



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0042408  
(43) 공개일자 2018년04월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12N 1/20* (2006.01) *A23C 9/123* (2017.01)  
*A23K 10/18* (2017.01) *A23L 33/135* (2016.01)  
*A61K 35/747* (2014.01) *C12R 1/225* (2006.01)

(52) CPC 특허분류  
*C12N 1/20* (2013.01)  
*A23C 9/1234* (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-7008644

(22) 출원일자(국제) 2016년08월30일  
심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2018년03월27일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2016/070408

(87) 국제공개번호 WO 2017/037058  
국제공개일자 2017년03월09일

(30) 우선권주장  
15183211.0 2015년08월31일  
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인  
시에이치알. 한센 에이/에스  
덴마크 디케이-2970 호르솔름 보게 알레 10-12

(72) 발명자  
닐슨, 세실리 리케 마비크  
덴마크 브로엔소에 2700 1. 테이호 아게스볼드바  
이 13  
흔백, 티나  
덴마크 비어커로드 3460 로브야크 6  
(뒷면에 계속)

(74) 대리인  
박장원

(74) 대리인  
박장원

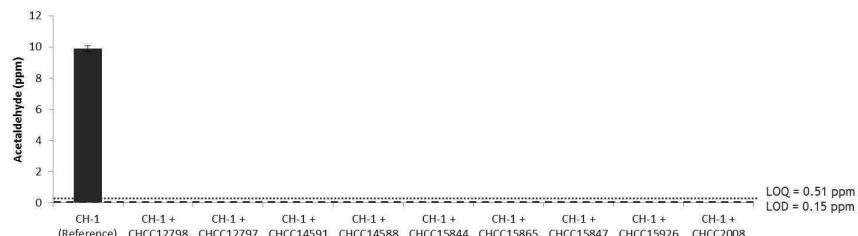
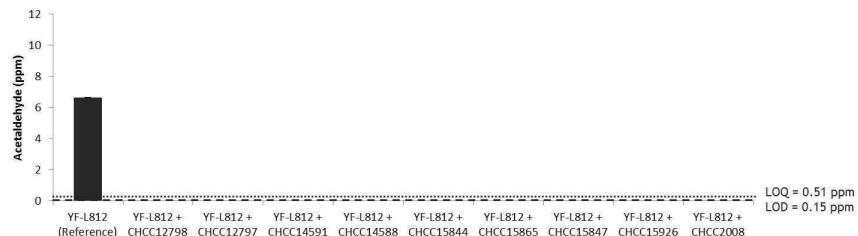
전체 청구항 수 : 총 15 항

## (54) 빌명의 명칭 아세트알데히드의 농도를 감소시키는 락토바실러스 퍼멘텀 박테리아

(57) 요약

본 발명은 발효유 제품에서 발효 중에 스타터 배양물(starter culture)에 의해 생성되는 아세트알데히드의 농도를 적어도 50% 감소시키는 능력을 갖는 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) 종의 박테리움에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 박테리움을 포함하는 조성물, 상기 박테리움을 사용하여 발효유 제품을 제조하는 방법, 및 그 결과 얻은 제품에 관한 것이다.

## 대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

*A23K 10/18* (2016.05)

*A23L 33/135* (2016.08)

*A61K 35/747* (2013.01)

*A23Y 2220/35* (2013.01)

*C12R 1/225* (2013.01)

(72) 발명자

**라스무센, 피아**

덴마크 쾤도우레 2610 몰러루프바이 5

**풀슨, 론**

덴마크 투엘루세 4340 운루세 훌백바이 31

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) 종의 박테리움으로서,

상기 박테리움은 발효유 제품에서 발효 중에 스타터 배양물(starter culture)에 의해 생성되는 아세트알데히드의 농도를 적어도 50% 감소시키는 능력을 갖는 락토바실러스 퍼멘텀 종의 박테리움.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 박테리움은 발효유 제품에서 발효 중에 스타터 배양물에 의해 생성되는 아세트알데히드의 농도를 적어도 75%, 적어도 95% 또는 적어도 98% 감소시키는 능력을 갖고, 아세트알데히드의 농도는 다음을 포함하는 분석법으로 결정되는 것인 락토바실러스 퍼멘텀 종의 박테리움:

(1) 다음에 의해 발효유 제품을 제조하는 것:

(a) 우유에 적어도  $10^7$  CFU/g 농도로 락토바실러스 퍼멘텀을, 및 스타터 배양물을 접종하는 것,

(b) pH가 4.6에 도달할 때까지 발효시키는 것, 및

(2) 발효유 제품을  $7 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 14일 동안 저장하는 것;

(3) 1 g의 발효유 제품에  $200 \mu\text{l}$ 의 4N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 을 첨가하고, 정적 헤드스페이스 가스 크로마토그래피에 의해 아세트알데히드의 농도를 결정하는 것.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 발효유 제품의 제조에 사용된 스타터 배양물은 아세트알데히드를 3 ppm 이상의 농도로 생성시킬 수 있는 LAB(유산균)를 포함하는 것인 락토바실러스 퍼멘텀 종의 박테리움.

#### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 하나의 항에 있어서, 스타터 배양물은 스트렙토코쿠스 씨모필러스(*Streptococcus thermophilus*) 및 락토바실러스 델브루에키 아종 불가리커스(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)를 포함하는 것인 락토바실러스 퍼멘텀 종의 박테리움.

#### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 박테리움은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 락토바실러스 퍼멘텀 종의 박테리움:

(a) 수탁번호 DSM32084의 락토바실러스 퍼멘텀 군주;

(b) 수탁번호 DSM32085의 락토바실러스 퍼멘텀 군주;

(c) 수탁번호 DSM32086의 락토바실러스 퍼멘텀 군주;

(d) 수탁번호 DSM32087의 락토바실러스 퍼멘텀 군주;

(e) 수탁번호 DSM32088의 락토바실러스 퍼멘텀 군주;

(f) 수탁번호 DSM32089의 락토바실러스 퍼멘텀 군주;

(g) 수탁번호 DSM32090의 락토바실러스 퍼멘텀 군주;

(h) 수탁번호 DSM32091의 락토바실러스 퍼멘텀 군주;

(i) 수탁번호 DSM32096의 락토바실러스 퍼멘텀 군주;

(j) 수탁번호 DSM22584의 락토바실러스 퍼멘텀 균주; 또는

(k) (a) 내지 (j)에 따른 기탁된 박테리아 중 하나에서 얻을 수 있는 돌연변이 균주로서, 상기 돌연변이는 발효유 제품에서 발효 중에 스타터 배양물에 의해 생성되는 아세트알데히드의 농도를 적어도 50% 감소시키는 능력을 갖는 것임.

### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 따른 락토바실러스 퍼멘텀 균주를 적어도 하나 포함하는 조성물.

### 청구항 7

제6항에 있어서, 상기 조성물은 다음 중에서 선택된 적어도 하나의 박테리움을 추가로 포함하는 것인 조성물:

- (a) 수탁번호 DSM32092로 독일생물자원센터(DSMZ)에 기탁된 락토바실러스 람노수스 균주 CHCC15860;
- (b) 수탁번호 DSM23035로 독일생물자원센터(DSMZ)에 기탁된 락토바실러스 람노수스 균주 CHCC5366;
- (c) 수탁번호 DSM24616로 독일생물자원센터(DSMZ)에 기탁된 락토바실러스 람노수스 균주 CHCC12697;
- (d) 수탁번호 DSM24651로 독일생물자원센터(DSMZ)에 기탁된 락토바실러스 파라카세이 균주 CHCC12777; 및
- (e) 수탁번호 DSM25612로 독일생물자원센터(DSMZ)에 기탁된 락토바실러스 파라카세이 균주 CHCC14676.

### 청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서, 적어도 하나의 동결방지 화합물을 추가로 포함하는 것인 조성물.

### 청구항 9

제6항 내지 제8항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 조성물은 동결물질 g당 적어도  $10^9$  콜로니 형성 단위의 농도, 또는 동결물질 g당 적어도  $10^{10}$  콜로니 형성 단위의 농도, 또는 동결물질 g당 적어도  $10^{11}$  콜로니 형성 단위의 농도로 유산균을 포함하는, 고형동결된 또는 동결건조된 스타터 배양물인 것인 조성물.

### 청구항 10

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 따른 락토바실러스 퍼멘텀 박테리움 또는 제6항 내지 제9항 중 어느 하나의 항에 따른 조성물을 우유 또는 유제품에 첨가시키는 것, 및 이 혼합물을 4.6 미만의 pH에 도달할 때까지 약 22°C 내지 약 43°C의 온도에서 발효시키는 것을 포함하는 발효유 제품의 제조방법.

### 청구항 11

제10항에 있어서, 제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 따른 락토바실러스 퍼멘텀 박테리움 또는 제6항 내지 제9항 중 어느 하나의 항에 따른 조성물을 우유 또는 유제품에 첨가시키는 것, 및 이 혼합물을 다음 방식으로 발효시키는 것을 포함하는 방법:

- (a) 제1항에 기재된 락토바실러스 퍼멘텀 박테리아의 농도는 발효유 제품의 발효 종료시 적어도  $1 \times 10^6$  cfu/g 또는 적어도  $1 \times 10^7$  cfu/g이 되도록 함; 및/또는
- (b) 제1항에 기재된 락토바실러스 퍼멘텀 박테리아의 농도는 발효유 제품의 표면에서 적어도  $1 \times 10^5$  cfu/cm<sup>2</sup> 이 되도록 함.

### 청구항 12

제10항 또는 제11항에 따른 발효유 제품의 제조방법을 포함하는 식품, 사료 또는 의약품의 제조방법.

### 청구항 13

제12항에 기재된 제조방법에 의해 얻을 수 있는 식품, 사료 또는 의약품.

## 청구항 14

제12항에 있어서, 제1항 내지 제9항 중 어느 하나의 항에 따른 락토바실러스 퍼멘텀 박테리아를  $10^7$  CFU/g 내지  $10^{11}$  CFU/g,  $10^7$  CFU/g 내지  $10^{10}$  CFU/g, 및  $10^7$  CFU/g 내지  $10^9$  CFU/g의 농도를 비롯하여, 적어도  $10^7$  CFU/g의 농도로 포함하는 식품, 사료 또는 의약품.

## 청구항 15

제1항 내지 제6항 중 어느 하나의 항에 따른 선택된 락토바실러스 퍼멘텀 종의 박테리움 및 다음 중 하나 이상을 포함하는 식품, 사료 또는 의약품:

- (a) 다음의 속 중 하나 이상으로부터 선택된 적어도 하나의 추가 박테리움: 락토코쿠스 종, 스트렙토코쿠스 종, 락토바실러스 종, 류코노스톡 종, 수도류코노스톡 종, 페디오코쿠스 종, 브레비박테리움 종, 및 엔터로코쿠스 종;
- (b) 수탁번호 DSM32092로 독일생물자원센터(DSMZ)에 기탁된 락토바실러스 람노수스 균주 CHCC15860;
- (c) 수탁번호 DSM23035로 독일생물자원센터(DSMZ)에 기탁된 락토바실러스 람노수스 균주 CHCC5366;
- (d) 수탁번호 DSM24616로 독일생물자원센터(DSMZ)에 기탁된 락토바실러스 람노수스 균주 CHCC12697;
- (e) 수탁번호 DSM24651로 독일생물자원센터(DSMZ)에 기탁된 락토바실러스 파라카세이 균주 CHCC12777; 및
- (f) 수탁번호 DSM25612로 독일생물자원센터(DSMZ)에 기탁된 락토바실러스 파라카세이 균주 CHCC14676.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001]

본 발명은 발효유 제품에서 발효 중에 스타터 배양물(starter culture)에 의해 생성되는 아세트알데히드의 농도를 감소시키는 능력을 갖는 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) 박테리아, 상기 박테리아를 함유하는 조성물, 특히 상기 박테리아를 함유하는 보조 배양물, 상기 박테리아 또는 배양물을 사용하여 발효유 제품을 제조하는 방법, 그 결과 얻어진 식품, 사료 및 의약품을 비롯한 발효유 제품에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002]

유산균(LAB)은 수십년 동안 식품의 저장 기간을 늘리기 위해 사용되어 왔다. 발효 중에 LAB는 발효 제품의 pH를 감소시키는 원인이 되는 젖산 뿐만 아니라 다른 유기산을 생성한다. 산성 pH를 갖는 제품은 병원성 및 부패성(spoilage) 유기체를 비롯한 대부분의 미생물의 추가 증식을 지원하지 않는다.

[0003]

전통적으로, 요거트는 두 종의 유산균(LAB), 즉 락토바실러스 렐브루에키 아종 불가리커스(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) 및 스트렙토코쿠스 씨모필러스(*Streptococcus thermophilus*)의 혼합물로 이루어진 특정 요거트 스타터 배양물에 의한 우유의 발효에 의해 제조된다. 요거트의 제조에서 스타터의 주된 역할은 (i) 락토오스를 락트산으로 전환시킴을 통한 산성화, (ii) 예컨대 단백질의 변성 및 엑소폴리사카라이드의 생성에 의한 점성 질감의 생성, 및 (iii) 전형적인 요거트의 향미 발생이다 (1).

