



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년09월06일
 (11) 등록번호 10-1305259
 (24) 등록일자 2013년09월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *C12N 1/16* (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2011-0104350
 (22) 출원일자 2011년10월13일
 심사청구일자 2011년10월13일
 (65) 공개번호 10-2013-0039782
 (43) 공개일자 2013년04월23일
 (56) 선행기술조사문헌
 KR1020110091940 A*
 KR100748846 B1
 KR1019960030725 A
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
한국과학기술원
 대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)
 (72) 발명자
김정희
 대전광역시 유성구 구성동 한국과학기술원
서범구
 대전광역시 중구 선화서로113번길 41 (선화동)
 (74) 대리인
맹성재

전체 청구항 수 : 총 10 항

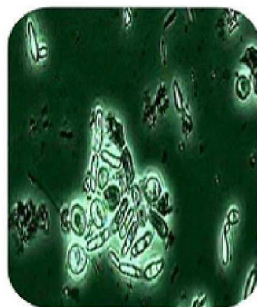
심사관 : 김지연

(54) 발명의 명칭 **인간에게 유익한 미생물 유인균 복합미생물 제조방법**

(57) 요약

본 발명은 세계에서 유명한 전통 발효 식품에서 미생물을 추출하여 복합미생물로 만드는 제조방법으로서, 유산균, 비피더스균, 효모균, 고초균 및 납두균을 세계 여러 나라의 전통식품에서 추출하여 배양한 후 당밀 또는 설탕 배지를 이용하여 균을 접종시켜 20~50℃에서 2~10일간 배양한 다음 각각의 균을 접종시켜 재배양한 복합미생물 제조방법에 관한 것이다.

대표도 - 도2



특허청구의 범위

청구항 1

(1) 그리스 및 불가리의 요구르트, 유럽의 오타지 치즈 및 버터에서 추출한 유산균인 락토코쿠수 락티스 서브스 피시스 락티스(*Lactococcus lactis* subsp *lactis*), 락토코쿠수 락티스 서브스피시스 크레모리스(*Lactococcus lacits* subsp *cremoris*), 페니실륨 카넨베르티아이(*Penicllium canenbertii*), 가이트리침 칸디덤(*Geitrichum candidum*), 브레비박테리움 린넨스(*Brevibacterium linens*)와 효모균인 클로엑케라 아피쿨라타(*Kloeckera apiculata*), 삭차로미세스 로세이(*Saccharomyces rosei*), 쉬조삭차로미세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*), 한세니아스포라 우바림 칸디다 스텔라타(*Hanseniaspora uvarum candida stellata*), 삭차로미세스(*Saccharomyces*)로 이루어진 군에서 선택된 미생물을 배양하는 단계,

(2) 상기 (1)단계에서 배양한 미생물과 요구르트에서 추출한, 비피덤(*B. bifidum*), 롱검(*B. longum*), 브리브(*B. breve*), 아돌레센티스(*B. adolescentis*)로 이루어진 군에서 선택되는 비피도박테리움(*Bifidobacterium*)균을 혼합하여 배양하는 단계,

(3) 상기 (2)단계에서 배양된 미생물과 나이지리아 우아바에서 추출한, 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 마이크로코쿠스 루테우스(*Micrococcus luteus*), 마이크로코쿠스 로세우스(*Micrococcus roseus*), 바실러스 리첸리포르미스(*Bacillus licheniformis*), 류코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides*), 바실러스 세레우스 바르(*Bacillus cereus* var), 바실러스 미코이데스(*Bacillus mycoides*), 바실러스 서큐란스(*Bacillus circulans*), 바실러스 마서란슴(*Bacillus maceransm*)로 이루어진 군에서 선택되는 미생물을 혼합하여 배양하는 단계

(4) 상기 (3)단계에서 배양된 미생물과 일본 간장에서 추출한, 바실러스 서브틸리스 코지(*Bacillus subtilis Koji*), 페르길러스 오리자에(*Pergillus oryzae*), 아스페르길러스 소자에(*Aspergillus sojae*), 바실러스 서브틸 리스(*Bacillus subtilis*), 페디코쿠스 할로코쿠스(*Pediococcus halococcus*), 지고삭차로미세스 마조르(*Zygosaccharomyces major*), 지고삭차로미세스 소야(*Zygosaccharomyces soya*), 토루롭시스 사케(*Torulopsis sake*), 칸디다 펠리쿨로사(*Candida pelliculosa*), 삭 로옥시(*Sacch. rouxxi*), 삭 로세이(*Sacch. rosei*), 삭 페르멘타티(*Sacch. fermentati*), 삭 멜리스(*Sacch. mellis*), 삭 파스토리(*Sacch. pastori*), 한세놀라 아모날라(*Hansenula amonala*)로 이루어진 군에서 선택되는 미생물을 혼합하여 배양하는 단계,

(5) 상기 (4)단계에서 배양된 미생물과 독일 맥주에서 추출한, 클로엑케라 아피쿨라타(*Kloeckera apiculata*), 삭차로미세스 로세이(*Saccharomyces rosei*), 쉬조삭차로미세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*), 한세니아스 포라 우바림(*Hanseniaspora uvarum*), 칸디다 스텔라타(*Candida stellata*)로 이루어진 군에서 선택되는 미생물을 혼합하여 배양하는 단계,

