(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0083392
(43) 공개일자 2025년06월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23K 10/16 (2017.01) *A23K 50/10* (2016.01)
C12N 1/20 (2006.01) *C12R 1/01* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A23K 10/16 (2016.05)
A23K 50/10 (2016.05)
(21) 출원번호 10-2024-0174619
(22) 출원일자 2024년11월29일
심사청구일자 2024년11월29일
(30) 우선권주장
1020230171473 2023년11월30일 대한민국(KR)

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
김선원
세종특별자치시 고운북3길 17
권문혁
경상남도 진주시 사들로 157 혁신도시엘에이치아파트1단지, 106동 2102호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
기율특허법인

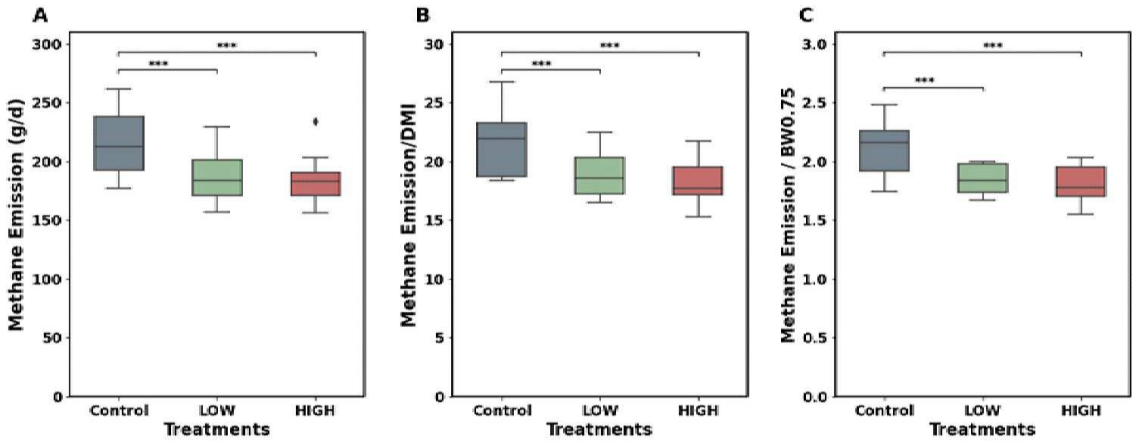
전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 발명의 명칭 **반추 동물의 메탄 배출 감소용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 메탄영양박테리아를 포함함으로써, 반추 동물의 메탄 배출을 저감하고, 사료 효율, 발효 효율 등을 개선할 수 있는 조성물 및 반추 동물의 메탄 배출 저감 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도8



(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2021.05)
C12R 2001/01 (2021.05)
(72) 발명자
강민경
제주특별자치도 제주시 진서로 4 서화한빛아파트 201호
윤상활
경상남도 진주시 에나로 100, 휴앤인엘리시움동 14층 101-1402호 (충무공동, 휴앤인엘리시움)
레이앤토니 산헐허
경상남도 진주시 진주대로 501 경상대학교
텐친 츠텐
경상남도 진주시 진주대로 501 경상대학교
이상석
전라남도 순천시 삼산로 92-50 대주피오레아파트 113-1005
백근식
광주광역시 북구 임방울대로1042번길 14-1 첨단자이1단지 106-901

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2710012807
과제번호 2021R1A5A8029490
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 집단연구지원
연구과제명 항노화 바이오소재 세포공장 지역혁신연구센터
과제수행기관명 경상국립대학교
연구기간 2024.03.01 ~ 2025.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2410004845
과제번호 20014582
부처명 산업통상자원부
과제관리(전문)기관명 한국산업기술기획평가원
연구사업명 바이오산업기술개발
연구과제명 자외선AB 차단 효과가 우수한 파이토엔 파이토플루엔의 생물학적 생산 및 제품화 기술 개발
과제수행기관명 코스맥스비티아이주식회사
연구기간 2024.01.01 ~ 2024.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1545026933
과제번호 321083053SB010
부처명 농림축산식품부
과제관리(전문)기관명 농림식품기술기획평가원
연구사업명 2025축산현안대응산업화기술개발
연구과제명 가축 온실가스 발생 저감 기술 개발
과제수행기관명 순천대학
연구기간 2024.01.01 ~ 2024.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

메탄영양박테리아를 포함하는 반추 동물의 메탄 배출 감소용 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 메탄영양박테리아는 반추 동물의 반추위 유래인 반추 동물의 메탄 배출 감소용 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 메탄영양박테리아는 메틸로시스티스속, 메틸로모나스속, 메틸로코커스속, 메틸로시누스속 또는 메틸로마이크로비움속 박테리아인 반추 동물의 메탄 배출 감소용 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 메틸영양박테리아를 더 포함하는 반추 동물의 메탄 배출 감소용 조성물.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 메틸영양박테리아는 반추 동물의 반추위 유래인 반추 동물의 메탄 배출 감소용 조성물.

청구항 6

청구항 4에 있어서, 상기 메틸영양박테리아는 메틸로박테리움 속 박테리아인 반추 동물의 메탄 배출 감소용 조성물.

청구항 7

청구항 4에 있어서, 상기 메틸영양박테리아는 메틸로박테리움 오르가노필럼인 반추 동물의 메탄 배출 감소용 조성물.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 반추동물은 소, 기린, 사슴, 양 또는 낙타인 반추 동물의 메탄 배출 감소용 조성물.

청구항 9

청구항 1 내지 8 중 어느 한 항의 조성물을 반추 동물에 급여하는 단계를 포함하는 반추 동물의 메탄 배출 저감 방법.

청구항 10

메탄영양박테리아를 포함하는 반추 동물용 사료 조성물.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 메탄영양박테리아는 반추 동물의 반추위 유래인 반추 동물용 사료 조성물.

청구항 12

청구항 10에 있어서, 상기 메탄영양박테리아는 메틸로시스티스속, 메틸로모나스속, 메틸로코커스속, 메틸로시누스속 또는 메틸로마이크로비움속 박테리아인 반추 동물용 사료 조성물.

청구항 13

청구항 10에 있어서, 메틸영양박테리아를 더 포함하는 반추 동물용 사료 조성물.

청구항 14

청구항 13에 있어서, 상기 메틸영양박테리아는 반추 동물의 반추위 유래인 반추 동물용 사료 조성물.

청구항 15

청구항 13에 있어서, 상기 메틸영양박테리아는 메틸로박테리움 속 박테리아인 반추 동물용 사료 조성물.

청구항 16

청구항 13에 있어서, 상기 메틸영양박테리아는 메틸로박테리움 오르가노필럼인 반추 동물용 사료 조성물.

청구항 17

메탄영양박테리아를 포함하는 반추 동물용 사료 첨가제 조성물.

청구항 18

청구항 17에 있어서, 상기 메탄영양박테리아는 반추 동물의 반추위 유래인 반추 동물용 사료 첨가제 조성물.

청구항 19

청구항 17에 있어서, 상기 메탄영양박테리아는 메틸로시스티스속, 메틸로모나스속, 메틸로코커스속, 메틸로시누스속 또는 메틸로마이크로비움속 박테리아인 반추 동물용 사료 첨가제 조성물.

청구항 20

청구항 17에 있어서, 메틸영양박테리아를 더 포함하는 반추 동물용 사료 첨가제 조성물.

청구항 21

청구항 20에 있어서, 상기 메틸영양박테리아는 반추 동물의 반추위 유래인 반추 동물용 사료 첨가제 조성물.

청구항 22

청구항 20에 있어서, 상기 메틸영양박테리아는 메틸로박테리움 속 박테리아인 반추 동물용 사료 첨가제 조성물.

청구항 23

청구항 20에 있어서, 상기 메틸영양박테리아는 메틸로박테리움 오르가노필럼인 반추 동물용 사료 첨가제 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 반추 동물의 메탄 배출 감소용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 메탄은 이산화탄소의 약 80배에 해당하는 온실가스 효과를 갖는 기체로 지구 온난화의 주요 원인이지만 메탄 분자의 수명은 이산화탄소 대비 10배 이상 짧기 때문에 메탄 발생 감축이 이산화탄소 감축보다 온난화 대응에 즉각적이고 효과적인 것으로 보고되고 있어 전세계는 2021년 글로벌 메탄서약을 통해 2030년까지 2018년 대비 메탄 배출량의 30%를 감축하는 것을 선언했다. 따라서 메탄 발생 저감하는 것은 전세계적인 지속 가능한 산업을 위해서 매우 중요하다. 메탄 발생의 주요 근원은 전 세계 메탄 발생량의 약 37% 이상이 소와 같은 반추동물로부터 발생한다. 친환경 축산업을 위해서는 이들 산업에서 발생하는 메탄을 저감할 수 있는 조성물의 개발이 중요하다.

[0004] 기존에 반추위 동물에서의 메탄 저감은 메탄 생성 미생물의 생육을 억제하는 화합물을 첨가하는 방식으로 이것은 반추위 발효의 중요한 구성 미생물인 메탄생성균(methanogens)의 생육을 억제함으로서 반추위 발효 효율 및 사료 효율의 감소를 초래하는 방식으로 바람직하지 않다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제2024-0107872호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 반추 동물에서 메탄 배출을 효과적으로 감소할 수 있는 조성물 및 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 1. 메탄영양박테리아를 포함하는 반추 동물의 메탄 배출 감소용 조성물.

[0010] 2. 위 1에 있어서, 상기 메탄영양박테리아는 반추 동물의 반추위 유래인 반추 동물의 메탄 배출 감소용 조성물.