[0004]

전형적인 요거트 향미는 락트산에 의해 야기되는데, 락트산은 산성의 상쾌한 맛, 및 아세톤, 디아세틸, 및 아세트알데히드와 같은 다양한 카르보닐 화합물의 혼합물을 부여하며, 여기서 아세트알데히드는 주요 향미 성분으로 간주된다 (2). 요거트에서 발견되는 상대적으로 높은 농도의 아세트알데히드는, 일반적인 요거트 박테리아에는 아세트알데히드를 에탄올로 전환시키기 위한 주요 효소인 알코올탈수소효소가 없으므로, 이 대사산물의 낮은 이용률로 인한 것으로 의심된다 (3).

[0005]

요거트 발효 중에, 아세트알데히드는 피루베이트 탈카르복시화의 결과로서 락토오스 대사로부터 직접 생성될 수 있다. 이는 (i) 피루베이트 탈카르복시화효소 또는 피루베이트 산화효소를 통해 직접, 또는 (ii) 피루베이트 탈수소효소 또는 피루베이트 포르메이트리아제(pyruvate formatelyase)에 의한 중간물질 아세틸 코엔자임 A의 형성을 통해 간접적으로 생성될 수 있다. 또한, 아세트알데히드는 티미딘(thymidine)을 아세트알데히드 및 글리세르알데히드-3-포스페이트로 분해하는 디옥시리보알돌라제(deoxyriboaldolase)의 활성에 의해 형성될 수 있다. 마지막으로, 여러 아미노산이 대사 중간물질로서 피루베이트를 통해 아세트알데히드로 전환될 수 있는 반면, 트

레오닌은 트레오닌 알돌라아제(TA)의 활성에 의해 아세트알데히드 및 글리신으로 직접 전환될 수 있다. 따라서, 아세트알데히드 형성의 정확한 생화학적 경로는 박테리아 종들 사이에서 서로 다를 수 있으며, 세포내 조절 메커니즘에 따라 다르다. 추가로 이용가능한 기질 역시 아세트알데히드 합성 경로에 영향을 줄 수 있다.

[0006] 역사적인 감각 분석(sensory analysis)은 요거트의 최적의 향미를 위하여 아세트알데히드 농도가 요거트 중량에 대하여 23 내지 41 mg/kg이어야 하고 (1), 왜 연구자들이 유의한 양의 원하는 향미 성분을 생성하는 균주를 분리하려고 노력해왔는지를 보여주어 왔다.

[0007] 그러나, 새로운 시장 및 새로운 소비자 선호도는 아세트알데히드 향미가 덜 나타나는 요거트 및 기타 발효유 제품에 대한 관심 증가를 나타내는 것으로 보인다.

[0008] 따라서, 아세트알데히드가 감소된 발효 제품이 요구되고 있다.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

#### 과제의 해결 수단

[0009] 본 발명의 락토바실러스 퍼멘텀 균주는 발효유 제품에서 발효 중에 스타터 배양물에 의해 생성되는 아세트알데히드의 농도를 적어도 50% 감소시키는 능력을 갖는 것을 특징으로 한다.

[0010] 본 발명은 상술한 바와 같은 박테리아, 이를 포함하는 조성물, 이 박테리아를 이용하여 발효유 제품을 제조하는 방법, 및 이로부터 얻은 제품을 제공한다.

#### 도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 스타터 배양물 단독(기준물, reference)으로, 또는 FreshQ®4, Holdbac® YM-C Plus 또는 Lb. 퍼멘텀 균주와 조합된 스타터 배양물로 발효된 발효유 제품에서  $7\pm1^{\circ}\text{C}$ 에서 14일간 저장 후 아세트알데히드 수준을 도시한 것이다. LOD: 검출 한계. LOQ: 정량 한계.

도 2는 스타터 배양물 단독(기준물)으로, 또는 Lb. 퍼멘텀 CHCC14591과 조합된 스타터 배양물로 발효된 발효유 제품에서  $7\pm1^{\circ}\text{C}$ 에서 14일간 저장 후 아세트알데히드 수준을 도시한 것이다. LOD: 검출 한계. LOQ: 정량 한계.

도 3는  $43^{\circ}\text{C}$ 의 우유(1% 지방 및 4.5% 단백질)에서 증식한 4가지 시판되는 스타터 배양물 FD-DVS YF-L812, F-DVS YF-L901, F-DVS YoFlex Mild 2.0 및 F-DVS CH-1의 산성화 곡선을 도시한다.

도 4는  $6^{\circ}\text{C}$ 에서 43일 동안 저장 후 4가지 시판되는 스타터 배양물 FD-DVS YF-L812, F-DVS YF-L901, F-DVS YoFlex Mild 2.0 및 F-DVS CH-1 중 하나로 발효된 요거트의 후산성화 곡선을 도시한다.

도 5는 스타터 배양물 FD DVS YF-L812 또는 F-DVS CH-1 단독(기준물)으로, 또는 9가지 Lb. 퍼멘텀 균주 중 하나와 조합된 스타터 배양물로 발효된 발효유 제품에서  $7\pm1^{\circ}\text{C}$ 에서 14일간 저장 후 아세트알데히드 수준을 도시한 것이다. LOD: 검출 한계. LOQ: 정량 한계.

#### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 본 발명은 발효유 제품에서 발효 중에 스타터 배양물에 의해 생성되는 아세트알데히드의 농도를 적어도 50% 감소시키는 능력을 갖는 락토바실러스 퍼멘텀 균주를 제공한다. 이러한 감소는 본 발명의 락토바실러스 퍼멘텀 균주 없이 생성되는 발효 제품과 비교하여 결정된다. 발효 제품에서 아세트알데히드의 농도를 결정하기 위하여 상이한 분석법들이 알려져 있는데, 이들은 본 발명에 따른 목적을 위하여 사용될 수 있다. 발효유 제품에서 발효 중에 스타터 배양물에 의해 생성되는 아세트알데히드의 농도를 적어도 50% 감소시키는 능력은 종기로는 다음을 포함하는 분석법에 의해 결정된다:

[0013] (1) 다음에 의해 발효유 제품을 제조하는 것:

[0014] (a) 우유에 적어도  $10^7$  CFU/g 농도로 락토바실러스 퍼멘텀을, 및 스타터 배양물을 접종하는 것,

[0015] (b) pH가 4.6에 도달할 때까지 발효시키는 것, 및

- [0016] (2) 발효유 제품을  $7\pm1^{\circ}\text{C}$ 에서 14일 동안 저장하는 것;
- [0017] (3) 1 g의 발효유 제품에 200  $\mu\text{l}$ 의 4N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 을 첨가하고, 정적 헤드스페이스 가스 크로마토그래피에 의해 아세트알데히드의 농도를 결정하는 것.
- [0018] 아세트알데히드는 유산균에 의해 생성되는 맛 성분이다. 이 성분은 특정 용도에서는 바람직하지만, 다른 용도에서는 아세트알데히드의 존재를 감소시키거나 피하는 것이 유리할 것이다. 따라서, 발효유 제품에서 아세트알데히드의 농도를 감소시키는 락토바실러스 퍼멘텀 박테리아는 달게 만든(sweetened) 또는 순한(mild) 요거트의 제조와 같은 특정 용도에서 이점을 제공한다. 본 발명의 락토바실러스 퍼멘텀 균주는 예를 들어, 발효유 제품에서 발효 중에 스타터 배양물에 의해 생성되는 아세트알데히드의 농도를 적어도 75%, 적어도 95% 또는 적어도 98% 감소시킬 수 있다.
- [0019] 본 발명의 락토바실러스 퍼멘텀 균주는 예를 들어, 발효유 제품에서 발효 중에 스타터 배양물에 의해 생성되는 아세트알데히드의 농도를 적어도 50% 감소시키는 능력을 갖고, 여기서 발효유 제품의 제조에 사용된 스타터 배양물은 아세트알데히드를 3 ppm 이상의 농도로 생성할 수 있는 LAB을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다. 예를 들어, 분석은 스트렙토코쿠스 씨모필러스와 락토바실러스 멜브루엑키 아종 불가리커스를 포함하는 스타터 배양물을 사용하는 것을 기반으로 할 수 있다. 각 혼합물은 요거트의 제조에 자주 사용되며, 아세트알데히드를 생성하는 것으로 알려져 있다.
- [0020] 본 발명의 박테리아는 유리하게는 다음의 기탁된 균주 중 하나로부터 유래될 수 있다:
- [0021] (a) 수탁번호 32084로 독일생물자원센터(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig)에 기탁된 락토바실러스 퍼멘텀 균주 CHCC12798;
- [0022] (b) 수탁번호 32085로 독일생물자원센터(DSMZ)에 기탁된 락토바실러스 퍼멘텀 균주 CHCC12797;
- [0023] (c) 수탁번호 32086로 독일생물자원센터(DSMZ)에 기탁된 락토바실러스 퍼멘텀 균주 CHCC14591;
- [0024] (d) 수탁번호 32087로 독일생물자원센터(DSMZ)에 기탁된 락토바실러스 퍼멘텀 균주 CHCC14588;
- [0025] (e) 수탁번호 32088로 독일생물자원센터(DSMZ)에 기탁된 락토바실러스 퍼멘텀 균주 CHCC15844;
- [0026] (f) 수탁번호 32089로 독일생물자원센터(DSMZ)에 기탁된 락토바실러스 퍼멘텀 균주 CHCC15865;
- [0027] (g) 수탁번호 32090로 독일생물자원센터(DSMZ)에 기탁된 락토바실러스 퍼멘텀 균주 CHCC15847;
- [0028] (h) 수탁번호 32091로 독일생물자원센터(DSMZ)에 기탁된 락토바실러스 퍼멘텀 균주 CHCC15848;
- [0029] (i) 수탁번호 32096로 독일생물자원센터(DSMZ)에 기탁된 락토바실러스 퍼멘텀 균주 CHCC15926;
- [0030] (j) 수탁번호 22584로 독일생물자원센터(DSMZ)에 기탁된 락토바실러스 퍼멘텀 균주 CHCC2008;
- [0031] (k) (a) 내지 (j)에 따른 기탁된 박테리아 중 하나에서 얻을 수 있는 돌연변이 균주로서, 상기 돌연변이는 발효유 제품에서 발효 중에 스타터 배양물에 의해 생성되는 아세트알데히드의 농도를 적어도 50% 감소시키는 능력을 갖는다.
- [0032] 본 발명의 맥락에서, "유산균" 또는 "LAB"라는 용어는 탄수화물 발효의 주요 대사 최종 산물로서 젖산을 생성하는 식품-등급 박테리아를 지칭하기 위해 사용된다. 이들 박테리아는 일반적인 대사 및 생리학적 특징과 관련이 있으며, 보통 그램 양성, 낮은 GC, 산성 내성, 비포자성(non-sporulating), 비호흡성, 막대모양의 간균 또는 구균이다. 발효 단계 중에, 이들 박테리아에 의한 락토오스의 소비는 젖산의 형성을 유발하여 pH를 감소시키고 단백질 응고물의 형성을 유도한다. 따라서, 이들 박테리아는 우유의 산성화 및 유제품의 질감에 대하여 책임이 있다. 본 명세서에서 사용된, "유산균"이라는 용어는 락토바실러스 종, 비피도박테리움 종, 스트렙토코쿠스 종, 락토코쿠스 종, 예컨대 락토바실러스 멜브루엑키 아종 불가리커스, 스트렙토코쿠스 씨모필러스, 락토바실러스 락티스, 비피도박테리움 아니말리스(*Bifidobacterium animalis*), 락토코쿠스 락티스, 락토바실러스 파라카세이 (*Lactobacillus paracasei*), 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*), 락토바실러스 헬베티커스 (*Lactobacillus helveticus*), 락토바실러스 아시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 비피도박테리움 브레베 (*Bifidobacterium breve*) 및 류코노스톡(*Leuconostoc*) 종의 속(genus)에 속하는 박테리아를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다.
- [0033] 전파를 위한 최적의 온도에 따라, LAB은 중온성(mesophilic) 또는 호열성(thermophilic) LAB로 특징지어진다.

"중온성"이라 함은 중간 온도에서 가장 잘 번식하는 미생물을 의미한다. 본원에서 "중온성 발효"라 함은 약 22°C 내지 약 35°C의 온도에서의 발효를 의미한다. "중온성 발효유 제품"이라 함은 중온성 스타터 배양물의 중온성 발효에 의해 제조된 발효유 제품을 의미하며, 버터우유, 사워 밀크(sour milk), 배양 우유, 스메타나(smetana), 사워 크림 및 후레쉬 치즈, 예컨대 퀴크, 트바로크(tvarog) 및 크림 치즈와 같은 발효유 제품을 포함한다. 산업적으로 가장 유용한 중온성 박테리아는 락토코쿠스 종 및 류코노스톡 종을 포함한다.

