(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0016334
(43) 공개일자 2018년02월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23B 4/22 (2017.01) *A23L 3/3472* (2006.01)
A23L 3/349 (2006.01) *A23L 3/3508* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A23B 4/22 (2013.01)
A23L 3/3472 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7025013
(22) 출원일자(국제) 2016년02월08일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2017년09월05일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2016/000178
(87) 국제공개번호 WO 2016/125015
국제공개일자 2016년08월11일
(30) 우선권주장
14/615,968 2015년02월06일 미국(US)

(71) 출원인
나투렉스 에스아
프랑스, 비피 81218-84911 아비뇽 코덱스 9, 뤼 피에르 베일 250
(72) 발명자
우드레, 멜라니, 마리-파울, 패트리샤
프랑스, 84270 브덴느, 104 뤼 데 프레레스 뤼미에르
버틱, 시모나
프랑스, 84300 카바이롱, 그랑 뤼 38
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인이지

전체 청구항 수 : 총 41 항

(54) 발명의 명칭 **항균 조성물**

(57) 요 약

조성물은 푸니카 추출물 및 라미아세아에 추출물을 포함하고, 대부분의 휘발성 오일 성분은 라미아세아에 추출물로부터 제거된다. 신선/미가공 및 가공 육류, 어류 또는 가금류(이들로 제한되지는 않음)를 포함하는 식품 및 조성물을 적용하는 방법이 또한 제공된다.

(52) CPC특허분류
A23L 3/349 (2013.01)
A23L 3/3508 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
Y02A 40/944 (2018.01)
(72) 발명자
피에르, 프랑스와-자비에르, 헨리
프랑스, 84450 종끄헤트, 임패스 데 자보네 78
메스니에르, 자비에르, 피에르, 프랑소와
스위스, 1007 로잔, 슈망 드 프리메로스 8
파세마드, 앤
프랑스, 84320 엉뜨헤그-슈흐-라-쏘흐그, 뤼 뒤 샤토 124
빌리, 앙투안, 찰스
프랑스, 84270 베덴느, 포미 카디널 뤼 162
롤러, 마크
프랑스, 84310 모히에흐 레 아비뇽, 슈만 드 롤리브헤 70

명 세 서

청구범위

청구항 1

푸니카(*Punica*) 추출물 및 라미아세아에(*Lamiaceae*) 추출물을 포함하는 조성물로서, 대부분의 휘발성 오일 성분은 상기 라미아세아에 추출물로부터 제거된, 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 라미아세아에 추출물은 카르노스산 및 카르노솔 및 이의 혼합물로부터 선택된 라미아세아에 페놀성 디테르펜, 및 푸니카 추출물을 포함하고, 푸니카 추출물 대 라미아세아에 추출물의 중량비는 0.625 내지 48인, 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 라미아세아에 추출물은 로즈마리 추출물, 오레가노 추출물, 타임 추출물, 세이지 추출물, 민트 추출물, 샐비어(Salvia) 추출물, 로스마리누스(Rosmarinus) 추출물, 레페치니아(Lepechinia) 추출물, 오레가눔(Oreganum) 추출물, 타이무스(Thymus) 추출물, 히소푸스(Hyssopus) 추출물 및 이의 혼합물로부터 선택된, 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 아라비아 검, 덱스트로스, 지방산의 염, 모노글라이세라이드 및 다이글라이세라이드, MPG, 폴리소르베이트 80, 덱스트로스, 식물성 오일, 글루코스 시럽, 글라이세린, 데카글라이세롤 모노올레에이트, 지방산 에스터, 벤질 알콜, 에틸 알콜, 프로필렌, 글라이콜, 폴리소르베이트, 소르비탄, 소르비탄 트라이올레에이트, 카프르산/카프릴산 트라이글라이세라이드, 및 이들의 조합으로부터 선택된 담체를 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 말토덱스트린이 유래한 전분과 구별되는 구조를 가지는 말토덱스트린의 담체를 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 조성물은 건조 분말의 형태인, 조성물.

청구항 7

제4항에 있어서, 하나 이상의 향미료 및 보조제를 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 8

제4항에 있어서, 상기 조성물은 액체 형태인, 조성물.

청구항 9

식품 및 제1항의 조성물을 포함하는 식품 제품.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 식품은 육류, 가금류 및 어류로 이루어진 군으로부터 선택된, 식품 제품.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 육류, 가금류 및 어류는 신선 육류, 가금류 및 어류인, 식품 제품.

청구항 12

제9항에 있어서, 상기 라미아세아에 추출물은 카르노스산, 카르노솔 및 이의 혼합물로부터 선택된 라미아세아에 페놀성 디테르펜의 12ppm 이상의 양의 라미아세아에 페놀성 디테르펜, 및 푸니카 추출물로부터의 56ppm 이상의 엘라그산 또는 19ppm 이상의 푸니칼라진을 포함하는, 식품 제품.

청구항 13

제12항에 있어서, 12 내지 188ppm의 라미아세아에 페놀성 디테르펜 및 푸니카 추출물로부터의 4 내지 24ppm의 엘라그산 및 19 내지 120ppm의 푸니칼라진을 함유하는, 식품 제품.

청구항 14

제9항에 있어서, 12 내지 188ppm의 라미아세아에 페놀성 디테르펜 및 푸니카 추출물로부터의 4 내지 24ppm의 엘라그산 및 19 내지 120ppm의 푸니칼라진을 함유하는, 식품 제품.

청구항 15

제9항에 따른 식품을 포함하는 포장된 식품 제품으로서, 상기 식품은 20% 이상의 산소를 포함하는 분위기에서 포장된, 포장된 식품 제품.

청구항 16

제9항에 따른 식품을 포함하는 포장된 식품 제품으로서, 상기 식품은 대기 환경에서 포장된, 포장된 식품 제품.

청구항 17

식품을 가공하는 방법으로서,

푸니카 추출물 및 라미아세아에 추출물을 포함하는 조성물을 식품에 적용하거나 혼입하는 단계로서, 대부분의 휘발성 오일 성분은 상기 라미아세아에 추출물로부터 제거된, 상기 단계를 포함하는, 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 20% 이상의 산소를 함유하는 분위기에서 상기 식품을 포장하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 19

제17항에 있어서, 상기 식품은 신선 육류, 어류 또는 가금류로 이루어진 군으로부터 선택된, 방법.

청구항 20

제17항에 있어서, 식품에 대한 첨가 또는 혼입은 건조 분말 형태의 상기 조성물을 상기 식품에 적용하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 21

제17항에 있어서, 식품에 대한 첨가 또는 혼입은 상기 라미아세아에 추출물 및 푸니카 추출물 둘 다를 포함하는 단일 조성물을 상기 식품에 적용하거나 혼입하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 22

제17항에 있어서, 상기 라미아세아에 추출물은 카르노스산, 카르노솔 및 이의 혼합물로부터 선택된 라미아세아에 페놀성 디테르펜을 포함하는, 방법.

청구항 23

제17항에 있어서, 라미아세아에 화합물 대 푸니카 추출물의 중량비는 0.625 내지 48인, 방법.

청구항 24

천연 에센셜 오일을 본질적으로 함유하지 않고, 카르노스산, 카르노솔을 함유하는 라미아세아에 추출물 및 푸니카 추출물과 배합된 식품을 포함하는 식품 제품으로서, 상기 식품에 존재하는 푸니카 추출물 대 상기 라미아세

아에 추출물의 중량비는 약 0.625 내지 약 48이고, 푸니카 추출물의 푸니카 엘라그산은 4 내지 24ppm의 양으로 상기 식품에 존재하고, 푸니카 푸니칼라진은 19 내지 120ppm의 양으로 존재하는, 식품 제품.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 식품은 육류, 가금류 및 어류로 이루어진 군으로부터 선택된, 식품 제품.

청구항 26

제24항에 있어서, 12 내지 188ppm의 라미아세아에 페놀성 디테르펜 및 푸니카 추출물의 4 내지 24ppm의 엘라그산 및 푸니카 추출물의 19 내지 120ppm의 푸니칼라진을 함유하는, 식품 제품.

청구항 27

제24항에 있어서, 상기 라미아세아에 추출물 및 푸니카 추출물은 아라비아 검, 덱스트로스, 지방산의 염, 모노글라이세라이드 및 다이글라이세라이드, MPG, 폴리소르베이트 80, 덱스트로스, 식물성 오일, 글루코스 시럽, 글라이세린, 데카글라이세롤 모노올레에이트, 지방산 에스터, 벤질 알콜, 에틸 알콜, 프로필렌, 글라이콜, 폴리소르베이트, 소르비탄, 소르비탄 트라이올레에이트, 카프르산/카프릴산 트라이글라이세라이드, 덱스트로스 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 담체를 추가적으로 함유하는 조성물의 형태인, 식품 제품.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 조성물은 건조 형태인, 식품 제품.

청구항 29

제27항에 있어서, 상기 조성물은 액체 형태인, 식품 제품.

청구항 30

식품 제품을 제조하는 방법으로서,

천연 에센셜 오일을 본질적으로 함유하지 않고, 카르노스산, 카르노솔을 포함하는 항균제인 라미아세아에 추출물 및 푸니카 추출물의 배합물을 식품에 적용하거나 혼입하는 단계로서, 상기 식품에 존재하는 푸니카 추출물 대 라미아세아에 페놀성 디테르펜의 중량비는 약 0.625 내지 48이고, 푸니카 추출물은 푸니카 추출물의 4 내지 24ppm의 엘라그산 및 푸니카 추출물의 19 내지 120ppm의 푸니카 푸니칼라진의 양으로 상기 식품에 존재하는, 상기 단계를 포함하는, 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 식품은 육류, 어류 또는 가금류인, 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 육류, 어류 또는 가금류는 신선 육류, 어류 또는 가금류인, 방법.

청구항 33

제30항에 있어서, 상기 방법은 상기 식품 제품에서의 색상 수명을 연장하고, 박테리아 성장을 저해하고/하거나 감소시키고/시키거나 제한하는 방법.

청구항 34

제33항에 있어서, 상기 저해되고/되거나 감소되고/되거나 제한된 박테리아 성장은 리스테리아인, 방법.

청구항 35

제1항에서, 상기 푸니카 추출물은 푸니칼라진 및 엘라그산으로 이루어진 군으로부터 선택된, 조성물.

청구항 36

유효량의 페놀성 디테르펜 및/또는 푸니칼라진 및 엘라그산을 포함하는 항균 조성물.

청구항 37

유효량의 페놀성 디테르펜 및/또는 푸니칼라진 및 엘라그산을 포함하는 항박테리아 조성물.

청구항 38

제37항에 있어서, 상기 조성물은 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*), 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*), 리스테리아 모노사이토게네스(*Listeria monocytogenes*), 클로스트리듐 퍼프린겐스(*Clostridium perfringens*), 엔테로코커스 히라에(*Enterococcus hirae*) 및 마이코박테륨 보비스(*Mycobacterium bovis*)로 이루어진 군으로부터 선택된 그람 양성 박테리아에 대해 유효한, 조성물.

청구항 39

제37항에 있어서, 상기 조성물은 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 에스체리치아 콜라이(*Escherichia coli*), 살모넬라 티피무륨(*Salmonella typhimurium*) 및 엔테로박터 클로아카에(*Enterobacter cloacae*)로 이루어진 군으로부터 선택된 그람 음성 박테리아에 대해 유효한, 조성물.

청구항 40

유효량의 페놀성 디테르펜 및 푸니칼라진 및 엘라그산을 포함하는 항진균/항효모 조성물.

청구항 41

제40항에 있어서, 상기 조성물은 사카로마이세스 세레비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*) 및 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)로 이루어진 군으로부터 선택된 효모에 대해 유효한, 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원에 대한 상호참조**

[0002] 본원은 2015년 2월 6일에 출원된 미국 특허 출원 제14/615,968호(본 명세서에 참고문헌으로 포함됨)의 이익을 주장한다.

[0003] **기술분야**

[0004] 본 발명은 식품에 색상 및/또는 미생물 안정성을 연장하기 위한 조성물 및, 특히 육류, 어류 또는 가금류(신선/미가공 및 가공)(이들로 제한되지는 않음)를 포함하는 식품에 색상 및/또는 미생물 안정성을 연장하는 조성물에 관한 것이다. 이 조성물은 식품의 색상 및 미생물 안정성을 연장하는 데 있어서 효과적이다.

배 경 기 술

[0005] 식품 안전성 및 식품 부패의 예방은 특히 육류 산업 내에 전세계적으로 항상 존재하는 우려사항이다. 식품의 부패는 식품 제조사에 대한 주요 경제적 문제이다. 식품 제조사는 먹기에 안전한 제품을 안겨 주어서 공중의 건강 및 안전성을 보호할 필요가 있다. 이러한 식품은 차가운 온도 또는 주변 온도 저장에서 보장된 반감기를 가져야 한다. 소비자는 높은 품질의 우수한 맛이 나는 식품을 선호한다. 이것은 화학 보존제, 가혹한 가열 체계 및 다른 가공 수단에 의해 달성하기 어렵다. 식품 안전성 및 보호는 더 온화한 가공 및 천연 보존제의 조합된 접근법을 이용하여 다중의 보존 시스템에 의해 최고로 달성된다. 식품 매개 미생물은 상이한 보존 수단에 의해 보존된 식품에서 또한 덜 순응하고 성장할 것이다.

[0006] 식품 부패 유기체, 예컨대 리스테리아 모노사이토게네스(*Listeria monocytogenes*)의 식품 보호 및 성장에 관한 더 많은 관심이 존재한다. 이 특정한 종은 육류에서 가장 문제가 되는 부패 미생물 중 하나이다. 항균제에 대한 드문 생리학적 특징, 예컨대 특출한 내성은 부패를 발생시키는 이의 능력에 주로 책임이 있다. 추가적으로, 부패 유기체는 때때로 상이한 보존제 및 저장 조건에 순응할 수 있고, 따라서 보존 수단의 조합은 개별 수단보다 더 성공적일 수 있다.

[0007] 보장된 반감기를 가지는, 편리하고, 천연이며, 안전하고, 건강한, 우수한 품질의 제품에 대한 공중 수요를 만족

시키기 위한 경제적이고 천연이며 효과적인 보존 시스템을 개발할 필요성이 증가하고 있다. 항균 재료, 예컨대 식물로부터 유래한 것은 이러한 필요성을 만족시키는 것을 돕도록 보존제로서 사용될 수 있다. 이러한 식물 추출물은 천연인 것으로 생각되므로 바람직한 것으로 생각된다. 더구나, 규제 관점으로부터, 장기간 사용 때문에, 식물 추출물은 통상적으로 GRAS(일반적으로 안전하다고 생각됨) 상태를 가진다. 더 적은 양의 항균 재료를 사용하여 미생물 보호를 제공하고자 하는 필요성이 또한 증가하고 있다. 따라서, 새로운 항균 재료 또는 항균 재료의 새로운 더 효과적인 조합을 제공할 필요성이 존재한다.

[0008] 이의 천연 기원에도 불구하고, 식물로부터의 항균 생성물이 가장 낮은 가능한 양으로 사용되는 것이 바람직하다. 이것은 비용의 이유뿐만 아니라, 식품에서의 '첨가제'의 양을 최소화하고자 하는 소비자 소망을 만족시키기 위해 바람직하다. 더구나, 많은 식물 재료는 연관된 맛을 가진다. 따라서, 많은 요구되는 식품 분야에서 식물 기원으로부터의 보호제의 양의 감소가 유리하다.

[0009] 육류 제조사는 이것이 효율적이고, 비용 효과적이며, 중앙 가공 센터로부터 소매 판매점에 공급되게 하는 방식을 찾고 있다. 육류가 더 긴 분배 채널을 통해 제조사로부터 소매자로 소비자로 돈벌이를 하므로, 부패에 관한 반감기의 증가(소비자 안전성)가 이것이 가능하게 하는 것이 필요하다.

[0010] 색상 반감기는 소비자 수용성에 중요하다. 소비자는 밝은 적색 옥시미오글로빈 색소의 존재에 의해 육류의 신선도를 판단한다. 신선 육류에서의 옥시미오글로빈은 메트미오글로빈인 안정한 갈색 안료로 변하면서 저장 동안 시간에 따라 감소한다. 옥시미오글로빈 색소가 예를 들어 정육점에서 암소 저장 동안 옅어지더라고, 색소 소실은 소매 시설에서 광이 있는 냉장 디스플레이 케이스에서 가장 뚜렷하다. 추가로, 색소 소실은 주로 성질상 미용상이고, 이것은 심각한 경제적 결과를 가진다. 가장 신선하게 보이는 덩어리를 찾는 소비자는 심지어 소량의 갈색 메트미오글로빈을 함유하는 육류를 구매하는 것을 피한다.

[0011] 미생물 부패와 연관된 반감기는 심각한 안건이다. 미생물 오염된 육류의 판매로부터 식품 매개 질병 발생과 연관된 잠재적 법적 책임은 막대하다. 육류 산업 및 연관 소매 판매점은 모든 제조 공정을 따라 미생물 오염을 예방함으로써 소비자의 안전성을 보장하는 방식을 추구한다. 공정 개선, 예컨대 도체 세척 및 조심스럽게 제어된 저온 가공은 현재 산업에서 일상적이다. 미생물 부패와 연관된 반감기를 증가시키는 일 방법은 기체 조절 포장(modified atmosphere package; MAP)을 이용하여 식품, 예를 들어 육류를 포장하는 것이다.

[0012] 소비자가 더 천연이라고 인식하는 항균 방법 및 공정에 대한 수요가 산업에서 있다. 라미아세아에 추출물 및 헤스페리딘을 포함하는 조성물의 항균 활성은 주요 연구 대상이다. 대부분의 선행의 기술은 허브의 항균 활성이 휘발성 에센셜 오일 성분에 집중된다고 나타낸다.

[0013] P. M. Davidson 및 A. S. Naidu(문헌[Natural Food Antimicrobial Systems, A. S. Naidu, ed., 2000, CRC Press, Boca Raton, 265-294 페이지]에서)는 향신료, 허브, 식용 곡물 및 종자의 에센셜 오일로부터 피토-페놀성 화합물의 항균 특성을 검토하였다. 저자들은 향신료 및 허브의 항균 효과가 주로 에센셜 오일 분획에서의 페놀성 화합물의 존재로 인하고, 약간의 모노테르펜이 또한 약간의 활성을 나타내는 것으로 보인다는 것을 교시한다. 카르바크롤, p-사이멘 및 티몰은 관찰된 활성을 책임질 것 같은 오레가노, 타임 및 세이보리의 주요 휘발성 성분으로 확인된다. 로즈마리의 활성 항균제는 보르네올, 캄퍼, 1,8-신네올, 알파 피넨, 캄펜, 베르베논 및 보르닐 아세테이트인 것으로 제안된다. 세이지의 활성 성분은 투욘(thujone)인 것으로 제안된다. 타임 오일의 에센셜 오일의 최소 치사 농도는 배양물 중에 225-900ppm의 범위인 것으로 밝혀졌다. 식품에서의 에센셜 오일의 이 농도는 심각한 향 문제를 발생시킬 것이다. 배양 실험이 식품에서 유효성에 필요한 농도를 과소평가하므로, 식품에서의 향 문제는 심지어 배양 수가 제안하는 것보다 더 심각할 것이다. 이 참고문헌의 또 다른 부분에서, 에센셜 오일의 최소 저해 농도는 로즈마리에 1-2%, 타임에 0.12-2%, 스피어민트에 0.12-2%, 세이지에 0.5-2%, 페퍼민트에 0.5-2% 및 오레가노에 0.12-2%라고 말해진다. 요약하면, 저자들은 허브 및 향신료에서의 항균 화합물의 농도가 식품의 감각 특징에 부정적인 영향을 미치지 않으면서 효과적으로 사용되기에 너무 낮다고 기술한다.

[0014] 미국 특허 제4,380,506호에서 Y. Kimura 등은 항산화제 및 항균 활성을 가지는 보존제를 제조하는 방법을 교시한다. 상기 방법은 극성 용매와 비극성 용매 사이에 허브 향신료의 추출물을 분배하는 것을 포함한다. 분배된 추출물 중 몇몇은 배양 배지에서 그람 양성 바실러스 서브틸리스 미생물에 대한 항균 활성을 나타냈다. Kimura 등에 의해 시험된 유일한 맛 기준은 쓴맛이었다. Kimura 등은 에센셜 오일 맛 지각에 관해 침묵하였다. Kimura 등은 추출물을 탈취하지 않았고, 이것은 추출물이 에센셜 오일을 함유하고, 육류의 맛에 영향을 미친다는 것을 의미한다. 맛에 대한 이의 영향은 Kimura 등이 교시한 방법에 의해 얻어진 로즈마리 추출물을 사용하는 것으로부터 교시된다.

[0015] D. Ninkov(WO 01/15680)는 약제학적 조성물이 라미아세아에 패밀리의 식물로부터의 에센셜 오일의 추출물을 유기 산과 배합함으로써 제조될 수 있다는 것을 교시한다. 닌코브는 약제학적 조성물의 항균 활성이 식물로부터의 오일 추출물에서의 유기 페놀, 예컨대 아이소프로필 o-크레솔의 존재로 인한다고 교시한다.

[0016] K. Shetty 및 R. G. Labbe(Asia Pacific J. Clin. Nutr. (1998), 7(3/4), 270-276 페이지)는 에센셜 오일 성분, 예컨대 카르바크롤 및 티몰의 증대된 수준을 제조하기 위해 라미아카에 식물을 클로닝하기 위한 작업을 기재한다. 이 에센셜 오일 성분은 약간의 항균 특성을 갖지만, 이의 상업적 사용은 이 휘발성 화합물에 의해 식품에 부여된 강한 향에 의해 금지된다.

[0017] J. Campo, M. Amiot 및 C. Nguyen-the(2000, Journal of Food Protection 63, 1359-1368 페이지)는 로즈마리 추출물이 배양 연구에서 항균 특성을 가진다는 것을 교시한다. 최소 저해 농도는 시험되는 박테리아의 종에 따라 변하지만, 0.06 내지 1% 범위이다. 이 조사자들은 로즈마리 추출물이 그람 양성 유기체에 대해 낮은 지방 및 낮은 단백질 함량을 가지는 식품에서 장래성을 나타낼 수 있다는 것을 제안한다. 식품 시스템은 이 참고문헌에서 실제로 연구되지 않았다. 이 참고문헌은 구체적으로 리스테리아를 연구하지 않았다.

[0018] 1999년 10월에 공개된 E. Down 등의 문헌["Comparison of Vitamin E, Natural Antioxidants and Antioxidant Combinations on the Lean Color and Retail Case-Life of Ground Beef Patties"]은 비-MAP 같은 쇠고기의 색상 수명에 대한 다른 천연 항산화제 및 비타민 E 다이어트 보충제와 조합된 로즈마리 추출물의 효과를 기재한다. 이 참고문헌은 육류의 미생물 반감기를 어떻게 연장하는지를 교시하지 않는다. 저자들은, 로즈마리를 함유하는 천연 항산화제에 의한 육류에서의 붉은 색상 보존이 대조군과 통계적으로 다르지 않으므로, 로즈마리를 사용함으로써 육류의 붉은 색상 개선을 입증하지 못했다. 대조군의 붉은 색상은 상업적으로 바람직한 기간 내에 변한다. 이 참고문헌으로부터 로즈마리를 가지는 육류에서처럼 대조군에서의 될 수 있는 한 붉은 색상의 소실은 육류의 붉은 색상을 보존할 수 있는 안정성 물질로서 로즈마리 추출물을 사용하는 것으로부터 교시된다.

[0019] Ahn 등의 문헌["Effects of plant extracts on microbial growth, color change, and lipid oxidation in cooked beef", Food Microbiol., Vol. 24, Issue 1, (2007): 7-14]은 페놀성 디테르페네스에서의 함량이 공지되지 않은 로즈마리 올레오레진 또는 로즈마리 추출물이 항리스테리아 효과를 가진다는 것을 보여준다. 이 참고문헌에서, 포도씨 추출물 및 소나무 껍질 추출물은 로즈마리보다 더 우수한 항리스테리아 효과를 가지고, 이것은 육류에서 주요 항리스테리아 천연 생성물로서 로즈마리 추출물을 사용하는 것으로부터 교시된다. 추가로, Ahn 등(2007)은 육류에 대한 로즈마리 추출물의 첨가가 붉은 색상을 덜 잃은 대조군과 비교하여 또는 육류의 붉은 색상의 보존을 상당히 개선한 포도 추출물과 비교하여 육류의 붉은 색상을 상당히 악화시켰다는 것을 보여준다. 따라서, Ahn 등(2007)은 육류의 붉은 색상을 보존할 수 있는 안정성 물질로서 로즈마리 추출물을 사용하지 않는 것을 교시한다.

[0020] 미국 특허 출원 공보 제2004/131709호 연구는 대부분의 휘발성 오일 성분이 제거된 Herbalox(등록상표) Seasoning인 로즈마리 추출물 단독이, 있다면, 매우 적은 항균 효과를 나타낸다는 것을 보여준다. 이 참고문헌은 육류의 그람 양성, 더 정확히는 항리스테리아 반감기를 어떻게 연장하는지를 교시하지 않는다.

[0021] 또한, 선행 기술에 보고된 시트러스로부터의 식물 유래 항균제는 플라보노이드가 아니라 산이다. 예를 들어, 시트러스로부터의 화합물에 관한 선행 특허는 본질적으로 산에 관한 것이다. KR20040001441은 세균 성장의 저해제로서 오렌지 주스를 기재한다. 그러나, KR20040001441에 보고된 주스의 불과 대략 1/50 미만이 신맛으로 육류를 인식하지 않으면서 육류에서 사용될 수 있다. 육류가 시트르산에 농후한 용액의 불과 7.2%까지를 차지하므로, 육류에 채워진 헤스페리딘에서의 최종 수준은 이후 0.48%*1/50*7.2% = 약 0.0007% 미만에 상응할 것이다. 이 참고문헌은 헤스페리딘이 육류에서 항리스테리아 효과를 가진다는 것을 교시하지 않는다.