[0011] 3. 위 1에 있어서, 상기 메탄영양박테리아는 메틸로시스티스속, 메틸로모나스속, 메틸로코커스속, 메틸로시누스속 또는 메틸로마이크로비움속 박테리아인 반추 동물의 메탄 배출 감소용 조성물.

[0012] 4. 위 1에 있어서, 메틸영양박테리아를 더 포함하는 반추 동물의 메탄 배출 감소용 조성물.

[0013] 5. 위 4에 있어서, 상기 메틸영양박테리아는 반추 동물의 반추위 유래인 반추 동물의 메탄 배출 감소용 조성물.

[0014] 6. 위 4에 있어서, 상기 메틸영양박테리아는 메틸로박테리움 속 박테리아인 반추 동물의 메탄 배출 감소용 조성물.

[0015] 7. 위 4에 있어서, 상기 메틸영양박테리아는 메틸로박테리움 오르가노필럼인 반추 동물의 메탄 배출 감소용 조성물.

[0016] 8. 위 1에 있어서, 상기 반추동물은 소, 기린, 사슴, 양 또는 낙타인 반추 동물의 메탄 배출 감소용 조성물.

[0017] 9. 위 1 내지 8 중 어느 한 항의 조성물을 반추 동물에 급여하는 단계를 포함하는 반추 동물의 메탄 배출 저감 방법.

[0018] 10. 메탄영양박테리아를 포함하는 반추 동물용 사료 조성물.

[0019] 11. 위 10에 있어서, 상기 메탄영양박테리아는 반추 동물의 반추위 유래인 반추 동물용 사료 조성물.

[0020] 12. 위 10에 있어서, 상기 메탄영양박테리아는 메틸로시스티스속, 메틸로모나스속, 메틸로코커스속, 메틸로시누스속 또는 메틸로마이크로비움속 박테리아인 반추 동물용 사료 조성물.

[0021] 13. 위 10에 있어서, 메틸영양박테리아를 더 포함하는 반추 동물용 사료 조성물.

[0022] 14. 위 13에 있어서, 상기 메틸영양박테리아는 반추 동물의 반추위 유래인 반추 동물용 사료 조성물.

[0023] 15. 위 13에 있어서, 상기 메틸영양박테리아는 메틸로박테리움 속 박테리아인 반추 동물용 사료 조성물.

[0024] 16. 위 13에 있어서, 상기 메틸영양박테리아는 메틸로박테리움 오르가노필럼인 반추 동물용 사료 조성물.

[0025] 17. 메탄영양박테리아를 포함하는 반추 동물용 사료 첨가제 조성물.

[0026] 18. 위 17에 있어서, 상기 메탄영양박테리아는 반추 동물의 반추위 유래인 반추 동물용 사료 첨가제 조성물.

[0027] 19. 위 17에 있어서, 상기 메탄영양박테리아는 메틸로시스티스속, 메틸로모나스속, 메틸로코커스속, 메틸로시누스속 또는 메틸로마이크로비움속 박테리아인 반추 동물용 사료 첨가제 조성물.

[0028] 20. 위 17에 있어서, 메틸영양박테리아를 더 포함하는 반추 동물용 사료 첨가제 조성물.

[0029] 21. 위 20에 있어서, 상기 메틸영양박테리아는 반추 동물의 반추위 유래인 반추 동물용 사료 첨가제 조성물.

[0030] 22. 위 20에 있어서, 상기 메틸영양박테리아는 메틸로박테리움 속 박테리아인 반추 동물용 사료 첨가제 조성물.

[0031] 23. 위 20에 있어서, 상기 메틸영양박테리아는 메틸로박테리움 오르가노필럼인 반추 동물용 사료 첨가제 조성물.

발명의 효과

[0033] 본 발명은 반추 동물의 메탄 배출 저감 효과가 우수하다.

[0034] 본 발명은 반추 동물의 사료 효율을 개선할 수 있다.

[0035] 본 발명은 반추 동물의 발효 효율을 개선할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0037] 도 1. 세 가지 분리주 NC52PC, NC75PC, NC77PC의 성장 테스트. 30° C (A) 및 39° C (B)에서 세 가지 분리주의 0시간부터 36시간까지의 성장 곡선(OD600).

도 2. 형태학적으로 다른 두 가지 세포 유형을 보여주는 NC52PC 세포의 SEM 이미지.

도 3. A) 메틸로시스티스 종의 전체 게놈과 두 플라스미드의 원형 염색체 지도, 밀접하게 관련된 종과의 게놈 비교를 포함한 원형 염색체 지도. 가장 안쪽 고리는 GC 스큐(녹색 -, 보라색 +)와 GC 함량(검은색)을 나타낸다. 범례의 고리와 색은 NC52PC의 메틸로시스티스 종과 비교하기 위해 사용된 밀접한 관련 균주를 나타낸다. B) NC52PC의 메틸로박테리움 종의 전체 게놈을 밀접하게 관련된 종과 비교한 원형 염색체 지도.

도 4. 0시간, 12시간, 24시간 후의 대조군 및 NC52PC 접종 시료의 pH 및 헤드스페이스 가스 부피(A 및 B). 12시간 및 24시간 후 대조군과 NC52PC 접종 시료 간의 소화율 및 메탄 생성량(C 및 D). ''ns''는 유의하지 않음을 나타내고(p-값>0.05), 별표는 유의한 차이를 나타낸다(p-값<0.05).

도 5. 체외 반추위 발효 샘플의 분류학 분석. 박테리아(A), 고세균(B), 곰팡이(C)에 대한 문 수준에서의 상대적 풍부도. 박테리아(D) 및 고세균(E)에 대한 속 수준에서의 상대적 풍부도. 대조군과 NC52PC 샘플 간의 메탄영양균 집단에 대한 pmoA 복제본 수(F).

도 6. 시험관 반추위 발효 시료의 알파 다양성. A) 박테리아, 고세균 및 곰팡이에 대한 섀넌 지수. B) 박테리아, 고세균, 곰팡이에 대한 차오 1 지수.

도 7. 세 동물 그룹 간의 총 체중 증가량(A) 및 사료 전환율(B)과 같은 동물 성능: 보통, 낮음, 높음. ''ns''는 유의하지 않음을 나타낸다(p-값>0.05).

도 8. 3 반복 생체 내 테스트 기간 동안 저농도 및 고농도 메탄영양박테리아 기반 프로바이오틱스(NC52PC)가 메탄 배출량(A), 메탄 수율(B), 메탄 강도(C)에 미치는 영향.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0038] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0040] 본 발명은 메탄영양박테리아를 포함하는 반추 동물의 메탄 배출 감소용 조성물에 관한 것이다.

[0041] 본 발명의 조성물은 반추 동물에 급여되어, 반추 동물의 위에서 발생하는 메탄을 대사하여, 메탄 발생을 저감할 수 있다.

[0042] 반추동물은 예를 들면 소, 기린, 사슴, 양, 낙타 등일 수 있다. 반추동물은 소 일 수 있다. 반추 동물은 조성물이 처리될 반추 동물과 동일 종일 수 있다.

[0043] 메탄영양박테리아는 반추위에서 생육 및 활동이 가능한 것일 수 있다.

[0044] 예를 들어 39℃에서도 활발한 생육을 나타내는 것일 수 있다. 이는 30℃와 비교해 생육 저해가 크지 않은 것으로서, 그 생육 저해도가 80% 이하, 50% 이하, 40% 이하, 30% 이하, 20% 이하, 10% 이하일 수 있다.

[0045] 예를 들어, 반추위액에서 활발한 생육을 나타내는 것일 수 있다. 이는 기본 생육 배지인 NMS 배지와 비교해서 생육 저해가 크지 않은 것으로서, 그 생육 저해도가 80% 이하, 50% 이하, 40% 이하, 30% 이하, 20% 이하, 10% 이하일 수 있다.

[0046] 예를 들어, 혐기 또는 부분적 호기 조건에서도 생육이 가능한 것일 수 있다. 이는 예를 들어 혐기 조건에서 산소 대체 전자수용체의 활용 능력을 갖는 것일 수 있다.

[0047] 메탄영양박테리아(메탄자화균주, methanotroph)는 반추 동물의 반추위 유래일 수 있다.

[0048] 메탄영양박테리아는 호기성 또는 혐기성 균주일 수 있다.

[0049] 메탄영양박테리아는 예를 들면 메틸로시스티스속, 메틸로모나스속, 메틸로코커스속, 메틸로시누스속 또는 메틸로마이크로비움속 균주일 수 있다. 예를 들면 메틸로시스티스 파버스, 메틸로시스티스 로제아, 메틸로시스티스 에코신바이오시스 또는 메틸로시스티스 에코노이데스일 수 있다.

[0050] 본 발명의 조성물은 메틸영양박테리아를 더 포함할 수 있다.

[0051] 메틸영양박테리아는 메탄영양박테리아의 생육을 촉진하여, 메탄 배출 감소 효과가 더욱 증가할 수 있다.

[0052] 메틸영양박테리아는 반추 동물의 반추위 유래일 수 있다. 그러한 경우, 그 유래인 반추 동물은 상기 메탄영양박테리아가 유래된 동물과 동일 종의 동물일 수 있다.

[0053] 메틸영양박테리아는 예를 들면 메틸로박테리움 속일 수 있다. 예를 들면 메틸로박테리움 오르가노필럼일 수 있다.

[0054] 본 발명의 조성물에 사용되는 박테리아는 예를 들면, 메탄영양박테리아와 메틸영양박테리아의 컨소시엄일 수 있다. 이는 예를 들면 메틸로시스티스속 박테리아와 메틸로박테리움속 박테리아일 수 있다.

