



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년07월25일
(11) 등록번호 10-2003822
(24) 등록일자 2019년07월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 1/20 (2006.01) A23K 10/18 (2017.01)
A23K 50/10 (2016.01) A23K 50/20 (2016.01)
A23K 50/30 (2016.01) A23K 50/40 (2016.01)
A23K 50/75 (2016.01) C12R 1/23 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 1/20 (2013.01)
A23K 10/18 (2016.05)

(21) 출원번호 10-2018-0141028

(22) 출원일자 2018년11월15일

심사청구일자 2018년11월15일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020170024915 A
JP2013514085 A*
KR100351548 B1
PLUS ONE, Vol.8, pp.e53867(2013.01.16.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

주식회사한국야쿠르트

서울특별시 서초구 강남대로 577 (잠원동)

(72) 발명자

박수동

경기도 용인시 기흥구 고매동 우림힐인원 아파트
205-1003

김주연

경기도 수원시 영통구 덕영대로1555번길 20 롯데
캐슬 945동 515호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

경일호

전체 청구항 수 : 총 6 항

심사관 : 김지연

(54) 발명의 명칭 반려동물의 모질을 개선하는 효능을 갖는 유산균과 이를 포함하는 생균제 조성물을 유효성분으로 함유하는 모질 개선을 위한 동물 사료용 첨가제 및 동물 사료 조성물

(57) 요약

본 발명은 반려동물의 모질을 개선하는 효능을 갖는 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) HY7032 및 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) HY7506과 이를 포함하는 생균제 조성물을 유효성분으로 함유하는 모질 개선을 위한 동물 사료용 첨가제 및 동물 사료 조성물에 관한 것으로서, 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) HY7032 및 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) HY7506은 내산성, 내담즙성, 항균활성 및 반려동물의 모질을 개선하는 효능을 가지므로 이를 포함하는 생균제 조성물을 유효성분으로 함유하는 모질 개선을 위한 동물 사료용 첨가제 및 동물 사료 조성물 등으로 사용될 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A23K 50/10 (2016.05)

A23K 50/20 (2016.05)

A23K 50/30 (2016.05)

A23K 50/40 (2016.05)

A23K 50/75 (2016.05)

C12R 1/23 (2013.01)

(72) 발명자

심재중

서울특별시 관악구 관악로30길 27, 121동 1303호

장성식

경기도 의정부시 부용로 49, 102동 806호

이정열

경기도 양평군 서종면 통점길 63 404-1

심재현

경기도 용인시 기흥구 탑실로 152 213-901호

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) HY7032(수탁번호: KCTC13690BP) : 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) HY7506(수탁번호: KCTC13692BP)가 1:1의 중량비율로 혼합된 균주를 포함하는 생균제 조성물을 유효성분으로 함유하는 모질 개선을 위한 동물 사료용 첨가제.

청구항 4

청구항 3에 있어서,

상기 동물은 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 양, 염소, 닭, 오리, 거위 및 칠면조로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 모질 개선을 위한 동물 사료용 첨가제.

청구항 5

청구항 4에 있어서,

상기 개와 고양이는 애완용 개와 애완용 고양이인 것을 특징으로 하는 모질 개선을 위한 동물 사료용 첨가제.

청구항 6

청구항 3의 동물 사료용 첨가제를 포함하는 동물 사료 조성물.

청구항 7

청구항 6에 있어서,

상기 동물은 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 양, 염소, 닭, 오리, 거위 및 칠면조로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 동물 사료 조성물.

청구항 8

청구항 7에 있어서,

상기 개와 고양이는 애완용 개와 애완용 고양이인 것을 특징으로 하는 동물 사료 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 반려동물의 모질을 개선하는 효능을 갖는 유산균과 이를 포함하는 생균제 조성물을 유효성분으로 함유하는 모질 개선을 위한 동물 사료용 첨가제 및 동물 사료 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 반려동물의 모질을 개선하는 효능을 갖는 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) HY7032 및 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) HY7506와 이를 포함하는 생균제 조성물을 유효성분으로 함유하는 모질 개선을 위한 동물 사료용 첨가제 및 동물 사료 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0003] 2010년 약 1조원 수준이던 국내 반려동물 시장 규모는 2020년 5조 8100억원 규모로 성장할 전망이다(농협경제연구원, 2013). 국내 반려동물 사료시장은 해외 수입브랜드가 70% 이상의 시장을 점유하고 있는 형편이다. 네슬레, 마스와 같은 다국적 브랜드의 고급 사료에 대항하는 우리나라의 반려동물 사료업체(대한사료, 대주사료, CJ, 우성 등)의 사료는 중저가품 사료로서 최근 성장하는 고가품 사료에 대한 시장의 수요를 따라가지 못하고 있는 형편이다. 실제로 2015년의 경우 반려동물 사료 수입량은 최근 5년간 20만 톤인 데 비해 수출량은 3만톤 규모로서 약 7배의 차이가 나고 있으며, 고급화된 수입 사료와 국산 사료와의 가격차이로 인해 수출액 155억 원 대비 수입액이 약 1,775억 원으로 약 11.5배의 높은 격차를 보이고 있다.

