(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년09월04일
(11) 등록번호 10-2701560
(24) 등록일자 2024년08월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23K 10/16 (2017.01) *A23K 50/10* (2016.01)
(52) CPC특허분류
A23K 10/16 (2016.05)
A23K 50/10 (2016.05)
(21) 출원번호 10-2023-0138464
(22) 출원일자 2023년10월17일
심사청구일자 2023년10월17일
(56) 선행기술조사문헌
US20140057343 A1*
Environmental Science and Pollution Research, Vol. 30, pages 82661-82671(Published online: 17 June 2023)*
인터넷 포스팅 "식이 보충제 데이터베이스, 칸디다 루고사"(2022.12.21.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
이성실
경상남도 진주시 금산면 중천로 82, 107동 901호 (금산아이파크아파트)
이신자
경상남도 진주시 진주대로 501, 경상국립대학교 (가좌동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 4 항 심사관 : 김정희

(54) 발명의 명칭 **칸디다 루고사 배양액을 포함하는 반추동물의 메탄 생성 저감용 사료첨가제 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 칸디다 루고사(*Candida rugosa*) 배양액을 포함하는 반추동물의 메탄 생성 저감용 사료 첨가제 조성물에 대한 것으로, 칸디다 루고사(*Candida rugosa*) 첨가에 따른 *in vitro* 시험 결과, pH와 건물소화율은 발효가 진행됨에 따라 부정적인 영향을 보이지 않았으며, 그와 동시에 메탄발생량이 감소된 것으로 나타났다. 상기와 같은 효과를 가지는 칸디다 루고사(*Candida rugosa*) 배양액은 가축의 생장을 촉진하고 사료 효율을 증가시킬 수 있고, 장기간 사용하여도 안전한 합성 첨가제 또는 항생제 대체제로 사용될 수 있으며, 메탄가스 생성을 감소시키는 천연 메탄 저감제로서 사료 첨가제로 사용될 수 있다.

(52) CPC특허분류
Y10S 426/807 (2013.01)

(72) 발명자
김현상
경상남도 진주시 진주대로 501, 경상국립대학교 (가좌동)
엄준식
경상남도 진주시 진주대로 501, 경상국립대학교 (가좌동)
최유영
경상남도 진주시 금산면 중장로154번길 49, 102동 2004호 (진주금산두산위브아파트)
조성욱
경상남도 김해시 가야로 19, 510동 704호 (삼계동, 분성마을5단지푸르지오아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1545027237
과제번호	321083053HD020
부처명	농림축산식품부
과제관리(전문)기관명	농림식품기술기획평가원
연구사업명	2025축산현안대응산업화기술개발
연구과제명	대사체학 기반 온실가스 생성경로 구명과 postbiotics 개발 및 저감형 사료의 현장 적용 기술개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경상국립대학교 산학협력단
연구기간	2023.01.01 ~ 2023.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

배지에 칸디다 루고사(*Candida rugosa*)를 30℃에서 32 내지 48시간 동안 배양한 칸디다 루고사(*Candida rugosa*) 배양액을 유효성분으로 포함하는 반추동물의 메탄 생성 저감용 사료첨가제 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 반추동물은 소, 염소, 양, 사슴, 낙타 및 기린으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 사료첨가제 조성물.

청구항 4

제1항 또는 제3항에 따른 사료첨가제 조성물을 포함하는 반추동물의 메탄 생성 저감용 사료 조성물.

청구항 5

제4항에 따른 사료 조성물을 반추동물에 급여하는 단계를 포함하는 반추위 내 메탄가스 생성 저감 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 칸디다 루고사(*Candida rugosa*) 배양액을 포함하는 반추동물의 메탄 생성 저감용 사료첨가제 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 전 세계적으로 기후 변화에 대응하기 위해 기후협약을 체결하여 각 나라마다 온실가스 감축을 의무화하고 있다. 메탄(CH_4)은 강력한 온실가스 중 하나로 축산업 및 다양한 농업분야에서 직접적으로 대기에 방출된다. 적외선을 흡수하는 메탄의 성질과 대기 중에 머무르는 기간 등을 고려하면, 메탄의 온실효과는 20년간 이산화탄소의 72배, 100년간 약 25배에 달한다.