[0055] 본 발명의 조성물은 사료, 사료 첨가제, 식품, 건강기능식품 등의 다양한 형태로 사용될 수 있다. 그러한 경우 그 형태로서의 사용에 적합한 추가 구성을 더 포함할 수 있다.

[0057] 또한, 본 발명은 반추 동물의 메탄 배출 저감 방법에 관한 것이다.

[0058] 본 발명의 방법은 전술한 메탄 배출 감소용 조성물을 반추 동물에 급여하는 단계를 포함한다.

[0059] 조성물은 예를 들면 조성물을 사료에 혼합하여 급여하거나, 사료와 별도로 급여될 수 있다.

[0060] 급여 대상인 반추 동물은 예를 들면 그 메탄영양박테리아 또는 메틸영양박테리아의 유래 반추 동물과 동일 종일 수 있다.

[0062] 또한, 본 발명은 메탄영양박테리아를 포함하는 반추 동물용 사료 조성물에 관한 것이다.

[0063] 메탄영양박테리아는 앞서 예시된 것일 수 있다.

[0064] 본 발명의 사료 조성물은 메틸영양박테리아를 더 포함할 수 있다. 이는 앞서 예시된 것일 수 있다.

[0065] 급여 대상인 반추 동물은 예를 들면 그 메탄영양박테리아 또는 메틸영양박테리아의 유래 반추 동물과 동일 종일 수 있다.

[0066] 본 발명의 조성물에 사용되는 박테리아는 예를 들면, 메탄영양박테리아와 메틸영양박테리아의 컨소시엄일 수 있다. 이는 예를 들면 메틸로시스티스속 박테리아와 메틸로박테리움속 박테리아일 수 있다.

[0067] 본 발명의 사료 조성물은 반추위 발효 과정의 부산물인 메탄을 제거하여 발효 효율을 향상시킬 수 있다. 또한, 메탄영양균이 메탄을 대사해서 반추동물에게 추가적인 에너지원(휘발성 지방산)과 단백질(메탄영양원 균체)을 제공함으로써 사료 효율을 개선할 수 있다. 아울러 메탄영양균들이 만드는 비타민, 카로티노이드 등의 유익한 기능성 물질들도 반추동물이 공급받을 수 있어, 이들 성분의 알려진 효능/효과도 누릴 수 있다.

[0068] 본 발명의 사료 조성물은 반추 동물의 사료에 포함되는 통상의 성분들을 더 포함할 수 있다.

[0070] 또한, 본 발명은 메탄영양박테리아를 포함하는 반추 동물용 사료 첨가제 조성물에 관한 것이다.

[0071] 메탄영양박테리아는 앞서 예시된 것일 수 있다.

[0072] 본 발명의 사료 조성물은 메틸영양박테리아를 더 포함할 수 있다. 이는 앞서 예시된 것일 수 있다.

[0073] 급여 대상인 반추 동물은 예를 들면 그 메탄영양박테리아 또는 메틸영양박테리아의 유래 반추 동물과 동일 종일 수 있다.

[0074] 본 발명의 조성물에 사용되는 박테리아는 예를 들면, 메탄영양박테리아와 메틸영양박테리아의 컨소시엄일 수 있다. 이는 예를 들면 메틸로시스티스속 박테리아와 메틸로박테리움속 박테리아일 수 있다.

[0075] 본 발명의 사료 첨가제 조성물은 통상의 반추 동물용 사료에 첨가될 수 있다. 그 첨가량은 특별히 한정되지 않으며, 예를 들면 사료 100중량부 대비 0.1 내지 50중량부, 0.1 내지 30중량부, 0.1 내지 10중량부 등일 수 있다.

[0076] 본 발명의 사료 첨가제 조성물은 반추위 발효 과정의 부산물인 메탄을 제거하여 발효 효율을 향상시킬 수 있다. 또한, 메탄영양균이 메탄을 대사해서 반추동물에게 추가적인 에너지원(휘발성 지방산)과 단백질(메탄영양원 균체)을 제공함으로써 사료 효율을 개선할 수 있다. 아울러 메탄영양균들이 만드는 비타민, 카로티노이드 등의 유익한 기능성 물질들도 반추동물이 공급받을 수 있어, 이들 성분의 알려진 효능/효과도 누릴 수 있다.

[0078] 이하 실시예를 들어 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다.

[0080] **실시예**

[0081] **방법**

[0082] **메탄영양성 컨소시엄의 농축 및 분리**

[0083] 한우 소 반추위 내부의 시료를 채취한 후에 즉시 10mM $CuCl_2$ (NMS-Cu)이 첨가된 멸균 질산염 미네랄 염 배지(ATCC 배지: 1306)에 담근 다음, 30° C에서 메탄과 공기가 20:80비율로 혼합된 혼합 기체로 충진된 혈청병 안에서 1주일 동안 배양하였다. 1주일 후, 농축액을 1:10 비율로 희석하여 신선한 NMS-Cu 배지에 넣고 위에서 언급한 동일한 조건으로 1주일 더 배양하였다. 이 절차를 8주 동안 반복하여 메탄영양균의 농축을 보장하는 동시에 종속영양균의 성장 가능성을 줄였다. 메탄영양균의 존재를 모니터링하기 위해 농축 과정의 전체 기간 동안 매주 액체 배양액에서 DNA를 추출하고 pmoA 및 메탄영양균 16S rRNA 특이 프라이머를 사용하여 스크리닝하였다(표 1).

[0084] 농축 과정에서 메탄영양균의 성장을 모니터링하는 데 사용되는 프라이머

표 1

[0085]

Primer Name	Target	Sequence	SEQ ID NO
MethT1dF	Methylomonas Methylobacter Methylomicribium	CCTTCGGGMGCYGACGAGT	5
MethT1bR	Methylococcus	GATTCYMTGSATGTCAAGG	6
27F	Methylocystis	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	7
MethT2R	Methylosinus	CATCTCTGRCSAYCATACCGG	8
Tlmob117F	Methylococcaceae	GTAAYGCRTAGGAATCTGCC	9
Tlmob1144f	(family)	CGGCAGTCTCCYTAGAGTTC	10
Tllmob445F	Methylocystaceae Beijerinckaceae	GGGAMGATAATGACGGTACCWGG	11
Tllmob1416F	(family)	GCCTTCGGGTARARCCAACTCC	12
A189b	pmoA	GGKGACTGGGACTTCTSG	13
mb661	(not clear)	CCGGMGCAACGTCYTTACC	14
mmox r1403	sMMO	TGGCACTCGTAGCGCTCCGGCTC	15
mmox f901		TSAARACSTGGAACCGCTGGGT	16

[0086] 8주 후에 액체 배양액을 NMS-Cu 한천 플레이트에 도말하였다. 메탄영양균을 분리하기 위해 여러 개의 콜로니를 골라 반복적으로 계대 도말을 하였다. 마지막으로, 콜로니를 0.2um 기공 크기의 76mm 폴리카보네이트 멤브레인 필터(Sterlitech PCT027630)에 도말하여 옮겼다. 도말하는 동안 멤브레인은 지지대 역할을 하는 NMS-Cu 한천 플레이트 위에 놓였다. 그런 다음 폴리카보네이트 멤브레인 필터를 즉시 30mL의 신선한 NMS-Cu 배지가 들어 있는 페트리 접시로 옮겨 폴리카보네이트 멤브레인이 배지 위에 떠 있도록 하였다. 그런 다음 접시를 30° C에서 메탄과 공기가 (50:50) 혼합된 밀폐된 챔버에 넣었다. 멤브레인을 정기적으로 관찰하고 2일마다 메탄-공기 혼합물로 챔버를 새로 교체하였다. 2주 배양 후 분홍빛이 도는 콜로니가 관찰되었다. 그런 다음 콜로니를 신선한 액체 NMS 배지로 직접 옮기고 혈청 병에서 30° C에서 180rpm으로 1주일 동안 흔들어 배양하였다. 분리된 콜로니는 NC75PC, NC77PC 및 NC52PC로 명칭하였다.

[0088] **생육 특성 분석**

[0089] 메탄영양균 생육 실험은 30ml의 NMS-Cu 배지가 포함된 120ml 혈청병에서 수행되었다. 병은 부틸 고무 마개로 밀폐하고 20%(v/v) CH4와 80% (v/v)공기를 혼합한 기체를 충진하였다. 모든 생육 실험에 동일한 메탄:공기 혼합물을 사용하였다. 3종의 메탄영양균 분리주(NC52PC, NC75PC, NC77PC)를 반추위 온도인 39° C와 진탕속도 180rpm으로 진탕배양기에서 배양하면서 성장 속도를 측정하였다. 생육량은 Ultrospec 10 세포 밀도 측정기(Amersham Biosciences)에서 흡광도(OD600)로 관찰하였다. 배양 과정중의 메탄 소모량은 가스 크로마토그래피 불꽃 이온화 검출기(GC-FID)를 이용해서 분석하였다. 모든 실험은 3반복으로 수행되었다.

[0091] **형태학적 특성 분석**

[0092] 메탄자화 분리균주 NC52PC의 살아있는 세포를 오일 에멀젼을 사용하여 400배 배율의 위상차 현미경(카메라가 장착된 일본 현미경 Nikon 80i)으로 관찰하였다. 전자현미경으로 분리균주의 정확한 형태를 보기 위해서 시료를 전처리하고 주사전자현미경(SEM) (Zeiss 모델 EVO-MA-15 SEM)으로 관찰하였다.