[0022] Lorente, José 등의 문헌["Chemical guide parameters for Spanish lemon (*Citrus limon* (L.) Burm.) juices." Food chemistry 162 (2014): 186-191]은 시트러스 주스가 52.4g/ℓ의 적정 가능한 산도를 가지고, 시트르산이 주성분이라는 것을 교시한다. Lorente 등(2014)에 따르면 이러한 주스에서 적정 가능한 산도와 비교된 헤스페리딘 수준은 2 차수 규모 초과(257 내지 484.8mg/ℓ)로 더 낮고, 이것은 0.26 내지 0.48%의 헤스페리딘 w/v에 상응한다. 육류에 대한 이러한 산성 조성물의 첨가는 육류 맛에 이미 낮은 수준으로 영향을 미칠 것이다._

[0023] Aktaş, Nesimi 및 Mükerrem Kaya의 문헌["The influence of marinating with weak organic acids and salts on the intramuscular connective tissue and sensory properties of beef." European Food Research and Technology 213.2 (2001): 88-94]은 육류에 1% 약산(시트르산 포함)의 용액을 첨가하는 것이 육류에 신맛

을 부여한다는 것을 보여준다. 또한, 이들은 비율 1:1 w/v(육류/양념장)로 양념될 때 육류가 시트르산을 함유하는 양념장에서 양념 후 기껏해야 7.2%의 중량을 얻는다는 것을 보여준다.

[0024] WO 2012/112337에서, 헤스페리딘을 함유하는 플라보노이드가, 이것이 박테리아이든, 이것이 그람 양성 박테리아이든, 이것이 리스테리아가 아니든, 미생물의 성질에 대한 정보 없이 약간의 활성 항균 활성을 제공할 수 있다는 것이 보고되어 있다. WO 2012/112337은 활성 항균 화합물이 산이라는 것을 교시한다.

[0025] Moulehi, Ikram 등의 문헌["Variety and ripening impact on phenolic composition and antioxidant activity of mandarin (*Citrus reticulate Blanco*) and bitter orange (*Citrus aurantium* L.) seeds extracts." Industrial Crops and Products 39 (2012): 74-80]은 시트러스 종자 추출물이 1g의 DW당 1.31 내지 2.52mg 당량의 카테킨의 전체 플라보노이드를 함유한다는 것을 보고한다. 헤스페리딘이 시트러스 종자 추출물의 전체 플라보노이드의 16% 미만을 나타내므로, 이것은 헤스페리딘이 DW 시트러스 종자 추출물에서 약 0.032%로 존재한다는 것을 의미한다.

[0026] Mandalari, G. 등의 문헌["Antimicrobial activity of flavonoids extracted from bergamot (Citris bergamia Risso) peel, a byproduct of the essential oil industry." Journal of Applied Microbiology 103.6 (2007): 2056-2064]은 시험관내 플라보노이드가 농후한 시트러스 추출물이 오직 그람 음성 박테리아의 성장을 저해하고, 그람 양성 박테리아의 성장에 영향을 미치지 않고, 리스테리아의 성장에 영향을 미치지 않는다는 것을 개시한다. Mandalari 등(2007)은 순수한 형태의 네오헤스페리딘이 시험관내 리스테리아 성장에 영향을 미치지 않는다는 것을 보여준다.

[0027] Fernandez-Lopez, J. 등의 문헌["Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs." Meat science 69.3 (2005): 371-380]은 주성분이 헤스페리딘인, 플라보노이드를 함유하는 시트러스 추출물이 보충된 육류가 리스테리아 모노사이토게네스의 성장에 영향을 미치지 않는다는 것을 보여준다. 예를 들어, Fernandez-Lopez 등(2005)은 이러한 추출물이 리스테리아 모노사이토게네스가 아니라 리스테리아 인노쿠아(*Listeria innocua*)를 포함하는 다른 박테리아 균주에 항균 효과를 발휘한다는 것을 보여준다.

[0028] Mandalari 등 및 Fernandez-Lopez 등의 교시내용은 항리스테리아 화합물로서 헤스페리딘을 사용하는 것으로부터 교시되고, 육류에서 리스테리아 모노사이토게네스에 대해 시트러스 추출물로부터의 임의의 플라보노이드 또는 이의 조합을 사용하는 것이 명확하게 하지 않는다. 예를 들어, Mandalari 등(2007)은 항리스테리아 화합물로서 헤스페리딘을 사용하는 것으로부터 교시하고, 정제된 플라보노이드가 항리스테리아 효과를 가진다는 것을 명확하게 하지 않는다.

[0029] 엘라그산이 농후한 푸니카(Punica) 추출물은 MAP 생육에서 항균 효과를 가지지 않는다. 예를 들어, Hayes 등(Hayes, J. E., Stepanyan, V., Allen, P., O'Grady, M. N., & Kerry, J. p. 2010). "Effect of lutein, sesamol, ellagic acid and olive leaf extract on the quality and shelf-life stability of packaged raw minced beef patties", *Meat science, 84*(4), 613-620.)(이하 "Hayes 등")은 엘라그산(푸니카 추출물로부터의 활성 화합물 중 하나)이 300ppm에서 적용될 때 차가운 곳에 저장된 쇠고기 MAP 생육에서 항균 효과를 가지지 않는다는 것을 교시한다. Hayes 등은 엘라그산이 300ppm 또는 600ppm에서 적용될 때 차가운 곳에 저장된 쇠고기 MAP 생육에서 붉은 색상의 보존을 개선하지 않는다는 것을 교시한다. Hayes 등은 항균 효과에 대해 엘라그산 중의 300ppm보다 낮은 농도를 사용하는 것으로부터 교시한다. Hayes 등은 육류의 붉은 색상을 개선하기 위해 엘라그산을 사용하는 것으로부터 교시한다.

[0030] 맛에 영향을 미치지 않으면서 신선 육류의 반감기를 증대시키는 일반 문제는 부패 유기체 및 병원균의 성장을 예방하고 상업적으로 바람직한 저장 기간에 걸쳐 육류의 붉은 색상을 보전하는 데 남아 있다.

발명의 내용

[0031] 본 발명에 따른 일 양태에 따라, 조성물은 페놀성 디테르페네스를 포함하는 라미아세아에(로즈마리) 추출물(추출물은 본질적으로 천연 에센셜 오일을 함유하지 않음); 및 푸니카 추출물을 포함한다. 유리한 일 조성물에서, 푸니카 추출물은 푸니칼라진 및 엘라그산으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 유리하게는, 헤스페리딘 추출물은 순수한 헤스페리딘이고, 즉 적어도 80%의 농도를 가진다.

[0032] 본 방법 및 조성물의 다른 양태는 육류, 가금류 및 어류(신선/미가공 및 가공)(이들로 제한되지는 않음)를 포함하고, 본 개시내용의 조성물의 성분을 포함하는 식품, 포장된 식품 제품 및 식품을 포장하는 방법과 사용하기

위한 것이다.

[0033] 본 발명은, 이의 일 형태에서, 푸니카 추출물 및 라미아세아에 추출물을 포함하는 조성물에 관한 것이고, 여기서 대부분의 휘발성 성분은 라미아세아에 추출물로부터 제거된다.

[0034] 본 발명은, 이의 또 다른 형태에서, 푸니카 추출물 및 라미아세아 추출물을 포함하는 조성물을 함유하는, 미가공/신선 육류, 가금류 및 어류, 및 가공 육류, 가금류 및 어류를 포함하는, 육류, 가금류 및 어류(이들로 제한되지는 않음)를 포함하는 식품에 관한 것이고, 여기서 대부분의 휘발성 오일 성분은 라미아세아에 추출물로부터 제거된다.

[0035] 본 발명은, 이의 또 다른 형태에서, 식품을 포장하는 방법을 포함하는 가공하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은, 미가공/신선 육류, 가금류 및 어류, 및 가공 육류, 가금류 및 어류(이들로 제한되지는 않음)를 포함하는, 식품에 푸니카 추출물 및 라미아세아에 추출물을 포함하는 조성물을 적용하거나 혼입시키는 단계를 포함하고, 여기서 대부분의 휘발성 오일 성분은 라미아세아에 추출물로부터 제거된다. 임의로, 상기 방법은, 20% 이상의 산소를 함유하는 분위기에서 식품을 포장하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 대안적인 추가의 실시형태에서, 산소의 양은 70%의 산소만큼 많을 수 있다. 더욱 대안적인 실시형태에서, 포장된 식품 제품은 표준 대기 환경에서 포장된 미가공/신선 육류, 가금류 및 어류, 및 가공 육류, 가금류 및 어류(이들로 제한되지는 않음)를 포함하는 식품을 포함한다.

[0036] 본 발명은, 이의 또 다른 형태에서, 식품을 포장하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은, 육류, 어류 또는 가금류(신선/미가공 및 가공)(이들로 제한되지는 않음)를 포함하는, 식품에 푸니카 추출물 및 라미아세아에 추출물을 포함하는 조성물을 적용하거나 혼입시키는 단계를 포함하고, 여기서 대부분의 휘발성 오일 성분은 라미아세아에 추출물로부터 제거되고, 식품은 20% 이상의 산소를 포함하는 환경에서 포장된다.

[0037] 본 발명은, 이의 또 다른 형태에서, 유효량의 페놀성 디테르펜 및/또는 헤스페리딘을 포함하는 항균 조성물에 관한 것이다. 유리한 일 형태에서, 항균 조성물은 효과적이다.

[0038] 본 발명은, 이의 훨씬 또 다른 형태에서, 유효량의 페놀성 디테르펜 및/또는 푸니칼라진 및 엘라그산을 포함하는 항박테리아 조성물에 관한 것이다. 유리한 추가의 일 형태에서, 항균 조성물은 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*) 또는 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 또는 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*) 또는 리스테리아 모노사이토게네스(*Listeria monocytogenes*) 또는 클로스트리듐 퍼프린겐스(*Clostridium perfringens*) 또는 엔테로코커스 히라에(*Enterococcus hirae*) 또는 마이코박테륨 보비스(*Mycobacterium bovis*)를 포함하는 그람 양성 박테리아에 대해 효과적이다. 대안적인 추가의 형태에서, 상기 조성물은 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 에스체리치아 콜라이(*Escherichia coli*) 또는 살모넬라 티피무륨(*Salmonella typhimirium*) 또는 엔테로박터 클로아카에(*Enterobacter cloacae*)를 포함하는 그람 음성 박테리아에 대해 효과적이다.

[0039] 본 발명은, 이의 또 다른 형태에서, 유효량의 페놀성 디테르펜 및/또는 푸니칼라진 및 엘라그산을 포함하는 항진균/항효모 조성물에 관한 것이다. 추가의 일 형태에서, 상기 조성물은 사카로마이세스 세레비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*) 및 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)를 포함하는 효모에 대해 역시 효과적이다.

[0040] 일 형태에서, 본 발명은 리스테리아 모노사이토게네스의 성장을 저해하기 위해, 육류에 로즈마리 추출물과 조합되어 첨가될 수 있는, 푸니카 추출물의 존재에 관한 것이다.

[0041] 본 발명에 따른 로즈마리 추출물은 육류의 붉은 색상의 보존을 개선하고 육류 향에 영향을 미치지 않으면서 미생물 반감기를 연장한다. 본 발명자들의 연구는 실제 육류 시스템에서, 대부분의 휘발성 에센셜 오일 성분이 제거되고 육류 맛에 영향을 미치지 않는 추출물인, 탈취된 로즈마리 추출물을 사용한다. 헤스페리딘 또는 푸니카 추출물과 배합될 때, 예상치 못하게, 식품 맛에 어떤 영향을 미치지 않으면서 상승작용 항리스테리아 및 상승작용 색상 보존 효과가 관찰된다.

[0042] 본 방법 및 조성물은 임의의 식품 제품 또는 음료의 식품 제조사에 대해 비용 효율적이고 비용 효과적인 중앙 가공 센터로부터 제품을 소매상에게 제공하기 위한 방식을 제공할 수 있다. 본 방법 및 조성물은 신선 육류, 어류 및 가금류의 반감기를 증대시키고, 70% 이상의 산소 및 30% 이상의 CO_2를 함유하는 분위기에서 연장된 미생물 및 색상 반감기를 가지는 신선 육류, 어류 및 가금류를 제공할 수 있다. 추출물의 조합을 사용하는 본 개시내용에 따라, 상기 방법은 육류 색상의 보존을 개선하고, 신선 육류, 어류 및 가금류에서 리스테리아 성장을 차단하고, 부정적인 향 영향 없이 식물 추출물의 더 낮지만 더 효과적인 저해 농도의 사용을 허용하도록 사용될

수 있다.

[0043] 본 방법은 특히 기체 조절 포장(MAP) 육류와 사용하기에 특히 적합하다. MAP 육류는 생성물 위로 기체를 유지시키는 가스 불투과성 재료에서 포장된다. 산소 및 이산화탄소의 혼합물은 대개 MAP 육류에서 사용된다. 이 가스의 혼합물은 본 방법과 매우 훌륭히 일한다.

[0044] 본 방법 및 조성물과 매우 대비되게, 선행 기술은 헤스페리딘을 함유하는 시트러스 추출물은 시험관내 리스테리아 성장에도 육류에서도 효과를 가지지 않는다고 교시한다. 순수한 플라보노이드, 예컨대 헤스페리딘 또는 네오헤스페리딘은 시험관내 리스테리아 성장에도 육류에서도 어떠한 효과를 가지지 않는다. Mandalari 등(2007)은 시험관내 플라보노이드가 농후한 시트러스 추출물이 오직 그람 음성 박테리아의 성장을 저해하고, 그람 양성 박테리아의 성장에 영향을 미치지 않고, 리스테리아의 성장에 영향을 미치지 않는다는 것을 개시한다. Mandalari 등(2007)은 순수한 형태의 네오헤스페리딘이 시험관내 리스테리아 성장에 효과를 가지지 않는다는 것을 나타낸다.

[0045] Fernandez-Lopez 등(2005)은 주성분이 헤스페리딘인, 플라보노이드를 함유하는 시트러스 추출물이 보충된 육류가 리스테리아 모노사이토게네스의 성장에 영향을 미치지 않는다는 것을 보여준다. Fernandez-Lopez 등(2005)은 이러한 추출물이 리스테리아 모노사이토게네스가 아니라 리스테리아 인노쿠아를 포함하는 다른 박테리아 균주에 항균 효과를 발휘한다는 것을 보여준다.

[0046] Mandalari 등 및 Fernandez-Lopez 등의 교시내용은 항리스테리아 화합물로서 헤스페리딘으로부터 교시되고, 육류에서 리스테리아 모노사이토게네스에 대한 시트러스 추출물로부터의 임의의 플라보노이드 또는 이의 조합을 사용하는 것이 명확하게 하지 않는다. 추가로, Mandalari 등의 교시내용은 항리스테리아 화합물로서 헤스페리딘으로부터 교시하고, 정제된 플라보노이드가 항리스테리아 효과를 가진다는 것을 명확하게 하지 않는다.

[0047] 본 개시내용은, 헤스페리딘이 적어도 80% 내지 99%, 바람직하게는 95%에서 농축될 때, 이것이 육류에서 리스테리아 모노사이토게네스의 성장을 저해한다는 것을 나타낸다. 선행 기술은 육류에서 리스테리아 성장에 영향을 가지지 않는다는 것을 교시하거나 적어도 제안한다. 본 발명자들은, 놀랍게도, 헤스페리딘이 이의 미생물, 색상 및 맛 반감기를 연장하기 위해 육류(예를 들어, 다진 육류)에서 사용될 수 있다는 것을 발견하였다. 헤스페리딘 단독이 사용될 때, 헤스페리딘은 적절한 항리스테리아 효과를 보장하도록 더 높은 농도로 사용되는 것이 요구된다. 놀랍게도, 예상치 못하게, 헤스페리딘에 대한 페놀성 디테르페네스를 포함하는 식물 추출물의 첨가는 상승적으로 항리스테리아 효과를 개선하고, 각각의 추출물의 더 낮은 용량의 사용을 허용한다.

[0048] 또한, 놀랍게도, 헤스페리딘 및 라미아세아에 추출물은 MAP 갈은 쇠고기에서의 색상을 상승적 방식으로 보존한다는 것이 발견되었다. 차가운 조건에서 6일 저장된 갈은 쇠고기의 샘플에서, 헤스페리딘과 로즈마리 추출물은 헤스페리딘 또는 로즈마리 단독의 상가작용 효과를 보존하는 색상을 초과한다.

[0049] 선행 기술은 헤스페리딘 함유 추출물이 리스테리아 모노사이토게네스 유기체에 저해 효과를 가지지 않는다는 서술로 충분하다. 놀랍게도, 본 발명자들은 높은 산소 농도의 존재 하의 헤스페리딘이 그람 양성 유기체인 리스테리아 모노사이토게네스를 저해한다는 증거를 발견하였다. 헤스페리딘 및 높은 산소 분위기의 조합은 갈은 쇠고기에서 주요 부패 유기체로서 단리된 그람 양성 유기체인 리스테리아 모노사이토게네스를 저해한다. 더욱 더 놀랍게도, 로즈마리 및 헤스페리딘의 조합이 높은 산소 분위기 하에 그람 양성 유기체인 이 리스테리아 모노사이토게네스의 상승적 저해를 나타낸다.

[0050] 페놀성 디테르페네스를 함유하는 라미아세아에 추출물 및 헤스페리딘의 조합은 산소의 존재 하에 상승적 방식으로 신선 육류, 어류 및 가금류의 색상을 보존한다.

[0051] 소정의 농도의 헤스페리딘 단독은 신선한 붉은 육류의 색상 수명을 보존하지 않고, 허용 불가능한 관능 특징을 발생시킨다. 로즈마리 추출물 및 헤스페리딘의 조합은 차가운 저장 조건에서 갈은 쇠고기의 색상 수명을 연장하도록 상승적으로 작용한다. 조합은 상가적이 아니라 상승적인데, 왜냐하면 이것이 헤스페리딘 단독 및 로즈마리 단독의 상가작용 효과를 초과하기 때문이다.

[0052] 헤스페리딘에 대한 페놀성 디테르페네스를 포함하는 라미아세아에 추출물의 첨가는 신선 육류, 어류 및 가금류에서 색상을 보존하고 미생물의 성장을 저해하는 데 있어서 효과적인 향 허용 가능한 조성물을 생성시킨다.

[0053] 본 개시내용에 따라, 헤스페리딘 단독은 육류를 포함하는 식품에서 리스테리아 성장을 억제한다. 추가로, 본 개시내용에 따라, 라미아세아에 추출물, 바람직하게는, 로즈마리 추출물, 및 헤스페리딘의 조합은 라미아세아에 추출물 또는 헤스페리딘 단독보다 그람 양성, 바람직하게는 리스테리아 모노사이토게네스, 박테리아 성장을 억

제하는 데 있어서 더 효과적이다.

[0054] 산소의 존재 하의 페놀성 디테르페네스를 포함하는 라미아세아에 추출물 및 헤스페리딘의 조합은 상업적으로 바람직한 저장 기간 후 포장에서 갈은 쇠고기의 향에 영향을 미치지 않는다. 페놀성 디테르페네스를 함유하는 라미아세아에 추출물도, 헤스페리딘 단독 또는 산소 단독 또는 이들 인자의 2개의 조합 단독도, 그리고 3개의 조합도, 향에 영향을 미치지 않으면서, 상업적으로 바람직한 저장 기간의 종료 시 색상을 보존하지 않는다.

[0055] 놀랍게도, 헤스페리딘에 대한 페놀성 디테르페네스를 포함하는 식물 추출물의 첨가는 항리스테리아 효과를 상승적으로 개선하고, 각각의 추출물의 더 낮은 용량의 사용을 허용한다.

[0056] 또한, 놀랍게도, 헤스페리딘 및 라미아세아에 추출물은 MAP 갈은 쇠고기에서의 색상을 상승적 방식으로 보존한다는 것이 발견되었다. 차가운 조건에서 오(5)일 저장된 갈은 쇠고기의 샘플에서, 헤스페리딘과 로즈마리 추출물은 헤스페리딘 또는 로즈마리 단독의 상가작용 효과를 보존하는 색상을 초과한다.

[0057] 본 발명자들은, 놀랍게도, 푸니칼라진 및 엘라그산을 함유하는 푸니카 추출물을 이의 미생물, 색상 및 맛 반감기를 연장하기 위해 다진 육류에서 사용할 수 있다는 것을 발견하였다. 푸니칼라진 및 엘라그산을 함유하는 푸니카 추출물을 단독으로(즉, 로즈마리 추출물 없이) 사용할 때, 더 높은 농도의 푸니카 추출물은 적절한 항리스테리아 효과를 보장하도록 필요하다. 놀랍게도, 로즈마리 추출물, 또는 다른 라미아세아에의 추출물의 첨가는 항리스테리아 효과를 상승적으로 개선하고, 더 적은 양의 푸니카 추출물(예를 들어, 푸니칼라진 및 엘라그산 추출물)의 사용을 허용한다.

[0058] 또한, 놀랍게도, 푸니칼라진 및 엘라그산을 함유하는 푸니카 추출물 및 라미아세아에 추출물은 MAP 갈은 쇠고기에서의 색상을 상승적 방식으로 보존한다는 것이 발견되었다. 차가운 조건에서 오(5)일 저장된 갈은 쇠고기의 샘플에서, 푸니칼라진 및 엘라그산을 함유하는 푸니카 추출물과 로즈마리 추출물은 푸니카 또는 로즈마리 단독의 상가작용 효과를 보존하는 색상을 초과한다. 이 상승적 효과는 각각의 추출물의 상이한 농도에서 관찰된다.

[0059] 놀랍게도, 본 발명자들은 높은 산소 농도의 존재 하의 푸니칼라진 및 엘라그산을 함유하는 푸니카 추출물이 그람 양성 유기체인 리스테리아 모노사이토게네스를 저해한다는 증거를 발견하였다. 푸니칼라진 및 엘라그산을 함유하는 푸니카 추출물 및 높은 산소 분위기의 조합은 갈은 쇠고기에서 주요 부패 유기체로서 단리된 그람 양성 유기체인 리스테리아 모노사이토게네스를 저해한다. 더욱 더 놀랍게도, 로즈마리 및 푸니칼라진 및 엘라그산을 함유하는 푸니카 추출물의 조합이 높은 산소 분위기 하에 그람 양성 유기체인 이 리스테리아 모노사이토게네스의 상승적 저해를 나타낸다.

[0060] 페놀성 디테르페네스를 함유하는 라미아세아에 추출물 및 푸니칼라진 및 엘라그산을 함유하는 푸니카 추출물의 조합은 산소의 존재 하에 상승적 방식으로 신선 육류, 어류 및 가금류의 색상 반감기를 연장한다. 로즈마리 추출물 또는 다른 효과적인 라미아세아에 추출물 및 푸니칼라진 및 엘라그산을 함유하는 푸니카 추출물, 및 산소의 존재의 조합이 본 발명에 중요하다.

[0061] 소정의 농도에서 푸니칼라진 및 엘라그산을 함유하는 푸니카 추출물 단독은 신선 붉은 육류의 색상 수명을 감소시키고, 허용 불가능한 관능 특징을 생성시킨다. 로즈마리 추출물 및 푸니칼라진 및 엘라그산을 함유하는 푸니카 추출물의 조합은 차가운 저장 조건에서 갈은 쇠고기의 색상 수명을 연장하도록 상승적으로 작용한다. 조합은 상가적이 아니라 상승적인데, 왜냐하면 이것이 푸니칼라진 및 엘라그산을 함유하는 푸니카 추출물 단독 및 로즈마리 단독의 상가작용 효과를 초과하기 때문이다.

[0062] 푸니칼라진 및 엘라그산을 함유하는 푸니카 추출물에 대한 페놀성 디테르페네스를 함유하는 라미아세아에 추출물의 첨가는 신선 육류, 어류 및 가금류에서 색상을 보존하고 미생물의 성장을 저해하는 데 있어서 효과적인 향 허용 가능한 조성물을 생성시킨다.

[0063] 라미아세아에 추출물, 바람직하게는, 로즈마리 추출물, 및 푸니칼라진 및 엘라그산을 함유하는 푸니카 추출물의 조합은 라미아세아에 추출물 또는 푸니칼라진 및 엘라그산을 함유하는 푸니카 추출물 단독보다 그람 양성, 바람직하게는 리스테리아 모노사이토게네스, 박테리아 성장을 억제하는 데 있어서 더 효과적이다.

[0064] 산소의 존재 하의 페놀성 디테르페네스를 함유하는 라미아세아에 추출물 및 푸니칼라진 및 엘라그산을 함유하는 푸니카 추출물의 조합은 상업적으로 바람직한 저장 기간 후 포장에서 갈은 쇠고기의 향에 영향을 미치지 않는다. 페놀성 디테르페네스를 함유하는 라미아세아에 추출물도, 푸니칼라진 및 엘라그산을 함유하는 푸니카 추출물 단독 또는 산소 단독 또는 이들 인자의 2개의 조합 단독도, 향에 영향을 미치지 않으면서, 적어도 저장의 6일까지, 조합으로서 또한 그리고 상승적 방식으로, 색상을 보존하지 않는다.

[0065] 놀랍게도, 로즈마리 추출물, 또는 다른 라미아세아에의 추출물의 첨가는 항리스테리아 효과를 상승적으로 개선하고, 각각의 추출물의 더 낮은 용량의 사용을 허용한다.

[0066] 또한, 놀랍게도, 푸니칼라진 및 엘라그산을 함유하는 푸니카 추출물 및 라미아세아에 추출물은 MAP 같은 쇠고기에서의 색상을 상승적 방식으로 보존한다는 것이 발견되었다. 차가운 조건에서 오(5)일 저장된 갈은 쇠고기의 샘플에서, 푸니칼라진 및 엘라그산을 함유하는 푸니카 추출물과 로즈마리 추출물은 헤스페리딘 또는 로즈마리 단독의 상가작용 효과를 보존하는 색상을 초과한다.

