



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0053209
(43) 공개일자 2019년05월17일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) **C12N 1/14** (2018.01)
C12P 17/04 (2006.01) **C12P 7/18** (2006.01)
C12P 7/46 (2006.01) **C12P 7/52** (2006.01)
C12P 7/56 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2013.01)
C12N 1/14 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-7009637
- (22) 출원일자(국제) 2017년09월05일
 심사청구일자 2019년04월03일
- (85) 번역문제출일자 2019년04월03일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2017/072249
- (87) 국제공개번호 WO 2018/046500
 국제공개일자 2018년03월15일
- (30) 우선권주장
 16187414.4 2016년09월06일
 유럽특허청(EPO)(EP)

- (71) 출원인
푸락 바이오켐 비.브이.
 네덜란드, 엔엘-4206 에이씨 고린켐, 아르켈세디
 이크 46
- (72) 발명자
오토, 로엘
 네덜란드 4201 비씨 호린켐 칼크하벤 62
라미레즈, 알다나 마리엘
 네덜란드 1017 에이치에이 암스테르담 케르크스트
 라아트 262번
엘데린크, 제니
 네덜란드 4201 비씨 호린켐 칼크하벤 62
- (74) 대리인
이은철, 이우영, 전병기

전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) 발명의 명칭 **발효에서의 감염을 막는 지방산 에스테르**

(57) 요 약

본원 발명은 그람-음성 박테리아 또는 곰팡이 또는 효모를 배양할 때 그람 양성균의 증식을 억제하기 위한 항균제의 용도에 관한 것이다. 항균제는 i) 일반식 ($R - (O-CH(CH_3)-CO)_aO_bM$ (식 1)에 따른 락틸레이트(젖산염, Lactylates); 일반식 $CH_2OR_1-CHOR_2-CH_2OR_3$ (식 2)에 따른 글리세롤 에스테르; 및 이들의 혼합물을 포함한다. 상기 일반식에서, R은 C4-C18 아실 그룹을 나타내고, 아실 그룹은 분지쇄 또는 직쇄의 알킬 또는 알케닐 사슬을 가지며; R_1 , R_2 및 R_3 은 각각 독립적으로 H 또는 C4-C18 아실 그룹으로부터 선택되며, 상기 아실 그룹은 분지쇄 또는 직쇄의 알킬 또는 알케닐 사슬을 가지며, 단 R_1 , R_2 또는 R_3 중 적어도 하나는 H이고, R_1 , R_2 또는 R_3 중 적어도 하나는 아실 그룹이며; M은 양성자(H^+) 또는 Li, Na, K, Ca, Mg, Zn, Fe (II), Cu, Mn, Ag, 암모늄, 또는 하나 이상의 하이드록시(OH)로 임의 치환된 하나 이상의 (C1-C4) 알킬을 갖는 치환된 암모늄으로부터 선택된 카운터 양이온이고; a는 1 내지 3의 정수 중 하나이고; b는 1 또는 2이고 M의 원자가와 동일하다.

(52) CPC특허분류

C12P 17/04 (2013.01)

C12P 7/18 (2013.01)

C12P 7/46 (2013.01)

C12P 7/52 (2013.01)

C12P 7/56 (2013.01)

명세서

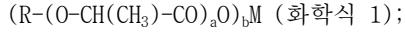
청구범위

청구항 1

아래의 성분 (a) 및 (b)를 함유하는 발효 배지(fermentation medium).

- (a) 미생물 성장을 위한 기질; 과,
 (b) 외인성 (exogenous) 첨가 성분으로서, 하기로부터 선택된 항균제 :

i) 화학식 1에 따른 락틸레이트,



ii) 화학식 2에 따른 글리세롤 에스테르,



iii) 상기 화합물들의 혼합물,

여기서:

R은 C4-C18 아실 그룹을 나타내고, 상기 아실 그룹은 분지쇄 또는 직쇄의 알킬 또는 알케닐 사슬을 가지며;

R₁, R₂ 및 R₃은 각각 독립적으로 H 또는 C4-C18 아실 그룹을 나타내고, 상기 아실 그룹은 분지쇄 또는 직쇄의 알킬 또는 알케닐 사슬을 가지며, 단 R₁, R₂ 또는 R₃ 중 하나 이상은 H이고, R₁, R₂ 또는 R₃ 중 적어도 하나는 아실 그룹이며;

M은 양성자 (H⁺) 또는 Li, Na, K, Ca, Mg, Zn, Fe (II), Cu, Mn, Ag, 암모늄, 또는 하나 이상의 하이드록시 (-OH)로 임의 치환된 하나 이상의 (C1-C4) 알킬을 갖는 치환된 암모늄으로부터 선택된 카운터 양이온이고;

a는 1 내지 3의 정수 중 하나이며;

b는 1 또는 2이고, M의 원자가와 동일하다.

청구항 2

제1항에 있어서, 그람-음성 박테리아, 곰팡이 또는 효모의 배양액을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 발효 배지.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 항균제는 화학식 1에 따른 락틸레이트 또는 이의 염인 것을 특징으로 하는 발효 배지.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 R은 탄소수 4 내지 18로 이루어진 직쇄 또는 분지쇄를 갖는 아실 그룹인 것을 특징으로 하는 발효 배지.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 R은 탄소수 12 내지 14로 이루어진 직쇄 또는 분지쇄를 갖는 아실 그룹인 것을 특징으로 하는 발효 배지.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 "a"는 1인 것을 특징으로 하는 발효 배지

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 항균제는 화학식 2에 따른 글리세롤 에스테르인 것을 특징으로 하는 발효 배지.

청구항 8

제7항에 있어서, R_1 , R_2 및 R_3 의 하나 이상은 탄소수 8개를 갖는 아실 그룹이고, 나머지는 수소 (H) 것을 특징으로 하는 발효 배지.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 항균제의 사용량은 배지 전체 무게를 기준으로 0.001 내지 0.5 중량%인 것을 특징으로 하는 발효 배지.

청구항 10

제9항에 있어서, 항균제의 사용량은 0.025 내지 0.5 중량%인 것을 특징으로 하는 발효 배지.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, ethanol; 1,3-propanediol; glycerol; butanol; 1,4-butanediol; arabinol; xylitol; sorbitol; mannitol; acetic acid; propionic acid; 3-hydroxy propionic acid; lactic acid; succinic acid; 2,5-furandicarboxylic acid; fumaric acid; malic acid; adipic acid; citric acid; aconitic acid; glutamic acid; itaconic acid; levulinic acid; glutaric acid; aspartic acid; malonic acid; 및 이들의 혼합물을 생산하는데 사용되는 발효 배지.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 1,4-butanediol; propionic acid; 3-hydroxy propionic acid; lactic acid; succinic acid; 2,5-furandicarboxylic acid; fumaric acid; malic acid; 또는 itaconic acid를 생산하는데 사용되는 발효 배지.

청구항 13

아래의 성분 (a) 및 (b)를 함유하는 발효 배지 (fermentation medium)용 접종제 (inoculant)

(a) 그람-음성 박테리아 곰팡이 또는 효모의 배양액; 과,

(b) 하기로부터 선택된 항균제:

i) 화학식 1에 따른 락틸레이트,

$(R-(O-CH(CH_3)-CO)_aO)_bM$ (화학식 1);

ii) 화학식 2에 따른 글리세롤 에스테르,

$CH_2OR_1-CHOR_2-CH_2OR_3$ (화학식 2); 및,

iii) 상기 화합물들의 혼합물,

여기서:

R 은 C4-C18 아실 그룹을 나타내고, 상기 아실 그룹은 분지쇄 또는 직쇄의 알킬 또는 알케닐 사슬을 가지며;

R_1 , R_2 및 R_3 은 각각 독립적으로 H 또는 C4-C18 아실 그룹을 나타내고, 상기 아실 그룹은 분지쇄 또는 직쇄의 알킬 또는 알케닐 사슬을 가지며, 단 R_1 , R_2 또는 R_3 중 하나 이상은 H이고, R_1 , R_2 또는 R_3 중 적어도 하나는 아실 그룹이며;

M 은 양성자 (H^+) 또는 Li, Na, K, Ca, Mg, Zn, Fe (II), Cu, Mn, Ag, 암모늄, 또는 하나 이상의 하이드록시 (-OH)로 임의 치환된 하나 이상의 (C1-C4) 알킬을 갖는 치환된 암모늄으로부터 선택된 카운터-양이온이고;

a는 1 내지 3의 정수 중 하나이며;

b는 1 또는 2이고, M의 원자가와 동일하다.

청구항 14

그람-음성 박테리아, 곰팡이 또는 효모 배양액에서 그람-양성 오염균의 성장을 저해하는 하기 (i), (ii) 및 (iii)으로부터 선택된 항균제의 용도.

i) 화학식 1에 따른 락틸레이트,

$(R-(O-CH(CH_3)-CO)_aO)_bM$ (화학식 1);

ii) 화학식 2에 따른 글리세롤 에스테르,

$CH_2OR_1-CHOR_2-CH_2OR_3$ (화학식 2); 및,

iii) 상기 화합물들의 혼합물,

여기서:

R은 C4-C18 아실 그룹을 나타내고, 상기 아실 그룹은 분지쇄 또는 직쇄의 알킬 또는 알케닐 사슬을 가지며;

R_1 , R_2 및 R_3 은 각각 독립적으로 H 또는 C4-C18 아실 그룹을 나타내고, 상기 아실 그룹은 분지쇄 또는 직쇄의 알킬 또는 알케닐 사슬을 가지며, 단 R_1 , R_2 또는

R_3 중 하나 이상은 H이고, R_1 , R_2 또는 R_3 중 적어도 하나는 아실 그룹이며;

M은 양성자 (H^+) 또는 Li, Na, K, Ca, Mg, Zn, Fe (II), Cu, Mn, Ag, 암모늄, 또는 하나 이상의 하이드록시 (-OH)로 임의 치환된 하나 이상의 (C1-C4) 알킬을 갖는 치환된 암모늄으로부터 선택된 카운터-양이온이고;

a는 1 내지 3의 정수 중 하나이며;

b는 1 또는 2이고, M의 원자가와 동일하다.

청구항 15

하기 (i), (ii) 및 (iii)으로부터 선택된 효과량의 항균제를 배지에 첨가하여 그람-음성 박테리아 발효 배양액에서 그람-양성균에 의한 미생물 감염을 감소시키거나 방해하는 방법.

i) 화학식 1에 따른 락틸레이트,

$(R-(O-CH(CH_3)-CO)_aO)_bM$ (화학식 1);

ii) 화학식 2에 따른 글리세롤 에스테르,

$CH_2OR_1-CHOR_2-CH_2OR_3$ (화학식 2); 및,

iii) 상기 화합물들의 혼합물,

여기서:

R은 C4-C18 아실 그룹을 나타내고, 상기 아실 그룹은 분지쇄 또는 직쇄의 알킬 또는 알케닐 사슬을 가지며;

R_1 , R_2 및 R_3 은 각각 독립적으로 H 또는 C4-C18 아실 그룹을 나타내고, 상기 아실 그룹은 분지쇄 또는 직쇄의 알킬 또는 알케닐 사슬을 가지며, 단 R_1 , R_2 또는 R_3 중 하나 이상은 H이고, R_1 , R_2 또는 R_3 중 적어도 하나는 아실 그룹이며;

M은 양성자 (H^+) 또는 Li, Na, K, Ca, Mg, Zn, Fe (II), Cu, Mn, Ag, 암모늄, 또는 하나 이상의 하이드록시 (-OH)로 임의 치환된 하나 이상의 (C1-C4) 알킬을 갖는 치환된 암모늄으로부터 선택된 카운터-양이온이고;

a는 1 내지 3의 정수 중 하나이며;

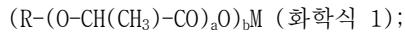
b는 1 또는 2이고, M의 원자가와 동일하다.