[0094] **게놈 특성 분석**

[0095] 고분자량 게놈 DNA는 제조업체의 지침에 따라 Promega의 Wizard® HMW DNA 추출 키트를 사용하여 NC52PC에서 추출하였다. 박테리아 게놈 시퀀싱은 정확성과 완성도를 높이기 위해 Oxford Nanopore Technologies long reads (ONT)와 Illumina short reads sequencing technology (NovaSeq6000)을 조합하여 수행하였다. 조립된 게놈은 Prokka 버전 1.14.6을 사용하여 주석을 달았다. 두 개의 완전한 게놈과 두 개의 원형 플라스미드의 원형 염색체 지도는 Proksee 도구를 사용하여 생성되었다. 분류학적 위치를 추가로 확인하기 위해 인실리코 DNA-DNA 혼성화(in silico DNA-DNA hybridization; isDDH)와 평균 뉴클레오티드 동일성(average nucleotide identity; ANI), 평균 아미노산 동일성(average amino acid identity; AAI)을 계산하였다. Type (Strain) Genome Server, OrthoANIu algorithm 및 EZBioCloud의 EzAAI 도구를 사용하여 밀접하게 관련된 종에 대해서도 isDDH, ANI 및 AAI 값을 계산하였다.

[0097] **시험관 반추위 발효**

[0098] 반추위 캐뉼러 시술을 받은 홀스타인-프리지안 젖소 2마리(체중 874±69kg, 8세)로부터 시험관 반추위 발효를 위한 반추위액을 채취하였다. 젖소들은 깨끗한 식수와 미네랄 블록을 자유롭게 이용할 수 있는 상태에서 60% 농축 사료와 40% 블루그래스(*포아 프라텐시스*)를 매일 두 번 먹었다. 아침 먹이를 주기 전에 반추위 내용물을 보온병에 수집하여 즉시 실험실로 운반하였다. 그런 다음 네 겹의 수술용 거즈를 통해 짜내고 걸러서 호박색 병에 모았다. 그 후 30분 동안 질소로 병 내부의 기체를 치환한 다음 뚜껑을 덮고 39° C로 온도를 유지하여 보관하였다. 그런 다음 여과된 반추위액을 혐기성 환경을 유지하면서 완충액과 1:3(v/v)의 비율로 혼합하였다. 완충된 반추위액 혼합물 30ml을 순수한 질소 가스 흐름 아래에서 160ml 혈청병에 분배하였다. 각 혈청병에는 1mm 체를 통과하도록 곱게 분쇄한 블루그래스 80%와 농축 사료 20%로 구성된 기질 0.3g이 열로 밀봉한 나일론 백에 들어 있다. 이 시험관 발효는 두 개의 실험 세트로 구성되었으며, 한 세트에는 $5x10^7$ CFU/mL NC52PC를 접종하고 대조군 세트에는 NC52PC를 접종하지 않았다. 각 세트는 0, 12, 24시간 배양 시점에 각 시점당 3개의 복제본으로 구성되었다. 완충 반추위액, 기질 및 NC52PC 접종물(대조군 세트에는 접종물 없음)을 혈청병에서 혼합한 후 질소로 15분 동안 더 내부 기체를 치환한 후에 부틸고무 뚜껑을 덮고 밀폐해서 100rpm, 39° C 조건으로 진탕배양기에서 배양하였다.

[0099] 0, 12, 24시간 배양 동안 각 병의 총 가스 생산량은 압력 트랜스듀서 기법(Tagliapietra)을 사용하여 기록하였다. 양방향 스톱콕이 장착된 주사기를 사용하여 각 병에서 헤드스페이스 가스(10mL)를 수집한 후 공기가 배출된 가스 바이알로 옮겼다. 메탄 농도는 가스 크로마토그래피 및 화염 이온화 검출기로 측정하였다. 0시간, 12시간, 24시간 배양 후 10mL의 액체 샘플을 채취한 다음 DNA 추출 및 미생물 군집 분석을 위해 즉시 -80° C에서 동결하였다. pH 측정기(LaquaTwin, Horiba, 영국)를 사용하여 pH를 측정하였다. 배양 기간이 완료된 후 잔여 사료가 담긴 나일론 백을 찬 수돗물로 헹구고 80° C의 오븐에서 48시간 동안 건조시켰다. 나일론 백이 건조되면 실온으

로 식힌 후 무게를 측정하였다. 건조물 소화율은 초기 무게에서 나일론 백을 건조시킨 후의 무게를 빼서 계산하였다.

[0101] **동물 실험 설계**

[0102] 본 연구는 순천대학교 부속 동물농장에서 진행되었으며, 모든 동물실험에 대해 대학 동물실험윤리위원회의 승인을 받았다. 한우 거세우 12마리(*Bos taurus*, 15개월령, 초기 체중 448±43kg)를 대상으로 3회 반복 3X3 라틴 정사각형 설계로 각각 28일간 총 84일간의 실험 기간을 두고 실험을 진행하였다. 실험 설계는 17일의 사료 급여 기간, 3일의 데이터 수집 및 분석 기간, 1일의 샘플 수집 및 무게 측정 기간, 11일의 휴지 기간의 네 단계로 구성된 주기적 패턴을 따랐다. 세척 기간 동안 소들은 이전 주기의 잔류 미생물을 완전히 제거하기 위해 사료 보충제 없이 동일한 사료를 먹었다. 처음에 동물들을 체중별로 그룹화한 다음, 사료 보충제를 달리한 세 가지 처리 중 하나에 무작위로 배정하였다: 대조군(**CON**), 밀기울 20g과 NC52PC 균이 없는 NMS-Cu 배지 20ml 혼합; 저농도 NC52PC(**LOW**), 밀기울 20g과 $3x10^{7}$ CFUs/ml의 NC52PC가 현탁된 NMS-Cu 배지 20ml혼합; 고농도 NC52PC(**HIGH**), 밀기울 20g과 $3x10^{8}$ CFUs/ml의 NC52PC가 현탁된 NMS-Cu 배지 20ml 혼합. 실험동물에게는 농축액 8.5kg과 조사료(블루그래스) 3.5kg을 70.8:29.2의 비율로 혼합한 표준 사료를 먹였습니다. 자세한 영양 성분은 표 2에 나와 있다. 모든 처리 혼합물은 매주 준비하여 냉장 보관한 후 일일 사료 급여량에 완전히 혼합하였다. 사료 급여는 하루 4회 실시했으며, 보충제는 오전 09:00에 제공하였다.

[0104] 동물 실험에 사용된 사료의 영양 성분

표 2

[0105]

Chemical composition, % of DM	Value (%)
Moisture	10.52
Crude protein	14.10
Crude fat	3.08
Crude fiber	7.37
Total ash	6.06
Calcium	1.40
Potassium	0.54
Acid detergent fiber (ADF)	12.53
Neutral detergent fiber (NDF)	26.41

[0107] **CH_4 배출량 측정**

[0108] 장내 메탄(CH_4) 배출량은 GreenFeed(GF) 장치(C-Lock, Rapid City, SD, USA)를 사용하여 실험환경에 맞게 약간 수정한 Hristov 실험법에 따라 평가하였다. 실험을 시작하기 전에 모든 실험동물은 GF 장치에 적응하기 위한 훈련을 받아 잠재적인 심리적 스트레스를 최소화하였다. CH_4 배출량은 각 측정 기간 동안 3일 연속으로 8개의 다른 간격으로 모니터링 되었다. 급여 시간 기준으로 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21시간 간격으로 3일간 측정을 실시하였다. 넓은 우리의 한쪽 구석에 GF 장치를 배치하고, 각 측정 간격마다 실험동물을 개별 외양간에서 이 실험 우리로 순차적으로 이동시켰다. 측정하는 동안 실험동물들이 GF 장치에 접근하여 후드 내에서 올바른 고개 숙인 자세를 취하도록 유도하기 위해 당밀로 코팅된 농축 펠릿(250-300g/회)이 제공되었다. 이 때에 섭취한 펠릿의 양은 건조 물질 섭취량(DMI) 계산에 포함되지 않았다. 동물의 GF 장치 출입 시간, 표준 가스 교정 세부 정보, CO_2 회수 타이밍 및 가스 방출 측정을 포함한 모든 관련 데이터는 C-Lock으로 전송되었다. CH_4 생성량(g/d) 데이터는 웹 기반 데이터 관리 시스템을 사용하여 계산하였다. 또한 CH_4 생성율(g/kg DMI)과 CH_4 생성도(g/d/kg BW 0.75)도 계산하였다.

[0110] **반추위액 시료 수집 및 직장 체온 측정**

[0111] 동물실험 16일째에 아침 사료급여 시간 전에 구강 튜브를 사용하여 각 소에서 반추위액을 채취하였다. 타액에 의한 오염을 방지하기 위해 처음 300mL의 반추위액은 버렸다. 채취 직후, pH 측정기(SevenCompactTM pH/Ion meter S220, Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland)를 사용하여 반추위 pH를 측정하였다. 그 후, 각 반추위액 시료를 3개의 개별 시료로 분획하고 드라이아이스에 넣어서 실험실로 운반하였다. 이후 암모니아 질소(NH_3-N), 휘발성 지방산(VFA), 반추위 미생물 등을 추후 분석하기 위해 -80° C에서 보관하였다. 또한 반추위액 시료 채취 당일 오후 12시경에 디지털 온도계(WPT-1, CAS, Yangju, Korea)를 사용하여 소의 직장 온도(RT)를 측정하였다.

[0113] **반추위 NH_3-N 및 휘발성 지방산 농도 분석**

[0114] NH_3-N 농도는 Chaney와 Marbach가 만든 프로토콜에 따라 Libra S22 분광광도계(CB40FJ, Biochrom, Cambourne, UK)를 사용하여 측정하였다. VFA 농도는 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC; Agilent Technologies 1200 series, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany)를 사용하여 측정하였다. HPLC를 수행하기 위해 UV 검출기(210nm 및 220nm로 설정), METACARB87H 컬럼(Varian, Palo Alto, CA, USA) 및 완충 용매(0.0085 N H_2SO_4; 유속 0.6 mL/min)를 사용하였다.

