



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년08월09일
(11) 등록번호 10-1766860
(24) 등록일자 2017년08월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 9/013 (2006.01) A23K 1/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61L 9/013 (2013.01)
A23K 10/16 (2016.05)
(21) 출원번호 10-2015-0172961
(22) 출원일자 2015년12월07일
심사청구일자 2015년12월07일
(65) 공개번호 10-2017-0066825
(43) 공개일자 2017년06월15일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020090073264 A*
KR101260872 B1*
KR101296613 B1
KR101029346 B1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
(주)라이스텍
경기도 안성시 서운면 제3공단1길 100
(72) 발명자
정종성
경기도 용인시 기흥구 구성로 44-10, 103동 601호
(마북동, 용화마을태영데시앙(아))
김완섭
강원도 원주시 현충로58번길 21, 101동 1301호(태장동, 흥화브라운빌)
(74) 대리인
특허법인(유)화우

전체 청구항 수 : 총 5 항

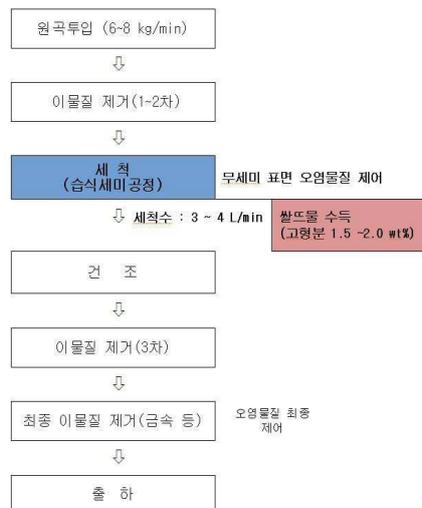
심사관 : 김상우

(54) 발명의 명칭 **쌀뜨물을 이용한 축산 생균제의 제조 방법**

(57) 요약

본 발명은, 쌀의 세척수인 쌀뜨물을 이용하여 유산균을 배양 혹은 박효시켜 항균성능 또는 약취 제거 성능이 우수한 생균제 및/또는 약취 저감제를 제공하는 방법 및 이러한 방법으로 제조된 생균제 및/또는 약취 저감제에 관한 것으로, 백미에 세척수를 사용한 세미 과정을 통해 고형물 농도가 1.5 ~ 2.0 wt%인 쌀뜨물을 준비하는 단계; 상기 쌀뜨물에 사전 배양된 유산균주와 당밀을 각각 1wt% 및 2wt% 첨가하여 1차 발효를 수행하는 단계; 1차 발효액을 원심분리하여 상등액을 분리하는 단계; 분리된 상등액을 여과하는 단계; 성온에서 10일간 숙성하는 2차 발효를 수행하는 단계; 및 여과 단계를 거쳐 제조되는 것을 특징으로 하며, 농가에 친환경 생균제를 공급하고 축산분뇨 약취를 효과적으로 감소시키며, 환경 오염원으로 작용할 수 있는 쌀뜨물을 효과적으로 활용할 수 있는 수단을 제공하고자 한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61L 2209/21 (2013.01)

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

축산 생균제의 제조 방법에 있어서,

백미에 세척수를 사용한 세미 과정을 통해 고형물 농도가 1.5 ~ 2.0 wt%인 쌀뜨물을 준비하는 단계;

준비된 쌀뜨물을 70 ~ 125 °C의 온도 범위에서 20 ~ 30 분간 전처리하여 살균 또는 멸균하는 단계;

상기 쌀뜨물에 사전 배양된 유산균주인 *Lactobacillus sakei*와 당밀을 각각 1wt% 및 2wt% 첨가하여 pH = 5.0 ~ 6.0의 범위에서 1차 발효를 수행하는 단계;

1차 발효액을 원심분리하여 상등액을 분리하는 단계;

분리된 상등액을 여과하는 단계;

상온에서 10일 동안 숙성하는 2차 발효를 수행하는 단계; 및

여과 단계;를 포함하고,

상기 세미 과정은, 백미를 6 ~ 8 kg/min로 스크류 타입의 세척기에 공급하고, 세척수를 3 ~ 4 liter/min의 유량으로 공급하며, 스크류는 900 rpm의 속도로 회전하여 10 ~ 20 초 동안 수행되며,

상기 1차 발효 후, 적어도 12일 이내에 후속 과정들이 수행되는 것을 특징으로 하는, 쌀뜨물을 이용한 축산 생균제의 제조 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 1차 발효는 30 ~ 35 °C의 범위에서 72시간 수행되는 것을 특징으로 하는, 쌀뜨물을 이용한 축산 생균제의 제조 방법.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 원심분리는 1 ~ 5 °C의 온도에서 3,000 ~ 5,000 rpm의 속도로 10 ~ 30분 동안 수행되는 것을 특징으로 하는, 쌀뜨물을 이용한 축산 생균제의 제조 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 여과 단계는 0.2 ~ 0.3 μm의 필터를 사용하여 수행되는 것을 특징으로 하는, 쌀뜨물을 이용한 축산 생균제의 제조 방법.

청구항 9

제1항, 제3항, 제7항 및 제8항 중 어느 한 항에 기재된 방법으로 제조되고, 당도가 2.5 ~ 3.0 Brix이고, pH가 5.0 ~ 5.5인, 쌀뜨물을 이용한 축산 생균제.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은, 쌀의 세척수인 쌀뜨물을 이용하여 유산균을 배양 혹은 박효시켜 항균성능 또는 악취 제거 성능이 우수한 생균제 및/또는 악취 저감제를 제공하는 방법 및 이러한 방법으로 제조된 생균제 및/또는 악취 저감제에 관한 것으로, 농가에 친환경 생균제를 공급하고 축산분뇨 악취를 효과적으로 감소시키며, 환경 오염원으로 작용할 수 있는 쌀뜨물을 효과적으로 활용할 수 있는 수단을 제공하고자 한다.

배경 기술

[0002] 쌀을 포함한 대부분의 곡류는 통상적으로 최종 소비가 이루어지기 전에 미감 또는 유해 미생물의 제거 및 식미의 향상, 보존성 증대 등의 목적으로 세정 과정을 거치게 된다.

[0003] 이러한 식품산업에서의 곡류의 2차 가공이나 대형급식시설에서의 대량으로 발생하는 쌀뜨물은 폐수처리에 따른 막대한 비용을 발생시키며, 적절한 처리 없이 방류될 경우에 하천과 소호에 부영양화를 야기하여 극심한 환경오염을 유발하게된다.

[0004] 하지만, 이러한 쌀뜨물을 포함한 곡류의 세정 부산물은 그 풍부한 영양적 특성 등으로 인해 쉽게 부패균에 의해 변패되어 효용성을 갖기 어려운 문제점이 존재한다. 등록특허 제0373499호는 이러한 쌀뜨물의 효용성을 극대화하기 위하여 액비 형태의 비료로 활용하는 기술을 제시하고 있다.

