



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년06월22일
 (11) 등록번호 10-1869498
 (24) 등록일자 2018년06월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 A61K 35/74 (2015.01) A61P 31/00 (2006.01)
 A61P 31/04 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2013-7029635
 (22) 출원일자(국제) 2013년04월09일
 심사청구일자 2017년03월09일
 (85) 번역문제출일자 2013년11월07일
 (65) 공개번호 10-2014-0026468
 (43) 공개일자 2014년03월05일
 (86) 국제출원번호 PCT/EP2012/056384
 (87) 국제공개번호 WO 2012/136830
 국제공개일자 2012년10월11일
 (30) 우선권주장
 11161609.0 2011년04월08일
 유럽특허청(EPO)(EP)
 (56) 선행기술조사문헌
 Int J Food Sci Technol. 44. pp.1916-1926.
 (2009)*
 EP00852114 B1*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
 시에이치알. 한센 에이/에스
 덴마크 디케이-2970 호르솔름 보게 알레 10-12
 (72) 발명자
 호른바엑 티나
 덴마크 디케이-3460 비르케뢰드 뢰브저그 6
 리스베르그 마이케
 덴마크 디케이-3060 에스페르가에르드 니 스트란
 트베즈 21
 디에메르 실자 케즈
 덴마크 디케이-2000 프레데릭스베르그 1. 티에이
 치 프리오르베즈 8
 (74) 대리인
 박장원

전체 청구항 수 : 총 12 항

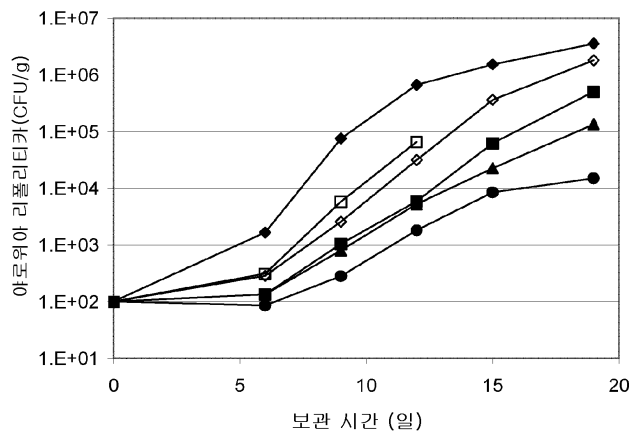
심사관 : 윤동준

(54) 발명의 명칭 **시너지적 항균 효과**

(57) 요약

본 발명은 생물학적 방어 (bioprotection) 분야에 관한 것으로서, 특히 락토바실러스 람노서스 (*Lactobacillus rhamnosus*) 균주 및/또는 락토바실러스 파라카세이 (*Lactobacillus paracasei*) 균주를 포함하는 항균 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 이러한 항균 조성물의 용도, 이러한 항균 조성물을 포함하는 식품, 먹이 및 약학적 제품, 이러한 식품, 먹이 및 약학적 제품을 제조하는 방법과 이러한 식품, 먹이 및 약학적 제품에서 원치않는 미생물 함량을 저감시키는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도2



명세서

청구범위

청구항 1

하나 이상의 락토바실러스 람노시스 (*Lactobacillus rhamnosus*) 균주 및 하나 이상의 락토바실러스 파라카세이 (*Lactobacillus paracasei*) 균주를 포함하는 향균 조성물로서,

상기 하나 이상의 락토바실러스 람노시스 균주는 수탁번호 DSM24616의 락토바실러스 람노시스 CHCC12697, 및 수탁번호 DSM246252의 락토바실러스 람노시스 CHCC14226로 이루어지는 군으로부터 선택되고; 상기 하나 이상의 락토바실러스 파라카세이 균주는 수탁번호 DSM24651의 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777인 것인 향균 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서, 식품, 먹이 또는 약학적 제품의 제조를 위한 것인 향균 조성물.

청구항 6

제1항에 기재된 향균 조성물을 포함하는 식제품.

청구항 7

제1항에 기재된 향균 조성물을 포함하는, 향균 약학적 제품.

청구항 8

제6항에 있어서, 과일 및 과일 파생 제품, 야채 및 야채 파생 제품, 곡물 및 곡물 파생 제품, 낙농 제품, 육류, 가금류, 해산물 및 이들의 혼합물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것인 식제품.

청구항 9

제7항에 있어서, 단위투여형인 것인 향균 약학적 제품.

청구항 10

제1항에 기재된 향균 조성물을 첨가하는 단계를 포함하는 식제품을 제조하는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

(a) 상기 향균 조성물을, 하나 이상의 락토바실러스 람노시스 균주의 농도 및 하나 이상의 락토바실러스 파라카세이 균주의 농도가 각각 상기 식제품의 1×10^6 cfu/g 이상이거나 1×10^6 cfu/ml 이상, 또는 상기 식제품 표면의 1×10^5 cfu/cm² 이상이 되도록 첨가하는 단계, 및

(b) 상기 제조 중에, 상기 하나 이상의 락토바실러스 람노시스 균주의 농도 및 상기 하나 이상의 락토바실러스 파라카세이 균주의 농도가 증가하거나 일정하게 유지되도록 제조 파라미터를 제어하는 단계를 포함하는 것인 방

법.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 방법은 하나 이상의 발효 단계들을 포함하는 것인 방법.

청구항 13

독일생물자원센터 (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, DSMZ)에 수탁번호 DSM24616으로 기탁된 락토바실러스 람노서스 CHCC12697 균주.

청구항 14

독일생물자원센터 (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, DSMZ)에 수탁번호 DSM24652로 기탁된 락토바실러스 람노서스 CHCC14226 균주.

청구항 15

독일생물자원센터 (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, DSMZ)에 수탁번호 DSM24651로 기탁된 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777 균주.

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 생물학적 방어 (bioprotection) 분야에 관한 것으로서, 특히 락토바실러스 람노서스 (*Lactobacillus rhamnosus*) 균주 및/또는 락토바실러스 파라카세이 (*Lactobacillus paracasei*) 균주를 포함하는 향균 조성물에

[0001]

관한 것이다. 또한, 본 발명은 이러한 항균 조성물의 용도, 이러한 항균 조성물을 포함하는 식품, 먹이 및 약학적 제품, 이러한 식품, 먹이 및 약학적 제품을 제조하는 방법과 이러한 식품, 먹이 및 약학적 제품에서 원치 않는 미생물 함량을 저감시키는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 생물학적 방어 배양체들은 여러 가지 식품에 적용함에 있어서 화학적 보존제에 대한 대안으로서 사용된다. 낙농 제품에 있어서, 효모 및 곰팡이에 의한 오염은 그 낙농 제품의 유통 기한을 제한할 수 있다. 효모 및 곰팡이 오염 문제가 심각한 한 가지 제품 분야로는 생치즈를 들 수 있다.
- [0003] 이러한 문제점들을 극복하기 위한 생물학적 방어 해법이 낙농 산업 분야에서 개발되어 왔다. 시장에서 가장 잘 알려지고 아마도 가장 통상적으로 사용되는 항진균 생물학적 방어 해법들 중 몇 가지는 Danisco의 HOLDBAC™ YM-b 및 HOLDBAC™ YM-C 배양체들이고, 이들은 양자 모두가 프로피오니박테리아 (*Propionibacteria*) 및 락토바실러스 (*Lactobacillus*)의 아종의 조합을 함유한다.
- [0004] 미생물의 저해를 위하여 프로피온산 박테리아를 젖산 박테리아와 함께 사용하는 것은 특허 출원 US 2005/0095318 및 WO 2004/041305에 개시되어 있다.
- [0005] 프로피오니박테리아 아종 (*Propionibacteria ssp.*)은 주요하게는 프로피온산의 생성을 통하여 뿐 아니라 아세트산 및 기타 대사물질들의 생성을 통하여 항진균 활성에 기여한다고 여겨진다.
- [0006] 그러나 이들 종들을 공업적 규모로 생산하는 것은 다소 고비용이고, 프로피온산의 생성은 최종 낙농 제품에서 원치 않는 관능 특성을 야기할 수 있다.
- [0007] 낙농 제품 시장의 다른 항진균 생물학적 방어 해법으로는 SACCO의 LPRA 및 BIOPROX의 Aroma-Prox®RP80을 들 수 있다. 이들 제품 양자 모두는 락토바실러스 플란타룸 (*Lactobacillus plantarum*) 및 락토바실러스 람노서스 (*Lactobacillus rhamnosus*)의 조합을 함유한다.
- [0008] Tharmaraj와 Shah (2009)는 치즈 계열 소스 (dip)용 생물학적 방어 젖산 박테리아 후보에 대한 스크리닝을 개시하고 있다. 단일 균주로서 시험된 락토바실러스 람노서스 및 락토바실러스 파라카세이의 모든 균주들은 효모와 곰팡이에 대한 최대의 저해 효과를 보여주었다. 그러나, 락토바실러스 람노서스와 락토바실러스 파라카세이의 조합은 전혀 평가되지 아니하였다.
- [0009] 따라서, 항진균 효율에 있어서는 타협하지 않고 프로피오니박테리아 아종을 제외하는 개선된 생물학적 방어 해법을 개발할 공업적 필요가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

- [0010] **발명의 요약**
- [0011] 본 발명의 발명자들은 밀크 및 낙농 제품들에서 오염을 발생시키는 것으로 알려진 박테리아 및 진균 미생물들의 성장을 억제하는 데 매우 효과적인 신규한 젖산 박테리아 균주를 동정하였다. 또한, 본 발명의 발명자들은 특정 균의 젖산 박테리아가 다른 균의 젖산 박테리아와 조합되었을 때 현저한 시너지 항균 효과를 나타낸다는 것을 알게 되었다. 놀랍게도, 2개 균 박테리아가 조합된 항균 효과는 2개 균의 박테리아의 각각의 효과의 합보다 우수하다.
- [0012] 따라서, 본 발명의 제1 관점은 하나 이상의 락토바실러스 람노서스 및 하나 이상의 락토바실러스 파라카세이를 포함하는 항균 조성물에 관한 것이다. 양호한 실시 상태에 있어서, 상기 항균 조성물은 (a) 락토바실러스 람노서스 CHCC12697 및 락토바실러스 람노서스 CHCC14226 및 이들의 돌연변이체로 이루어지는 균으로부터 선택되는 하나 이상의 락토바실러스 균주 및 (b) 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777 및 이들의 돌연변이 균주로 이루어지는 균으로부터 선택되는 하나 이상의 락토바실러스 파라카세이 균주를 포함한다. 또 다른 양호한 실시 상태에 있어서, 본 발명은 락토바실러스 람노서스 균주 CHCC12697, 락토바실러스 람노서스 균주 CHCC14226, 락토바실러

스 파라카세이 균주 CHCC12777, 및 이들의 돌연변이 균주들로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 균주를 포함하는 항균 조성물을 제공하고, 여기서 상기 돌연변이 균주들은 개시재로서 상기 기탁된 균주를 이용하여 얻는 것이다.

- [0013] 본 발명의 조성물은, 인간과 동물의 예컨대 식품, 먹이 및 약학적 제품에서 진균, 박테리아 및 이들의 혼합물로부터 선택되는 원치 않는 미생물을 저해할 수 있다는 이점을 제공한다. 진균, 예컨대 효모 및 곰팡이의 성장을 예방 및/또는 저해하는 것이 특히 예상된다. 그러므로, 양호한 실시 상태에 있어서, "항균"이라는 용어는 "항진균"으로서 이해된다.
- [0014] 그러므로, 본 발명의 제2 관점은 식품, 먹이 또는 약학적 제품의 제조에 있어서 상기 제1 관점의 항균 조성물 중 한 가지의 용도에 관한 것이다.
- [0015] 제3 관점은 진균, 박테리아 및 이들의 혼합물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 원치 않는 미생물들의 성장을 억제하기 위한 제1 관점의 항균 조성물 중 하나의 용도에 관한 것이다. 특히, 본 발명의 조성물들은 낙농 산업 공정, 예컨대 밀크 발효 공정에서 흔히 알려진 오염물인 진균과 박테리아의 성장을 저해 및/또는 예방하기 위하여 사용될 것이다.
- [0016] 제4 관점은 제1 관점의 항균 조성물들 중 하나의 약학적 제품으로서의 용도에 관한 것이다. 상기 약학적 제품은 좋기로는 박테리아 또는 진균, 더욱 좋기로는 곰팡이에 의하여 감염된 대상체의 치료에 사용하기 위한 것이다.
- [0017] 제5 관점은 본 발명의 제1 관점에 따른 항균 조성물들 중 하나를 포함하는 식품, 먹이 또는 약학적 제품에 관한 것이다.
- [0018] 본 발명의 제6 관점은 본 발명의 제5 관점에 따른 식품, 먹이 또는 약학적 제품을 제조하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 상기 식품, 먹이 또는 약학적 제품의 제조 중에 본 발명의 제1 관점에 따른 항균 조성물 중 하나를 첨가하는 단계를 포함한다. 상기 방법이 락토바실러스 람노시스 균주와 조합하여 락토바실러스 파라카세이 균주를 포함하는 항균 조성물의 첨가를 포함하는 경우, 상기 조성물은 상기 식품, 먹이 또는 약학적 제품 중에서, 하나 이상의 락토바실러스 람노시스 균주 및 하나 이상의 락토바실러스 파라카세이 균주의 농도가 각각 1×10^6 cfu/g 이상, 좋기로는 5×10^6 cfu/g, 또는 각각 1×10^6 cfu/ml 이상, 좋기로는 5×10^6 cfu/ml이거나, 상기 식품, 먹이 또는 약학적 제품의 표면에서 각각 1×10^5 cfu/cm² 이상, 좋기로는 1×10^7 cfu/cm²이도록 첨가되고, 제조 파라미터들은 그 제조 중에 상기 하나 이상의 락토바실러스 람노시스 균주 및 하나 이상의 락토바실러스 파라카세이 균주의 농도가 증가하거나 일정하게 유지되도록 제어된다.
- [0019] 본 발명의 제7 관점은 독일생물자원센터 (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, DSMZ)에 수탁번호 DSM24616으로 기탁된 락토바실러스 람노시스 CHCC12697 균주, 또는 그 돌연변이 균주에 관한 것으로, 여기서 상기 돌연변이 균주는 개시재로서 상기 기탁된 균주를 이용하여 얻어지는 것이다.
- [0020] 본 발명의 제8 관점은 독일생물자원센터 (DSMZ)에 수탁번호 DSM24652로 기탁된 락토바실러스 람노시스 CHCC14226 균주, 또는 그 돌연변이 균주에 관한 것으로, 여기서 상기 돌연변이 균주는 개시재로서 상기 기탁된 균주를 이용하여 얻어지는 것이다.
- [0021] 본 발명의 제9 관점은 독일생물자원센터 (DSMZ)에 수탁번호 DSM24651으로 기탁된 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777 균주, 또는 그 돌연변이 균주에 관한 것으로, 여기서 상기 돌연변이 균주는 개시재로서 상기 기탁된 균주를 이용하여 얻어지는 것이다.
- [0022] **도면의 간단한 설명**
- [0023] **도 1**은 스타터 배양체 단독 (레퍼런스, 제1 컬럼), 락토바실러스 람노시스 CHCC12697과 함께 (제2 컬럼), 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777과 함께 (제3 컬럼) 또는 락토바실러스 람노시스 CHCC12697 및 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777의 조합과 함께 (제4 컬럼) 발효시킨 밀크로 제조된 플레이트 상에서 효모와 곰팡이의 성장을 보여준다. 꼭대기 행 (row)의 플레이트들에서 표적 오염체를 본 명세서에 언급된 농도로 왼쪽부터 오른쪽으로 첨가하였다: 각각 K. 마르시아누스, P. 페르멘탄스, Y. 리폴리티카 및 C. 사케. 제2 행의 플레이트들 상에는, 꼭대기에 P. 날지오벤스가 첨가되었고, 하단 좌측에 클라디오스포리움 종이, 하단 우측에 P. 코뮌이 첨가되었다. 마지막 행의 플레이트들 상에는, 뮌코르 아종만이 단독으로 첨가되었다. 이 플레이트들을 17일간 7 ± 1°C에서 배양하였다.
- [0024] **도 2**는 스타터 배양체 CHN-19 단독 (달린 다이아몬드) 또는 하기의 균주들: HOLDBAC™ YM-B (열린 사각형),

HOLDBAC™ YM-C (열린 다이아몬드), 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777 (닫힌 사각형), 락토바실러스 람노시스 CHCC12697 (닫힌 삼각형) 또는 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777 및 락토바실러스 람노시스 CHCC12697 (닫힌 원)과 함께 접종된 전지유에 첨가된 야로위아 리폴리티카 단리물의 세포수를 보여주고, 모두 pH 4.65±0.05에 도달할 때까지 29±1℃에서의 발효 이전에 첨가되었다.