(6) 상기 (5)단계에서 배양된 미생물과 발효된 무지개콩(*Cowpeas*)과 병아리콩(*Chickpeas*)으로 만들어진 발효 대두가루에서 추출한, 락토바실러스 카세이(*Lactobacillus casei*), 락토바실러스 라이치만아이(*Lactobacillus leichmanii*), 락토바실러스 플란타람(*Lactobacillus plantaram*), 페디코쿠스 펜토사세우스(*Pediococcus pentosaceus*), 페디코쿠스 에시디락티시(*Pediococcus acidilactici*)로 이루어진 군에서 선택되는 미생물을 혼합하여 배양하는 단계, 및

(7) 상기 (6)단계에서 배양된 미생물과 일본 낫또에서 추출한, 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 바실 러스 세레우스(*Bacillus cereus*), 바실러스 메가테리움(*Bacillus megaterium*), 바실러스 미코이데스(*Bacillus mycoides*), 바실러스 낫또(*Bacillus natto*)로 이루어진 군에서 선택되는 미생물을 혼합하여 배양하는 단계를 포함하는 복합미생물의 제조방법

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 각 식품에서 추출한 미생물 각각은 0.5~1.0% NaCl 함유 배양 배지에 접종시켜 15~40℃에서 24시간 동안 수조에서 진탕 배양하고, 당밀 배지를 이용하여 15~40℃로 각각 별도로 2~60일간 배양하여 사용하는 것을 특징 으로 하는 복합미생물의 제조방법

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 (1)단계는 상기 유산균 또는 효모균과, 당밀이나 설탕 및 정제수를 0.1:1:1 중량비율로 혼합하여 30~ 35℃에서 2~10일간 배양하는 것을 특징으로 하는 복합미생물의 제조방법

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 (2)단계에서는 상기(1)단계에서 배양한 미생물과 상기 비피도박테리움(Bifidobacterium)균 및 설탕과 정제수를 0.1:1:1:1로 또는 0.1:2:2:1 중량비율로 20~50℃에서 2~10일간 배양하는 것을 특징으로 하는 복합미생물의 제조방법

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 (3)단계에서는 상기(2)단계에서 배양한 복합미생물과 나이지리아의 우아바에서 추출한 미생물 및 설탕과 정제수를 0.1:1:1:1로 또는 0.1:2:2:1 중량비율로 20~50℃에서 2~10일간 배양하는 것을 특징으로 하는 복합미생물의 제조방법

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 (4)단계에서는 상기(3)단계에서 배양한 복합미생물과 일본 간장에서 추출한 미생물 및 설탕과 정제수를 0.1:1:1:1 또는 0.1:2:2:1 중량비율로 20~50℃에서 2~10일간 배양하는 것을 특징으로 하는 복합미생물의 제조방법

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 (5)단계에서는 상기(4)단계에서 배양한 복합미생물과 독일 맥주에서 추출한 미생물 및 설탕과 정제수를 0.1:1:1:1로 또는 0.1:2:2:1 중량비율로 20~50℃에서 2~10일간 배양하는 것을 특징으로 하는 복합미생물의 제조방법

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 (6)단계에서는 상기(5)단계에서 배양한 복합미생물과 발효된 무지개콩(Cowpeas)과 병아리콩(Chickpeas)으로 만들어진 발효 대두가루에서 추출한 미생물 및 설탕과 정제수를 0.1:1:1:1로 또는 0.1:2:2:1 중량비율로 20~50℃에서 2~10일간 배양하는 것을 특징으로 하는 복합미생물의 제조방법

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 (7)단계에서는 상기(6)단계에서 배양한 복합미생물과 일본의 낫또에서 추출한 미생물 및 설탕과 정제수를 0.1:1:1:1로 또는 0.1:2:2:1 중량비율로 20~50℃에서 2~10일간 배양하는 것을 특징으로 하는 복합미생물의 제조방법

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 기재된 방법에 의해 제조된 복합미생물을 포함하는 식품용 조성물

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 복합균 제조 방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 건강식품, 화장품, 비료, 식품, 약품, 환경개선제 등의 원료로 사용하기 위하여 여러 나라의 전통 식품 중 발효 과정에서 나타나는 발효 미생물들 분리 추출하여 각각 배양하고 결합시켜 다시 혼합 발효하는 복합미생물 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 박테리오신(bacteriocin)은 어떤 세균주에 의해 생산되고 다른 세균주의 활성을 나타내는 항균성 단백질로서 고온에서 활성을 유지하며 광범위한 pH에서 안정하고 무독, 무색, 무취이다. 박테리오신과 항생제의 차이점은 항생제가 2차대사 산물인데 비해 박테리오신은 자기의 유전자로부터 생합성되는 것이므로 유전자분석 및 조작을 통하여 분자적 수준에서 생산량을 최대화가 용이하고 분자적 변이를 통하여 더욱 우수한 박테리오신을 합성할 수 있다는 점이다. 항생제는 사람에게 투여시 부작용이 있다는 단점이 있으나 박테리오신은 인체에 섭취되면 단백질 가수분해효소에 의해 분해되므로 인체에 무독하고 잔류성이 없다는 이유로 식품 등의 생물학적 보존제(biopreservative) 및 발효식품의 생물제어제(bioregulator)로서 이용이 증대되고 있다.

[0003] 천연 단백질인 박테리오신은 식품에 있어서 최소의 열처리와 저온 유통으로 안정성을 확보할 수 있는 수단으로 인식되고 있으며 발효유, 발효 알콜 음료의 저장성 향상, 통조림 제품의 저장성 향상, 냉장 및 냉동 제품의 저장성 향상, 고추장, 된장, 두부, 유산균 발효 제품 등의 저장성 향상, 전통 식품(김치, 약주, 탁주 등)의 산패 및 변질 방지, 어패류의 신선도 유지, 과일 및 야채류의 저장성 향상에 응용할 수 있다. 또한 박테리오신의 응용으로 인한 기대 효과는 신선 식품의 저장성 향상과 화학 보존제에 대한 소비자 불안감 해소, 가축 질병 예방으로 생산성 향상, 고품질 신제품 개발이 가능하게 된다는 것이다.