[0005] 한편, 축산업에서 최근 항생제는 여러 가지 문제점이 대두되어 사용이 제한되고 있으며, 친환경축 산물 생산을 위하여 천연자원을 활용한 생균제의 개발이 진행되고 있다. 특히 양계산업에서는 기능성 소재로서 다양한 천연 생리활성물질과 생균제제들이 주목받고 있다. 이러한 생균제는 장내의 미생물 군집의 균형에 도움을 주는 미생물이 생산한 대사산물을 포함하며, 가축에게 건조세포나 발효산물의 형태로 투여되어 장내 유해 미생물을 감소시키고 장내 균 총을 개선해주는 유익한 작용을 하는 살아있는 미생물 첨가제를 포괄하고 있다.

[0006] 특히, 가축 사료용 사업체는 현재 약 180여 곳으로 연간 약 500억 규모로 큰 비중을 차지하고 있으며, 생균제의 종류와 수는 해마다 증가하고 있다. 소비자의 고품질 축산물에 대한 요구의 증가와 가축 사료 내 항생제 사용의 전면 금지에 대한 문제를 해결하기 위하여, 본 발명에서는 생균제 기술 분야에 쌀뜨물을 활용하는 방법을 연구하였다.

[0007] 현재 사료용에 많이 이용되고 있는 첨가용 생균제는 *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobaum lingum*, *Bacillus subtilis* 등을 들 수 있으며, 특히 양계사료에 생균제의 사용은 배설한 분내의 유해균을 감소시키고 유익균인 유산균을 증가시키는 효과가 있을 것으로 예상되며, 동시에 분내 유해가스인 암모니아와 황화수소 가스발생을 줄여 축사의 환경개선에 의한 가축의 생산성에 도움이 될 것으로 예상된다.

[0008] 이러한 보조사료제 및 분뇨처리제로제로서의 양계 분야에서 쌀뜨물을 이용한 생균제의 생산 및 사용은 친환경 및 유기축산 경영의 토대를 제시할 수 있으며 생균제 첨가에 의한 지속적인 계사환경 관리는 양계농가의 소득향상에도 기여할 수 있을 것으로 판단된다..

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 등록특허 제0373499호 (2003.02.11. 등록공고)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은, 쌀의 세척수인 쌀뜨물을 이용하여 항균성능 또는 악취 제거 성능이 우수한 생균제 및/또는 악취 저감제를 제공하는 것을 목적으로 하고 있으며, 이러한 생균제 및/또는 악취 저감제를 사용하여 농가에 친환경 생균제를 공급하고 축산분뇨 악취를 효과적으로 감소시키고자 한다.

[0011] 또한, 환경 오염원으로 작용할 수 있는 쌀뜨물을 효과적으로 활용할 수 있는 수단을 제공함으로써, 무세미 제조 과정 중에서 발생되어 환경 오염물질로 작용할 수 있는 쌀뜨물을 효과적으로 재활용하는 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명의 일 실시예에 따른 쌀뜨물을 이용한 유산균 발효 생균제 또는 악취 저감제의 제조 방법은, 백미에 세척수를 사용한 세미 과정을 통해 고형물 농도가 1.5 ~ 2.0 wt%인 쌀뜨물을 준비하는 단계; 상기 쌀뜨물에 사전 배양된 유산균주와 당밀을 각각 1wt% 및 2wt% 첨가하여 1차 발효를 수행하는 단계; 1차 발효액을 원심분리하여 상등액을 분리하는 단계; 분리된 상등액을 여과하는 단계; 성온에서 10일간 숙성하는 2차 발효를 수행하는 단계; 및 여과 단계를 거쳐 제조되는 것을 특징으로 한다.

[0013] 상기 1차 발효 전에, 준비된 쌀뜨물을 70 ~ 125 °C의 온도 범위에서 20 ~ 30 분간 전처리하여 살균 또는 멸균하는 단계가 수행되는 것이 바람직하고, 상기 1차 발효는 30 ~ 35 °C의 범위에서 72시간 동안, pH = 5.0 ~ 6.0의 범위에서 수행되는 것이 더욱 바람직하다.

[0014] 본 발명에서 사용되는 쌀뜨물을 준비하기 위한 세미 과정은, 백미를 6 ~ 8 kg/min로 스크류 타입의 세척기에 공급하고, 세척수를 3 ~ 4 liter/min의 유량으로 공급하며, 스크류는 900 rpm의 속도로 회전하여 10 ~ 20 초 동안 수행되는 것이 바람직하다.

[0015] 또한, 상기 제1 발효에서 사용되는 유산균주는, 특별히 한정되지는 아니하지만, *Lactobacillus sakei* 또는 *Lactobacillus plantarum*인 것이 바람직하다.

[0016] 상기 원심분리는 1 ~ 5 °C의 온도에서 3,000 ~ 5,000 rpm의 속도로 10 ~ 30분 동안 수행될 수 있고, 상기 여과 단계는 0.2 ~ 0.3 μm의 필터를 사용하여 수행될 수 있다.

[0017] 본 발명의 다른 실시 형태로 이러한 방법으로 제조되고, 당도가 2.5 ~ 3.0 Brix이고, pH는 5.0 ~ 5.5의 범위인 유산균 발효 생균제 또는 악취 저감제를 포함한다.

발명의 효과

[0018] 본 발명의 쌀뜨물을 이용한 유산균 발효 생균제 또는 악취 저감제의 제조 방법은, 쌀의 세척수인 쌀뜨물을 *Lactobacillus sakei* 또는 *Lactobacillus plantarum* 등과 같은 유산균의 발효 혹은 생장에 적용하여 항균성능 또는 악취 제거 성능이 우수한 생균제/악취 저감제를 제공할 수 있어, 친환경 생균제 공급이 가능하고, 축산분뇨 악취를 효과적으로 감소시킬 수 있는 효과가 있다.

[0019] 또한, 환경 오염원으로 작용할 수 있는 쌀뜨물을 효과적으로 활용할 수 있는 수단을 제공하여, 무세미 제조 과정 중에서 발생할 수 있는 오염물질을 효과적으로 감소시키는 장점을 갖는다.