[0005] 농림축산식품부에 따르면, 1인 가구의 증가, 저출산, 고령화 등에 따라 국내 반려동물 보유가구 비율은 2015년 현재 약 21.89%, 사육가구 수는 약 457만 가구로서 5가구 중 1가구가 반려동물을 키우고 있으며, 이는 지난 2010년의 17.4%에 비해 4.4%p 증가한 것이다. 반려동물 산업이 일찍이 발달했던 미국은 2015년 기준으로 전체 가정의 68%가 반려동물을 키우고 있으며, 반려동물 수는 약 2억 2천만 마리로 추정된다. KB금융지주경영연구소에 의하면 2012년 기준 일본 가구의 반려동물 보유비율은 약 16.8%이며 개와 고양이 2천만 마리를 기르고 있는 것으로 추산된다.

[0007] 특히, 사료 및 사료첨가제 산업을 살펴보면, BCC Research 시장보고서 "Compound Feeds and Additives Global Markets(2014.6)"에 따르면 전 세계 배합사료 시장규모의 경우, 2013년 856억 290만 달러 규모에서 연평균 성장률 6.6%로 성장하여 2018년에는 1,177억 9,520만 달러 규모로 성장할 것으로 예상된다. 한편, 전 세계 사료첨가제에 시장규모는 2013년 204억 3,960만 달러 규모에서 연평균 성장률 5.41%로 성장하여 2018년 266억 250만 달러 규모로 성장할 것으로 전망된다.

[0009] 이러한 시장 성장 전망에 비해 돼지, 닭, 소 등 산업 동물을 위주로 생균제의 연구 및 산업화는 활발하게 진행되어 왔으나(Korean J. Microbiol., Biotechnol., (2014), 42(3), 211-218; 한국공개특허 제10-2011-0065128호 등), 개와 고양이에 대한 생균제 연구는 극히 일부분에 지나지 않는 실정이다. 개에 대한 생균제 연구의 예로서, 여러 종의 숙주에서 분리된 생균제를 개의 장 점액을 사용한 경쟁적 배제 실험에 사용하였을 때, 병원균에 대하여 다른 숙주에서 분리된 생균제보다 개에서 분리된 생균제가 가장 좋은 효과를 보인다는 보고가 있을 뿐이다(Vet. Micro. (2003) 92:111-119). 특히, 생균제(프로바이오틱스)가 반려동물에서의 모질 개선에 미치는 영향에 대한 연구는 현저히 적다.

[0011] 이에 본 발명자들은 반려동물의 분변에서 내산성, 내담즙성 및 항균활성을 갖는 생균제(프로바이오틱스)를 선발하여 구강 투여 후 모질을 개선하는 효능을 발견하여 이를 사료 첨가제 및 생균제로 사용할 수 있음을 알아내고 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0013] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허공보 제10-0822038호(2008.04.16.)
(특허문헌 0002) 대한민국 등록특허공보 제10-1873682호(2018.07.02.)
(특허문헌 0003) 대한민국 등록특허공보 제10-1675035호(2016.11.22.)