청구항 16

a) 발효 배지를 공급하는 단계; 및

b) 상기 배지에 그람-음성 박테리아, 곰팡이 또는 효모를 이루어진 접종제 (inoculant)를 부가하는 단계를 포함하고, 상기 발효 배지는 '미생물 성장을 위한 기질' 및 '외인성 (exogenous) 첨가 성분으로서, 하기 i) 내지 iii)으로부터 선택된 항균제'를 함유하는 것을 특징으로 하는 발효 산물을 얻는 방법.

i) 화학식 1에 따른 락틸레이트,



ii) 화학식 2에 따른 글리세롤 에스테르,



iii) 상기 화합물들의 혼합물,

여기서:

R은 C4-C18 아실 그룹을 나타내고, 상기 아실 그룹은 분지쇄 또는 직쇄의 알킬 또는 알케닐 사슬을 가지며;

R₁, R₂ 및 R₃은 각각 독립적으로 H 또는 C4-C18 아실 그룹을 나타내고, 상기 아실 그룹은 분지쇄 또는 직쇄의 알킬 또는 알케닐 사슬을 가지며, 단 R₁, R₂ 또는 R₃ 중 하나 이상은 H이고, R₁, R₂ 또는 R₃ 중 적어도 하나는 아실 그룹이며;

M은 양성자 (H⁺) 또는 Li, Na, K, Ca, Mg, Zn, Fe (II), Cu, Mn, Ag, 암모늄, 또는 하나 이상의 하이드록시 (-OH)로 임의 치환된 하나 이상의 (C1-C4) 알킬을 갖는 치환된 암모늄으로부터 선택된 카운터-양이온이고;

a는 1 내지 3의 정수이며;

b는 1 또는 2이고, M의 원자가와 동일하다.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 접종제는 *Escherichia coli*; *Acinetobacter*; *Bordetella*; *Brucella*; *Campylobacter*; *Cyanobacteria*; *Enterobacter*; *Erwinia*; *Francisella*; *Helicobacter*; *Klebsiella*; *Legionella*; *Moraxella*; *Neisseria*; *Pantoea*; *Pasteurellaceae*; *Pseudomonas*; *Proteus*; *Salmonella*; *Selenomonadales*; *Serratia*; *Shigella*; *Treponema*; *Vibrio*; *Yersinia*; *Zygomononas*; 및 이들의 혼합물로 이루어진 그룹으로부터 선택된 그램-음성 박테리아를 포함하는 것을 특징으로 하는, 발효 산물을 얻는 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 접종제는 *Escherichia coli*; *Pseudomonas* species; 및 *Pasteurellaceae* species, 특히 *Actinobacillus* genus, *Hemophilus* genus 및 *Pasteurella* genus의 species로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 그램-음성 박테리아를 포함하는 것을 특징으로 하는, 발효 산물을 얻는 방법.

청구항 19

제16항에 있어서, 상기 접종제는 genera *Aspergillus* 및 *Rhizopus*로부터 선택되는 하나 이상, 바람직하게는 *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger*; *Rhizopus oligosporus* 및 *Rhizopus oryzae*로부터 선택된 하나 이상의 곰팡이를 포함하는 것을 특징을 하는, 발효 산물을 얻는 방법.

청구항 20

제16항에 있어서, 상기 접종제는 *Brettanomyces*; *Candida*; *Dekkera*; *Pichia*; and, *Saccharomyces*의 속 (genera)으로부터 선택된 하나 이상의 효모를 포함하는 것을 특징으로 하는, 발효 산물을 얻는 방법.

청구항 21

제16항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 발효 산물이 ethanol; 1,3-propanediol; glycerol;

butanol; 1,4-butanediol; arabitol; xylitol; sorbitol; mannitol; acetic acid; propionic acid; 3-hydroxypropionic acid; lactic acid; succinic acid; 2,5-furandicarboxylic acid; fumaric acid; malic acid; adipic acid; citric acid; aconitic acid; glutamic acid; itaconic acid; levulinic acid; glutaric acid; aspartic acid; malonic acid; 및 이들의 혼합물로 된 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 발효 산물을 얻는 방법.

청구항 22

제16항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 발효 산물은 propionic acid; lactic acid; succinic acid; 1,4-butanediol; and, 2,5-furandicarboxylic acid로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 발효 산물을 얻는 방법.

발명의 설명

기술분야

본 발명은 그람 음성 박테리아, 곰팡이 및 효모를 배양할 때 그람 양성균의 증식을 억제하는 방법에 관한 것이다. 특히, 본원 발명은 락틸레이트 (젖산염, Lactylates), 글리세롤 에스테르 또는 이의 혼합물을 포함하는 항균제, 및 발효 배양물에서 이러한 항균제의 용도에 관한 것이다.

배경기술

다른 미생물에 의한 감염의 위험은 순수한 배양물 (pure cultures)이 사용되는 모든 미생물학적인 과정에서의 공통적인 문제 중 하나이다. 이러한 위험은 특히 실험실 밭효 공정과 비교하여 공정의 규모로 인해 다른 미생물과의 오염 위험이 큰 대형 산업 밭효 공정에서 존재한다.

효모 발효에서 작업자들은 세균 억제제 (bacterial control agent)를 사용하여 세균 오염의 위험을 완화하려고 노력했다. 이러한 억제제는 효모의 생존력에는 영향을 주지 않고 오염 세균의 번식을 방지하는 농도의 (천연) 항생제 (antibiotics) 및 아황산염 (sulphite)을 포함한다. 이러한 억제제에 대한 세부 사항은 다음에 개시되어 있다 : Rückle 등의 'Hop acids as natural anti-bacterials can efficiently replace antibiotics in ethanol production', International Sugar Journal 108, 139-147 (2006); 및 Limayem 등의 'Alternative antimicrobial compounds to control potential *Lactobacillus* contamination in bioethanol fermentations', Journal B Environmental Science and Health, Part B 46 (8) 709-714, (2011).

오늘날, 유전자 조작 박테리아는 종종 많은 발효 제품의 생산 균주로 사용된다. 이러한 예로는, Chang et al. 'Homo-fermentative production of D(-) or L(+) lactate in metabolically engineered *Escherichia coli* RR1', Applied and Environmental Microbiology 65(4) 1384-1389 (1999)에 기재된 바와 같이, R-락트산 (R-lactic acid)을 생산할 수 있는 대장균 (*Escherichia coli*)의 사용이 있다. 이 미생물은 상대적으로 단순하고 값이 싸고 화학적으로 한정된 배지에서 자라는 것으로 입증되었지만, 이 미생물의 배양물이 쉽게 감염될 수 있음이 반복적으로 관찰되었다. 이들 오염 물질은 포자 형성 미생물 (spore forming micro-organisms) 또는 그램 양성 미생물(gram-positive micro-organisms)인 것으로 나타났다. 오염성의 그램 양성균 중에는 *Enterococcus*, *Clostridium*, *Listeria*, *Staphylococcus*, 각종 *Bacillus* 종 및 *Streptococcus*와 같은 병원성 박테리아가 있다. 이 오염 물질은 젖산의 광학 순도를 심각하게 훼손시킬 수 있고, 또한 다른 발효 산물을 생산할 수 있어 발효 생산량을 낮출 수 있으므로 바람직하지 않다. 그러므로 이러한 미생물의 번식을 억제해야 할 충분한 이유가 있는 것이다.

본 발명의 목적은 생산 품질의 안정화, 특히 관식 물품의 발효 산물의 수율을 안정화하는 것이다.

중간(크기) 사슬 지방산 (medium chain fatty acids)의 락틸레이트 및/또는 글리세롤 에스테르의 첨가는 그람-음성 박테리아, 또는 곰팡이 및 효모를 배양할 때 그람 양성균의 성장을 특이적으로 억제한다는 것이 알려져 있다. 유효량의 락틸레이트, 글리세롤 에스테르 또는 이들의 혼합물을 첨가하면, 생산자 미생물은 발효기에서 계속 성장하지만, 그람 양성균의 오염은 예방 또는 억제된다. 이것은 원하지 않는 미생물, 원하지 않는 부산물 및 에너지원의 비효율적인 사용에 의하여도 발효 과정이 방해되지 않는다는 것을 말해주는 것이다. 또한, 항생제와 같은 세균 오염 제어제의 필수 첨가량을 감소시킨다.

락틸레이트 (젖산염, Lactylates)는 하나 (모노락틸레이트, monolactylates) 또는 여러 락트산 분자 (디락틸레

이트, dilactylates)에 부착된 지방산 (fatty acid)의 아실 그룹(Acyl group) 및 카복실레이트 말단 (carboxylate terminal)에 양성자 (H^+) 또는 다른 양이온을 갖는 화합물이다. 지방산 부분은 전형적으로 말단 카르복실기가 부착된 탄화수소 사슬로 구성된다. 탄화수소 사슬은 상이한 수의 탄소 원자를 함유할 수 있으며, 탄소 원자 사이의 결합은 포화 되거나 불포화될 수 있다.

[0008] 락틸레이트는 잘 알려진 계면활성제이다. 이들 계면활성제는 R-락트산 또는 S-락트산 또는 이 둘의 혼합물을 지방산과 반응시키고 동시에 염기로 중화시킴으로써 제조된다. 락틸레이트는 식품 산업에서 잘 알려져 있으며, 피부 관리, 피부 부드러움 및 보습을 개선하고, 제품 적용 후 젖은 상태에서 건조한 상태로 변할 때의 점착성을 감소시키기 위해 개인 관리 용품에 사용된다. 특정의 락틸레이트는 항균 특성을 갖는 것으로 알려져 있다. US 제2007/010856호 (코헨 (Cohen) 등)는 항균 화합물로서 특히 락틸레이트로 처리된 봉합사를 기술하고 있다. US 제2006/062832호 (Lopes)에는 항균 화합물로서 락틸레이트를 포함하는 자동차 유리 세정 (와이프, wiper) 조성물이 기재되어 있다. WO 제2004/037177호 (Eveready Battery Inc.)는 항균성 화합물로서 락틸레이트를 함유하는 항균 면도용 품 또는 젤 제형을 기재하고 있다.