[0067] 놀랍게도, 본 발명자들은 높은 산소 농도의 존재 하의 푸니칼라진 및 엘라그산을 함유하는 푸니카 추출물이 그람 양성 유기체인 리스테리아 모노사이토게네스를 저해한다는 증거를 발견하였다. 푸니칼라진 및 엘라그산을 함유하는 푸니카 추출물 및 높은 산소 분위기의 조합은 갈은 쇠고기에서 주요 부패 유기체로서 단리된 그람 양성 유기체인 리스테리아 모노사이토게네스를 저해한다. 더욱 더 놀랍게도, 로즈마리 및 푸니칼라진 및 엘라그산을 함유하는 푸니카 추출물의 조합이 높은 산소 분위기 하에 그람 양성 유기체인 이 리스테리아 모노사이토게네스의 상승적 저해를 나타낸다.

[0068] 페놀성 디테르페네스를 함유하는 라미아세아에 추출물 및 푸니칼라진 및 엘라그산을 함유하는 푸니카 추출물의 조합은 산소의 존재 하에 상승적 방식으로 신선 육류, 어류 및 가금류의 색상을 보존한다. 따라서, 본 개시내용의 본 방법 및 조성물의 몇몇에 로즈마리 추출물 또는 다른 효과적인 라미아세아에 추출물 및 푸니칼라진 및 엘라그산을 함유하는 푸니카 추출물, 및 산소의 존재의 조합이 유리하다.

[0069] 소정의 농도에서 푸니칼라진 및 엘라그산을 함유하는 푸니카 추출물 단독은 신선 붉은 육류의 색상 수명을 감소시키고, 허용 불가능한 관능 특징을 생성시킨다. 로즈마리 추출물 및 푸니칼라진 및 엘라그산을 함유하는 푸니카 추출물의 조합은 차가운 저장 조건에서 갈은 쇠고기의 색상 수명을 연장하도록 상승적으로 작용한다. 조합은 상가적이 아니라 상승적인데, 왜냐하면 이것이 푸니칼라진 및 엘라그산을 함유하는 푸니카 추출물 단독 및 로즈마리 단독의 상가작용 효과를 초과하기 때문이다.

[0070] 푸니칼라진 및 엘라그산을 함유하는 푸니카 추출물에 대한 페놀성 디테르페네스를 함유하는 라미아세아에 추출물의 첨가는 신선 육류, 어류 및 가금류에서 색상을 보존하고 미생물의 성장을 저해하는 데 있어서 효과적인 향허용 가능한 조성물을 생성시킨다.

[0071] 라미아세아에 추출물, 바람직하게는, 로즈마리 추출물, 및 푸니칼라진 및 엘라그산을 함유하는 푸니카 추출물의 조합은 라미아세아에 추출물 또는 푸니칼라진 및 엘라그산을 함유하는 푸니카 추출물 단독보다 그람 양성, 바람직하게는 리스테리아 모노사이토게네스, 박테리아 성장을 억제하는 데 있어서 상승적 방식으로 더 효과적이다. 페놀성 디테르페네스를 함유하는 라미아세아에 추출물도, 푸니칼라진 및 엘라그산을 함유하는 푸니카 추출물 단독 또는 산소 단독 또는 이들 인자의 2개의 조합 단독도, 그리고 3개의 조합도, 향에 영향을 미치지 않으면서, 상업적으로 바람직한 저장 기간 내에, 리스테리아 모노사이토게네스에 대해 육류를 보존한다.

[0072] 산소의 존재 하의 페놀성 디테르페네스를 함유하는 라미아세아에 추출물 및 푸니칼라진 및 엘라그산을 함유하는 푸니카 추출물의 조합은 상업적으로 바람직한 저장 기간 후 포장에서 갈은 쇠고기의 향에 영향을 미치지 않는다. 페놀성 디테르페네스를 함유하는 라미아세아에 추출물도, 푸니칼라진 및 엘라그산을 함유하는 푸니카 추출물 단독 또는 산소 단독 또는 이들 인자의 2개의 조합 단독도, 그리고 3개의 조합도, 향에 영향을 미치지 않으면서, 차가운 저장 기간의 오(5)일 후 색상을 보존하지 않는다.

[0073] 육류, 어류 또는 가금류에 관한 합당한 한계 내에 첨가제의 수를 유지시키기 위해, 리스테리아 모노사이토게네스의 성장을 저해하는 특성을 제공하는 보테니컬 추출물을 사용하는 것이 유리하고, 더 특히, 상승적 항리스테리아 효과를 제공하고, 육류 맛에 영향을 미치지 않으면서 육류의 붉은 색상을 보존하는 보테니컬 추출물을 조합하는 것이 유리하다. 유리하게는, 상이한 보테니컬 추출물의 제제는, 본 개시내용에 따라, 전체 항리스테리아 활성을 증가시키고, 육류 맛에 영향을 미치지 않으면서, 이의 개별 기여의 합보다 우수한 배합된 추출물의, 육류의 붉은 색상을 보존하기 위해 상승적으로 작용한다.

[0074] 본 개시내용에 따른 방법 및 조성물은 상기 도입되고 하기하는 더 상세한 설명에 기재된 바대로 상승적 효과를 나타낸다. 본 개시내용에 따른 방법 및 조성물의 상승적 효과와 반대로, 2개의 화합물이 동일한 명시적인 반응을 유발하는 때, 작용 기전 및 조합된 효과가 이의 개별 효과의 대수 합이라는 것과 무관하게, 상기 화합물은 가중을 나타낸다고 말해지는 것에 주목한다(Levine et al., 1996). 그러나, 상승작용에서, 2개의 화합물의 연결 효과는 이의 개별 효과의 대수 합보다 크다.

[0075] Levine 등(1996)에서의 기법은 화합물 조합의 생물학적 효과를 평가하도록 사용된다. 도 1("선행 기술"로 확인되고, [Basic Principles of Pharmacology, Tulane University]로부터 취해짐), 상부 그래프에 도시된 바대로, 화합물 조합 효과는 유사한 기전을 가지는 2개의 화합물이 함께 제공될 때, 이들이 통상적으로 상가작용 효과를 생성한다는 것을 예시한다. 이것은 또한 가중이라 불린다. 그러나, 2개의 화합물의 효과가 이의 개별 효과의 합을 초과하는 경우, 이것은 상승작용이라 불리는 예상치 못한 효과이다.

[0076] 비유에 의해, 도 1의 하부 그래프에 예시된 바와 같이, 절반 용량에 관한 상승적 반응은 화합물 A 및 B의 절반 용량의 조합이 A 또는 B 단독보다 큰 반응을 생성하는 경우 발생한다.

[0077] 식품 매트릭스, 예컨대 육류에 대한 항균 제제의 분야의 당업자는 육류에서의 항균 상승작용이 예측 가능하지 않다는 것을 알고 있다. 3개의 천연 보테니컬 추출물 사이의 상이한 조합에 대해 단일 상승작용이 개시되지 않았다. Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., & Bourke, P.(2008). "The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients." *International journal of food microbiology*, 124(1), 91-97). 조합의 상승적 효과는 합성 천연물과 천연 추출물 사이의 조합에 대해 좀처럼 개시되어 있지 않다(예를 들어, WO 2013/169231 참조).

[0078] 몇몇 조성물 및 방법의 일 이점은, 본 개시내용에 따라, 탈취에 의해 휘발성 화합물을 제거하는 공정에 의해 달성된다. 탈취 공정은 보르네올, 캄퍼, 1,8-신네올, 알파 피넨, 캄펜, 베르베논 및 보르닐 아세테이트를 포함하는 휘발성 화합물을 제거한다.

[0079] 본 개시내용의 본 방법, 시스템 및 조성물의 몇몇 양태에 따른 추가적인 이점은 헤스페리딘 또는 푸니카 추출물과 라미아세아에 추출물의 조합을 통해 달성된다. 추가로, 미국 특허 제4,380,506호에 기재된 공정과 달리, 본 개시내용에 따른 방법은 추가적인 가공 비용의 사용을 피하는 분배 공정 및 방법을 요하지 않는다.

[0080] 본 방법 및 시스템의 일 양태에 따른 추가적인 이점은, 조성물이 적용되는 식품 제품, 예컨대 육류의 맛에 영향을 미치지 않아서, 육류의 맛에 영향을 미치지 않도록 휘발성 화합물의 농도를 낮은 수준으로 감소시키는 조성물이다.

[0081] 본 발명의 몇몇 양태의 추가적인 일 이점은 로즈마리 추출물과 조합될 때 항리스테리아 효과를 발생시키는 (Hayes 등에 의해 이전에 보고된 것보다) 엘라그산에서 60 초과의 완전 더 낮은 농도에 의한 푸니카 추출물의 존재이다.

도면의 간단한 설명

[0082] 도 1은 "Basic Principles of Pharmacology"(Tulane University)로부터 채택되고, 여기서 상부 부분은 "가중: 화합물 A 및 B는 동일한 효과를 생성하고, 이의 영향은 조합될 때 상가적이다"이고, 하부 부분은 "상승작용: 화합물 A 및 화합물 B의 용량의 절반의 조합은 A 또는 B 단독보다 큰 반응을 생성한다"이다.

도 2는 본 발명에 따른 육류에서의 리스테리아 모노사이토게네스 성장을 보여주는 그래프이다.

도 3은 본 발명에 따른 헤스페리딘 및 로즈마리 추출물의 조합의 항리스테리아 상승작용 효과를 보여주는 그래프이다.

도 4는 본 발명에 따른 리스테리아 모노사이토게네스 성장을 저해하고 감소시키는 로즈마리 추출물 및 헤스페리딘의 상이한 조합의 항균 표면 반응을 보여주는 그래프이다.

도 5는 본 발명에 따른 로즈마리 추출물 및 헤스페리딘의 조합에 관한 본 발명에 따른 육류의 붉은 색상 값을 보여주는 막대 차트이다.

도 6은 본 발명에 따른 로즈마리 및 푸니카 추출물의 다양한 조합에 관한 본 발명에 따른 육류의 붉은 색상 값을 보여주는 막대 차트이다.

도 7은 다진 쇠고기에서의 식물 추출물에 의한 리스테리아 모노사이토게네스 성장의 저해를 보여주는 차트이다.

도 8은 9일에 8℃에서 다진 쇠고기에서의 식물 추출물에 의한 리스테리아 모노사이토게네스 성장의 저해를 보여주는 그래프이다.

도 9는 6일에 8℃에서 다진 쇠고기에서의 식물 추출물에 의한 리스테리아 모노사이토게네스 성장의 저해를 보여주는 차트이다.

도 10은 본 발명에 따라 9일에 8℃에서 다진 쇠고기에서의 식물 추출물에 의한 리스테리아 모노사이토게네스 성장의 저해를 보여주는 차트이다.

도 11은 본 발명에 따라 리스테리아 모노사이토게네스 성장을 저해하고 감소시키는 로즈마리 및 푸니카 추출물의 상이한 조합의 항균 표면 반응을 보여주는 그래프이다.

도 12는 가금류 소세지에서의 리스테리아 모노사이토게네스를 보여주는 그래프이다.

도 13은 본 발명에 따라 R/P의 추출물 조합에 의한 가금류 소세지에서의 리스테리아 성장의 저해를 보여주는 그래프이다.

도 14는 R/H의 추출물 조합에 의한 가금류 소세지에서의 리스테리아 성장의 저해를 보여주는 그래프이다.

도 15는 돼지고기 소세지(대조군)에서의 리스테리아 모노사이토게네스를 보여주는 그래프이다.

도 16은 R/P의 추출물 조합에 의한 돼지고기 소세지에서의 리스테리아 성장의 저해를 보여주는 그래프이다.

도 17은 R/H의 추출물 조합에 의한 돼지고기 소세지에서의 리스테리아 성장의 저해를 보여주는 그래프이다.

도 18은 훈제 연어(대조군)에서의 리스테리아 모노사이토게네스의 성장을 보여주는 그래프이다.

도 19는 성장의 30일에 훈제 연어에서의 리스테리아 모노사이토게네스의 저해를 보여주는 그래프이다.

도 20은 성장의 30일에 훈제 연어에서의 리스테리아 모노사이토게네스의 저해를 보여주는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0083] 본 개시내용에 따른 조성물은, 맛에 영향을 미치지 않으면서, 라미아세아에 추출물 및 헤스페리딘 및 신선 육류, 어류 및 가금류의 반감기를 연장하기 위한 조성물을 사용하는 방법을 포함한다.

[0084] 본 발명은 또 다른 형태에서 라미아세아에 추출물 및 푸니카 추출물을 포함하는 조성물 및 맛에 영향을 미치지 않으면서 신선 육류, 어류 및 가금류의 반감기를 연장하기 위한 이들 조성물을 사용하는 방법을 포함한다.

[0085] 본 방법 및 조성물은 단독의 또는 헤스페리딘 또는 엘라그산 및 푸니칼라진이 농후한 푸니카 추출물과 조합된, 페놀성 디테르페네스가 농후한 로즈마리 추출물이 상업적으로 상당한 기간 동안 육류의 붉은 색상을 보존한다는 발견에 기초한다. 본 발명자들은 시트러스 껍질로부터 추출되고 이후 정제된 순수한 헤스페리딘, 즉 플라보노이드에 의해 육류를 처리하는 것이 육류에서 리스테리아 모노사이토게네스의 성장을 예방한다는 것을 발견하였다. 헤스페리딘 또는 엘라그산 및 푸니칼라진을 포함하는 푸니카 추출물과 조합된, 페놀성 디테르페네스를 포함하는 라미아세아에 추출물은 상업적으로 바람직한 기간 동안 미생물의 성장을 억제하기 위해 그리고 육류 맛에 영향을 미치지 않으면서 육류의 붉은 색상을 보존하기 위해 신규한 해결책을 상승적으로 제공한다. 본 발명의 조성물은 그람 양성 미생물의 성장을 저해하는 것으로 발견되었다. 본 발명의 조성물은 리스테리아의 성장을 저해하는 것으로 발견되었다. 본 발명의 조성물은 리스테리아 모노사이토게네스의 성장을 저해하는 것으로 발견되었다.

[0086] 육류 맛에 영향을 미치지 않으면서, 육류에서 리스테리아 모노사이토게네스 성장을 상승적으로 예방하도록 사용되고, 육류 색상의 보존을 상승적으로 개선하는, 페놀성 디테르페네스 카르노스산 및 카르노솔 및 헤스페리딘에서 표준화된 식물 추출물, 또는 페놀성 디테르페네스 카르노스산 및 카르노솔에서 표준화된 식물 추출물 및 엘라그산 및 푸니칼라진에서 표준화된 식물 추출물을 포함하는 조합은 선행 기술로부터 검색될 수 없다.

[0087] 페놀성 디테르페네스를 포함하는 로즈마리 또는 다른 라미아세아에 추출물과 헤스페리딘과의 또는 푸니칼라진 및 엘라그산을 포함하는 푸니카 추출물과의 조합의 항균 사용에 대한 선행 기술의 어떤 것도 본 방법 및 조성물을 예측하거나 명확하게 만들지 않는다. 선행 기술은 허브 에센셜 오일의 사용 또는 유기 산, 예컨대 시트르산의 사용에 초점을 둔다. 본 개시내용에서 사용된 로즈마리 추출물은 이것이 본질적으로 천연 에센셜 오일을 함유하지 않고 페놀성 디테르페네스가 농후하게 하는 방식으로 가공된다. 선행 기술은 페놀성 디테르페네스가 농후한 라미아세아에 추출물 및 푸니칼라진 및 엘라그산이 농후한 푸니카 추출물의 상승적 조합을 예측하지도 이것이 명확하게 하지도 않는다.

[0088] 선행 기술은 페놀성 디테르페네스이 농후한 라미아세아에 추출물 및 헤스페리딘의 상승적 조합을 예측하지도 이것이 명확하게 하지도 않는다. 선행 기술은 그람 양성 유기체: 리스테리아 모노사이토게네스에 대한 페놀성 디테르페네스를 포함하는 라미아세아에 추출물과 푸니칼라진 및 엘라그산을 포함하는 푸니카 추출물과의, 또는 헤

스페리딘과의 조합의 놀랍게도 유리한 항균 효과를 예측하지도 이것이 명확하게 하지도 않는다. 선행 기술은 페놀성 디테르페네스를 포함하는 라미아세아에 추출물과 푸니칼라진 및 엘라그산을 포함하는 푸니카 추출물과의, 또는 헤스페리딘과의 조합의 놀랍게도 유리한 색상 보존 효과를 예측하지도 이것이 명확하게 하지도 않는다.

[0089] 선행 기술은 페놀성 디테르페네스를 포함하는 라미아세아에 추출물과 푸니칼라진 및 엘라그산을 포함하는 푸니카 추출물과의, 또는 헤스페리딘과의 조합의 식품 맛에 대한 영향의 부재를 예측하지도 이것이 명확하게 하지도 않는다.

[0090] 나리긴, 아이소쿠라메틴, 네오헤스페리딘, 헤스페리딘, 폰시린, 네빌레틴 및 탄제레틴(이들로 제한되지는 않음)을 포함하는 동일한 효과를 가지는 다른 플라보노이드.

[0091] 정의

[0092] 하기는 본 개시내용에 걸쳐 사용된 정의의 목록이다:

[0093] "유효량"은 당해 분야의 당업자가 일상 실험을 통해 용이하게 결정하는 것에 따라 특정 효과를 달성하는 데 필요한 양이다. 예를 들어, 본 개시내용과 관련하여, 신선 육류, 어류 및 가금류에 붉은 색상의 수명을 연장하기 위해 신선 육류, 어류 및 가금류에 적용되는 푸니카 추출물 및 라미아세아에 추출물을 포함하는 조성물의 유효량은 푸니카 및 라미아세아에 추출물의 농도, 신선 육류, 어류 및 가금류의 용적 및/또는 표면적 및 신선 육류, 어류 및 가금류의 대기 환경 조건(이들로 제한되지는 않음)을 포함하는 공지된 매개변수에 기초한 붉은 색상 수명을 제공하는 것으로 결정된 양이다. 유사하게, 다른 식품의 수명을 연장하기 위한 로즈마리/푸니카의 유효량은 유사한 방식으로 결정된다.

[0094] "식품" 및 "식품 제품"은 사람 또는 동물이 먹는 제품을 의미한다. 식품 또는 식품 제품은 신선 육류, 어류 및 가금류, 및 가공 육류, 어류 및 가금류를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0095] "신선 육류, 어류 및 가금류"는 육류 어류 및 가금류, 전체 도체, 이의 절단 부분 및 이의 분쇄 부분을 의미한다. 신선 육류, 어류 및 가금류는 미가공 육류, 어류 및 가금류, 및 육류, 어류 또는 가금류에 혼입된 첨가제, 예컨대 폴리포스페이트, 염, 물, 향미료, 브로쓰, 첨가 단백질, 당, 전분 등을 포함하는 육류, 어류 및 가금류 둘 다를 포함한다. 동일한 성분을 함유하지만, 또한 하기 중 하나 이상을 함유할 수 있는 소금에 절인 육류, 어류 및 가금류로부터, 이들 성분을 함유하는 신선 육류, 어류 또는 가금류를 구별하는 것이 중요하다: 에리쓰르베이트, 에리쓰르브산, 아스코르베이트, 아스코르브산, 니트라이트, 니트레이트 또는 배양물. 신선 육류, 어류 및 가금류는 소금에 절인 육류, 어류 또는 가금류와 구별되고 이것과 반대이고, 이것을 포함하지 않는다.

[0096] "헤스페리딘"은 천연 또는 합성으로부터 추출된 화합물을 의미한다.

[0097] "라미아세아에 추출물"은 라미아세아에 패밀리, 바람직하게는 로즈마리, 세이지, 오레가노, 타임, 민트, 및 샐비어(Salvia), 로스마리누스(Rosmarinus), 레페치니아(Lepechinia), 오레가눔(Oreganum), 타이무스(Thymus), 히소푸스(Hyssopus)의 속 및 이의 혼합물의 식물로부터의 추출물을 의미한다. 로즈마리가 가장 바람직하다.

[0098] "육류, 어류 및 가금류"는 a) 가공 육류, 어류 및 가금류 및 b) 미가공 육류, 어류 및 가금류 둘 다를 의미한다.

[0099] "페놀성 디테르페네스"는 카르노스산, 카르노솔, 메틸카르노세이트, 및 다른 페놀성 디테르펜 유도체(로스마놀, 아이소로스마놀, 11,12 -다이-O-메틸아이소로스마놀, 12-O-메틸카르노스산, 로스마놀-9-에틸 에터, 시르시마리틴, 카르노스산의 메틸화 일산화 생성물, 겐콰닌, 에피로스마놀, 에피아이소로스마놀, 카르노스산 유도체, 에피로스마놀 에틸 에터, 크립토탄시논) 및 이들의 혼합물을 의미한다.

[0100] "가공", 예컨대 "가공 식품" 및 "가공 육류, 어류 및 가금류"는 식품, 예컨대 육류, 어류 또는 가금류의 가공 또는 이러한 가공 제품의 추가의 가공으로부터 생긴 제품이어서, 잘린 표면은 그 제품이 더 이상 신선 육류, 어류 또는 가금류의 특징을 가지지 않는다는 것을 보여준다. 가공은 가열, 훈제, 말리기, 숙성, 건조, 양념, 추출, 압출 또는 이들 공정의 조합을 포함하는 초기 생성물을 실질적으로 변경하는 임의의 작용을 의미한다. 공정은 비열 처리 공정 및 열 처리 공정을 포함한다.

[0101] "푸니카 추출물"은 푸니카 속, 바람직하게는 푸니카 그라나툼(*Punica* granatum) 및 푸니카 프로토푸니카(*Punica protoPunica*), 및 이들의 혼합물의 식물로부터의 추출물을 의미한다. 푸니카 그라나툼이 가장 바람직하다.

[0102] "미가공"(예컨대, 육류, 어류 및 가금류)은 식품(예를 들어, 육류, 어류 및 가금류)의 원래 상태를 실질적으로 변화시키는 어떤 처리를 겪지 않은 것을 의미한다. 그러나, 식품은 예를 들어 분할되거나, 갈라지거나, 체질되

거나, 뼈가 추려지거나, 다져지거나, 가죽이 벗겨지거나, 깎아지거나, 껍질이 벗겨지거나, 절단되거나, 세정되거나, 손질되거나, 급속냉동되거나, 냉동되거나, 차갑게 되거나, 분쇄되거나, 겉껍질이 벗겨지거나, 포장 또는 비포장될 수 있다. 육류, 어류 및 가금류를 포함하는 미가공 식품은 비처리 생육, 어류 및 가금류, 및 분쇄되거나 다져진, 이것에 식품 시즈닝 또는 첨가제가 첨가된, 또는 육류, 어류 또는 가금류의 내부 근육 섬유를 변경하고 이에 따라 신선 육류, 어류 또는 가금류의 특징을 제거하기에 불충분한 가공을 겪은 신선 육류, 어류 및 가금류를 포함한다.

[0103] 본 방법 및 조성물의 개발에서, 헤스페리딘이 소정의 농도 범위 내에 있을 때 육류에서 항리스테리아 효과를 가진다는 것이 발견되었다.

[0104] 본 방법 및 조성물의 개발에서, 헤스페리딘 또는 푸니카 추출물과 조합된 페놀성 디테르페네스를 포함하는 로즈마리 추출물이, 추출물이 단독으로 적용될 때보다, 육류에서의 리스테리아 모노사이토게네스의 성장을 억제하는 데 있어서 탁월한 효과를 가진다는 것이 발견되었다.

[0105] 본 방법 및 조성물의 개발에서, 헤스페리딘 또는 푸니칼라진 및 엘라그산을 포함하는 푸니카 추출물과 조합된 로즈마리의 추출물의 소정의 혼합물이, 농도 비율의 소정의 범위 내에 제조될 때, 상승적 항리스테리아 효과를 제공한다는 것이 발견되었다.

[0106] 본 방법 및 조성물의 개발에서, 헤스페리딘 또는 푸니카 추출물과 조합된 페놀성 디테르페네스를 포함하는 로즈마리 추출물이, 추출물이 단독으로 적용될 때보다, 육류에서의 붉은 색상을 보존하는 데 있어서 탁월한 효과를 가진다는 것이 발견되었다.

[0107] 본 방법 및 조성물의 개발에서, 헤스페리딘 또는 푸니칼라진 및 엘라그산을 포함하는 푸니카 추출물과 조합된 로즈마리의 추출물의 소정의 혼합물이, 농도 비율의 소정의 범위 내에 제조될 때, 육류에서의 상승적 붉은 색상 보존 효과를 제공한다는 것이 발견되었다.