[0116] **계산 및 통계 분석**

[0117] DMI, CH4 배출량, 반추위 발효, 반추위 미생물군에 대한 모든 데이터는 SAS의 혼합 절차를 사용하여 분석하였다. 여기서는 품종과 미량 미네랄을 요인으로 고려하였다. 그런 다음 일반 선형 모델과 Duncan의 다중 범위 테스트를 사용하여 품종 간 차이가 있는지 테스트하였다. 모든 분석은 SAS(version 9.4, SAS Institute, Cary, NC, USA)를 사용하여 수행하였다. 통계적 유의성은 p-값 <0.05로 설정하였다.

[0119] **결과**

[0120] **NC52PC의 분리 및 특성화**

[0121] 메탄영양균은 주로 호기적 환경에서 분리되고 배양되기 때문에 혐기적 조건으로 알려진 반추위에서 분리되거나 반추위 환경조건에서 배양된 적은 없다. 이 발명에서는 반추위 샘플에서 호기성 메탄영양균을 분리하고 배양하는데 성공하였다. 반추위에도 호기성 메탄영양균이 반추위 상피를 통해 반추위로 유입되는 산소로 인해서 존재할 가능성이 높기 때문이다. 한천 플레이트에서 일련의 하위 배양과 반복적인 도말을 통해 콜로니를 분리하고 다시 폴리카보네이트 멤브레인으로 옮겨 한천 플레이트에서 발견될 수 있는 종속영양균의 오염을 최소화하였다.

[0122] 폴리카보네이트 멤브레인에서 얻은 3종의 유망 분리균주(NC75PC, NC77PC, NC52PC)를 30° C와 39° C의 반추위 온도에서 생육량을 테스트하였다. 분리주 NC75PC, NC77PC, NC52PC는 30° C에서 36시간에 각각 0.1164 h^{-1} , 0.1172 h^{-1} , 0.0915 h^{-1} 의 비성장속도로 2 이상의 OD600 값으로 성장하였다(도 1). 그러나 39° C에서 배양했을 때 분리주 NC75PC와 NC77PC의 성장 속도는 각각 0.0308 h^{-1} 와 0.0275 h^{-1} 로 크게 감소하였다. 반면, NC52PC는 39° C에서도 견고하게 성장하여 비성장속도가 30° C와 비슷한 0.1075 h^{-1}를 나타내서 향후 시험관 및 생체 반추위 발효 실험에 사용하였다.

[0124] 세 가지 반추위 분리주의 성장률

표 3

	Temperature (°C)	μmax (hr^{-1})	Td (h)
NC52PC	30	0.0915±0.0030	7.6±0.25
	39	0.1075±0.0094	6.5±0.58
NC75PC	30	0.1164±0.0023	6.0±0.12
	39	0.0308±0.0016	22.6±1.18
NC77PC	30	0.1172±0.0014	5.9±0.07
	39	0.0275±0.0046	25.7±4.50

Data are expressed as mean ± standard deviation (SD).

[0125]

[0127] **SEM:** 주사 전자 현미경으로 NC52PC를 검사한 결과 형태학적으로 뚜렷한 두 가지 세포 유형이 발견되었다(도 2). 한 유형의 세포는 약 2.4~2.9 x 0.8~1 마이크론 크기의 매끄러운 표면을 가진 막대 모양의 간균으로 나타났다. 두 번째 유형은 대략 1.3~1.5 x 0.8~1 마이크론 크기의 거친 표면을 가진 곡선형 구균으로 나타났다. 또한 게놈 시퀀싱을 통해 두 개의 게놈 DNA가 발견되었는데, 하나는 메탄영양균인 *메틸로시스티스 에코노이데스* (*Methylocystis echinoides*)와 밀접한 관련이 있고 다른 하나는 메틸영양균인 *메틸로박테리움 오르가노필럼* (*Methylobacterium organophilum*)과 유사한 것으로 밝혀졌다. 따라서 표면이 매끄러운 막대 모양의 간균을 *메틸로박테리움* 종으로, 거친 표면을 가진 다른 곡선형 구균은 *메틸로시스티스* 종으로 추정하였다.

[0129] **게놈 분석:** 분리주 NC52PC의 게놈을 하이브리드 롱-리드 및 숏-리드 시퀀싱을 사용하여 분석하였다. 시퀀싱 분석을 통해 2개의 원형 염색체, 2개의 원형 플라스미드로 구성된 총 4개의 콘티그(contigs)를 얻었다. BlastX 분석에 따르면, 5.1 Mbp 크기의 큰 염색체는 *메틸로박테리움* 속과 유사성을 보였다. 3.95 Mbp 크기의 다른 염색체와 두 개의 플라스미드는 *메틸로시스티스* 속에 속한다. 두 플라스미드의 크기는 167 kb와 165 kb였다. GC 함량, tRNAs, rRNA, 유전자 및 단백질 수와 같은 게놈 특징은 Prokka를 사용하여 계산하였다(표 4). NC52PC의 각 종의 게놈과 밀접하게 관련된 종을 시각화한 결과는 도 3에 표시하였다.

[0131] NC52PC의 두 원형 염색체 게놈 특징

표 4

[0132]

Traits	*Methylobacterium* sp.	*Methylocystis* sp.
Genome size	5.07 Mbp	3.9 Mbp
Contigs	1	3
Circular	Yes	Yes
GC%	69.98	64.46
tRNA	150	150
rRNA	24	12
CDS	4683	3884
16S	4	2
*pmoA*s	-	2
Integrated plasmids	-	2
Genbank Accession No	CP168955	CP170127

[0133] NC52PC에 존재하는 *메틸로시스티스* 종과 *메틸로박테리움* 종의 게놈 기반 비교를 밀접하게 관련된 종들과 수행해서 평균 뉴클레오티드 동일성(average nucleotide identity, ANI), 인실리코DNA-DNA 혼성화(in silico DNA-DNA hybridization, DDH), 평균 아미노산 동일성(average amino-acid identity, AAI)을 계산했다. *메틸로시스티스* 분리균주와 가장 가까운 친척인 *메틸로시스티스 에키노이드*(*Methylocystis echinoides*) LMG27198 사이의 ANI,

AAI 및 DDH 값은 각각 81.1%, 81.4% 및 25.8%로 임계값(ANI 또는 AAI 95%, DDH 70%)보다 낮았다(표 5). 따라서 NC52PC의 *메틸로시스티스* 균주가 *메틸로시스티스과에* 속하는 *메틸로시스티스* 속의 새로운 종을 대표한다고 제안하였다. 마찬가지로 NC52PC에 있는 *메틸로박테리움 종의* 게놈을 밀접하게 관련된 *메틸로박테리움* 종과 비교한 결과, *메틸로박테리움 오가노필룸*(*Methylobacterium organophilum*) WPA_B와 각각 98.6%, 98.8%, 88.5%의 ANI, AAI, DDH 값으로 가장 높은 유사성을 보였다(표 5). 따라서 NC52PC 컨소시엄의 *메틸로박테리움* 종은 *메틸로박테리움 오가노필룸*일 가능성이 가장 높다.

[0134] 메탄영양균과 메틸영양균의 컨소시엄인 NC52PC에서 메탄영양균만을 추가로 분리하는 것은 매우 어려웠고 분리된 메탄영양균의 생육속도는 심각하게 저해되었다. 메탄 저감을 극대화하기 위해서는 메탄을 빠르게 대사 할 수 있는 높은 생육속도의 메탄영양균을 사용하는 것이 이상적이다. 따라서 반추위 발효에서의 메탄 저감을 위해서는 순수한 메탄영양균 보다는 메탄영양균과 메틸영양균의 컨소시엄을 활용하는 것이 최선일 수 있다. 메틸영양균은 메탄 산화 과정에서 생성된 과잉 메탄올을 대사하여 메탄올 독성을 감소시키고 메탄영양균의 성장을 촉진할 수 있다. 또한 메틸로시스티스와 메틸로박테리움 오가노필룸 간의 필수 영양소 교환이 이 컨소시엄의 전반적인 성장 성능을 촉진할 수 있다.

[0136] NC52PC의 메틸로시스티스 속과 메틸로박테리움 속과 다른 밀접한 관련 종의 게놈 비교. isDDH: 인실리코 DNA-DNA 혼성화, ANI: 평균 뉴클레오티드 동일성, AAI: 평균 아미노산 동일성.

