하여 장내의 산소를 제거하여 혐기성 미생물의 증식을 활성화시킬 뿐만 아니라, 여러 종의 소화효소를 생성하여 사료의 소화 흡수를 향상시킴으로써 사료 효율이 향상되는 이점이 있다.
- [60] 또한, 효모균(*Saccharomyces cerevisiae*)은 pH의 완충 역할을 하며, 비타민 B 그룹과 UGF, 아미노산 등을 생성하여 가축의 수정율과 부화율을 향상시킬 수 있다.
- [61] 아울러, 본 발명자들은 수많은 실험과 시행착오를 거쳐, 상호 보완되어 상승효과가 극대화될 수 있는 최적 균주의 조합은 고초균 (*Bacillus subtilis*), 황국균(*Aspergillus oryzae*), 락토바실러스 아시도필루스(*Lactobacillus acidophilus*), 스트렙토코커스 서머필러스(*Streptococcus thermophilus*) 및 효모균(*Saccharomyces cerevisiae*)을 혼합하여 동시에 사용되는 경우임을 확인하였다.
- [62] 한편 본 발명의 일 실시예에 따라, 전술한 배지에 고초균 (*Bacillus subtilis*), 황국균(*Aspergillus oryzae*), 락토바실러스 아시도필루스(*Lactobacillus acidophilus*), 스트렙토코커스 서머필러스(*Streptococcus thermophilus*) 및 효모균(*Saccharomyces cerevisiae*)이 접종된 후 35 내지 40°C의 저온에서 50시간 이상 발효가 진행될 수 있으며, 바람직하게는 발효는 대형 발효기에서 전체를 2차 이상 발효시킬 수 있다. 이는 반복적 발효에 의해 높은 균수가 유지될 수

있어 대사 산물이 충분히 분비되고, 저온 건조시 균체의 포자 형성으로 내열성이 높아 이후, 사료로 제조되는 경우 가공 열처리시 부수적인 문제가 발생하지 않는 효과가 있다.

[63] 아울러, 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따라 전술한 발효녹차 복합 생균제를 포함하는 사료가 제공될 수 있다.

[64]

[65] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범의가 이들 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

[66]

[67] 실시예 1 - 기능성 발효 녹차 복합생균제

[68] 보성녹차 15 중량%, 홍삼박 10 중량%, 대두박 40 중량%, 옥수수 15중량%, 소맥피 15 중량% 및 당밀 5 중량%를 혼합하여 배지를 제조하였으며, 총 수분함량은 70%로 하였다. 이후 혼합 배지를 100°C 이상의 온도에서 30분간 살균처리하였다. 살균처리가 완료된 배지에 도 2의 배양기로 춘천바이오산업진흥원에서 구입한 고초균 (*Bacillus subtilis*), 황국균(*Aspergillus oryzae*), 락토바실러스 아시도필루스(*Lactobacillus acidophilus*), 스트렙토코커스 서머필러스(*Streptococcus thermophilus*) 및 효모균(*Saccharomyces cerevisiae*)을 각각 1×10^{10} /ml 수준으로 분사 및 접종하여 전체 혼합물의 함유율이 약 40% 정도 되게 하여 도 3의 발효기로 37°C의 온도하에서 50 시간 동안 혐기 및 호기적 유산균 발효 과정을 진행하여 기능성 배양물을 제조하였다. 이후 제조된 배양물에 춘천바이오산업진흥원에서 구입한 사카로마이세스 세레비지아(*Saccharomyces cerevisiae*) KCTC 7915균, 바실러스 서브틸러스(*Bacillus subtilis*) KCTC 3239균, 바실러스 코아굴란스 (*Bacillus coagulans*) KCTC 1015균을 각각 1×10^{12} /ml 수준으로 분사 및 접종한 후, 도 4의 건조기로 37°C의 온도 하에서 수분함량이 20%가 되는 36시간동안 건조하였다. 건조된 생성물을 도 5의 발효기로 37°C의 온도하에서 50 시간 동안 2차 발효를 진행하였으며, 2차 발효된 생성물을 도 6의 건조기로 37°C의 온도 하에서 수분함량이 15%가 되는 36시간동안 건조하여 기능성 발효녹차 복합생균제를 제조하였다.

[69]

[70] 실시예 2

[71] 상기 실시예 1의 기능성 발효녹차 복합생균제가 0.3% 함유한 사료를 제조하였다. 도 7 내지 10은 사료 제조에 실제 사용된 기계 장치이다.

[72]

[73] 평가예 1

[74] 2019년 11월 14일 상기 실시예 2의 사료를 한국단미사료협회 사료 연구소에 사료검정을 의뢰하였으며(접수번호 기11-154), 하기 표 1과 같이 살모넬라 균 등의 유해균은 검출되지 않았으며, 바실러스 균, 유산균 등 유익균이 다량

함유된 것으로 확인되었다.

[75] [표1]

의뢰성분	단위	검정결과	검정방법
살모넬라		불검출	사료표준분석방법
고초균 (Bacillus subtilis)	cfu/g	1.4 X 10 ⁷	사료표준분석방법
락토바실러스 아시도필루스(Lactobacillus acidophilus)	cfu/g	5.8 X 10 ⁷	사료표준분석방법
스트렙토코커스 서머필러스(Streptococcus thermophilus)	cfu/g	2.0 X 10 ⁷	사료표준분석방법
황곡균(Aspergillus oryzae)	cfu/g	2.8 X 10 ⁷	사료표준분석방법
효모균(Saccharomyces cerevisiae)	cfu/g	7.7 X 10 ⁸	사료표준분석방법

[76] 평가예 2

[77] 2019년 1월 22일 상기 실시예 2의 사료를 한국사료협회 사료기술연구소에 사료검정을 의뢰하였으며(접수번호 190110-15), 하기 표 2와 같이 곰팡이 독소가 전혀 검출되지 않은 것으로 확인되었다.

