(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0112065
(43) 공개일자 2015년10월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23K 1/165 (2006.01) *A23K 1/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0035084
(22) 출원일자 2014년03월26일
심사청구일자 2014년03월26일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
김영준
서울 서초구 효령로77길 20, 1107호 (서초동, 현대이에스에이아파트)
허완
세종특별자치시 조치원읍 섭골길 45-4
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인다나

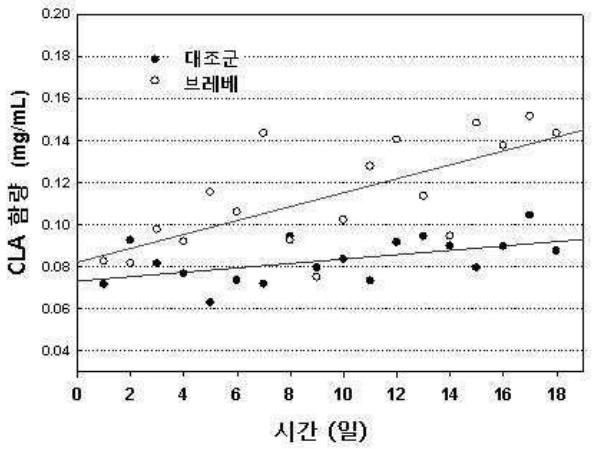
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 **비피도박테리움 브레베 ＬＭＣ５２０을 포함하는 사료 첨가제 조성물**

(57) 요 약

본 출원은 비피도박테리움 브레베 LMC520을 포함하는 젖소의 우유 내 CLA 함량 증진용 사료 첨가제 조성물에 관한 것이다. 본 출원의 사료 첨가제 조성물을 포함하는 사료를 젖소에게 급여함으로써 젖소의 생리활성을 증진시키고 CLA 함량이 증진된 우유를 제조할 수 있다.

대 표 도 - 도2



(72) 발명자

김태균

세종특별자치시 조치원읍 충현로 159 옥일아파트 108동 1606호

김미정

서울특별시 강북구 삼양로19길 113 삼각산아이원아파트 114-2001

판정훈

세종특별자치시 조치원읍 섭골길 45-4

김준호

충청남도 연기군 조치원읍 서창리 고려대학교서창캠퍼스 과학기술대학 517호

조형택

강원 홍천군 서면 노일로 478

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2013010824
부처명	교육과학기술부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	일반연구자지원사업
연구과제명	[1차년도] 기능성 공액지방산 생합성 및 강화
기 여 율	1/1
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2013.06.01 ~ 2014.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

비피도박테리움 브레베 LMC520을 포함하는 젖소의 우유 내 CLA 함량 증진용 사료 첨가제 조성물.

청구항 2

제1항의 사료 첨가제 조성물을 포함하는 사료.

청구항 3

제2항에 있어서,

제1항의 사료 첨가제 조성물은 전체 사료 중량대비 0.1 내지 10 중량%로 함유되는 사료.

청구항 4

제2항 또는 제3항의 사료를 젖소에게 급여하는 것을 포함하는 젖소의 우유 내 CLA 함량 증진 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 출원은 비피도박테리움 브레베 LMC520을 포함하는 젖소의 우유 내 CLA 함량 증진용 사료 첨가제 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 우유 중의 기능성 물질의 강화는 가공과정에서 기능성 물질의 단순한 첨가에 의하여 이루어져 왔다. 그러나 정제된 기능성 물질의 단순 첨가는 소비자의 기호도에 별다른 영향을 줄 수 없으며, 식품의 안전성 및 기능성 물질의 안정성 면에서도 불완전할 수 있다는 단점이 있다. 이를 보완하기 위한 방법으로 젖소에게 기능성 물질을 섭취시킴으로써 우유 중의 기능성 물질의 함량을 높이고 젖소의 생리활성을 증진시키는 방법이 개발되고 있다.

[0003] CLA(공액 리놀렌산; Conjugated Linoleic Acid)는 1987년 미국의 위스컨신 대학의 연구팀에 의해 발견된 후 항암, 항비만, 운동능력 증진 등 다양한 기능성이 여러 차례 보고되었으며 한국 식품 의약품 안전처의 개별인정형 소재이자 미국 FDA로부터 안정성이 검증된 세계적인 기능성 소재이다.