표 5

[0137]

Rumen isolate (NC52PC)	Closely related members	isDDH (%)	ANI(%)	AAI(%)
***Methylobacterium* spp.**	*Methylobacterium organophilum* WPA_B	88.5 [87.6-90.3]	98.59	98.79
	Methylorubrum populi BJ001	26.6 [25.4-28.0]	81.68	78.16
	Methylorubrum extorquens AM1	24.5 [23.9-25.1]	80.77	77.58
	Methylorubrum zatmanii LMG 6087	28.2 [27.7-29.2]	80.75	77.48
***Methylocystis* spp.**	*Methylocystis echinoides* LMG 27198	25.76 [24.6-27.2]	81.07	81.35
	Methylocystis iwaonis JCM 34278T	23.66 [22.8-24.4]	80.39	80.42
	Methylocystis parvus OBbp	23.9 [23.4-24.7]	80.02	80.46
	Methylocystis rosea SV98	19.2 [17.8-21.9]	77.22	74.67
	Methylosinus trichosporium OB3b	18.5 [15.8-21.8]	75.97	69.36

표 6

[0139]

SUBID	BioProject	BioSample	Localid	Accession	Organism
SUB14691566	PRJNA1155250	SAMN43453749	Contig3C	CP170125(plasmid 1)	Methylocystis sp. NC52PC
SUB14691566	PRJNA1155250	SAMN43453749	Contig4	CP170126(plasmid 2)	Methylocystis sp. NC52PC
SUB14691566	PRJNA1155250	SAMN43453749	Contig2C	CP170127(Genome)	Methylocystis sp. NC52PC
SUB14700942	PRJNA1155264	SAMN43454258	-	CP168955(genome)	Methylobacterium organophilum NC52PC

[0141] **시험관 반추위 발효 매개변수**

[0142] 시험관 반추위 발효 동안 모든 샘플링 지점에서 대조군과 NC52PC를 접종한 샘플 간에 메탄 생성을 제외한 pH, 총 가스 생성량, 소화율에 유의미한 차이가 관찰되지 않았다(p-값 > 0.05). 24시간 후, 혈청병의 총 헤드스페이스 부피는 130ml에서 160ml 이상으로 증가하였다. 건조 물질 분해는 12시간에 25%에서 24시간에 32% 이상으로

계속 증가하여 실험 기간 동안 반추위 발효가 활발히 진행되었음을 나타낸다. 또한 반추위 발효 과정에서 다양한 유기산이 합성되어 두 샘플 모두 pH 수치가 6.5에서 5.8로 떨어졌다. NC52PC를 접종했을 때 메탄 생성량은 12시간과 24시간에 각각 41.7%와 53.6%로 크게 감소하였다(p-값 <0.01)(도 4). 그리고 NC52PC 접종 그룹에서 12시간부터 24시간까지 메탄 생성량의 증가 속도가 느리다는 것은 지속적인 메탄영양 활성을 보여준다. 메틸로시스티스의 개체수가 24시간 동안 비교적 안정적으로 유지되었기 때문에 메탄 소비가 지속되었을 수 있다. NC52PC는 생육과 메탄 산화를 위해 기본적으로 산소를 필요로 하지만 무산소 조건에서도 NC52PC가 메탄 산화 및 생육 능력을 가지는지 확인하기 위해 0.60g/L 시스테인을 보충한 NMS-Cu 배지에서 무산소 상태로 20% 메탄을 사용하여 메탄 소모를 실험하였다. 그 결과 메탄 농도가 180,000ppm에서 24시간과 48시간 후에 각각 168,000ppm과 160,000ppm으로 감소한 것으로 나타났다. 즉 NC52PC는 산소 없이도 48시간 동안 약 20,000ppm의 메탄을 소비할 수 있었다. 이는 호기성 메탄영양성 NC52PC의 다양한 활용성과 산소 공급 부족에도 불구하고 메탄을 안정적으로 산화할 수 있는 능력을 강조한다. 혐기성 환경에서 호기성 메탄영양균에 의한 메탄 산화는 반추위 내용물에서 이용 가능한 다른 대체 전자 수용체를 활용함으로써 가능하다. 메틸로모나디아과 및 메틸로시스타과에 속하는 미생물들은 산소 제한 하에서 질산염/아질산염 또는 광물질 산화물 의존성 메탄 산화를 할 수 있는 것으로 보고되었다. NC52PC는 반추위와 같은 무산소 환경에서 탈질화 또는 미네랄 환원 과정을 활용하도록 진화했을 수 있다.

[0144] **NC52PC가 시험관 내 반추위 미생물 구성에 미치는 영향**

[0145] 24시간 샘플의 기술 복제본 3개와 0시간 샘플의 복제본 1개로부터 대조군과 NC52PC 모두에서 총 게놈 DNA를 추출하였다. 24시간 시험관 발효 후 대조군과 NC52PC 샘플 간의 반추위 미생물의 구성, 풍부도, 다양성의 차이를 확인하기 위해 16S rRNA(V3-V4) 유전자 염기서열 분석을 수행하였다. 전체적으로 총 18개의 박테리아 문과 276개의 박테리아 속이 통합 실험 샘플에서 검출되었다. 박테로이데테스, 펌미쿠테스, 프로테오박테리아, 액티노박테리아가 전체 박테리아 ASV의 최대 80%를 차지하는 지배적인 문(phyla)이었다(도 5). 대조군에서는 프레보텔라가 가장 우세한 속(16.56%)이며, 그 다음으로 인테스티니모나스(4.21%), 아리스테엘라(4.20%), 석시니클라스텀(2.51%), 룸미노코커스(2.41%), 소달리필루스(2.17%), 렌티마이크로비움(1.63%), 비피도박테리움(1.41%), 게홍기아(1.39%), 팔루디박테리아(1.32%)가 우세한 것으로 나타났다. 한편, NC52PC 접종 샘플에서 가장 우세한 속은 메틸로시스티스(28.7%)였으며, 프리보텔라(9.5%), 아리스테엘라(3.2%), 소달리필루스(3.2%), 인테스티니모나스(3.16%), 메틸로박테리움(2.2%), 루미노코커스(1.74%), 세가텔라(1.61%), 석시니클라스티움(1.16%), 비피도박테리움(1.1%)이 그 뒤를 이었다. 메틸로시스티스가 NC52PC 샘플에서 우세한 속이기 때문에 프레보텔라, 아리스테엘라, 인테스티니모나스, 루미노코커스, 렌티마이크로비움 등 다른 우세한 박테리아 속의 상대적 풍부도는 현저히 낮았다(p-값<0.05).

[0146] 대조군과 NC52PC 모두 24시간 샘플의 고세균 군집은 대부분 메탄노브레비박터 속(대조군 78%, NC52PC 86%)이 지배적이었고, 메탄노마실리코커스와 메탄노스피에라가 그 뒤를 이었다. 반추위에서 우세한 메탄 생성 고세균인 메탄노브레비박터의 경우 24시간 후 상대적으로 그 수가 증가했기 때문에 NC52PC의 첨가는 메탄 생성 군집에 부정적인 영향을 미치지 않았다. 곰팡이 군집의 경우, 네오칼리마스티고마이코타, 아스코마이코타, 바시디마이코타의 세 문이 대조군과 NC52PC 샘플 모두에서 전체 곰팡이 ASV의 80% 이상을 차지하며 지배적이었다(도 5). 특히, 리그노셀룰로오스 분해에 관여하는 다양한 효소를 발현하는 네오칼리마스티고마이코타[43]가 약간 증가했는데, 이는 사료 소화를 촉진할 수 있다.

[0148] 알파 다양성을 분석한 결과, 24시간 샘플에서 박테리아 종 다양성(섀넌 지수)은 대조군 샘플이 NC52PC보다 유의하게 높았지만(p-값 < 0.05), 종 풍부도(차오 1 지수)에는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 또한, 고생물 다양성에는 영향을 미치지 않았지만 차오 1 지수는 NC52PC에서 대조 샘플보다 상당히 낮아서(p-값 < 0.05) 고생물 종 풍부도에는 유의미한 영향을 미쳤다. 또한 곰팡이 종의 다양성과 풍부함의 차이는 유의미하지 않았다(p-값 > 0.05).

[0150] **생체 내 반추위 발효**

[0151] 전반적으로 DMI(kg/d), 총 체중 증가량(kg), 사료 전환율(FCR)은 처리군 간에 큰 차이가 없었다(p > 0.05)(도 7). **CON**, **LOW**, **HIGH**의 반추위 발효 특성은 표 7에 나와 있다. **CON**의 부티레이트 및 총 휘발성 지방산(VFA) 생산

량은 **LOW** 및 **HIGH** 처리에 비해 현저히 낮았다. 이로 인해 NC52PC 처리 **LOW**(6.30) 및 **HIGH**(6.29)의 반추위 pH가 **CON**(6.55)보다 낮았을 수 있다. **LOW**와 **HIGH** 모두 암모니아 함량, 아세테이트, 프로피오네이트 및 A:P 비율을 포함한 다른 발효 특성에는 큰 영향을 미치지 않았다. 가장 중요한 것은 CH_4 배출량(g/d), CH_4 수율(g/kg DMI), CH_4 강도(g/kg BW0.75)가 대조군에서 **LOW** 및 **HIGH** NC52PC 처리 소 보다 유의하게 높았지만($p < 0.05$)(도 8), 총 CO_2 수준은 모든 처리 소 간에 유사하게 유지되었다(데이터 표시되지 않음).