[78]

[79] [표2]

곰팡이 독소	검정결과	검정방법
아플라톡신(ppb)	불검출	사료표준분석 7.1. 라
오크라톡신(ppb)	불검출	사료표준분석 7.3. 나

[80] 평가예 3

[81] 하기 표 3과 같이 실시예 1의 기능성 발효녹차 복합생균제를 일정 비율로 함유하는 사료를 제조하여 돼지 및 소에게 급여하였다.

[82]

[83] [표3]

축종별	기능성 발효농차 복합생균제 함량
육성주 및 산란계	0.1~0.2%
종계 및 육계	0.1~0.2%
자돈 및 젖돈	0.2%
육성돈 및 비육돈	0.1%
모돈	0.1~0.2%
송아지	0.2%
비육우	0.1%
착육우	0.1~0.2%

- [84] 이때, 상기 산란계의 가축은 산란율이 향상되었으며, 난중 증가 및 난각이 개선됨에 따라 연파란이 방지됨을 확인하였다. 종계의 경우 부화율이 향상되며, 난질이 개선됨을 확인하였다.
- [85] 육계의 경우 골격의 발육이 향상되고 일당 증체율이 개선되며 하리 등이 예방됨을 확인하였다.
- [86] 양돈(자돈, 육성돈, 비육돈, 모돈)은 소화율이 향상되며 수태율 및 산자수가 증가됨을 확인하였다. 또한, 이유자돈의 하리 예방 및 체중 증가와 섭취량 향상에 따른 일당 증체량 향상을 확인하였으며, 포유자돈 폐사율 감소와 소화기 장애 예방, 유산 및 사산 감소등을 확인하였다.
- [87] 한편, 소(송아지, 비육우, 착우)의 경우 사료의 섭취량과 사료 효율, 소화율이 개선되어 성장이 촉진되며, 이유 시기가 단축됨을 확인하였다. 또한, 반추위내 PH, 프로피온산(propionic acid), 위액의 반전율(flow rate) 등이 증가하여 산유량 및 유지율이 증가됨을 확인하였다. 아울러, 총 혐기성 미생물 및 섬유소 분해 미생물이 증가하여 조단백, 조섬유의 소화율이 증가하였으며, 체내 체세포수를 감소시킬 수 있음을 확인하였다.
- [88] 또한, 본 발명의 일 실시예에 따른 기능성 발효농차 복합생균제를 함유한 사료로 사육된 가축은 공통적으로 병원성 미생물(병원성 대장균, 살모넬라 등)의 억제, 사료 내 독소(Aflatoxin)의 제거효과가 있었으며, 수송, 환경 변화에 따른 스트레스에 대한 적응력이 증가, 암모니아 가스 등 축사 내 유해가스의 현저한 감소, 양질의 유기질 비료의 생산 및 면역력 증강 효과가 있음이 확인되었다.
- [89] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적사상이나 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. 예컨대, 단일형으로 설명되어 있는

각 구성 요소는 분산되어 실시될 수 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

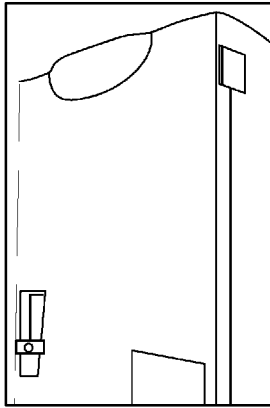
- [90] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

청구범위

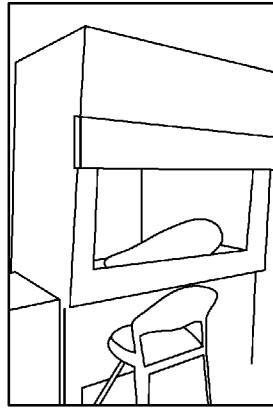
- [청구항 1] 녹차, 홍삼박, 대두박, 옥수수, 소맥피 및 당밀을 포함하는 배지에 유익균을 접종하여 발효시킨 기능성 발효녹차 복합생균제.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 발효는 35 내지 40°C의 저온에서 50시간 이상 진행되고, 두 번 이상 반복되는 것을 특징으로 하는 기능성 발효녹차 복합생균제.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 배지 100 중량부에 대하여, 녹차는 10 내지 30 중량부이고, 홍삼박은 5 내지 30 중량부이고, 대두박은 30 내지 50 중량부이고, 옥수수는 10 내지 30 중량부이고, 소맥피는 10 내지 30 중량부이고, 당밀은 1 내지 10 중량부인 것을 특징으로 하는 기능성 발효녹차 복합생균제.
- [청구항 4] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 기능성 발효녹차 복합생균제를 포함하는 사료.

[도1]