[0025] 도 3은 스타터 배양체 단독 (레퍼런스, 제1 컬럼), 락토바실러스 람노시스 CHCC14226과 함께 (제2 컬럼), 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777과 함께 (제3 컬럼) 또는 락토바실러스 람노시스 CHCC14226 및 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777의 조합과 함께 (제4 컬럼) 발효시킨 밀크로 제조된 플레이트 상에서 효모와 곰팡이의 성장을 보여준다. 꼭대기 행 (row)의 플레이트들에서 표적 오염체를 본 명세서에 언급된 농도로 왼쪽부터 오른쪽으로 첨가하였다: 각각 K. 마르시아누스, P. 페르멘탄스, Y. 리폴리티카 및 C. 사케. 바닥 행의 플레이트들 상에는, 꼭대기에 P. 날지오벤스가 첨가되었고, 하단 좌측에 클라디오스포리움 종이, 하단 우측에 P. 코균이 첨가되었다. 이 플레이트들을 15일간 7±1℃에서 배양하였다.

[0026] 도 4는 스타터 배양체 CHN-19 단독 (닫힌 다이아몬드) 또는 하기의 균주들: HOLDBAC™ YM-B (열린 사각형), HOLDBAC™ YM-C (열린 다이아몬드), 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777 (닫힌 사각형), 락토바실러스 람노시스 CHCC14226 (닫힌 삼각형) 또는 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777 및 락토바실러스 람노시스 CHCC14226 (닫힌 원)과 함께 접종된 전지유에 첨가된 클리베로마이세스 마르시아누스 단리물의 세포수를 보여주고, 모두 pH 4.65±0.05에 도달할 때까지 29±1℃에서의 발효 이전에 첨가되었다.

[0027] 도 5는 스타터 배양체 단독 (레퍼런스, 제1 도), 락토바실러스 파라카세이 CHCC14676과 함께 (제2 도), 락토바실러스 람노시스 CHCC5366과 함께 (제3 도) 또는 락토바실러스 파라카세이 CHCC14676 및 락토바실러스 람노시스 CHCC5366의 조합과 함께 (제4 도) 발효시킨 밀크로 제조된 플레이트 상에서 곰팡이의 성장을 보여준다. 표적 오염체를 본 명세서에 언급된 농도로 왼쪽 상단부터 오른쪽 하단으로 첨가하였다: 각각 페니실리움 날지오베세, 페니실리움 코균, 아스페르길루스 베르시콜로르 및 페니실리움 크루스토섬. 이 플레이트들을 12일간 7±1℃에서 배양하였다.

[0028] 도 6은 스타터 배양체 단독 (레퍼런스, 제1 도), 락토바실러스 파라카세이 CHCC14676과 함께 (제2 도), 락토바실러스 람노시스 CHCC14226과 함께 (제3 도) 또는 락토바실러스 파라카세이 CHCC14676 및 락토바실러스 람노시스 CHCC14226의 조합과 함께 (제4 도) 발효시킨 밀크로 제조된 플레이트 상에서 곰팡이의 성장을 보여준다. 표적 오염체를 본 명세서에 언급된 농도로 왼쪽 상단부터 오른쪽 하단으로 첨가하였다: 각각 페니실리움 날지오베세, 페니실리움 코균, 아스페르길루스 베르시콜로르 및 페니실리움 크루스토섬. 이 플레이트들을 12일간 7±1℃에서 배양하였다.

[0029] 도 7은 스타터 배양체 단독 (레퍼런스, 제1 도), 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777과 함께 (제2 도), 락토바실러스 람노시스 CHCC14226과 함께 (제3 도) 또는 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777 및 락토바실러스 람노시스 CHCC14226의 조합과 함께 (제4 도) 발효시킨 밀크로 제조된 플레이트 상에서 곰팡이의 성장을 보여준다. 표적 오염체를 본 명세서에 언급된 농도로 왼쪽 상단부터 오른쪽 하단으로 첨가하였다: 각각 페니실리움 날지오베세, 페니실리움 코균, 아스페르길루스 베르시콜로르 및 페니실리움 크루스토섬. 이 플레이트들을 12일간 7±1℃에서 배양하였다.

[0030] 도 8은 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777을 이용하여 사우어 크림에서 시도한 연구 결과를 보여준다. 스타트 배양체만으로 발효시킨 (꼭대기 행) 또는 스타터 배양체와 HOLDBAC™ YM-B 배양체로 발효시킨 (중간 행) 밀크로 만들어진 사우어 크림 상에서 P. 코균 (M6), A. 베르시콜로르 (M7), P. 브레비콤팍툼 (M 1), P. 크루스토섬 (M 10) 및 P. 글라브룸 (M8)이 잘 자란다는 것이 입증된다. 반면, 밀크 발효 중 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777이 존재하면 (바닥 행), 시험된 모든 곰팡이들의 생장이 저해되었다.

[0031] 도 9는 락토바실러스 람노시스 CHCC12697을 이용하여 트바로그 (tvvarog)에서 시도한 연구 결과를 보여준다. 스타트 배양체 CHN-19만으로 발효시킨 (Ref.) 밀크로 만들어진 트바로그 상에서 뮤코르 아종이 잘 자란다는 것이 입증된다. 또한, 이 곰팡이는 스타터 배양체와 HOLDBAC™ YM-B 배양체로 발효시킨 밀크로 만들어진 트바로그 상에서도 잘 자라고, 좀 적은 양으로 스타터 배양체와 HOLDBAC™ YM-C 배양체로 발효시킨 밀크로 만들어진 트바로그 상에서도 잘 자란다. 그러나, 밀크 발효 중 락토바실러스 람노시스 CHCC12697이 존재하면, 뮤코르 아종의 현저히 더욱 두드러지는 성장 억제가 관찰된다.

[0032] 도 10은 락토바실러스 람노시스 CHCC14226을 이용하여 요거트에서 시도한 연구 결과를 보여준다. 스타터 배양체 YF-L901만으로 발효시킨 (꼭대기 행) 또는 스타터 배양체와 HOLDBAC™ YM-B 배양체로 발효시킨 (중간 행) 밀크로 만들어진 요거트 상에서 *P. 브레비콤팍툼* (M1), *P. 코문* (M6), *A. 베르시콜로르* (M7) 및 *P. 크루스토섬* (M10)은 잘 자란다. 반면, 밀크 발효 중 락토바실러스 람노시스 CHCC14226이 존재하면 (바닥 행), 시험된 모든 곰팡이들의 생장이 저해되었다.

[0033] 도 11은 트바로그에서 *K. 락티스*에 대한 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777 및 락토바실러스 람노시스 CHCC12697의 저해 효과의 정량적 측정을 보여준다. 발효 전에 스타터 배양체 CHN-19와 함께 접종되었을 때, 락토바실러스 파라카세이 균주 CHCC12777의 존재하에서 및 락토바실러스 람노시스 균주 CHCC12697의 존재하에서 *K. 락티스*의 생장이 억제된다는 것이 입증되었다. 락토바실러스 파라카세이 균주 CHCC12777 및 락토바실러스 람노시스 균주 CHCC12697의 양자의 균주 모두 시판 배양체 HOLDBAC™ YM-B보다 현저히 높은 억제력을 유도하였다.

[0034] 도 12는 요거트에서 트바로마이세스 한세니이에 대한 락토바실러스 람노시스 CHCC14226의 저해 효과의 정량적 측정을 보여준다. 발효 전 스타터 배양체 YF-L901과 함께 접종되었을 때, 락토바실러스 람노시스 균주 CHCC14226의 존재하에서 *D. 한세니이*의 생장은 저해되었다. 이 균주는 시판 배양체 HOLDBAC™ YM-B보다 현저히 높은 억제력을 유도하였다.

[0035] **발명의 상세한 설명**

[0036] 정의

[0037] 본 명세서에서 사용되는 "젖산 박테리아"이라는 용어는 그람-양성의, 미호기성 또는 혐기성 박테리아로서 우세하게 생성되는 산으로서 젖산을 포함하는 산을 생성하며 당을 발효시킨다. 공업적으로 가장 유용한 젖산 박테리아는 락토코쿠스 종 (*Lactococcus* spp.), 스트렙토코쿠스 종 (*Streptococcus* spp.), 락토바실러스 종 (*Lactobacillus* spp.), 류코노스톡 종 (*Leuconostoc* spp.), 수도류코노스톡 종 (*Pseudoleuconostoc* spp.), 페디오코쿠스 종 (*Pediococcus* spp.), 브레비박테리움 종 (*Brevibacterium* spp.) 및 엔테로코쿠스 종 (*Enterococcus* spp.)을 포함하는 "락토바실라레스" 목에서 발견된다. 이들은 단독으로 또는 다른 젖산 박테리아와 함께 조합하여 식품 배양체로서 자주 사용된다. 젖산 박테리아, 예컨대 락토바실러스 종 및 스트렙토코쿠스 써모필러스는 보통 벌크 스타터 (bulk starter) 증식을 위한 냉동 또는 동결 건조 배양체로서, 또는 소위 "다이렉트 배트 세트 (Direct Vat Set)" (DVS) 배양체로서 유업계에 공급되고, 낙농 젖산 박테리아, 예컨대 발효유 제품 또는 치즈 제조용의 발효관 또는 발효통으로 직접 접종된다. 이들 젖산 박테리아 배양체를 일반적으로 "스타터 배양체" 또는 "스타터 (starter)"라고 부른다.

[0038] 본 발명의 "중온성균 (mesophile)"이라는 용어는 중간 정도의 온도 (15°C~40°C)에서 가장 잘 자라는 미생물을 의미한다. 공업적으로 가장 유용한 중온성 박테리아로는 락토코쿠스 종 및 류코노스톡 종 (*Leuconostoc* spp.)을 들 수 있다. 본 발명의 "중온성 발효"라는 용어는 약 22°C 내지 약 35°C 사이의 온도에서의 발효를 말한다. "중온성 발효유 제품"이라는 용어는 중온성 스타터 배양체의 중온성 발효에 의하여 제조되는 발효유 제품을 말하고, 버터밀크, 사우어 밀크, 배양 밀크, 스메타나, 사우어 크림 및 생치즈, 예컨대 퀴크 (quark), 트바로그 (tvorog) 및 크림 치즈 등의 발효유 제품을 들 수 있다.

[0039] 본 발명의 "호열성균 (thermophile)"이라는 용어는 43°C를 초과하는 온도에서 가장 잘 자라는 미생물을 의미한다. 공업적으로 가장 유용한 호열성 박테리아로는 스트렙토코쿠스 종 및 락토바실러스 종을 들 수 있다. 본 발명의 "호열성 발효"라는 용어는 약 35°C를 초과하는, 예컨대 약 35°C 내지 약 45°C 온도에서의 발효를 말한다. "호열성 발효유 제품"이라는 용어는 호열성 스타터 배양체의 호열성 발효에 의하여 제조되는 발효유 제품을 말하고 세트-요거트, 스타터-요거트 및 마시는 요거트와 같은 낙농 발효유 제품을 들 수 있다.

[0040] "밀크"라는 용어는, 예컨대 소, 양, 염소, 버팔로 또는 낙타 등의 임의의 포유 동물을 착유하여 얻는 젖 분비액이라고 이해하여야 한다. 양호한 실시 상태에 있어서, 상기 밀크는 소의 젖이다. 또한, 밀크라는 용어는 식물 재료, 예컨대 두유로 제조된 단백질/지방 용액도 역시 포함한다.

[0041] "밀크 기질"이라는 용어는 본 발명의 방법에 따른 발효를 거칠 수 있는 임의의 원유 및/또는 가공유일 수 있다. 그러므로, 유용한 밀크 기질로서는 단백질을 함유하는 임의의 밀크 또는 유사 밀크 제품의 용액/현탁액, 예컨대 전지 밀크 또는 저지방 밀크, 무지방 밀크, 버터 밀크, 재구성 분유, 연유, 분유, 유청, 유청 막투과액 (whey permeate), 젖당, 젖당의 결정화 모액, 유청 단백질 농축액 또는 크림을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 명백히, 상기 밀크 기질은 임의의 포유 동물로부터 유래한 것, 예컨대 실질적으로 순수한 포유류의 젖 또

는 재구성 분유일 수 있다.