[0004] 가공 옥수수, 밀, 옥가공 부산물, 탈지강, 대두피, 루핀피, 밀가루, 소맥피, 식물성 박류, 석회석, 탈불 인산, 소금, 당밀, 광물질 첨가제, 비타민 첨가제에 식물성 유지 원료인 열처리 전지 대두를 단독으로 또는 열처리 전지 대두 및 아마인유를 혼합하여 첨가한 후 전체사료를 고온에서 단시간 열처리하여 제조한 사료를 젖소에게 급여하여 우유 내에 CLA 함량을 높이는 방법이 개시되어 있다(특허문헌 1; KR 2001-0063661호).

[0005] 한편, 젖산균인 비피도박테리움 브레베 LMC520(Bifidobacterium breve LMC520)은 장내 미생물 중 하나로 리놀렌산을 기질로 활용하여 CLA를 생산할 수 있는 능력이 있는 것으로 보고되었으며, 본 출원자들은 해당 균주를 이용하여 CLA를 효율적으로 생산하는 방법에 관하여 특허를 출원하여 등록을 받은 받 있다(특허문헌 2: KR 1233805호).

[0006] 현재까지, 비피도박테리움 브레베 LMC520을 포함하는 사료, 및 이를 젖소에게 급여함으로써 우유 중의 CLA 함량을 증진시키는 방법에 대하여는 알려진 바 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 특허 출원 제2001-0063661호

(특허문헌 0002) 대한민국 특허 등록 제1233805호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 출원은 우유 중의 CLA 함량을 증진시킬 수 있는 사료 첨가제 조성물을 제공하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 출원은 비피도박테리움 브레베 LMC520을 포함하는 젖소의 우유 내 CLA 함량 증진용 사료 첨가제 조성물을 제공한다.

[0010] 본 출원은 또한, 상기 사료 첨가제 조성물을 포함하는 사료를 제공한다.

[0011] 본 출원은 또한, 비피도박테리움 브레베 LMC520을 포함하는 사료를 젖소에게 급여하는 것을 포함하는 젖소의 우유 내 CLA 함량 증진 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 출원의 비피도박테리움 브레베 LMC520을 포함하는 사료 첨가제 조성물을 포함하는 사료를 젖소에게 급여함으로써 젖소의 생리활성을 증진시키고 CLA 함량이 증진된 우유를 제조할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 비피도박테리움 브레베 LMC520을 포함하는 사료를 급여한 젖소의 생리활성 증진 효과를 보여준다.

도 2는 비피도박테리움 브레베 LMC520을 포함하는 사료를 급여한 젖소로부터 착유한 우유 내 CLA 함량 증진 효과를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 본 출원은 비피도박테리움 브레베 LMC520을 포함하는 젖소의 우유 내 CLA 함량 증진용 사료 첨가제 조성물, 상기 사료 첨가제 조성물을 포함하는 사료 및 상기 사료를 젖소에게 급여하는 것을 포함하는 젖소의 우유 내 CLA 함량 증진 방법을 제공한다.

[0015] CLA 생산능을 갖는 미생물은 여러 종류가 알려져 있지만, 그 중에서도 비피도박테리움 브레베 LMC520을 젖소의 사료 첨가제로 이용하는 경우, 상기 젖소로부터 착유한 우유 내 CLA 함량을 현저히 높일 수 있다. 비피도박테리움 브레베 LMC520는 젖소가 섭취하는 사료에 함유되어있는 리놀렌산(linoleic acid)를 이용해 CLA로 전화시켜 우유 내 CLA 함량을 증진시킬 수 있다.

[0016] 리놀렌산을 포함하는 기초사료에 비피도박테리움 브레베 LMC520을 혼합하여 비피도박테리움 브레베 LMC520을 포함하는 사료를 제조할 수 있다 (제조예 1). 기초사료는 젖소의 성장 및 우유 생산에 필요한 영양공급을 위해 기본적으로 제공되는 사료를 의미하며, 본 출원에서 리놀렌산을 포함하는 사료이면 특별히 제한되지 않는다. 젖소에게 급여되는 기초사료의 종류는 본 출원이 속한 기술 분야에 잘 알려져 있다. 제조된 비피도박테리움 브레베 LMC520을 포함하는 사료를 젖소에 급여한 결과, 비피도박테리움 브레베 LMC520을 섭취한 젖소의 우유 내 CLA 함량이 현저히 높음을 알 수 있었다 (실시예 2; 도 2).