[0034] "호열성"이라 함은 고온에서 가장 잘 번식하는 미생물을 의미한다. "호열성 발효"라 함은 약 35°C 내지 약 45°C의 온도에서의 발효방법을 의미한다. "호열성 발효유 제품"이라 함은 호열성 스타터 배양물을 사용하여 호열성 발효에 의해 제조된 발효유 제품을 의미하며, 세트형 요거트(set-yoghurt), 스터드형 요거트(stirred-yoghurt), 스트레이드 요거트 및 드링킹 요거트와 같은 발효유 제품을 포함한다. 산업적으로 가장 유용한 호열성 박테리아는 스트렙토코쿠스 종 및 락토바실러스 종을 포함한다.

[0035] 아래에 약술되는 바와 같이, 본 발명은 중온성 및 호열성 발효를 이용하는 방법을 포함한다.

[0036] 진균, 효모 및 곰팡이와 관련하여 "억제하다(inhibit)"라 함은 예를 들어, 본 발명의 박테리아를 포함하는 식품 및/또는 식품의 표면에 있어서, 그러한 박테리아를 포함하지 않는 식품과 비교하여, 증식 또는 포자형성의 감소 또는 진균, 효모 및 곰팡이 수의 감소 또는 농도의 감소를 의미한다. 본 발명의 락토바실러스 퍼멘텀 박테리아에 의해 제공되는 억제의 정도는 좋기로는 락토바실러스 퍼멘텀 박테리아가 존재 및 부재할 때 한천 고화된 발효유 상의 증식에 의해 결정된다.

[0037] 본 발명의 맥락에서, "돌연변이"라 함은 예컨대 유전 공학, 방사선 및/또는 화학적 처리에 의해 본 발명의 균주로부터 유래된 균주로 이해되어야 한다. 좋기로는, 돌연변이는 기능적으로 동등한 돌연변이, 예컨대 특히 아세트알데히드를 감소시키는 효과에 있어서 기탁된 균주와 실질적으로 동일하거나 개선된 특성을 갖는 돌연변이이다. 이러한 돌연변이는 본 발명의 일부이다. 특히, "돌연변이"라 함은 본 발명의 균주에 화학적 돌연변이 유발원, 예컨대 에탄 메탄 설포네이트(EMS) 또는 N-메틸-N'-니트로-N-니트로구아니딘(NTG), 자외선으로 처리하는 것을 포함하는 통상적으로 사용되는 돌연변이 유발 처리를 수행함으로써 얻은 균주, 또는 자발적으로 발생하는 돌연변이를 의미한다. 돌연변이는 몇 가지 돌연변이 유발 처리를 받았을 수 있으나 (단일 처리는 스크리닝/선택 단계가 뒤따르는 하나의 돌연변이 유발 단계로 이해되어야 함), 20 개 이하, 또는 10개 이하, 또는 5개 이하의 처리(또는 스크리닝/선택 단계)가 수행되는 것이 현재 바람직하다. 현재 바람직한 돌연변이에서, 모 균주와 비교할 때, 박테리아 계놈 중 뉴클레오티드의 5% 미만, 또는 1% 미만, 또는 0.1% 미만이 다른 뉴클레오티드에 의해 옮겨졌거나, 결실되었다.

[0038] 본 발명을 설명하는 맥락에서 (특히 하기 청구항의 맥락에서), 용어 "하나(a)" 및 "하나(an)" 및 "그(the)" 및 유사한 지시자의 사용은 본 명세서에 달리 표시하지 않는 한, 또는 문맥에서 분명하게 부정하지 않는 한 단수 및 복수를 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

[0039] 본 발명은 발효유 제품에서 발효 중에 스타터 배양물에 의해 생성되는 아세트알데히드의 농도를 적어도 50% 감소시키는 능력을 갖는 락토바실러스 퍼멘텀 종의 적어도 하나의 박테리움을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0040] 각각의 조성물은 LAB을 비롯한 수많은 추가 박테리아를 포함할 수 있다. 따라서, 본 발명의 바람직한 조성물은 다음의 속 및 종 중의 하나 이상에서 선택된 적어도 하나의 박테리움을 추가로 포함하는 것을 특징으로 한다: 락토바실러스 종, 비피도박테리움 종, 스트렙토코쿠스 종, 락토코쿠스 종, 예컨대 락토바실러스 텔브루액키 아종 불가리커스, 스트렙토코쿠스 씨모필러스, 락토바실러스 락티스, 비피도박테리움 아니말리스, 락토코쿠스 락티스, 락토바실러스 파라카세이, 락토바실러스 플란타룸, 락토바실러스 헬베티커스, 락토바실러스 아시도필러스, 비피도박테리움 브레베 및 류코노스톡 종.

[0041] 특히 바람직한 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 발효유 제품에서 발효 중에 스타터 배양물에 의해 생성되는 아세트알데히드의 농도를 적어도 50% 감소시키는 능력을 갖는 락토바실러스 퍼멘텀 종의 적어도 하나의 박테리움을 포함한다. 일 구현예에서, 본 발명의 발효유 제품에서 발효 중에 스타터 배양물에 의해 생성되는 아세트알데히드의 농도를 적어도 50% 감소시키는 능력을 갖는 락토바실러스 퍼멘텀 박테리아의 몇 가지 상이한 균주는 조합된다. 대안적으로, 이를 추가 박테리아는 예를 들어 다음으로부터 선택될 수 있다:

[0042] (a) 수탁번호 DSM32092로 독일생물자원센터(DSMZ)에 기탁된 락토바실러스 람노수스 균주 CHCC15860;

[0043] (b) 수탁번호 DSM23035로 독일생물자원센터(DSMZ)에 기탁된 락토바실러스 람노수스 균주 CHCC5366;

[0044] (c) 수탁번호 DSM24616로 독일생물자원센터(DSMZ)에 기탁된 락토바실러스 람노수스 균주 CHCC12697;