비특허문헌

[0014] (비특허문헌 0001) Craig JM. Atopic dermatitis and the intestinal microbiota in humans and dogs. Vet Med Sci. 2016 Feb 23;2(2):95-105. doi: 10.1002/vms3.24.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0015] 본 발명은 반려동물의 모질을 개선하는 효능을 갖는 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) HY7032 및 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) HY7506와 이를 포함하는 생균제 조성물을 유효성분으로 함유하는 모질 개선을 위한 동물 사료용 첨가제 및 동물 사료 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0017] 상기한 목적을 달성하기 위하여, 반려동물의 모질을 개선하는 효능을 갖는 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) HY7032 및 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) HY7506와 이를 포함하는 생균제 조성물을 유효성분으로 함유하는 모질 개선을 위한 동물 사료용 첨가제 및 동물 사료 조성물을 제공하는 것을 특징으로 한다.
- [0019] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0020] 본 발명의 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) HY7032 및 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) HY7506는 반려동물의 분변에서 분리된 균주로서 내산성, 내담즙성 및 항균활성을 가지며, 반려동물의 모질을 개선하는 효능을 갖는 것을 특징으로 한다.
- [0022] 또한, 본 발명은 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) HY7032 및 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) HY7506를 포함하는 생균제 조성물을 유효성분으로 함유하는 모질 개선을 위한 동물 사료용 첨가제 및 동물 사료 조성물을 제공하는 것을 특징으로 한다.
- [0024] 특히, 본 발명의 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) HY7032 및 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) HY7506를 포함하는 생균제 조성물은 본 발명의 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) HY7032 : 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) HY7506가 1:1의 중량비율로 혼합된 혼합균주와 이스트 엑기스, 포도당 및 설탕을 포함하는 배지에 35℃에서 48시간 동안 정치 배양을 하여 생균제 조성물을 제조하는데, 이때, 동결 방지를 위한 첨가제로서 상기 생균제 조성물에 대하여 글루타민산 및 염화나트륨을 첨가한다.
- [0026] 또한, 본 발명의 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) HY7032 및 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) HY7506를 포함하는 생균제 조성물을 유효성분으로 함유하는 동물 사료용 첨가제는 상기의 생균제 조성물, 프락토올리고당 및 구연산을 배합사료 제조용 믹서기에 첨가한 후, 10분간 혼합하여 제조한다.
- [0028] 또한, 본 발명의 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) HY7032 및 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) HY7506를 포함하는 생균제 조성물을 유효성분으로 함유하는 동물 사료용 첨가제를 포함하는 동물 사료 조성물은 대두박, 쌀, 우육 골분, L-카르니틴, 비타민 C, 식염 및 잔부의 옥수수 분말을 첨가하여 사료 조성물 100중량%를 제조하고, 상기의 사료 조성물 100중량부에 대하여 상기 동물 사료용 첨가제를 첨가하여 혼합한 다음, 상기 동물 사료용 첨가제를 포함하는 사료 조성물을 익스트루더(extruder)에 투입하고 압출 후 절단한 다음 건조하여 제조한다.

발명의 효과

- [0030] 본 발명의 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) HY7032 및 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) HY7506는 내산성, 내담즙성, 항균활성 및 반려동물의 모질을 개선하는 효능을 가지므로 이를 포함하는 생균제 조성물을 유효성분으로 함유하는 모질 개선을 위한 동물 사료용 첨가제 및 동물 사료 조성물 등으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0032] 도 1은 항생제가 투입된 비글견에서 본 발명의 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) HY7032 및 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) HY7506의 섭취에 따른 피부 표면의 수분량을 나타낸 그래프이

다.

도 2는 항생제가 투여된 비글견에서 본 발명의 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) HY7032 및 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) HY7506의 섭취에 따른 빠지는 털의 양을 나타낸 그래프이다.

도 3은 항생제가 투여된 비글견에서 본 발명의 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) HY7032 및 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) HY7506의 섭취에 따른 모질의 변화를 나타낸 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 다음의 실시예는 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니며, 본 발명의 기술적 사상의 범위 내에서 당업자에 의한 통상적인 변화가 가능하다.

<실시예 1>

락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) HY7032 및 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) HY7506의 분리 및 동정

1-1. 균주의 분리

본 발명에 따른 신규 유산균주를 분리하기 위하여 63마리의 반려견에서 분변을 PBS buffer에 십진 희석한 후, $1/10^4$ 또는 $1/10^5$ 수준으로 희석된 샘플을 MRS 배지(Oxoid)에 접종하였다. 혐기 조건에서 자라는 유산균을 배양하기 위해 BBL anaerobic GasPak(BD)을 넣은 혐기박스를 사용하여 37℃에서 36시간 동안 혐기 배양하였다. 상기 배양 후 배지에서 모양이 다른 각각의 콜로니(colony)를 새로운 MRS 배지에 접종하여 순수 분리하였다. 그 결과 총 129개의 유산균을 분리하였다.

1-2. 균주의 내산성 시험

상기 분리된 129개 균주중 내산성을 시험하기 위하여, 탁도가 0.8로 맞춰질 때까지 MRS broth에 배양한 각각의 균주를 pH 2, pH 3, pH 4, pH 5로 조절된 각각의 MRS broth에 1:500의 중량비율로 접종하여 하루 동안 배양하였다. 상기 배양 후 각 배양액을 PBS로 단계 희석하고, 100 μ l씩 MRS agar에 접종하여 혐기 조건에서 37℃, 36시간 동안 배양한 후 생균수를 확인하였다. 상기 129개의 균주 중에서 내산성이 우수한 6개의 균주를 선발하여 그 결과를 표 1(+: pH 저항성 있음, -: pH 저항성 없음)에 나타내었다.