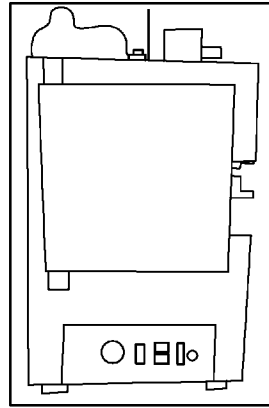
① Deepfreezer



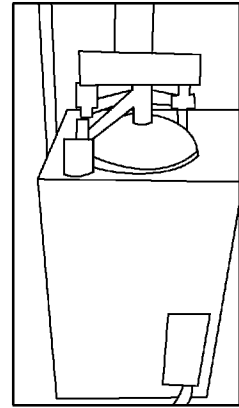
② Clean bench



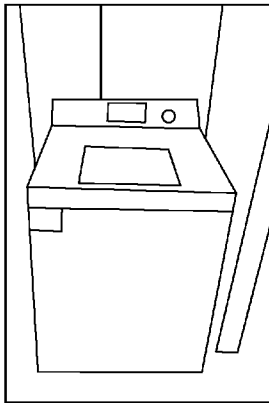
③ Drying oven



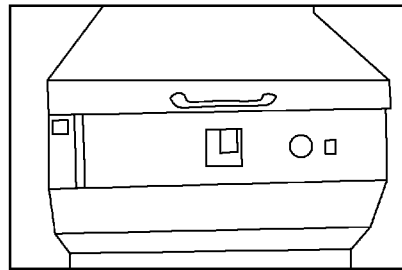
④ Autoclave



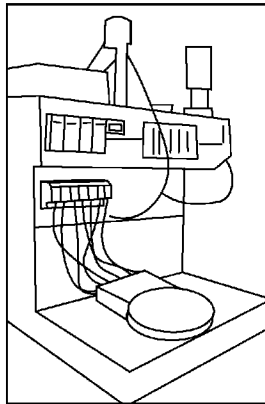
⑤ Shaking incubator



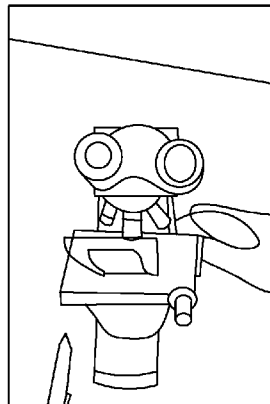
⑥ 4°C Refrigerator



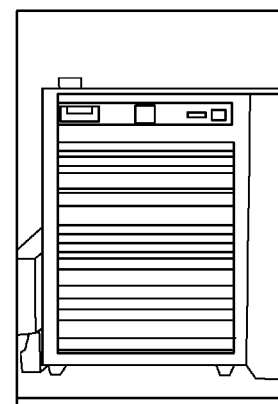
⑦ Fermenter



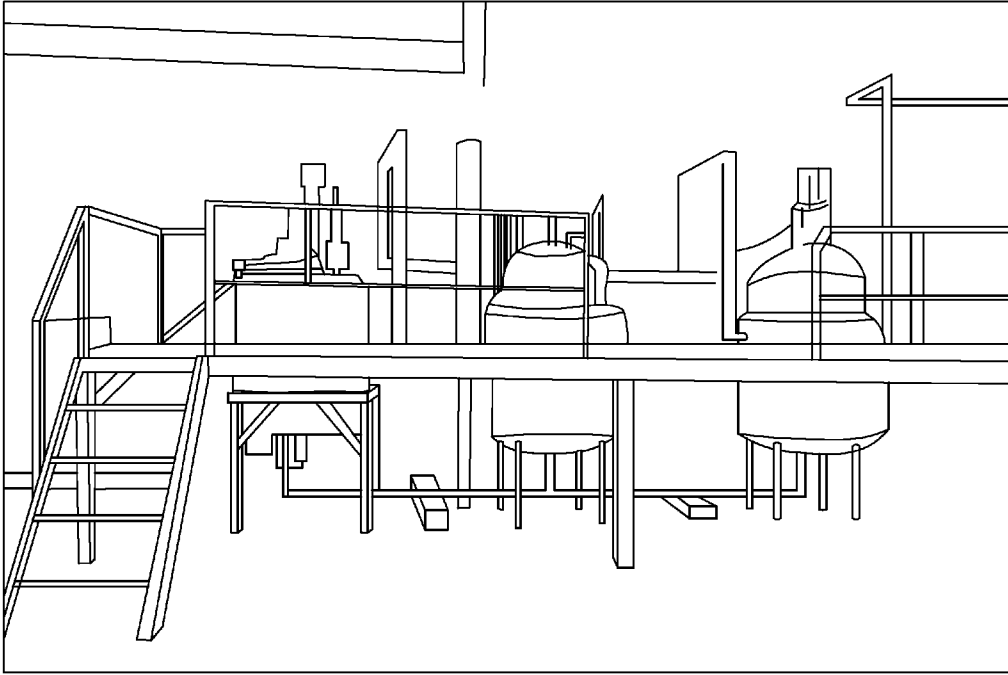
⑧ Microscope



⑨ UV Sterilizer

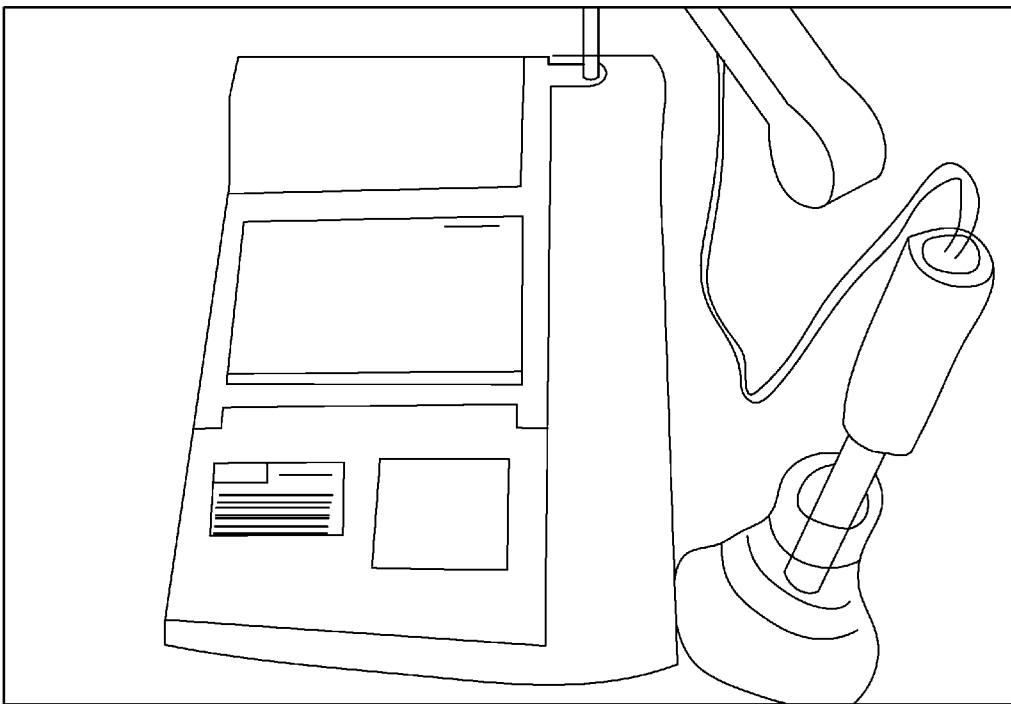


[도2]