- [0042] 발효 전에, 상기 밀크 기질은 이 기술 분야에 알려져 있는 방법에 따라 균질화 및 살균 처리될 수 있다.
- [0043] "균질화"라는 용어는 격렬하게 혼합하여 용해성 현탁액 또는 에멀전을 얻는 것을 의미한다. 발효 전에 균질화가 수행되는 경우, 밀크 지방을 작은 크기로 분쇄함으로써 밀크 지방이 더 이상 밀크로부터 분리되지 않도록 상기 균질화를 수행할 수 있다. 이는 작은 오리피스스를 통하여 밀크에 고압의 힘을 가함으로써 달성될 수 있다.
- [0044] "살균"이라는 용어는 밀크 기질을 처리하여 살아있는 생물체, 예컨대 미생물의 존재를 저감시키거나 제거하는 것을 의미한다. 살균은 특정 시간 동안 특정 온도를 유지하여 행하는 것이 좋다. 특정 온도는 보통 가열로 이루어진다. 상기 온도와 시간은 특정의 박테리아, 예컨대 유해 박테리아를 죽이거나 불활화시키기 위하여 선택될 수 있다. 급속 냉각 과정이 수반될 수 있다.
- [0045] 본 발명의 방법에 있어서 "발효"는 미생물의 작용을 통하여 탄수화물을 알코올 또는 산으로 전환시키는 것을 의미한다. 본 발명의 방법에 있어서 발효는 젖당의 젖산으로의 전환으로 이루어지는 것이 좋다.
- [0046] 낙농 제품의 제조에 이용되는 발효 공정은 잘 알려져 있고, 이 기술 분야의 숙련자라면 온도, 산소, 미생물의 양과 특성 및 공정 시간 등의 적절한 공정 조건을 선택하는 방법을 알게 될 것이다. 명백히, 발효 조건은 본 발명의 목적, 즉 고형 (치즈 등) 또는 액상형 유제품 (발효유 제품 등)을 얻기 위한 목적을 뒷받침하기 위하여 선택된다.
- [0047] 본 발명에서 "원치 않는 미생물들"이라는 용어는 병원성 및/또는 식품, 먹이 또는 약학적 제품을 악화시킬 수 있는 박테리아와 진균과 같은 미생물들, 예컨대 효모를 말한다.
- [0048] 원치않는 미생물과 관련하여 "저해하는" 및 "저해되는"이라는 용어는, 예컨대 상기 항균 조성물을 포함하는 식품 제품에서 및/또는 식품 제품의 표면에서, 이러한 항균 조성물을 포함하지 않는 식품 제품에서 및/또는 상기 항균 조성물을 포함하는 식품 제품의 표면에서보다 원치 않는 미생물들의 농도 또는 수 또는 생장이 적어진다는 것을 의미한다.
- [0049] 본 발명에 있어서, "돌연변이체"라는 용어는, 본 발명의 균주로부터, 예컨대 유전 공학, 방사선, 및/또는 화학적 처리의 수단에 의하여 유래한 균주라고 이해하여야 한다. 상기 돌연변이체는 모균주와 기능적으로 균등한 돌연변이체, 예컨대 실질적으로 동일하거나, 또는 (예컨대, 디아세틸 생성, 점도, 겔 강도, 구강 코팅도, 향미, 후산 발효도, 산성화 속도 및/또는 파지 인성 (phage robustness)에 관한) 성질이 개선된 돌연변이체인 것이 좋다. 이러한 돌연변이체는 본 발명의 일부이다. 특히, "돌연변이체"라는 용어는 본 발명의 균주를 에탄 메탄 술포네이트 (EMS) 또는 N-메틸-N'-니트로-N-니트로구아니딘 (NTG) 등의 화학적 MUTAGEN 처리, UV광 처리를 비롯한 종래에 사용되는 임의의 돌연변이화 처리를 거치게 하여 수득한 균주 또는 자생적인 돌연변이체를 말한다. 돌연변이체는 수회의 돌연변이화 처리 (하나의 처리는 스크리닝/선별 단계가 뒤따르는 1회의 돌연변이화 단계로 이해되어야 한다)를 거친 것일 수 있으나, 본 발명에서는 20회 이하, 또는 10회 이하, 또는 5회 이하의 처리 (또는 스크리닝/선별 단계)를 수행하는 것이 좋다. 본 발명에서 양호한 돌연변이체에 있어서, 박테리아 계능 중의 5% 미만, 또는 1% 미만 또는 심지어 0.1% 미만의 뉴클레오티드가 모균주에 비하여 또 다른 뉴클레오티드로 이동 또는 결실된다.
- [0050] 본 발명의 설명과 관련하여 (특히 후술하는 청구 범위와 관련하여), "a"와 "an" 및 "the"와 이에 유사한 낱말의 사용은 본 발명에서 달리 표시하거나 문맥상 명백히 모순되지 않는 한, 단수 및 복수 양자 모두를 포괄하는 것으로 이해되어야 한다. "포함하는 (comprising)", "가지는 (having)", "비롯한 (including)" 및 "함유하는 (containing)" 이라는 용어들은 달리 표시되지 않는 한, 개방형 (open-ended) 용어 (즉, "포함하지만 이에 한정되지는 아니하는"을 의미)로 이해되어야 한다. 본 발명에 있어서, 수치 범위에 관한 언급은 달리 명시하지 않는 한, 그 범위에 속하는 별도의 각 값을 개별적으로 나타내는 약기(略記) 방식으로 사용하고자 하는 것일 뿐이며, 별도의 각 값은 이것이 마치 본 명세서에서 개별적으로 설명되어 있는 것처럼 본 명세서에 포함된다. 달리 명시하거나 문맥상 명백히 반대되는 경우가 아닌 한, 본 명세서에 설명된 방법들은 모두 임의의 적절한 순서로 수행될 수 있다. 본 발명에 제시된 임의의 실시예 및 모든 실시예, 또는 예를 들고자 한 용어 (예컨대, "...과 같은")의 사용은, 단지 본 발명을 더 분명히 나타내기 위한 목적일 뿐이며, 달리 필요하지 않는 한 본 발명의 범위에 대한 한정을 가하지 않는다. 본 명세서 중의 어떠한 언어나, 어떤 청구되지 않은 사항을 본 발명의 실시예에 필수적인 것을 나타낸다고 해석되어서는 아니된다.
- [0051] 본 발명의 구현 및 관점

- [0052] 본 발명의 발명자들은 원치 않는 미생물들, 예컨대 곰팡이 및 효모에 대항하는 효율적인 한 가지 젖산 박테리아 균주 또는 두 가지 상이한 균주들의 혼합을 포함하는 항균 조성물을 제공하기 위하여 강력한 스크리닝과 연구를 진행하였다.
- [0053] 광범위한 미생물들, 예컨대 효모 및 곰팡이에 대항하는 가장 효율적인 단일 균주 또는 2 균주 조합을 찾기 위하여 본 발명의 발명자들은 200개의 락토바실러스 플라타룸, 락토바실러스 파라카세이 및 락토바실러스 람노시스 후보들을 스크리닝하였다.
- [0054] 스크리닝은 가능한 최대의 중온성 발효유 제품을 모방한 모델 실험의 형태로, 생물학적 방어 후보체들을 함유하거나 함유하지 않도록 하여 해당 스타터 배양체를 첨가하고, 중온성 발효유 제품에 해당하는 조건하에서 발효시킨 밀크 계열 배지에서 수행되었다. 표적 미생물들을 중온성 발효유 제품으로부터 단리하였다. Danisco A/S, Denmark의 HOLDBAC™ 배양체들 중 정제된 젖산 박테리아 양자 모두 및 상기 젖산 박테리아 양자 모두와 프로피온산 박테리아를 함유하는 완전 HOLDBAC™ YM-B 및 HOLDBAC™ YM-C 배양체를 벤치 마크로 사용하였다.
- [0055] 25℃에서 시험하였을 때 락토바실러스 파라카세이 및 락토바실러스 람노시스 중 17개의 후보들이 12종의 표지자 진균들을 벤치 마크 젖산 박테리아만큼 일반적으로 잘 저해하거나 또는 그보다 훌륭했다. 따라서, 제1 관점에 있어서, 본 발명은 하나 이상의 락토바실러스 람노시스 또는 락토바실러스 파라카세이 균주를 포함하는 항균 조성물에 관한 것이다.
- [0056] 동정된 후보자들 중 9개는 또한, 냉(冷) 조건에서 시험하였을 때 벤치 마크 젖산 박테리아와 동일한 범위의 활성을 나타내었고, 특히 3종의 균주들은 매우 효과적인 것으로 나타났다: 수탁번호 DSM24651의 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777, 수탁번호 DSM24616의 락토바실러스 람노시스 CHCC12697 및 수탁번호 DSM24652의 락토바실러스 람노시스 CHCC14226. 이들 3종의 균주는 독일생물자원센터 (DSMZ)에 기탁되었다.
- [0057] 소위 보틀 실험에서 시험했을 때, 이들 단일한 균주들은 여러 가지 효모들에 대한 효과에 있어서 HOLDBACTM 배양체들에 비하여 우수하거나 비견할만한 것으로 보였다. 따라서, 이들 단일 균주들은 항균 제제로 사용하기에 매우 적합하다. 양호한 관점에 있어서, 그러므로 본 발명은 하기의 균주들:
- [0058] 수탁번호 DSM24616으로 독일생물자원센터 (DSMZ)에 기탁된 락토바실러스 람노시스 CHCC12697,
- [0059] 수탁번호 DSM24652로 독일생물자원센터 (DSMZ)에 기탁된 락토바실러스 람노시스 CHCC14226,
- [0060] 수탁번호 DSM24651으로 독일생물자원센터 (DSMZ)에 기탁된 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777, 및
- [0061] 이들의 돌연변이 균주들
- [0062] 로 이루어지는 균으로부터 선택되는 하나 이상의 균주를 포함하는 항균 조성물을 제공하고, 여기서 상기 돌연변이 균주들은 개시제로서 상기 기탁된 균주들을 사용하여 얻어지는 것이다.
- [0063] 특히 양호한 실시 상태에 있어서, 본 발명의 항균 조성물은 상기한 균주들 또는 그 돌연변이체 중 하나를 항균 활성을 나타내는 단독 제제로서 포함한다.
- [0064] 전술한 3종의 균주들 외에도, 본 발명은 이들 균주들로부터 유래하는 돌연변이체들에 관한 것이기도 하며, 즉 이들은 개시제로서 기탁 균주 CHCC12777, CHCC12697, CHCC14226 중 하나를 이용하여 얻어지는 것이다. 상기 돌연변이 균주들은 이들 균주들 중 하나로부터, 예컨대 유전자 조작, 방사선, 자외선, 화학적 처리 및/또는 게놈 상 변화를 유도하는 방법과 같은 수단에 의하여 유래될 수 있다. 본 발명에 따른 돌연변이체는 특정한 박테리아 또는 진균, 종기로는 곰팡이들의 성장을 저해 및/또는 예방할 것이다. 상기 돌연변이체는, 예컨대 효모 K. 마르시아누스, P. 페르멘타스, Y. 리폴리티카 또는 C. 사케 중 하나를 오염체로 사용하는 실시예 2에서 개시되는 실험에서 측정하였을 때, 그 모균주와 비교하여 항균 효과, 예컨대 항진균 효과에 있어서 근본적으로 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 또는 심지어 100% 이상인 것이 좋다.
- [0065] 이들 균주들의, 원치 않는 미생물들에 대항하는 저해 효과는 하기의 실시예들에 개시되는 바와 같이 적절한 저장 기간 동안 적절한 온도에서 보틀들을 저장함으로써 결정될 수 있었다.
- [0066] 일반적으로, 이러한 방법이 수행되어야 하는 적절한 온도는 구체적인 식품, 먹이 또는 약학적 제품이 일반적으로 저장되고 및/또는 제조되는 온도에 달려있다. 보통 상기 보틀들이 보관되는 온도는 5℃ 내지 26℃, 종기로는 그 온도는 약 8℃이다.
- [0067] 상기 온도에서의 보관 시간은 그 식품, 먹이 또는 약학적 제품이 일반적으로 보관되어지는 그 시간 (유통기한)

에 달려있다. 보통 보관 시간은 7~28일, 종기로는 그 보관 시간은 약 21일이다.

- [0068] 2-균주 조합으로 시험하였을 때, 예기치 않게도, 심지어 첨가되는 총 세포 농도는 시험 대상인 단일 균주들과 2-균주 조합에 대하여 동일한 경우일 지라도 가장 효과적인 단일 균주들의 조합들이 상기 균주들 단독인 각각의 경우보다 훨씬 훌륭하다는 것을 알게 되었다. 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777 및 락토바실러스 람노서스 CHCC12697의 조합, 또는 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777 및 락토바실러스 람노서스 CHCC14226의 조합은 Danisco, Denmark의 벤치 마크 배양체들 HOLDBAC™ YM-B 및 HOLDBAC™ YM-C보다 훨씬 효과적인 것으로 보였다.
- [0069] 따라서, 본 발명의 양호한 실시 상태는 하나 이상의 락토바실러스 람노서스 및 하나 이상의 락토바실러스 파라카세이를 포함하는 항균 조성물에 관한 것이고, 여기서 상기 하나 이상의 락토바실러스 람노서스는 수탁번호 DSM24616의 락토바실러스 람노서스 CHCC12697, 수탁번호 DSM24652의 락토바실러스 람노서스 CHCC14226 및 이들의 돌연변이 균주들로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것이고, 여기서 상기 돌연변이 균주는 개시재로서 상기 기탁된 균주를 이용하여 얻어지는 것이다.
- [0070] 또 다른 양호한 실시 상태에 있어서, 하나 이상의 락토바실러스 파라카세이 균주는 수탁번호 DSM24651의 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777 및 그 돌연변이 균주들로 이루어지는 군으로부터 선택되고, 상기 돌연변이 균주들은 개시재로서 상기 기탁된 균주들을 이용하여 얻어지는 것이다.
- [0071] 또 다른 실시 상태에 있어서, 본 발명은 하나 이상의 락토바실러스 람노서스 균주와 하나 이상의 락토바실러스 파라카세이 균주를 포함하는 항균 조성물, 더욱 종기로는 항진균 조성물에 관한 것이고, 여기서
- [0072] 상기 하나 이상의 락토바실러스 람노서스 균주는 수탁번호 DSM24616의 락토바실러스 람노서스 CHCC12697, 수탁번호 DSM246252의 락토바실러스 람노서스 CHCC14226 및 이들의 돌연변이 균주들로 이루어지는 군으로부터 선택되고, 여기서 상기 돌연변이 균주들은 개시재로서 상기 기탁된 균주를 이용하여 얻어지는 것이며;
- [0073] 상기 하나 이상의 락토바실러스 파라카세이 균주는 수탁번호 DSM24651의 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777 및 그 돌연변이 균주들로 이루어지는 군으로부터 선택되고, 상기 돌연변이 균주들은 개시재로서 상기 기탁된 균주들을 이용하여 얻어지는 것이다.
- [0074] 적어도 락토바실러스 람노서스 CHCC12697 및 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777을 포함하는 항균 조성물이 특히 양호하다. 유사하게, 적어도 락토바실러스 람노서스 CHCC14226 및 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777을 포함하는 항균 조성물이 본 발명에 따라 특히 양호하다.
- [0075] 항균 조성물은 통상적으로 박테리아를 농축 형태로 포함하는데, 예컨대 통상적으로 상기 조성물 그램당 10^4 내지 10^{12} cfu (콜로니 형성 단위) 범위인 생균 농도를 갖는, 예컨대 상기 조성물 그램당 10^4 cfu 이상, 예컨대 10^5 cfu 이상, 예컨대 10^6 cfu 이상, 예컨대 10^7 cfu 이상, 예컨대 10^8 cfu 이상, 예컨대 10^9 cfu 이상, 예컨대 10^{10} cfu 이상, 예컨대 10^{11} cfu 이상의 생균 농도를 갖는 동결, 건조 또는 동결-건조된 농축물 등이다. 따라서, 본 발명의 상기 항균 조성물은 종기로는 동결, 건조 또는 동결-건조형으로, 예컨대 다이렉트 배트 세트 (DVS) 배양체로 존재한다. 그러나, 본 발명에서 사용되는 바, 항균 조성물은 상기 동결된, 건조된 또는 동결건조된 세포 농축물을 액체 매질, 예컨대 물 또는 PBS 완충액에 현탁한 후 얻어지는 액체일 수도 있다. 본 발명의 항균 조성물이 현탁액인 경우, 생균 농도는 조성물 ml당 10^4 내지 10^{12} cfu (콜로니 형성 단위) 범위, 예컨대 조성물 ml당 10^4 cfu 이상, 예컨대 조성물 ml당 10^5 cfu 이상, 예컨대 조성물 ml당 10^6 cfu 이상, 예컨대 조성물 ml당 10^7 cfu 이상, 예컨대 조성물 ml당 10^8 cfu 이상, 예컨대 조성물 ml당 10^9 cfu 이상, 예컨대 조성물 ml당 10^{10} cfu 이상, 예컨대 조성물 ml당 10^{11} cfu 이상이다.
- [0076] 상기 조성물은 추가적인 성분들인 동해방지제 및/또는 관용적인 첨가제들, 예컨대 영양분, 예컨대 효모 추출물, 당 및 비타민, 예컨대 비타민 A, C, D, K 또는 비타민 B군의 비타민들을 추가로 함유할 수 있다. 본 발명의 조성물에 첨가될 수 있는 적절한 동해방지제는 미생물의 저온 저항성 (cold tolerance)을 향상시키는 성분들, 예컨대 만니톨, 소르비톨, 트리폴리포스페이트나트륨, 자일리톨, 글리세롤, 라피노오스, 말토덱스트린, 에리스리톨, 트레이톨, 트레할로오스, 글루코오스 및 프럭토오스이다. 기타 첨가제들로는, 예컨대 탄화수소, 향미제, 미네랄, 효소 (예컨대, 렌넷 (rennet), 락타아제 및/또는 포스포리파아제)를 들 수 있다.
- [0077] 락토바실러스 람노서스 균주 및 락토바실러스 파라카세이 균주를 포함하는 본 발명의 항균 조성물에 있어서, 상