[0108] **페놀성 디테르페네스이 농후한 추출물 및 헤스페리딘 또는 푸니카 추출물의 혼합물**

[0109] 페놀성 디테르페네스, 예컨대 카르노스산 또는 카르노솔은 특이적으로 라미아세아에에서 발생한다. 현재까지, 카르노스산은, 모두 라미아세아에를 제외하고, 오직 약간의 종에서 확인된다. 본 발명자들의 지식이 미치는 한, 70개 중 오직 7개의 멘테아에(Mentheae) 집단의 속은 카르노스산: 샐비어(Brieskorn and Dumling, 1969), 로즈마리누스(Luis and Johnson, 2005), 레페치니아(Bruno et al., 1991), 오레가눔(Hossain et al., 2010) 및 타이무스(Achour et al., 2012)를 함유한다. 이것은 히소푸스에 존재할 수 있고, 로스마놀-9-에틸 에터(7)인, 이의 가능한 유도체 중 하나가 확인되었다(Djarmati et al., 1991). 카르노스산은 또한 오시뭄(Ocimum)인 오시메아에(Ocimeae) 집단의 일 속에 소량 화합물로 발생한다(Jayasinghe et al., 2003). Brieskorn, C.H., Dumling, H.J., 1969. Carnosolsaure, der wichtige antioxydativ wirksame Inhaltsstoff des Rosmarin-und Salbeiblattes. Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und Forschung 141, 10-16; Luis, J.C., Johnson, C.B., 2005; Bruno, Maurizio, et al. "Abietane diterpenoids from *Lepechinia meyeni* and *Lepechinia hastata*." Phytochemistry 30.7 (1991): 2339-2343; Hossain, Mohammad B., et al. "Characterization of phenolic composition in Lamiaceae spices by LC-ESI-MS/MS." Journal of agricultural and food chemistry 58.19 (2010): 10576-10581; Achour, S., Khelifi, E., Attia, Y., Ferjani, E., Noureddine Hellah A., 2012. Concentration of Antioxidant Polyphenols from Thymus capitatus extracts by Membrane Process Technology. Journal of food science 77, C703-C709; Djarmati, Z., Jankov, R.M., Schwirtlich, E., Djulinac, B., Djordejevic, A., 1991. High antioxidant activity of extracts obtained from sage by supercritical CO_2 extracton. Journal of the American Oil Chemists Society 68, 731-734; Jayasinghe, C., Gotoh, N., Aoki, T., Wada, S., 2003. Phenolic composition and antioxidant activity of sweet basil (Ocimum basilicum L.). Journal of agricultural and food chemistry 51, 4442-4449. Seasonal variations of rosmarinic and carnosic acids in rosemary extracts. Analysis of their *in vitro* antiradical activity. Spanish Journal of Agricultural Research 3, 106-112.

[0110] 여기서, 이 페놀성 디테르페네스는 본질적으로 페놀성 디테르페네스를 추출하고 농축시킬 목표로 로즈마리로부터 추출된다: 44-85%. 이렇게 얻어진 추출물은 식품 맛에 영향을 미치는 에센셜 오일 및 휘발성 화합물을 제거하기 위해 이후 탈취된다.

[0111] *로즈마리 추출물*

[0112] 로즈마리(로스마리누스 오피시날리스) 잎은 다양한 용매에 의해 추출될 수 있고, 상이한 화합물에서 농후한 추출물을 생성시킬 수 있다. 예를 들어, 수성 추출물은 로스마린산 중에 다소 풍부하지만, 유기 용매를 사용한 추출은 페놀성 디테르페네스, 예컨대 카르노스산 및 카르노솔이 농후한 추출물을 오히려 생성시킨다. 로즈마리 추출물의 조성물을 제조하기 위한 자세한 절차는 미국 특허 제5,859,293호 및 WO 96/34534호(둘 다 본 명세서에서 참고문헌으로 포함됨)에 기재되어 있다.

[0113] 로즈마리 잎은 실온에서 아세톤에 의해 추출된다. 추출이 완료된 후, 아세톤 추출물을 여과시켜 로즈마리 잎으로부터 용액을 분리하고, 감압 하에 농축시켜 농축 네이티브 추출물을 만든다. 이때, 농축된 추출물을 분말화된 추출물을 만들기 위해 온화한 열 하에 진공 오븐에서 직접적으로 건조시킬 수 있고, 이 추출물은 약 15%-30%의 카르노스산 및 1%-3%의 카르노솔을 포함하는 조성물이다. 대안적으로, 농축된 네이티브 추출물에, 수성 탄산나트륨($NaHCO_3$)을 첨가하여 카르노스산 및 다른 유기 산을 용해시키고, 염기 불용성 물질을 침전시킨다.

[0114] 용액을 여과시켜 고체로부터 분리하고, 여과액을 추가로 감압 하에 농축시킨다. 최종 농도가 달성되면, 인산(H_3PO_4)을 첨가하고, 산 불가용성 물질(카르노스산, 카르노솔 및 카르노스산 유도체 포함)을 농축 용액으로부터 침전시킨다. 활성탄을 여과 전에 용액 중의 로즈마리 추출물을 탈색시키는 공정 동안 사용한다. 여과에 걸쳐, 침전된 고체를 후속하여 액체로부터 분리하고, 물에 의해 세정하여 불순물을 제거한다.

[0115] 마지막으로, 고체를 진공 오븐에서 건조시킥고, 이후 분말로 분쇄하여 약 40-65%의 카르노스산, 2-10%의 카르노솔 및 2-10%의 12-O-메틸카르노스산을 함유하는 조성물을 만든다. 여기서 사용된 추출물은 48% 초과의 카르노스산 + 카르노솔을 함유한다. 마지막 단계는 로즈마리 추출물을 탈취하도록 수행된다. 이것은 아세톤/헥산의 혼합물에 의해 이전의 고체의 후속하는 추출에 상응한다. 이 단계의 목적은 지방 분자 및 휘발성 화합물의 제거이다. 여과액을 감압 하에 농축시키고 액체 담체에서 직접적으로 제제화한다.

[0116] 본 명세서 및 청구항 내에서, 페놀성 디테르페네스 카르노스산 및 카르노솔에 표준화된 이 추출물은 로즈마리, 또는 로즈마리 추출물 또는 로즈마리(분말) 또는 로즈마리(액체)라 칭해질 것이다.

[0117] *헤스페리딘 추출*

[0118] 건조된 미성숙 과일(시트러스 아루란티움 엘.(*citrus aurantium L.*))을 물에 의한 추출 전에 펙틴을 제거하기 위해 증기에 노출시킨다. 후속하여, 수산화나트륨 및 수산화칼슘을 용액 중에 첨가하여 pH 값을 안정화시킨다. 여과 단계 이후, HCl을 이용하여 여과액의 산성화를 유도한다. 이 단계 시, 헤스페리딘은 침전하고, 액체 용액을 제거하고, 침전물을 건조시킨다. 최종 생성물은 HPLC에 의해 측정될 때 90% 내지 99%의 헤스페리딘, 바람직하게는 95% 초과의 헤스페리딘을 함유한다.

[0119] 얻어진 추출물은 본질적으로 헤스페리딘(>80%)을 함유하고, 순수하다고 생각된다. 본 개시내용에 걸쳐, 95% 초과로 헤스페리딘 중에 표준화된 이 추출물은 헤스페리딘 또는 헤스페리딘(분말) 또는 헤스페리딘(액체)이라 칭해질 것이다.

[0120] *푸니카 추출*

[0121] 석류 스킨 비터(푸니카 그라나툼 엘.)를 에탄올/물에 의해 추출한다. 추출물을 여과시키고, 이후 농축시킨다. 추출물을 건조 전에 담체, 이 실시예에서 말토덱스트린과 혼합한다. 상이한 건조 기술을 적용할 수 있다. 이 추출물을 하기 폴리페놀에서 표준화한다: HPLC에 의해 결정된 바와 같은 푸니칼라진(HPLC에 의해 7.5% 초과) 및 엘라그산(1.5-2.5%).

[0122] 본 개시내용에 걸쳐, 푸니칼라진(HPLC에 의해 7.5% 초과) 및 엘라그산(1.5-2.5%)에서 표준화된 이 추출물은 푸니카, 또는 푸니카 추출물 또는 푸니카(분말) 또는 푸니카(액체)라 칭해질 것이다.

[0123] *로즈마리 추출물/헤스페리딘 및 로즈마리 추출물/푸니카 추출물의 생성물 및 혼합물의 제조*

[0124] 식물 추출물 및 이의 조합을 분말로 건조시킨다. 추출물의 조합의 적합한 건조 공정을 보장하도록 말토덱스트린을 사용한다. 말토덱스트린은 건조 공정을 위한 흔히 사용되는 부형제 또는 담체이다.

[0125] 말토덱스트린은 20 미만의 덱스트로스 당량을 가지는 전분 가수분해 생성물로 정의된다. 덱스트로스 당량(DE 값)은 가수분해물의 건조물에 대한 D-글루코스의 백분율로 표시된 전분 유래 올리고사카라이드의 환원력의 측정치이고, 무수 글루코스 단위의 평균 중합도(DP)의 역의 값이다. 전분 가수분해의 생성물로서, 말토덱스트린은 선형 아밀로스 및 분지 아밀로펙틴 분해 생성물을 함유하고, 따라서 이것은 a-(1,4) 및 a-(1,6) 연결에 의해 연

결된 D-글루코스 중합체로 생각된다.

[0126] 말토덱스트린이 천연 화합물(전분)로부터 유래하지만, 이의 구조는 이것이 유래한 천연 분자(전분)의 초기 구조와 다르다. 이 차이는 가수분해 공정에 의해 유도된다. 따라서, 말토덱스트린 구조는 자연히 발생하지 않는다.

[0127] 다른 가능한 부형제 또는 담체는 말토덱스트린, 아라비아 검, 덱스트로스, 지방산의 염, 모노글라이세라이드 및 다이글라이세라이드, MPG, 폴리소르베이트 80, 식물성 오일, 지방산의 모노글라이세라이드 및 다이글라이세라이드, 글루코스 시럽, 글라이세린, 물 및 알콜을 포함한다.

[0128] 조성물을 15% 지방에서의 다진 쇠고기 생육에 첨가한다.

[0129] 본 방법 및 조성물을 발생시키는 작업의 과정에서, 전통적인 미생물 방법을 이용하여 다수의 변하는 농도 비율의 로즈마리 추출물 및 헤스페리딘 또는 푸니카 추출물의 혼합물을 항리스테리아 효과에 대해 시험한다. 모든 여기서 시험된 샘플에서의 박테리아 목록을 표준화된 방법(NF EN ISO 11-290)에 따라 알로아(Aloa) 배지에서 수행한다. 리스테리아 모노사이토게네스의 성장을 어떤 항리스테리아 물질 없이 그리고 어떤 식물 추출물(대조군) 없이 육류에서 평가한다. 대조군 육류에서의 리스테리아 성장의 데이터는 도 2에 표시되어 있다. 성장 6일 후 리스테리아가 불과 0.29 log CFU/㎖로 약간 성장한다는 것에 주목한다. 성장 9일 후, 리스테리아는 2.42 log CFU/㎖로 성장했다. 육류에서의 실험을 20% 초과의 O_2, 더 정확히 70%의 O_2 및 30%의 CO_2를 함유하는 기체 조절 포장(MAP)에서 수행한다.

[0130] 육류 제조 후, 육류의 뱃치를 다짐 공정 후 바로 샘플링하고, 냉동 조건에서 실험실로 옮겼다. 이 실험실에서, 육류를 2kg 샘플로 샘플링하고, -20℃에서 진공에서 컨디셔닝하고, 실험 전 24h에, 2kg 육류 샘플을 2-4℃로 옮기고, 코어 온도가 -1℃를 획득할 때까지 이 온도에서 24h±3h 동안 유지시켰다.

[0131] 이 단계에서, 2kg 육류 샘플을 3 수준의 생물안전성의 실험실에서 리스테리아 모노사이토게네스에 의해 접종하여서, 다른 미생물에 의한 오염을 피했다. 육류에 대한 임의의 추가의 보충을 이러한 실험실에서 수행한다. 4℃에서의 접종원의 균질화 후, 접종된 2kg 육류 샘플을 식물 추출물에 의해 보충하고 균질화한다. 식물 추출물은 분말 형태이고, 그대로 육류에 첨가된다. 이것을 건조 분말로 유지시키기 위해, 식물 추출물을 건조 공정 전에 말토덱스트린에 의해 보충한다.

[0132] 식물 추출물을 육류에 친유성 또는 친수성 액체, 또는 이들의 조합으로서 첨가한다. 이렇게 하기 위해, 식물 친유성 또는 친수성 추출물은 가용화되거나 액체일 필요가 있고, 비건조된 추출물을 건조 단계를 거치지 않고 직접적으로 사용한다.

[0133] 식물 추출물의 보충 및 균질화 직후, 이렇게 형성된 다진 육류의 100g의 2개의 조각을 트레이에 함께 위치시켰다. 추출물 처리가 없는 대조군 육류 조각은 동일한 절차를 따랐다.

[0134] 이후, 트레이를 4 또는 8℃에서 20% 이상의 산소, 바람직하게는 70%의 O_2 및 30%의 CO_2의 조절 기체 하에 컨디셔닝한다. 포장된 육류를 기재된 시간 동안 암소에서 저장한다.

[0135] 로즈마리 및 헤스페리딘 추출물, 로즈마리 및 푸니카 추출물, 통상적인 항리스테리아 화합물(락트산나트륨 또는 아세트산나트륨) 및 비처리된 대조군을 포함하는 일련의 실험을 수행한다. 로즈마리 및 헤스페리딘의 혼합물 또는 단독의 추출물을 육류에 1.18%로 첨가한다. 로즈마리 및 푸니카의 혼합물 또는 단독의 추출물을 육류에 0.48%로 첨가한다. 통상적인 항리스테리아 화합물, 락트산나트륨 및 아세트산나트륨을 별개의 실험에서 각각 전통적인 농도 25g/kg 및 3g/kg로 첨가한다.

[0136] 추출물의 조합을 제조하고, 하기 비율에 따라 육류에 첨가하고, 시험 전에 하였다:

		대조군 LM	0,5R	R	0,5H	H	0,5R + 0,5H	0,5R + H	R + 0,5H	R + H
추출물의 조성(%)	로즈마리 추출물	0,00	1,28	2,56	0,00	0,00	1,28	1,28	2,56	2,56
	카르노스산	0,00	0,56	1,13	0,00	0,00	0,56	0,56	1,13	1,13
	카르노스산 + 카르노솔	0,00	0,62	1,24	0,00	0,00	0,62	0,62	1,24	1,24
	헤스페리딘 추출물	0,00	0,00	0,00	24,00	49,00	24,00	48,00	24,00	48,00
	헤스페리딘	0,00	0,00	0,00	22,80	46,55	22,80	45,60	22,80	45,60
다진 쇠고기에서의 조성(ppm)	로즈마리 추출물	0	151	302	0	0	151	151	302	302
	카르노스산	0	66	133	0	0	66	66	133	133
	카르노스산 + 카르노솔	0	73	146	0	0	73	73	146	146
	헤스페리딘 추출물	0	0	0	2832	5782	2832	5664	2832	5664
	헤스페리딘	0	0	0	2690	5493	2690	5381	2690	5381

R: 로즈마리 추출물; H: 헤스페리딘 추출물; 0.5R: 로즈마리 추출물의 절반 농도; 0.5H: 헤스페리딘 추출물의 절반 농도

[0137] R: 로즈마리 추출물; P: 푸니카 추출물; 0.5R: 로즈마리 추출물의 절반 농도; 0.5P: 푸니카 추출물의 절반 농도

		대조군 LM	0,5R	R	0,5P	P	0,5R + 0,5P	0,5R + P	R + 0,5P	R + P
추출물의 조성(%)	로즈마리 추출물	0,00	3,33	6,65	0,00	0,00	3,33	3,33	6,65	6,65
	카르노스산	0,00	1,47	2,93	0,00	0,00	1,47	1,47	2,93	2,93
	카르노스산 + 카르노솔	0,00	1,61	3,22	0,00	0,00	1,61	1,61	3,22	3,22
	석류 추출물	0,00	0,00	0,00	13,50	27,00	13,50	27,00	13,50	27,00
	엘라그산	0,00	0,00	0,00	0,27	0,54	0,27	0,54	0,27	0,54
	푸니칼라진	0,00	0,00	0,00	1,22	2,43	1,22	2,43	1,22	2,43
다진 쇠고기에서의 조성(ppm)	로즈마리 추출물	0	160	319	0	0	160	160	319	319
	카르노스산	0	70	140	0	0	70	70	140	140
	카르노스산 + 카르노솔	0	77	154	0	0	77	77	154	154
	석류 추출물	0	0	0	648	1296	648	1296	648	1296
	엘라그산	0	0	0	13	26	13	26	13	26
	푸니칼라진	0	0	0	58	117	58	117	58	117

[0138]

[0139] 보충 및 균질화 직후, 햄버거 형상의 갈은 육류의 100g의 2개의 조각을 트리이에 위치시켰다. 이후, 트레이를 70%의 O_2 및 30%의 CO_2를 함유하는 조절 기체에서 컨디셔닝하고, 리스테리아 성장 및 붉은 색상을 포함하는 관능 특징의 분석까지 8℃에서 저장한다. 이러한 분석을 저장의 0일, 6일 및 9일에 수행한다.

[0140] 리스테리아 모노사이토게네스의 성장을 각각의 추출물 또는 화합물에 대해 및 이들의 조합에 대해 냉동 조건에서 육류에서 평가한다. 리스테리아 모노사이토게네스의 성장을 실험의 시작 시, 상업적 반감기의 2/3(6일)에 및 반감기의 상업적 기간(9일)에 상응하는 시점에 측정한다. 리스테리아 성장의 대수 값(log CFU/㎖)을 각각의 실험 및 처리에 대해 계산한다. 식물 추출물에 의해 처리된 육류와 비처리된 대조군 사이의 리스테리아 성장의 대수 값(log CFU/㎖)의 차이를 계산하여 최종 결과를 생성한다. 더 음의 값을 얻어지면, 추출물 또는 추출물의 조합의 항리스테리아 효과가 더 높다. 육류 과학 미생물학에서, 소정의 시간 동안, 값은 0.5 Log10 CFU $\bullet g^{-1}$의 차이가 관찰될 때 2개의 시리즈 사이에 상당한 것으로 생각된다(Caillou et al., 2014); (Guide pour la validation de méthodes d'essais microbiologiques et l'évaluation de leur incertitude de mesure dans les domaines de la microbiologie alimentaire et de l'environnement), Schweizerische Eidgenossenschaft, Confédération suisse, Département fédéral de l'économie, de la formation et de la recherche DEFR, Document No. 328, April 2013, Rev. 03). 미생물학에서, 이의 효과가 비처리된 대조군과 비교하여 -0.5 log CFU/㎖를 초과하는 경우 처리가 상당한 항박테리아 효과를 가진다는 것에 주목한다.

[0141] 리스테리아 성장 동안, 육류의 색상을 모니터링하고, 추출물의 첨가 직후(0일에) 및 성장의 6일에) 영상을 취한다. 노출의 표준화된 광 조건 하에 및 "PackShot Creator"라 불리는 시스템을 이용하여 영상이 취해진다. 실제로, 이 전문적 설비는, 최소 반사로 동일한 조건 하에 항상 취해지는 영상을 생성하는, 균일한 광을 확산시키는 4개의 형광성 관을 함유하는 최적화 광 박스로 이루어진다.

[0142] 상이한 시간 스케일에서의 "샘플"을 나타내는 각각의 사진을 오픈 소스 이미지 분석 프로그램 ImageJ에서 로딩

한다. 소프트웨어를 식품 산업에서 보통 사용하여 상이한 식품 매개변수, 예컨대 색상 또는 밀도를 측정한다(Reineke et al. "The Influence of Sugars on Pressure Induced Starch Gelatinization, Procedia Food Science, 1, 2011, 2040-3046; Kelkar et al. "Developing novel 3D measurement techniques and prediction method for food density determination, Procedia Food Science, 1, 2011, 483-491). 붉은 색상의 대표적인 값을 얻기 위해, RGB 모델의 3개의 색상 단위 적색(R), 녹색(G) 및 청색(B) 중에서 색상 단위 적색(R)을 사용하고, 샘플에 걸쳐 그려진 선의 각각의 화소의 색상을 측정한다. 인빌트(inbuilt) RGB 프로필 플롯 플러그인을 이용하여 이 선을 따른 각각의 화소의 상이한 색상 값, 특히 붉은 색상의 값을 결정한다. 결과는 이 선을 따른 화소 수의 함수로서 상이한 색상 값의 변동으로 제시된다. $p<0.05$로 ANOVA 시험을 이용하여 결과를 유의미한 차이에 대해 통계적으로 분석한다. 따라서, 샘플마다, 1000 초과의 화소를 분석한다.

[0143] 육류의 색상에 대한 식물 추출물의 효과를 평가하기 위해, 처리된 육류의 붉은 색상을 비처리된 대조군과 비교한다. 이 효과는 하기에 의해 계산된다: [추출물을 가지는 육류에서의 붉은 색상] - [(추출물이 없는) 대조군 육류에서의 붉은 색상]. 음의 효과는 추출물의 첨가가 육류의 붉은 색상을 보존하지 않는다는 것을 의미한다. 양의 효과는 추출물의 첨가가 대조군과 비교하여 육류의 붉은 색상을 개선한다는 것을 의미한다.

[0144] **로즈마리 및 헤스페리딘의 혼합물**

[0145] *생육에서의 리스테리아 모노사이토게네스의 성장*

[0146] 6일 및 9일에서의 이러한 시험의 결과는 도 7 및 도 8에 제시되어 있다. 데이터는 2회 내지 6회 반복검증의 평균이다. 데이터는 접종된 대조군(비처리된 육류)과 비교하여 처리된 육류에서의 엘. 모노사이토게네스 성장의 log 차이를 나타낸다. ANOVA를 사용하여 $p<0.05$에서의 유의도에 대해 데이터를 통계적으로 분석한다. 상이한 철자는 $p<0.05$에서의 유의미한 차이를 나타낸다.

[0147] 로즈마리 추출물 및/또는 헤스페리딘을 사용한 6일에서의 이러한 시험의 결과는 하기 표 1에 기재되어 있다.

표 1

[0148]

로즈마리 추출물(%)	헤스페리딘(%)	예상된 효과	측정된 효과
R	0		-0.08
0	H		-0.09
R	H	-0.08 내지 -0.17	0.07*

*예상하지 못한 효과

[0149] 로즈마리 추출물 및/또는 헤스페리딘: 육류에서의 성장 6일 후 리스테리아 모노사이토게네스 성장에 대한 완전 농도 효과: [(식물 추출물에 의해 처리된 육류에서의 log(CFU/㎖)) - (log(CFU/㎖) 대조군 육류(처리 무))]

[0150] 이러한 짧은 기간(차가운 조건에서의 성장 6일)에, log로 표시된, 비처리 육류와 비교하여, 식물 추출물에 의해 처리된 육류에서의 리스테리아 성장의 차이는 -0.5 log를 획득하지 못하고, 이것은 성장의 이러한 짧은 시간에, 항리스테리아 효과가 상당하지 않을 수 있다는 것을 의미한다는 것에 주목한다. 이러한 짧은 기간(차가운 조건에서의 성장 6일)에, 리스테리아 모노사이토게네스는 불과 0.29 log CFU/㎖로 대조군 육류에서 성장했다는 것에 주목한다(도 2).

[0151] 조합될 때, 조합 효과가 예상치 못하게 길항성이므로, 로즈마리 추출물 및 헤스페리딘의 조합의 측정된 효과가 성장 6일 후 상기 농도에서 상승작용 효과에 상응하지 않는다는 것에 주목한다.

[0152] 농도가 절반일 때, 상기 표로부터 계산된 하기 예상된 효과 및 측정된 효과가 얻어지고, 표 2에 기재되어 있다.

표 2

로즈마리 추출물(%)	헤스페리딘(%)	예상된 효과	측정된 효과
0.5R	0	-0.04	0.04*
0	0.5H	-0.045	-0.37*
0.5R	0.5H	-0.045 to -0.085	0.11*
R	0.5H	-0.045 to -0.125	-0.07
0.5R	H	-0.04 to -0.13	0*

*예상하지 못한 효과

[0153]

[0154] 로즈마리 추출물 및 헤스페리딘: 육류에서의 성장 6일 후 리스테리아 모노사이토게네스 성장에 대한 절반 농도 및 절반 및 완전 농도의 조합 효과: [(식물 추출물에 의해 처리된 육류에서의 log(CFU/㎖)) - (log(CFU/㎖) 대조군 육류(처리 무))]

[0155] 이러한 짧은 기간(차가운 조건에서의 성장 6일)에, log로 표시된, 비처리 육류와 비교하여, 식물 추출물에 의해 처리된 육류에서의 리스테리아 성장의 차이는 -0.5 log를 획득하지 못하고, 이것은 성장의 이러한 짧은 시간에, 항리스테리아 효과가 상당하지 않을 수 있다는 것을 의미한다는 것에 주목한다. 이러한 짧은 기간(차가운 조건에서의 성장 6일)에, 리스테리아 모노사이토게네스는 불과 0.29 log CFU/㎖로 대조군 육류에서 성장했다는 것에 주목한다(도 2).

[0156] 그래도, 상기 표 2에서, 절반 용량에서 적용된 헤스페리딘 단독은 놀랍게도 완전 용량에서보다 더 큰 항리스테리아 효과를 가진다는 것에 주목한다. 예상하지 못한 효과는 별로 표시된다. 다른 한편, 로즈마리의 절반 용량 및 절반 용량 로즈마리 및 완전 용량 헤스페리딘의 조합의 효과는 예상된 것으로부터 길항작용이다. 마지막으로, 절반 용량 로즈마리 및 절반 용량 헤스페리딘의 조합 및 완전 용량 로즈마리 및 절반 용량 헤스페리딘의 조합의 효과는, 예상된 바대로, 추가적인 범위 내에 있다.

[0157] 로즈마리 추출물 및/또는 헤스페리딘을 사용한 9일에서의 이러한 시험의 결과는 하기 표 3에 기재되어 있다.

표 3

로즈마리 추출물(%)	헤스페리딘(%)	예상된 효과	측정된 효과
R	0		-1.12
0	H		-0.64
R	H	-1.76	-0.85

*예상하지 못한 효과

[0158]

[0159] 로즈마리 추출물 및 헤스페리딘: 육류에서의 성장 9일 후 리스테리아 모노사이토게네스에 대한 완전 농도 효과: [(식물 추출물에 의해 처리된 육류에서의 log(CFU/㎖)) - (log(CFU/㎖) 대조군 육류(처리 무))]

[0160] 차가운 조건에서 성장의 구(9)일 후, log CFU/㎖로 표시된 리스테리아 성장의 차이는 -0.5 log CFU/㎖를 초과하고, 이것은 상기 표에 제시된 모든 추출물 및 이들의 농도 및 조합의 항리스테리아 효과가 상업적으로 바람직한 기간 내에 상당할 수 있다는 것을 의미한다는 것에 주목한다.