도면의 간단한 설명

- [0020] 도 1은 본 발명에서 사용되는 쌀뜨물의 제조 방법을 도식적으로 나타낸 것이다.
- 도 2는 본 발명에서 사용된 쌀뜨물의 전기영동 실험 결과이다.
- 도 3과 4는 본 발명의 쌀뜨물에 접종된 유산균의 배양 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 5 내지 12는 본 발명의 쌀뜨물을 통해 배양된 *Lactobacillus sakei* 유래 생균제의 병원성균에 대한 항균활성 측정 결과를 정리한 그래프이다.
- 도 13 내지 17은 본 발명의 쌀뜨물을 통해 배양된 *Lactobacillus plantarum* 유래 생균제의 병원성균에 대한 항균활성 측정 결과를 정리한 그래프이다.
- 도 18 내지 20은 본 발명의 쌀뜨물을 이용한 유산균 발효 생균제의 악취 저감제로서의 기능을 확인한 실험 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 이하 본 발명의 바람직한 실시 예를 통해 상세히 설명하기에 앞서, 본 명세서 및 청구범위에 사용된 용어나 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 한정하여 해석되어서는 아니 되며, 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야 함을 밝혀둔다.
- [0022] 본 명세서 전체에서, 어떤 부재가 다른 부재 "상부에" 위치하고 있다고 할 때, 이는 어떤 부재가 다른 부재에 접해 있는 경우뿐 아니라 두 부재 사이에 또 다른 부재가 존재하는 경우도 포함한다.
- [0023] 본 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함" 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [0024] 각 단계들에 있어 식별부호는 설명의 편의를 위하여 사용되는 것으로 식별부호는 각 단계들의 순서를 설명하는 것이 아니며, 각 단계들은 문맥상 명백하게 특정 순서를 기재하지 않는 이상 명기된 순서와 다르게 실시될 수 있다. 즉, 각 단계들은 명기된 순서와 동일하게 실시될 수도 있고 실질적으로 동시에 실시될 수도 있으며 반대의 순서대로 실시될 수도 있다.
- [0026] 먼저, 도 1은 본 발명에서 사용되는 쌀뜨물의 제조 과정을 설명하기 위한 것으로, 통상적인 무세미를 제조하는 과정을 도식적으로 나타낸 것이다. 무세미의 세척공정은 일반적으로 선별기를 통과한 원곡을 세척수와 함께 투입하면서 투입구의 스크류와 세척수의 마찰로 표면이 깨끗해지는 과정으로, 이러한 공정 중 곡물의 표면에 상처를 유발할 수 있는 스크류 회전수와 세척수량 조절에 의한 무세미의 최적상태에 따른 쌀뜨물의 미생물 발효 활성도에도 영향을 줄 수 있다.
- [0027] 본 발명에서는 이러한 세미 과정을 통해 우수한 유산균의 영양 공급원이 될 수 있는 쌀뜨물을 준비하게 위하여, 백미를 6 ~ 8 kg/min의 유량으로 스크류 타입의 세척기에 공급하고, 세척수를 3 ~ 4 liter/min의 유량으로 공급하였으며, 상기 세척기 내의 스크류는 약 900 rpm의 속도로 회전시켜 10 ~ 20 초 동안 수행하였다.
- [0028] 백미의 양이 너무 적을 경우에는 상기 과정에서 얻어지는 쌀뜨물의 고형분 농도가 너무 낮아지게 되고, 백미의 양이 너무 많을 경우에는 스크류와의 마찰이 너무 증가하여 생산되는 무세미의 품질이 저하되므로 바람직하지 아니하다.
- [0029] 또한, 세척수의 양이 너무 적을 경우도, 스크류와의 마찰이 너무 증가하여 생산되는 무세미의 품질이 저하될 수 있고, 세척수의 양이 너무 많을 경우 역시 얻어지는 쌀뜨물의 고형분 농도가 너무 낮아지게 되는 문제점이 있으므로, 바람직하지 아니하다.
- [0030] 상기 스크류의 회전 속도 혹은 세미 시간 역시 백미 혹은 세척수의 양과 유사한 현상을 야기할 수 있으므로, 상기 범위에서 운전되는 것이 바람직하다. 또한, 상기 백미 세척 스크류 회전수를 600 rpm/min에서부터 100 rpm/min 씩 증가시켜 총 7단계로 실험하였으며, 세척시간은 8초, 10초, 20초로 3단계로 구분하여 진행하였으며, 그 결과는 아래의 표 1과 같다.

표 1

[0031]

시료	회전수(RPM)	세척시간(sec)	고형분 (wt%)	유산균수	세미손상 여부
A1	600	8	1.2	1.0×10^6	X
A2	700	8	1.3	2.0×10^6	X
A3	800	10	1.5	7.0×10^6	X
A4	900	10	1.7	3.1×10^7	X
A5	1,000	10	1.8	3.0×10^7	0
A6	1,100	20	1.9	9.2×10^7	0

[0033] 이렇게 표 1과 같은 조건을 통해 얻어진 쌀뜨물을 사용하여 젖산균의 배양 실험을 수행하였다. 표 1의 각각의 방법으로 얻어진 쌀뜨물을 대상으로, 유산균 배양액을 분주하여 2시간 이상 방치 후, MRS 고체배지에서 48시간 37°C에서 배양한 후 조건별 유산균 수를 측정 비교하였다. 이렇게 얻어진 결과 역시 상기 표 1에 같이 정리하였

으며, 얻어진 세미 표면의 손상 여부 역시 육안으로 확인하여 그 결과를 같이 제시하였다.

[0034] 상기 표 1의 결과에서 확인되듯이, 회전수가 증가할수록 고형분 양이 증가하며, 배양되는 유산균의 수 역시 같이 증가함을 알 수 있었다. 하지만, 너무 회전수가 증가할 경우에는 세미가 손상되는 현상이 발생하여 약 900 rpm의 속도 및 적어도 10초 이상의 세척시간이 적절함을 알 수 있다.

[0035] 이하에서는 상기 시료 A4의 조건으로 쌀뜨물을 제조하였으며, 이렇게 제조된 쌀뜨물의 성분함량은 다음의 표 2와 같다.

표 2

항목	백미	쌀뜨물(일반가정)	쌀뜨물(무세미 공정)
단백질 [g]	6.1	0.0	16.1
섬유소 [g]	0.5	1	1.4
Fe [mg]	0.8	0	4.7
K [mg]	88	3	1,730
Ca [mg]	5	0	91.0
Zn [mg]	1.4	1.5	3.7
GABA [mg]	5	3	98

[0038] 상기 표 2의 결과에서 알 수 있듯이, 일반 가정에서 얻어지는 쌀뜨물에 비해, 본 발명의 무세미 공정에서 얻어지는 쌀뜨물은 고농축된 세척수로 특수성분이 유의하게 높게 포함되어 있음을 알 수 있었으며, 이하의 실험에서는 상기 조성을 갖는 시료 A4의 쌀뜨물을 사용하여 유산균 발효 실험 및 악취 저감 효과 실험을 수행하였다.

[0040] [실시에 1] 쌀뜨물의 이화학 및 미생물학적 검사

[0041] 앞서 얻어진 쌀뜨물을 사용하여 시험에 이용하였다. 쌀뜨물의 pH 측정은 pH meter(Mettler toleda, Switzerland)를 이용하여 측정하였고, 적정산도(titratable acidity, TA)측정은 Marth Method(1978)에 따라 측정하였다. 즉, 시료 9 ml에 동량의 증류수 9 ml를 혼합한 후, 1% phenolphthalein을 가하여 pH가 8.4에 도달할 때까지의 0.1N NaOH 소요량으로 측정하여 환산하였다. 한편 총 생균수의 측정은 SPC agar를 이용하여 측정하였으며, 쌀뜨물에 대한 전기영동은 Laemmli의 방법(1970)에 따라 수행하였다.