표 1

균주	pH 저항성			
	pH2	pH3	pH4	pH5
13	-	+	++	+++
14	-	+	++	+++
21-3	+	++	+++	+++
22-4	-	+	++	+++
24-1	-	+	++	+++
45-1	+	++	+++	+++

1-3. 균주의 내담즙성 시험

상기 6개 균주의 내담즙성을 시험하기 위하여, 탁도가 0.8로 맞춰질 때까지 MRS broth에 배양한 각각의 균주를 담즙산염(bile salt)이 각각 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.4% 첨가된 MRS broth에 1:500의 중량비율로 접종하여 하루 동안 배양하였다. 상기 배양 후 각 배양액을 PBS로 단계 희석하고, 100 μ l씩 MRS agar에 접종하여 혐기 조건에서 37℃, 36시간 동안 배양한 후 생균수를 확인하여 그 결과를 표 2(+: 담즙산염 저항성 있음, -: 담즙산염 저항성 없음)에 나타내었다.

표 2

균주	담즙산염 저항성			
	0.05%	0.1%	0.2%	0.4%
13	+++	++	+	-
14	+++	++	+	-

21-3	+++	+++	++	++
22-4	+++	++	+	+
24-1	+++	++	+	-
45-1	+++	+++	++	++

[0050]

1-4. 균주의 항균활성 시험

[0051]

상기 내산성과 내담즙성이 뛰어난 6개 균주에 대하여 Agar spot test(by Strompfova and Laukova, Anaerobe, 2014) 방법으로 항균활성을 시험하였다.

[0053]

즉, MRS broth에 하루 동안 키운 상기 각각의 균주 3 μ l를 MRS agar(1.5% w/v agar)에 떨어뜨렸다. 그런다음, 혐기조건으로 37℃에서 24시간 배양한 후, 하기의 9종의 병원균 1.3~1.8x10⁶ CFU/ml를 고르게 포함하고 있는 TSA agar(0.8% w/v)를 상기 각각의 균주가 배양된 MRS agar 위에 덮었다. 그런다음, Soft agar를 덮은 plate를 37℃에 24시간 동안 배양한 후, 상기 각각의 균주의 콜로니를 중심으로 생성된 억제환의 길이를 측정하여 항균활성을 측정하였다.

[0054]

9종의 병원균은 다음과 같다.

[0055]

살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*; A), 대장균(*E. coli*; B), 시트로박터 프룬디 (*Citrobacter freundii*; C), 엔테로코커스 페시움(*Enterococcus faecium*; D), 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*; E), 포도상구균(*Staphylococcus intermedius*; F), 리스테리아균(*Listeria monocytogenes*; G), 코리네박테리움 아우리스카르니스균(*Corynebacterium auriscarnis*; H), 바실러스 서큐란스(*Bacillus circulans*; I)

[0056]

그 결과를 표 3에 나타내었다.

[0058]

하기의 표 3에서 확인할 수 있는 바와같이, 내산성과 내담즙성이 뛰어난 6개 균주 중에서 9종의 병원균에 대하여 항균활성이 뛰어난 21-3 균주 및 45-1 균주를 최종적으로 선발하였다.

표 3

균주	억제환의 길이(mm)								
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
14	0	0	0	0	0	1.25	0	0	0.5
21-3	3.88	3.2	1.25	0.5	3.25	5	3.25	2.95	3.25
13	0	0	0	0	0	0	0.25	0	0
22-4	0	0	0	0	0	0	0	1.1	0.5
24-1	4	2.5	3.5	0	5	5	2.5	1.5	6
45-1	5.4	3	3	0	3.75	3.75	3.25	3.25	5

[0060]

[0062]

1-6. 신균주 '21-3' 균주의 동정

[0063]

상기 실시예 1-5의 21-3 균주의 동정을 위하여 신균주 21-3으로부터 분리한 유전체 DNA를 주형으로 하여 518F(5'-CCAGCAGCCGCGTAATACG-3'), 800R(5'-TACCAGGTATCTAATCC-3') 프라이머(primer)를 사용하여 PCR 반응 [(95℃, 3분), 30cycles(95℃, 30초; 50℃, 30초; 72℃, 90초), 72℃, 10분]을 수행하여 282bp의 증폭산물을 얻은 후 정제하여 시퀀싱(sequencing) 반응을 통해 염기서열을 분석한 결과를 토대로 BLAST 검색결과 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)와 비교하였다.