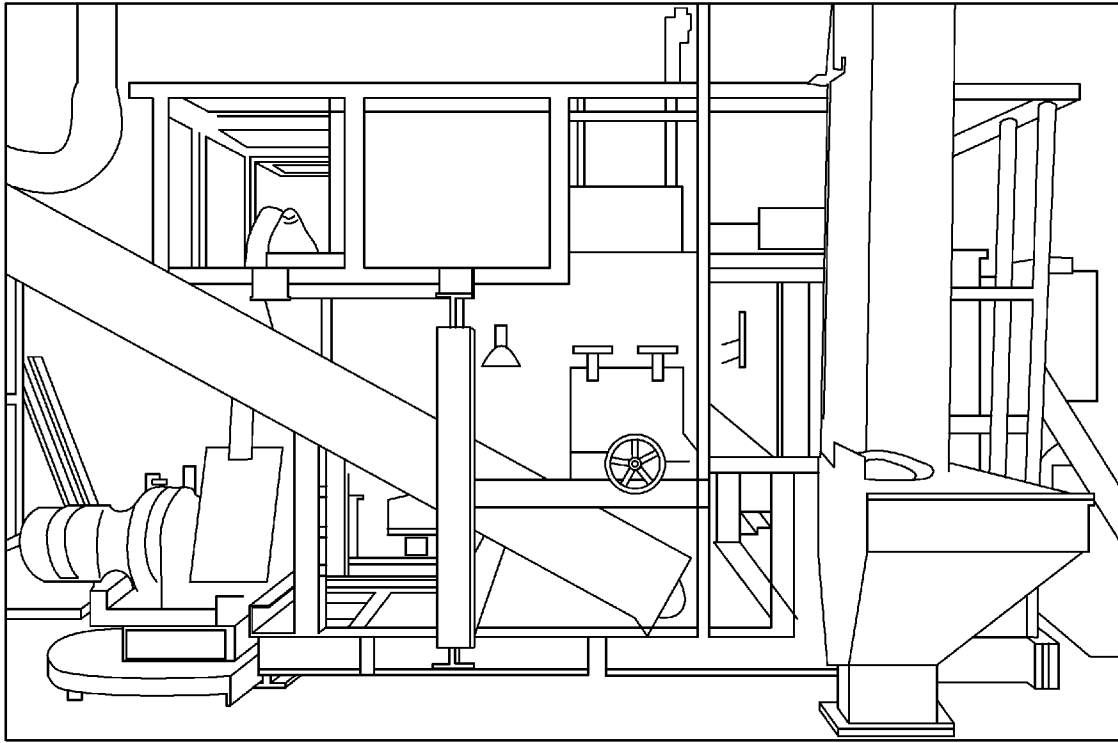


액상 Fermenter

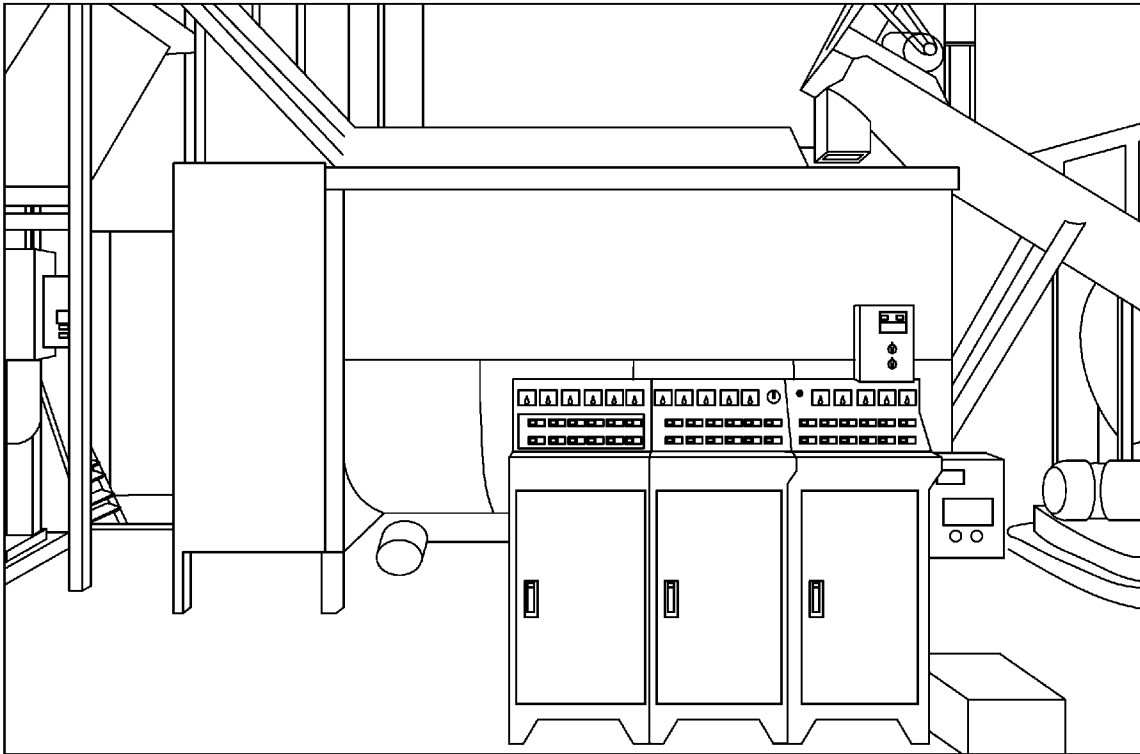
(우측부터 1번, 2번, 3번 액상 Fermenter로 완전 멸균후에 적정 rpm, Aeration과 PH로 최적의 균 배양)