[0004] 전통 발효 식품으로부터 분리 동정되어 장질환 치료용 조성물 및 면역 증강용 조성물로 사용되는 락토바실러스 플란타룸 CJLP243(Lactobacillus plantarum CJLP243)이 신규한 균주로 특허문헌 1에 보고되었고, 특허문헌 2에는 콩 발효물을 유효성분으로 하는 김치 유산균 락토바실러스 플랜타룸(Lactobacillus plantarum), 류코노스톡 김치아이(Leuconostoc kimchii), 류코노스톡 시트레움(Leuconostoc citreum), 류코노스톡 메센테로이드스(Leuconostoc mesenteroides) 및 락토바실러스 사케이(Lactobacillus sakei)이 등이 제시되어 있다.

[0005] 특허문헌 3에는 박테리오신을 생산하여 유해 미생물의 생육을 억제하며 식품, 의약품, 생활용품에 광범위하게 사용될 수 있는 새로운 락토코커스속(Lactococcus sp.) 락토바실러스 델부루에키(Lactobacillus delbrueckii IFO 3202), 락토바실러스 퍼멘텀(Lactobacillus fermentum IFO 3023), 락토바실러스 락티스 서브스피시스 락티스(Lactobacillus lactis subsp. lactis ML3), 류코노스톡 메센테로이드스(Leuconostoc mesenteroides KFCC 11324), 대장균(Escherichia coli A2), 슈도모나스 플루오레스센스(Pseudomonas fluorescence), 스타필로코커스 오레우스(Staphylococcus aureus), 스타필로코커스 에피더미디스(Staphylococcus epidermidis KFCC 35494), 리스테리아 모노사이토게네스(Listeria monocytogenes ATCC 15313), 리스테리아 모노사이토게네스(Listeria monocytogenes ATCC 35152) 등의 유산균이 제시되어 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0006] (특허문헌 0001) 1. 한국공개특허 제2011-0046020호
- (특허문헌 0002) 2. 한국등록특허 제1014872호
- (특허문헌 0003) 3. 한국등록특허 제0123946호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 그리스 및 불가리아의 요구르트, 나이지리아의 우아바(Uaba), 일본의 낫또(nattou), 중국의 인야와 마이타우자(Inya, meitauza), 인도네시아의 케캡(kecap), 인도의 와리스(waries), 유럽의 오타지(ottage), 퀴크(quark), 체다 치즈 및 버터, 포도주, 맥주, 터키의 라키 및 아이란, 독일의 사우어크라우트(sauerkraut),

태국의 투 아나오(to anao) 등 세계 여러 나라의 전통발효 식품에서 미생물을 추출하여 각각 배양한 후 혼합 발효하여 장내 박테리옴을 촉진시킬 수 있는 복합미생물을 제조하고자 한다.

[0008] 또한, 복합미생물로 하여금 장내에 박테리옴을 활성화시켜 장내의 유해균과 해바라기균을 유인균으로 유도시키는 미생물에 대한 제조방법을 제공하고자 한다.