[0153] 메탄영양 기반 프로바이오틱스가 pH, 암모니아-질소 및 휘발성 지방산 생성에 미치는 영향

표 7

[0154]

Item	Treatments[1]			SEM[2]	P-value
	CON	LOW	HIGH		
pH	6.55 ± 0.22	6.30 ± 0.23	6.29 ± 0.24	0.067	0.0191
NH_3-N (mg/dL)	3.89 ± 2.53	3.65 ± 2.14	3.32 ± 2.32	0.673	0.9163
Acetate (mmol/L)	57.93 ± 10.68	62.35 ± 7.66	65.75 ± 8.05	2.539	0.1567
Propionate (mmol/L)	18.74 ± 4.65	22.10 ± 6.21	22.48 ± 5.07	1.533	0.2934
Butyrate (mmol/L)	34.70 ± 20.20	41.13 ± 19.03	49.32 ± 29.52	6.616	0.0031
Total VFA (mmol/L)	111.37 ± 33.12	125.88 ± 22.14	137.55 ± 33.04	8.496	0.0050
A:P[3]	3.17 ± 0.59	2.93 ± 0.44	3.03 ± 0.61	0.157	0.7796

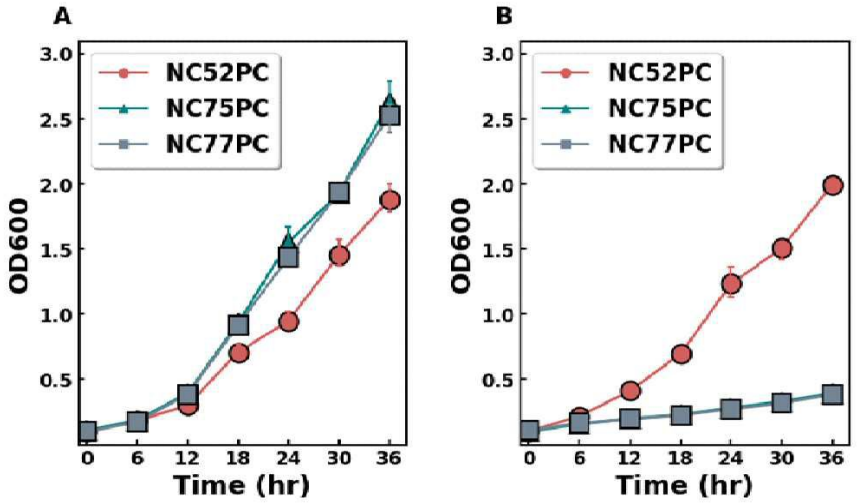
[0155] 데이터는 평균 ± 표준 편차(SD)로 표시됩니다. [1]처리: CON, 기본 식단(0.2% 밀기울); LOW, 기본 식단 + 0.2% 메탄영양균($3 X 10^7$ CFUs/ml); HIGH, 기본 식단 + 0.2% 메탄영양균($3 X 10^8$ CFUs/ml). [2]SEM, 평균의 표준 오차. [3]A:P, 아세트산 대 프로피온산 비율.

[0157] **결론**

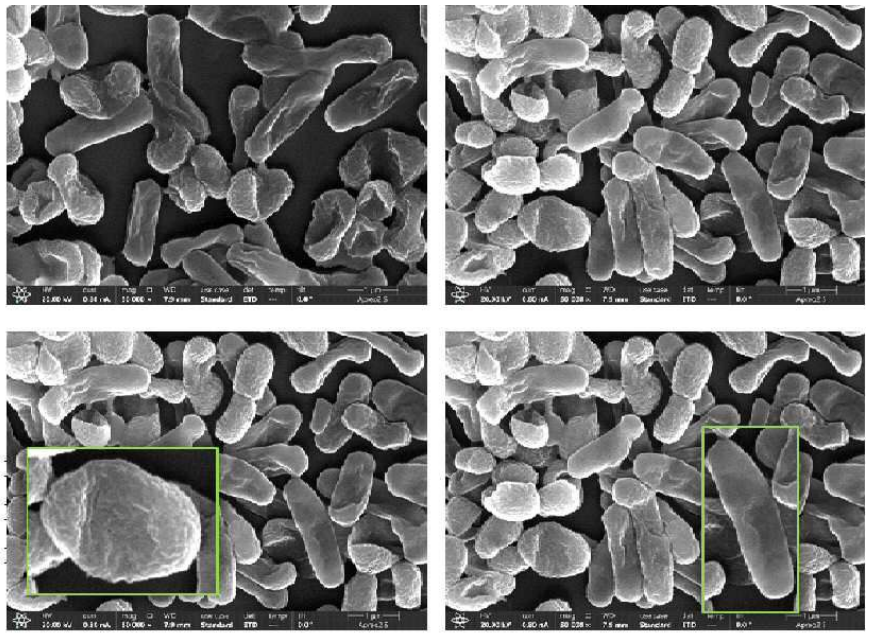
[0158] 연구 결과, 한우 12마리에 17일 동안 $3 X 10^8$ CFU/mL의 메탄영양균 기반 프로바이오틱스를 투여했을 때 메탄 배출량이 14% 이상 성공적으로 감소했으며 전반적인 동물 건강에 악영향을 미치지 않은 것으로 나타났다. 메탄영양 기반 프로바이오틱스는 반추 동물의 메탄 배출을 완화할 수 있는 엄청난 잠재력을 가지고 있으며 기후 변화에 대응할 수 있는 유망한 사료 첨가제로 사용될 수 있다.

도면

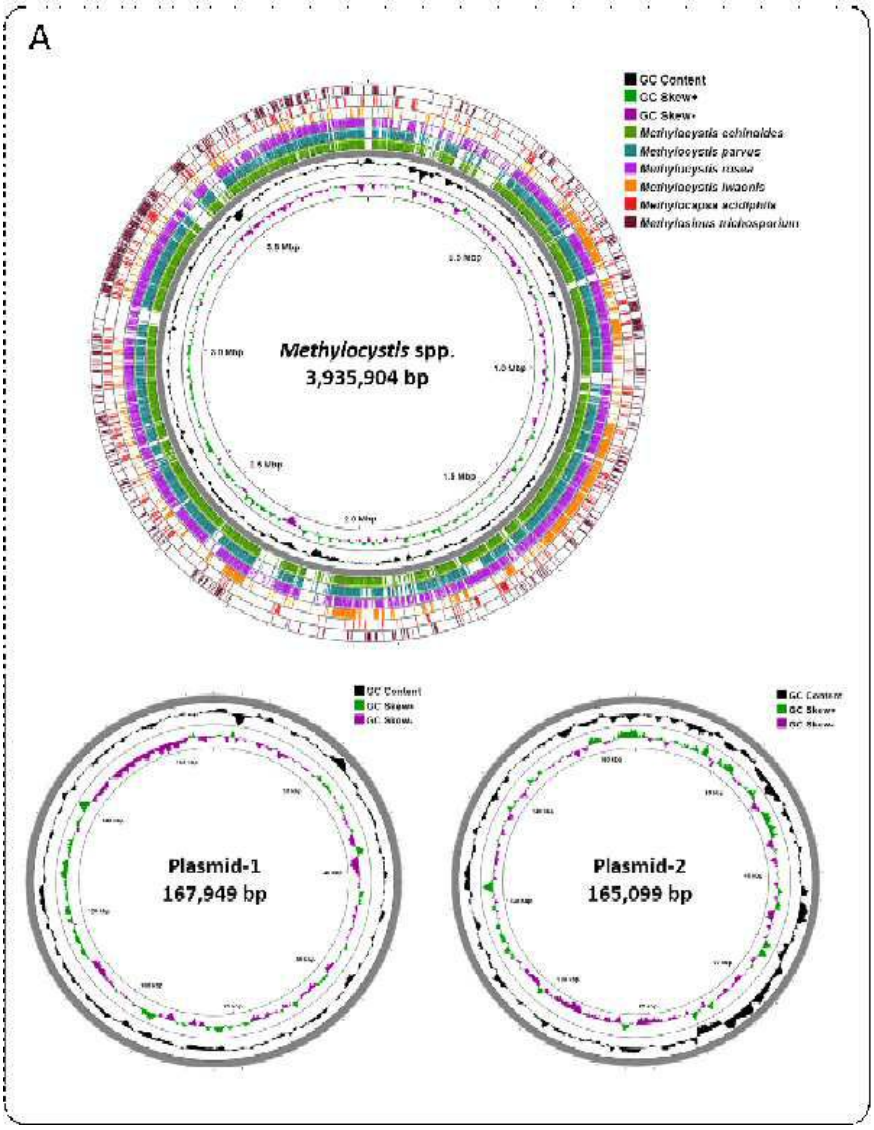
도면1


A
B
NC52PC
NC75PC
NC77PC
OD600
Time (hr)
0
6
12
18
24
30
36
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0