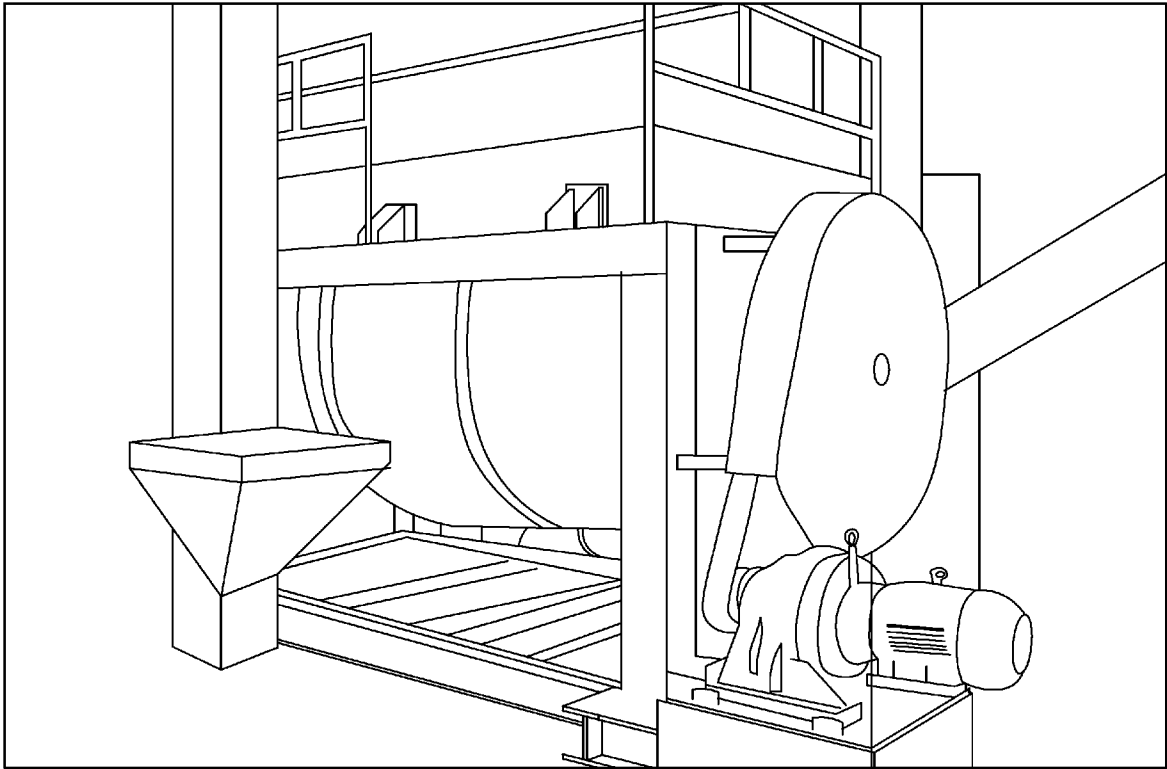
[도3]



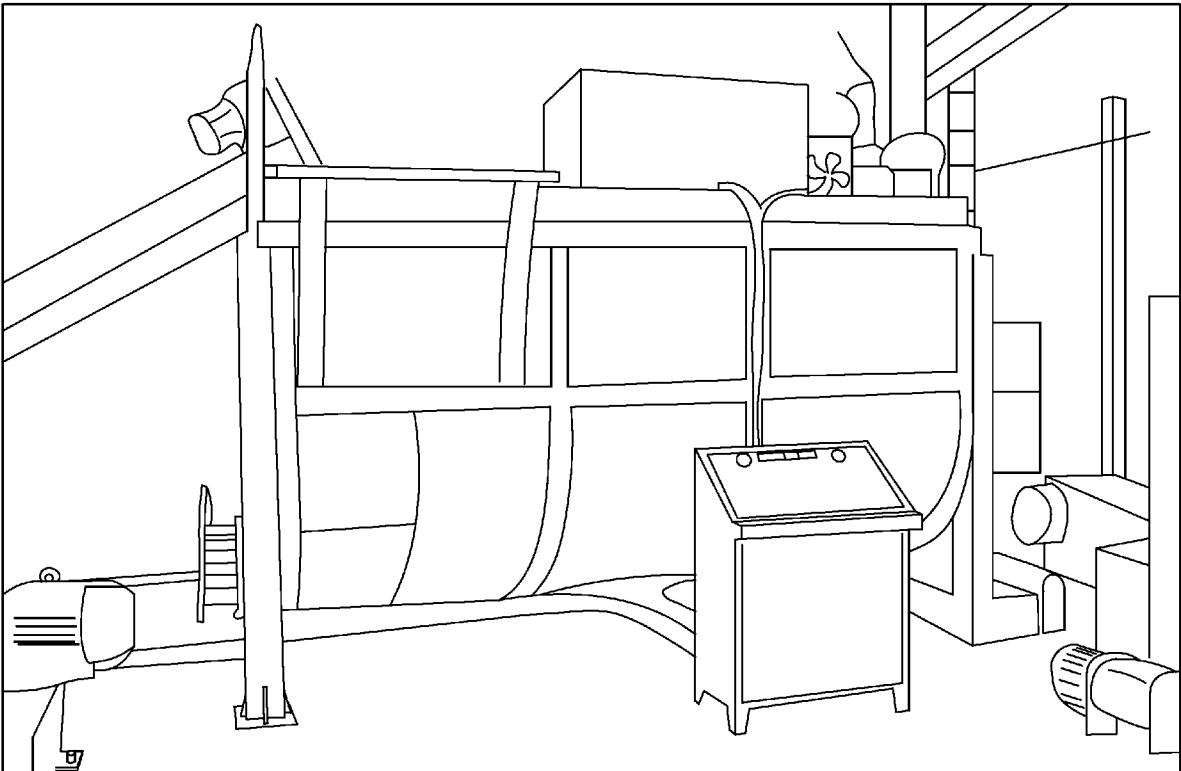
[도4]