[0009] 또한, 본 발명은 발효 식품 속에 있는 미생물들을 결합시켜 제조된 복합미생물을 약품, 식품, 건강식품, 화장품, 비료, 환경개선제 등의 원료로 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기의 해결하고자 하는 과제를 위한 본 발명에 따른 복합미생물의 제조방법은, (1) 그리스 및 불가리의 요구르트, 유럽의 오타지 치즈 및 버터에서 추출한 유산균인 락토코쿠수 락티스 서브스피시스 락티스(Lactococcus lactis subsp lactis), 락토코쿠수 락티스 서브스피시스 크레모리스(Lactococcus lacits subsp cremoris), 페니실름 카넨베르티아이(Penicillium canenbertii), 가이트리첼 칸디덤(Geitrichum candidum), 브레비박테리움 린넨스(Brevibacterium linens)와 효모균인 클로엑케라 아피쿨라타(Kloeckera apiculata), 삭차로미세스 로세이(Saccharomyces rosei), 쉬조삭차로미세스 폼베(Schizosaccharomyces pombe), 한세니아스포라 우바럼 칸디다 스텔라타(Hanseniaspora uvarum candida stellata), 삭차로미세스(Saccharomyces)로 이루어진 균에서 선택된 미생물을 배양하는 단계, (2) 상기 (1)단계에서 배양한 미생물과 요구르트에서 추출한, 비피덤(B. bifidum), 롱검(B. longum), 브리브(B. breve), 아돌레센티스(B. adolescentis)로 이루어진 균에서 선택되는 비피도박테리움(Bifidobacterium)균을 혼합하여 배양하는 단계, (3) 상기 (2)단계에서 배양된 미생물과 나이지리아 우아바에서 추출한, 바실러스 서브틸리스(Bacillus subtilis), 마이크로코쿠스 루테우스(Micrococcus luteus), 마이크로코쿠스 로세우스(Micrococcus roseus), 바실러스 리체니포르미스(Bacillus licheniformis), 류코노스톡 메센테로이데스(Leuconostoc mesenteroides), 바실러스 세레우스 바르(Bacillus cereus var), 바실러스 미코이데스(Bacillus mycoides), 바실러스 서큐란스(Bacillus circulans), 바실러스 마서란스(Bacillus macerans)로 이루어진 균에서 선택되는 미생물을 혼합하여 배양하는 단계, (4) 상기 (3)단계에서 배양된 미생물과 일본 간장에서 추출한, 바실러스 서브틸리스 코지(Bacillus subtilis Koji), 페르길러스 오리자에(Pergillus oryzae), 아스페르길러스 소자에(Aspergillus sojae), 바실러스 서브틸리스(Bacillus subtilis), 페디코쿠스 할로코쿠스(Pediococcus halococcus), 지고삭차로미세스 마조르(Zygosaccharomyces major), 지고삭차로미세스 소야(Zygosaccharomyces soya), 토루롭시스 사케(Torulopsis sake), 칸디다 펠리쿨로사(Candida pelliculosa), 삭로옥시(Sacch. rouxxi), 삭 로세이(Sacch. rosei), 삭 페르멘타티(Sacch. fermentati), 삭 멜리스(Sacch. mellis), 삭 파스토리(Sacch. pastori), 한세놀라 아모날라(Hansenula amonala)로 이루어진 균에서 선택되는 미생물을 혼합하여 배양하는 단계, (5) 상기 (4)단계에서 배양된 미생물과 독일 맥주에서 추출한, 클로엑케라 아피쿨라타(Kloeckera apiculata), 삭차로미세스 로세이(Saccharomyces rosei), 쉬조삭차로미세스 폼베(Schizosaccharomyces pombe), 한세니아스포라 우바럼(Hanseniaspora uvarum), 칸디다 스텔라타(Candida stellata)로 이루어진 균에서 선택되는 미생물을 혼합하여 배양하는 단계, (6) 상기 (5)단계에서 배양된 미생물과 발효된 무지개콩(Cowpeas)과 병아리콩(Chickpeas)으로 만들어진 발효 대두가루에서 추출한, 락토바실러스 카세이(Lactobacillus casei), 락토바실러스 라이치만아이(Lactobacillus leichmanii), 락토바실러스 플란타람(Lactobacillus plantaram), 페디코쿠수 펜토사세우스(Pediococcus pentosaceus), 페디코쿠스 에시디락티시(Pediococcus acidilactici)로 이루어진 균에서 선택되는 미생물을 혼합하여 배양하는 단계, 및 (7) 상기 (6)단계에서 배양된 미생물과 일본 낫또에서 추출한, 바실러스 서브틸리스(Bacillus subtilis), 바실러스 세레우스(Bacillus cereus), 바실러스 메가테리움(Bacillus megaterium), 바실러스 미코이데스(Bacillus mycoides), 바실러스 낫또(Bacillus natto)로 이루어진 균에서 선택되는 미생물을 혼합하여 배양하는 단계를 포함한다.

본 발명에서 상기 각 식품에서 추출한 미생물 각각은 0.5~1.0% NaCl 함유 배양 배지에 접종시켜 15~40℃에서 24시간 동안 수조에서 진탕 배양하고, 당밀 배지를 이용하여 15~40℃로 각각 별도로 2~60일간 배양하여 사용한다.

[0011] 삭제

[0012] 삭제

- [0013] 삭제
- [0014] 삭제
- [0015] 삭제
- [0016] 삭제
- [0017] 삭제
- [0018] 삭제
- [0019] 본 발명의 일실시예로서, 상기 (1)단계는 상기 유산균 또는 효모균과, 당밀이나 설탕 및 정제수를 0.1:1:1 중량 비율로 혼합하여 30~ 35℃에서 2~10일간 배양하는 것을 특징으로 한다.
- [0020] 본 발명의 일실시예로서, 상기 (2)단계에서는 상기(1)단계에서 배양한 미생물과 상기 비피도박테리움 (Bifidobacterium)균 및 설탕과 정제수를 0.1:1:1:1로 또는 0.1:2:2:1 중량비율로 20~50℃에서 2~10일간 배양 하는 것을 특징으로 한다.
- [0021] 본 발명의 일실시예로서, 상기 (3)단계에서는 상기(2)단계에서 배양한 복합미생물과 나이지리아의 우아바에서 추출한 미생물 및 설탕과 정제수를 0.1:1:1:1로 또는 0.1:2:2:1 중량비율로 20~50℃에서 2~10일간 배양하는 것 을 특징으로 한다.
- [0022] 본 발명의 일실시예로서, 상기 (4)단계에서는 상기(3)단계에서 배양한 복합미생물과 일본 간장에서 추출한 미생 물 및 설탕과 정제수를 0.1:1:1:1 또는 0.1:2:2:1 중량비율로 20~50℃에서 2~10일간 배양하는 것을 특징으로 한 다.
- [0023] 본 발명의 일실시예로서, 상기 (5)단계에서는 상기(4)단계에서 배양한 복합미생물과 독일 맥주에서 추출한 미생 물 및 설탕과 정제수를 0.1:1:1:1로 또는 0.1:2:2:1 중량비율로 20~50℃에서 2~10일간 배양하는 것을 특징으로 한다.
- [0024] 본 발명의 일실시예로서, 상기 (6)단계에서는 상기(5)단계에서 배양한 복합미생물과 발효된 무지개콩(Cowpeas) 과 병아리콩(Chickpeas)으로 만들어진 발효 대두가루에서 추출한 미생물 및 설탕과 정제수를 0.1:1:1:1로 또는 0.1:2:2:1 중량비율로 20~50℃에서 2~10일간 배양하는 것을 특징으로 한다.
- [0025] 본 발명의 일실시예로서, 상기 (7)단계에서는 상기(6)단계에서 배양한 복합미생물과 일본의 낫또에서 추출한 미 생물 및 설탕과 정제수를 0.1:1:1:1로 또는 0.1:2:2:1 중량비율로 20~50℃에서 2~10일간 배양하는 것을 특징으 로 한다.
- [0026] 본 발명은 또한 상기 기재된 방법에 의해 제조된 복합미생물을 포함하는 식품용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0027] 본 발명에 따른 복합미생물의 효과는 우리 몸의 장에서 미생물의 박테리오파지(bacteriophage)와 박테리오신 (bacteriocin)의 역할을 더욱 강화시키고 유해 미생물들의 활동을 억제시킨다.
- [0028] 또한, 장내에 박테리오신을 활성화시켜 장내의 유해균과 해바라기균을 유인균으로 유도시켜 면역능력을 향상시 키고 장내의 균을 장내의 각종 발암성 물질을 해독시키는 정화능력을 갖도록 유인균으로 전환시키는 효과가 있 다.