- [0045] (d) 수탁번호 DSM24651로 독일생물자원센터(DSMZ)에 기탁된 락토바실러스 파라카세이 균주 CHCC12777; 및
- [0046] (e) 수탁번호 DSM25612로 독일생물자원센터(DSMZ)에 기탁된 락토바실러스 파라카세이 균주 CHCC14676.
- [0047] 본 발명의 조성물은 하나 이상의 동결방지 화합물 및 향미 화합물을 비롯하여 수많은 추가 성분을 추가로 포함할 수 있다.
- [0048] LAB은 스타터 배양물의 형태로 우유에 가장 일반적으로 첨가된다. 본 발명의 맥락에서 사용된 용어 "스타터" 또는 "스타터 배양물"은 하나 이상의 식품-등급 미생물, 특히 우유 재료의 산성화에 책임이 있는 유산균의 배양물을 의미한다. 스타터 배양물은 갓 만든(fresh) 것일 수 있으나, 대부분은 자주 동결되거나 동결건조된다. 이들 제품은 "다이렉트 배트 세트(Direct Vat Set: DVS)" 배양물이라고도 알려져 있으며, 발효유 제품 또는 치즈와 같은 유제품의 제조를 위해 발효 용기 또는 배트(vat)의 직접 접종을 위해 제조된다. 각각의 스타터 배양물은 많은 공급원으로부터 상업적으로 이용가능하며, Chr. Hansen으로부터 상업적으로 이용가능한 스트렙토코쿠스 써모필러스와 락토바실러스 멜브루액키 아종 불가리커스의 혼합물을 함유하는 3가지 배양물, F-DVS YoFlex Mild 2.0, F-DVS YF-L901, FD-DVS YF-812 및 F-DVS CH-1을 포함한다.
- [0049] 따라서, 일 측면에서, 본 발명은 동결물질 g당 적어도  $10^9$  콜로니 형성 단위의 농도, 또는 동결물질 g당 적어도  $10^{10}$  콜로니 형성 단위의 농도, 또는 동결물질 g당 적어도  $10^{11}$  콜로니 형성 단위의 농도로 유산균을 포함하는, 고형 동결된 또는 동결건조된 스타터 배양물 형태의 조성물을 제공하며, 이들 조성물은 전술한 바와 같은 발효유 제품에서 발효 중에 스타터 배양물에 의해 생성되는 아세트알데히드의 농도를 적어도 50% 감소시키는 능력을 갖는 락토바실러스 퍼멘텀 종의 박테리움을 포함한다.
- [0050] 추가적 일 구현예에서, 본 발명은 전술한 바와 같이 발효유 제품에서 발효 중에 스타터 배양물에 의해 생성되는 아세트알데히드의 농도를 적어도 50% 감소시키는 능력을 갖는 락토바실러스 퍼멘텀 박테리움 또는 이를 포함하는 조성물을 우유 또는 유제품에 첨가하고 이 혼합물을 4.6 미만의 pH에 도달할 때까지 약 22°C 내지 약 43°C의 온도에서 발효시키는 것을 포함하는 발효유 제품의 제조방법을 제공한다.
- [0051] 본원의 맥락에서, "우유(milk)"라 함은 동물의 유선 또는 식물에 의해 생성된 액체를 지칭하는 일반적인 의미로 광범위하게 사용된다. 본 발명에 따르면, 우유는 가공된 것일 수 있고, "우유"는 전유, 탈지유, 무지방 우유, 저지방 우유, 전지방 우유, 락토오스 저감(lactose-reduced) 우유, 또는 농축 우유를 포함한다. 저지방 우유는 전형적으로 약 1% 내지 약 2% 지방을 함유한 우유로 정의된다. 전지방 우유는 종종 2% 이상의 지방을 함유한다. "우유"라는 용어는 다른 포유동물 및 식물 원천으로부터 얻은 우유를 포함하도록 의도된다. 우유의 포유류 원천으로는 암소, 양, 염소, 벼팔로, 낙타, 라마, 암말 및 사슴이 있지만 이에 한정되지는 않는다. 우유의 식물 원천으로는 콩, 완두콩, 땅콩, 보리, 쌀, 귀리, 퀴노아, 아몬드, 캐슈, 코코넛, 헤이즐넛, 대마, 참깨 및 해바라기씨에서 추출된 우유가 있지만 이에 한정되지는 않는다. 본 발명의 방법 및 제품에서 암소에서 유래된 우유는 가장 좋기로는 발효를 위한 출발 물질로 사용된다.
- [0052] "우유"라는 용어는 또한 지방 저감 및/또는 락토오스 저감 유제품을 포함한다. 각각의 제품은 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제조될 수 있고, (예를 들어, 미국 텍사스의 셀렉트 밀크 Select Milk Producers Inc.로부터) 상업적으로 이용가능하다. 락토오스 저감 우유는, 락타아제 효소에 의해 락토오스를 글루코오스 및 갈락토오스로 가수분해하거나, 또는 전기투석, 이온교환 크로마토그래피 및 원심분리에 의해 당업계에 공지된 방법에 따라 제조될 수 있다.
- [0053] 본원에서 "유제품" 또는 "우유 재료"는 LAB의 증식 및 발효를 위한 배지로 사용될 수 있는 우유 또는 우유 성분에 기반한 조성물을 지칭하는 것으로 광범위하게 사용된다. 유제품 또는 우유 재료는 우유 및 LAB를 증식하거나 발효하기 위한 목적으로 사용될 수 있는 다른 성분에서 유래한 성분을 포함한다.
- [0054] 발효유 제품을 생산하는 공정의 발효 단계는 LAB을 우유에 첨가시키는 것을 포함한다. 유제품의 제조시 사용되는 발효 공정은 잘 알려져 있으며, 통상의 기술자는 온도, 산소, 미생물(들)의 양과 특성 및 발효 시간을 비롯한 발효 공정 조건을 선택할 수 있다.
- [0055] 발효에 앞서, 우유 기질은 당업계에 공지된 방법에 따라 균질화 및 저온살균될 수 있다. 본 명세서에서 사용된 "균질화(homogenizing)"는 가용성 혼탁액 또는 에멀젼을 얻기 위한 강력한 혼합을 의미한다. 발효에 앞서 균질화가 수행될 경우, 우유 지방을 더 작은 크기로 분해하여 더 이상 우유에서 분리되지 않게 하기 위하여 수행될 수 있다. 이는 작은 구멍들(orifices)을 통해 고압에서 우유에 힘을 가함으로써 달성될 수 있다. 본 명세서에서 "저온살균(pasteurizing)"이라 함은 미생물과 같이 살아있는 유기체의 존재를 감소시키거나 제거하기 위한 우유

기질의 처리를 의미한다. 좋기로는, 저온살균은 특정 기간의 시간 동안 특정 온도를 유지함으로써 달성된다. 특정 온도는 보통 가열에 의해 달성된다. 온도 및 지속시간은 유해 박테리아와 같은 특정 박테리아를 죽이거나 비활성화시키기 위하여 선택될 수 있다. 급속 냉각 단계가 이어질 수 있다.