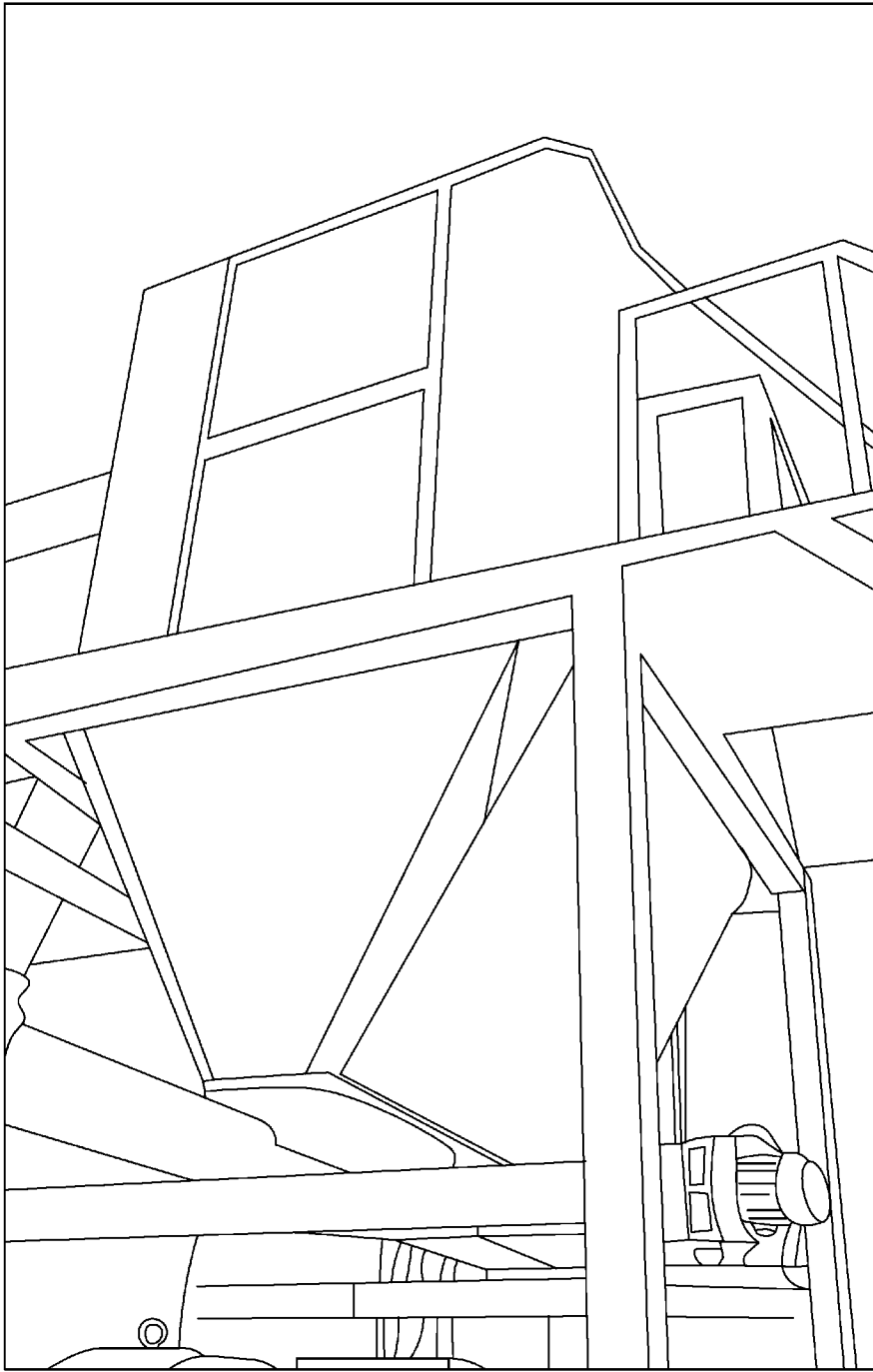
[도5]