도면의 간단한 설명

- [0029] 도 1은 유인균을 이용한 복합 병원성균인 대장균, 살모넬라균, 녹농균의 억제 사진
- 도 2는 복합 미생물 결합 사진
- 도 3은 유인균 복합균에 의한 유산균, 효모, 바실러스 등의 활성 사진

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0030] 이하, 본 발명에 따른 바람직한 실시예로서, 세계 여러 나라의 전통발효 식품에서 미생물을 추출하여 각각 배양한 후 혼합 발효하여 복합미생물을 만들어 사람의 장내에 박테리오신을 활성화시켜 장내의 유해균과 해바라기균을 유인균으로 유도시키는 복합미생물에 대한 제조방법을 설명한다.
- [0031] 세계 여러 나라의 전통발효 식품은 그리스 및 불가리의 요구르트, 나이지리아의 우아바(Uaba), 일본의 낫또(nattou), 중국의 인야와 마이타우자(Inya, meitauza), 인도네시아의 케캡(kecap), 인도의 와리스(waries), 유럽의 오타지(ottage), 퀴크(quark), 체다 치즈 및 버터, 포도주, 맥주, 터키의 라키 및 아이란, 독일의 사우어크라우트(sauerkraut), 태국의 투 아나오(to anao) 등을 가리키며 유산균, 효모균, 고초균 및 납두균을 함유하고 있다.
- [0032] 그리스 및 불가리의 요구르트, 유럽의 오타지 치즈 및 버터에 있는 미생물인 락토코쿠수 락티스 서브스피시스 락티스(Lactococcus lactis subsp lactis), 락토코쿠수 락티스 서브스피시스 크레모리스(Lactococcus lacits subsp cremoris), 페니실룸 카넨베르티아이(Penicillium canenbertii), 가이트리침 칸디덤(Geitrichum candidum), 브레비박테리움 린넨스(Brevibacterium linens), 클로엑케라 아피쿨라타(Kloeckera apiculata), 삭차로미세스 로세이(Saccharomyces rosei), 쉬조삭차로미세스 폼베(Schizosaccharomyces pombe), 한세니아스포라 우바림 칸디다 스텔라타(Hanseniaspora uvarum candida stellata), 삭차로미세스(Saccharomyces)를 추출한다.
- [0033] 나이지리아의 우아바에서 바실러스 서브틸리스(Bacillus subtilis), 마이크로코쿠스 루테우스(Micrococcus luteus), 마이크로코쿠스 로세우스(Micrococcus roseus), 바실러스 리체니포르미스(Bacillus licheniformis), 류코노스톡 메센테로이데스(Leuconostoc mesenteroides), 바실러스 세레우스 바르(Bacillus cereus var), 바실러스 미코이데스(Bacillus mycoides), 바실러스 서큐란스(Bacillus circulans), 바실러스 마서란스(Bacillus maceransm)을 추출한다.
- [0034] 또한 먹는 수프와 칩에 들어가는 대두 발효가루는 발효된 무지개콩(Cowpeas)과 병아리콩(Chickpeas)으로 만들어진다. 여기에서 락토바실러스 카세이(Lactobacillus casei), 락토바실러스 라이치만아이(Lactobacillus leichmanii), 락토바실러스 플란타람(Lactobacillus plantaram), 페디코쿠수 펜토사세우스(Pediococcus pentosaceus), 페디코쿠스 에시디락티시(Pediococcus acidilactici)를 추출한다.
- [0035] 일본의 낫또에서 추출한 미생물인 바실러스 서브틸리스(Bacillus subtilis), 바실러스 세레우스(Bacillus cereus), 바실러스 메가테리움(Bacillus megaterium), 바실러스 미코이데스(Bacillus mycoides), 바실러스 낫또(Bacillus natto)를 추출하고, 일본 간장에서 추출한 바실러스 서브틸리스 코지(Bacillus subtilis Koji)균을 포함한 페르길러스 오리자에(Pergillus oryzae), 아스페르길러스 소자에(Aspergillus sojae), 바실러스 서브틸리스(Bacillus subtilis), 페디코쿠스 할로코쿠스(Pediococcus halococcus), 지고삭차로미세스 마조르(Zygosaccharomyces major), 지고삭차로미세스 소야(Zygosaccharomyces soya), 토루롭시스 사케(Torulopsis sake), 칸디다 펠리쿨로사(Candida pelliculosa), 삭 로옥시(Sacch. rouxxi), 삭 로세이(Sacch. rosei), 삭 페르멘타티(Sacch. fermentati), 삭 멜리스(Sacch. mellis), 삭 파스토리(Sacch. pastori), 한세놀라 아모날라(Hansenula amonala)를 추출한다.
- [0036] 독일 맥주에서 효모균인 삭차로미세스 세레비시에(Saccharomyces cerevisiae), 삭차로미세스 엘립소이두스(Saccharomyces ellipsoideus), 한세니아스포라 우바림(Hanseniaspora uvarum), 클로엑케라 아피쿨라타(Kloeckera apiculata), 삭차로미세스 체발리에리(Saccharomyces chevalieri), 칸디다 스텔라타(Candida stellata), 삭차로미세스 오비포미스/마야너스(Saccharomyces oviformis/bayanus), 삭차로미세스 로세이(Saccharomyces rosei), 쉬조삭차로미세스 폼베(Schizosaccharomyces pombe)를 추출한다.
- [0037] 여러 나라의 요구르트나 동물의 장내에서 비피도박테리움(Bifidobacterium)균 중 비피덤(B. bifidum), 롱검(B. longum), 브리브(B. breve), 아돌레센티스(B. adolescentis)를 추출한다.
- [0038] 그 외 여러 나라의 전통 발효 식품에서 바실러스 서브틸리스(Bacillus subtilis), 바실러스 세레우스(Bacillus