[0003] 메탄가스는 반추동물의 소화과정에서 발생하는 자연적인 대사산물이며, 반추동물 중에서 소가 75%를 차지하고 나머지는 물소, 면양 그리고 산양으로부터 발생된다. 소의 경우, 평균적으로 50L/시간 이상의 가스를 생산하고 이중 25-30%가 메탄이다.

[0004] 또한, 반추동물이 사료로부터 섭취한 총 에너지의 3 내지 12%가 메탄의 생성으로 소실되는 결과를 초래하므로 사료 이용 효율과도 깊은 관련이 있다. 이와 같이, 반추동물의 반추위 내에서 메탄이 생성되는 경우 지구 온난화로 인한 환경 문제가 발생하고 사료이용 효율이 감소되기 때문에 이의 생성을 억제하기 위한 여러 가지 방안이 연구되고 있다.

[0005] 반추 동물의 반추위 내 메탄 생성을 억제하기 위한 방법은 크게 두 가지로 나눌 수 있다. 첫 번째 방법은 메탄 생성의 전구물질인 수소의 발생량을 제어하기 위하여 수소를 이용할 수 있는 질산염이나 아질산염과 같은 화합물을 사용하는 것인데, 이 경우 세포에 필요한 산소의 공급이 부족하게 될 염려가 있다. 두 번째 방법은 메탄 생성 미생물에 독성을 주는 화합물인 이오노포어나 항생 물질 등을 사용하는 것인데, 장기간 투여하는 경우 메탄 생성 미생물이 적응을 하여 메탄 생성 억제 효과가 감소한다는 문제점이 있다. 또한, 상기의 방법들은 화합물을 이용하는 것이므로 이러한 물질이 축산물에 잔류하는 경우 안전성에 문제가 될 수 있으며 반추위 내의 유용한 미생물의 성장을 함께 저하시키므로 사료 이용 효율이 저하되고 생산성이 약화되는 문제점이 있으며, 실제로 가축에 급여하여 지속적인 효과를 보이는 메탄 저감방법은 개발되지 않고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) PCT 국제공개특허 WO2007-072848 A1 (2007.06.28 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 이에, 본 발명에서는 칸디다 루고사(*Candida rugosa*) 배양액을 유효성분으로 포함하는 반추동물의 메탄 생성 저감용 사료첨가제 조성물을 제공하는 데에 그 목적이 있다.

[0008] 또한, 본 발명에서는 상기 사료첨가제 조성물을 포함하는 반추동물의 메탄 생성 저감용 사료 조성물을 제공하는 데에 그 목적이 있다.

[0009] 또한, 본 발명에서는 상기 사료 조성물을 반추동물에 급여하는 단계를 포함하는 반추위 내 메탄가스 생성 저감 방법을 제공하는 데에 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 칸디다 루고사(*Candida rugosa*) 배양액을 유효성분으로 포함하는 반추동물의 메탄 생성 저감용 사료첨가제 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 사료첨가제 조성물을 포함하는 반추동물의 메탄 생성 저감용 사료 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 사료 조성물을 반추동물에 급여하는 단계를 포함하는 반추위 내 메탄가스 생성 저감 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명은 칸디다 루고사(*Candida rugosa*) 배양액을 포함하는 반추동물의 메탄 생성 저감용 사료첨가제 조성물에 대한 것으로, 칸디다 루고사(*Candida rugosa*) 첨가에 따른 *in vitro* 시험 결과, pH와 건물소화율은 발효가 진행됨에 따라 부정적인 영향을 보이지 않았으며, 그와 동시에 메탄발생량이 감소된 것으로 나타났다. 상기와 같은 효과를 가지는 칸디다 루고사(*Candida rugosa*) 배양액은 가축의 생장을 촉진하고 사료 효율을 증가시킬 수 있고, 장기간 사용하여도 안전한 합성 첨가제 또는 항생제 대체제로 사용될 수 있으며, 메탄가스 생성을 감소시키는 천연 메탄 저감제로서 사료첨가제로 사용될 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 본 발명은 칸디다 루고사(*Candida rugosa*) 배양액을 유효성분으로 포함하는 반추동물의 메탄 생성 저감용 사료첨가제 조성물을 제공한다.