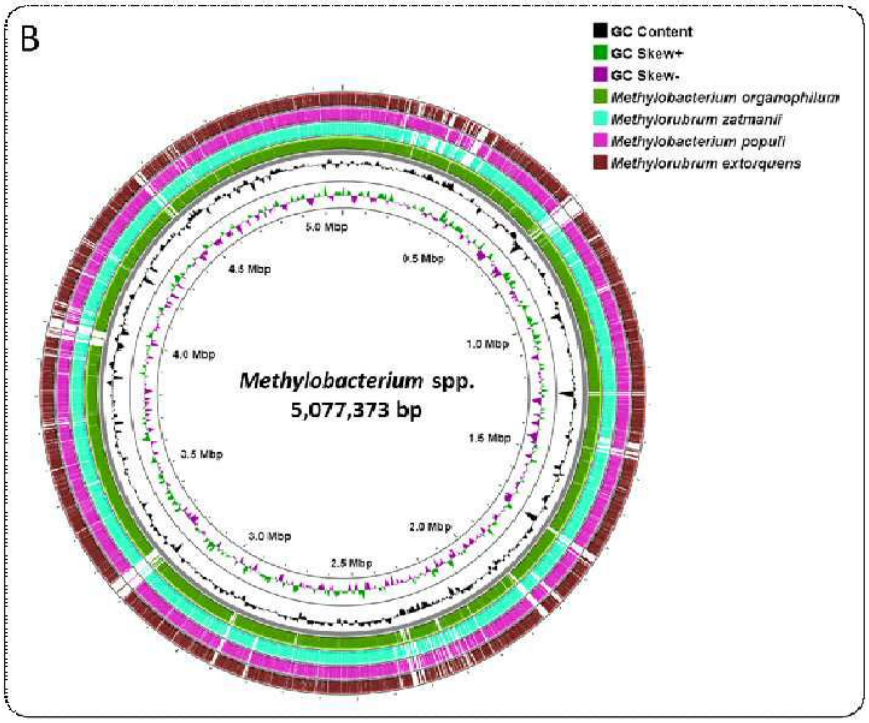
도면2



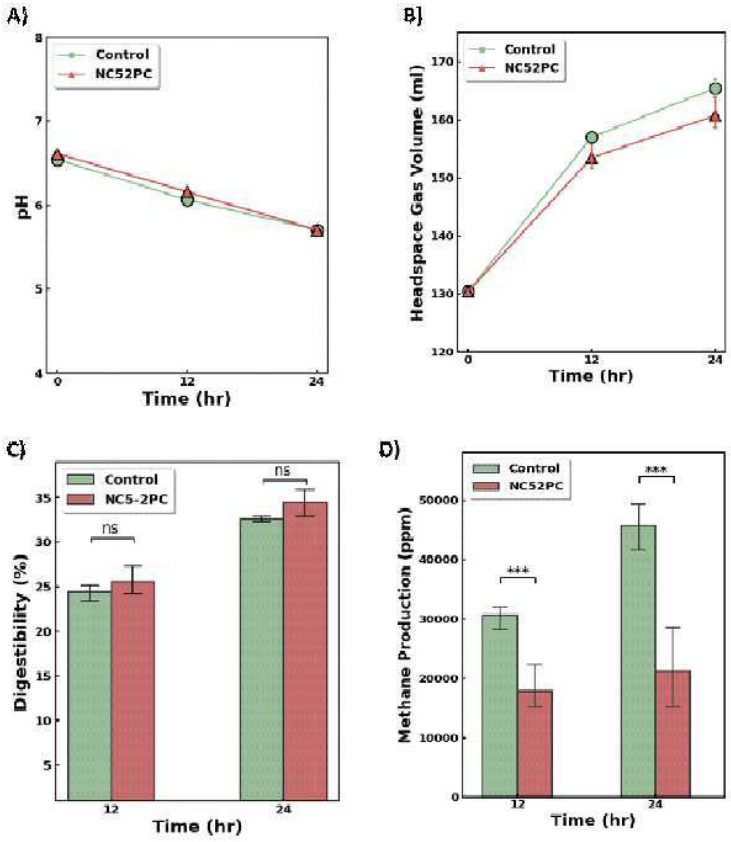
도면3a


A
GC Content
GC Skew+
GC Skew-
Methylocystis echinoides
Methylocystis parvus
Methylocystis rosea
Methylocystis iwaonis
Methylocapsa acidiphila
Methylosinus trichosporium
Methylocystis spp.
3,935,904 bp
Plasmid-1
167,949 bp
Plasmid-2
165,099 bp

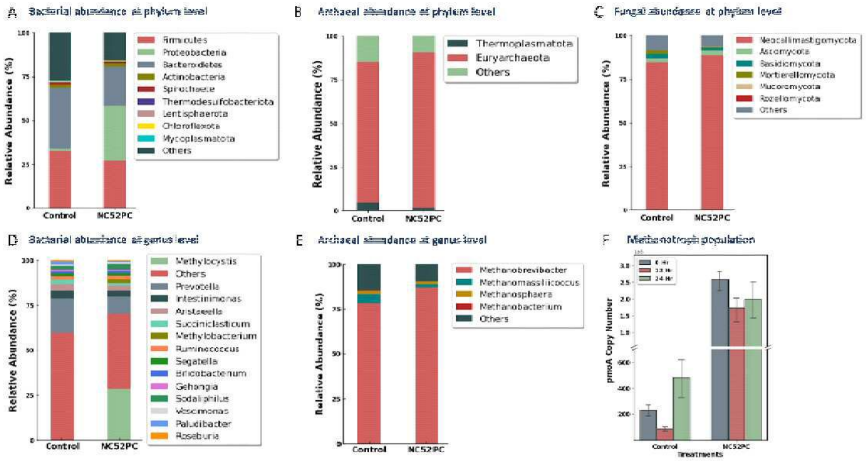
도면3b


B
GC Content
GC Skew+
GC Skew-
Methylobacterium organophilum
Methylorubrum zatmanii
Methylobacterium populi
Methylorubrum extorquens
Methylobacterium spp.
5,077,373 bp
0.5 Mbp
1.0 Mbp
1.5 Mbp
2.0 Mbp
2.5 Mbp
3.0 Mbp
3.5 Mbp
4.0 Mbp
4.5 Mbp
5.0 Mbp

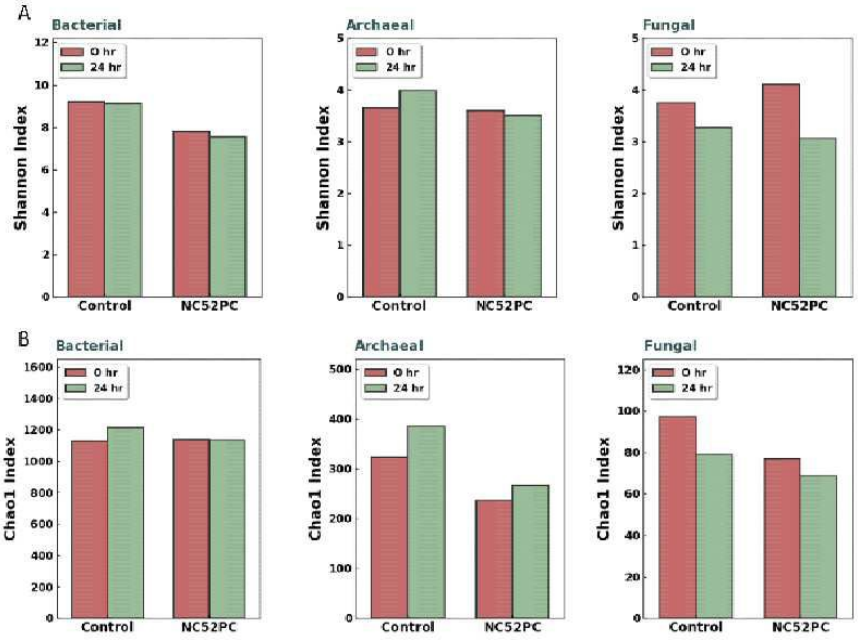
도면4


A)
Control
NC52PC
pH
Time (hr)
B)
Control
NC52PC
Headspace Gas Volume (ml)
Time (hr)
C)
Control
NC5-2PC
ns
ns
Digestibility (%)
Time (hr)
D)
Control
NC52PC
***
***
Methane Production (ppm)
Time (hr)

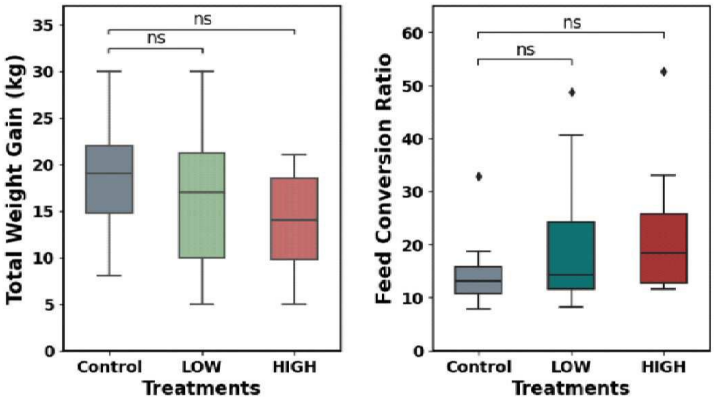
도면5


A Bacterial abundance at phylum level
B Archaeal abundance at phylum level
C Fungal abundances at phylum level
D Bacterial abundance at genus level
E Archaeal abundance at genus level
Relative Abundance (%)
Control
NC52PC
Firmicutes
Proteobacteria
Bacteroidetes
Actinobacteria
Spirochaetes
Thermodesulfobacteriota
Lentisphaerota
Chloroflexota
Mycoplasmatota
Others
Thermoplasmatota
Euryarchaeota
Others
Ascomycota
Basidiomycota
Mortierellomycota
Mucoromycota
Rozellomycota
Others
Methylocystis
Prevotella
Intestinimonas
Anaerovibrio
Succiniclasticum
Methylobacterium
Ruminococcus
Segatella
Eubacterium
Gehangia
Sodaliphilus
Vescimonas
Paludibacter
Roseburia
Methanobrevibacter
Methanomassiliicoccus
Methanosphaera
Methanobacterium
Others
pmoA Copy Number
Treatments

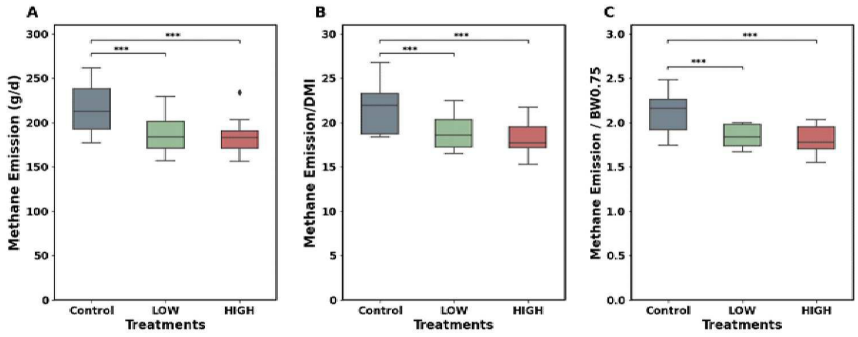
도면6


A
Bacterial
Archaeal
Fungal
Shannon Index
0 hr
24 hr
Control
NC52PC
B
Chao1 Index

도면7


Total Weight Gain (kg)
Feed Conversion Ratio
ns
Control
LOW
HIGH
Treatments

도면8


A
B
C
Methane Emission (g/d)
Methane Emission/DMI
Methane Emission / BW0.75
Control
LOW
HIGH
Treatments
***