cereus), 바실러스 메가테리움(Bacillus megaterium), 바실러스 마서란슴(Bacillus macerans), 수도모나스 아에루기노사(pseudomonas aeruginosa), 수도모나스 푸토다(Pseudomona putoda), 마이크로코쿠스 루테우스(Micrococcus luteus) 등의 다양한 미생물을 추출할 수 있다.

[0039] 각각의 미생물 접종 시 잡균의 생장을 억제하기 위해 120℃ 이상에서 90분 동안 멸균하는 방법을 사용해도 좋다. 본 발명은 미생물을 결합하여 만드는 복합균 조성물로부터 발효 시간을 20~40℃에서 2~4일 발효하는 것이 좋으며, 가장 바람직하게는 35℃에서 48시간 발효하는 것이 좋다.

실시예 1

[0040] **미생물의 동정**

[0041] 미생물이 함유된 그리스 요구르트를 50℃에서 40분동안 열처리를 한 후 시료 1g을 취하여 0.8 NaCl 9ml를 현탁한 후 1/10~1/10⁸로 희석한다. 각각의 희석 현탁액을 200μl를 MRS배지에 도말아 42℃에서 배양하여 복합균을 배양하였다. 상기 복합미생물 분리 동정결과 락토바실러스 카세이(Lactobacillus casei), 락토바실러스 에시도필러스(Lactobacillus acidophilus), 불가리쿠스(bulgaricus), 스트렙토코쿠스(Streptococcus), 비피도박테리아(Bifidobacteria) 등으로 구성되어 있음을 알 수 있었다.

실시예 2

[0042] **1. 유산균 및 효모균 배양**

[0043] 그리스 및 불가리의 요구르트, 유럽의 오타지 치즈 및 버터에서 추출한 유산균인 락토코쿠수 락티스 서브스피시스 락티스(Lactococcus lactis subsp lactis), 락토코쿠수 락티스 서브스피시스 크레모리스(Lactococcus lacits subsp cremoris), 페니실룸 카넬베르티아이(Penicillium canenbertii), 가이트리침 칸디덤(Geitrichum candidum), 브레비박테리움 린넨스(Brevibacterium linens)와 효모균인 클로엑케라 아피쿨라타(Kloeckera apiculata), 삭차로미세스 로세이(Saccharomyces rosei), 쉬조삭차로미세스 폼베(Schizosaccharomyces pombe), 한세니아스포라 우바럼 칸디다 스텔라타(Hanseniaspora uvarum candida stellata), 삭차로미세스(Saccharomyces)를 멸균된 배지에 접종하여 종균을 배양한다. 이때 배지의 가열 멸균은 121℃에서 15분 이상 하는 것이 좋다. 유산균의 접종량은 1×10⁵ cfu/ml 이상, 효모균의 접종량 1×10⁶ cfu/ml 이상 되게 하고 배양 온도는 25~35℃, 배양시간은 24~48시간 배지는 유산균은 MRS배지를 효모균은 YM배지를 사용하는 것이 바람직하다.

[0044] 독일 맥주에서 추출한 효모균인 클로엑케라 아피쿨라타(Kloeckera apiculata), 삭차로미세스 로세이(Saccharomyces rosei), 쉬조삭차로미세스 폼베(Schizosaccharomyces pombe), 한세니아스포라 우바럼(Hanseniaspora uvarum), 칸디다 스텔라타(Candida stellata)를 각각 6×10⁵ cfu/ml 되게 접종하여 48시간 배양하여 5종균을 제조한다. 이때 YM 배지를 121℃에서 21분간 멸균한다.

[0045] **2. 비피더스균 및 구균 배양**

[0046] 요구르트에서 추출한 비피도박테리움(Bifidobacterium)균 중 비피덤(B. bifidum), 롱검(B. longum), 브리브(B. breve), 아돌레센티스(B. adolescentis)와 나이지리아 우아바에서 추출한 마이크로코쿠스 루테우스(Micrococcus luteus), 마이크로코쿠스 로세우스(Micrococcus roseus), 바실러스 리체니포르미스(Bacillus licheniformis), 류코노스톡 메센테로이테스(Leuconostoc mesenteroides), 바실러스 서큐란스(Bacillus circulans)를 접종하여 종균을 배양한다. 비피도박테리움 접종량은 2×10⁴ cfu/ml 과 마이크로코쿠스 루테우스의 접종량 2×10⁴ cfu/ml 이상 되게 하고 배양 온도는 25~35℃, 배양시간은 24~48시간 배지는 BS한천배지를 사용하는 것이 바람직하다. 이때 배지의 가열 멸균은 121℃에서 15분이상 하는 것이 좋다.