[0064]

그 결과를 표 4에 나타내었다.

표 4

Sequences producing significant alignments:

Select All None Selected 0

Alignments Download v. GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Lactobacillus crispatus strain DSM 20684 16S ribosomal RNA, partial sequence	399	399	100%	2e-111	99%	NR_119274.1
Lactobacillus acidophilus strain NBRC 13621 16S ribosomal RNA, gene, partial sequence	399	399	100%	2e-111	99%	NR_115830.1
Lactobacillus palmarum strain ATCC 33159 16S ribosomal RNA, gene, partial sequence	399	399	100%	2e-111	99%	NR_042111.1
Lactobacillus palmarum strain JCM 2011 16S ribosomal RNA, gene, partial sequence	399	399	100%	2e-111	99%	NR_115320.1
Lactobacillus crispatus strain DSM 20684 16S ribosomal RNA, gene, partial sequence	399	399	100%	2e-111	99%	NR_117063.1
Lactobacillus acidophilus strain VPI 6032 16S ribosomal RNA, gene, partial sequence	399	399	100%	2e-111	99%	NR_117062.1
Lactobacillus palmarum strain ATCC 33159 16S ribosomal RNA, gene, partial sequence	399	399	100%	2e-111	99%	NR_117061.1
Lactobacillus acidophilus strain JCM 11132 16S ribosomal RNA, gene, partial sequence	399	399	100%	2e-111	99%	NR_117012.1
Lactobacillus acidophilus strain BCRC10955 16S ribosomal RNA, partial sequence	399	399	100%	2e-111	99%	NR_045103.1

[0066]

[0068]

또한, Api 50CHL kit(BIOMERIEUX)을 이용하여 당이용성 검사를 하여 하기의 표 5에 나타내었다.

표 5

[0070]

당 0-24	사용여부	당 25-49	사용여부
0 Control	-	25 에스컬린	+
1 글리세롤	-	26 살리신	+
2 Erythritol	-	27 셀로비오스	+
3 D 아라비노스	-	28 말토스	-
4 L 아라비노스	-	29 유당	+
5 리보스	+	30 멜리비오스	-
6 D 크실로스	-	31 자당	+
7 L 크실로스	-	32 트레할로스	+
8 아도니톨	-	33 이눌린	-
9 β 메틸-D-크실로시드	-	34 멜레지토스	-
10 갈락토스	+	35 라피노스	-
11 포도당	+	36 전분	-
12 과당	+	37 글리코젠	-
13 만노스	+	38 크실리톨	-
14 소르보스	-	39 젠티오비오스	+
15 람노스	-	40 D 투라노스	+
16 돌시톨	-	41 D 라이소스	-
17 이노시톨	-	42 D 타가토스	+
18 만니톨	+	43 D 푸코스	-
19 소르비톨	-	44 L 푸코스	-
20 α-메틸-D-만노시드	-	45 D 아라비톨	-
21 α-메틸-D-글루코시드	+	46 L 아라비톨	-
22 N-아세틸-글루코사민	+	47 글루코나테	+
23 아미그달린	-	48 2-케토-글루코나테	-
24 아르부틴	+	49 5-케토-글루코나테	-

[0072]

상기의 표 4 및 표 5에서 확인할 수 있는 바와 같이, 상기 실시예 1-5의 21-3 균주의 16S rRNA 유전자는 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*)의 16S rDNA 유전자와 99% 일치하는 것으로 나타났으며, 각종 당 분해능을 API 아이덴티피케이션 소프트웨어 프로그램(API identification software program)으로 분석한 결과도 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*)와 99%의 유사성을 가진 것으로 나타났다.

[0074]

따라서, 본 발명자들은 상기 실시예 1-5의 21-3 균주를 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) HY7032로 명명하고, 2018년 10월 26일 한국생명공학연구원 생물자원센터에 기탁하였다(수탁번호: KCTC13690BP).

[0076]

본 발명에 따른 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) HY7032의 특성은 다음과 같다.