- [0056] 본 발명의 특히 유리한 방법에서, 전술한 바와 같은 발효유 제품에서 발효 중에 스타터 배양물에 의해 생성되는 아세트알데히드의 농도를 적어도 50% 감소시키는 능력을 갖는 락토바실러스 퍼멘텀 박테리움 또는 이를 포함하는 조성물은 우유 또는 유제품에 첨가되고, 이 혼합물은 다음 방식으로 발효된다:
- [0057] (a) 아세트알데히드의 농도를 감소시키는 락토바실러스 퍼멘텀 박테리아의 농도는 발효유 제품의 발효 종료시 적어도  $1 \times 10^6$  cfu/g 또는 적어도  $1 \times 10^7$  cfu/g임; 및/또는
- [0058] (b) 아세트알데히드의 농도를 감소시키는 락토바실러스 퍼멘텀 박테리아의 농도는 발효유 제품의 표면에서 적어도  $1 \times 10^5$  cfu/cm<sup>2</sup> 이 되도록 함.
- [0059] 이러한 방식의 진행은 락토바실러스 퍼멘텀 박테리움의 아세트알데히드 농도를 감소시키는 효과를 완전히 사용할 수 있는 장점을 갖는다.
- [0060] 농축을 달성하는 한가지 방법은, 발효 중에 전술한 락토바실러스 퍼멘텀 박테리아의 농도가 증가하도록 발효를 위한 파라미터가 유지되는 발효유 제품의 제조방법을 사용하는 것이다. (실시예에 기술된 바와 같이) 발효를 위한 통상적인 스타터 배양물 및 조건을 사용하면, 발효 중에 전술한 락토바실러스 퍼멘텀 박테리아의 농도가 일반적으로 적어도 0.5 log 만큼 증가할 것이다. 대안적으로, 발효를 위한 파라미터는, 발효 및 저장 중에 락토바실러스 퍼멘텀 박테리아의 농도가 유의하게 감소하지 않도록, 예를 들어 30% 이하, 25% 이하, 또는 20% 이하 만큼 감소되도록 유지된다.
- [0061] 또한, 본 발명은 전술한 바와 같은 발효유 제품의 제조방법에 의해 얻을 수 있는 식품, 사료 또는 의약품의 제조방법 및 이 방법에 의해 얻을 수 있는 식품, 사료 또는 의약품을 제공한다.
- [0062] 발효는 식품, 사료 제품 또는 의약품을 제조하기 위하여 수행된다. "발효유 제품", "식품" 또는 "사료" 제품일 함은 본 발명의 발효 방법에 의해 얻을 수 있는 제품을 의미하며, 치즈, 요거트, 과일 요거트, 요거트 음료, 스트레이드 요거트(그릭 요거트, Labneh), 쿠크, 프로마쥬 프레이(fromage frais) 및 크림 치즈를 포함한다. 식품이라는 용어는 발효 소시지와 같은 발효 육류, 및 발효 생선 제품을 비롯한 기타 발효 식품을 더 포함한다.
- [0063] "치즈"라는 용어는 경질 치즈, 반경질 치즈, 연질 치즈, 예컨대 다음 유형의 치즈를 비롯한 모든 치즈를 포함하는 것으로 이해된다: 카티지(Cottage), 페타, 체다, 파마산, 모짜렐라, 에멘탈, 단보, 고다, 에담, 페타형, 블루 치즈, 브라인 치즈, 까망베르 및 브리. 당업자는 응고물을 치즈로 전환하는 방법을 알고 있으며, 이들 방법은 문헌에서 찾을 수 있다 (예컨대, Kosikowski, F. V., and V. V. Mistry, "Cheese and Fermented Milk Foods", 1997, 3rd Ed. F. V. Kosikowski, L. L. C. Westport, CT). 본 명세서에서 사용된 바와 같이, NaCl 농도가 1.7% (w/w) 미만인 치즈는 "저염 치즈"로 지칭된다.
- [0064] 본원의 맥락에서, "요거트"라 함은 스트렙토코쿠스 씨모필러스 및 락토바실러스 뎔브루액키 아종 불가리커스, 및 선택적으로 다른 미생물, 예컨대 락토바실러스 뎔브루액키 아종 락티스, 비피도박테리움 아니말리스 아종 락티스, 락토코쿠스 락티스, 락토바실러스 아시도필러스 및 락토바실러스 파라카세이, 또는 이들로부터 유래된 미생물을 포함하는 제품을 의미한다. 스트렙토코쿠스 씨모필러스 및 락토바실러스 뎔브루액키 아종 불가리커스 이외의 유산균 균주는 플로라의 평형을 증진시키는 특성과 같은 다양한 특성을 완제품에 제공하기 위하여 포함된다. 본 명세서에서 사용된 "요거트"라는 용어는 세트형 요거트, 스터드형 요거트, 드링킹 요거트, 프티 스위스(Petit Suisse), 열처리된 요거트, 스트레이드 또는 고단백질 농도의 특징이 있는 그릭 스타일 요거트 및 요거트-유사 제품을 포함한다.
- [0065] 특히, "요거트"라는 용어는 프랑스 및 유럽 규정에 따라 정의된 요거트, 예컨대 동시에 배양되고 최종 제품에 적어도 1000만 CFU (콜로니 형성 단위:colony-forming unit)/g의 양으로 살아있는 것으로 밝혀진, 특정 호열성 유산균(즉, 락토바실러스 뎔브루액키 아종 불가리커스 및 스트렙토코쿠스 씨모필러스)만으로 유산 발효하여 얻은 응고된 유제품을 포함하지만 이에 한정되는 것은 아니다. 요거트는 첨가된 유제품 원료(예컨대, 크림) 또는 설탕 또는 감미료, 하나 이상의 향료, 과일, 시리얼과 같은 기타 성분, 또는 영양 물질, 특히 비타민, 미네랄 및 섬유질, 뿐만 아니라 안정제 및 중점제를 선택적으로 함유할 수 있다. 선택적으로, 요거트는 AFNOR NF 04-600 표준 및/또는 codex StanA-11a-1975 표준의 발효유 및 요거트의 규격을 충족한다. AFNOR NF 04-600 표준을 충족시키기 위하여, 제품을 발효 후 가열해서는 안되고, 유제품 원료는 완제품의 최소 70% (m/m)를 나타내야 한

다.