[0009] WO 제01/06877호 (Rhodia)는 식품에서 흡산 (hop acids)과 조합하여 락틸레이트를 사용하는 것을 기술한다; 흡산 (hop acids)은 그램 양성균에 대한 활성을 가지고 있으며, 락틸레이트는 매우 다양한 범위의 식품 등급 유화제 중에서 하나의 보조 성분으로 알려져 있다 (6쪽). 그러나 이들 참고문헌에는 락틸레이트의 특정 용도가 예시되어 있지 않고, 락틸레이트가 그램 양성균에 대해 개별적인 활성을 갖는다는 사실도 이 참고문헌에서는 인식하고 있지 않다.

[0010] WO 제2004/107877호 (Purac Biochem BV)에서 락트산 또는 이의 유도체와 무기산의 혼합물을 포함하는 항균 조성물을 기재하고 있는 것은 주목할 만 것이다. 상기 조성물은 일반적으로 항균제로 기술된다. 이 참고문헌에는 살모넬라 (Salmonella) 및 대장균 (Escherichia coli)에 대한 사용이 명시되어 있다. 락틸레이트는 가능한 락트산 유도체로 언급되고 있지만, 그 용도는 더 이상 밝히고 있지 않다. 이 참고문헌에는 그램 음성균 비교하여 그램 양성균에 대한 락틸레이트의 특별한 효능을 암시하거나 제시하고 있지 않다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본원 발명의 제1 양태에 따라, 아래의 성분을 포함하는 발효 배지가 제공된다:

[0012] 미생물 성장을 위한 기질; 과,

[0013] 외인성 (exogenous) 첨가 성분으로서, 하기로부터 선택된 항균제 :

[0014] i) 화학식 1에 따른 락틸레이트,

[0015] $(R-(O-CH(CH_3)-CO)_aO)_bM$ (화학식 1);

[0016] ii) 화학식 2에 따른 글리세롤 에스테르,

[0017] $CH_2OR_1-CHOR_2-CH_2OR_3$ (화학식 2); 및,

[0018] iii) 상기 화합물들의 혼합물,

[0019] 여기서:

[0020] R은 C4-C18 아실 그룹을 나타내고, 상기 아실 그룹은 분지쇄 또는 직쇄의 알킬 또는 알케닐 사슬을 가지며;

[0021] R_1 , R_2 및 R_3 은 각각 독립적으로 H 또는 C4-C18 아실 그룹을 나타내고, 상기 아실 그룹은 분지쇄 또는 직쇄의 알킬 또는 알케닐 사슬을 가지며, 단 R_1 , R_2 또는 R_3 중 하나 이상은 H이고, R_1 , R_2 또는 R_3 중 적어도 하나는 아실 그룹이며;

[0022] M은 양성자 (H^+) 또는 Li, Na, K, Ca, Mg, Zn, Fe (II), Cu, Mn, Ag, 암모늄, 또는 하나 이상의 하이드록시 (-OH)로 임의 치환된 하나 이상의 (C1-C4) 알킬을 갖는 치환된 암모늄으로부터 선택된 카운터 양이온이고;

[0023] a는 1 내지 3의 정수 중 하나이며;

- [0024] b는 1 또는 2이고, M의 원자가와 동일하다.
- [0025] 발명의 완성을 위하여, 본 발명에 사용된 용어 "상기 화합물의 혼합물"은 항균제가 다음을 포함할 수 있음을 나타낸다: 화학식 1에 부합하는 둘 이상의 화합물; 화학식 2에 따르는 둘 이상의 화합물; 또는 화학식 1 및 화학식 2에서 정의된 바와 같은 화합물의 혼합물.
- [0026] 발효 배지는, 발효 배지 중량을 기준으로 항균제를 0.001 - 0.5 중량%의 양으로 함유할 수 있고, 바람직하게는 0.025 - 0.5 중량%의 양으로 포함할 수 있다. 다르게 표현하면, 발효 배지의 부피(L)를 기준으로 0.1 - 1000 mg/L, 바람직하게는 0.5 - 500 mg/L, 보다 바람직하게는 1 - 100 mg/L의 발효 배지 농도로 항균제를 포함할 수 있다.
- [0027] 발효 배지는 그람 음성 박테리아, 곰팡이 또는 효모의 배양물을 포함하는 접종제 (inoculant)를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 배지의 제조에 있어서, 항균제는 그람 음성 박테리아, 곰팡이 또는 효모의 배양 전, 배양 후 또는 (배양과) 동시에 배지에 첨가될 수 있다. 이를 첨가 방식은 상호 배타적인 것이 아니며, 본원 발명은 하나 이상의 발효 단계에서의 항균제 첨가를 배제하지 않는다.
- [0028] 그러나, 바람직한 구체적인 예에서, 발효 배지는 아래의 방법으로 얻어진다: 발효 미생물을 가진 발효 배지를 접종하기 전에 1분 - 48시간, 바람직하게는 1 - 24시간 동안 미생물 성장을 위한 기질을 항균제와 접촉하는 방법.
- [0029] 또 다른 실시예 또는 추가적인 실시예에서, 발효 배지는, 상기 항균제를, 특히 물의 균형 (balance)을 위하여 발효 배지에로의 투입되는 투입물로서 재순환되는 수성의 재순환 공정 흐름 (스트림, stream)에 상기 항균제를 첨가함으로써 수득 될 수 있다.
- [0030] 본 발명의 제2 양태에 따르면, 아래의 성분을 포함하는 발효 배지를 위한 접종제 (inoculant)가 제공된다:
- [0031] 그람 음성 박테리아, 곰팡이 또는 효모의 배양물; 과,
- [0032] 하기로부터 선택된 항균제:
- [0033] i) 화학식 1에 따른 락틸레이트,
- [0034] $(R-(O-CH(CH_3)-CO)_aO)_bM$ (화학식 1);
- [0035] ii) 화학식 2에 따른 글리세롤 에스테르,
- [0036] $CH_2OR_1-CHOR_2-CH_2OR_3$ (화학식 2); 과,
- [0037] iii) 상기 화합물들의 혼합물,
- [0038] 여기서:
- [0039] R은 C4-C18 아실 그룹을 나타내고, 상기 아실 그룹은 분지쇄 또는 직쇄의 알킬 또는 알케닐 사슬을 가지며;
- [0040] R₁, R₂ 및 R₃은 각각 독립적으로 H 또는 C4-C18 아실 그룹을 나타내고, 상기 아실 그룹은 분지쇄 또는 직쇄의 알킬 또는 알케닐 사슬을 가지며, 단 R₁, R₂ 또는 R₃ 중 하나 이상은 H이고, R₁, R₂ 또는 R₃ 중 적어도 하나는 아실 그룹이며;
- [0041] M은 양성자 (H^+) 또는 Li, Na, K, Ca, Mg, Zn, Fe(II), Cu, Mn, Ag, 암모늄, 또는 하나 이상의 하이드록시 (OH)로 임의 치환된 하나 이상의 (C1-C4) 알킬을 갖는 치환된 암모늄으로부터 선택된 카운터 양이온이고;
- [0042] a는 1 내지 3의 정수 중 하나이며;
- [0043] b는 1 또는 2이고, M의 원자가와 동일하다.
- [0044] 본 발명의 제2 양태는 접종제가 그람 양성균에 의하여 오염되는 것을 방지한다. 발효 배지를 접종할 때, 항균제는 배지의 오염 물질로서 도입될 수 있는 그람 양성균의 성장을 억제 또는 예방할 수 있는 배지에 분산되게 된다.
- [0045] 본 발명은 또한 그람-음성 박테리아, 곰팡이 또는 효모를 배양할 때 그람 양성 오염균의 성장을 억제하기 위한 항균제의 용도를 제공하며, 상기 항균제는 상기 정의된 바와 같은 화학식 1에 따른 락틸레이트, 상기 정의된 바

와 같은 화학식 2에 따른 글리세롤 에스테르, 또는 이러한 화합물들의 혼합물이다.

[0046] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 그램 음성 박테리아의 발효 배양물에서 그램 양성균에 의한 미생물 감염을 예방 또는 감소시키는 방법을 제공하며, 상기 방법은 유효량의, 상기에서 정의된 바와 같은 화학식 1에 따른 락틸레이트, 상기에서 정의된 바와 같은 화학식 2에 따른 글리세롤 에스테르 및 이러한 화합물들의 혼합물로부터 선택된 항균제를 첨가하는 것을 포함한다.

[0047] 또한, 본 발명의 최종 양태에 따르면, 본원 발명은 발효 산물을 수득하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 첨부된 청구범위에서 한정하고 있는 것으로, 발효 배지를 제공하는 단계, 상기 배지에 그램 음성 박테리아, 곰팡이 또는 효모의 배양물을 포함하는 접종제를 도입하는 단계를 포함한다.

과제의 해결 수단

정의

[0049] 본 발명에 사용된 용어 "포함하는" (comprising)은 나열된 목록에 한정하지 않으며, 다른 추가의 적합한 항목, 예를 들어 하나 이상의 추가 특징, 성분 (들), 구성요소 (들) 및/또는 적절한 치환체 (들)을 포함할 수도 있고, 포함하지 않을 수도 있다.

[0050] "항균성" (antibacterial)의 활성 (activity) 또는 "항균성"(antibacterial)의 작용제(agent)는 본원에서 박테리아의 살생 및/또는 억제가 가능한 활성 또는 작용제를 의미한다.

[0051] 용어 "미생물 성장" (microbial growth)은 그 표준 의미에 따라 본 발명의 명세서에서 사용된다: "미생물 성장"은 박테리아, 곰팡이, 진균 및 조류를 포함하는 미생물 세포의 수 및/또는 대사 활성의 증가를 나타낸다.

[0052] 본 발명에 사용된 용어 "발효 배지" (fermentation medium)는 발효 용기 내에 있는 3상 (고체-액체-기체) 시스템을 의미한다. 액상은 물, 용해된 영양물, 미생물 성장을 위한 용해된 기질, 및 용해된 대사 산물을 함유한다; 물의 공급원은 제한되지 않으며, 특히 폐수, 및/또는 물은 종류 폐액, 세정수, 응축물, 또는 종류 시 발생 되는 부가생산물인 저 비점 액체 또는 종류액과 같은 공정 수, 또는 다른 발효 생산공장의 공정 수를 포함한다. 고체 상은 개별 세포, 펠릿, 미생물 성장을 위한 불용성 기질 및 침전된 대사 산물을 포함한다.

[0053] 미생물 성장과 관련하여, "기질" (substrate)이란 용어는 효소의 작용에 의하여 다른 화합물로 전환되거나 변환될 것으로 기대되는 물질 또는 화합물을 의미한다. "기질"(substrate)이라는 용어는 임의의 바이오매스 (biomass)로부터 유래된 탄수화물과 같이 출발 물질로 사용하기에 적합한 탄소 원을 제공하는 화합물뿐만 아니라, 미생물과 관련된 대사 경로에 사용되는 중간 대사 산물도 포함하는 것으로 의도된다. 발효 배지는 전형적인 기질로서 하나 이상의 발효성 탄수화물 (fermentable carbohydrates), 예컨대 당류 (sugar)를 포함할 수 있다.