[0015] 바람직하게는, 상기 칸디다 루고사(*Candida rugosa*) 배양액은 배지에 칸디다 루고사(Candida rugosa)를 30℃에서 32 내지 48시간 동안 배양한 배양액일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0016] 상기 반추동물은 포유류 소목에 속하는 되새김 동물로 소, 염소, 황소, 물소, 들소, 사슴, 낙타, 양 등을 포함하며, 4개의 위를 가진 동물들을 대부분 반추동물이라 부르며, 제 1위가 반추위다. 반추동물 반추위(rumen)라고 불리우는 소화계에서 미생물의 발효를 통해 셀룰로즈(cellulose)를 휘발성 지방산(volatile fatty acid)으로 전환시키고 이것을 영양분으로 이용한다. 즉, 반추위 내에서 탄수화물의 분해를 통하여 휘발성 지방산, 수소, 이산화탄소 등이 생성되며, 상기 수소와 이산화탄소는 반추위 산도 하강의 원인이 된다. 상기 수소와 이산화탄소는 메탄으로 전환되어 소실된다.

[0017] 바람직하게는, 상기 반추동물은 소, 염소, 양, 사슴, 낙타 및 기린으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0018] 본 발명의 사료첨가제 조성물은 단독으로 가축에게 급여할 수도 있지만, 일반 사료에 첨가, 혼합하여 가축에게 급여할 수 있다. 예를 들면, 소, 양, 염소 등의 반추 동물은 제1위가 형성될 때까지는 모유 또는 대용유와 고형

사료가 병행 급여되며, 이유와 동시에 고형 사료로 완전히 바뀔 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 따라서 본 발명의 사료첨가제 조성물은 이들 중 어느 사료에 첨가해도 사료 요구율 및 증체 효율을 개선시킬 수 있다.

[0019] 또한, 본 발명은 상기 사료첨가제 조성물을 포함하는 반추동물의 메탄 생성 저감용 사료 조성물을 제공한다.

[0020] 본 발명의 사료 조성물은 가루 및 펠릿과 같은 종래의 사료 조성물의 형태로 제조될 수 있으나, 이에 제한되지 않고, 당업계에 알려진 다양한 형태의 사료로 제조가 가능하다. 상기 사료 조성물에는 탄수화물, 단백질, 지방, 무기질, 비타민, 광물질 및 물과 같은 사료에 통상적으로 첨가되는 성분들이 포함될 수 있다. 이러한 각 성분의 종류에 있어서 특별히 제한되는 바가 없으며, 당 분야에서 통상적으로 사용되는 것은 모두 사용 가능하다.

[0021] 또한, 본 발명은 상기 사료 조성물을 반추동물에 급여하는 단계를 포함하는 반추위 내 메탄가스 생성 저감 방법을 제공한다.

[0022] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0023] **<실험예>**

[0024] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

[0025] **1. *Candida rugosa* 효모 분양 및 배양**

[0026] 본 발명에 사용된 *Candida rugosa* 효모는 한국생명공학연구원 생물자원센터 [Korean Collection for Type Cultures (KCTC) No. KCTC 27369]에서 분양받았다. 분양 받은 효모는 50 mL yeast culture media [YM broth (Difco™]에 분주 후 30℃ incubator에서 약 48시간 배양 하여 *in vitro* 시험에 사용하였다. 반추동물을 이용한 연구에 널리 사용되고 있는 *Saccharomyces cerevisiae*와 *Pichia kudriavzevii*는 실험실에서 보관 중인 배지(media)를 이용하였으며, 배양 조건은 위와 동일하다.

[0027] **2. 공시축 및 반추위액 채취**

[0028] 공시축의 사양관리 및 연구절차는 경상국립대학교 동물실험윤리위원회의 심의를 거쳐 사전 승인되었다(승인번호: GNU-180130-A0007). 경상국립대학교 부설동물사육장(경남 진주시)에서 반추위에 cannula가 장착된 한우 암소 2두(체중: 450 ± 30 kg)로부터 *in vitro* 반추위 발효 시험을 위한 시험용 반추위액을 채취하였다. 공시축의 사료 급여는 timothy와 농후사료(조단백질 12%, 조지방 1.5%, 조섬유 15%, 조회분 12%, 칼슘 0.75%, 인 0.90%, 가소화 영양분 총량 69% 건물기준) 비율을 60:40 (w/w)로 하여 체중의 2%를 1일 2회(09:00 및 17:30) 분할 급여하였고, 물과 미네랄 블록은 자유섭취토록 하였다. 시험용 반추위액은 오전 사료 급여 전에 채취하였고, 4겹의 cheese cloth에 걸러서 보온 용기에 담아 실험실로 운반하였다. 잔여 사료 입자 제거를 위해 cheese cloth로 다시 걸러낸 반추위액과 McDougall's buffer를 1:2의 비율로 혼합한 배양액을 39℃에서 혐기상태(O_2-free N_2)로 유지시켜 실험을 위한 배양액으로 사용하였다.