[0017] 이뿐만 아니라, 비피도박테리움 브레베 LMC520은 젖소의 장내에 점착되어, 정장작용을 나타냄으로써 젖소의 생리활성을 증진시킬 수 있다. 상기 사료를 급여한 젖소의 분변 시료를 채취하여, 시료 내 비피도박테리움 브레베 LMC520의 mRNA 발현 수준을 측정하였다. 그 결과, 비피도박테리움 브레베 LMC520을 급여한 소의 시료에서 비피도박테리움 브레베 LMC520의 mRNA 발현 수준이 현저히 향상됨을 알 수 있었다 (실시예 1; 도 1). 이는, 비피도박테리움 브레베 LMC520이 젖소의 장 내에 점착하여, 유산균으로써 정장작용을 발휘할 수 있음을 제시하는 결과이다.

[0018] *한 구체예에서, 비피도박테리움 브레베 LMC520을 포함하는 사료 첨가제 조성물은 전체 사료 중량대비 0.1 내지

10 중량%, 0.3 내지 7 중량%, 0.5 내지 5 중량%, 0.7 내지 3 중량% 또는 0.8 내지 2 중량%로 함유될 수 있다. 기초사료에 배합되는 비피도박테리움 브레베 LMC520의 양은 특별히 제한되는 것은 아니나, 상기의 범위에서, 효율적으로 우유 내 CLA 함량을 향상시킬 수 있다.

[0019] 본 출원의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 출원은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 출원의 개시가 완전하도록 하고, 본 출원이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 출원은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0020] **[실시예]**

[0021] **[제조예 1] 비피도박테리움 브레베 LMC520을 포함하는 사료의 제조**

[0022] 동결건조된 비피도박테리움 브레베 LMC520 (기탁번호: KCTC 10455BP)균주를 CO_2로 치환된 혐기상태의 20 mL 시험관에서 37℃, 18 시간 동안 0.05% L-시스테인이 함유된 MRS배지 (w/v)에서 2차에 걸쳐 배양시켜 활성화를 시켰다. 활성화된 비피도박테리움 브레베 LMC520을 새 배지가 함유된 대량 배양기에 접종시켜 37℃, 24 시간 배양시켜 균주를 얻었다.

[0023] 일일 섭취량의 기초사료에 일일 섭취량의 1% (CFU = 2.4 x 10^7)에 해당하는 균주를 배합하여 비피도박테리움 브레베 LMC520이 포함된 사료를 제조하였다.

[0024] **[실시예 1] 비피도박테리움 브레베 LMC520의 젖소 생리활성 증진 효과 확**인

[0025] 비피도박테리움 브레베 LMC520을 포함하는 사료를 급여한 젖소의 생리활성이 증진되는지 알아보고자, 비피도박테리움 브레베 LMC520의 장내 점착성 실험을 수행하였다. 비피도박테리움 브레베 LMC520은 유산균으로써 장내에 점착하는 경우, 정장작용을 나타낼 수 있다.

[0026] 실험에 사용된 젖소는 평균 7.1(±2.1) 년 된 홀스테인을 사용하였으며 몸무게는 평균 654(±48.7) kg을 사용하였다. 비피도박테리움 브레베 LMC520을 포함하는 사료를 급여한 젖소의 분변시료를 실험군으로 하고, 비피도박테리움 브레베 LMC520이 포함되지 않은 사료를 급여한 젖소의 분변 시료를 대조군으로 하여, 장내 비피도박테리움 브레베 LMC520의 mRNA 발현 수준을 알아보았다.

[0027] QIAamp DNA 스툴 키트 (QIAgen, Duesseldorf, Germany)를 이용하여 액체질소로 동결 파쇄한 건조중량 1 g의 분변 시료로부터 DNA를 추출하였다. 추출된 박테리아 DNA 의 200 mL 을 분리하여 20℃에 저장하였다.

[0028] 추출한 DNA는 하기 표 1에 기재된 비피도박테리움 브레베 LMC520에 적합한 프라이머와 함께 qPCR에 이용되었다.

표 1

[0029]

타겟	프라이머 서열 (5'→3')	사이즈 (bp)	애닐링 온도 (℃)
B. breve	*F: GTG GTG GCT TGA GAA CTG GAT AG* *R: CAA AAC GAT CGA AAC AAA CAC TAA A*	*118*	*59* *58*

[0030] 각각의 반응은 DNA 2 uL, 프라이머 (10 pmol/L), 파워 SYBR 그린 마스터 믹스(Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) 10 uL 와 뉴클레아제 프리 DW(nuclease free DW) 6 uL 를 혼합하여, 총 20 uL 의 부피에서 반응시켰다. qPCR 실험은 ABI7500 시스템을 이용하여 다음과 같은 조건에서 진행되었다; 50℃ 에서 2분, 94℃에서 2 분간 반응 후, 94℃ 에서 30 초, 60℃ 에서 30초를 45 사이클을 반복하였다. 그리고 나서 72℃ 에서 1 분간 반응시켰다. 모든 시료를 모든 박테리아로 노멀라이즈하였으며, 각각의 유전자 ΔCt와 ΔΔCt 값을 이용하여 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 값으로 계산하였다.