실시예 3

[0047] **복합미생물의 제조**

[0048] (1) 그리스 및 불가리의 요구르트, 유럽의 오타지 치즈 및 버터에서 추출한 유산균인 락토코쿠수 락티스 서브스피시스 락티스(Lactococcus lactis subsp lactis), 락토코쿠수 락티스 서브스피시스 크레모리스(Lactococcus lacits subsp cremoris), 페니실룸 카넬베르티아이(Penicillium canenbertii), 가이트리침 칸디덤(Geitrichum candidum), 브레비박테리움 린넨스(Brevibacterium linens)와 효모균인 클로엑케라 아피쿨라타(Kloeckera apiculata), 삭차로미세스 로세이(Saccharomyces rosei), 쉬조삭차로미세스 폼베(Schizosaccharomyces pombe),

한세니아스포라 우바럼 칸디다 스텔라타(Hanseniaspora uvarum candida stellata), 삭차로미세스(Saccharomyces)로 이루어진 군에서 선택된 균과 당밀이나 설탕 및 pH가 5.0 이하가 되는 정제수를 0.1:1:1 중량비율로 혼합하여 30~ 35℃에서 2~10일간 배양한다.

[0049] (2) 상기(1)단계에서 배양한 미생물과 요구르트나 동물의 장내에서 추출한 비피도박테리움(Bifidobacterium)군 중에서 비피둠(B. bifidum), 롱검(B. longum), 브리브(B. breve), 아돌레센티스(B. adolescentis)로 이루어진 군에서 선택되는 균 및 설탕과 pH가 5.0 이하가 되는 정제수를 0.1:1:1:1로 또는 0.1:2:2:1 중량비율로 20~50℃에서 2~10일간 배양한다.

[0050] (3) 상기(2)단계에서 배양한 복합미생물과 나이지리아의 우아바에서 추출한 바실러스 서브틸리스(Bacillus subtilis), 마이크로코쿠스 루테우스(Micrococcus luteus), 마이크로코쿠스 로세우스(Micrococcus roseus), 바실러스 리첸리포르미스(Bacillus licheniformis), 류코노스톡 메센테로이데스(Leuconostoc mesenteroides), 바실러스 세레우스 바르(Bacillus cereus var), 바실러스 미코이데스(Bacillus mycoides), 바실러스 서큐란스(Bacillus circulans), 바실러스 마서란슴(Bacillus macerans)로 이루어진 군에서 선택되는 균 및 설탕과 pH가 5.0 이하가 되는 정제수를 0.1:1:1:1로 또는 0.1:2:2:1 중량비율로 20~50℃에서 2~10일간 배양한다.

[0051] (4) 상기(3)단계에서 배양한 복합미생물과 일본 간장에서 추출한 바실러스 서브틸리스 코지(Bacillus subtilis Koji), 페르길러스 오리자에(Pergillus oryzae), 아스페르길러스 소자에(Aspergillus sojae), 바실러스 서브틸리스(Bacillus subtilis), 페디코쿠스 할로코쿠스(Pediococcus halococcus), 지고삭차로미세스 마조르(Zygosaccharomyces major), 지고삭차로미세스 소야(Zygosaccharomyces soya), 토루롭시스 사케(Torulopsis sake), 칸디다 펠리쿨로사(Candida pelliculosa), 삭 로옥시(Sacch. rouxxi), 삭 로세이(Sacch. rosei), 삭 페르멘타티(Sacch. fermentati), 삭 멜리스(Sacch. mellis), 삭 파스토리(Sacch. pastori), 한세놀라 아모날라(Hansenula amonala)로 이루어진 군에서 선택되는 균 및 설탕과 pH가 5.0 이하가 되는 정제수에 0.1:1:1:1 또는 0.1:2:2:1로 20~50℃에서 2~10일간 배양한다.

[0052] (5) 상기(4)단계에서 배양한 복합미생물과 독일 맥주에서 추출한 클로엑케라 아피쿨라타(Kloeckera apiculata), 삭차로미세스 로세이(Saccharomyces rosei), 쉬조삭차로미세스 폼베(Schizosaccharomyces pombe), 한세니아스포라 우바럼(Hanseniaspora uvarum), 칸디다 스텔라타(Candida stellata)로 이루어진 군에서 선택되는 균 및 설탕과 pH가 5.0 이하가 되는 정제수를 0.1:1:1:1로 또는 0.1:2:2:1 중량비율로 20~50℃에서 2~10일간 배양한다.

[0053] (6) 상기(5)단계에서 배양한 복합미생물과 발효된 무지개콩(Cowpeas)과 병아리콩(Chickpeas)로 만들어진 발효 대두가루에서 추출한 락토바실러스 카세이(Lactobacillus casei), 락토바실러스 라이치만아이(Lactobacillus leichmanii), 락토바실러스 플란타람(Lactobacillus plantaram), 페디코쿠스 펜토사세우스(Pediococcus pentosaceus), 페디코쿠스 에시디락티시(Pediococcus acidilactici)로 이루어진 군에서 선택되는 균 및 설탕과 pH가 5.0 이하가 되는 정제수를 0.1:1:1:1로 또는 0.1:2:2:1 중량비율로 20~50℃에서 2~10일간 배양한다.