[0054] 발효 기질 및 본원 발명의 발효 공정에 사용되는 다른 원료를 포함하는 발효 배지는 발효 공정 전 또는 발효 공정과 동시에 분쇄 (milling), 액화 (liquefaction), 당화(saccharification) 또는 이와 유사한 과정 등으로 가공될 수 있다. 따라서, 발효 배지는 발효 미생물이 첨가되기 전의 배지, 즉 액상화 및/또는 당화로부터 유래되거나 액상화 및/또는 당화에 있는 배지뿐만 아니라, 발효 생물을 포함하는 배지, 즉 동시당화 및 발효 공정 (SSF, simultaneous saccharification and fermentation) 또는 1단계 발효 공정에 사용된 배지를 지칭할 수 있다. 발명의 완성을 위하여 상기에서 언급한 실시예들의 미생물을 접종하기 전에 항균제를 먼저 발효 배지에 첨가하는 것은 액화 및/또는 당화 중에 상기 항균제를 첨가하는 것을 포함한다.

[0055] 본 발명에서 사용되는 용어 "발효 용기" (fermentation vessel)는 발효 반응이 수행되는 용기를 의미한다. "발효기" (fermenter)라는 용어도 발효 용기와 교환하여 사용할 수 있다.

[0056] 본 발명 명세서에서 사용되는 "접종제" (inoculant)는 발효 용기에 첨가되는 것이나, 미생물 군집의 최종 조성을 제한하지 않는 복합 미생물 군집의 원천 (original source)을 의미한다; 최종 조성은 발효 용기의 작동 조건 및 생산성에 의해 결정된다. 접종제는 전형적으로 발효 용기보다 훨씬 작은 적절한 증식 탱크에서 원하는 미생물을 증식시킴으로써 제조된다.

[0057] 접종제는 전형적으로 자연적인 선택으로, 또는 관심 발효 산물을 생산하기 위한 생물 공학적 수단으로 개작된 미생물의 하나 이상의 "생산 균주" (production strains)의 배양물을 포함한다. 예시로, 그러나 이에 제한하는 것이 아니지만, 접종제는 에탄올 생산을 위한 효모 *Saccharomyces cerevisiae*의 배양물을 포함한다.

[0058] 용어 "배양" (culture)은 미생물 유기체, 특히 생산 균주의 성장을 돋기 위하여 미리 결정된 배양 배지에서의 증식을 나타내는 것으로 당업계에 공지된 방식으로 사용된다. 본원에 사용된 용어 "발효기 배양" (fermenter

culture)은 상기 발효 배지 또는 발효 배지에 적합한 접종체 내에 존재하는 미생물의 하나 이상의 생산 균주의 증식을 지칭한다.

[0059] 본 발명에서 배양 및 사용될 수 있는 그람 음성 박테리아를 생산 균주로 제한하려는 것은 아니다. 예시적인, 그러나 이로 제한하는 것은 아니지만, 그람 음성 박테리아는 다음을 포함한다 : 대장균 (*Escherichia coli*); *Acinetobacter*; *Bordetella*; 브루셀라 (*Brucella*); *Campylobacter*; *Cyanobacteria*; *Enterobacter*; *Erwinia*; *Francisella*; 헬리코박터 (*Helicobacter*); *Klebsiella*; 레지오넬라 (*Legionella*); *Moraxella*; *Neisseria*; *Pantoea*; *Pasteurellaceae*, 특히 *Actinobacillus* 속, *Hemophilus* 속 및 *Pasteurella* 속의 박테리아; 슈도모나스 (*Pseudomonas*); 프로테우스 (*Proteus*); 살모넬라 (*Salmonella*); *Selenomonadales*, 특히 *Propionispira*, *Propionispora* 및 *Schwartzia* 속의 박테리아; 세라티아 (*Serratia*); 시겔라 (*Shigella*); *Treponema*; 비비리오 (*Vibrio*); *Yersinia*; 및 *Zygomonas*. 흥미로운 실시 양태에서, 발효 배양 또는 발효 배지는 대장균 (*Escherichia coli*); 슈도모나스 종 (*Pseudomonas species*); 및 *Pasteurellaceae* 종으로부터 선택된 하나 이상의 그람 음성 박테리아이다.

[0060] 예시적으로 언급될 수 있는 곰팡이는 다음과 같은 속 (genera)의 곰팡이들이다: *Aspergillus*, 특히 *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus terreus* 및 *Aspergillus niger*; *Rhizopus*, 예를 들어 *Rhizopus oligosporus* 및 *Rhizopus oryzae*; *Fusarium oxysporum*와 같은 *Fusarium*; *Mucor racemosus* 과 같은 *Mucor*; *Cladosporium herbarum*과 같은 *Cladosporium*; *Penicillium expansum*과 같은 페니실류 (*Penicillium*); *Trichoderma harzanium*과 같은 *Trichoderma*.

[0061] 본 발명에서 사용될 수 있는 효모 속 (yeast genera)의 비 제한적인 예는 다음을 포함한다: *Brettanomyces*; 칸디다 (*Candida*); *Dekkera*; 피키아 (*Pichia*); 및 사카로마이세스 (*Saccharomyces*).

[0062] 특정 미생물이 발효할 수 있는 탄수화물은 당업자에게 일반적으로 공지되어 있거나 공개된 배경 문헌에서 쉽게 확인할 수 있다. 발명의 완성을 위해서는, 젖산을 생성하는 미생물이 발효할 수 있는 일반적인 탄수화물은 다음을 포함하지만 이에 한정되지 않는다: arabinose, xylose 및 ribose와 같은 C5 당; glucose, fructose, galactose, rhamnose 및 mannose와 같은 C6 당; 및 sucrose, maltose and isomaltose와 같은 C12 당.

[0063] 발효성 탄수화물은 주로 전분-계 또는 설탕-계 공급 원료에서 추출된다. 공급 원료의 예는 다음을 포함하지만 이에 국한되지 않는다: 옥수수, 밀, 라이밀 (*triticale*), 보리 (*barley*), 카사바, 호밀, 상기 공급 원료로부터 제공된 등급화 된 전분 스트림 (stream), 사탕수수, 사탕무, 당밀, 벳짚, 감자 폐기물, 목재폐기물, 스위치 잔디 (switch grass), 소나무 및 기타 목재 폐생품 (pine and other wood derivatives), 도시 폐기물, 음식물 쓰레기 및 음료 (알코올 및 비 알코올) 산업 폐기물. 예를 들어 이에 제한되는 것은 아니지만, *Saccharomyces cerevisiae*에 의한 발효를 위한 공급 원료로는 당밀을 들 수 있다. 원하는 경우, 바이오매스 중 발효성 탄수화물의 함량은 당 업계에 공지된 방법으로 결정될 수 있다. 특히 유익하게 공개된 정보는 Milne 외 저자의 ‘Biomass Conversion and Biomass Conversion Process 분석 방법의 Sourcebook’ SERI/SP-220-3548. Golden, CO: Solar Energy Research Institute, 1990년 2월이다.

[0064] 상기 언급된 미생물과 같은 그람 음성 박테리아, 곰팡이 및 효모에 의해 생산될 수 있는 예시적인, 그러나 이에 제한되는 것은 아니지만, 발효 산물의 목록으로는 다음이 언급될 수 있다 : 에탄올; 1,3-프로판디올; 글리세린 (glycerol); 부탄올; 1,4-부탄디올; 아라비톨; 자일리톨; 소르비톨; 만니톨; 아세토인 (acetoin); 아세트산; 프로피온산; 3-하이드록시 프로피온산; 젖산(lactic acid); 숙신산; 푸란디카르복실산 (furandicarboxylic acid); 푸마르산; 사과산 (malic acid); 아디프산; 구연산 (citric acid); 아코니트산 (aconitic acid); 글루탐산; 이타콘산; 레불린산 (levulinic acid); 글루타르산 (glutaric acid); 아스파라긴산 (aspartic acid); 말론산; 글리신; 세린; 트레오닌; 라이신; 이소프렌; 및 폴리하이드록시부티레이트 (polyhydroxybutyrate). 하나의 구체 예에서, 본원 발명에서 정의된 바와 같은 항균제를 포함하는 발효 배지는 다음과 같은 물질의 생산을 위한 것이다: 에탄올; 1,3-프로판디올; 글리세린; 부탄올; 1,4-부탄디올; 아라비톨; 자일리톨; 소르비톨; 만니톨; 아세트산; 프로피온산; 3-하이드록시프로피온산; 젖산; 숙신산; 2,5-푸란디카르복실산; 푸마르산; 사과산; 아디프산; 구연산; 아코니트산; 글루탐산; 이타콘산; 레불린산; 글루타르산; 아스파라긴산; 말론산; 및 이들의 혼합물. 또한, 항균제가 다음과 같은 물질의 생산을 위해 발효 배지에 첨가되었을 때 좋은 결과가 얻어졌다: 1,4-부탄디올; 프로피온산; 3-하이드록시프로피온산; 젖산; 숙신산; 2,5-푸란디카르복실산; 푸마르산; 사과산; 또는 이타콘산.

[0065] 그리고 프로피온산; 젖산; 숙신산; 1,4-부탄디올; 또는 2,5-푸란디카르복실산과 같은 물질의 생산을 위하여 발효 배지에 항균제가 첨가되는 것이 가장 바람직하다.