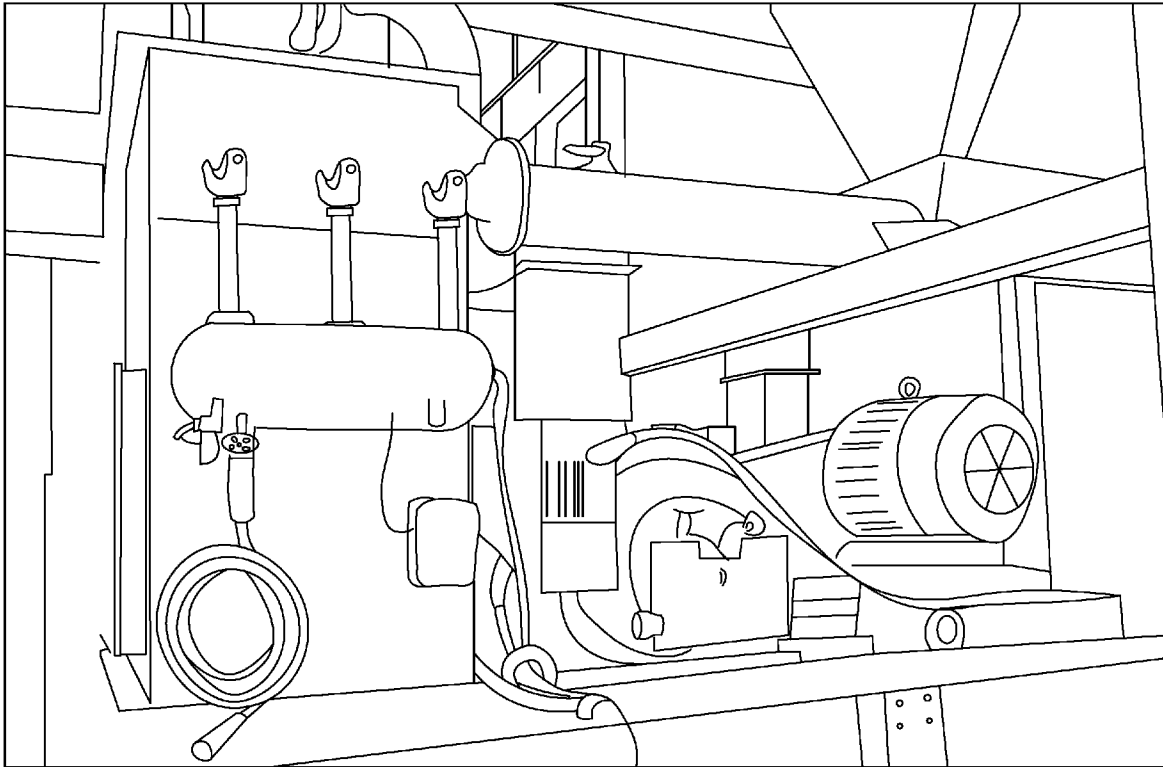
[도6]



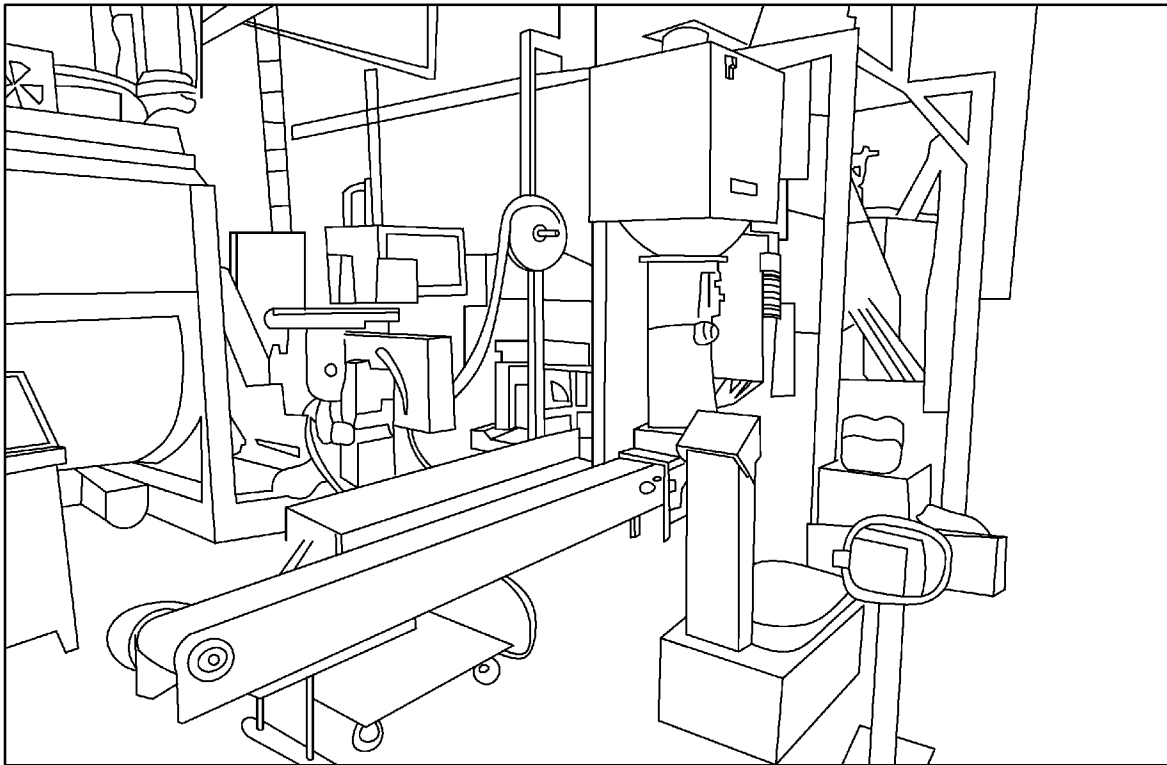
[도7]