[0029] **3. *In vitro* 시험**

[0030] 기질로 사용된 timothy와 농후사료는 1 mm screen이 장착된 wiley mill로 분쇄하여 사용하였다. *In vitro* 시험은 nylon bag에 기질 timothy 0.2g과 농후사료 0.1g, 그리고 배양액 대비 5% *Saccharomyces cerevisiae, Pichia kudriavzevii* 및 *Candida rugosa media*를 각각 담아 준비하였다. 배양액은 50 mL serum bottle에 준비된 혼합배양액 20 mL를 분주하고 혐기 유지를 위해 O_2-free N_2 가스를 이용하였다. 배양은 39℃ shaking incubator에서 발효시간을 6, 12 및 24시간으로 설정하여 매 시간마다 샘플링하여 분석을 진행하였다. 또한, 각 처리당 (대조구, *Saccharomyces cerevisiae, Pichia kudriavzevii* 및 *Candida rugosa*) 4반복으로 총 48개의 serum bottle이 사용되었다.

[0031] **4. 조사항목 및 분석방법**

[0032] (1) pH 및 건물 소화율

[0033] pH 측정은 각 발효 시간대별 배양액을 pH meter (S210 SevenCompact, Mettler-Toledo, Greifensee, Switzerlant)를 이용하여 측정하였다.

[0034] 건물 소화율은 nylon bag을 수거하여 물을 채운 수조에 넣고 Heidolphs Rotamax 120 (Hei-dolph Instrument,

Germany)을 이용하여 100 rpm에서 20분간 3회 세척 후, 65℃의 dry oven에서 24시간 건조 후 건물 잔량을 측정하였다. 기질의 건조 전과 건조 후의 차를 구하고 백분율로 환산하여 계산하였다.

[0035] (2) 총 가스, 메탄 및 이산화탄소 발생량

[0036] 총 가스 발생량은 Theodorou 등(1994)의 방법으로 serum bottle의 head space에 있는 가스 발생량을 detachable pressure transducer 및 digital read-out voltmeter (Laurel Electronics, Inc., CA, USA)를 사용하여 측정하고, 그 후 6 mL vacutainer에 가스를 포집하여 gas chromatography (GC; HP 5890 Gas Chromatography, USA)를 사용하여 메탄 및 이산화탄소 발생량을 측정하였다.

[0037] **5. 통계처리**

[0038] 통계처리는 SAS package program (2002)의 General Linear Model (GLM) procedure에 따라 처리하였으며, 각 처리구간 유의성 검증을 위해 Duncan's multiple range test (Duncan, 1955)를 실시하였다. P 값이 < 0.05는 유의차가 있는 것으로 간주하였고, 0.05 ≤ P < 0.1은 경향이 있는 것으로 간주 하였다.

[0039] **<실시예 1> 반추위 pH와 건물소화율**

[0040] *Candida rugosa* 첨가에 따른 pH 측정 결과는 표 1과 같다. 전체적인 pH의 범위는 5.92 ~ 6.82의 범위로 반추위 미생물 활동에 부정적인 영향을 주지 않는 범위로 확인되었다. 또한 발효 24시간대 *Candida rugosa* 첨가구에서 대조구에 비해 유의적 (P < 0.05)으로 감소하는 것을 확인하였다. 표 2는 건물소화율 결과로, 발효 6시간대에 *Candida rugosa* 첨가구에서 대조구에 비해 유의적으로 증가하는 경향을 보였으며 (P = 0.0564) 나머지 발효시간대에서는 유의적 차이를 보이지 않았다.