[0054] (7) 상기(6)단계에서 배양한 복합미생물과 일본의 낫또에서 추출한 바실러스 서브틸리스(Bacillus subtilis), 바실러스 세레우스(Bacillus cereus), 바실러스 메가테리움(Bacillus megaterium), 바실러스 미코이데스(Bacillus mycoides), 바실러스 낫또(Bacillus natto)로 이루어진 군에서 선택되는 균 및 설탕과 pH가 5.0 이하가 되는 정제수를 0.1:1:1:1로 또는 0.1:2:2:1 중량비율로 20~50℃에서 2~10일간 배양한다.

실시예 4

[0055] **복합균 제제의 제조**

[0056] 상기 실시예 3에서 배양한 복합 미생물 1kg 당밀 1kg 또는 설탕 1kg 정제수 1kg 을 혼합하며 35℃를 유지하며 1개월마다 4회 반복적으로 배양하여 복합 미생물 액제를 제조한다. 상기 복합 미생물의 액제의 총 균수는 5.8 × 10⁹ cfu/g 정도이다.

[0057] **[실험예 1]**

[0058] **박테리옌 생성 가능한 활성 측정**

[0059] 1. 세계 여러 발효 식품에서 추출바실러스 서브틸리스(Bacillus subtilis), 바실러스 세레우스(Bacillus cereus), 바실러스 메가테리움(Bacillus megaterium), 바실러스 마서란슴(Bacillus macerans), 수도모나스 아에루기노사(pseudomonas aeruginosa), 수도모나스 푸토다(Pseudomonsa putoda), 마이크로코쿠스 루테우스

(*Micrococcus luteus*)를 비교예로 사용한다.

[0060] 2. 박테리오신 활성 측정방법인 스폿온론(spot-on-lawn)방법을 이용하여 할로(halo)가 형성되는 것을 분석하였다.

[0061] 시험 방법은 시험균 10^7 cell 을 포함한 075% sofe TSA 4ml를 1.5% TSA에 분주한다. 연한 TAS가 굳으면 균주를 미상 액체 배지에 30℃, 35시간 배양한 배양액을 6,500rpm으로 4℃, 20분간 원심분리하여 상등액을 0.45 μm 셀룰로스 아세테이트 필터(Cellulose acetate syringe filter)로 여과하여 제균한 배양액을 검정용 여지에 100ul 를 흡수시켜 35~38℃에서 13시간 후 할로를 관찰한다. 활성도는 박테리오신을 2배씩 희석하여 계산하여 결과를 3회 반복하여 표 1에 나타내었다.

표 1

organism	Inchbation temp	Inhibition zone diameter (mm)	Spot-on lawn method
			Inhibition
<i>pseudomonas aeruginosa</i>	38℃	25	+(20mm)
<i>Pseudomonsa putoda</i>	37℃	20	+(14mm)
<i>Bacillus subtilis</i>	31℃		+(29mm)
<i>Bacillus macerans</i>	31℃		
<i>Bacillus cereus</i>	31℃	12	+(20mm)
<i>Bacillus megaterium</i>	31℃	14	+
<i>B. bifidum</i>	31℃		+(27mm)
<i>B. adolescentis</i>	31℃	14	+(12mm)
<i>Micrococous luteus</i>	30℃	10	+(10mm)

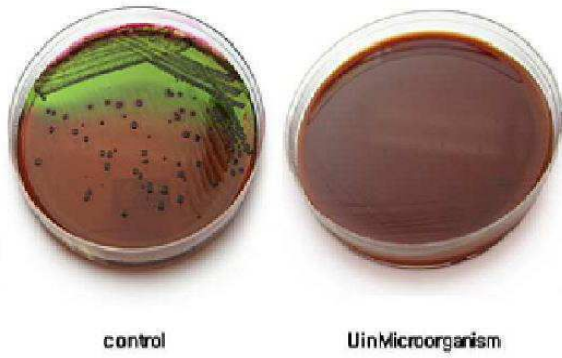
[0063] 표 1의 결과에서 바실러스 메가테리움(*Bacillus megaterium*)을 제외하고 항균력을 보이며 항균 활성이 높음을 알 수 있다. 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)는 항균 활성이 가장 높게 나타났으며, 비피덤(*B. bifidum*) 또한 큰 항균 활성을 나타내었다.

[0064] 도 1은 본 발명에서 제조한 복합미생물의 항균 효과를 보여주는 사진으로서, 복합 병원균인 대장균, 살모넬라균, 녹농균의 상태(control)와 본 발명에 의한 복합미생물을 투여하여 복합 병원균이 억제된 상태(unmicroorganism)을 보여준다.

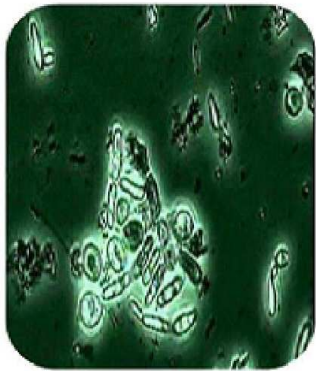
[0065] 도 2는 본 발명에 따른 복합미생물의 사진이고, 도 3은 본 발명에 따른 복합미생물에 의하여 유인균에 의한 유산균, 효모, 바실러스 등의 활성 사진을 보여 준다. 도 3에서 유인균의 초기 상태(control)와 본 발명에 의한 복합미생물을 투여하여 유인균이 활성화된 상태(unmicroorganism)을 보여준다.

도면

도면1



도면2



도면3