[0042] 본 발명에서 사용된 쌀뜨물에는 총 미생물수가 약 1.8×10^5 정도로 상당한 수의 미생물이 생존하고 있는 것이 확인되었다. 따라서 유산균의 생존력과 항균활성을 측정하기 위해서는 먼저 쌀뜨물을 살균 또는 멸균한 후, 접종하여 실험을 수행하는 것이 필요함을 알 수 있다. 따라서, 125℃/20min과 70℃/30min의 조건으로 열처리한 후, 생균수를 측정한 결과 쌀뜨물 내의 생균이 모두 사멸되었음을 확인하였다. 또한 쌀뜨물을 125℃/20min, 70℃/30min, 그리고 미열처리한 대조구의 pH와 적정산도(TA)를 측정결과를 다음의 표 3과 같다. 열처리된 쌀뜨물과 각각의 온도와 시간에서 처리한 쌀뜨물과의 pH와 적정산도(TA)와의 차이는 나타나지 않았다.

표 3

시험구	pH	T.A.
미처리구(대조구)	7.02	0.0352
70℃/30min 처리구	6.98	0.0225
125℃/20min 처리구	6.63	0.0360

[0045] 한편, 본 발명에서 사용된 쌀뜨물의 전기영동결과는 도 2와 같다. 상기 전기영동결과에서 확인되듯이, 대부분의 성분들이 낮은 범위에 밴드들을 보여주고 있어, 쌀뜨물에는 분자량이 작은 물질들이 많이 함유되어 있는 것을 알 수 있다.

[0047] [실시에 2] 쌀뜨물이용 유산균의 배양검토 및 저장 중 생균수 측정

[0048] 본 발명에서 이용되는 쌀뜨물에 잘 자랄 수 있는 유산균을 알아보기 위하여 유산균 상업균주 *Lactobacillus acidophilus*, *Weissella koreensis*, *Lactobacillus sakei*, *Leuconostoc mesenteroidis*, *Lactobacillus plantarum*을 각각 쌀뜨물에 접종하여 배양하고 저온에서 장기간 저장한 결과, 가장 좋은 생장과 저장 중 생존력이 높은 균주로 *Lactobacillus sakei* 와 *Lactobacillus plantarum*을 선정하였다.

[0049] 살균된 쌀뜨물에 *Lactobacillus sakei*를 접종 후, 배양 12시간과 24시간대 생균수를 측정한 결과는 도 3(a)와 같다. 배양 12시간대에 *Lactobacillus sakei*의 생균수는 약 10.6 cfu/ml에 도달하였으며, 배양 24시간대는 약 11.3 cfu/ml에 도달하였다. 결과에서와 같이 쌀뜨물은 *Lactobacillus sakei*에 있어서 좋은 성장배지로 조사되었다.

[0050] 또한, 또한 쌀뜨물에 *Lactobacillus sakei*를 접종하고 배양 24시간에 배양을 중지한 후, 4℃ 냉장 보관하는 생균수를 측정한 결과를 도 3(b)에 나타내었는데, 배양 종료 후 *Lactobacillus sakei*의 생균수는 약 11.27 cfu/ml이었으며, 저장 3일 후 생균수는 11.3 cfu/ml이었으며, 저장 6일 후는 11.2 cfu/ml, 저장 9일 후는 11.15 cfu/ml, 저장 12일은 11.03 cfu/ml로 저장초기의 생균수를 유지하였다. 그러나 저장 15일부터 생균수는 10.63 cfu/ml, 저장 20일 후에는 9.68 cfu/ml을 나타내어 저장 15일부터 생균수가 감소하는 것이 확인되었다.

[0052] 동일한 방식으로 *Lactobacillus plantarum*의 성장과 저장 중 생존 수를 측정하였으며, 그 결과는 각각 도 4(a)와 (b)에 제시하였다. 배양 12시간대에 *Lactobacillus plantarum*의 생균수는 약 11.12 cfu/ml에 도달하였으며, 배양 24시간대는 약 11.75 cfu/ml에 도달하였다. 결과에서 보는바와 같이 쌀뜨물은 *Lactobacillus sakei*와 같이 *Lactobacillus plantarum*에 있어서 좋은 성장배지로 확인되었다.

[0053] 도 4(b)에는 쌀뜨물에 *Lactobacillus plantarum*를 접종하고 배양 24시간에 배양을 중지한 후, 4℃ 냉장 보관하는 생균수를 측정한 결과를 도시하였다. 배양 종료 후 *Lactobacillus plantarum*의 생균수는 약 11.75 cfu/ml이었으며, 저장 3일 후 생균수는 11.79 cfu/ml이었으며, 저장 6일 후는 12.26 cfu/ml, 저장 9일 후는 12.94 cfu/ml, 저장 12일은 12.87 cfu/ml, 저장 15일부터 생균수는 12.83 cfu/ml이었다. *Lactobacillus plantarum*의 저장 중 흥미로운 것은 저장 중 생균수가 증가함을 보여주었다. 대부분의 유산균은 저장 중 시간이 지날수록 생존률이 낮아지는데, *Lactobacillus plantarum*은 오히려 생장이 증가함을 보여주었으나. 저장 20일 후에는 11.37 cfu/ml을 나타내어 저장 20일부터는 생균수가 감소하는 것이 확인되었다.

[0055] [실시예 3]

[0056] 유산균에 대한 표적 항균활성 측정을 측정하기 위해, 병원성 미생물 *Escherichia coli* KCCM 11234, *Salmonella enteritidis* KCCM 3313, *Salmonella enteritidis* KCCM 12021, *Salmonella typhimurium* KCCM 40253, 그리고 *Salmonella typhimurium* M 15를 한국미생물보존센터로부터 구입하여 실험에 사용하였다.

[0057] *Lactobacillus(L) sakei* 또는 *Lactobacillus plantarum* 1wt%와 2wt%의 당밀을 쌀뜨물에 혼합하여 33 ℃에서 72 시간 동안 1차 숙성을 수행하고, 이를 원심분리하여 상층액을 얻어 0.2µm filter에 통과시킨 후, 상온에서 10 일 동안 2차 숙성을 진행하였으며, 이를 각각의 병원성균에 대하여 항균활성을 측정하였으며 그 결과를 각각 표 4와 도 5 내지 17에 도시하였다.