- [0066] 발효 산물로서 젖산(lactic acid)을 완전하게 수득하기 위하여 본원 발명은 또한 아래의 경우를 포함한다: 락타이드(lactide)를 얻기 위한 젖산(lactic acid)의 이량체화; 해당 젖산의 중축 함에 의한 폴리락트산(polylactic acid)의 합성; 및 상기 락트산으로부터 수득된 락타이드의 중합에 의한 폴리 락트산의 합성.
- [0067] 본 발명 명세서에 언급되고 발효 가능한 기질을 적합한 미생물로 발효시킴으로써 수득 될 수 있는 원하는 발효 산물은, 일반적으로 발효성 기질 미량; 미생물에 의해 생성된 다른 물질; 및 세포 잔해 및/또는 세포 구성성분과 같은 미생물 자체의 혼적을 포함하는 조성물의 하나의 구성성분으로 생산되는 것으로 인식될 것이다. "발효 산물" (fermentation product)이라는 용어는 조 (crude) 생성물 및 정제, 정제 및/또는 농축을 거친 후의 산물 모두를 포함하는 것으로 의도된다. 예시적인, 그러나 이에 제한되지 않는 정제 방법은 다음 중 하나 이상을 포함한다: 마이크로 및 울트라 여과 (ultrafiltration)를 포함하는 여과; 증류; (재) 결정화; 추출; 산성화와 같은 화학적 처리; 이온 교환; 활성 탄소 처리; 및 전기 투석.
- [0068] 당해 분야에 공지된 바와 같이, 그람 양성균은 그람 세포 염색 (staining)에 의해 짙은 청색 또는 보라색으로 염색되며, 이는 주로 세포벽에 많은 양의 펩티도글리칸 (peptidoglycan)이 존재하기 때문이다. 본원 발명은 발효 배양물에서 이러한 박테리아의 성장을 억제 또는 방지하는 것에 관한 것이다. 본원 발명은 특히 다음을 포함하는 그람 양성균의 성장 억제 또는 예방에 관한 것이다: Enterococci; Clostridium, 특히 Clostridium perfringens 및 Clostridium pasteurianum; 리스테리아 (Listeria), 특히 리스테리아 모노사이토겐 (Listeria monocytogenes) 및 리스테리아 이노쿠아 (Listeria innocua); 포도상 구균, 특히 황색 포도상 구균 (Staphylococcus aureus); 다양한 Bacillus 종, 특히 Bacillus anthracis, Bacillus cereus 및 Bacillus subtilis; 및 스트렙토코커스 (Streptococcus).
- [0069] 본 발명 명세서에서 사용된 용어 "아실 그룹" (acyl group)은 카르복실산 (carboxylic acid)으로부터 하이드록실기(-OH)를 제거하여 유도된 작용기를 의미하고, RxCO-의 구조를 가지며, 여기서 Rx는 단일 결합으로 CO기에 결합된 알킬기 또는 알케닐기를 의미한다. 하나 이상의 불포화 결합이 알케닐기에 존재할 수 있다. 따라서 아실 사슬의 총 탄소 원자 수는 Rx 사슬의 탄소 원자 수+1이다. '(C4-C18) 아실'이란 용어는 4 - 18개의 탄소 원자를 갖는 아실기를 의미한다.
- [0070] 본 발명에서 사용된 바와 같이 단지 하나의 C4-C18 아실 그룹 측쇄를 갖는 글리세롤 에스테르는 '(C4-C18) 글리세롤 모노-에스테르'로 지칭된다; 2개의 C4-C18 아실 그룹을 갖는 글리세롤 에스테르는 '(C4-C18) 글리세롤 디-에스테르'로 지칭된다. 상기 에스테르의 혼합물은 '(C4-C18) 글리세롤 모노/디-에스테르' 또는 '(C4-C18) 글리세롤 모노/디'라고 명명될 수 있다.
- [0071] 예시적인 아실 그룹은 iso-hexanoyl 그룹과 같은 C6 아실 그룹; iso-octanoyl 그룹과 같은 C8 아실 그룹; decanoyl 그룹과 같은 C10 아실 그룹; lauryl (dodecanoyl)과 같은 C12 아실 그룹; myristyl (tetradecanoyl) 그룹과 같은 C14 아실 그룹; cetyl 및 palmityl (hexadecanoyl) 그룹과 같은 C16 아실 그룹; 및 octadecanoyl 그룹과 같은 C18 아실 그룹을 포함한다.
- 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**
- [0072] 일반적으로 상기 화학식 1 및 2의 화합물은 그람 음성 박테리아, 곰팡이 또는 효모 배양을 위한 배양액에 하나 이상의 상기 화합물을 첨가하여 그람 양성균의 성장 억제를 위하여 사용한다. 그람 양성균의 증식이 억제될 때, 원하는 발효 산물의 생산을 향상시키는 것이 가능하다.
- [0073] 본 발명은 항균제로서 화학식 1에 따르는 2종 이상의 화합물 또는 화학식 2에 부합하는 2종 이상의 화합물을 첨가하는 것을 배제하지 않는다. 또한, 화학식 1 및 화학식 2에서 정의된 바와 같은 화합물의 혼합물이 역시 사용될 수 있다.
- [0074] 발효 배지, 접종제 또는 발효 배양에 투여되는 항균제의 총량은 그람 양성균에 의한 오염을 억제, 방지 또는 감소시키는 효과가 있는 양이다. 항균제의 정확한 양은 사용되는 특정 약제, 배양되는 생산 균주, 배지의 종류 및 에너지원 (energy source)과 같은 여러 요인에 달려있다. 그러나, 대부분의 실시 양태에서, 발효 배지 또는 다른 배양 배지는 전체 배지 중량을 기준으로 0.001 - 0.5 중량% 바람직하게는 0.025 - 0.5 중량%, 더욱 바람직하게는 0.1 - 0.5 중량%의 정의된 항균제를 포함할 것이다.
- [0075] 락틸레이트 및/또는 글리세롤 에스테르에 기초한 상기의 항균제 이외에, 발효 배지는 그람 양성균에 대하여는 효능을 가지지만 실질적으로 그람 음성 박테리아에는 영향을 미치지 않는 적어도 하나의 보조 항균 성분을 포함할 수 있다. 이러한 보조 성분은 외인성 성분 (exogenous ingredient)으로서 발효 배지에 직접 첨가될 수 있다.

- [0076] 부가적으로 또는 대안으로, 보조 성분은 발효 배지를 위한 접종제에 포함될 수 있다.
- [0077] 한 구체 예에서, 발효 배지, 접종제 또는 발효조 배양은 배지의 총 중량을 기준으로 1 중량% 이하의 다음으로부터 선택된 보조 항균제를 포함할 수 있다: lysozyme; nisin; pediocin; ϵ -Polylysine; Protamin; Hop beta acids; rosin acids; pimelic acid; benzoic acid; p-hydroxybenzoic acid; salicylic acid; cinnamic acid; citric acid; 탄소수 8 to 16의 체인 길이를 갖는 포화 지방산 (saturated fatty acids); 탄소수 8 to 16의 체인 길이를 갖는 포화 지방산 (saturated fatty acids)의 sugar esters; 및 이들의 혼합물. 다른 말로 표현하면, 발효 배지는 2000 mg/L 이하의 상기 보조 항균제를 포함할 수 있다.
- [0078] **화학식 1**
- [0079] 본 발명에 사용된 락틸레이트는 하기 화학식 1에 따른 구조를 갖는다 :
- [0080] $(R-(O-CH(CH_3)-CO)_aO)_bM$ (화학식 1);
- [0081] R은 C4-C18 아실 그룹, 바람직하게는 C8-C14 아실 그룹, 보다 바람직하게는 C10-C14 아실 그룹 및 가장 바람직하게는 C12-C14 아실 그룹을 나타낸다.
- [0082] M은 양성자 (H⁺), 또는 Li, Na, K, Ca, Mg, Zn, Fe (II), Cu, Mn, Ag, 암모늄, 또는 하나 이상의 하이드록실 그룹으로 임의로 치환된 하나 이상의 (C1-C4) 알킬기를 갖는 치환된 암모늄을 나타낸다. 바람직하게는, M은 Na, K, Ca 및 Mg로 이루어진 군으로부터 선택된다. 보다 바람직하게는, M은 Na이다.
- [0083] 상기 그룹 (O-CH(CH₃)-CO)O는 R- 또는 S-젖산 (lactic acid)으로부터 유래된 R 또는 S 배열 (1979년 IUPAC 유기 화학 명명법의 섹션 E에 정의된 바와 같음)의 락틸 라디칼 (lactyl radical)을 나타낸다. 상기 그룹은 또한 상기 입체 이성체 배열의 혼합물일 수 있다.
- [0084] b의 값은 M의 원자가와 동일하다. 따라서, "b"는 M이 양성자 (H⁺) 또는 Na, K, Ag, 암모늄 (NH₄) 또는 치환된 암모늄과 같은 1가의 양이온인 경우에는 1의 값을 얻는다. "b"는 M이 Ca, Mg, Zn, Mn, Fe (II) 또는 Cu와 같은 2가의 양이온인 경우에는 2의 값을 갖는다.
- [0085] "a"의 값은 1에서 3 사이가 될 수 있으며, 1이 바람직하다. "a"가 1인 락틸레이트는 모노락틸레이트 (monolactylates)이고; "a"가 2인 화합물은 디락틸레이트 (dilactylates)이며; 그리고 "a"가 3인 화합물은 트리락틸레이트로 (trilactylates)이다. 모노락틸레이트 (a=1)가 본원 발명의 사용에 바람직하다. 그러나, 모노락틸레이트가 항균제에 포함되는 경우, 이는 미량의 디락틸레이트 및 트리락틸레이트의 존재를 배제하지 않는다는 점에 유의해야 한다; 모노락틸레이트를 합성하는 과정에서 고차 화학종이 발생할 수 있다.
- [0086] 본 발명에서 항균제로서 유용한 화학식 1의 예시적인 락틸레이트는 dodecanoyl-lactylate (C12-lactylate); tetradecanoyl-lactylate (C14-lactylate); hexadecanoyl-lactylate (C16-lactylate); octadecanoyl lactylate (C18:0-lactylate); 및 octadec-9-enoyl-lactylate (C18:1-lactylate)를 포함하며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0087] 이러한 락틸레이트의 합성 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들면, 미국 특허 제3,883,669호 (Tsen et al.); 미국 특허 제4,146,548호 (Forsythe); Elliger, *A convenient preparation of pure stearoyl-2-lactyllic acid*, Journal of Agricultural and Food Chemistry 27 : 527 (1979); 및 WO 제2012/036693호 (Caravan Ingredients Inc.) 이다.
- [0088] **화학식 2**
- [0089] 본 발명에서 항균제로 사용하기에 적합한 글리세롤 에스테르는 아래 화학식 2로서 정의된다:
- [0090] $CH_2OR_1-CHOR_2-CH_2OR_3$ (화학식 2)
- [0091] R₁, R₂ 및 R₃은 각각 독립적으로 H 또는 C4-C18 아실 그룹을 나타내고, 단, R₁, R₂ 또는 R₃ 중 적어도 하나는 H이 고, R₁, R₂ 또는 R₃ 중 적어도 하나는 아실 그룹이다.
- [0092] 제1 실시 양태에서, R₁, R₂ 또는 R₃ 중 하나 또는 둘은 C6-C14 아실 그룹이고 나머지 Rn 그룹은 H이다. 바람직하게는, R₁, R₂ 또는 R₃ 중 하나 또는 둘은 C8 아실 그룹이고 나머지 Rn 그룹은 H이다.
- [0093] 본 발명은 항균제 내에서 글리세롤 모노- 및 디-에스테르의 혼합물의 사용을 배제하지 않는다는 것을 유의해야

한다. 예를 들어, (C8) 글리세롤 모노/디-에스테르의 혼합물의 사용으로 양호한 결과가 얻어졌다.

[0094] 이러한 모노- 및 디-에스테르의 합성 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 글리세롤의 C4-C18 에스테르의 상업적 합성은 아래와 같은 전형적으로 두 가지 상이한 경로에 의해 수행된다: 황산 (sulphuric acid) 또는 술폰산 (sulfonic acids)과 같은 균질한 산에 의한 촉매 작용에서 지방산과 글리세롤의 직접 에스테르화 반응 경로 (글리세롤 분해); 또는 NaOH, KOH 또는 Ca(OH)₂와 같은 알칼리성 수산화물 및 메탄올과 같은 저분자량 알코올의 나트륨염에 의한 촉매로 트리글리세라이드 (triglycerides) 및 폴리알콜 (polyalcohol)의 에스테르 교환 반응 (transesterification) 경로. 또한, 아래의 참조문헌으로부터도 참조할 수 있다: Mostafa et al. *Production of mono-, di-, and triglycerides from waste fatty acids through esterification with glycerol* Advances in Bioscience and Biotechnology, 2013, 4, 900-907; Hyun et al. *A single step non-catalytic esterification of palm fatty acid distillate (PFAD) for biodiesel production*. Fuel, 93, 373-380 (2012). 또한, 이러한 합성 방법에서 수득된 비정제 글리세롤 에스테르는 예를 들어 여과; 원심 분리; 증류; 결정화; 추출; 및 크로마토그래피의 통상적인 방법으로 정제될 수 있다.