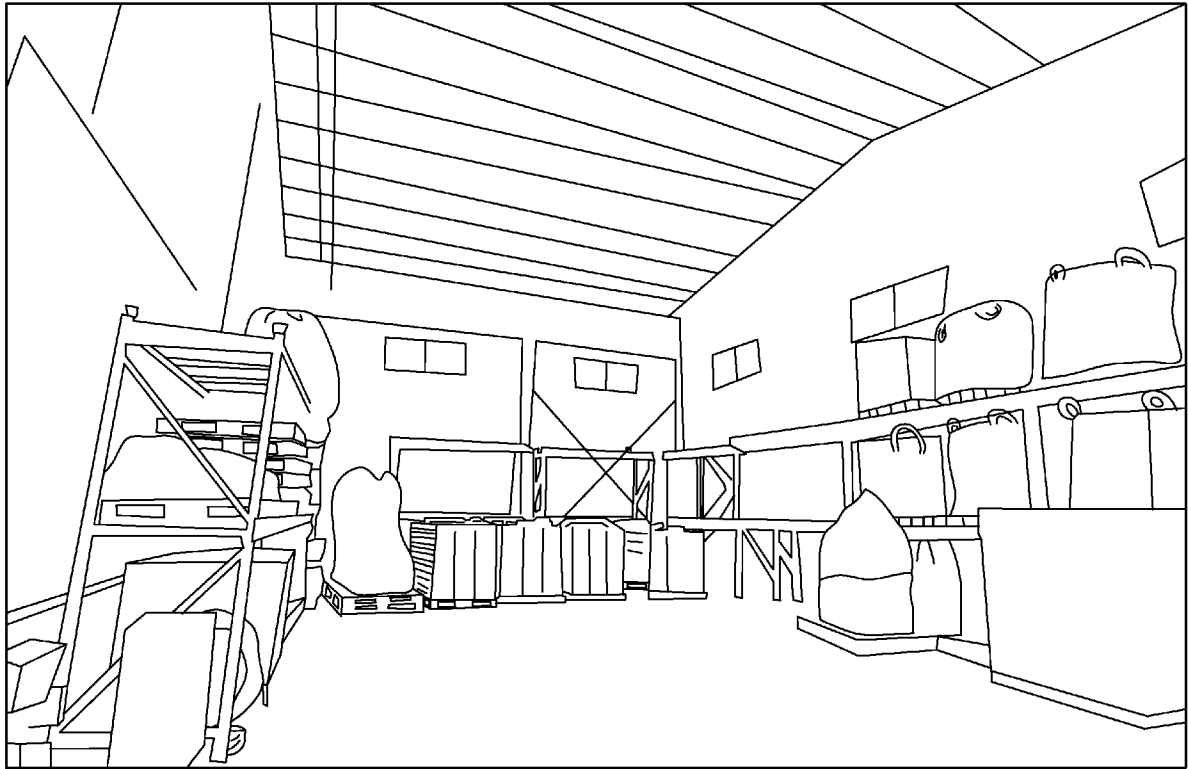
[도8]



[도9]



[도10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/012817

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
A23K 10/18(2016.01)i; C12N 1/20(2006.01)i; C12N 1/14(2006.01)i; A23K 10/30(2016.01)i; A23K 10/33(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 10/18(2016.01); A23K 1/14(2006.01); A23K 1/16(2006.01); A23K 1/18(2006.01); A23K 20/195(2016.01)		
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: 녹차(green tea), 발효(fermentation), 생균제(probiotic), 사료(feed)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2010-0137940 A (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION OF SUNCHON NATIONAL UNIVERSITY) 31 December 2010 (2010-12-31) See claims 1, 2 and 4.	1-4
Y	KR 10-2011-0131718 A (DAWBIO CO., LTD.) 07 December 2011 (2011-12-07) See claims 1 and 5; and example 1.	1-4
A	CN 102771660 A (ANHUI JINYUAN AGRICULTURE ANIMAL HUSBANDRY TECHNOLOGY CO., LTD.) 14 November 2012 (2012-11-14) See claim 1; and example 1.	1-4
A	KR 10-1319097 B1 (KIM, Gi Sun) 17 October 2013 (2013-10-17) See claim 1; and example 1.	1-4
A	CN 104472879 A (FUJIAN AGRICULTURE AND FORESTRY UNIVERSITY) 01 April 2015 (2015-04-01) See claims 1 and 5.	1-4
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 "D" document cited by the applicant in the international application "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 24 December 2021		Date of mailing of the international search report 24 December 2021
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2021/012817

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2010-0137940	A	31 December 2010	KR	10-1157544	B1	18 June 2012
KR	10-2011-0131718	A	07 December 2011	KR	10-1137893	B1	30 April 2012
CN	102771660	A	14 November 2012	CN	102771660	B	18 September 2013
KR	10-1319097	B1	17 October 2013	KR	10-2013-0032485	A	02 April 2013
CN	104472879	A	01 April 2015	None			

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A23K 10/18(2016.01)i; C12N 1/20(2006.01)i; C12N 1/14(2006.01)i; A23K 10/30(2016.01)i; A23K 10/33(2016.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A23K 10/18(2016.01); A23K 1/14(2006.01); A23K 1/16(2006.01); A23K 1/18(2006.01); A23K 20/195(2016.01)		
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: 녹차(green tea), 발효(fermentation), 생균제(probiotic), 사료(feed)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2010-0137940 A (순천대학교 산학협력단) 2010.12.31 청구항 1, 2, 4	1-4
Y	KR 10-2011-0131718 A ((주)다우바이오) 2011.12.07 청구항 1, 5; 실시예 1	1-4
A	CN 102771660 A (ANHUI JINYUAN AGRICULTURE ANIMAL HUSBANDRY TECHNOLOGY CO.,LTD.) 2012.11.14 청구항 1; 실시예 1	1-4
A	KR 10-1319097 B1 (김기선) 2013.10.17 청구항 1; 실시예 1	1-4
A	CN 104472879 A (FUJIAN AGRICULTURE AND FORESTRY UNIVERSITY) 2015.04.01 청구항 1, 5	1-4
<input type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2021년12월24일(24.12.2021)		국제조사보고서 발송일 2021년12월24일(24.12.2021)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 한인호 전화번호 +82-42-481-3362

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2010-0137940 A	2010/12/31	KR 10-1157544 B1	2012/06/18
KR 10-2011-0131718 A	2011/12/07	KR 10-1137893 B1	2012/04/30
CN 102771660 A	2012/11/14	CN 102771660 B	2013/09/18
KR 10-1319097 B1	2013/10/17	KR 10-2013-0032485 A	2013/04/02
CN 104472879 A	2015/04/01	없음	