[0031] 그 결과, 도 1에 도시한 바와 같이, 비피도박테리움 브레베 LMC520을 포함한 사료를 급여한 젖소의 분변 시료에서 비피도박테리움 브레베 LMC520의 mRNA 발현 수준이 증가함을 알 수 있었다. 이로부터 비피도박테리움 브레베

LMC520이 젖소의 장내에 점착하여, 정장작용을 나타냄을 알 수 있다.

[0032] **[실시예 2] 비피도박테리움 브레베 LMC520 섭취에 따른 우유 내 CLA 함량**

[0033] 비피도박테리움 브레베 LMS520을 급여한 젖소의 우유 내 CLA 함량이 증진되는지 확인하였다.

[0034] 비피도박테리움 브레베 LMC520을 포함하는 사료를 급여한 젖소로부터 착유한 우유를 실험군으로 하고, 비피도박테리움 브레베 LMC520이 포함되지 않은 사료를 급여한 젖소로부터 착유한 우유를 대조군으로 하여, 우유 내 비피도박테리움 브레베 LMC520의 양을 측정하였다.

[0035] 실험에 사용된 젖소는 평균 7.1(±2.1) 년 된 홀스테인을 사용하였으며 몸무게는 평균 654(±48.7) kg을 사용하였다. 균주의 섭취 여부에 따라 2 그룹으로 각 4 마리씩 완전임의배치법으로 나누었으며, 균주 섭취 그룹의 경우 기초사료 섭취량의 1% (CFU = 2.4 x 10^7)를 급여하며 18일간 진행하였다. 사료는 착유 시 급여하였으며, 착유한 우유는 즉시 영하 70℃ 에 보관하였다.

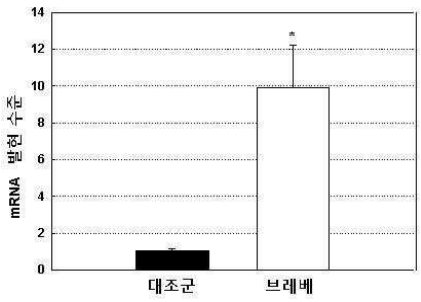
[0036] 우유 내 CLA 함량은 메틸화를 통한 지방산 분석방법을 통해 분석되었다. 내부표준물질은 탄소 수 17개에 이중결합이 없는 합성된 지방산을 이용하였으며, 지질 추출용매로는 헥산/이소프로파놀 (3:2 v/v)을 이용하였고, 톨루엔과 5% KOH-MeOH 그리고 14% BF_3-MeOH을 이용하여 메틸화하였다.

[0037] GC(Gas chromatograph)는 HP7890에 불꽃 이온화 검출기 (Hewlett Packard 7890 Series Ⅱ, Paloalto, CA, USA)를 사용하였으며 컬럼은 Supelcowax-10 fused silica capillary column (100 m x 0.32 mm i.d., 0.25 um film thichness; Supelco, Inc., Bellefonte, PA, USA)를 이용하였다. 이동상으로 사용된 헬륨은 1.2 mL/min의 속도로 공급하였으며 시료 주입기 및 검출기의 온도는 260℃, 오븐은 분당 4℃씩 190℃ 에서 240℃까지 승온시켰다.

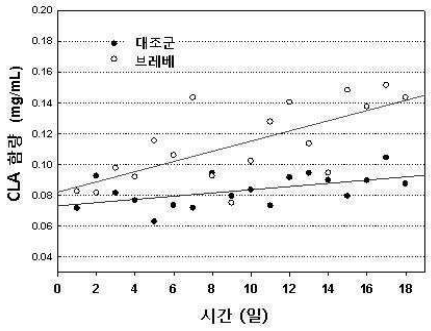
[0038] GC 결과, 도 2에 도시한 바와 같이, 대조군에 비하여 비피도박테리움 브레베 LMC520을 포함하는 사료를 급여한 젖소의 우유에서 CLA 함량이 현저히 향상됨을 알 수 있었다.

도면

도면1



도면2


대조군
브레베
CLA 함량 (mg/mL)
시간 (일)
0.20
0.18
0.16
0.14
0.12
0.10
0.08
0.06
0.04
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18