[0095] 본 발명은 하기의 실시예에 의해 추가로 예시되며, 이들 실시예는 본원 발명의 본질을 나타내는 것으로서, 본원 발명은 이들 실시예로 제한되지 않는다.

실시예

[0097] AMCET 200C: C8-글리세롤 모노- 및 디-에스테르의 혼합물, Corbion Caravan, Lenexa, Kansas, U.S로부터 구입.

[0098] AMCET 3400E: decanoyl-lactylate (C10-락틸레이트) 및 dodecanoyl-lactylate (C12-락틸레이트)의 혼합물, Corbion Caravan, Lenexa, Kansas, U.S.A.로부터 구입.

[0099] AMCET 4530E: dodecanoyl-lactylate (C12-락틸레이트) 및 tetradecanoyl-lactylate (C14-락틸레이트)의 혼합물, Corbion Caravan, Lenexa, Kansas, U.S.A.로부터 구입.

[0100] ATCC: American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, U.S.A.

[0101] Bioscreen C: 핀란드 헬싱키의 Oy Growth Curves Ab Ltd에서 구입할 수 있는 배양 시스템. Bioscreen C는 최대 200개의 웰에서 동시에 수직적 광도측정 (vertical photometry)으로 탁도(성장)의 현상을 역학적 (kinetically)으로 측정한다.

[0102] EMPLEX: C18-lactylate. Corbion Caravan, Lenexa, Kansas, U.S로부터 구입.

[0103] MIC: 최소 억제 농도 (MIC)는 광학 밀도 시험에서 측정한 바와 같이 배양의 흡광도 증가가 역치 (threshold value)를 초과하지 않는 최저 농도이고, 상기 역치는 공 시료 (空試料, blanks)의 흡광도 값의 평균 증가량에 표준 편차의 3배를 더한 값으로 정의된다.

[0104] Olacta: Octadecenoyl-lactylate (C18:1-락틸레이트), Corbion Caravan, Lenexa, Kansas, U.S.A.로부터 구입.

[0105] Pationic 122A: sodium decanoyl lactylate (sodium caproyl lactylate) 및 sodium dodecanoyl lactylate (sodium lauroyl lactylate)의 2개 락틸레이트의 1.3:1 몰비의 혼합물, Corbion Caravan, Lenexa, Kansas, U.S로부터 구입.

[0106] 실시예 1: 대장균 (*Escherichia coli*)과 *Clostridium pasteurianum*의 혼합 배양물에 대한 tetradecanoyl-lactylate (C14-lactylate)의 효능

[0107] tetradecanoyl-lactylate (C14-lactylate)가 생체 공학의 동형 젖산 (bioengineered homolactic R-lactic acid)을 생산하는 대장균 (*Escherichia coli*) TG128 (NRRL B-30962, NRRL: Agricultural Research Service Culture Collection, National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, Illinois, U.S.A.)의 배양에서 *Clostridium pasteurianum* JEG2 (NCCB 100154, NCCB: Netherlands Culture Collection of Bacteria, Utrecht, Netherlands)의 성장을 예방할 수 있는지 알아보기 위하여, 3가지의 서로 다른 발효조를 설치하여 수행하였다. 이들 발효조는 각각

[0108] i) 발효조 1: 대장균 (*Escherichia coli*) TG128 순수 배양 발효;

[0109] ii) 발효조 2: *Clostridium pasteurianum* JEG2와 혼합된 대장균 (*Escherichia coli*) TG128;

[0110] iii) 발효조 3: 0.05 %(w/v)의 tetradecanoyl-lactylate (C14-lactylate): Corbion Caravan, Lenexa, Kansas,

U.S.A.)를 첨가한 *Clostridium pasteurianum* JEG2와 혼합 된 대장균 (*Escherichia coli*) TG128, 이다.

[0111] 상기 3가지 발효는 모두 무균 7 리터 발효기에서 수행되었다. 상기 발효조 1, 2 및 3은 하기 조성의 3.5 리터 무균 성장 배지로 채웠다: 3.25 리터의 탈염수 (demineralised water), 385g의 glucose monohydrate, 12.25g의 di-ammonium phosphate, 17.75g의 di-potassium hydrogen phosphate, 12.25g의 potassium dihydrogen phosphate, 3.5 ml의 1M 농도 betaine-hydrochloride, 5.25 ml의 1M 농도 MgSO₄ (magnesium sulphate), 3.5 ml의 1M 농도 CaCl₂ (calcium chloride) 및 5.25 ml의 미량 원소 용액(trace metal solution). 상기 미량 원소 용액은 리터 당 1.6g의 FeCl₃ (철(III)-염화물), 0.2g의 CoCl₂·6H₂O (염화코발트), 0.1g의 CuCl₂ (염화구리), 0.2g의 ZnCl₂·4H₂O (염화아연) NaMoO₄ (나트륨-몰리브덴산염) 0.2g, H₃BO₃ (붕산) 및 37 %(w/w) HCl (염산) 10 ml를 포함한다. 상기 발효조 3에는 0.05 %(w/v)의 tetradecanoyl-lactylate (C14-lactylate)를 넣었다.

[0112] 3개의 모든 발효조에는 pH 프로브를 장착하였다. 탈염수의 Ca(OH)₂ 슬러리를 첨가하여 발효의 pH를 6.5로 조절하였다. Ca(OH)₂ 슬러리의 농도는 약 220g/l이었다. 발효조 온도는 37°C의 값으로 일정하게 유지되었다.

[0113] 각 발효조 (1, 2 및 3)에 대장균 (*Escherichia coli*) TG128의 밤새 활발히 성장한 배양액 80 ml를 접종하였다. 발효조 2 및 3에는 또한 뇌 심장 침출 배지 (brain heart infusion broth) 상에서 성장하는 *Clostridium pasteurianum* JEG2 배양물 1 ml를 접종하였다. 발효 과정에 따라 발효조 배양을 25 내지 35시간 동안 작동시킨 후, 분석하였다.

[0114] 이 (화학적) 분석 결과는 하기 표 1에 요약되어있다:

표 1

	Fermenter 1	Fermenter 2	Fermenter 3
Component (g/l)	<i>Escherichia coli</i> TG128	<i>Escherichia coli</i> TG128 + <i>Clostridium pasteurianum</i> NCCB 100154	<i>Escherichia coli</i> TG128 + <i>Clostridium pasteurianum</i> NCCB 100154 + Tetradecanoyl-lactylate
R-lactate	82.6	28.2	81.8
S-lactate	0	2	0.3
% enantiomeric excess: (R-S)/(R+S)	100	86.8	99.3
Ethanol	0.07	0.4	0.08
glucose	1.9	14.4	2.3
Formic acid	<0.2	2	<0.2
Acetic acid	0.2	2.3	0.3
Propionic acid	<0.1	<0.1	<0.1
Butyric acid	<0.1	6.6	0.1
Pyruvic acid	<0.1	<0.1	<0.1
2-hydroxy butyric acid	<0.1	<0.1	<0.1
Glycolic acid	<0.5	<0.5	<0.5
Oxalic acid	<0.2	<0.2	<0.2
Sorbic acid	<0.1	<0.1	<0.1
Fumaric acid	<0.2	<0.2	<0.2
Succinic acid	0.1	<0.1	<0.1
Benzoic acid	<0.3	<0.3	<0.3
Maleic acid	<0.2	<0.2	<0.2
Malic acid	<0.5	<0.5	<0.5
Citric acid	<0.5	<0.5	<0.5

[0116] 접종 12시간 후에, 발효조 2에서 다량의 거품과 부폐한 냄새가 발생하기 시작하는 것이 관찰되었다. 배양액을 현미경으로 관찰한 결과 많은 양의 내생 포자 함유 세포 (endospore bearing cells)가 존재하는 것으로 나타났다. 이런 현상은 *Clostridium pasteurianum* JEG2가 무제한 성장할 때 나타난다.