표 4

로즈마리 추출물(%)	헤스페리딘(%)	예상된 효과	측정된 효과
0.5R	0	-0.56	-1.61*
0	0.5H	-0.32	-0.71*
0.5R	0.5H	-0.88	-1.64*
R	0.5H	-1.83	-1.68
0.5R	H	-2.28	-0.82

*예상하지 못한 효과

[0161]

[0162] 로즈마리 추출물 및 헤스페리딘: 육류에서의 성장 9일 후 리스테리아 모노사이토게네스 성장에 대한 절반 농도 및 절반 및 완전 농도의 조합 효과: [(식물 추출물에 의해 처리된 육류에서의 log(CFU/㎖)) - (log(CFU/㎖) 대조군 육류(처리 무))]

[0163] 육류에서의 성장의 구(9)일 후, 모든 시험된 농도에서의 추출물 단독 또는 이들의 조합은 0.5 log 초과로 리스테리아 모노사이토게네스의 성장을 저해하고, 이것은 이것이 육류에서 항리스테리아 효과를 가진다는 것을 의미한다.

[0164] 예상치 못하게, 선행 기술의 관점에서 그리고 시험관내 데이터의 관점에서, 헤스페리딘은 모든 시험된 농도에서 항리스테리아 효과를 가졌다. 추가로, 예상치 못하게, 로즈마리 추출물 또는 헤스페리딘 단독은 완전 농도와 비교하여 절반 농도로 사용될 때 더 큰 항리스테리아 효과를 가졌다. 훨씬 추가로, 예상치 못하게, 절반 농도의 헤스페리딘과 조합된 로즈마리 추출물은 완전 농도에서의 각각의 추출물 단독보다 더 큰 항리스테리아 효과를 가졌다. 이것은 상승작용이다(도 3).

[0165] 3의 수준에서 설계된 표면 반응 방법론 계승 실험 설계를 이용하여 상이한 농도 및 이의 반응 표면을 분석하였다. 이 결과는 도 4에 도시되어 있다. 이것은 표 5에 제공된 바와 같은 하기한 바대로 결정된 육류에서 항리스테리아 반응을 제공하는 하기 농도 범위를 나타낸다: [(식물 추출물에 의해 처리된 육류에서의 log(CFU/㎖))-(log(CFU/㎖) 대조군 육류(처리 무))]<0.5.

표 5

[0166]

추출물	배합물 중 추출물 비율(%)
헤스페리딘	0.5 - 48.0
로즈마리 추출물	0.2 - 3.0

육류에서 항리스테리아 반응을 제공하는 배합물 중 추출물 비율(%)

[0167] 항리스테리아 효과를 보장하기 위해, 임의의 상기 추출물 농도(표 5)가 육류에 조합으로 또는 단독으로 첨가될 수 있다는 것에 주목한다. 단독으로 또는 조합으로, 육류 첨가된 추출물의 전체 백분율은 1.18%를 초과하지 않았다.

[0168] 리스테리아 성장 동안, 육류의 색상을 모니터링하고, 추출물의 첨가 직후에(0일에) 및 성장 6일에 영상을 취했다.

[0169] 상이한 시간 스케일에서의 "샘플"을 나타내는 각각의 사진을 오픈 소스 이미지 분석 프로그램 ImageJ에서 로딩한다. 소프트웨어를 식품 산업에서 보통 사용하여 상이한 식품 매개변수, 예컨대 색상 또는 밀도를 측정한다(Reineke et al. 2011; Kelkar et al. 2011). RGB 모델의 3개의 색상 단위 적색(R), 녹색(G) 및 청색(B)의 대표적인 값을 얻기 위해, 샘플에 걸쳐 선을 그렸다. 인빌트 RGB 프로필 플롯 플러그인을 이용하여 이 선을 따른 각각의 화소의 상이한 색상 값을 결정한다. 결과는 이 선을 따른 화소 수의 함수로서 상이한 색상 값의 변동으로 제시된다. $p<0.05$로 ANOVA 시험을 이용하여 결과를 유의미한 차이에 대해 통계적으로 분석한다. 샘플마다, 1000 초과의 화소를 분석한다.

[0170] *생육의 붉은 색상*

[0171] 감각 분석의 패널이 육류의 색상을 인지하였다. 이 패널은 밝은 적색, 적색, 갈색 및 녹색 색조 사이의 육류 색상을 구별하였다. 모든 육류 샘플은 실험 0일에 밝은 적색이었다.

[0172] 6일에, 전체 패널 인식은 하기한 바대로 상이한 육류 처리를 겪은 상이한 육류 샘플의 색상을 기재하였다:

	6 일에 육류 색상
대조군	갈색
아세트산나트륨	갈색
락트산나트륨	갈색
0.5R	갈색
R	적색
0.5H	녹색
H	갈색
0.5R + 0.5H	적색
0.5R + H	갈색
R + 0.5H	적색
R + H	갈색

[0173]

[0174] 리스테리아 성장 동안, 식물 추출물에 의해 보충되거나 보충되지 않은 육류의 색상을 모니터링하고, 추출물의 첨가 직후에(0일에) 및 성장 6일에 영상을 취했다.

[0175] 단독 또는 조합의 로즈마리 추출물 및 헤스페리딘을 사용한 6일에서의 이러한 모니터링의 결과는 하기 표 6에 기재되어 있다:

표 6

로즈마리 추출물(%)	헤스페리딘(%)	예상된 효과	측정된 효과
R	0		11.05
0	H		10.69
R	H	21.75	15.39

[0176]

[0177] 육류에서의 성장 6일 후 붉은 육류 색상에 대한 로즈마리 추출물 및 헤스페리딘의 완전 농도 효과. 이 효과는 하기를 이용하여 계산된다: [추출물을 가지는 육류의 붉은 색상] - [(추출물이 없는) 대조군 육류의 붉은 색상]

[0178] 선행 기술로부터의 보고서와 반대로, 예상치 못하게, 로즈마리 추출물은 대조군과 비교하여 육류의 붉은 색상을 더 우수하게 보존하였다. 헤스페리딘은 약간 더 낮지만 유사한 효과를 가졌다.

[0179] 조합 효과는 추가적인 범위 내에 있고, 따라서 이 농도에서 상승적인 것으로 발견되지 않았다.

[0180] 대조군과 비교하여 추출물의 조합은 각각의 추출물 단독보다 붉은 색상의 보존을 유의미하게 개선한다.

표 7

로즈마리 추출물(%)	헤스페리딘(%)	예상된 효과	측정된 효과
0.5R	0	5.53	14.143*
0	0.5H	5.35	-1.63*
0.5R	0.5H	12.51	17.16*
R	0.5H	9.42	15.03*
0.5R	H	16.22	13.33

*예상하지 못한 효과

[0181]

[0182] 육류에서의 성장 6일 후 붉은 육류 색상에 대한 완전 및 절반 농도의 로즈마리 추출물 및 헤스페리딘 및 절반 및 완전 농도의 조합 효과. 각각의 효과는 하기를 이용하여 계산된다: [추출물을 가지는 육류의 붉은 색상] - [(추출물이 없는) 대조군 육류의 붉은 색상]

[0183] 도 5는, 육류에 첨가된 헤스페리딘의 농도가 절반일 때, 이것이 대조군과 비교하여 육류의 붉은 색상의 보존을 유의미하게 감소시킨다는 것을 보여준다.

[0184] 로즈마리의 첨가는 비처리된 대조군 육류와 비교하여 육류 색상의 보존을 유의미하게 개선하였다. 예상치 못하게, 절반의 로즈마리 농도는 완전 로즈마리 농도보다 육류의 붉은 색상 보존에서 더 큰 효과를 유발하였다. 또한, 예상치 못하게, 절반의 헤스페리딘 농도는 예상된 것처럼 붉은 색상의 보존 효과를 발생시키지 않았지만, 이 농도에서, 헤스페리딘은 대조군과 비교하여 붉은 색상의 보존을 저하시켰다. 추가로, 예상치 못하게, 완전 농도의 로즈마리 및 절반 농도의 헤스페리딘의 조합의 육류의 붉은 색상의 보존에 대한 효과는 단독의 완전 농도의 로즈마리 또는 절반 농도의 헤스페리딘의 예상된 추가적인 효과를 초과하였다. 이것은 상승작용이다.

[0185] 더욱 추가로, 예상치 못하게, 절반 농도의 로즈마리 및 절반 농도의 헤스페리딘의 조합의 육류의 붉은 색상의 보존에 대한 효과는 단독의 절반 농도의 로즈마리 또는 절반 농도의 헤스페리딘의 예상된 추가적인 효과를 초과하였다. 이것은 상승작용이다.

[0186] 절반 농도의 로즈마리 추출물 및 완전 농도의 헤스페리딘에 관해서, 이의 조합 효과는 추가적인 범위 내에 있고, 따라서 상승적인 것으로 발견되지 않았다.

[0187] 도 5는 임의의 여기에 제시된 농도에서의 로즈마리 및 헤스페리딘 사이의 모든 조합이 대조군과 비교하여 그리고 통상적인 항리스테리아 화합물, 예컨대 아세트산나트륨 및 락트산나트륨과 비교하여 육류의 붉은 색상의 보존을 유의미하게 개선했다는 것을 보여준다.

[0188] 로즈마리 및 푸니카의 혼합물

[0189] *생육에서의 리스테리아 모노사이토게네스의 성장*

[0190] 6일 및 9일에서의 이러한 시험의 결과는 도 9 및 도 10에 제시되어 있다. 데이터는 2회 내지 6회 반복검증의 평균이다. 데이터는 접종된 대조군(비처리된 육류)과 비교하여 처리된 육류에서의 엘. 모노사이토게네스 성장의 log 차이를 나타낸다. ANOVA를 사용하여 $p<0.05$에서의 유의도에 대해 데이터를 통계적으로 분석한다. 상이한 철자는 $p<0.05$에서의 유의미한 차이를 나타낸다.

표 8

[0191]

로즈마리 추출물(%)	푸니카 추출물(%)	예상된 효과	측정된 효과
R	0		0.26
0	P		0.05
R	P	0.31	0.12

*예상하지 못한 효과

[0192] 로즈마리 추출물 및/또는 푸니카 추출물: 육류에서의 성장 6일 후 리스테리아 모노사이토게네스 성장에 대한 완전 농도 효과: [(식물 추출물에 의해 처리된 육류에서의 log(CFU/㎖)) - (log(CFU/㎖) 대조군 육류(처리 무))]

[0193] 이러한 짧은 기간(차가운 조건에서의 성장 6일)에, log로 표시된, 비처리 육류와 비교하여, 식물 추출물에 의해 처리된 육류에서의 리스테리아 성장의 차이는 -0.5 log를 획득하지 못하고, 이것은 성장의 이러한 짧은 시간에, 항리스테리아 효과가 상당하지 않을 수 있다는 것을 의미한다는 것에 주목한다.

[0194] 조합될 때, 로즈마리 추출물 및 푸니카 추출물의 조합의 측정된 효과가 상승작용 효과에 상응하지 않는다는 것에 주목한다.

[0195] 농도가 절반일 때, 상기 표로부터 계산된 하기 예상된 효과 및 측정된 효과가 얻어졌다:

표 9

[0196]

로즈마리 추출물(%)	푸니카 추출물(%)	예상된 효과	측정된 효과
0.5R	0	0.13	0.28
0	0.5P	0.025	0.27
0.5R	0.5P	0.55	0.11*
R	0.5P	0.53	-0.03*
0.5R	P	0.33	0.26*

*예상하지 못한 효과

[0197] 로즈마리 추출물 및/또는 푸니카 추출물: 육류에서의 성장 6일 후 리스테리아 모노사이토게네스 성장에 대한 절반 농도 및 절반 및 완전 농도의 조합 효과: [(식물 추출물에 의해 처리된 육류에서의 log(CFU/㎖)) - (log(CFU/㎖) 대조군 육류(처리 무))]

[0198] 이러한 짧은 기간(차가운 조건에서의 성장 6일)에, log로 표시된, 리스테리아 성장의 차이는 -0.5 log를 획득하지 못하고, 이것은 성장의 이러한 짧은 시간에, 항리스테리아 효과가 상당하지 않을 수 있다는 것을 의미한다는 것에 주목한다.

[0199] *예상치 못한 효과는 별로 표시된다*

[0200] 예상치 못하게, 절반 농도의 로즈마리 및 절반 농도의 푸니카의 조합의 항리스테리아 효과는 단독의 절반 농도의 로즈마리 또는 절반 농도의 푸니카의 예상된 추가적인 효과를 초과하였다. 이것은 상승작용이다.

[0201] 추가로, 예상치 못하게, 완전 농도의 로즈마리 및 절반 농도의 푸니카의 조합의 항리스테리아 효과는 단독의 완전 농도의 로즈마리 또는 절반 농도의 푸니카의 예상된 추가적인 효과를 초과하였다. 이것은 상승작용이다.

[0202] 더욱 추가로, 예상치 못하게, 절반 농도의 로즈마리 및 완전 농도의 푸니카의 조합의 항리스테리아 효과는 단독의 절반 농도의 로즈마리 또는 완전 농도의 푸니카의 예상된 추가적인 효과를 초과하였다. 이것은 상승작용이다.

[0203] 로즈마리 추출물 및/또는 푸니카 추출물을 사용한 9일째의 이러한 시험의 결과는 표 10에 기재되어 있다.

표 10

로즈마리 추출물(%)	푸니카 추출물(%)	예상된 효과	측정된 효과
R	0		-0.39
0	P		-0.53
R	P	-0.92	-0.63

*예상하지 못한 효과

[0204]

[0205] 로즈마리 추출물 및 푸니카 추출물: 육류에서의 성장 9일 후 리스테리아 모노사이토게네스 성장에 대한 완전 농도 효과: [(식물 추출물에 의해 처리된 육류에서의 log(CFU/㎖)) - (log(CFU/㎖) 대조군 육류(처리 무))]

[0206] 상기 언급된 바대로, 미생물학에서, 이의 효과가 비처리 대조군과 비교하여 -0.5 log CFU/㎖를 초과하는 경우 처리가 항박테리아 효과를 가진다는 것에 주목한다. 육류가 완전 농도의 푸니카 또는 완전 농도의 로즈마리 및 완전 농도의 푸니카의 조합에 의해 처리될 때, 대조군과 비교하여, 차가운 조건에서 성장의 구(9)일 후, log CFU/㎖로 표시된 리스테리아 성장의 차이는 -0.5 log CFU/㎖를 초과하였다는 것에 주목한다. 단독의 절반 농도의 로즈마리는 비처리된 대조군 육류와 비교하여 리스테리아 성장을 유의미하게 저해하지 않았다. 그러나, 완전 농도의 로즈마리를 완전 농도의 푸니카와 조합하는 것은 추출물을 단독으로 사용할 때보다 더 큰 항리스테리아 효과를 가졌고, 항리스테리아 성장에서 유의미한 효과를 위해 필요한 -0.5 log CFU/㎖의 한계치를 초과하게 하였다.

표 11

로즈마리 추출물(%)	푸니카 추출물(%)	예상된 효과	측정된 효과
0.5R	0	-0.195	-0.35*
0	0.5P	-0.265	-0.84*
0.5R	0.5P	-1.19	-1.47*
R	0.5P	-1.23	-1.45*
0.5R	P	-0.88	-0.69

*예상하지 못한 효과

[0207]

[0208] 로즈마리 추출물 및 푸니카 추출물: 육류에서의 성장 6일 후 리스테리아 모노사이토게네스 성장에 대한 절반 농

도 및 절반 및 완전 농도의 조합 효과: [(식물 추출물에 의해 처리된 육류에서의 log(CFU/㎖)) - (log(CFU/㎖) 대조군 육류(처리 무))]

[0209] 육류에서의 성장의 9일 후, 거의 모든 시험된 농도에서의 하나가 아닌 모든 추출물 단독 또는 이들의 조합은 대조군과 비교하여 0.5 log CFU/㎖ 초과로 리스테리아 모노사이토게네스의 성장을 저해하고, 이것은 이것이 육류에서 항리스테리아 효과를 가진다는 것을 의미한다. 절반 농도에서 시험될 때 오직 로즈마리 추출물 단독은 대조군과 비교하여 -0.5 log CFU/㎖의 차이를 획득하지 못했다.

[0210] 예상치 못하게, 푸니카 추출물 단독은 완전 농도와 비교하여 절반 농도로 사용될 때 더 큰 항리스테리아 효과를 가졌다. 추가로, 예상치 못하게, 절반 농도로 사용될 때, 로즈마리 추출물은 예상된 것보다 더 큰 항리스테리아 효과를 가졌다. 훨씬 추가로, 예상치 못하게, 절반 농도의 로즈마리 및 절반 농도의 푸니카 추출물의 조합의 항리스테리아 효과는 단독의 절반 농도의 로즈마리 또는 절반 농도의 푸니카 추출물의 이의 예상된 추가적인 효과를 초과하였다. 이것은 상승작용이다.

[0211] 또한, 예상치 못하게, 완전 농도의 로즈마리 및 절반 농도의 푸니카 추출물의 조합의 항리스테리아 효과는 단독의 완전 농도의 로즈마리 또는 절반 농도의 헤스페리딘의 예상된 추가적인 효과를 초과하였다. 이것은 상승작용이다.

[0212] 추가로, 예상치 못하게, 절반 농도의 푸니카 추출물과 조합된 로즈마리 추출물은 완전 농도에서의 각각의 추출물 단독보다 더 큰 항리스테리아 효과를 가졌다. 이것은 상승작용이다(예를 들어, 도 1 참조).

[0213] 3의 수준에서 설계된 표면 반응 방법론 계승 실험 설계를 이용하여 상이한 농도 및 이의 반응 표면을 분석하였다. 이 결과는 도 11에 도시되어 있다. 이것은 표 12에 기재된 바와 같은 하기한 바대로 결정된 육류에서 항리스테리아 반응을 제공하는 하기 농도 범위를 나타낸다: [식물 추출물에 의해 처리된 육류에서의 log(CFU/㎖)] - [log(CFU/㎖) 대조군 육류(식물 추출물 무)]<-1.

표 12

[0214]

추출물	추출물(%)
푸니카 추출물	5.0 내지 24.0
로즈마리 추출물	0.5 내지 8.0

* 추출물 %

[0215] 항리스테리아 효과를 보장하기 위해, 임의의 상기 추출물 농도(표 12)가 육류에 조합으로 또는 단독으로 첨가될 수 있다는 것에 주목한다. 단독으로 또는 조합으로, 육류 첨가된 추출물의 전체 백분율은 0.18%를 초과하지 않았다.

[0216] *생육의 붉은 색상*

[0217] 감각 분석의 패널이 육류의 색상을 인지하였다. 이 패널은 밝은 적색, 적색, 갈색 및 녹색 색조 사이의 육류 색상을 구별하였다. 모든 육류 샘플은 실험 0일에 밝은 적색이었다.

[0218] 6일에, 전체 패널 인식은 하기한 바대로 상이한 육류 처리를 겪은 상이한 육류 샘플의 색상을 기재하였다:

	6일에 육류 색상
대조군	갈색
아세트산나트륨	갈색
락트산나트륨	갈색
0.5R	갈색
R	갈색
0.5P	적색
P	적색
0.5R + 0.5P	적색
0.5R + P	갈색
R + 0.5P	적색
R + P	갈색

[0219]

[0220] 리스테리아 성장 동안, 식물 추출물에 의해 보충되거나 보충되지 않은 육류의 색상을 모니터링하고, 추출물의 첨가 직후에(0일에) 및 성장 6일에 영상을 취했다. 방법 부문에서 상기 설명된 바대로 적색 화소를 정량화하였다.

[0221] 단독 또는 조합의 로즈마리 추출물 및 푸니카 추출물을 사용한 6일에서의 이러한 모니터링의 결과는 하기에 기재되어 있다:

표 13

로즈마리 추출물(%)	푸니카 추출물(%)	예상된 효과	측정된 효과
R	0		-3.72
0	P		-5.60
R	P	-9.32	1.27*

*예상하지 못한 효과

[0222]

[0223] 로즈마리 추출물 및 푸니카 추출물: 육류에서의 성장 6일 후 육류의 붉은 색상의 보존에 대한 완전 농도 효과. 이 효과는 하기에 의해 계산된다: [추출물을 가지는 육류의 붉은 색상] - [(추출물이 없는) 대조군 육류의 붉은 색상]

[0224] 상기 농도(표 13)에서, 단독으로 첨가될 때, 로즈마리 또는 푸니카 추출물은 대조군과 비교하여 육류의 붉은 색상의 보존을 저하시켰다. 따라서, 조합될 때, 이 추출물은 육류의 붉은 색상의 보존을 심지어 추가로 저하시킨다는 것이 예상되었다. 예상치 못하게, 조합될 때, 로즈마리 및 푸니카 추출물은 대조군과 비교하여 육류의 붉은 색상의 보존을 개선하였다.

[0225] 예상치 못하게, 완전 농도의 로즈마리 및 완전 농도의 푸니카의 조합의 육류의 붉은 색상의 보존에 대한 효과는 단독의 완전 농도의 로즈마리 또는 완전 농도의 푸니카의 예상된 추가적인 효과를 초과하였다. 이것은 상승작용이다.

표 14

로즈마리 추출물(%)	푸니카 추출물(%)	예상된 효과	측정된 효과
0.5R	0	-1.86	1.07*
0	0.5P	-2.80	-0.34*
0.5R	0.5P	0.73	4.45*
R	0.5P	-4.04	-2.71*
0.5R	P	-4.53	6.37*

*예상하지 못한 효과

[0226]

[0227] 로즈마리 추출물 및 푸니카 추출물: 육류에서의 리스테리아 성장의 6일 후 육류의 붉은 색상의 보존에 대한 완

전 및 절반 농도 및 절반 및 완전 농도의 조합 효과. 각각의 효과는 하기에 의해 계산된다: [추출물을 가지는 육류의 붉은 색상] - [(추출물이 없는) 대조군 육류의 붉은 색상]

[0228] 완전 농도의 로즈마리 및 푸니카 추출물이 육류의 붉은 색상의 보존을 저하시키므로, 절반 농도가 육류의 붉은 색상의 보존을 또한 저하시킨다는 것이 예상되었다. 예상치 못하게, 첨가된 로즈마리 농도의 절반은 비처리된 대조군과 비교하여 육류의 붉은 색상의 보존을 유의미하게 개선하였다.

[0229] 로즈마리의 첨가는 비처리된 대조군 육류와 비교하여 육류 색상의 보존을 유의미하게 개선하였다. 예상치 못하게, 첨가된 푸니카 추출물의 절반 농도는 육류의 붉은 색상의 보존을 예상된 것만큼 많이 저하시키지 않았다.

[0230] 추가로, 예상치 못하게, 절반 농도의 로즈마리 및 절반 농도의 푸니카 추출물의 조합의 붉은 색상의 보존의 개선은 단독의 절반 농도의 로즈마리 또는 절반 농도의 푸니카 추출물의 이의 예상된 추가적인 효과를 초과하였다. 이것은 상승작용이다.

[0231] 또한, 예상치 못하게, 완전 농도의 로즈마리 및 절반 농도의 푸니카 추출물의 조합의 붉은 색상의 보존의 개선은 단독의 완전 농도의 로즈마리 또는 절반 농도의 헤스페리딘의 예상된 추가적인 효과를 초과하였다. 이것은 상승작용이다.

[0232] 훨씬 추가로, 예상치 못하게, 완전 농도의 푸니카 추출물 및 절반 농도의 로즈마리 추출물의 조합의 붉은 색상의 보존의 개선은 단독의 완전 농도의 푸니카 추출물 또는 절반 농도의 로즈마리 추출물의 예상된 추가적인 효과를 초과하였다. 이것은 상승작용이다.

[0233] 예상치 못하게, 완전 농도의 푸니카 추출물 및 절반 농도의 로즈마리 추출물의 조합은 육류의 색상의 보존을 개선하지만, 색상의 보존은 이러한 조합의 적용 시 저하되는 것으로 예상되었다.

[0234] 도 6은 임의의 여기에 제시된 농도에서의 로즈마리 및 푸니카 추출물 사이의 모든 조합이 대조군과 비교하여 그리고 전통적인 항리스테리아 물질, 예컨대 아세트산나트륨 및 락트산나트륨과 비교하여 육류의 붉은 색상의 보존을 유의미하게 개선했다는 것을 보여준다.

[0235] 당해 분야의 당업자는, 현재 개시된 대상의 교시내용으로부터 벗어나지 않으면서, 추가적인 실시형태가 또한 가능하다는 것을 인식할 것이다. 이 상세한 설명, 및 특히 본 명세서에 개시된 예시적인 실시형태의 구체적인 상세내용은 주로 이해의 명확성을 위해 제공되고, 필요한 제한이 이로부터 이해되고, 변형을 위해 본 개시내용을 읽을 때 당해 분야의 당업자에게 명확해질 것이고, 현재 개시된 대상의 정신 및 범위로부터 벗어나지 않으면서 이루어질 수 있다.

[0236] 당해 분야의 당업자는, 현재 개시된 대상의 교시내용으로부터 벗어나지 않으면서, 추가적인 실시형태가 또한 가능하다는 것을 인식할 것이다. 이 상세한 설명, 및 특히 본 명세서에 개시된 예시적인 실시형태의 구체적인 상세내용은 주로 이해의 명확성을 위해 제공되고, 필요한 제한이 이로부터 이해되고, 변형을 위해 본 개시내용을 읽을 때 당해 분야의 당업자에게 명확해질 것이고, 현재 개시된 대상의 정신 및 범위로부터 벗어나지 않으면서 이루어질 수 있다.

[0237] 시험관내 실험:

[0238] 단독의 로즈마리, 푸니카 및 헤스페리딘 추출물 및 조합된 로즈마리, 헤스페리딘, 푸니카의 식물 추출물 및 이들의 조합 로즈마리/헤스페리딘, 로즈마리/푸니카의 항균 활성을 하기 프로토콜(여기서 추출물의 조합을 준비하고, 말토덱스트린에 의해 100%까지 완료하고, 하기 비율에 따라 시험 용액에 첨가함)에 따라 $DMSO_{50\%\ 최종}$에서 10%로 준비하고, 시험 전에 한다.