기 락토바실러스 람노시스 균주 및 상기 락토바실러스 파라카세이 균주 사이의 비율, 예컨대 락토바실러스 람노시스 박테리아의 농도 또는 수와 락토바실러스 파라카세이 박테리아의 농도 또는 수의 비율은, 좋기로는 1:100 내지 100:1, 좋기로는 1:10 내지 10:1이다.

- [0078] 본 발명의 항균 조성물은 미생물 분해 및/또는 효모들 및 곰팡이들에 의한 오염에 민감한 임의의 식품, 먹이 및 약학적 제품과 관련하여 사용될 수 있다. 이들은 과일 및 야채, 예컨대 그 파생 제품, 곡물 및 곡물 파생 제품, 낙농 제품, 육류, 가금류, 및 해산물 등을 들 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 특히 양호한 실시 상태에 있어서, 상기 조성물은 낙농 제품 및/또는 육류 및 가금류와 관련하여 사용된다. 양호한 실시 상태에 있어서, 본 발명의 상기 조성물은 낙농 제품, 예컨대 요거트, 트바로그, 사우어 크림, 크림 치즈 등등의 제조에 있어서 첨가제로 사용하기 위한 것이다.
- [0079] 본 발명에 따른 항균 조성물은 또한 진균 및 박테리아 및 이들의 혼합물로 이루어지는 균으로부터 선택되는 원치 않는 미생물들을 저해하기 위하여 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물은 특히, 낙농 산업 공정, 예컨대 밀크 발효 공정에서 흔히 알려진 오염체들은 진균과 박테리아의 성장을 저해 및/또는 예방하기 위하여 유용하다.
- [0080] 양호한 실시 상태에 있어서, 본 발명의 항균 조성물은 진균, 예컨대 효모들 및 곰팡이들에 대하여 사용된다. 이것은 상기 조성물이 낙농 산업 공정, 특히 밀크 발효 공정에서 오염을 야기하는 진균의 성장을 저해 및/또는 예방하기 위하여 사용된다는 것을 의미한다. 본 발명의 항균 조성물은, 예컨대 효모들, 예컨대 속 클리베로마이세스 (예컨대, K. 마르시아누스, K. 락티스), 피치아 (예컨대, P. 페르멘탄스), 야로위아 (예컨대, Y. 리폴리티카), 칸디다 (예컨대, C. 사케), 등등의 효모들; 또는 곰팡이들, 예컨대 속 페니실리움 (예컨대, P. 날지오벤스, P. 코문, P. 크루스토섬, P. 브레비콤팩툼, P. 글라브룸), 뮤코르 종, 클라디오스포리움 아종, 아스페르길루스 (예컨대, A. 베르시콜로르), 드바로마이세스 (예컨대, D. 한세나이), 등등의 곰팡이들의 성장을 저해 및/또는 예방하기 위하여 사용될 수 있다. 본 발명의 항균 조성물을, 종 클리베로마이세스 마르시아누스, 야로위아 리폴리티카, 페니실리움 날지오벤스, 클라디오스포리움 아종, 페니실리움 코문, 뮤코르 아종, 페니실리움 브레비콤팩툼, 아스페르길루스 베르시콜로르, 페니실리움 크루스토섬, 클리베로마이세스 락티스, 및/또는 드바로마이세스 한세나이의 성장을 저해 및/또는 예방하기 위하여 사용하는 것이 특히 좋다.
- [0081] 본 발명의 제1 관점에 따른 항균 조성물은 또한 병원성 진균, 좋기로는 병원성 효모들에 의한 감염을 치료하기 위한 약학적 제품으로서 사용될 수도 있다.
- [0082] 전술한 바와 같이, 한 가지 관점에서 본 발명은 본 발명의 제1 관점의 항균 조성물을 포함하는 식품, 먹이 또는 약학적 제품에 관한 것이다.
- [0083] 양호한 실시 상태에 있어서, 이러한 식품 제품은 과일 및 과일 파생 제품, 야채 및 야채 파생 제품, 곡물 및 곡물 파생 제품, 낙농 제품, 육류, 가금류 및 해산물 및 이들의 혼합물로 이루어지는 균으로부터 선택된다.
- [0084] 더욱 양호한 실시 상태에 있어서, 상기 식품 제품은 낙농 제품, 좋기로는 중온성 또는 호열성 발효유 제품, 예컨대 생치즈, 요거트, 사우어 크림 또는 트바로그이다.
- [0085] 또 다른 양호한 실시 상태에 있어서, 상기 식품 제품은 육류 또는 가금류이다.
- [0086] 양호한 실시 상태에 있어서, 상기 약학적 제품은 병원성 미생물을 저해하고 상기 병원성 미생물과 관련된 증상들을 완화시키는 인간 또는 동물에게 본 발명의 제1 관점에 따른 항균 조성물을 투여하는 데 유용한 제품이다. 이러한 증상들의 예시로는 효모 감염 관련 증상들을 들 수 있다. 이러한 실시 상태에 있어서, 상기 약학적 제품은 상기 항균 조성물을 포함하는 단위투여형일 수 있다. 좋기로는, 상기 단위투여형은 캡슐 또는 정제이다. 그러나, 상기 단위투여형은 또한 점막 또는 피부에 적용하기에 적합할 수 있고, 따라서 페이스트, 크림, 연고 등등의 형태일 수도 있다.
- [0087] 본 발명의 또 다른 관점은 식품, 먹이 또는 약학적 제품의 제조 중에 본 발명의 제1 관점에 따른 항균 조성물을 첨가하는 단계를 포함하는 본 발명의 제5 관점에 따른 상기 식품, 먹이 또는 약학적 제품의 제조 방법에 관한 것이다.
- [0088] 양호한 실시 상태에 있어서, 상기 하나 이상의 락토바실러스 람노시스 또는 락토바실러스 파라카세이 균주의 농도는 상기 식품, 먹이 또는 약학적 제품 기준 1×10^6 cfu/g 이상, 좋기로는 5×10^6 cfu/g 이상, 가장 좋기로는 1×10^8 cfu/g 이상, 또는 1×10^6 cfu/ml 이상, 좋기로는 5×10^6 cfu/ml 이상, 가장 좋기로는 1×10^8 cfu/ml 이상, 또는 상기 식품, 먹이 또는 약학적 제품의 표면 기준 1×10^5 cfu/cm² 이상, 좋기로는 5×10^5 cfu/cm² 이상, 가장 좋

기로는 1×10^7 cfu/cm² 이상이다.

- [0089] 상기 식품, 먹이 또는 약학적 제품이 하나 이상의 락토바실러스 람노시스 균주 및 하나 이상의 락토바실러스 파라카세이 균주를 포함하는 조성물의 첨가에 의하여 제조되는 경우, 상기 하나 이상의 락토바실러스 람노시스 균주와 상기 하나 이상의 락토바실러스 파라카세이 균주의 농도는 각각 상기 식품, 먹이 또는 약학적 제품 기준 1×10^6 cfu/g 이상이거나 각각 1×10^6 cfu/ml 이상, 또는 상기 식품, 먹이 또는 약학적 제품 표면 기준 각각 1×10^5 cfu/cm² 이상이다. 종기로는, 상기 하나 이상의 락토바실러스 람노시스 균주와 상기 하나 이상의 락토바실러스 파라카세이 균주의 농도는 각각 상기 식품, 먹이 또는 약학적 제품 기준 5×10^6 cfu/g 이상이거나 각각 5×10^6 cfu/ml 이상, 또는 상기 식품, 먹이 또는 약학적 제품 표면 기준 각각 5×10^5 cfu/cm² 이상이다. 또 다른 실시 상태에 있어서, 상기 하나 이상의 락토바실러스 람노시스 균주와 상기 하나 이상의 락토바실러스 파라카세이 균주의 농도는 각각 상기 식품, 먹이 또는 약학적 제품 기준 1×10^8 cfu/g 이상이거나 각각 1×10^8 cfu/ml 이상, 또는 상기 식품, 먹이 또는 약학적 제품 표면 기준 각각 1×10^7 cfu/cm² 이상이다.
- [0090] 양호한 실시 상태에 있어서, 상기 제조 파라미터들은, 제조 중에는 상기 하나 이상의 락토바실러스 람노시스 균주 및 상기 하나 이상의 락토바실러스 파라카세이 균주의 농도가 증가하거나 일정하게 유지되도록 제어된다.
- [0091] 본 발명에 따른 항균 조성물은, 배합 가능한 식품, 먹이 또는 약학적 제품과 혼합 및/또는 그에 도포함으로써 가장 쉽게 사용되지만, 또한 고체 식품 제품의 표면 또는 이러한 제품의 내부, 예컨대 주입에 의하여 처리하는 데 효과적이어야 한다. 또 다른 실시 상태에 있어서, 상기 조성물은 마리네이트, 브레딩, 시즈닝 럽, 글레이즈, 착색제 혼합물, 등등으로 활용될 수 있고, 핵심 기준은 상기 항균 조성물이 박테리아 분해 및 효모들과 곰팡이들로 오염되는 표면에서 이용 가능하다는 것이다. 또 다른 실시 상태에 있어서, 상기 조성물은, 상기 조성물을 식품 패키징에 도포하여 그 후 그 패키징을 식품 표면에 도포되도록 함으로써 식품 표면과 간접적으로 접촉될 수 있다. 사용되는 최적량은 처리될 특정 식품 제품에 대한 조성물과 상기 식품 표면에 상기 조성물을 적용하는 데 사용되는 방법에 달려있을 것이나, 간단한 시험으로 결정될 수 있다.
- [0092] 더욱 양호한 실시 상태에 있어서, 상기 방법은 하나 이상의 발효 단계들을 포함하고, 상기 항균 조성물은 이러한 하나 이상의 발효 단계들 이전, 도중 또는 이후에 상기 식품, 먹이 또는 약학적 제품에 첨가될 수 있다.
- [0093] 더더욱 양호한 실시 상태에 있어서, 상기 방법은 밀크 기질을 락토바실러스, 스트렙토코쿠스, 락토코쿠스 및 류코노스톡로부터 선택되는 속의 균주 하나 이상, 예컨대 하나 이상의 락토바실러스 불가리쿠스 균주와 하나 이상의 스트렙토코쿠스 써모필러스 균주 또는 예컨대 하나 이상의 락토코쿠스 락티스 아종 락티스 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) 균주, 하나 이상의 류코노스톡 메센테로이데스 아종 크레모리스 (*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*) 균주와 하나 이상의 락토코쿠스 락티스 아종 디아세틸락티스 (*Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*) 균주를 포함하는 스타터 배양체로 발효시키는 단계들을 포함한다.
- [0094] 본 발명의 마지막 관점은 수탁번호 DSM24616으로 독일생물자원센터 (DSMZ)에 기탁된 락토바실러스 람노시스 CHCC12697 균주 또는 그 돌연변이 균주, 수탁번호 DSM24652로 독일생물자원센터 (DSMZ)에 기탁된 락토바실러스 람노시스 CHCC14226 균주 또는 그 돌연변이 균주 및 수탁번호 DSM24651으로 독일생물자원센터 (DSMZ)에 기탁된 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777 균주 또는 그 돌연변이 균주에 관한 것이고, 여기서 상기 돌연변이 균주들은 개시재로서 상기 기탁된 균주들을 이용하여 얻는 것이다.
- [0095] 상기 기탁된 균주를 개시재로서 사용하여, 숙련자가 관용적인 돌연변이화 방법 또는 재분리 기법에 의하여 일상적으로 본 발명에서 설명하고 있는 관련 특성들 및 이점을 보유하는 추가적인 돌연변이 또는 그 유도체들을 얻을 수 있다는 것은 숙련자에게 명확하다. 따라서, 제1 관점의 "그의 돌연변이"라는 용어는 개시재로서 상기 기탁된 균주를 사용하여 얻어지는 돌연변이 균주에 관한 것이다.
- [0096] 비제한적 실시예의 방식으로, 본 발명의 실시 상태들이 이하에 개시된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0097] **실시예**
- [0098] **실시예 1:** 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777 및 락토바실러스 람노시스 CHCC12697 단독 및 이들을 조합한, 여러 가지 효모 및 곰팡이 오염체에 대항하는 저해 효과에 대한 반정량적 (semi-quantitative) 측정