- [0117] 또한, 대장균 (*Escherichia coli*) TG128과 *Clostridium pasteurianum* JEG2의 혼합 배지를 접종하였으나 0.05 % (w/v) tetradecanoyl-lactylate (C14-lactylate)를 함유한 발효조 3에서는 발포 또는 부패한 냄새가 없었다. 더욱이, 발효조 3에서 채취한 배양액을 현미경으로 관찰한 결과, 내생 포자가 없는 세포가 존재한다는 것을 알 수 있었다.
- [0118] 발효조 3의 성능은 대장균 (*Escherichia coli*) TG128의 순수한 배양을 접종한 발효조 1의 성능과 거의 모든 면에서 유사했다. 또한, 발효 배지 (표 1)의 화학적 분석 결과, 대장균 (*Escherichia coli*) TG128 표준 발효액 (발효조 1)과 tetradecanoyl-lactylate가 첨가된 대장균 (*Escherichia coli*)/ *Clostridium pasteurianum* JEG2의 혼합 배양액 (발효조 3)의 불순물 프로파일에 차이가 없음을 보여 주었다. 발효조 1 및 3에서 생성된 락테이트 (lactate)의 거울상 이성질체 과량 퍼센트 (percent enantiomeric excess, 이성질체 순도)는 100에 가깝고, 발효조 3에서 소량의 S-락테이트가 검출되었는데, 이는 아마도 락틸레이트 에스테르의 비누화에 의해 도입되었을 것이다.
- [0119] 한편, 발효조 2에서의 거울상 이성질체 과량 퍼센트 (percent enantiomeric excess, 이성질체 순도)는 *Clostridium pasteurianum* JEG2의 무제한 성장으로 인하여 상당히 낮았다. 또한, 발효조 2에서 생성된 젖산 (lactic acid)의 총량 또한 상당히 낮았다. 거울상 이성질체 과량 퍼센트는 다음과 같이 정의된다: $(R-S)/(R+S) * 100$ 및 여기서 R 및 S는 각각 발효 배지에 포함된 R- 및 S-락테이트의 거울상 이성질체의 각각의 분율을 나타낸다.
- [0120] 발효조 3이 0.05 % (w/v) 대신에 0.025 % (w/v)의 tetradecanoyl-lactylate (C14-lactylate)로 강화되었을 때 정확히 동일한 결과가 얻어졌다.
- [0121] **실시예 2:** 대장균 (*Escherichia coli*)과 *Clostridium pasteurianum*의 혼합 배양에서 decanoyl-lactylate (C10-lactylate)와 dodecanoyl-lactylate (C12-lactylate)의 혼합물, 또는 dodecanoyl-lactylate (C12-lactylate) and tetradecanoyl-lactylate (C14-lactylate)의 혼합물의 효능
- [0122] 실시예 1에 기재된 것과 동일한 실험 장치에서, *Escherichia coli* TG128의 배양에서의 *Clostridium pasteurianum* JEG2의 성장을 억제하기 위한 0.05 % (w/v) AMCET 3400E 및 0.05 % (w/v) AMCET 4530E의 효능을 시험하였다.
- [0123] AMCET 3400E 또는 AMCET 4530E를 함유한 발효조 3의 성능은 모든 면에서 *Escherichia coli* TG128의 순수 배양을 접종한 발효조 1의 성능과 유사하다. 또한, 발효 배지의 화학적 분석 결과, *Escherichia coli* TG128 표준 발효 (발효조 1)와 AMCET 3400E 또는 AMCET 4530E가 혼합된 대장균 (*Escherichia coli*)/ *Clostridium pasteurianum* JEG2의 혼합 배양 (발효조 3) 사이에는 불순물 프로파일에서 차이가 없다는 것을 보여 주었다. 발효조 1 및 3에서 생성된 락테이트의 거울상 이성질체 초과 퍼센트 (percent enantiomeric excess, 이성질체 순도)는 AMCET 3400E 및 AMCET 4530E에 대하여 100에 가깝다.
- [0124] **실시예 3:** *Clostridium perfringens*에 대한 락틸레이트의 시험 판내 (in vitro) 시험
- [0125] 성장을 억제하는 것에 관한 화학식 1에서 정의된 바와 같은 락틸레이트 및 화학식 2에서 정의된 글리세롤 에스테르의 효능을 Bioscreen C 배양 시스템에서 *Clostridium perfringens* ATCC 13124에 대하여 시험을 하였다.
- [0126] 배양(액)의 광학 밀도는 광대역 필터를 사용하여 420 - 580 nm에서 고정 시간 간격으로 자동 측정되었다. 시험 유기체의 성장 속도는 30°C에서 결정되었다. 낮은 산소 조건을 보장하기 위하여, Bioscreen은 M-12 타입 산소 센서 (In Vivo2 400 저산소 워크 스테이션, Biotrace International Plc, Bridgend, 영국)가 장착된 협기성 캐비닛 안에 놓았다. 산소 장력은 Ruskinn 가스 혼합기 모듈 (Biotrace International Plc)을 사용하여 0% 산소로 조절하였다.
- [0127] 뇌 심장 침출 배지 (Brain heart infusion broth)는 하기 표 2에 제시된 바와 같이 다양한 양의 상이한 락틸레이트 및 글리세롤 에스테르로 제조되었다.
- [0128] 아래의 다양한 화합물에 대하여 효능실험이 이루어졌다: Octanoyl-lactylate (C8-lactylate), Decanoyl-lactylate (C10-lactylate), Dodecanoyl-lactylate (C12-lactylate), Tetradecanoyl-lactylate (C14-lactylate), Hexadecanoyl-lactylate (C16-lactylate), Olacta (octadecenoyl-lactylate, C18:1-lactylate), AMCET 3400E, AMCET 4530E, C8-glycerol mono/di, C10-glycerol mono/di, C12-glycerol mono/di, C14-glycerol mono/di, Tetradecanoic acid (Myristic acid) 및 Sodium tetradecyl sulfate (Sodium myristyl sulfate).

표 2

Species	Concentration Range % (w/v)	Concentration Step size % (w/v)
Octanoyl-lactylate (C8-lactylate)	0 - 0.5	0.1
Decanoyl-lactylate (C10-lactylate)	0 - 0.1	0.02
Dodecanoyl-lactylate (C12-lactylate)	0 - 0.01	0.002
Tetradecanoyl-lactylate (C14-lactylate)	0 - 0.01	0.001
Hexadecanoyl-lactylate (C16-lactylate)	0 - 0.01	0.002
Olacta (Octadecenoyl-lactylate, C18:1-lactylate)	0 - 0.1	0.02
AMCET 3400E (C10/C12-lactylate)	0 - 0.01	0.001
AMCET 4530E (C12/C14-lactylate)	0 - 0.01	0.001
C8-glycerol mono/di	0 - 0.1	0.05
C10-glycerol mono/di	0 - 0.5	0.01
C12-glycerol mono/di	0 - 0.01	0.001
C14-glycerol mono/di	0 - 0.01	0.001
Tetradecanoic acid (Myristic acid)	0 - 0.01	0.001
Sodium tetradecyl sulfate (Sodium myristyl sulfate)	0 - 0.01	0.001

[0129] Tetradecanoic acid (Myristic acid), Sodium tetradecyl sulfate (Sodium myristyl sulfate)는 Sigma-Aldrich사로부터 구입.

[0130] 배지의 pH는 Blueline 16 pH (마이크로) 프로브 (No. 285129163)가 장착된 Handylab pH 12 pH 미터를 사용하여 9M 황산으로 pH 6.0으로 조정하였다. 모든 배지는 0.45 μ m 셀룰로스 아세테이트 필터 (Minisart syringe filter, 멸균 및 비열화, 번호 16555, Sartorius, Gottingen, Germany) (9)를 사용하여 여과하여 멸균하였다. 300 μ l의 각 배지를 멸균한 Bioscreen Honeycombe 100 well plate (Thermo electron Oy, Vantaa, Finland)의 패널에 옮겼다. 완성된 웰 플레이트 (well plate)는 추후 사용할 때까지 -30°C에서 보관하였다. 상기 웰 플레이트에 해밀턴 반복 디스펜서 (Hamilton, Bonaduz, Switzerland)를 사용하여 3 μ l의 종균 배양액을 접종하였다. Clostridium perfringens ATCC 13124의 액체 종균 배양액은 뇌 심장 침출 배지 (Oxoid CM225, Basingstoke, 영국) 10 ml가 들어있는 스크류 캡 투브 (100 × 16 mm)을 이용하여 30°C에서 24시간 동안 준비하였다.

[0131] 표 3은 뇌 심장 침출 배지에서의 Clostridium perfringens ATCC 13124에 대한 lactylates, glycerol esters, tetradecanoic acid (myristic acid) 및 sodium tetradecyl sulfate (sodium myristyl sulfate)의 MIC 값을 나타내고 있다. 괄호 안의 수는 반복 횟수를 의미한다.

표 3

[0132] 뇌 심장 침출 배지에서의 Clostridium perfringens ATCC 13124에 대한 상이한 지방산 유도체의 MIC 값. (반복 횟수는 괄호 안에 표시됨.)

Species	MIC value % (w/v)
Octanoyl-lactylate (C8-lactylate)	0.05 (2)
Decanoyl-lactylate (C10-lactylate)	0.04 (2)
Dodecanoyl-lactylate (C12-lactylate)	0.002 (2)
Tetradecanoyl-lactylate (C14-lactylate)	0.001 (2)
Hexadecanoyl-lactylate (C16-lactylate)	0.002 (2)
Olacta (Octadecenoyl-lactylate, C18:1-lactylate)	0.02 (2)
AMCET 3400E (C10/C12-lactylate)	0.02 (3)
AMCET 4530E (C12/C14-lactylate)	0.001 (3)
C8-glycerol mono/di	0.1 (3) 0.2 (4)
C10-glycerol mono/di	0.02 (2) 0.04 (2)
C12-glycerol mono/di	>0.01 (2)
C14-glycerol mono/di	>0.01 (4)
Tetradecanoic acid (Myristic acid)	>0.01 (3)

Sodium tetradecyl sulfate (Sodium myristyl sulfate)	0.001 (3)
---	-----------

- [0134] 표 3을 보면, 매우 낮은 농도에서도 락틸레이트 및 글리세롤 에스테르는 *Clostridium perfringens* ATCC 13124의 성장을 억제할 수 있는 것으로 나타났다.
- [0135] **실시예 4:** 일부 락틸레이트 및 C8-글리세롤 모노/디-에스테르의 항균 특성
- [0136] 화학식 1에서 정의된 바와 같은 선택된 다양한 락틸레이트 및 화학식 2에서 정의된 C8-glycerol mono/di ester (Caprylic mono/di)의 성장 억제 효능을 Bioscreen C 배양 시스템에서 그람 양성 및 그람 음성 박테리아의 선택에 대하여 시험하였다. 배양(액)의 광학 밀도는 광대역 필터를 사용하여 420 - 580 nm에서 고정 시간 간격으로 자동 측정되었다. 시험 유기체의 성장 속도는 30°C에서 결정되었다.
- [0137] 뇌 심장 침출 배지는 다양한 양의 락틸레이트 또는 C8-글리세롤 모노/디 에스테르 (카프릴릭 모노/디)로 제조하였다. 하기 화합물을 시험하였다: AMCET 3400E; AMCET 4530E; EMPLEX; 및 AMCET 200C.
- [0138] 배지의 pH는 Blueline 16 pH (마이크로) 프로브 (No. 285129163)가 장착된 Handylab pH 12 pH 미터를 사용하여 9M 황산으로 pH 6.0으로 조정 하였다. 모든 배지는 0.45 μ m 셀룰로스 아세테이트 필터 (Minisart syringe filter, 멸균 및 비열화, 번호 16555, Sartorius, Gottingen, Germany) (9)를 사용하여 여과하여 멸균하였다. 300 μ l의 각 배지를 멸균한 Bioscreen Honeycombe 100 well plate (Thermo electron Oy, Vantaa, Finland)의 패널에 옮겼다. 완성된 웰 플레이트(well plate)는 추후 사용할 때까지 4°C에서 보관하였다. 상기 웰 플레이트에 해밀턴 반복 디스펜서 (Hamilton, Bonaduz, Switzerland)를 사용하여 3 μ l의 각각의 시험 (종균) 배양액을 접종하였다.
- [0139] 아래의 배양액으로 제조된 액체 종균 배양액 (Liquid seed cultures)이 이 실험에서 사용되었다.
- [0140] *Escherichia coli* serotype 0157:H7 (ATCC 700728);
- [0141] *Escherichia coli* (ATCC 8739);
- [0142] *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P);
- [0143] *Listeria monocytogenes* (F2399);
- [0144] *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644);
- [0145] *Listeria monocytogenes* NFPA 83 (Seman, D. L., A. C. Borger, et al. (2002) Journal of Food Protection 65(4): 651-658);
- [0146] *Listeria monocytogenes* LCDC 861 (Seman, D. L., A. C. Borger, et al. Journal of Food Protection 2002 65(4): 651-658);
- [0147] *Listeria innocua* (ATCC 33090);
- [0148] *Listeria innocua* TNO strain (TNO, Zeist, The Netherlands);
- [0149] *Salmonella enterica* (ATCC 13076, *S. Enteritidis*);
- [0150] *Salmonella enterica* (ATCC 13311, *S. Typhimurium*);
- [0151] *Salmonella enterica* JAVA (NCTC 8458, NCTC: National Collection of Type Cultures, Porton Down, Salisbury, United Kingdom);
- [0152] *Lactobacillus sakei* (DSMZ 20017, DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany);
- [0153] *Lactobacillus plantarum* (DSMZ 20174);
- [0154] *Lactobacillus curvatus* (DSMZ 20019);
- [0155] *Bacillus cereus* (ATCC 11778);
- [0156] *Pseudomonas lundensis* (LMG 13517, LMG: Belgian Coordinated Collections of Microorganisms/ LMG Bacteria Collection, Gent, Belgium); 및

[0157] *Pseudomonas fragi* (LMG 2191).