- [0078] 1)균의 형태
- [0079] 엠알에스(MRS) 한천평판배지에서 37℃, 2일간 배양했을 때 균의 특성
- [0080] ①세포의 형태: 간균
- [0081] ②운동성: 없음
- [0082] ③포자형성능: 없음
- [0083] ④그람(Gram) 염색: 양성
- [0084] 2)균락의 형태
- [0085] 엠알에스(MRS) 한천평판배지에서 37℃, 2일간 배양했을 때 균락의 형태
- [0086] ①형상: 원형
- [0087] ②융기: 볼록
- [0088] ③표면: 매끄러움(slime)
- [0089] 3)생리적 성질
- [0090] ①생육온도: 생장가능 생육온도 20~40℃
- [0091] 최적 생장온도 37℃
- [0092] ②생육 pH: 생장가능 생육 pH 4.5~10
- [0093] 최적 pH 5.0~6.0
- [0094] ③산소에 대한 영향: 통성혐기성
- [0095] 4)카탈라제: -
- [0096] 5)가스형성여부: -
- [0097] 6)15℃에서 생육: -
- [0098] 7)45℃에서 생육: +
- [0099] 8)인돌생산: -
- [0100] 9)젖산생산: +
- [0102] 1-7. 신균주 '45-1' 균주의 동정
- [0103] 상기 실시예 1-5의 45-1 균주의 동정을 위하여 신균주 45-1로부터 분리한 유전체 DNA를 주형으로 하여 27F(5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'), 1492R(5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3') 프라이머(primer)를 사용하여 PCR 반응[(95℃, 3분), 30cycles(95℃, 30초; 50℃, 30초; 72℃, 90초), 72℃, 10분]을 수행하여 1.47kbp의 증폭산물을 얻은 후 정제하여 시퀀싱(sequencing) 반응을 통해 염기서열을 분석한 결과를 토대로 BLAST 검색결과(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)와 비교하였다.
- [0104] 그 결과를 표 6에 나타내었다.

표 6

Sequences producing significant alignments:						
Select All None Selected 0						
Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results						
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Lactobacillus reuteri strain DSM 20016 16S ribosomal RNA, partial sequence	1936	1936	99%	0.0	98%	MF 075036.1
Lactobacillus reuteri strain NBRC 15892 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1936	1936	99%	0.0	98%	MF 113820.1
Lactobacillus reuteri strain DSM 20016 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1917	1917	99%	0.0	97%	MF 113820.1
Lactobacillus casei strain M22M2 16S ribosomal RNA, partial sequence	1844	1844	97%	0.0	97%	MF 157747.1

[0106]

[0108] 또한, API 50CHL kit(BIOMERIEUX)을 이용하여 당이용성 등 생화학적특성 검사를 실시하였고, 이를 표 7에 나타내었다.

표 7

[0110]

당 0-24	사용여부	당 25-49	사용여부
0 Control	-	25 에스쿨린	-
1 클리세롤	-	26 살리신	-
2 Erythritol	-	27 셀로비오스	-
3 D 아라비노스	-	28 말토스	+
4 L 아라비노스	+	29 유당	+
5 리보스	+	30 멜리비오스	+
6 D 크실로스	-	31 자당	+
7 L 크실로스	-	32 트레할로스	+
8 아도니톨	-	33 이눌린	-
9 β 메틸-D-크실로시드	-	34 멜레지토스	-
10 갈락토스	+	35 라피노스	+
11 포도당	+	36 진분	-
12 과당	-	37 글리코젠	-
13 만노스	-	38 크실리톨	-
14 소르보스	-	39 젠티오비오스	+
15 람노스	-	40 D 투라노스	+
16 돌시톨	-	41 D 라이소스	-
17 이노시톨	-	42 D 타가토스	+
18 만니톨	+	43 D 푸코스	-
19 소르비톨	-	44 L 푸코스	-
20 α-메틸-D-만노시드	-	45 D 아라비톨	-
21 α-메틸-D-글루코시드	+	46 L 아라비톨	-
22 N-아세틸-글루코사민	+	47 글루코나테	-
23 아미그달린	-	48 2-케토-글루코나테	-
24 아르부틴	+	49 5-케토-글루코나테	-

[0112] 상기의 표 6 및 표 7에서 확인할 수 있는 바와 같이, 상기 실시예 1-5의 45-1 균주의 16S rRNA 유전자는 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*)의 16S rDNA 유전자와 99% 일치하는 것으로 나타났으며, 각종 당 분해능을 API 아이덴티피케이션 소프트웨어 프로그램(API identification software program)으로 분석한 결과도 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*)와 99%의 유사성을 가진 것으로 나타났다.

[0114] 따라서, 본 발명자들은 상기 실시예 1-5의 45-1 균주를 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) HY7506로 명명하고, 2018년 10월 26일 한국생명공학연구원 생물자원센터에 기탁하였다(수탁번호: KCTC13692BP).