표 15

		R/H
추출물의 조성(%)	**로즈마리 추출물**	**3.05**
	카르노스산	1.34
	카르노스산 + 카르노솔	1.48
	헤스페리딘 추출물	**56.7**
	헤스페리딘	53.87

R: 로즈마리 추출물; H: 헤스페리딘 추출물

[0239]

표 16

		R	P	R/P
추출물의 조성(%)	로즈마리 추출물	5.33	0	5.33
	카르노스산	2.35	0	2.35
	카르노스산 + 카르노솔	2.58	0	2.58
	석류 추출물	0	21.60	21.60
	엘라그산	0	0.43	0.43
	푸니칼라진	0	1.94	1.94

R: 로즈마리 추출물; P: 푸니카 추출물

[0240]

[0241] *작업/시험 용액의 제조*

[0242] 200mg의 추출물(조합)을 1mℓ 100% DMSO와 혼합하고, 와류시키고, 전력 100%, 45kHz, 일반 방식에서 10분 동안 음파 처리하고, 잘 와류시키고, 다시 음파 처리하고, 100mg/mℓ($DMSO_{50\%\ 최종}$)의 최종 농도로 무균수에서 1:2 희석시켰다.

[0243] 100mg/mℓ에서의 이 제제를 무균 5mℓ 에펜도르프(Eppendorf) 관에서 준비하였다. 최소 살균 농도(Minimum Bactericidal Concentration; MBC) 플레이트를 제조하기 전에 샘플을 취했다. MBC, 최소 살진균 농도(Minimal Fungicidal Concentration; MFC) 및 최소 저해 농도(Minimal Inhibitory Concentration; MIC).

[0244] *원칙*

[0245] 최소 살균 농도(MBC)는 접종원의 적어도 99.99%를 사멸시키는 데 필요한 최소 샘플 농도(-4 log10)이다. 최소 살균 농도(MBC)는 특정한 박테리아를 사멸하는 데 필요한 항박테리아제의 최소 농도이다. 이것은 시험 물질을 함유하지 않는 한천 플레이트로 서브클로닝함으로써 브로쓰 희석 최소 저해 농도(MIC) 시험으로부터 결정될 수 있다. MBC는 99.9% 이상으로 초기 박테리아 접종원의 가변성을 감소시키는 항박테리아제의 최소 농도를 결정함으로써 확인된다. MBC는 MIC에 보충적이지만; MIC 시험은 성장을 저해하는 항균제의 최소 수준을 나타내고, MBC는 미생물을 사멸시키는 항균제의 최소 수준을 나타낸다. 이것은 특정한 MIC가 저해를 나타내더라고, 항균제가 사멸을 야기하지 않으므로, 한천으로의 박테리아의 플레이팅이 유기체 증식을 여전히 발생시킨다는 것을 의미한다. MBC가 MIC의 4배 이하인 경우, 항박테리아제는 살균성으로 보통 생각된다. 이 시험은 가시적으로 성장을 약간 나타내거나 나타내지 않거나 웰에서의 미생물의 계수에 기초하고, 이후 플레이팅하였다. 10% $DMSO_{50\%\ 최종}$에서 준비된 샘플을 1당량의 DMSO 대조군(각각 12.5, 2.5 및 0.5%)에 대해 2.5, 0.5 및 0.1%의 농도에서 시험하였다.

[0246] 효모의 경우에, 살진균제 최소 농도(fungicide minimum concentration; CMF)를 WCD로서 수행하였다. 균류인 균주 에이. 브라실리엔시스의 경우에, 단지 성장의 존재는 살진균 활성의 부재로 해석된다. 최소 저해 농도(MIC)는 항온처리의 순응된 기간 후 미생물의 가시적인 성장을 저해하는 항균제의 최소 농도이다. 최소 저해 농도는 새로운 항균제, 예컨대 식물 추출물 또는 이들의 조합의 효력을 결정하기 위해 통상적으로 사용된다. 최소 저해 농도 또는 MIC는 여기서 시험된 추출물에 의해 미생물 성장을 저해하기에 충분한 최소 농도이다. 이 시험은 시험된 추출물에 의해 또는 이것 없이(대조군) 연구된 미생물 균주를 함유하는 웰의 가시적인 관찰에 기초한다. 미생물 성장의 시간 길이 및 조건을 당해 분야의 당업자에 의해 널리 공지된 전통적인 방법에 따라 수행하였다.

[0247] 하기 박테리아 균주 이. 콜라이, 슈도모나스 아에루기노사, 살모넬라 엔테리카 세르 티피무륨, 스타필로코커스 아우레우스, 바실러스 세레우스, 리스테리아 모노사이토게네스, 스트렙토코커스 뮤탄스, 클로스트리듐 퍼프린겐스, 엔테로코커스 히라에, 엔테로박터 클로아카에, 모락셀라 보비스 및 2개의 효모 사카로마이세스 세레비시아에 및 칸디다 알비칸스 및 곰팡이 아스퍼질러스 브라실리엔시스에서 시험을 수행하였다. 박테리아 및 효모에 대해 10^5-10^6CFU/mℓ의 보정된 접종원 및 에이. 브라실리엔시스에 대해 10^5개의 포자/mℓ에 의해, 풍부한 영양소 배지에서 내부 절차에 따라 살균 및 살진균 활성의 평가를 수행하였다.

[0248] 추출물의 항균 평가 전에, 플레이팅에 의해 추출물의 무균성을 검증하였다. 임의의 미생물 성장의 부재는 의무

적이다. 미생물 배양을 표 17에 요약된 바대로 전통적으로 수행하였다.

표 17

미생물의 성장 조건 및 수집

유기체	수집	배양 조건
바실러스 세레우스	ATCC 11.778	TS-30℃-24h
스타필로코커스 아우레우스	CIP 4.83	TS-37℃-18h
리스테리아 모노사이토게네스	ATCC 19.115	TS-37℃-24h
살모넬라 티피무륨	CIP 103.799	TS-37℃-18h
에스체리치아 콜라이	CIP 53.126	TS-37℃-18h
슈도모나스 아에루기노사	CIP 82.118	TS-37℃-18h
스트렙토코커스 뮤탄스	ATCC 35.668	COS 5% sang/브로쓰 Streptos-37℃-24h
엔테로코커스 히라에	ATCC 8043	브로쓰 TS-37℃-24h
엔테로박터 클로아카에	CIP 103.475	브로쓰 TS-30℃-24h
모락셀라 보비스	CIP 70.40 T	TS/브로쓰 Col 10% 말 혈청-30℃-24h
클로스트리듐 퍼프린겐스	ATCC 13.124	RCM/37℃/혐기성생활/48h
칸디다 알비칸스	UMIP 48.72	Sabouraud/30℃/48h
사카로마이세스 세레비시아에	UMIP 1181.79	Sabouraud/30℃/48h
아스페르길루스 니게르	IP 1431.83	Sabouraud/30℃/48h

[0249]

[0250] **결과**

표 18

여기에 제시된 미생물에 대해 효과적인 로즈마리(R), 푸니카(P), 로즈마리/푸니카(R/P) 및 로즈마리/헤스페리딘(R/H)의 MBC 및 MFC 농도(0.1; 0.5 또는 2.5%)

	R/H	R/P
에스. 아우레우스	0.5	0.1
에스. 뮤탄스	2.5	0.5
에스. 티피무륨	2.5	0.1
피. 아에루기노사	2.5	0.1
에이. 콜라이	2.5	0.5
엘. 모노사이토게네스		0.5
비. 세레우스	2.5	0.1
씨. 퍼프린겐스	0.5	0.1
에이. 히라에		2.5
에이. 클로아카에		0.5
엠. 보비스	0.1	0.1

표 15에 따른 로즈마리 및 헤스페리딘 추출물의 R/H 조합; R: 로즈마리 추출물, P: 푸니카 추출물, R/P: 표 16에 따른 로즈마리 및 푸니카 추출물의 조합. 빈 셀: 최소 농도(있다면)는 여기서 측정된 최대 농도(2.5%)보다 더 높을 것이다.

[0251]

표 19

R 및 P의 예상치 못한/상승작용 MBC 및 MFC 효과(시험 용액 중의 %)

	R의 MBC/MFC (%)	P의 MBC/MFC (%)	R/P의 예상된 MBC/MFC(%)	R/P의 측정된 MBC/MFC(%)
에스. 티피무륨	0.5	0.5	0.25-0.5	0.1*
피. 아에루기노사	0.5	0.5	0.25-0.5	0.1*
씨. 퍼프린겐스	0.03	>0.016	>0.016	0.0078*

*: 예상하지 못한 결과

예상치 못하게, 조합으로 적용될 때, 에스. 티피미륨 및 피. 아에루기노사인 미생물 성장을 4 log만큼 감소시키는 조합 R/P의 최소 농도는 놀랍게도 낮고; 이것은 예상된 것보다 2.5-5배 낮다. 놀랍게도, 2종의 추출물이 조합될 때, 이의 활성은 2.5-5배로 상승적으로 증가한다.

[0252]

[0253] 예상치 못하게, 로즈마리 및 푸니카 추출물의 조합의 항살모넬라 효과는, 추출물이 단독으로 적용될 때, 이의 예상된 추가적인 효과를 초과하였다. 실제로, 동일한 항살모넬라 효과를 달성하고 미생물 성장을 4 log만큼 감소시키기 위해, 추출물이 단독으로 적용될 때와 비교하여 추출물이 조합될 때 MBC는 기껏해야 절반이라는 것이 예상될 것이다. 놀랍게도, 여기서, MBC는 2.5-5배로 감소하였다. 이것은 상승작용이다.

[0254] 추가로 예상치 못하게, 로즈마리 및 푸니카 추출물의 조합의 항슈도모나스 효과는, 추출물이 단독으로 적용될 때, 이의 예상된 추가적인 효과를 초과하였다. 실제로, 동일한 항슈도모나스 효과를 달성하고 미생물 성장을 4 log만큼 감소시키기 위해, 추출물이 단독으로 적용될 때의 MBC와 비교하여 추출물이 조합될 때의 MBC는 기껏해야 절반이라는 것이 예상될 것이다. 놀랍게도, 여기서, MBC는 2.5-5배로 감소하였다. 이것은 상승작용이다.

[0255] 훨씬 추가로 예상치 못하게, 로즈마리 및 푸니카 추출물의 조합의 항클로스트리듐 효과는, 추출물이 단독으로 적용될 때, 이의 예상된 추가적인 효과를 초과하였다. 실제로, 동일한 항클로스트리듐 효과를 달성하고 미생물 성장을 4 log만큼 감소시키기 위해, 추출물이 단독으로 적용될 때의 MIB와 비교하여 추출물이 조합될 때의 MIB는 기껏해야 절반이라는 것이 예상될 것이다. 이것은 상승작용이다. 푸니카 추출물이 0.016%의 MIC 효과를 가진다는 것에 주목한다. 이것은 이의 MBC가 MIC보다 높아야 한다는 것을 시사하고, 이것은 0.016%보다 높다는 것을 의미한다. 어느 쪽이든, 로즈마리 및 푸니카 추출물의 조합의 MBC가 추출물 단독의 MIC보다 2배 초과로 낮다는 것이 추가로 예상되지 못했다.

표 20

R 및 P의 예상치 못한/상승작용 MIC 효과(시험 용액 중의 %)

	R의 MIC(%)	P의 MIC(%)	R/P의 예상된 MIC(%)	R/P의 측정된 MIC(%)
에스. 뮤탄스	0.25	>1	0.25	0.0625*
에스. 아우레우스	0.125	0.5	0.125-0.325	0.0625*
씨. 알비칸스	1	>1	1	0.25*
에스. 세레비시아에	0.25	>1	0.25	0.0625*

[0256]

[0257] 예상치 못하게, 조합으로 적용될 때, 박테리아 또는 효모, 에스. 뮤탄스, 에스. 아우레우스, 씨. 알비칸스 및 에스. 세레비시아에의 미생물 성장을 저해하는 조합 R/P의 최소 농도는 놀랍게도 낮고; 이것은 예상된 것보다 2-4배 낮다. 놀랍게도, 2종의 추출물이 조합될 때, 이의 활성은 예상된 것보다 2.5-5배로 상승적으로 증가한다.

[0258] 추가로 예상치 못하게, 로즈마리 및 푸니카 추출물의 조합의 항스트렙토코커스 효과는, 추출물이 단독으로 적용될 때, 이의 예상된 추가적인 효과를 초과하였다. 실제로, 동일한 항스트렙토코커스 효과를 달성하고 미생물 성장을 저해하기 위해, 추출물이 단독으로 적용될 때의 MIC와 비교하여 MIC는 기껏해야 최소 MIC라는 것이 예상될 것이다. 놀랍게도, 여기서, MIC는 예상된 것보다 4배 감소하였다. 이것은 상승작용이다.

[0259] 훨씬 추가로 예상치 못하게, 로즈마리 및 푸니카 추출물의 조합의 항스타필로코커스 효과는, 추출물이 단독으로 적용될 때, 이의 예상된 추가적인 효과를 초과하였다. 실제로, 동일한 항스타필로코커스 효과를 달성하고 미생

물 성장을 저해하기 위해, 추출물이 단독으로 적용될 때의 MIC와 비교하여 추출물이 조합될 때의 MIC는 기껏해야 절반이라는 것이 예상될 것이다. 놀랍게도, 놀랍게도, 여기서, MIC는 예상된 것보다 2-4.5배 감소하였다. 이것은 상승작용이다.

[0260] 추가로 예상치 못하게, 로즈마리 및 푸니카 추출물의 조합의 항칸디다 효과는, 추출물이 단독으로 적용될 때, 이의 예상된 추가적인 효과를 초과하였다. 실제로, 동일한 항칸디다 효과를 달성하고 미생물 성장을 저해하기 위해, 추출물이 단독으로 적용될 때의 MIC와 비교하여 MIC는 기껏해야 최소 MIC라는 것이 예상될 것이다. 놀랍게도, 여기서, MIC는 예상된 것보다 4배 감소하였다. 이것은 상승작용이다.

[0261] 그리고, 훨씬 추가로 예상치 못하게, 로즈마리 및 푸니카 추출물의 조합의 항사카로마이세스 효과는, 추출물이 단독으로 적용될 때, 이의 예상된 추가적인 효과를 초과하였다. 실제로, 동일한 항사카로마이세스 효과를 달성하고 미생물 성장을 저해하기 위해, 추출물이 단독으로 적용될 때의 MIC와 비교하여 MIC는 기껏해야 최소 MIC라는 것이 예상될 것이다. 놀랍게도, 여기서, MIC는 예상된 것보다 4배 감소하였다. 이것은 상승작용이다.

[0262] 피. 아에루기노사 및 에스. 티피미륨이 그람 음성 박테리아라는 것에 주목한다. 씨. 퍼프린겐스, 에스. 뮤탄스, 에스. 아우레우스 및 엘. 모노사이토게네스는 그람 양성 박테리아이다. 씨. 알비칸스 및 에스. 세레비시아에는 효모이다.

[0263] 푸니카 추출물과 조합된 로즈마리는 그람 양성(엘. 모노사이토게네스(육류에서), 씨. 퍼프린겐스, 에스. 뮤탄스, 에스. 아우레우스 포함), 그람 음성(에스. 티피미륨, 피. 아에루기노사 포함) 박테리아 및 효모(씨. 알비칸스, 사카로마이세스 세레비시아에 포함)의 성장에 대해 상승적 항균 효과를 명확히 나타낸다.

표 21

상이한 미생물에 대한 추출물 R/P의 배합물의 예상치 못한/상승작용 효과가 여기에 요약되어 있다

[0264]

미생물	미생물의 성질	그람(+ 또는 -)	항균 효과
엘. 모노사이토게네스	박테리아	G+	예상하지 못한, 상승작용
에스. 티피무륨	박테리아	G-	예상하지 못한, 상승작용
피. 아에루기노사	박테리아	G-	예상하지 못한, 상승작용
씨. 퍼프린겐스	박테리아	G+	예상하지 못한, 상승작용
에스. 뮤탄스	박테리아	G+	예상하지 못한, 상승작용
에스. 아우레우스	박테리아	G+	예상하지 못한, 상승작용
씨. 알비칸스	효모		예상하지 못한, 상승작용
에스. 세레비시아에	효모		예상하지 못한, 상승작용

[0265] 로즈마리와 조합된 헤스페리딘이 심지어 최고로 여기서 시험된 농도(2.5%)에서 리스테리아 모노사이토게네스에 대해 시험관내 살균 효과를 가지지 않는다는 것에 주목한다.

[0266] 이제, 놀랍게도, 이러한 추출물 조합이 상승적 방식으로 육류 제품에서의 리스테리아 모노사이토게네스의 성장을 상당히 그리고 효율적으로 저해하였다.

[0267] 리스테리아 모노사이토게네스 성장에 대해 선행 기술에서 및 육류(이 연구)에서 보고된 바대로 시험관내 헤스페리딘 효과와 비교할 때 유사한 관찰이 도출될 수 있었다. 실제로, 시험관내 헤스페리딘이 항리스테리아 효과를 가지지 않더라도, 이것은 쇠고기 육류에서의 리스테리아 성장을 저해하였다.

[0268] **육류/가금류/어류 매트릭스에서의 로즈마리/푸니카 및 로즈마리/헤스페리딘 추출물의 사용**

[0269] 가공 방법, 추출물 혼입, 리스테리아 오염 및 성장 저해

[0270] 산업에 의해 사용되는 표준 레시피에 따라 신선 돼지고기 소세지 및 가금류를 제조하였다. 어류 및 해산물에 관한 한, 여기서 훈제 연어에 의해 예시된 바대로, 이의 가공은 산업 절차에 따라 또한 수행되었다.

[0271] **육류/가금류/어류 뱃치**

[0272] 가능할 때마다, 각각의 육류/카테고리에 대해 pH 및 내인성 플로라(구성성분 플로라의 비율 및 성질)의 면에서 원료의 가변성을 극복하기 위해, 상이한 육류/가금류/어류 공급자/(연어) 사육장으로부터 기원한 원료의 3개의 뱃치에서 가공을 수행하였다. 식물 추출물 또는 이들의 조합을 기본적인 가공 성분과 함께 각각의 레시피의 시작 시 혼입하였다. 식물 추출물 또는 이들의 조합을 하기 표 23, 24, 26, 27, 29 및 30에 설명된 바대로 1-3의 상이한 농도에서 식품 매트릭스에서 혼입하였다.

[0273] 모든 생성물 카테고리가 관여한 한, 대조군, 즉 식물 추출물을 포함하지 않는 생성물을 시험하였다.

[0274] *리스테리아 모노사이토게네스의 균주의 성질 및 기원/박테리아 제조 조건*

[0275] 표준 조작 절차 NF V01-009에 따라 임의의 육류/가금류/어류 제품에 관해 혼합물(50/50)에서의 리스테리아 모노사이토게네스의 2개의 균주를 연구하였다. 육류 제품에서의 시험에 관한 한, 기준 균주 CIP 7838(혈청형 4b) 및 돼지고기 항원형 1/2a형으로부터 단리된 소위 필드 균주(ADIV 수집), 신선 돼지고기에서 50% 초과로 우위를 차지하는 것을 사용하였다.

[0276] 가금류 육류에 관한 한, 기준 균주 7838을 가금류 도체로부터 단리된 리스테리아 모노사이토게네스의 균주(ADIV 수집; 항원형 1/2b형)에 커플링시켰다. 연어에서의 시험에 관한 한, 기준 균주 CIP 7838을 ADIV가 이의 네트워크의 파트너에 의해 공여된 연어로부터 단리된 균주와 혼합하였다. 임의의 여기서 연구된 식품 매트릭스에 관한 한, 표준 조작 절차 NF V01-009의 가이드라인(2014년 버전)에 따라 2개의 균주를 제조하고 접종하였다.

[0277] 저온생물(cryobille)(-80℃)로서 보존된 냉동된 균주를 개별적으로 부활시키고 배양하였다. 10㎖의 BHI 배양 배지(30℃에서 24시간 동안) 중에 0.1㎖를 이식함으로써 각각의 균주를 부활시켰다. 2의 연속적인 하위배양은 각각의 균주의 예비배양물을 생성시켰다. 후속하여, 각각의 균주를 30℃에서 24시간 동안 다시 배양하였다. 후자의 배양물을 (지수기 또는 초기 정지기의 각각에) 매트릭스 생성물 오염에서 사용하였다. 2의 연속적인 원심분리 후, 펠렛을 10㎖의 완충 펩톤 물(BPW) 중에 현탁시키고, BHI 배지에서 계수를 수행하고, 접종 전에 0℃에서 24시간 동안 박테리아 용액을 유지시켰다. 박테리아 성장의 판독 후, 2-3 log cfu/g에서 2개의 균주의 혼합물(50/50)에 의해 식품 매트릭스 생성물을 접종하도록 농도를 이후 조정하였다.

[0278] *접종 방법*

[0279] NF V01-009에 기재된 바대로, 제품 접종 모드는 산업 오염의 현실과 일치해야 한다. 따라서, 육류로부터의 오염을 모의하기 위해 육류 혼합물의 덩어리에서의 접종에 의해 소세지(돼지고기 또는 가금류)를 오염시켰다. 훈제 연어의 오염이 원료의 취급 동안 또는 슬라이싱/포장할 때 발생하므로, 여기서 연어 슬라이스의 표면의 오염을 적용하였다.

[0280] 제품의 표면에서의 접종 방법은 ADIV에 의해 개발되었고, 제품의 표면에서의 원하는 농도를 얻는 방식으로 계산된 접종원의 정확한 중량을 제공하였다. 접종의 방법(접지 또는 표면)과 무관하게, 식품 제품의 적절한 물 활성을 유지시키기 위해, 1/100의 중량/용적 비율(NF V01-009)을 초과하지 않도록 식품 매트릭스에 첨가되는 수성 용적을 계산하였다.

[0281] *육류/가금류/어류 제품 동화 및 추출물 혼입*

[0282] **돼지고기 소세지**

[0283] 돼지고기 살코기(86%) 및 돼지고기 지방(14%)으로부터 실행 지침에 응하여 종래의 공정에 따라 돼지고기 소세지를 제조하였다. 그리드(6㎜ 그리드)를 통해 저온에서의 돼지고기 육류의 지방 및 살코기 부분의 갈기/다지기에 의해 소세지 제조에 의도된 초기 육류 혼합물을 얻었다. 이후, 표 24 및 표 25에 따라, 적용 가능할 때마다, 여기서 시험된 식물 추출물을 첨가하였다. 균질화 후, 혼합물을 이후 천연 케이싱(양 메뉴, 24/26 직경)에 채웠다.

[0284] **오염/포장**

[0285] 소정의 뱃치에 대해, 42㎏의 육류 혼합물을 준비하고 이후 시험 시리즈의 제조를 위해 각각 5㎏의 상이한 세트

로 분할하였다. 오(5)kg의 육류 혼합물을 어떤 항균제도 첨가제(23g/kg에서의 Mix Fraiche 230 South) 및 50g 물/kg도 함유하지 않는 제조된 혼합물에 첨가하였다. 균질화 후, 따라서 얻어진 혼합물을 부분으로 분할하였다. 4℃에서의 보존 시간의 1/3 및 8℃에서의 보존 시간의 2/3의 보존 시간 시나리오에 의해 MAP 조건(70% O_2/30% CO_2)에서 포장된 트레이(트레이마다 6개의 소세지)에 인공 리스테리아 오염이 없는 부분을 위치시켰다. 상기 기재된 바대로 포장하고 보존하기 전에 3 log cfu/g(같은 육류 덩어리에서의 접종)의 평균 속도로 리스테리아 모노사이토게네스에 의해 다른 부분을 인공으로 오염시켰다. 식물 추출물을 포함하지 않은 오염된 육류 샘플을 대조군이라 칭했다.

[0286] *보존 동안 분석 모니터링*

[0287] 미생물 분석을 D0 및 JDLC(D14)에서 수행하고, 이것은 리스테리아 모노사이토게네스, 전체 중온성 산성화 플로라(FAM) 및 락트산 플로라의 목록에 관련하였다. 각각의 분석 지점에서, 트레이(3개의 뱃치에 대해 n = 3)의 분석에 의해 단일 반복 뱃치를 수행하였다.

[0288] *가금류 소세지의 제조*

[0289] 돼지고기 소세지에 대해 기재된 바와 같은 동일한 실험 조건에 따라 가금류 소세지를 제조하였다. 유일한 차이는 사용된 원료의 성질 및 첨가될 수 있는 화합물의 성질에 있다. 실제로, 이 경우에, 닭 허벅지의 상부 부분 85% 및 피부로 표현되는 지방을 사용하여 살코기를 만들었다.

[0290] 같은 육류 혼합물은 어떤 전통적인 항균제를 포함하지 않고 항균 또는 항산화 활성을 가지는 임의의 성분이 제거된 혼합물(Mix Chipo Flight 310 내지 31g/kg)을 포함하였다. 이렇게 제조된 혼합물은 식물 추출물을 포함하거나 포함하지 않고(대조군), 돼지고기에 대해 기재된 바와 같은 동일한 실험 조건 및 리스테리아/박테리아 분석을 따랐다.

[0291] *훈제 연어의 제조 및 접종*

[0292] 당해 분야의 당업자로부터 널리 공지되고 이 당업자에게 이용 가능한 전통적인 절차에 따라 훈제 연어의 제조를 수행하였다. 육류 제품에 관해서는, 동일 주 동안 3개의 상이한 기원으로부터의 연어의 3개의 상이한 뱃치를 만들었다. 리스테리아/박테리아 분석 전에 산업 부지에서 진공(트레이마다 약 200g) 하에 트레이에서 제품을 포장 슬라이싱하였다.