- [0099] 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777 및 락토바실러스 람노서스 CHCC12697 단독 및 이들 조합의 저해 효과에 대한 반정량적 측정 시험을 위하여, 생치즈의 제조 공정 및 제품과 닮은 아가-실험이 사용되었다.:
- [0100] 전지 (3.5% w/v) 균질화유를 79±1℃에서 20 초간 열처리하고 즉시 냉각하였다. 시판 스타터 배양체 (Chr. Hansen A/S, Denmark로부터 구득한 F-DVS CHN- 19)를 0.1 u/L로 접종하고, 접종된 밀크를 220 ml 보틀에 분주하였다. 여러 보틀을 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777 및/또는 락토바실러스 람노서스 CHCC12697로 최종 농도 5x10⁶ CFU/ml로 접종하고, 하나의 보틀은 레퍼런스로 사용하여 스타터 배양체 만으로 접종하였다. 또한, 산성화 속도에 대한 표식을 얻고 뒤이어 성장하는 표적 효모들과 곰팡이들을 쉽게 검출할 수 있게 하여 주는 청색/녹색의 배지를 확인하기 위하여 pH-표지자 브롬크레솔 퍼플 및 브롬크레솔 그린 5%를 첨가하였다. 모든 보틀을 29±1℃의 수조에서 배양하고 이 조건에서 pH 4.60±0.1에 도달할 때까지 발효시켰다. 발효 후, 보틀들을 즉시 얼음 상에서 냉각시키고 응결을 끊기 위하여 격렬히 흔들었다. 그 후, 상기 발효유를 40℃ 온도까지 데우고, 녹여서 60℃까지 식힌 40 ml의 5% 멸균 아가 용액을 첨가하였다. 이 발효유 용액과 아가를 그 후 멸균 펠트리 디쉬에 부어 플레이트를 30 분간 LAF 벤치에서 건조시켰다.
- [0101] 효모 클리베로마이세스 마르시아누스, 피치아 페르멘탄스, 야로위아 리폴리티카 및 칸디다 사케 각각에 대하여 선별된 효모들 및 곰팡이들을 10⁴, 10³ 및 10² CFU/스폿의 농도로 스폿팅하였다. 곰팡이 페니실리움 날지오벤스, 뮤코르 아종, 페니실리움 코문 및 클라디오스포리움 아종 각각에 대하여 완전히 자란 포자 현탁물을 1000, 100, 10배 희석하거나, 비희석물을 사용하였다. 플레이트를 7±1℃에서 배양시키고 규칙적으로 효모와 곰팡이들의 성장을 평가하였다.
- [0102] 아가-실험의 결과를 도 1에 나타내었고, 이것은 모든 시험된 효모들 및 곰팡이들이 스타터 배양체만으로 발효시킨 밀크로 만들어진 아가 플레이트 상에서 잘 자란다는 것을 보여준다 (레퍼런스). 그러나, 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777 또는 락토바실러스 람노서스 CHCC12697가 밀크 발효 중에 존재하였을 때, 그 결과물 플레이트는 모든 농도에서 첨가된 K. 마르시아누스와 Y. 리폴리티카의 성장을 방해하였다. 또한, 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777 또는 락토바실러스 람노서스 CHCC12697가 밀크 발효 중에 존재하였을 때, 플레이트 상에 스폿팅된 모든 곰팡이에 대하여 현저한 저해가 관찰되었다. 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777 또는 락토바실러스 람노서스 CHCC12697가 단독으로 첨가된 어떤 경우에도 P. 페르멘탄스 또는 C. 사케 균주에 대한 저해 효과를 야기하는 것으로 보이지는 않았다. 그러나, 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777과 락토바실러스 람노서스 CHCC12697가 밀크의 발효 중에 양자 모두 존재하는 경우 낮은 농도인 10² 및 10³ CFU/스폿으로 스폿팅되었을 때 P. 페르멘탄스의 성장 저해가 관찰되었고, 곰팡이 클라디오스포리움 아종 뿐 아니라 뮤코르 아종은 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777 또는 락토바실러스 람노서스 CHCC12697 균주 각각이 단독으로 첨가된 경우보다 더욱 저해되었다. 이러한 결과는 두 균주 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777과 락토바실러스 람노서스 CHCC12697의 시너지적 항진균 효과를 보여주는 것이다.
- [0103] **실시예 2:** 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777 및 락토바실러스 람노서스 CHCC12697 단독 및 이들을 조합한, 야로위아 리폴리티카에 대항하는 저해 효과에 대한 정량적 측정
- [0104] 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777 및 락토바실러스 람노서스 CHCC12697 단독 및 이들 조합의 저해 효과에 대한 정량적 측정 시험을 위하여, 생치즈의 제조 공정 및 제품과 닮은 실험이 사용되었다.:
- [0105] 전지 (3.5% w/v) 균질화유를 79±1℃에서 20 초간 열처리하고 즉시 냉각하였다. 시판 스타터 배양체 (Chr. Hansen A/S, Denmark로부터 구득한 F-DVS CHN- 19)를 0.1 u/L로 접종하고, 접종된 밀크를 1 l 보틀에 분주하였다. 여러 보틀을 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777 및/또는 락토바실러스 람노서스 CHCC12697로 최종 농도 5x10⁶ CFU/ml로 접종하고, 하나의 보틀은 레퍼런스로 사용하여 스타터 배양체 만으로 접종하였다. 또한, 2개의 보틀을 HOLDBAC™ YM-B (50 DCU/100L; Danisco A/S, Denmark) 또는 HOLDBAC™ YM-C (20 DCU/100L; Danisco A/S, Denmark)로, CHN-19 스타터 배양체와 함께 접종하였다. 모든 보틀을 29±1℃의 수조에서 배양하고 이 조건에서 pH 4.65±0.05에 도달할 때까지 발효시켰다. 발효 후, 보틀들을 즉시 얼음 상에서 냉각시키고 응결을 끊기 위하여 격렬히 흔들었다.
- [0106] 오염체로서 미리 생치즈 제품으로부터 단리시켜 둔 야로위아 리폴리티카로의 접종을 위하여 각 보틀의 내용물을 작은 플라스틱 컵으로 분주하였다. 2개의 개별적인 컵을 1 부피% (v/w)로 접종시켜 발효유 제품에서 Y. 리폴리티카의 최종 오염 수준이 대략 1x10² CFU/g에 이르게 하였다. 플라스틱 컵을 밀봉하고 8±1℃에서 보관하였다. 살라인 펄톤에서 적당히 10배 희석한 것을 이스트 글루코오스 클로람페니콜 (YGC) 아가에 도달한 후 25℃에서 5

일간 호기 배양함으로써 상기 발효유 제품의 Y. 리폴리티카 오염 수준을 규칙적으로 샘플링하였다. 또한, 다양한 발효유 시료들의 pH를 규칙적으로 보관 내내 측정하였다.

[0107] 도 2에 나타난 바와 같이, 발효 전 스타터 배양체 CHN-19와 함께 단일 균주로서 사용되었을 때 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777 및 락토바실러스 람노서스 CHCC12697 양자의 균주 모두는 그 존재시 Y. 리폴리티카의 생장이 저해되었다. 양자의 균주 모두는 HOLDBAC™ YM-B 및 HOLDBAC™ YM-C보다 매우 우수한 저해를 나타내었다. 또한, 각각의 균주가 단독으로 사용된 저해 효과와 비교하여, 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777과 락토바실러스 람노서스 CHCC12697가 조합하여 사용되었을 때 시너지적 저해 효과가 밝혀졌다. 조합하여 사용된 경우, 균주 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777과 락토바실러스 람노서스 CHCC12697은 발효유 제품 중 Y. 리폴리티카의 유도기 뿐 아니라 최대 세포수 양자 모두에 극적인 영향을 미쳤고 이러한 시너지적 효과는 이들 제품 유형의 유통기한 연장에 기여할 수 있다.

[0108] **실시예 3:** 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777 및 락토바실러스 람노서스 CHCC14226 단독 및 이들을 조합한, 여러 가지 효모 및 곰팡이 오염체에 대항하는 저해 효과에 대한 반정량적 (semi-quantitative) 측정

[0109] 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777 및 락토바실러스 람노서스 CHCC14226 단독 및 이들 조합의 저해 효과에 대한 반정량적 측정 시험을 위하여, 생치즈의 제조 공정 및 제품과 닮은 아가-실험이 사용되었다.:

[0110] 전지 (3.5% w/v) 균질화유를 79±1°C에서 20 초간 열처리하고 즉시 냉각하였다. 시판 스타터 배양체 (F-DVS CHN- 19)를 0.1 u/L로 접종하고, 접종된 밀크를 220 ml 보트에 분주하였다. 여러 보트를 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777 및/또는 락토바실러스 람노서스 CHCC14226로 최종 농도 5x10⁶ CFU/ml로 접종하고, 하나의 보트는 레퍼런스로 사용하여 스타터 배양체 만으로 접종하였다. 또한, 산성화 속도에 대한 표식을 얻고 뒤이어 생장하는 표적 효모들과 곰팡이들을 쉽게 검출할 수 있게 하여 주는 청색/녹색의 배지를 확인하기 위하여 pH-표지자 브롬크레솔 퍼플 및 브롬크레솔 그린 5%를 첨가하였다. 모든 보트를 29±1°C의 수조에서 배양하고 이 조건에서 pH 4.60±0.1에 도달할 때까지 발효시켰다. 발효 후, 보트들을 즉시 얼음 상에서 냉각시키고 응결을 끊기 위하여 격렬히 흔들었다. 그 후, 상기 발효유를 40°C 온도까지 데우고, 녹여서 60°C까지 식힌 40 ml의 5% 멸균 아가 용액을 첨가하였다. 이 발효유 용액과 아가를 그 후 멸균 펠트리 디쉬에 부어 플레이트를 30 분간 LAF 벤치에서 건조시켰다.

[0111] 효모 클리베로마이세스 마르시아누스, 피치아 페르멘탄스, 야로위아 리폴리티카 및 칸디다 사케 각각에 대하여 선별된 효모들 및 곰팡이들을 10⁴, 10³ 및 10² CFU/스폿의 농도로 스폿팅하였다. 곰팡이 페니실리움 날지오벤스, 뮤코르 아종, 페니실리움 코문 및 클라디오스포리움 아종 각각에 대하여 완전히 자란 포자 현탁물을 1000, 100, 10배 희석하거나, 비희석물을 사용하였다. 플레이트를 7±1°C에서 배양시키고 규칙적으로 효모와 곰팡이들의 생장을 평가하였다.

[0112] 아가-실험의 결과를 도 3에 나타내었고, 이것은 모든 시험된 효모들 및 곰팡이들이 스타터 배양체만으로 발효시킨 밀크로 만들어진 아가 플레이트 상에서 잘 자란다는 것을 보여준다 (레퍼런스). 그러나, 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777가 밀크 발효 중에 존재하였을 때, 그 결과물 플레이트는 모든 농도에서 첨가된 K. 마르시아누스와 Y. 리폴리티카의 생장을 방해하였다. 락토바실러스 람노서스 CHCC14226에 대하여는, 그 결과물 플레이트 역시 첨가된 모든 농도에서 K. 마르시아누스 뿐 아니라, 낮은 농도로 첨가된 2개의 Y. 리폴리티카의 생장 역시 방해하였다. 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777 또는 락토바실러스 람노서스 CHCC14226가 단일 균주로서 첨가되었을 때, 이들은 또한 낮은 농도로 첨가된 P. 페르멘탄스에 대하여 약간의 저해 효과를 나타내는 것으로 보였다. 그러나, 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777 및 락토바실러스 람노서스 CHCC14226 양자 모두가 밀크의 발효 중에 존재하였을 때, P. 페르멘탄스의 생장은 가장 낮은 농도인 10² CFU/스폿으로 첨가된 경우 방해가 일어났다. 곰팡이에 대하여는, 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777 또는 락토바실러스 람노서스 CHCC14226가 밀크 발효 중에 존재하였을 때 현저한 저해가 관찰되었다. 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777 및 락토바실러스 람노서스 CHCC14226의 조합을 사용한 경우, 클라디오스포리움 아종의 생장은 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777 또는 락토바실러스 람노서스 CHCC14226 균주 어느 하나가 단독으로 첨가되었던 경우보다 더욱 저해되었다. 이들 결과는 두 균주 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777 및 락토바실러스 람노서스 CHCC14226의 시너지적 항진균 효과를 보여주는 것이다.

[0113] **실시예 4:** 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777 및 락토바실러스 람노서스 CHCC14226 단독 및 이들을 조합한, 클리베로마이세스 마르시아누스에 대항하는 저해 효과에 대한 정량적 측정