[0116] 본 발명에 따른 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) HY7506의 특성은 다음과 같다.

[0118] 1)균의 형태

[0119] 엠알에스(MRS) 한천평판배지에서 37℃, 2일간 배양했을 때 균의 특성

[0120] ①세포의 형태: 간균

[0121] ②운동성: 없음

[0122] ③포자형성능: 없음

[0123] ④그람(Gram) 염색: 양성

[0124] 2)균락의 형태

[0125] 엠알에스(MRS) 한천평판배지에서 37℃, 2일간 배양했을 때 균락의 형태

[0126] ①형상: 원형

- [0127] ②용기: 볼록
- [0128] ③표면: 매끄러움(slime)
- [0129] 3)생리적 성질
- [0130] ①생육온도: 성장가능 생육온도 20~40℃
- [0131] 최적 생장온도 37℃
- [0132] ②생육 pH: 성장가능 생육 pH 4.5~10
- [0133] 최적 pH 5.0~6.0
- [0134] ③산소에 대한 영향: 통성혐기성
- [0135] 4)카탈라제: -
- [0136] 5)가스형성여부: -
- [0137] 6)15℃에서 생육: -
- [0138] 7)45℃에서 생육: +
- [0139] 8)인돌생산: -
- [0140] 9)젖산생산: +
- [0142] <실시에 2>
- [0143] 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) HY7032 및 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) HY7506을 포함하는 생균제 조성물의 제조
- [0144] 본 발명의 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) HY7032 : 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) HY7506가 1:1의 중량비율로 혼합된 균주를 2.0×10^8 CFU/ml 수준으로 1% 종균 접종하기 위하여, 이스트 엑기스 2.5중량%, 포도당 1.5중량% 및 설탕 2중량%를 포함하는 배지에 35℃에서 48시간 동안 정지 배양을 하여 생균제 조성물을 제조하였다. 이때, 동결 방지를 위한 첨가제로, 상기 생균제 조성물에 대하여 글루타민산 0.1중량% 및 염화나트륨 1중량%를 첨가하였다.
- [0146] <실시에 3>
- [0147] 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) HY7032 및 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) HY7506을 포함하는 생균제 조성물을 유효성분으로 함유하는 동물 사료용 첨가제의 제조
- [0148] 상기 실시예 2의 생균제 조성물 6.4kg, 프락토올리고당 3.0kg 및 구연산 5.0kg을 배합사료 제조용 믹서기에 첨가한 후, 10분간 혼합하여 동물 사료용 첨가제를 제조하였다.
- [0150] <실시에 4>
- [0151] 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) HY7032 및 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) HY7506을 포함하는 생균제 조성물을 유효성분으로 함유하는 동물 사료용 첨가제를 포함하는 동물 사료 조성물의 제조
- [0152] 대두박 15중량%, 쌀 5중량%, 우육 골분 15중량%, L-카르니틴 0.05중량%, 비타민 C 0.2중량%, 식염 0.25중량% 및 잔부의 옥수수 분말을 첨가하여 사료 조성물 100중량%를 제조하였다.
- [0153] 상기의 사료 조성물 100중량부에 대하여 상기 실시예 3의 동물 사료용 첨가제 0.5중량부를 첨가하여 혼합하였다.
- [0154] 그런 다음, 상기 동물 사료용 첨가제를 포함하는 사료 조성물을 익스트루더(extruder)에 투입하고 압출 후 절단한 다음 건조하여 애완동물용 사료 조성물을 제조하였다.
- [0156] <시험예 1>
- [0157] 1-1. 항생제 및 시료 투여