[0158] 모든 배양액을 매일 뇌 심장 침출 배지 (Oxoid CM0225, Basingstoke, UK) 10 ml가 들어있는 스크류 캡 튜브 (100 × 16 mm)로 이송하였다. *Lactobacillus* 종은 MRS 배지(broth, Oxoid CM0359)로 이송하였다. 모든 배양물은 30°C에서 교반없이 배양되었다.

[0159] 다양한 농도의 AMCET 3400E, AMCET 4530E, EMPLEX 및 AMCET 200C의 효과에 대하여 연구가 이루어졌다.

[0160] 하기 표 4 및 표 5에 요약된 데이터는 그람 양성균이 그람 음성균 종보다 이들 화합물에 더 민감하다는 것을 보여 준다. 표 5의 데이터는 또한 AMCET 200C가 락틸 레이트보다 훨씬 넓은 범위의 유기체에 대해 활성을 나타내고, 이러한 현상은 그람 음성 박테리아에도 포함된다. 그람 음성 박테리아에 대한 AMCET 200C (C8-글리세롤 모노/디)의 유효 농도는 0.5 - 1 %(w/w)이다.

표 4

[0161] AMCET 3400E, AMCET 4530E, EMPLEX 및 AMCET 200C가 서로 다른 그람 양성 및 그람 음성 박테리아에 미치는 영향.

Strain	AMCET 3400E (C10/C12-lactylate)	AMCET 4530E C12/C14-lactylate)	Emplex	AMCET 200C (C8-glycerol mono/di)
<i>Listeria monocytogenes</i> LCDC 861	+(+)	+(+)	- (-)	- (-)
<i>Listeria monocytogenes</i> NFPA 83	+(+)	+(+)	- (-)	- (-)
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	+(+)	+(+)	- (-)	- (-)
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	+(+)	+(+)	- (-)	- (-)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P	+(+)	+(+)	- (-)	- (-)
<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20174	+(-)	+(-)	- (-)	- (-)
<i>Lactobacillus curvatus</i> DSM 20019	+(-)	+(-)	- (-)	- (-)
<i>Lactobacillus sakei</i> DSM 20017	+(+)	+(+)	- (-)	- (-)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7 ATCC 700728	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 13311	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 13076	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)
<i>Salmonella enterica</i> JAVA strain	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)
<i>Pseudomonas lundensis</i> LMG 13517	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)
<i>Pseudomonas fragi</i> LMG 2191	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)

[0162] 0 - 0.1 %(w/w) 및 0 - 0.01 %(w/w)의 두 농도 범위를 시험하였다. 표 4에는 0 - 0.01 % 농도 범위의 결과가 팔호 안에 표시되어 있다. "+"기호는 억제를 나타낸다. 그람 양성 박테리아는 *Listeria*, *Bacillus*, *Staphylococcus* 및 *Lactobacillus*이다.

표 5

[0163] AMCET 3400E, AMCET 4530E, EMPLEX 및 AMCET 200C가 서로 다른 그람 양성 및 그람 음성 박테리아에 미치는 영향.

Strain	AMCET 3400E (C10/C12-lactylate)	AMCET 4530E C12/C14-lactylate)	Emplex	AMCET 200C (C8-glycerol mono/di)
<i>Listeria monocytogenes</i> F2399	+	+	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> LCDC 861	+	+	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> NFPA 83	+	+	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	+	+	+	+
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	+	+	+	+
<i>Listeria innocua</i> TNO strain	+	+	+	+
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P	+	+	+	+
<i>Lactobacillus curvatus</i> DSM 20019	NT	NT	NT	+
<i>Lactobacillus sakei</i> DSM 20017	NT	NT	NT	+

<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	NT	NT	NT	+
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7 ATCC 700728	-	-	-	+
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 13311	-	-	-	+
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 13076	-	-	-	+
<i>Salmonella enterica</i> JAVA strain	-	-	-	+
<i>Pseudomonas lundensis</i> LMG 13517	NT	NT	NT	-
<i>Pseudomonas fragi</i> LMG 2191	NT	NT	NT	-

[0164] 시험 된 농도 범위는 0 - 1 %(w/w)이고, 표 5에서 "+"기호는 억제를 나타내며, "NT"는 테스트하지 않은 것을 나타낸다. 그람 양성 박테리아는 *Listeria*, *Bacillus*, *Staphylococcus* 및 *Lactobacillus*이다.

실시예 5: *Saccharomyces cerevisiae*를 이용한 에탄올 발효

[0166] 이 실시예는 *Saccharomyces cerevisiae*로 에탄올 발효 중 락틸레이트 블렌드의 저농도 효과에 관한 것으로, 상기 발효는 사탕수수 당밀 (cane-sugar molasses) 상에서 실행되고, 유산균 (*Lactobacillus*) 종의 혼합 배양물로 고의 오염시킨 것이다.

배양물(Cultures) 및 배양 조건(culture conditions)

[0168] *Saccharomyces cerevisiae* MUCL30115는 Mycothèque de l' Université Catholique de Louvain (BCCM / MUCL, Louvain-la-Neuve, Belgium)에서 입수하고, 효모-펩톤-포도당 배지 (yeast-peptone-glucose broth, YPG)에서 미리 배양하였다. YPG-배양액은 1 리터의 탈염수에 대하여 아래의 구성성분을 포함한다: 40g의 glucose monohydrate; 10g의 Bacto™ Peptone (Becton, Dickinson and Company, Sparks, Maryland, USA); 및, 5g의 Bacto™ 이스트 추출물 (Becton, Dickinson and Company, Sparks, Maryland, USA). 배지의 pH는 1N HCl을 이용하여 pH 6.0 - 7.0으로 조정하였고, 배양물은 실온의 진동 플라스크 (shake flask)에서 배양하였다. *Lactobacillus brevis* LMG11438은 University of Gent (BCCM / LMG, Gent, Belgium)의 Laboratorium voor Microbiologie에서 입수하였다. *Lactobacillus fermentum* AR748 및 *Lactobacillus fructivorans* AR742는 Corbion Purac B.V., Gorinchem, the Netherlands로부터 입수하였다. 모든 균주는 MRS-배지 (de Man et al (1960) A medium for the cultivation of lactobacilli. J. Appl. Bacteriology 23(1): 130 - 135)에서 미리 배양하여, 고정 나사 캡이 달린 플라스크에 넣어 30°C에서 배양하였다. 상기 3개의 락토바실러스 (*Lactobacillus*) 배양물의 각각의 균등 부피를 혼합하여 혼합 배양물을 제조하였다.

[0169] 모든 발효 실험은 아래의 성분을 갖는 액체 배지 0.5 리터를 함유하는 3 리터 재킷 유리 발효조에서 수행되었다: 50g의 사탕 수수 당밀 (85° Brix); 및 450 ml의 탈염수. 각 발효 온도는 순환수 옥조를 사용하여 30°C로 조절하였고, pH는 1N NaOH를 이용하여 pH 5.5로 조절하였다.

[0170] 2개의 1차 발효조 (A, B)에 활발하게 발효되는 *Saccharomyces* 배양액 50 ml를 각각 접종하였다: 이들 두 개의 배양액에는 혼합 락토바실러스 배양액 10 ml가 주어졌다. 이들 발효조 중 하나 (A)에 10 %(w/w)의 Pationic 122A를 함유하는 용액 0.5 ml를 첨가하여 발효에서의 락틸레이트의 효과를 연구하였다.

[0171] 발효 24시간 후, 각각의 발효조 (A, B)로부터 9 - 10 vol. %의 접종제를 취하여 각각 새로운 배지를 함유하는 추가 발효조 (A', B')로 옮겼다: 1차 발효조 (A, B)의 발효는 그대로 진행시켰다. 이 back slopping 기술을 사용하여, 원천 발효조 (1차 발효조)에서 발효 24시간 후에 실시하는 접종제 이송을 6 - 8회 더 실시하였다.

분석 방법

[0173] L(+) 젖산, D(-) 젖산 및 남은 글루코오스의 양은 효소적 절차 (enzymic procedures)를 이용하여 결정하였다. 특정 제조업체의 프로토콜에 따라 구체적으로 결정을 하는 것은 다음과 같다: Megazyme International 사로부터 입수 가능한 K-Gluc 키트를 사용하여 글루코스를 검정하였고, D-락트산은 Megazyme International 사로부터 입수 가능한 K-Date 키트를 사용하여 분석하였으며, L-락트산은 Megazyme International 사로부터 입수 가능한 L-Date 키트를 사용하여 분석하였다.

[0174] 유기산과 에탄올은 Gas Chromatographic 분석으로 측정하였다.

결과

[0176] 하기 표 6은 락토바실러스 (*Lactobacillus*) 종의 혼합 배양액으로 오염된 발효에서의 L(+) 젖산, D(-) 젖산 및

에탄올의 결정된 양을 나타낸다. Pationic 122A를 포함하는 *Saccharomyces cerevisiae*의 발효 배양액에서는 락틸레이트 혼합물(blend)을 함유하지 않는 배양액과 비교하여 L(+) 및, 특히 D(-) 락트산의 현존 농도가 유의하게 낮아지는 것으로 나타났다. 더욱이, Pationic 122A를 함유한 *Saccharomyces cerevisiae* 배양액의 에탄올 농도는 락틸레이트 혼합물 (Pationic 122A)이 없는 배양액의 에탄올 농도를 넘어서 유의하게 상승한다. 이러한 Pationic 122A의 긍정적인 효과는 최소 6 - 8회 연속 이송 (consecutive transfers)에 대해서 유지될 수 있다.

표 6

당밀 발효 (Molasses Fermentation) with <i>Saccharomyces cerevisiae</i> contaminated with LAB mixed culture				
Transfer No.	Pationic 122A Present	L(+) Lactic acid (g/l)	D(-) Lactic acid (g/l)	Ethanol (% w/w)
2	No	1.40	6.80	1.20
3	No	1.18	6.50	1.30
4	No	1.28	6.79	1.60
5	No	1.16	3.15	1.30
6	No	1.42	3.31	1.60
Average		1.29	5.31	1.40

Molasses Fermentation with <i>Saccharomyces cerevisiae</i> contaminated with LAB mixed culture and in presence of Pationic 122A				
Transfer No.	Pationic 122A Present	L(+) Lactic acid (g/l)	D(-) Lactic acid (g/l)	Ethanol (% w/w)
2	Yes	0.15	2.10	1.30
3	Yes	0.16	0.90	2.010
4	Yes	0.15	0.98	2.20
5	Yes	0.21	0.97	2.20
6	Yes	0.23	1.33	1.80
Average		0.18	1.25	1.92

[0178] 본 발명의 명세서를 고려할 때, 발명의 범위를 벗어나지 않고 개시된 실시예들에서 다양한 수정이 이루어질 수 있음을 당업자에게 명백할 것이다.