표 4

유산균의 종류	병원성 미생물	항균활성 측정 결과
<i>Lactobacillus(L) sakei</i>	<i>Escherichia coli</i> KCCM 11234	도 5 & 도 6
	<i>Salmonella enteritidis</i> KCCM 12021	도 7 & 도 8
	<i>Salmonella typhimurium</i> M15	도 9 & 도 10
	<i>Salmonella typhimurium</i> 40253	도 11 & 도 12
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Escherichia coli</i> KCCM 11234	도 13
	<i>Salmonella enteritidis</i> KCCM 3313	도 14
	<i>Salmonella typhimurium</i> KCCM 40253	도 15
	<i>Salmonella typhimurium</i> M 15	도 16
	<i>Salmonella enteritidis</i> KCCM 12021	도 17

[0060] *L. sakei*로부터 얻어진 본 발명의 유산균 발효 생균제의 *Escherichia coli* KCCM 11234에 대하여 항균활성여부를 측정한 결과 현저한 항균활성을 보여주었는데(도 5(a)와 (b) 참조), 얻어진 생균제의 *E. coli*에 대한 항균활성은 농도가 높을수록 강한 항균활성을 나타내었으며(도 5(b)), 25% 이상의 첨가는 *E. coli*에 대하여 배양초기부터 강한 항균활성을 보여주었다.

[0061] 또한, 얻어진 생균제의 항균활성에 대하여 다양한 pH 변화에 대한 항균활성의 안전성과 다양한 온도변화에 대한 항균활성의 열안정성을 확인하였는데, pH를 다양하게 변화시켜 항균활성을 측정한 결과, 병원성 미생물에 대하여 항균활성을 나타내지 않았지만(도 6(a)), 다양한 열처리한 후, 병원성 미생물에 대한 항균활성은 미열처리구

(대조구)와 같은 수준의 항균활성을 나타내었다(도 6(b)).

- [0063] *Salmonella enteritidis* KCCM 12021에 항균활성 실험결과를 도 7과 8에 제시하였다. Paper disc법의 의해서 측정된 항균활성 결과 분비액 원액과 1/2 농도에서 강한 항균활성 환이 확인되었으며(도 7(a)), 항균활성의 최소 농도를 알아보기 위하여 98well plate법에 의해 측정된 결과 25%이상의 농도가 요구됨을 알 수 있었다(도 7(b)). 다양한 pH 변화에 대한 항균활성의 안전성과 다양한 온도변화에 대한 항균활성의 열안정성을 도 8에서 검토하였으며, 그 결과는 앞선 *Escherichia coli* KCCM 11234의 결과와 유사하였다.
- [0065] 도 9와 도 10은 *Salmonella typhimurium* M15에 대하여 동일한 방법으로 측정된 항균활성 결과인데, Paper disc법의 의해서 측정된 항균활성 결과 분비액 원액과 1/2 농도에서 강한 항균활성 환이 확인되었으며(도 9(a)), 또한 항균활성의 최소농도를 알아보기 위하여 98well plate법에 의해 측정된 결과 다른 병원성균과 달리 50%이상의 농도가 요구되었다(도 9(b)). 한편, pH변화에 의한 *S. typhimurium*에 대한 항균활성을 측정된 결과 pH가 알칼리성에 가까울수록 증식효과를 나타내었고(도 10(a)), 각각의 열변성에 의한 항균활성은 모든 시험구에서 동일하게 항균활성을 나타내었다(도 10(b)).
- [0067] 도 11과 12는 *Salmonella typhimurium* 40253에 대한 *L. sakei* 유산균 유래 생균제의 항균활성을 나타낸 것으로, Paper disc법의 의해서 측정된 항균활성 결과는 다른 병원성균과는 다른 형태의 항균환을 나타내었으나(도 11(a)), 98well plate법에 의해 측정된 결과 25%이상의 농도에서 항균활성이 나타내는 것을 보여주었다(도 11(b)). 또한 pH 변화에 따른 *S. typhimurium*에 대한 항균활성을 측정된 결과 pH가 중성 또는 알칼리성에 가까울수록 항균활성은 나타나지 않았으며(도 12(a)), 열변성에 의한 항균활성은 모든 시험구에서 동일하게 항균활성을 보였다(도 12(b)).
- [0069] *Lactobacillus plantarum*에 대하여도 앞선 *Lactobacillus(L) sakei*와 동일한 방식으로 각각의 병원성균에 대한 항균활성을 96 well plate법을 통해 확인하였으며, 그 결과는 도 13 내지 17에 정리하였다.
- [0070] *Salmonella enteritidis* KCCM 12021의 경우에는 현저한 항균활성은 10% 이상의 농도에서 보여주었고, 농도가 낮을수록 항균활성 또한 미약하게 나타났다(도 13).
- [0071] *Salmonella enteritidis* KCCM 3313의 경우에는 현저한 항균활성이 20% 의 농도에서 나타났으며, 10%의 농도에서는 배양초기에 억제효과를 나타내었으나 배양 6시간대부터 억제능력이 현저히 감소되었다. 그 외의 농도에서는 대조군과 생장에 거의 차이를 나타내지 않았다(도 14).
- [0072] *Salmonella typhimurium* KCCM 40253에 대한 현저한 항균활성은 20% 의 농도에서 보여주었으며, 10%의 농도에서는 배양초기에 억제효과를 나타내었으나 배양 6시간대부터 억제능력이 현저히 감소되어 *Salmonella enteritidis* KCCM 3313와 같은 감소효과를 나타내었다. 그 외의 농도 또한 대조구와 생장에 거의 차이를 나타내지 않았다(도 15).
- [0073] *Salmonella typhimurium* M 15의 경우에는 현저한 항균활성이 20% 와 10%의 농도에서 나타났으며, 배양초기부터 24시간대까지 현저한 억제능력을 보여주었다. 특히 5%의 농도에서는 배양 3시간까지는 대조군에 비하여 서서히 성장하는 것을 보여주고 있으며 배양 15시간부터는 오히려 대조구보다 생장이 증가하는 현상을 보였다(도 16).
- [0074] 도 17은 *Salmonella enteritidis* KCCM 12021의 항균활성의 실험결과로 현저한 항균활성은 20% 의 농도에서 보여주었으며, 10%의 농도에서의 항균활성은 20%에 비하여 약하지만 대조구에 비해서는 현저한 항균작용을 나타내었다.
- [0076] [실시예 4]
- [0077] 앞서 실시예 3에서 항균 활성이 확인된, 본 발명의 싼뜨물을 이용한 두 유산균(*L. sakei*와 *L. plantarum*)유래 발효 생균제에 대하여 HPLC를 사용하여 유기산 성분분석을 실시하였으며, 그 결과는 다음의 표 5와 같다.