- [0114] 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777 및 락토바실러스 람노서스 CHCC14226 단독 및 이들 조합의 저해 효과에 대한 정량적 측정 시험을 위하여, 생치즈의 제조 공정 및 제품과 닮은 실험이 사용되었다.:
- [0115] 전지 (3.5% w/v) 균질화유를 79±1°C에서 20 초간 열처리하고 즉시 냉각하였다. 시판 스타터 배양체 (F-DVS CHN- 19)를 0.1 u/L로 접종하고, 접종된 밀크를 1 l 보틀에 분주하였다. 여러 보틀을 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777 및/또는 락토바실러스 람노서스 CHCC14226로 최종 농도 5x10⁶ CFU/ml으로 접종하고, 하나의 보틀은 레퍼런스로 사용하여 스타터 배양체 만으로 접종하였다. 또한, 2개의 보틀을 HOLDBAC™ YM-B (50 DCU/100L; Danisco A/S, Denmark) 또는 HOLDBAC™ YM-C (20 DCU/100L; Danisco A/S, Denmark)로, CHN-19 스타터 배양체와 함께 접종하였다. 모든 보틀을 29±1°C의 수조에서 배양하고 이 조건에서 pH 4.65±0.05에 도달할 때까지 발효시켰다. 발효 후, 보틀들을 즉시 얼음 상에서 냉각시키고 응결을 끊기 위하여 격렬히 흔들었다.
- [0116] 오염체로서 미리 생치즈 제품으로부터 단리시커 둔 클리베로마이세스 마르시아누스 효모 균주의 접종을 위하여 각 보틀의 내용물을 작은 플라스틱 컵으로 분주하였다. 2개의 개별적인 컵을 1 부피% (v/w)로 접종시켜 발효유 제품에서 K. 마르시아누스의 최종 오염 수준이 대략 1x10² CFU/g에 이르게 하였다. 플라스틱 컵을 밀봉하고 8±1°C에서 보관하였다. 살라인 펄프에서 적당히 10배 희석한 것을 이스트 글루코오스 클로람페니콜 (YGC) 아가에 도달한 후 25°C에서 3~5일간 호기 배양함으로써 상기 발효유 제품의 K. 마르시아누스 오염 수준을 규칙적으로 샘플링하였다. 또한, 다양한 발효유 시료들의 pH를 규칙적으로 보관 내내 측정하였다.
- [0117] 도 4에 나타난 바와 같이, 발효 전 스타터 배양체 CHN-19와 함께 단일 균주로서 사용되었을 때 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777 및 락토바실러스 람노서스 CHCC14226 양자의 균주 모두는 그 존재시 K. 마르시아누스의 생장이 저해되었다. 실시예 2에 나타난 바와 같이, 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777은 또한 HOLDBAC™ YM-B 및 HOLDBAC™ YM-C보다 매우 우수한 K. 마르시아누스 저해를 나타낸 반면, 락토바실러스 람노서스 CHCC14226에 의하여 유발되는 저해는 HOLDBAC™ 배양체와 동일한 수준임이 밝혀졌다. 각각의 균주가 단독으로 사용된 저해 효과와 비교하여, 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777과 락토바실러스 람노서스 CHCC14226이 조합하여 사용되었을 때 시너지적 저해 효과가 밝혀졌다. 조합하여 사용된 경우, 균주 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777과 락토바실러스 람노서스 CHCC14226은 발효유 제품 중 K. 마르시아누스의 느린 생장이라는 결과를 낳았고, 그러므로 이들 제품 유형의 유통 기한 연장에 기여할 수 있다.
- [0118] **실시예 5:** 락토바실러스 파라카세이 CHCC14676 및 락토바실러스 람노서스 CHCC5366 단독 및 이들을 조합한, 여러 가지 곰팡이 오염체에 대항하는 저해 효과에 대한 반정량적 (semi-quantitative) 측정
- [0119] 락토바실러스 파라카세이 CHCC14676 및 락토바실러스 람노서스 CHCC5366 단독 및 이들 조합의 저해 효과에 대한 반정량적 측정 시험을 위하여, 요거트의 제조 공정 및 제품과 닮은 아가-실험이 사용되었다.:
- [0120] 균질화유 (1.5% 지방 w/v)를 95°C에서 5 분간 열처리하고 즉시 냉각하였다. 시판 스타터 배양체 (Chr. Hansen A/S, Denmark)로부터 구득한 F-DVS YC-350)를 0.02%로 접종하고, 접종된 밀크를 220 ml 보틀에 분주하였다. 상기 보틀들을 각각 락토바실러스 파라카세이 CHCC14676, 락토바실러스 람노서스 CHCC5366 및 이 두 균주들의 조합으로 최종 농도 1x10⁷ CFU/ml로 추가 접종하였다. 스타터 배양체 외에 추가의 접종이 없는 하나의 보틀을 레퍼런스로 사용하였다. 또한, 산성화 속도에 대한 표식을 얻고 뒤이어 성장하는 표적 효모들과 곰팡이들을 쉽게 검출할 수 있게 하여 주는 청색/녹색의 배지를 확인하기 위하여 pH-표지자 브롬크레솔 피플 및 브롬크레솔 그린 5%를 모든 보틀에 첨가하였다. 모든 보틀을 43±1°C의 수조에서 배양하고 이 조건에서 pH 4.60±0.1에 도달할 때까지 발효시켰다. 발효 후, 보틀들을 즉시 얼음 상에서 냉각시키고 응결을 끊기 위하여 격렬히 흔들었다. 그 후, 상기 발효유를 40°C 온도까지 데우고, 녹여서 60°C까지 식힌 40 ml의 5% 멸균 아가 용액을 첨가하였다. 이 발효유 용액과 아가를 그 후 멸균 페트리 디쉬에 부어 플레이트를 30 분간 LAF 벤치에서 건조시켰다.
- [0121] 선별된 곰팡이들 페니실리움 날지오베세 (10x), 페니실리움 코문 (100x), 아스페르길루스 베르시콜로르 (100x) 및 페니실리움 크루스토섬 (100x)의 완전히 자란 포자 현탁물을 적절히 희석하여 플레이트에 스폿팅하였다. 이 플레이트를 7°C에서 배양하고 적절한, 규칙적인 인터벌로 곰팡이의 성장을 평가하였다.
- [0122] 아가-실험의 결과를 도 5에 나타내었고, 이것은 모든 시험된 곰팡이들이 스타터 배양체만으로 발효시킨 밀크로 만들어진 아가 플레이트 상에서 잘 자란다는 것을 보여준다 (레퍼런스). 그러나, 락토바실러스 파라카세이 CHCC14676 또는 락토바실러스 람노서스 CHCC5366가 밀크 발효 중에 존재하였을 때, 그 결과물 플레이트는 모든

곰팡이들의 성장을 방해하였다. 또한, 락토바실러스 파라카세이 CHCC14676 및 락토바실러스 람노서스 CHCC5366 이 조합되어 밀크 발효 중에 존재하였을 때, 플레이트에 스폿팅된 페니실리움 코문, 아스페르길루스 베르시콜로르 및 페니실리움 크루스토섬에 대하여 현저한 저해가 관찰되었다.

- [0123] **실시예 6:** 락토바실러스 파라카세이 CHCC14676 및 락토바실러스 람노서스 CHCC14226 단독 및 이들을 조합한, 여러 가지 곰팡이 오염체에 대항하는 저해 효과에 대한 반정량적 (semi-quantitative) 측정
- [0124] 락토바실러스 파라카세이 CHCC14676 및 락토바실러스 람노서스 CHCC14226 단독 및 이들 조합의 저해 효과에 대한 반정량적 측정 시험을 위하여, 요거트의 제조 공정 및 제품과 닮은 아가-실험이 사용되었다.:
- [0125] 균질화유 (1.5% 지방 w/v)를 95°C에서 5 분간 열처리하고 즉시 냉각하였다. 시판 스타터 배양체 (Chr. Hansen A/S, Denmark로부터 구득한 Yoflex® Mild)를 0.02%로 접종하고, 접종된 밀크를 220 ml 보트에 분주하였다. 상기 보틀들을 각각 락토바실러스 파라카세이 CHCC14676, 락토바실러스 람노서스 CHCC14226 및 이 두 균주들의 조합으로 최종 농도 1×10^7 CFU/ml로 추가 접종하였다. 스타터 배양체 외에 추가의 접종이 없는 하나의 보틀을 레퍼런스로 사용하였다. 또한, 산성화 속도에 대한 표식을 얻고 뒤이어 성장하는 표적 효모들과 곰팡이들을 쉽게 검출할 수 있게 하여 주는 청색/녹색의 배지를 확인하기 위하여 pH-표지자 브롬크레솔 퍼플 및 브롬크레솔 그린 5%를 모든 보트에 첨가하였다. 모든 보틀을 $43 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 수조에서 배양하고 이 조건에서 pH 4.60 ± 0.1 에 도달할 때까지 발효시켰다. 발효 후, 보틀들을 즉시 얼음 상에서 냉각시키고 응결을 끊기 위하여 격렬히 흔들었다. 그 후, 상기 발효유를 40°C 온도까지 데우고, 녹여서 60°C까지 식힌 40 ml의 5% 멸균 아가 용액을 첨가하였다. 이 발효유 용액과 아가를 그 후 멸균 페트리 디쉬에 부어 플레이트를 30 분간 LAF 벤치에서 건조시켰다.
- [0126] 선별된 곰팡이들 페니실리움 날지오베세 (10x), 페니실리움 코문 (100x), 아스페르길루스 베르시콜로르 (100x) 및 페니실리움 크루스토섬 (100x)의 완전히 자란 포자 현탁물을 적절히 희석하여 플레이트에 스폿팅하였다. 이 플레이트를 7°C에서 배양하고 적절한, 규칙적인 인터벌로 곰팡이의 성장을 평가하였다.
- [0127] 아가-실험의 결과를 도 6에 나타내었고, 이것은 모든 시험된 곰팡이들이 스타터 배양체만으로 발효시킨 밀크로 만들어진 아가 플레이트 상에서 잘 자란다는 것을 보여준다 (레퍼런스). 그러나, 락토바실러스 파라카세이 CHCC14676 또는 락토바실러스 람노서스 CHCC14226이 밀크 발효 중에 존재하였을 때, 그 결과물 플레이트는 모든 곰팡이들의 성장을 방해하였다. 또한, 락토바실러스 파라카세이 CHCC14676 및 락토바실러스 람노서스 CHCC14226 이 조합되어 밀크 발효 중에 존재하였을 때, 플레이트에 스폿팅된 페니실리움 코문, 아스페르길루스 베르시콜로르 및 페니실리움 크루스토섬에 대하여 현저한 저해가 관찰되었다.
- [0128] **실시예 7:** 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777 및 락토바실러스 람노서스 CHCC14226 단독 및 이들을 조합한, 여러 가지 곰팡이 오염체에 대항하는 저해 효과에 대한 반정량적 (semi-quantitative) 측정
- [0129] 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777 및 락토바실러스 람노서스 CHCC14226 단독 및 이들 조합의 저해 효과에 대한 반정량적 측정 시험을 위하여, 요거트의 제조 공정 및 제품과 닮은 아가-실험이 사용되었다.:
- [0130] 균질화유 (1.5% 지방 w/v)를 95°C에서 5 분간 열처리하고 즉시 냉각하였다. 시판 스타터 배양체 (Chr. Hansen A/S, Denmark로부터 구득한 F-DVS YC-350)를 0.02%로 접종하고, 접종된 밀크를 220 ml 보트에 분주하였다. 상기 보틀들을 각각 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777, 락토바실러스 람노서스 CHCC14226 및 이 두 균주들의 조합으로 최종 농도 1×10^7 CFU/ml로 추가 접종하였다. 스타터 배양체 외에 추가의 접종이 없는 하나의 보틀을 레퍼런스로 사용하였다. 또한, 산성화 속도에 대한 표식을 얻고 뒤이어 성장하는 표적 효모들과 곰팡이들을 쉽게 검출할 수 있게 하여 주는 청색/녹색의 배지를 확인하기 위하여 pH-표지자 브롬크레솔 퍼플 및 브롬크레솔 그린 5%를 모든 보트에 첨가하였다. 모든 보틀을 $43 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 수조에서 배양하고 이 조건에서 pH 4.60 ± 0.1 에 도달할 때까지 발효시켰다. 발효 후, 보틀들을 즉시 얼음 상에서 냉각시키고 응결을 끊기 위하여 격렬히 흔들었다. 그 후, 상기 발효유를 40°C 온도까지 데우고, 녹여서 60°C까지 식힌 40 ml의 5% 멸균 아가 용액을 첨가하였다. 이 발효유 용액과 아가를 그 후 멸균 페트리 디쉬에 부어 플레이트를 30 분간 LAF 벤치에서 건조시켰다.
- [0131] 선별된 곰팡이들 페니실리움 날지오베세 (10x), 페니실리움 코문 (100x), 아스페르길루스 베르시콜로르 (100x) 및 페니실리움 크루스토섬 (100x)의 완전히 자란 포자 현탁물을 적절히 희석하여 플레이트에 스폿팅하였다. 이 플레이트를 7°C에서 배양하고 적절한, 규칙적인 인터벌로 곰팡이의 성장을 평가하였다.
- [0132] 아가-실험의 결과를 도 7에 나타내었고, 이것은 모든 시험된 곰팡이들이 스타터 배양체만으로 발효시킨 밀크로 만들어진 아가 플레이트 상에서 잘 자란다는 것을 보여준다 (레퍼런스). 그러나, 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777 또는 락토바실러스 람노서스 CHCC14226이 밀크 발효 중에 존재하였을 때, 그 결과물 플레이트는 모든

곰팡이들의 성장을 방해하였다. 또한, 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777 및 락토바실러스 람노시스 CHCC14226 이 조합되어 밀크 발효 중에 존재하였을 때, 플레이트에 스폿팅된 모든 곰팡이들에 대하여 현저한 저해가 관찰되었다.

- [0133] **실시예 8:** 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777을 이용한 사우어 크림에 대한 시도적 연구
- [0134] 여러 가지 곰팡이들 P. 코문, A. 베르시콜로르, P. 브레비콤팩툼, P. 크루스토섬 및 P. 글라브룸에 대한 단일 균주로서의 락토바실러스 파라카세이 균주 CHCC12777의 저해 효과를 육안 평가하기 위하여, 사우어 크림을 제조하였다:
- [0135] 살균된 고지방유를 헤테로발효 시판 스타터 배양체 (Chr. Hansen A/S, Denmark으로부터 구득한 F-DVS DSG-2000)를 이용하여 0.01%로 접종하였다. 이 밀크를 HOLDBAC™ YM-B (10 DCU/100 L) 또는 락토바실러스 람노시스 균주 CHCC12777 (5×10^6 CFU/g)로 추가 접종하고, 하나의 बै치를 레퍼런스로 사용, 스타터 배양체만으로 접종하였다.
- [0136] pH 4.60 ± 0.05 에 이를 때까지 밀크를 $28^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 발효시키고 사우어 크림을 후처리하였다. 이 사우어 크림을 교반하고 $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 까지 냉각하여 $7^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 에 보관하였다.
- [0137] 사우어 크림 제조 하루 후, 표면 오염체로서 여러 가지 곰팡이들을 표적 100 포자/스폿으로, 사우어 크림 표면 상 하나의 스폿으로 2개의 사우어 크림 컵에 접종하였다. $7^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 45일간 보관한 후 육안으로 곰팡이의 성장을 평가하였다.
- [0138] 사우어 크림 시험의 결과를 도 8에 나타내었고, 이것은 스타터 배양체 (꼭대기 행)으로만 또는 스타터 배양체와 함께 HOLDBAC™ YM-B (중간 행)로 발효된 밀크로부터 만들어진 사우어 크림 상에서 P. 코문 (M6), A. 베르시콜로르 (M7), P. 브레비콤팩툼 (M1), P. 크루스토섬 (M 10) 및 P. 글라브룸 (M8)이 잘 자람을 보여준다. 반면, 밀크 발효 중에 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777이 존재한 경우 (바닥 행) 시험된 모든 곰팡이들의 생장이 저해되었다.
- [0139] **실시예 9:** 락토바실러스 람노시스 CHCC12697을 이용한 트바로그에 대한 시도적 연구
- [0140] 뮤코르 아종에 대한 단일 균주로서의 락토바실러스 람노시스 균주 CHCC12697의 저해 효과를 육안 평가하기 위하여, 트바로그를 제조하였다:
- [0141] 살균된 저지방유를 시판 스타터 배양체 (Chr. Hansen A/S, Denmark으로부터 구득한 F-DVS CHN-19)를 이용하여 0.01%로 접종하였다. 이 밀크를 HOLDBAC™ YM-B (5 DCU/100 L) 또는 락토바실러스 람노시스 균주 CHCC12697 (5×10^6 CFU/g)로 추가 접종하고, 하나의 बै치를 레퍼런스로 사용, 스타터 배양체만으로 접종하였다.
- [0142] pH 4.60 ± 0.05 에 이를 때까지 밀크를 $28^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 발효시켰다. 스켈딩 온도는 약 $38\sim 40^\circ\text{C}$ 였다. 커드에서 수분을 제거한 후 30 분간 1 bar에서 가압하였다.
- [0143] 트바로그 제조 하루 후, 표면 오염체로서 뮤코르 아종을 표적 100 포자/스폿으로, 트바로그 (100 g) 표면상 3개의 스폿을 피펫팅함으로써 2개 접종하였다. $7^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 18일간 보관한 후 육안으로 곰팡이의 성장을 평가하였다.
- [0144] 트바로그 시험의 결과를 도 9에 나타내었고, 이것은 스타터 배양체 CHN-19만으로 발효된 밀크로부터 만들어진 트바로그 상에서 뮤코르 아종이 잘 자람을 보여준다 (Ref.). 또한 곰팡이는 스타터 배양체와 함께 HOLDBAC™ YM-B 배양체로 발효된 밀크로 만들어진 트바로그 상에서도 잘 자라고, 적은 양으로 스타터 배양체와 함께 HOLDBAC™ YM-C 배양체로 발효된 밀크로 만들어진 트바로그 상에서도 자란다. 그러나, 락토바실러스 람노시스 CHCC12697가 밀크의 발효 중에 존재한 경우, 뮤코르 아종의 보다 현저한 성장 저해가 관찰된다.
- [0145] **실시예 10:** 락토바실러스 람노시스 CHCC14226을 이용한 요거트에 대한 시도적 연구
- [0146] 여러 가지 곰팡이들 P. 브레비콤팩툼, P. 코문, A. 베르시콜로르 및 P. 크루스토섬에 대한 단일 균주로서의 락토바실러스 람노시스 균주 CHCC14226의 저해 효과를 육안 평가하기 위하여, 1.5% 지방 요거트를 제조하였다:
- [0147] 균질화유 (1.5% 지방)을 수조의 1 L 보틀에서 5 분간 $95^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 로 열처리하고 즉시 냉각시켰다. 시판 스타터 배양체 (Chr. Hansen A/S, Denmark으로부터 구득한 F-DVS YF-L901)를 0.02%로 접종하였다. 이 밀크를 HOLDBAC™

YM-B (20 DCU/100 L) 또는 락토바실러스 람노시스 균주 CHCC14226 (1×10^7 CFU/ml)로 추가 접종하고, 하나의 보틀을 레퍼런스로 사용, 스타터 배양체만으로 접종하였다.