[0293] 표 29 및 표 30에 기재된 비율 및 농도에 따라 시험된 해산물, 즉 훈제 연어에 로즈마리 및 헤스페리딘 추출물, 및 로즈마리 및 푸니카 추출물의 추출물 조합을 혼입하였다. 연어를 칭량하고, 이후 3±0.5 log/g의 평균 속도로 2개의 균주의 혼합물(50/50)에 의해 분무에 의해 표면 접종하였다. 접종 후, 플레이트를 다시 진공 포장하고 8℃에서 30일 동안 저장하였다. 접종(0일) 시 및 성장의 30일에 리스테리아 성장을 모니터링하였다. 비접종된 대조군을 비교 목적을 위해 여기서 시험된 모든 육류/가금류/어류 매트릭스에 대해 차가운 저장에서 유지시켰다.

[0294] 쇠고기, 돼지고기, 가금류 육류 또는 어류에서의 모든 실험에 걸쳐 pH, 전체 중온성 산성화 플로라, 락트산 플로라를 측정하였다. 이 식품 매트릭스에서의 여기서 시험된 보테니컬 추출물의 존재는 pH, 전체 중온성 산성화 플로라, 락트산 플로라에 상당한 영향을 미치지 않았다.

[0295] **실시예: 가금류 소세지에서의 R/P 및 R/H의 항균 효과**

[0296] 다진 쇠고기에 대해 그리고 상기에 기재된 프로토콜에 기초하여 당해 분야의 당업자에게 이용 가능한, 전통적인 방법을 가공 가금류 소세지에 적용하였다.

[0297] 상기 기재된 바대로, 간단히 말하면, 상이한 농도의 R/P 및 R/H 추출물 조합을 포함하는 소세지로 가공된 신선 가금류 육류의 3개의 상이한 뱃치를 리스테리아 모노사이토게네스에 의해 접종하였다. 대조군은 식물 추출물을 포함하지 않았다. 신선 가금류 육류 샘플을 차가운 조건에서 유지시키고, 14일에 리스테리아 성장을 측정하였다.

표 22

가금류 소세지의 뱃취마다 초기 리스테리아 부하

뱃치	엘. 모노사이토게네스(cfu/g)
뱃치 1	1.95E+03
뱃치 2	2.93E+03
뱃치 3	2.75E+03

[0298]

[0299] 추출물을 하기한 바대로 제조하였다: 상기 정의된 바와 같은 절반 분량의 R(0.5 R) 및 절반 분량의 H(0.5H) 또는 절반 분량의 P(0.5P) 추출물을 표 21에 따라 함께 혼합하고, 혼합물을 말토덱스트린에 의해 100%까지 완료하였다. 표 23 및 표 24에 기재된 바와 같은 비율의 소세지로 가공 시 가금류 신선 육류에 이 분말화 혼합물을 첨가하였다. 표 23 및 표 24는 추출물에서 및 육류 매트릭스에서 % 및 ppm 단위의 추출물 및 추출물 화합물에서의 최종 함량을 또한 나타낸다.

[0300] 0.5%의 0.5R + 0.5H가 다진 쇠고기에서 시험된 0.5R + 0.5H라 칭하는 추출물 화합물에서의 분량에 상응한다는 것에 주목한다. 추가로, 0.3%의 0.5R + 0.5P가 다진 쇠고기에서 시험된 0.5R + 0.5P라 칭하는 추출물 화합물에서의 분량에 상응한다는 것에 주목한다. 모든 얻은 데이터는 분석되고, 다진 쇠고기에 관해 알려진 설명에 따라 표현된다(즉, 델타 log 등).

표 23

		대조군	0,5R + 0,5H
추출물의 조성(%)	로즈마리 추출물	0,00	3,05
	카르노스산	0,00	1,34
	카르노스산 + 카르노솔	0,00	1,48
	헤스페리딘 추출물	0,00	56,70
	헤스페리딘	0,00	53,87
			0,6%
가금류에서의 조성(ppm)	로즈마리 추출물	0	183
	카르노스산	0	80
	카르노스산 + 카르노솔	0	89
	헤스페리딘 추출물	0	3402
	헤스페리딘	0	3232

[0301]

표 24

		대조군 LM	0,5R + 0,5P	
추출물의 조성(%)	로즈마리 추출물	0,00	5,33	
	카르노스산	0,00	2,35	
	카르노스산 + 카르노솔	0,00	2,58	
	석류 추출물	0,00	21,60	
	엘라그산	0,00	0,43	
	푸니칼라진	0,00	1,94	
			0,2%	0,4%
가금류에서의 조성(ppm)	로즈마리 추출물	0	107	213
	카르노스산	0	47	94
	카르노스산 + 카르노솔	0	52	103
	석류 추출물	0	432	864
	엘라그산	0	9	17
	푸니칼라진	0	39	78

[0302]

[0303] 결과:

[0304] 엘. 모노사이토게네스는 대조군 육류에서 확실히 성장하였다(도 12). 추출물의 조합이 육류에 첨가될 때, 이들은 리스테리아 성장을 효율적으로 저해하였다(도 13 및 도 14). 이 데이터는 다진 쇠고기에서 발견된 데이터를 확인시켜주고, 이것은 로즈마리 및 헤스페리딘, 및 로즈마리 및 푸니카 추출물의 상승적 항리스테리아 효과를 명확히 입증한다.

[0305] **실시예: 돼지고기 소세지에서의 R/P 및 R/H의 항균 효과**

[0306] 다진 쇠고기에 대해 그리고 상기에 기재된 프로토콜에 기초하여 당해 분야의 당업자에게 이용 가능한, 전통적인 방법을 가공 돼지고기 소세지에 적용하였다.

[0307] 간단히 말하면, 상이한 농도의 R/P 및 R/H 추출물 조합을 포함하는 소세지로 가공된 신선 돼지고기 육류의 3개의 상이한 뱃치를 리스테리아 모노사이토게네스에 의해 접종하였다. 대조군은 식물 추출물을 포함하지 않았다. 신선 돼지고기 육류 샘플을 차가운 조건(8℃)에서 유지시키고, 14일에 리스테리아 성장을 측정하였다.

표 25

뱃치마다 초기 리스테리아 부하

뱃치	엘. 모노사이토게네스(cfu/g)
뱃치 1	1.55E+03
뱃치 2	2.96E+03
뱃치 3	2.36E+03

[0308]

[0309] 상기 정의된 바와 같은 절반 분량의 R(0.5 R) 및 절반 분량의 H(0.5H) 또는 절반 분량의 P(0.5P) 추출물을 표 24에 따라 함께 혼합하고, 혼합물을 말토덱스트린에 의해 100%까지 완료하였다. 표 26 및 표 27에 기재된 바와 같은 비율의 소세지로 가공 시 돼지고기 신선 육류에 이 분말화 혼합물을 첨가하였다. 표 26 및 표 27은 추출물에서 및 육류 매트릭스에서 % 및 ppm 단위의 추출물 및 추출물 화합물에서의 최종 함량을 또한 나타낸다.

[0310] 0.5%의 0.5R + 0.5H가 다진 쇠고기에서 시험된 0.5R + 0.5H라 칭하는 추출물 화합물에서의 분량에 상응한다는 것에 주목한다. 또한, 0.3%의 0.5R + 0.5P가 다진 쇠고기에서 시험된 0.5R + 0.5P라 칭하는 추출물 화합물에서의 분량에 상응한다는 것에 주목한다. 모든 얻은 데이터는 분석되고, 다진 쇠고기에 관해 상기 제공된 설명에 따라 표현된다(즉, 델타 log 등).

표 26

		대조군	0,5R + 0,5H		
추출물의 조성(%)	로즈마리 추출물	0,00	3,05		
	카르노스산	0,00	1,34		
	카르노스산 + 카르노솔	0,00	1,48		
	헤스페리딘 추출물	0,00	56,70		
	헤스페리딘	0,00	53,87		
		대조군	0,4%	0,5%	0,6%
돼지고기에서의 조성(ppm)	로즈마리 추출물	0	122	153	183
	카르노스산	0	54	67	80
	카르노스산 + 카르노솔	0	59	74	89
	헤스페리딘 추출물	0	2268	2835	3402
	헤스페리딘	0	2155	2694	3232

[0311]

		대조군	0,5R + 0,5H		
추출물의 조성(%)	로즈마리 추출물	0,00	3,05		
	카르노스산	0,00	1,34		
	카르노스산 + 카르노솔	0,00	1,48		
	헤스페리딘 추출물	0,00	56,70		
	헤스페리딘	0,00	53,87		
			0,4%	0,5%	0,6%
돼지고기에서의 조성(ppm)	로즈마리 추출물	0	122	153	183
	카르노스산	0	54	67	80
	카르노스산 + 카르노솔	0	59	74	89
	헤스페리딘 추출물	0	2268	2835	3402
	헤스페리딘	0	2155	2694	3232

[0312]

표 27

		대조군 LM	0,5R + 0,5P		
추출물의 조성(%)	로즈마리 추출물	0,00	5,33		
	카르노스산	0,00	2,35		
	카르노스산 + 카르노솔	0,00	2,58		
	석류 추출물	0,00	21,60		
	엘라그산	0,00	0,43		
	푸니칼라진	0,00	1,94		
			0,2%	0,3%	0,4%
돼지고기에서의 조성(ppm)	로즈마리 추출물	0	107	160	213
	카르노스산	0	47	71	94
	카르노스산 + 카르노솔	0	52	77	103
	석류 추출물	0	432	648	864
	엘라그산	0	9	13	17
	푸니칼라진	0	39	58	78

[0313]

[0314] 결과:

[0315] 엘. 모노사이토게네스는 대조군 육류에서 확실히 성장하였다(도 15). 추출물의 조합이 육류에 첨가될 때, 이들은 모든 여기서 시험된 농도에서 리스테리아 성장을 효율적으로 저해하였다(도 16 및 도 17). 이 데이터는 다진 쇠고기에서 발견된 데이터를 확인시켜주고, 이것은 로즈마리 및 헤스페리딘, 및 로즈마리 및 푸니카 추출물의 상승적 항리스테리아 효과를 명확히 입증한다.

[0316] 갈은 쇠고기에 대해 그리고 상기에 기재된 프로토콜에 기초하여 당해 분야의 당업자에게 이용 가능한, 전통적인 방법을 훈제 연어에 적용하였다.

[0317] 상기 기재된 바대로, 간단히 말하면, 상이한 농도의 R/P 및 R/H 추출물 조합을 포함하는 훈제 연어의 3개의 상이한 뱃치를 리스테리아 모노사이토게네스에 의해 접종하였다. 대조군은 식물 추출물을 포함하지 않았다. 훈제 연어 샘플을 차가운 조건에서 유지시키고, 14일에 리스테리아 성장을 측정하였다.

[0318] 가금류 소세지의 뱃취마다 초기 리스테리아 부하는 표 28에 제시되어 있다:

표 28

훈제 연어에서의 초기 리스테리아 부하

뱃치	엘. 모노사이토게네스(cfu/g)
뱃치 1	1.46E+03
뱃치 2	4.93E+03
뱃치 3	5.64E+03

[0319]

표 29

		대조군	0,5R + 0,5H	
추출물의 조성(%)	로즈마리 추출물	0,00	3,05	
	카르노스산	0,00	1,34	
	카르노스산 + 카르노솔	0,00	1,48	
	헤스페리딘 추출물	0,00	56,70	
	헤스페리딘	0,00	53,87	
		대조군	0,4%	0,5%
훈제 연어에서의 조성(ppm)	로즈마리 추출물	0	122	153
	카르노스산	0	54	67
	카르노스산 + 카르노솔	0	59	74
	헤스페리딘 추출물	0	2268	2835
	헤스페리딘	0	2155	2694

[0320]

표 30

		대조군 LM	0,5R + 0,5P
추출물의 조성(%)	로즈마리 추출물	0,00	5,33
	카르노스산	0,00	2,35
	카르노스산 + 카르노솔	0,00	2,58
	석류 추출물	0,00	21,60
	엘라그산	0,00	0,43
	푸니칼라진	0,00	1,94
			0,3%
훈제 연어에서의 조성(ppm)	로즈마리 추출물	0	160
	카르노스산	0	71
	카르노스산 + 카르노솔	0	77
	석류 추출물	0	648
	엘라그산	0	13
	푸니칼라진	0	58

[0321]

[0322] 0.3%의 0.5R + 0.5P가 다진 쇠고기에서 첨가된 추출물 조합의 동일한 비율 및 용량에 상응하고, 0.5R+0.5P라 칭해진다는 것에 주목한다.

[0323] 결과:

[0324] 엘. 모노사이토게네스는 대조군 훈제 연어에서 확실히 성장하였다(도 18). 추출물의 조합이 육류에 첨가될 때, 이들은 리스테리아 성장을 효율적으로 저해하였다(도 19 및 도 20). 이 데이터는 다진 쇠고기에서 발견된 데이터를 확인시켜주고, 이것은 로즈마리 및 헤스페리딘, 및 로즈마리 및 푸니카 추출물의 상승적 항리스테리아 효과를 명확히 입증한다.

[0325] **참고문헌**

[0326] 다수의 참고문헌이 본 개시내용에 걸쳐 인용되었다. 하기 기재된 추가적인 참고문헌을 포함하는 본 개시내용에 인용된 모든 참고문헌은 참고문헌으로 포함된다.

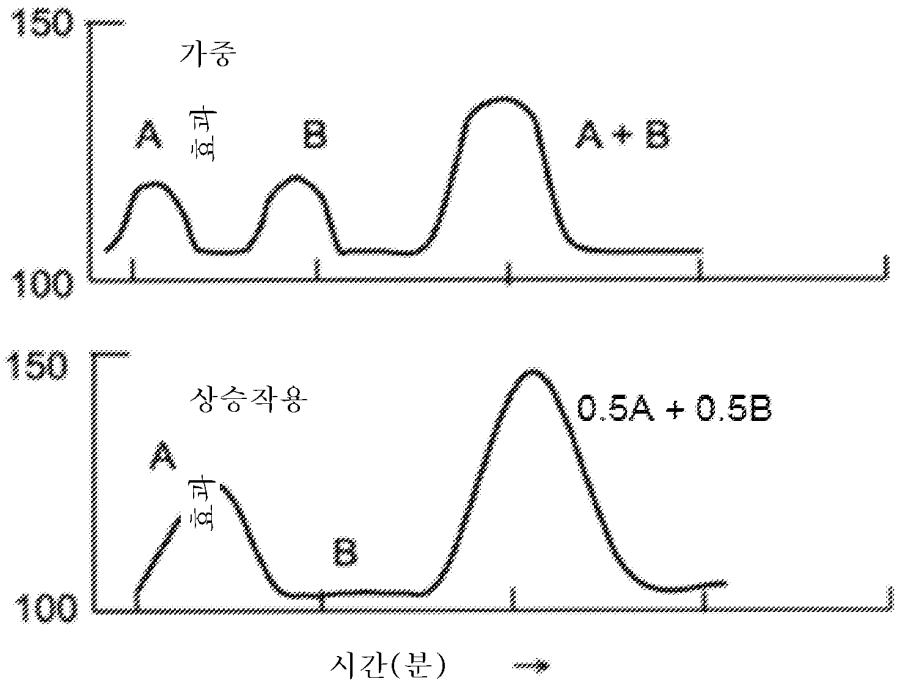
[0327] Kai Reineke, Henning Weich, Dietrich Knorr, "The Influence of Sugars on Pressure Induced Starch Gelatinization", Procedia Food Science, Vol. 1, (2011), pages 2040-2046.

[0328] Shivangi Kelkar, Scott Stella, Carol Boushey, Martin Okos, "Developing novel 3D measurement techniques and prediction method for food density determination", Procedia Food Science, Vol. 1, (2011), pages 483-491.

[0329] S. Chaillou, S.Christieans, M. Rivollier, I. Lucquin, M.C. Champomier-Verges, M. Zagorec; "Quantification and efficiency of Lactobacillus sakei strain mixtures used as protective cultures in ground beef"; Meat Science 97, (3) (2014), pages 332-338.

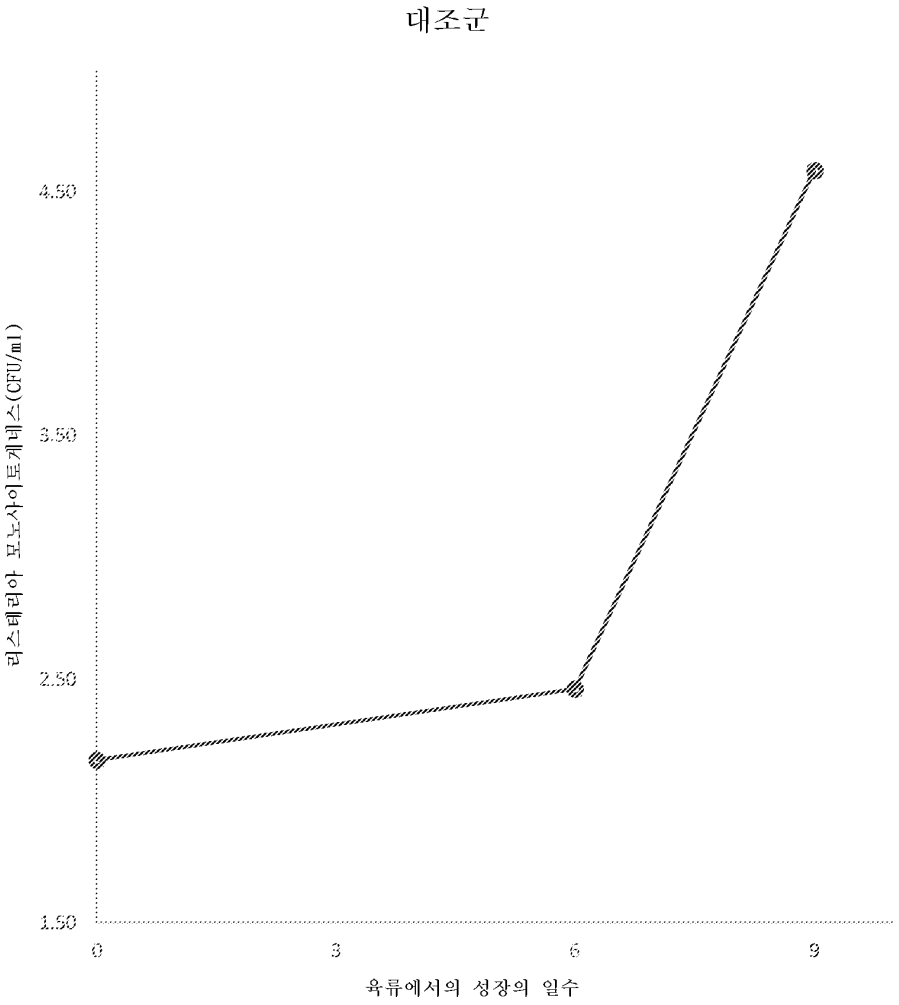
도면

도면1

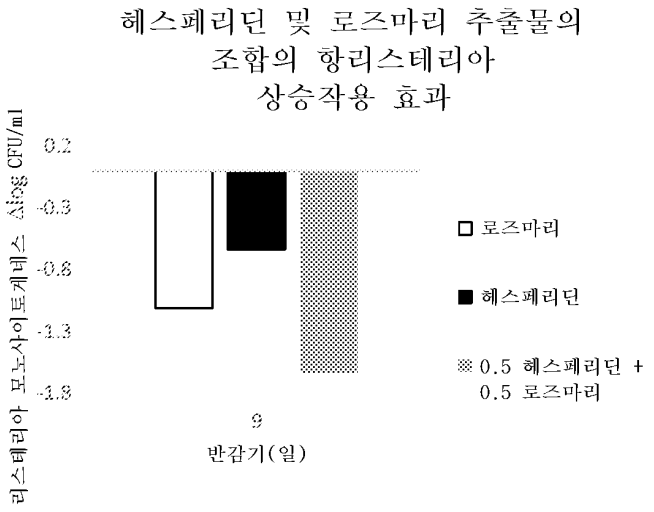


선행 기술

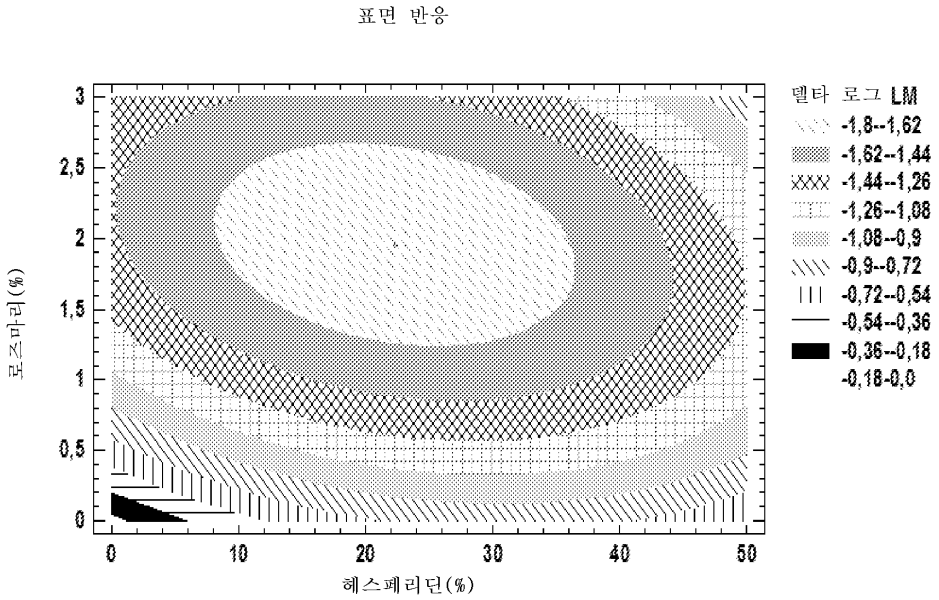
도면2


대조군
4.50
3.50
2.50
1.50
리스테리아 모노사이토게네스(CFU/ml)
0
3
6
9
육류에서의 성장의 일수

도면3

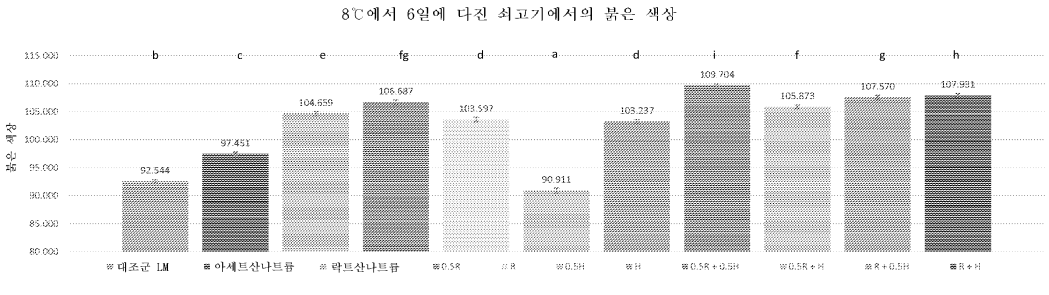

헤스페리딘 및 로즈마리 추출물의
조합의 항리스테리아
상승작용 효과
0.2
-0.3
-0.8
-1.3
-1.8
리스테리아 모노사이토게네스 Δlog CFU/ml
9
반감기(일)
로즈마리
헤스페리딘
※ 0.5 헤스페리딘 +
0.5 로즈마리

도면4

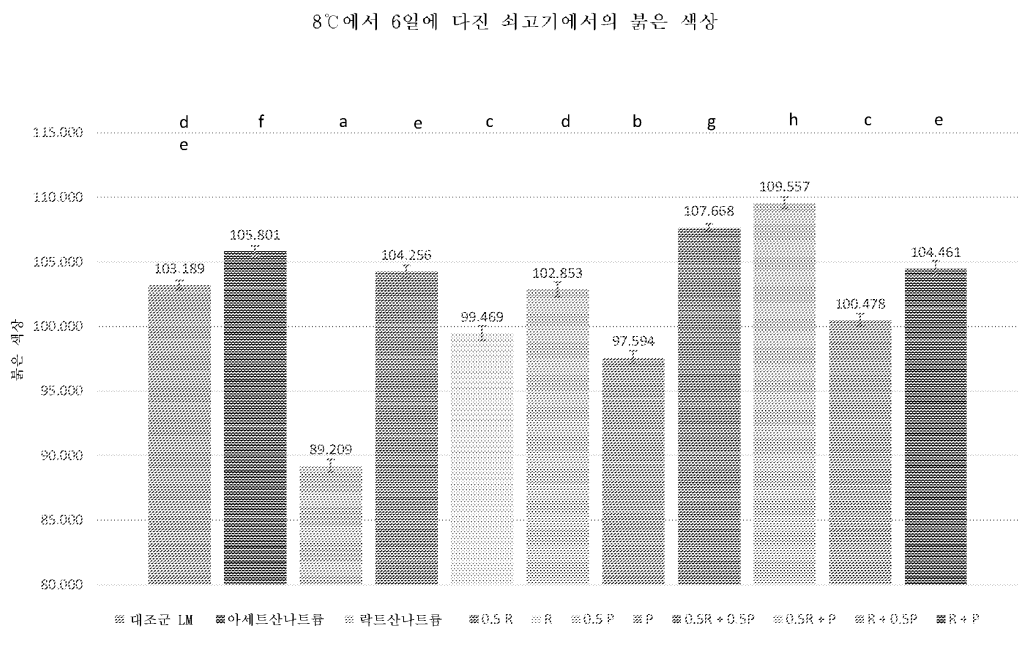


RH 표면 반응

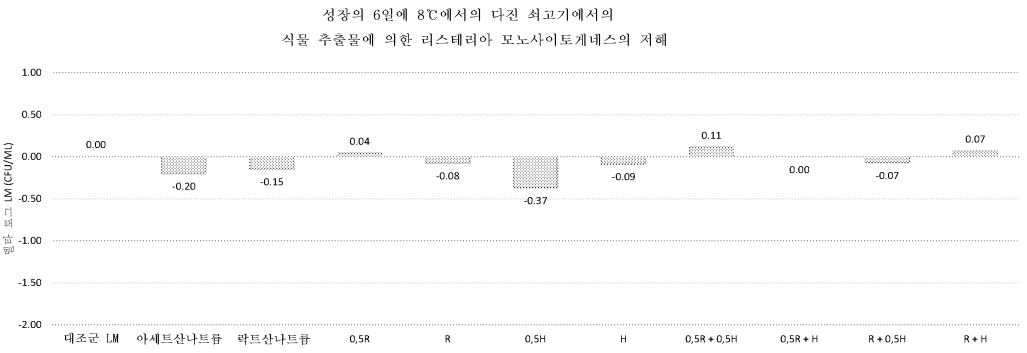
도면5



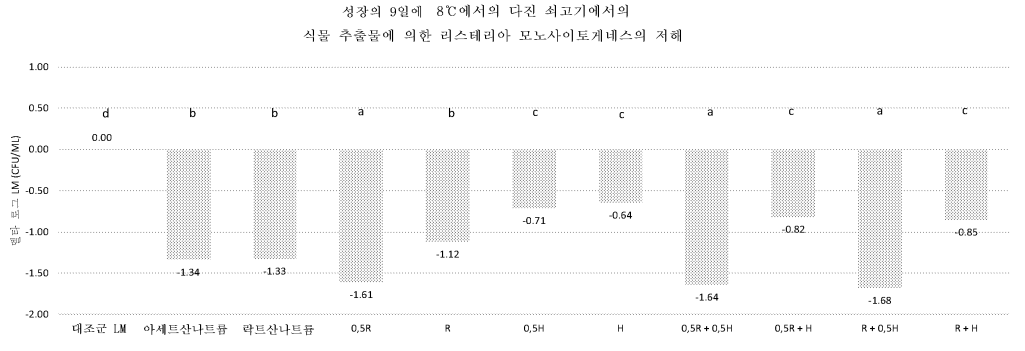
도면6


8℃에서 6일에 다진 쇠고기에서의 붉은 색상
붉은 색상
115.000
110.000
105.000
100.000
95.000
90.000
85.000
80.000
d e
f
a
e
c
d
b
g
h
c
e
103.189
105.801
89.209
104.256
99.469
102.853
97.594
107.668
109.557
100.478
104.461
대조군 LM
아세트산나트륨
락트산나트륨
0.5 R
R
0.5 P
P
0.5R + 0.5P
0.5R + P
R + 0.5P
R + P