표 5

mg/L	phosphoric	citric	succinic	lactic	formic	acetic	pyroglutamic
<i>L. sakei</i>	953.8	1371.8	61.7	14725.2	61.6	3592.2	319.2
<i>L. plantarum</i>	895.4	1139.5	61.1	14780	54.3	3765.5	217.7

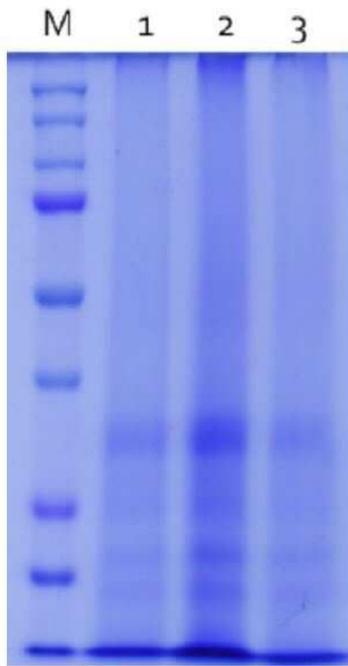
- [0080] [실시예 5]
- [0081] 앞서 실시예 3과 4에서 살펴본 본 발명의 싼뜨물을 이용한 두 유산균(*L. sakei*와 *L. plantarum*) 유래 발효 생균제의 악취저감 효과를 살펴보기 위하여, 계사로부터 계분을 수거하여 악취 제거 실험을 실시하였다.
- [0082] 계분은 각각 100g씩 준비하고 본 발명의 싼뜨물을 이용한 유산균 발효 생균제를 계분과 혼합한 후 24시간 더 배양하였다. 생균제를 혼합하지 않은 대조군과 계분과 생균제를 각각 1:1, 1:0.5의 비율(이하, 무게비로 동일함)로 조절하여 혼합하고 24시간 후, 포집된 가스들은 가스검지기(GV-100S; Gastec, Co., Korea)를 이용하여 암모니아, 황화수소, 메탄가스 발생량을 측정하였으며, 그 결과는 도 18 내지 도 20에 제시하였다.
- [0083] 도 18은 암모니아 발생량을 측정한 값으로 계분만 처리된 대조군에서는 14ppm/100ml의 함량이 발생하였으며, *L. sakei* 유래 생균제 및/또는 *L. plantarum* 유래 생균제를 혼합한 처리군에서는 암모니아가 전혀 검출되지 않았다. 따라서 계분 또는 닭의 사료에 본 발명의 싼뜨물을 이용한 유산균 발효 생균제를 첨가할 경우 악취절감을 기대할 수 있다고 예상된다.
- [0084] 도 19는 메탄가스 발생량을 측정한 값으로 계분만 처리된 대조군에서는 120ppm이상/50ml의 함량이 발생하였으나, *L. sakei* 유래 생균제를 1:0.5 혼합한 처리군에서는 60ppm/50ml, 1:1 혼합한 처리군에서는 29ppm/50ml으로 대조군에 비해 현저히 발생량이 감소된 것을 확인하였다.
- [0085] 또한 *L. plantarum* 유래 생균제를 혼합한 처리군에 대해서도 1:0.5 혼합한 처리군의 경우에는 100ppm/50ml, 1:1 혼합한 처리군의 경우에는 30ppm/50ml로 대조군에 비해 현저히 가스발생량이 감소된 것을 확인하였다.
- [0086] 도 20은 황화수소의 발생량을 측정한 결과인데, 발생된 황화 수소의 양은 모두 0.1% 이하로 분석 키트의 유효 측정범위 밖으로 정확한 범위로 정량이 어려웠지만, 각각의 경우 역시 비슷한 수준으로 관찰되었다.