표 1

[0041]

Incubation time (h)	Con	TRT[1)]			SEM[2)]	P
		S	P	C		
6	6.73	6.71	6.76	6.82	0.03	0.1859
12	6.39^{a}	6.30^{b}	6.33^{ab}	6.33^{ab}	0.02	0.0973
24	6.03^{a}	5.99^{ab}	5.98^{ab}	5.92^{b}	0.03	0.0158

[0042] [1)]S, *Saccharomyces cerevisiae*; P, *Pichia kudriavzevii*; C, *Candida rugosa*

[0043] [2)]SEM, standard error of the mean

[0044] [ab]Means in the same row at same temperature with different superscripts differ significantly (p<0.05).

표 2

[0045]

Incubation time (h)	Con	TRT[1)]			SEM[2)]	P
		S	P	C		
6	24.13^{b}	23.90^{b}	23.10^{b}	27.10^{a}	0.89	0.0564
12	41.00	42.43	40.33	41.87	1.23	0.6522
24	51.87	51.00	51.53	53.67	1.05	0.3632

[0046] [1)]S, *Saccharomyces cerevisiae*; P, *Pichia kudriavzevii*; C, *Candida rugosa*

[0047] [2)]SEM, standard error of the mean

[0048] [ab]Means in the same row at same temperature with different superscripts differ significantly (p<0.05).

[0049] **<실시예 2> 총 가스, 메탄 및 이산화탄소 발생량**

[0050] *Candida rugosa* 첨가에 따른 가스 발생량 분석 결과는 표 3과 같다. 총 가스 발생량은 발효 12시간대 *Candida*

rugosa 첨가구에서 대조구에 비해 유의적 (P < 0.05)으로 증가 하였으며, 나머지 발효시간대에서는 유의적 차이를 보이지 않았다. 메탄 발생량은 발효 6시간대 *Candida rugosa* 첨가구에서 대조구에 비해 유의적 (P < 0.05)으로 증가하였지만 발효 12시간대에서는 유의적(P < 0.05)으로 감소하였다. 발효 24시간대에서는 수치적으로 감소하는 경향을 보였으나 유의적 차이를 보이지 않았다. 총 가스 대비 메탄 발생량 결과 또한 유사하게 나타났다. 이산화탄소 발생량은 발효 12시간대 *Candida rugosa* 첨가구에서 대조구에 비해 수치적으로 감소하는 경향을 보였으나 유의적 차이를 보이지 않았다.

표 3

[0051]

Incubation time (h)	Con	TRT[1)]			SEM[2)]	P
		S	P	C		
Total gas (mL)						
6	25.43	26.10	26.47	26.33	0.39	0.3207
12	36.90[b]	41.67[a]	40.40[a]	39.43[a]	0.74	0.0107
24	50.27	50.73	49.90	50.23	0.65	0.8372
Methane (mL)						
6	2.62[b]	3.58[a]	3.35[a]	3.59[a]	0.18	0.0181
12	6.41[a]	6.94[a]	7.48[a]	4.82[b]	0.33	0.0024
24	12.14[ab]	11.76[ab]	12.45[a]	10.69[b]	0.47	0.1182
Methane (% of total gas)						
6	4.73[b]	6.39[a]	5.92[a]	6.36[a]	0.31	0.0172
12	9.58[a]	9.68[a]	10.63[a]	6.97[b]	0.53	0.0065
24	15.13[ab]	14.58[ab]	15.59[a]	13.32[b]	0.62	0.1345
Carbon dioxide (mL)						
6	13.39[b]	15.89[a]	15.40[a]	15.62[a]	0.55	0.0428
12	21.27[ab]	21.19[ab]	24.04[a]	20.05[b]	1.10	0.1446
24	31.38	27.17	32.99	28.72	2.89	0.5193
Carbon dioxide (% of total gas)						
6	24.17[b]	28.37[a]	27.23[a]	27.73[a]	0.92	0.0483
12	31.80	29.57	34.17	29.00	1.75	0.224
24	39.13	33.70	41.27	35.80	3.65	0.5021

[0052] [1)]S, *Saccharomyces cerevisiae*; P, *Pichia kudriavzevii*; C, *Candida rugosa*

[0053] [2)]SEM, standard error of the mean

[0054] [ab]Means in the same row at same temperature with different superscripts differ significantly (p<0.05).

[0055] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.