- [0158] 건강한 5~6개월령 암컷 비글견 10마리를 시험군 5마리와 대조군 5마리로 나누었다.
- [0159] 먼저, 시험군 5마리의 비글견 각각에 7일간 항생제(Vancomycin 50mg/마리 및 Polymyxin B 100KU/마리)를 경구 투여한 후, 3주 동안 본 발명의 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) HY7032 및 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) HY7506를 각각 10^7 CFU/마리로 준비하여 경구 투여하였다.
- [0161] 한편, 대조군 5마리의 비글견 각각에 대하여는 본 발명의 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) HY7032 및 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) HY7506 대신에 동일한 양의 증류수를 경구 투여한 것을 제외하고는 상기와 동일한 방법으로 시험하였다.
- [0163] 상기 시험군과 대조군에 시험기간 동안 사료와 음수량은 동일하게 유지하였다.
- [0165] 1-2. 피부표면의 유수분 측정
- [0166] 본 발명의 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) HY7032 및 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) HY7506 섭취에 따른 피부 표면의 유수분 변화를 관찰하기 위하여 유수분 측정기로 피부를 검사하였다.
- [0168] 즉, 항생제 투여시작일(-1week)부터 일주일 간격으로 3주 동안 시험군 및 대조군의 각각의 비글견의 배쪽 피부의 3cmx3cm 이상의 면적을 제모한 뒤 유수분 측정기로 기기 매뉴얼에 따라 마리당 2회 측정하여 기록하였다
- [0169] 그 결과를 도 1(평균 피부수분함량) 및 표 8(피지양)에 나타내었다.
- [0171] 도 1 및 하기의 표 8에서 확인할 수 있는 바와 같이, 대조군과 시험군 간의 피부 수분의 양에 있어서 유의한 차이가 나타나지 않았지만, 대조군과 달리 시험군에서는 시간에 따른 피지양의 감소가 관찰되었다.

표 8

구 분	-1 week	0	1 weeks	2 weeks	3 weeks
시험군	7.78	5.2	6.28	5.59	5.26
대조군	6.98	5.31	5.55	5.58	6.39

- [0173]
- [0175] <시험예 2>
- [0176] 탈락되는 털의 개수 평가
- [0177] 본 발명의 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) HY7032 및 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) HY7506의 섭취에 따른 모근 건강에 미치는 영향을 알아보기 위하여 인위적으로 털의 탈락을 유도하여 탈락되는 털의 개수를 기록 및 평가하였다.
- [0179] 즉, 항생제 투여시작일(-1week)부터 일주일 간격으로 3주 동안 시험군 및 대조군의 각각의 비글견의 등의 정중앙 지점에서 4cmx4cm의 일정한 규격의 테이프를 부착 후 떼어내기를 매회 새로운 테이프로 3회 반복하여 각 회차별 탈락한 털의 개수를 기록하였다.
- [0180] 그 결과를 도 2에 나타내었다.
- [0182] 도 2에서 확인할 수 있는 바와 같이, 시험군과 달리 대조군에서 평균적으로 탈모유도가 잘 일어나는 것이 확인되었다.
- [0184] <시험예 3>
- [0185] 피모의 비교
- [0186] 본 발명의 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) HY7032 및 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) HY7506의 섭취에 따른 피모의 육안상 비교를 위해 털의 사진을 촬영하였다.
- [0188] 즉, 항생제 투여시작일(-1week)부터 일주일 간격으로 3주 동안 시험군 및 대조군의 각각의 비글견의 등쪽 털을

확대 디지털 현미경을 이용하여 약 150배 배율로 현미경 촬영 어플리케이션을 사용(CamearaFi)하여 사진을 촬영하여 털에서 비듬의 양을 관찰하였다.

[0189] 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0191] 도 3에서 확인할 수 있는 바와 같이, 시험군과 달리 대조군에서 평균적으로 비듬의 양이 많은 것으로 관찰되었다.

수탁번호

[0193]

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC13692BP

수탁일자 : 20181026

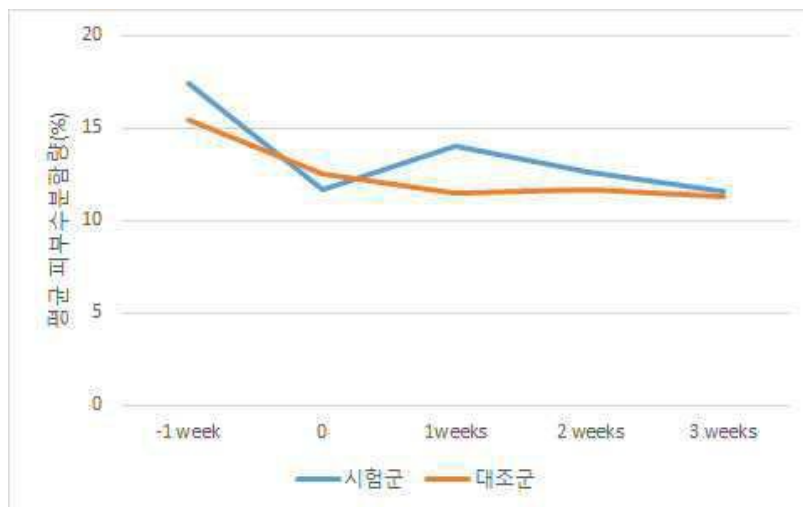
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC13690BP

수탁일자 : 20181026

도면

도면1



도면2



도면3