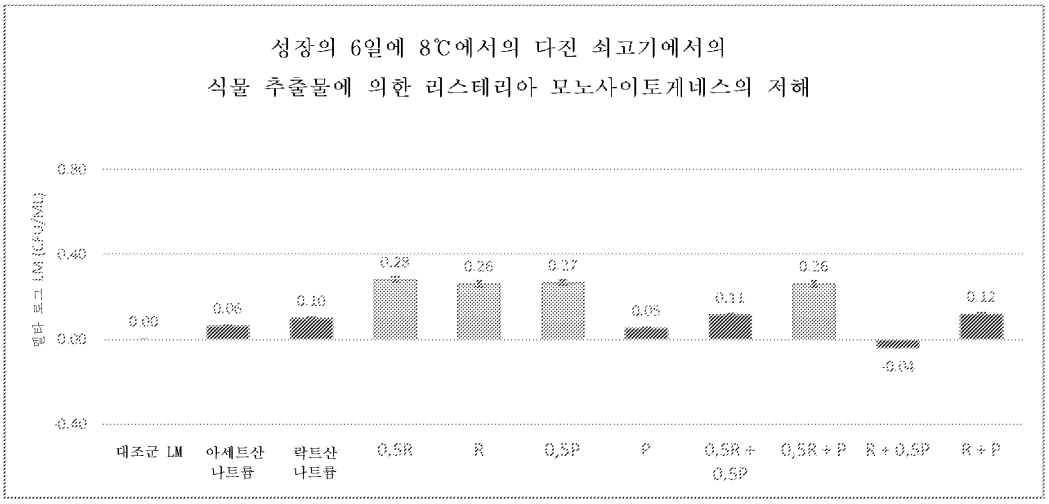
도면7


성장의 6일에 8℃에서의 다진 쇠고기에서의
식물 추출물에 의한 리스테리아 모노사이토게네스의 저해
헴담 로그 LM (CFU/ML)
1.00
0.50
0.00
-0.50
-1.00
-1.50
-2.00
0.00
-0.20
-0.15
0.04
-0.08
-0.37
-0.09
0.11
0.00
-0.07
0.07
대조군 LM
아세트산나트륨
락트산나트륨
0,5R
R
0,5H
H
0,5R + 0,5H
0,5R + H
R + 0,5H
R + H

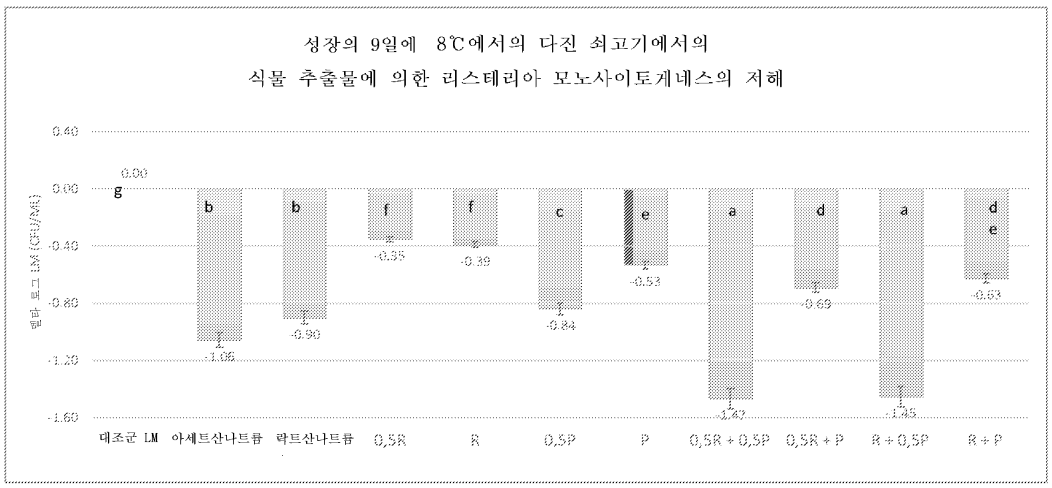
도면8


성장의 9일에 8℃에서의 다진 쇠고기에서의
식물 추출물에 의한 리스테리아 모노사이토게네스의 저해
헴담 로그 LM (CFU/ML)
1.00
0.50
0.00
-0.50
-1.00
-1.50
-2.00
d
b
b
a
b
c
c
a
c
a
c
0.00
-1.34
-1.33
-1.61
-1.12
-0.71
-0.64
-1.64
-0.82
-1.68
-0.85
대조군 LM
아세트산나트륨
락트산나트륨
0,5R
R
0,5H
H
0,5R + 0,5H
0,5R + H
R + 0,5H
R + H

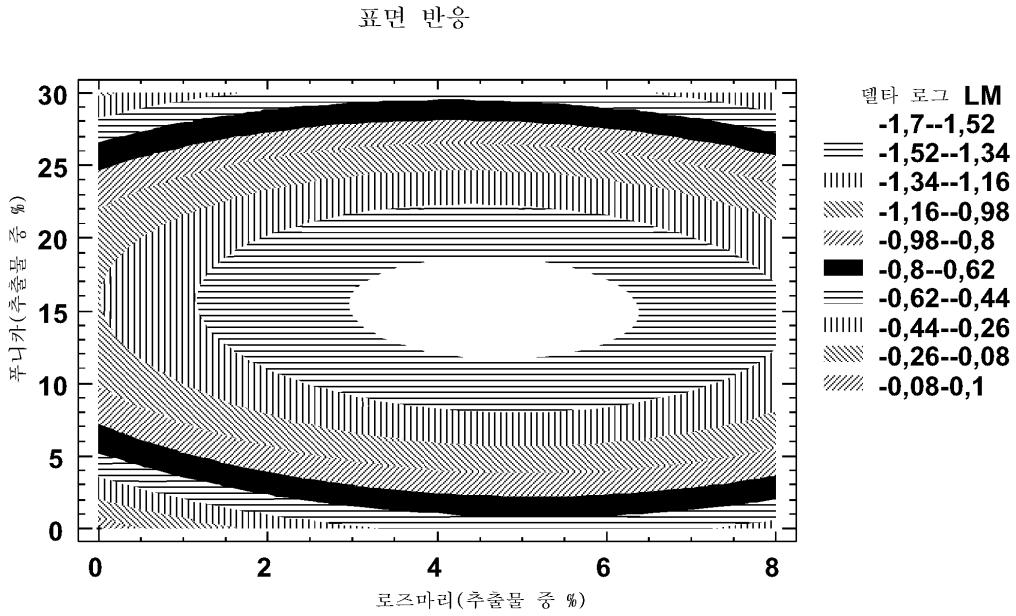
도면9


성장의 6일에 8℃에서의 다진 쇠고기에서의
식물 추출물에 의한 리스테리아 모노사이토게네스의 저해
0.80
0.40
0.00
-0.40
0.00
0.06
0.10
0.28
0.26
0.27
0.05
0.11
0.26
-0.04
0.12
대조군 LM
아세트산 나트륨
락트산 나트륨
0.5R
R
0.5P
P
0.5R + 0.5P
0.5R + P
R + 0.5P
R + P

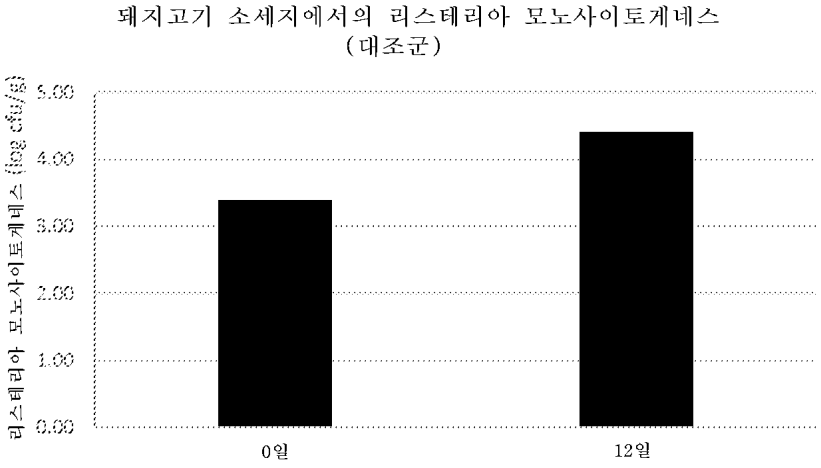
도면10


성장의 9일에 8℃에서의 다진 쇠고기에서의
식물 추출물에 의한 리스테리아 모노사이토게네스의 저해
0.40
0.00
-0.40
-0.80
-1.20
-1.60
g
b
b
f
f
c
e
a
d
a
d
e
0.00
-1.06
-0.90
-0.55
-0.59
-0.84
-0.53
-1.62
-0.69
-1.65
-0.63
대조군 LM
아세트산나트륨
락트산나트륨
0.5R
R
0.5P
P
0.5R + 0.5P
0.5R + P
R + 0.5P
R + P

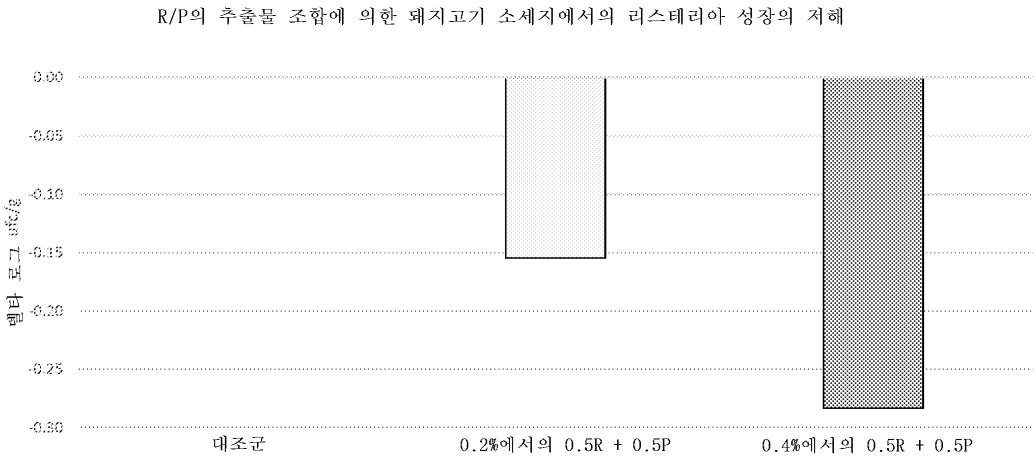
도면11


표면 반응
30
25
20
15
10
5
0
0
2
4
6
8
푸니카(추출물 중 %)
로즈마리(추출물 중 %)
델타 로그 LM
-1,7--1,52
-1,52--1,34
-1,34--1,16
-1,16--0,98
-0,98--0,8
-0,8--0,62
-0,62--0,44
-0,44--0,26
-0,26--0,08
-0,08-0,1

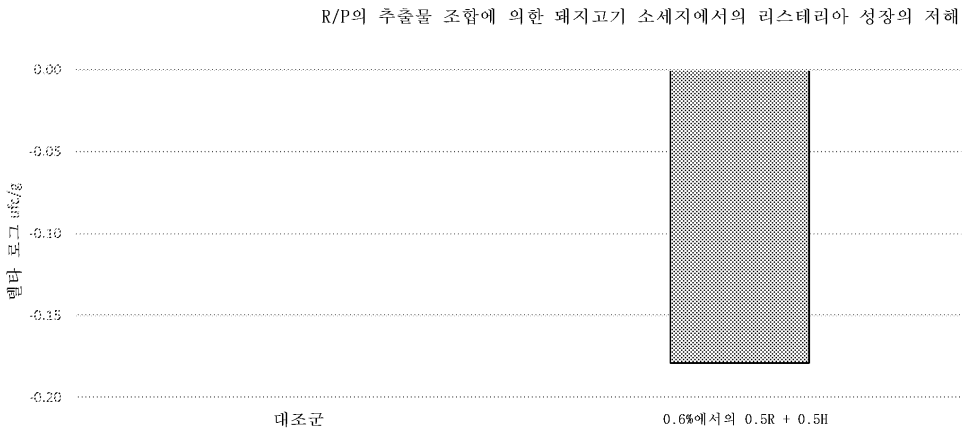
도면12


돼지고기 소세지에서의 리스테리아 모노사이토게네스
(대조군)
리스테리아 모노사이토게네스 (log cfu/g)
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
0일
12일

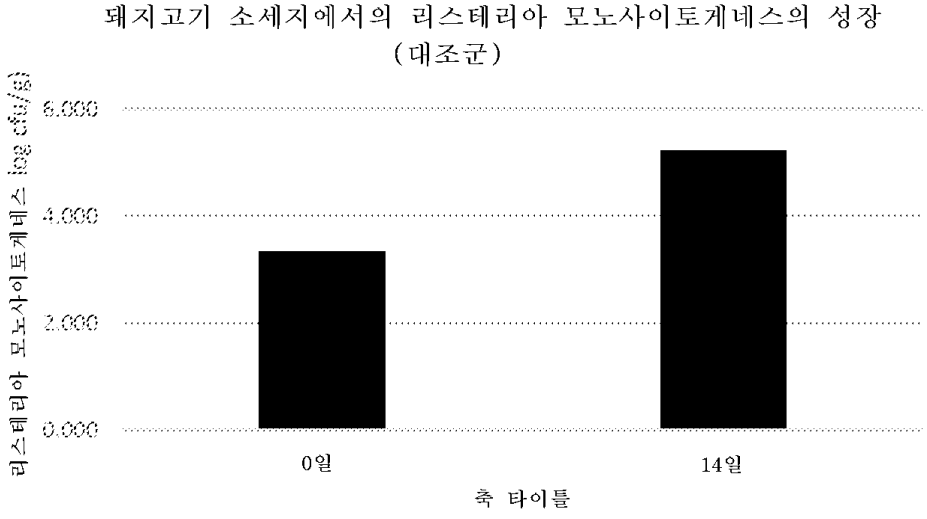
도면13



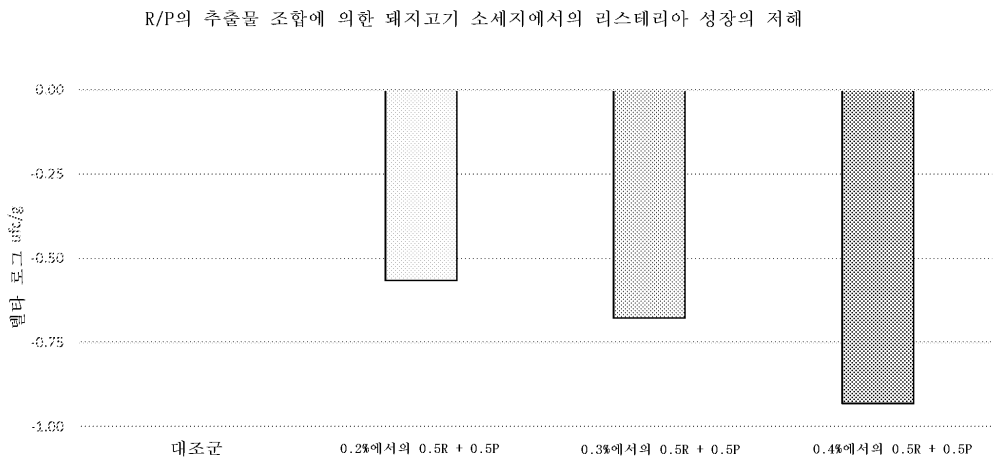
도면14



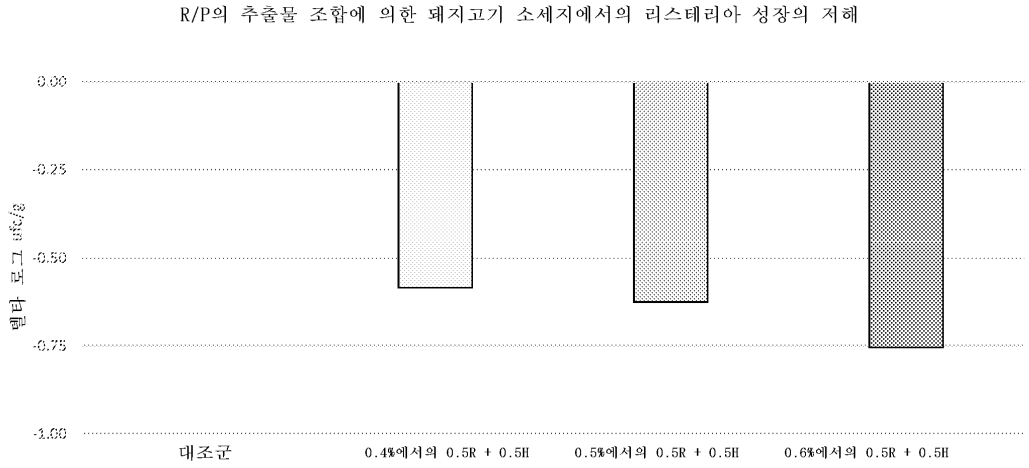
도면15



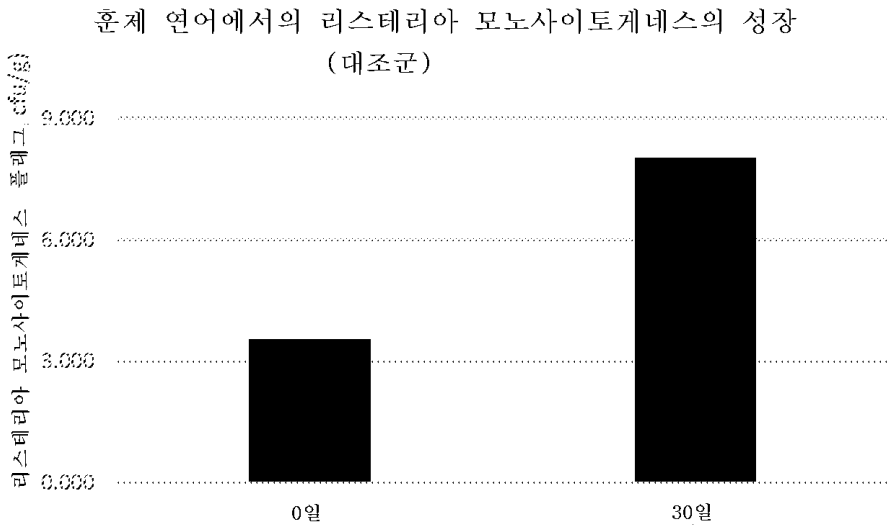
도면16


R/P의 추출물 조합에 의한 돼지고기 소세지에서의 리스테리아 성장의 저해
0.00
-0.25
-0.50
-0.75
-1.00
대조군
0.2%에서의 0.5R + 0.5P
0.3%에서의 0.5R + 0.5P
0.4%에서의 0.5R + 0.5P

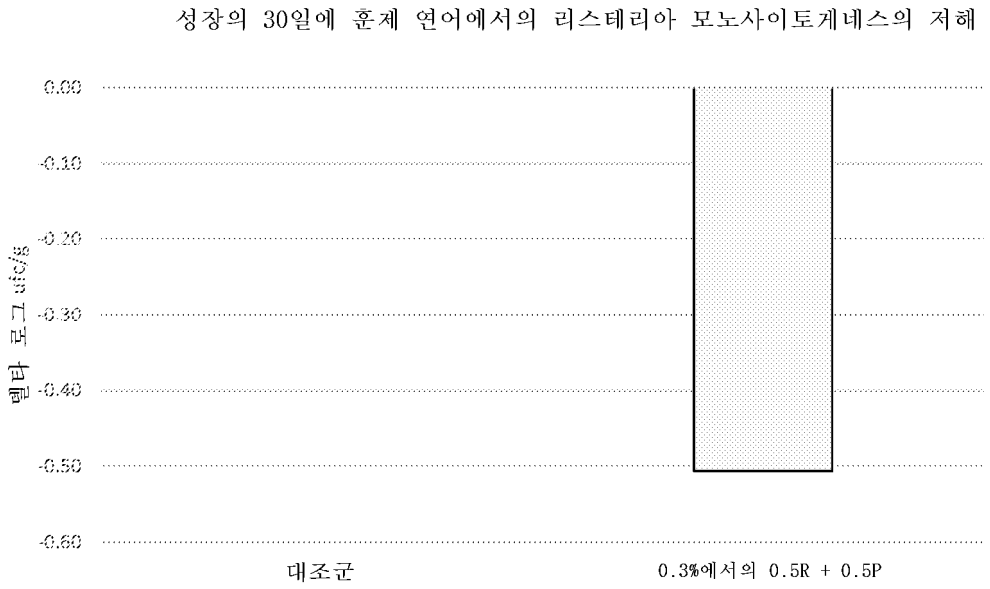
도면17


R/P의 추출물 조합에 의한 돼지고기 소세지에서의 리스테리아 성장의 저해
0.00
-0.25
-0.50
-0.75
-1.00
대조군
0.4%에서의 0.5R + 0.5H
0.5%에서의 0.5R + 0.5H
0.6%에서의 0.5R + 0.5H

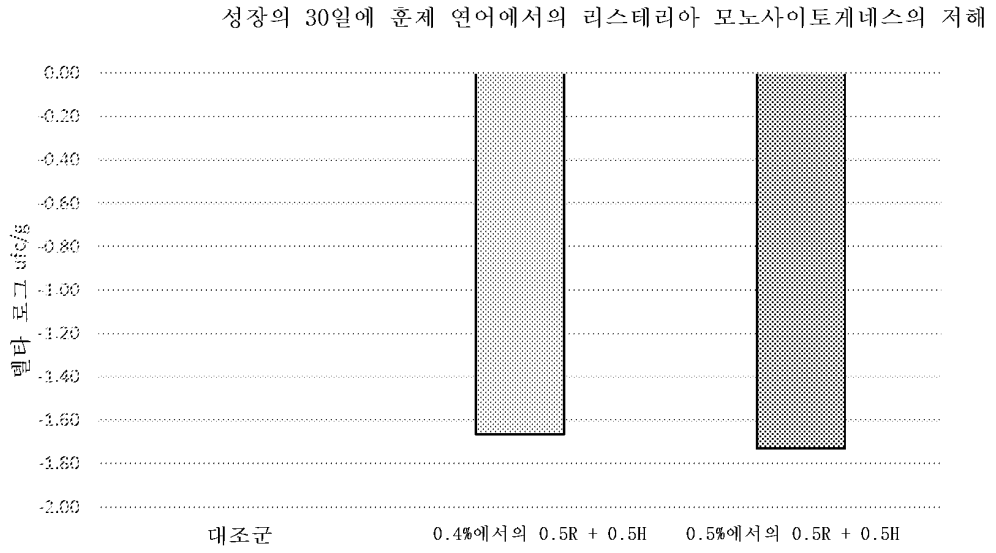
도면18


훈제 연어에서의 리스테리아 모노사이토게네스의 성장
(대조군)
리스테리아 모노사이토게네스 플레그 cfu/g
9.000
6.000
3.000
0.000
0일
30일

도면19


성장의 30일에 훈제 연어에서의 리스테리아 모노사이토게네스의 저해
델타 로그 cfu/g
0.00
-0.10
-0.20
-0.30
-0.40
-0.50
-0.60
대조군
0.3%에서의 0.5R + 0.5P

도면20


성장의 30일에 훈제 연어에서의 리스테리아 모노사이토게네스의 저해
0.00
-0.20
-0.40
-0.60
-0.80
-1.00
-1.20
-1.40
-1.60
-1.80
-2.00
대조군
0.4%에서의 0.5R + 0.5H
0.5%에서의 0.5R + 0.5H