- [0148] pH 4.60 ± 0.05 에 이를 때까지 밀크를 $43^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 발효시켰다. 결과물 요거트를 컵에 붓고 (100 g) $7^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 에 보관하였다.
- [0149] 요거트 제조 하루 후, 표면 오염체로서 여러 가지 곰팡이들을 표적 100 포자/스폿으로, 요거트 표면상 하나의 스폿으로 2개의 요거트 컵에 접종하였다. $7^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 45일간 보관한 후 육안으로 곰팡이의 성장을 평가하였다.
- [0150] 요거트 시험의 결과를 도 10에 나타내었고, 이것은 스타터 배양체 YF-L901 (꼭대기 행)으로만 또는 스타터 배양체와 함께 HOLDBAC™ YM-B (중간 행)로 발효된 밀크로부터 만들어진 요거트 상에서 P. 브레비콤팍툼 (M1), P. 코문 (M6), A. 베르시콜로르 (M7) 및 P. 크루스토섬 (M10)이 잘 자람을 보여준다. 반면, 밀크 발효 중에 락토바실러스 람노시스 균주 CHCC14226이 존재한 경우 (바닥 행) 시험된 모든 곰팡이들의 생장이 저해되었다.
- [0151] **실시예 11:** 트바로그에서 K. 락티스에 대한 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777의 저해 효과의 정량적 측정
- [0152] 단일 균주로서 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777의 K. 락티스에 대한 저해 효과의 정량적 평가를 위하여, 트바로그를 제조하였다:
- [0153] 살균된 저지방유를 시판 스타터 배양체 (Chr. Hansen A/S, Denmark으로부터 구득한 F-DVS CHN-19)를 이용하여 0.01%로 접종하였다. 이 밀크를 HOLDBAC™ YM-B (20 DCU/100 L) 또는 락토바실러스 파라카세이 CHCC12777 (5×10^6 CFU/g)로 추가 접종하고, 하나의 보틀을 레퍼런스로 사용, 스타터 배양체만으로 접종하였다.
- [0154] pH 4.60 ± 0.05 에 이를 때까지 밀크를 $28^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 발효시켰다. 스킨딩 온도는 약 $38\text{--}40^\circ\text{C}$ 였다. 커드에서 수분을 제거한 후 30 분간 1 bar에서 가압하였다.
- [0155] 트바로그 제조 다음날, 대략 10 g의 트바로그 시료 블록을 잘라내어 스톱마커 백 (stomacher bag)에 넣었다. 뒤이어, 가느다란 니들로 트바로그 내로 효모를 주입함으로써 0.1 ml의 효모 접종원을 10,000 CFU/ml로 2개씩 블록들에 접종하였다. 트바로그 주위로 백을 랩핑하고 밀봉 테스트하였다.
- [0156] 시료를 $7^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 보관하고, 1 g의 트바로그와 살라인 펩톤에서 적절히 추가 1배 희석한 것을 이스트 글루코오스 클로람페니콜 (YGC) 아가에 도말한 후 25°C 에서 5일간 호기 배양함으로써 K. 락티스 오염 수준을 적절한 인터벌로 분석하였다.
- [0157] 도 11에 나타낸 바와 같이, 발효 전 스타터 배양체 CHN-19와 함께 접종되었을 때 락토바실러스 파라카세이 균주 CHCC12777의 존재시 K. 락티스의 생장이 저해되었다. 락토바실러스 파라카세이 균주 CHCC12777는 시판 배양체 HOLDBAC™ YM-B보다 현저히 우수한 저해를 나타내었다.
- [0158] **실시예 12:** 트바로그에서 K. 락티스에 대한 락토바실러스 람노시스 CHCC12697의 저해 효과의 정량적 측정
- [0159] 단일 균주로서 락토바실러스 람노시스 CHCC12697의 K. 락티스에 대한 저해 효과의 정량적 평가를 위하여, 트바로그를 제조하였다:
- [0160] 살균된 저지방유를 시판 스타터 배양체 (Chr. Hansen A/S, Denmark으로부터 구득한 F-DVS CHN-19)를 이용하여 0.01%로 접종하였다. 이 밀크를 HOLDBAC™ YM-B (5 DCU/100 L) 또는 락토바실러스 람노시스 CHCC12697 (5×10^6 CFU/g)로 추가 접종하고, 하나의 보틀을 레퍼런스로 사용, 스타터 배양체만으로 접종하였다.
- [0161] pH 4.60 ± 0.05 에 이를 때까지 밀크를 $28^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 발효시켰다. 스킨딩 온도는 약 $38\text{--}40^\circ\text{C}$ 였다. 커드에서 수분을 제거한 후 30 분간 1 bar에서 가압하였다.
- [0162] 트바로그 제조 다음날, 대략 10 g의 트바로그 시료 블록을 잘라내어 스톱마커 백 (stomacher bag)에 넣었다. 뒤이어, 가느다란 니들로 트바로그 내로 효모를 주입함으로써 0.1 ml의 효모 접종원을 10,000 CFU/ml로 2개씩 블록들에 접종하였다. 트바로그 주위로 백을 랩핑하고 밀봉 테스트하였다.
- [0163] 시료를 $7^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 보관하고, 1 g의 트바로그와 살라인 펩톤에서 적절히 추가 1배 희석한 것을 이스트 글루코오스 클로람페니콜 (YGC) 아가에 도말한 후 25°C 에서 5일간 호기 배양함으로써 K. 락티스 오염 수준을 적절한 인터벌로 분석하였다.

- [0164] 도 11에 나타낸 바와 같이, 발효 전 스타터 배양체 CHN-19와 함께 접종되었을 때 락토바실러스 람노서스 균주 CHCC12697의 존재시 K. 락티스의 생장이 저해되었다. 락토바실러스 람노서스 균주 CHCC12697는 시판 배양체 HOLDBAC™ YM-B보다 현저히 우수한 저해를 나타내었다.
- [0165] **실시예 13:** 요거트에서 드마로마이세스 한세니이에 대한 락토바실러스 람노서스 CHCC14226의 저해 효과의 정량적 측정
- [0166] 단일 균주로서 락토바실러스 람노서스 CHCC14226의 D. 한세니이에 대한 저해 효과의 정량적 평가를 위하여, 요거트를 다음과 같이 제조하였다:
- [0167] 균질화유 (1.5% 지방)을 수조의 1 L 보틀에서 5 분간 95°C ± 1°C로 열처리하고 즉시 냉각시켰다. 시판 스타터 배양체 (Chr. Hansen A/S, Denmark으로부터 구매한 F-DVS YF-L901)를 0.02%로 접종하였다. 이 밀크를 HOLDBAC™ YM-B (20 DCU/100 L) 또는 락토바실러스 람노서스 균주 CHCC14226 (1x10⁷ CFU/ml)로 추가 접종하고, 하나의 보틀을 레퍼런스로서 사용, 스타터 배양체만으로 접종하였다.
- [0168] pH 4.60 ± 0.1에 이를 때까지 밀크를 43°C ± 1°C에서 발효시켰다. 결과물 요거트를 컵에 붓고 (100 g) 7°C ± 1°C에 보관하였다.
- [0169] 요거트 제조 다음날, 컵을 표적 20 CFU/g으로, 효모 1.00 ml/컵으로 2개씩 접종하였다. 효모를 요거트 내에 균일하게 분산시켰다. 뚜껑을 덮어 컵을 7°C ± 1°C에 보관하고 1 ml의 요거트와 살라인 펩톤에서 적절히 추가 1배 희석한 것을 이스트 글루코오스 클로람페니콜 (YGC) 아가에 도말한 후 25°C에서 5일간 호기 배양함으로써 D. 한세니이 오염 수준을 적절한 인터벌로 분석하였다.
- [0170] 도 12에 나타낸 바와 같이, 발효 전 스타터 배양체 YF-L901과 함께 접종되었을 때 락토바실러스 람노서스 균주 CHCC14226의 존재시 D. 한세니이의 생장이 저해되었다. 락토바실러스 람노서스 균주 CHCC14226는 시판 배양체 HOLDBAC™ YM-B보다 현저히 우수한 저해를 나타내었다.
- [0171] **기탁 및 전문가용 참조 사항**
- [0172] 본원의 출원인은 이하 언급되는 기탁된 미생물 시료가 특허 결정일자까지 전문가에게만 이용 가능할 것을 요구한다.
- [0173] 락토바실러스 람노서스 균주 CHCC12697은 독일생물자원센터 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig에 2011년 3월 1일에 기탁되었고, 수탁 번호는 다음과 같다: DSM 24616.
- [0174] 락토바실러스 람노서스 균주 CHCC14226은 독일생물자원센터 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig에 2011년 3월 15일에 기탁되었고, 수탁 번호는 다음과 같다: DSM 24652.
- [0175] 락토바실러스 파라카세이 균주 CHCC12777은 독일생물자원센터 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig에 2011년 3월 15일에 기탁되었고, 수탁 번호는 다음과 같다: DSM 24651.
- [0176] 기탁은 특허 절차상의 미생물기탁의 국제적 승인에 관한 부다페스트조약에 따라 이루어졌다.
- [0177] **참고문헌**
- [0178] US 2005/0095318 (Schwenninger et al.)
- [0179] WO 2004/041305 (Valio Ltd)
- [0180] Tharmaraj, N. & Shah, N.P. (2009) Antimicrobial effects of probiotic bacteria against selected species of yeasts and molds in cheese-based dips. International Journal of Food Science & Technology. 44: 1916- 1926.

수탁번호

[0181]

기탁기관명 : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

수탁번호 : DSM24616

수탁일자 : 20110301

기탁기관명 : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

수탁번호 : DSM24652

수탁일자 : 20110315

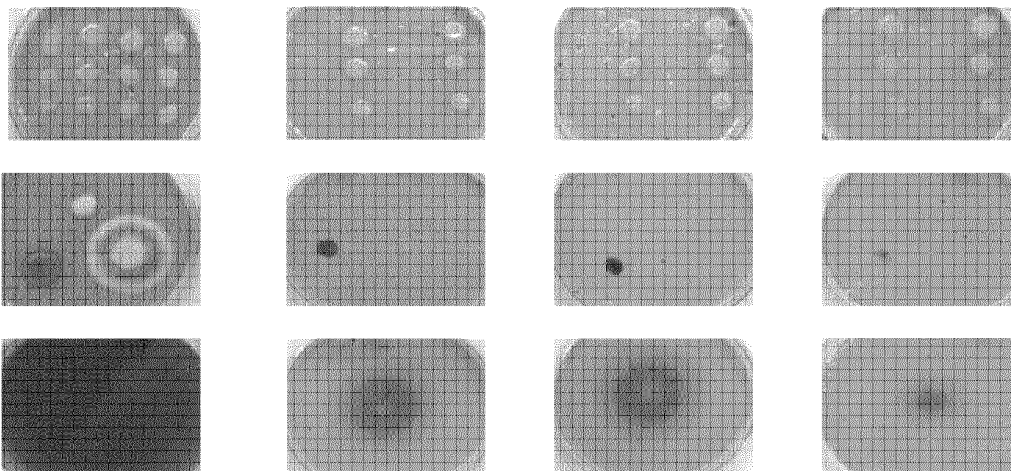
기탁기관명 : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