도면

도면1



도면2



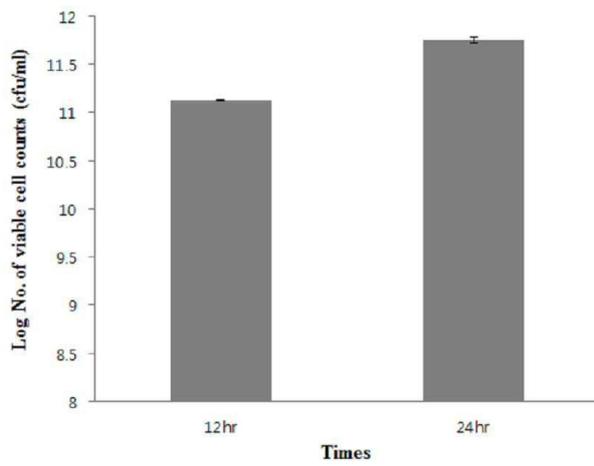
M : Marker 3 μ l

1. 쌀뜨물 10 μ l + Sample buffer 10 μ l

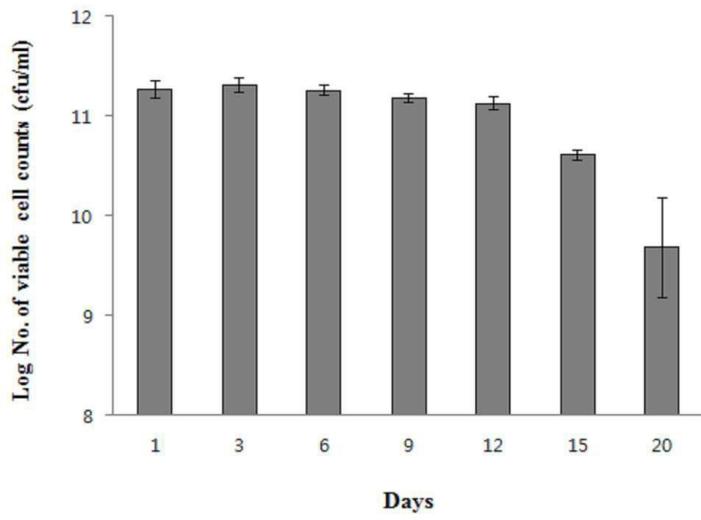
2. 쌀뜨물 20 μ l + Sample buffer 20 μ l

3. 쌀뜨물 30 μ l + Sample buffer 30 μ l

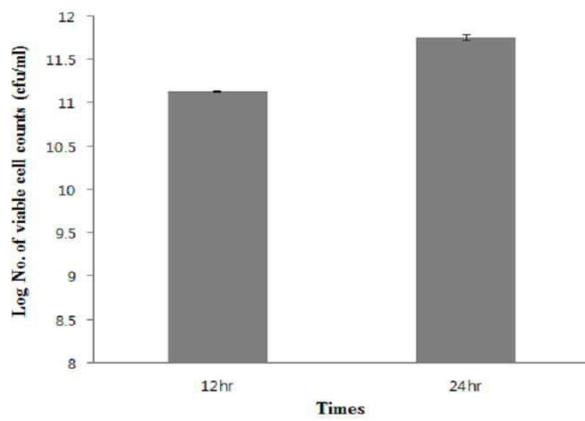
도면3a



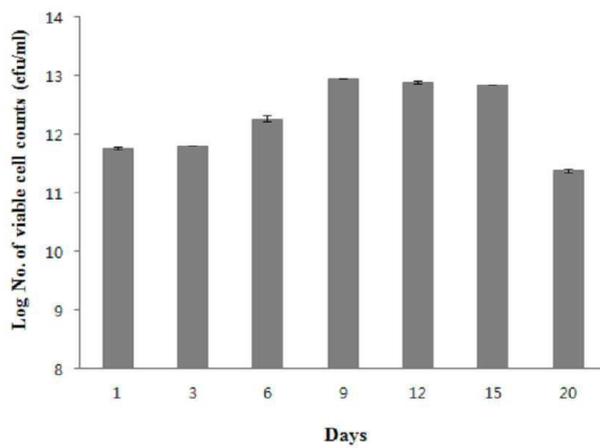
도면3b



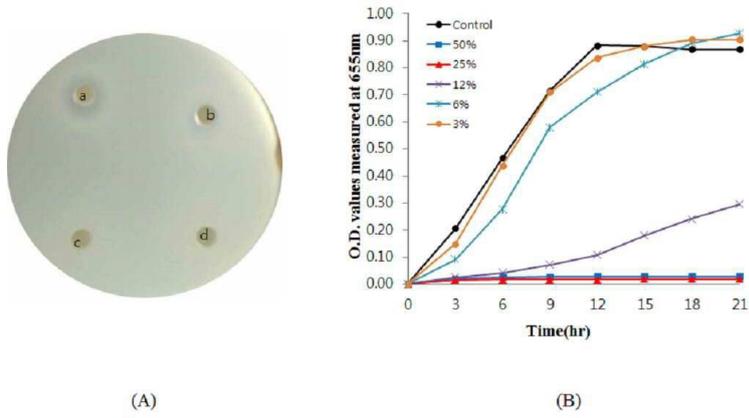
도면4a



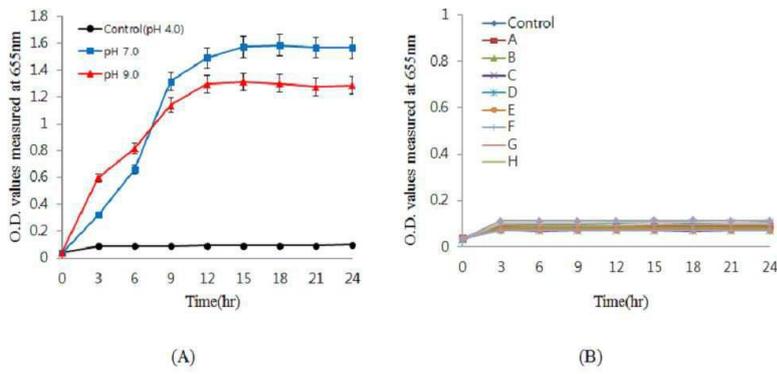
도면4b



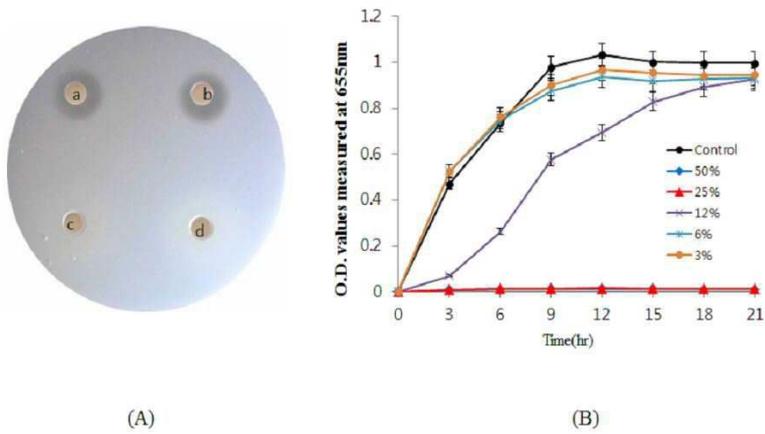
도면5



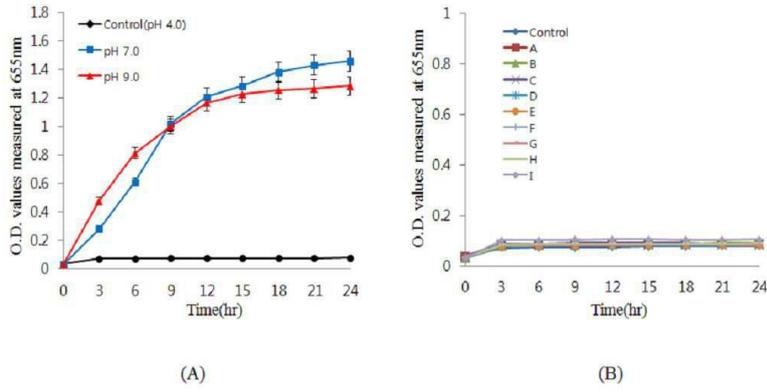
도면6



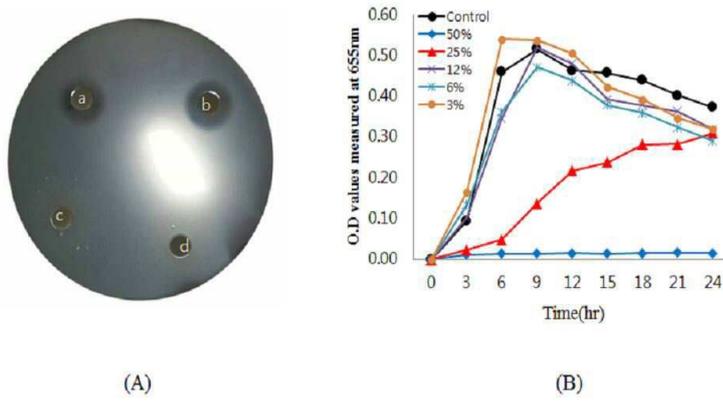
도면7



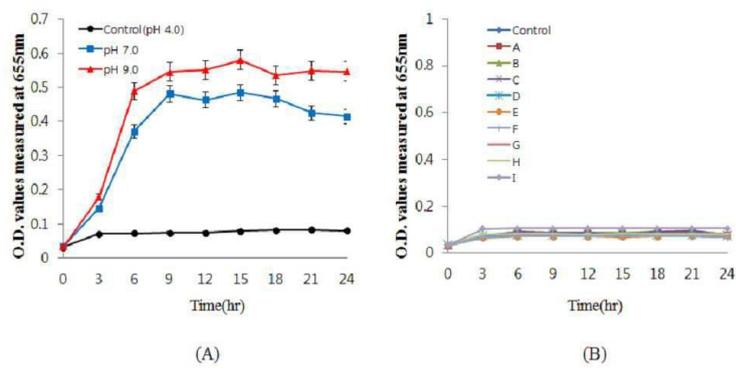
도면8



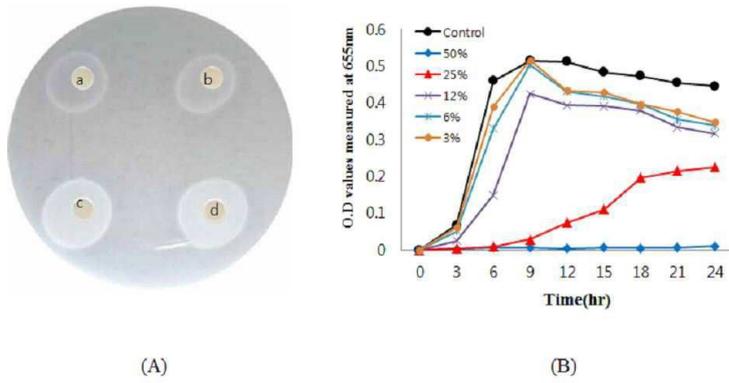
도면9



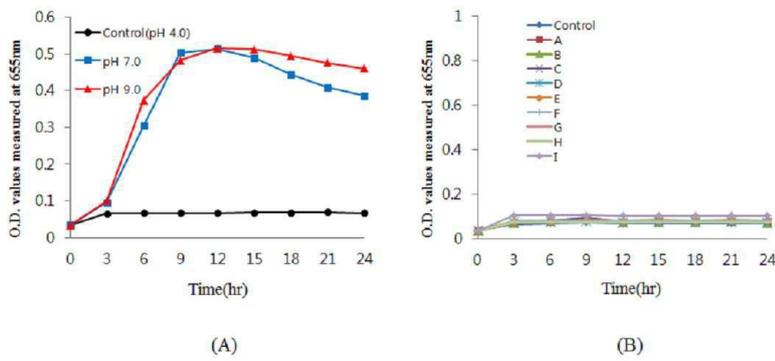
도면10



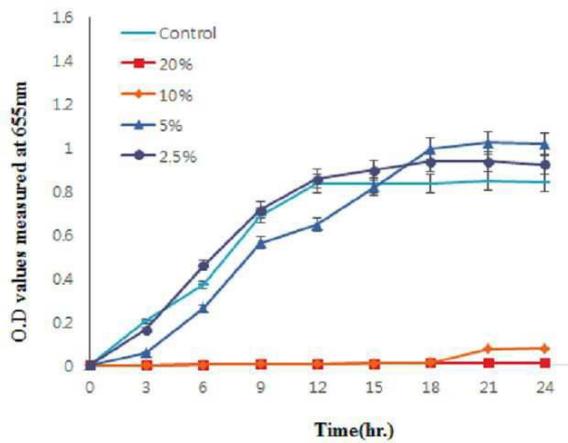
도면11



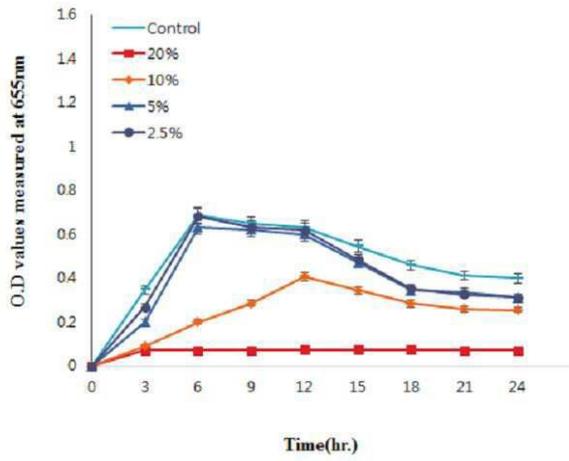
도면12



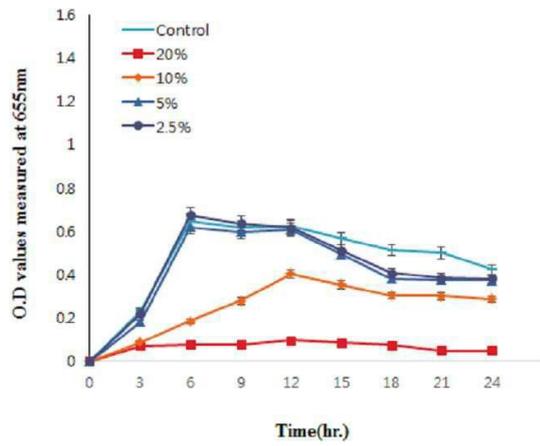
도면13



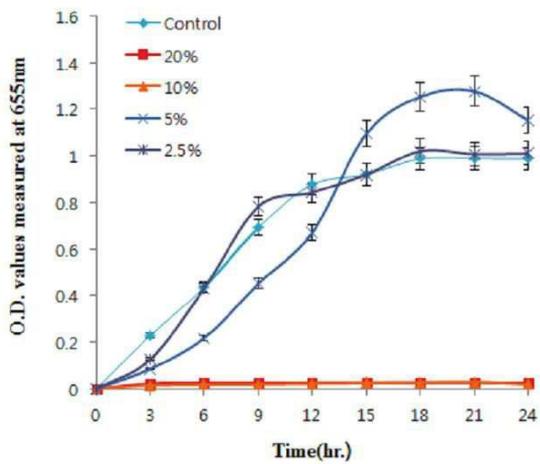
도면14



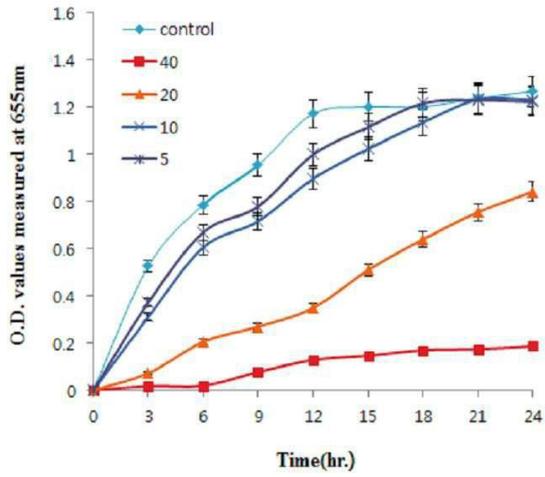
도면15



도면16



도면17



도면18



The measured value of the ammonia content. Control: only feces of chicken, Sample 1: chicken feces + 1/2 *Lactobacillus sakei*; Sample 2: chicken feces + *Lactobacillus sakei*; Sample 3: chicken feces + 1/2 *Lactobacillus plantarum*; Sample 4: chicken feces + *Lactobacillus plantarum*.

도면19



The measured value of the methane content. Control; only feces of chicken, Sample 1; chicken feces + 1/2 *Lactobacillus sakei*; Sample 2; chicken feces + *Lactobacillus sakei*; Sample 3; chicken feces + 1/2 *Lactobacillus plantarum*; Sample 4; chicken feces + *Lactobacillus plantarum*.

도면20



The measured value of the hydrogen sulfide content. Control; only feces of chicken, Sample 1; chicken feces + 1/2 *Lactobacillus sakei*; Sample 2; chicken feces + *Lactobacillus sakei*; Sample 3; chicken feces + 1/2 *Lactobacillus plantarum*; Sample 4; chicken feces + *Lactobacillus plantarum*.