수탁번호 : DSM24651

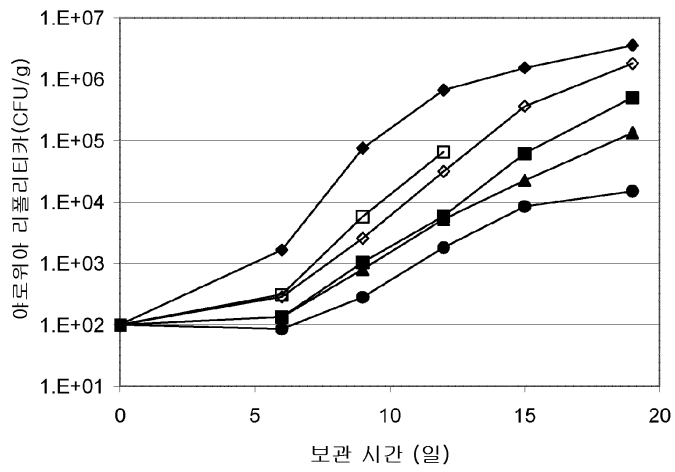
수탁일자 : 20110315

도면

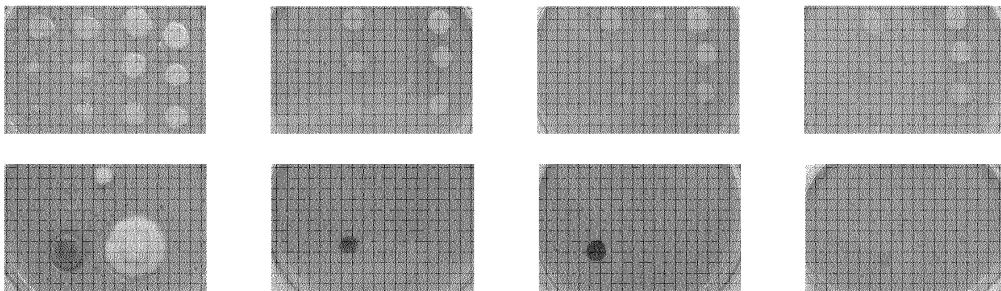
도면1



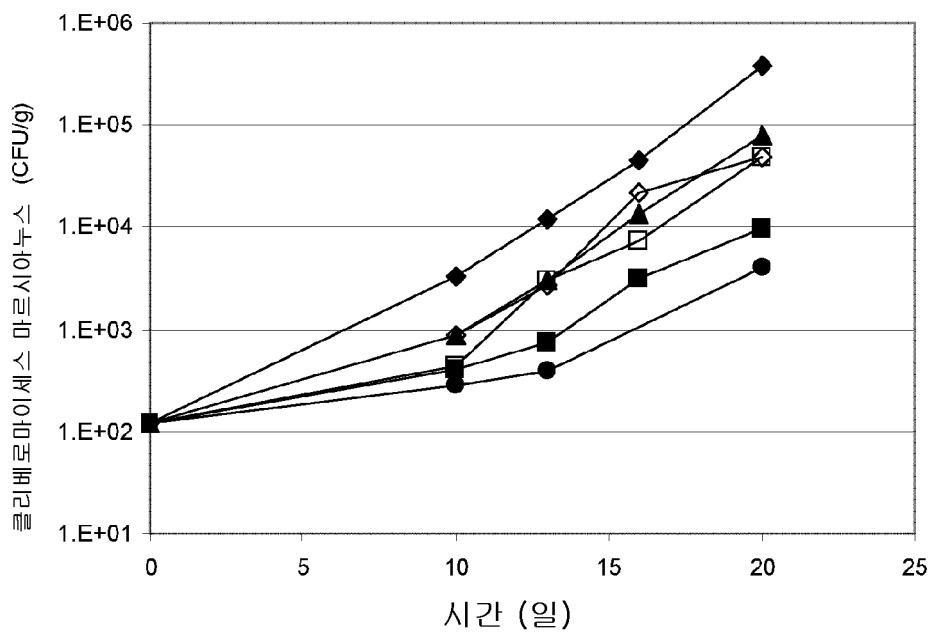
도면2



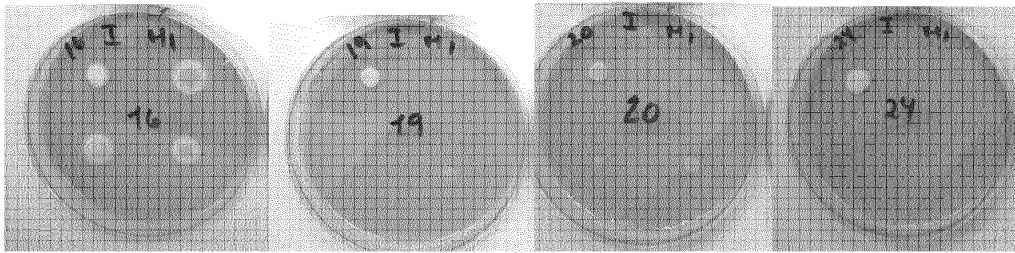
도면3



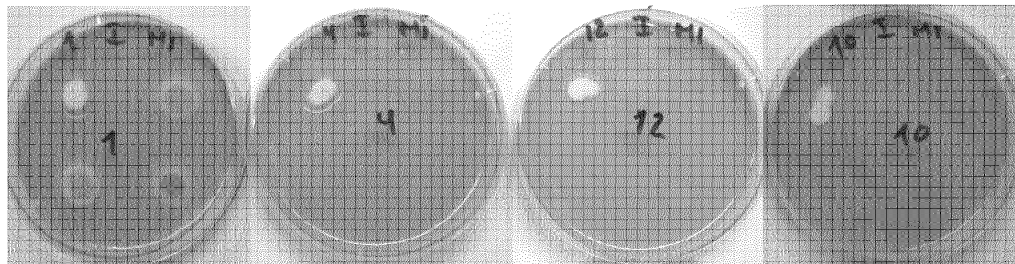
도면4



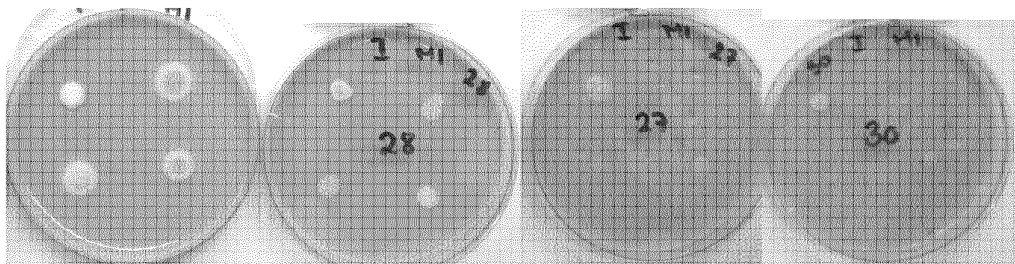
도면5



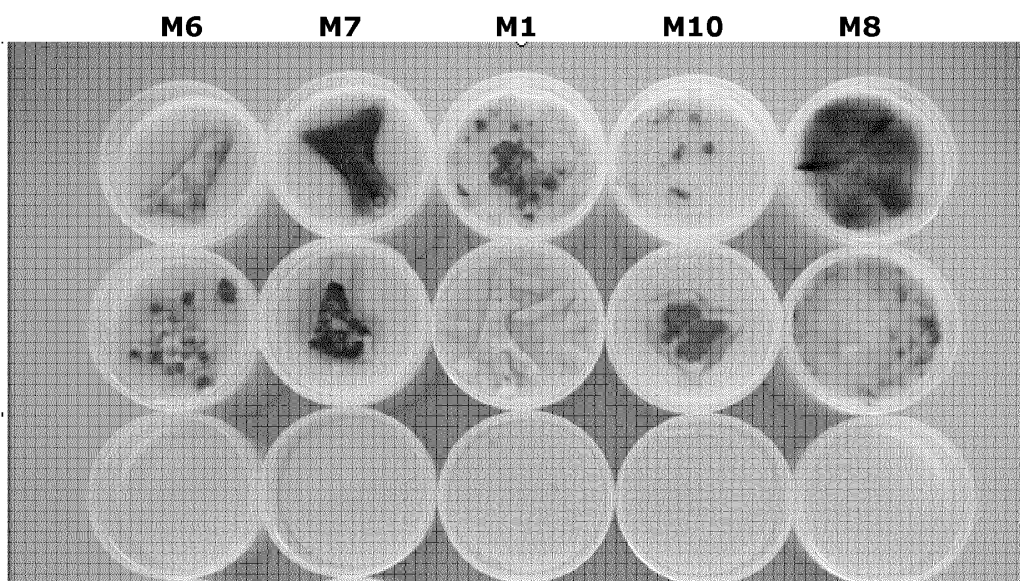
도면6



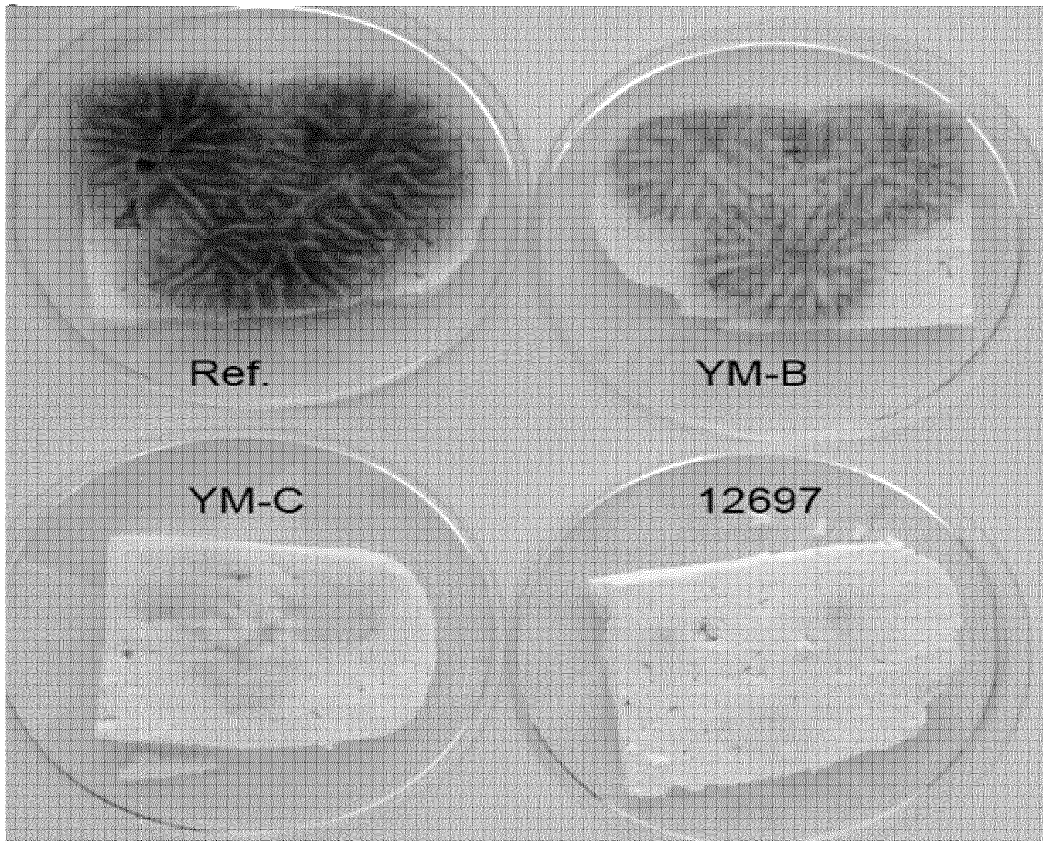
도면7



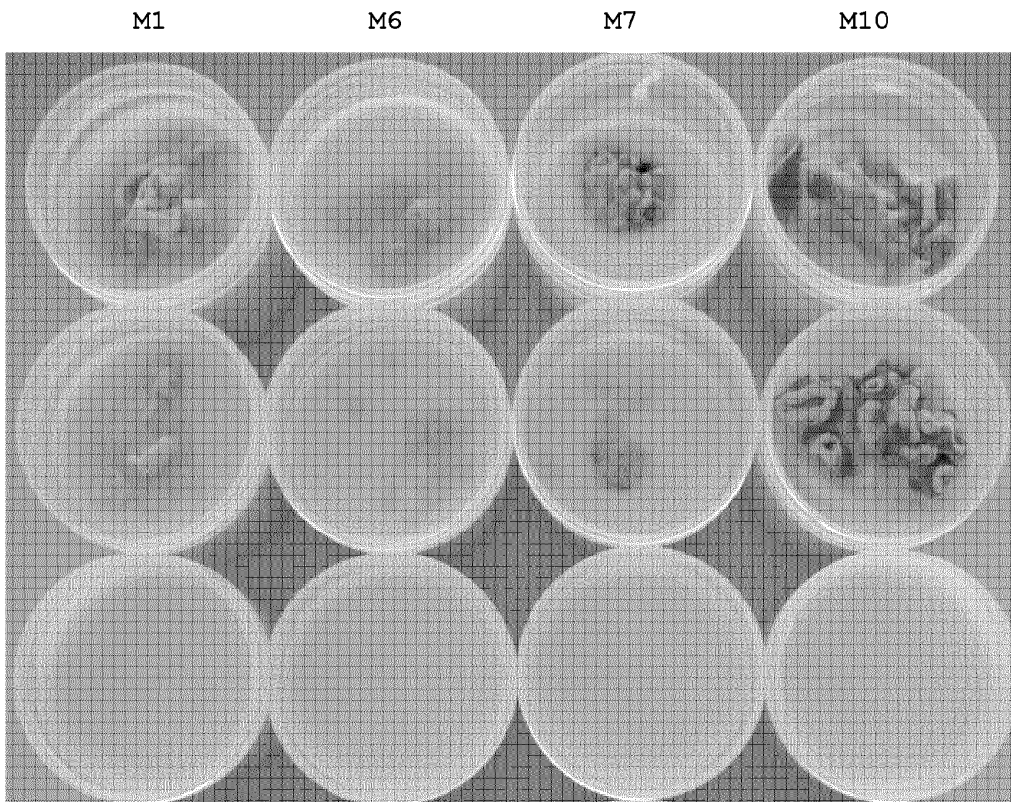
도면8



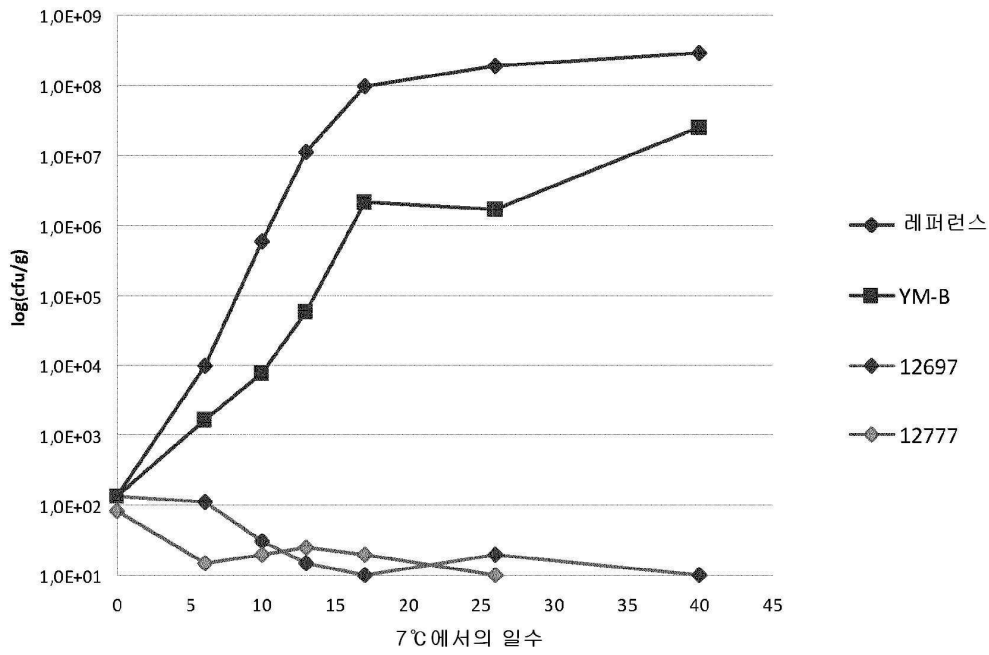
도면9



도면10



도면11



도면12