[0066] 추가적 일 구현예에서, 본 발명은 전술한 바와 같이 밸효유 제품에서 밸효 중에 스타터 배양물에 의해 생성되는 아세트알데히드의 농도를 적어도 50% 감소시키는 능력을 갖는 락토바실러스 퍼멘텀 종의 박테리아를 하나 이상 포함하는 식품, 사료 또는 의약품을 제공하며, 상기 박테리아는 다음 중 하나 이상이다:

[0067] (a) 다음의 속 중 하나 이상으로부터 선택된 적어도 하나의 추가 박테리움: 락토코쿠스 종, 스트렙토코쿠스 종, 락토바실러스 종, 류코노스톡 종, 수도류코노스톡 종, 페디오코쿠스 종, 브레비박테리움 종, 및 엔터로코쿠스 종;

[0068] (b) 수탁번호 DSM32092로 독일생물자원센터(DSMZ)에 기탁된 락토바실러스 람노수스 균주 CHCC15860;

[0069] (c) 수탁번호 DSM23035로 독일생물자원센터(DSMZ)에 기탁된 락토바실러스 람노수스 균주 CHCC5366;

[0070] (d) 수탁번호 DSM24616로 독일생물자원센터(DSMZ)에 기탁된 락토바실러스 람노수스 균주 CHCC12697;

[0071] (e) 수탁번호 DSM24651로 독일생물자원센터(DSMZ)에 기탁된 락토바실러스 파라카세이 균주 CHCC12777; 및

[0072] (f) 수탁번호 DSM25612로 독일생물자원센터(DSMZ)에 기탁된 락토바실러스 파라카세이 균주 CHCC14676.

[0073] 실시예 1:

#### 아세트알데히드 농도에 대한 10가지 Lb. 퍼멘텀 균주의 효과

[0075] 10가지 Lb. 퍼멘텀 균주를 아세트알데히드 함량을 낮추는 능력에 대하여 시험하였다.

[0076] 저지방(1.5% w/v) 균질 우유를  $90 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 20분 동안 열처리하고 즉시 냉각시켰다. 시판되는 스타터 배양물(F-DVS YF-L901 Yo-Flex®)을 0.02% (v/w)로 접종하고, 접종된 우유를 200 ml 병들에 분배하였다. 10개의 병에 Lb. 퍼멘텀 균주를  $1 \times 10^7$  CFU/g의 농도로 접종하였고, 1개의 병을 기준물로 사용하여 스타터 배양물만을 접종하였다. 모든 병을  $43 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 수조에서 인큐베이션시키고, pH가  $4.60 \pm 0.1$ 에 도달할 때까지 이 조건에서 발효시켰다. 발효 후, 병을 격렬히 흔들어서 응고물을 파괴하고 얼음에서 냉각시켰다. 병들을  $7 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 14일 동안 저장하였다.

[0077] 제14일에 복잡한 매트릭스에서 휘발성물질을 분석하기 위한 민감한 방법인 정적 헤드스페이스 가스 크로마토그래피를 통해 아세트알데히드에 대하여 샘플을 분석하였다. 설정은 불꽃 이온화 검출기(FID)가 있는 가스 크로마토그래피에 연결된 정적 헤드스페이스 샘플러로 구성되었다. 그 목적을 위해 다음의 장비가 사용되었다:

[0078] HS-오토샘플러: HS40XI, TurboMatrix 110, Perkin Elmer.

[0079] HS-소프트웨어: HSControl v.2.00, Perkin Elmer.

[0080] GC: Autosystem XL, Perkin Elmer.

[0081] GC-소프트웨어: Turbochrom navigator, Perkin Elmer.

[0082] 컬럼: HP-FFAP 25 m x 0.20 mm x 0.33  $\mu\text{m}$ , Agilent Technologies.

[0083] 알려진 농도의 표준물질을 사용하여 반응 계수 (보정)을 결정하였고, 사용된 반응 계수가 하나의 분석 시리즈 내에서 뿐만 아니라 시리즈들 간에서 및 시간(개월)에 따라 안정하도록 조절하기 위하여 대조군(controls)이 사용되었다. 샘플 및 대조군 내 휘발성물질의 농도(ppm)를 표준물질에서 나온 반응 계수를 사용하여 결정하였다. 1 g의 요거트 샘플에 200  $\mu\text{l}$ 의 4N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 을 첨가함으로써 샘플을 준비하고, 즉시 HSGC로 분석하였다.

[0084] 그 결과를 도 1에 나타내었는데, 이 도면은 다음 각각의 균주가 밸효유 제품에서 밸효 중에 스타터 배양물에 의해 생성되는 아세트알데히드 농도를 감소시키는 능력을 갖는다는 것을 보여준다: Lb. 퍼멘텀 CHCC12798, Lb. 퍼멘텀 CHCC12797, Lb. 퍼멘텀 CHCC14591, Lb. 퍼멘텀 CHCC14588, Lb. 퍼멘텀 CHCC15844, Lb. 퍼멘텀 CHCC15865, Lb. 퍼멘텀 CHCC15847, Lb. 퍼멘텀 CHCC15848, Lb. 퍼멘텀 CHCC15926, 및 Lb. 퍼멘텀 CHCC2008.

[0085] 실시예 2:

#### 아세트알데히드 함량에 대한 Lb. 퍼멘텀 균주의 효과

[0087] 1가지 Lb. 퍼멘텀 균주를 아세트알데히드의 낮은 함량에 대한 능력에 대하여 시험하였다.

- [0088] 저지방(1.5% w/v) 균질 우유를  $90 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 20분 동안 열처리하고 즉시 냉각시켰다. 시판되는 스타터 배양물(F-DVS YoFlex Mild 2.0)을 0.02% (v/w)로 접종하고, 접종된 우유를 200 ml 병들에 분배하였다. 1개의 병에 Lb. 퍼멘텀 균주를  $1 \times 10^7$  CFU/g의 농도로 접종하였고, 1개의 병을 기준물로 사용하여 스타터 배양물만을 접종하였다. 모든 병을  $43 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 수조에서 인큐베이션시키고, pH가  $4.60 \pm 0.1$ 에 도달할 때까지 이 조건에서 발효시켰다. 발효 후, 병을 격렬히 흔들어서 응고물을 파괴하고 얼음에서 냉각시켰다. 병들을  $7 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 14일 동안 저장하였다.
- [0089] 제14일에 복잡한 매트릭스에서 휘발성물질을 분석하기 위한 민감한 방법인 정적 헤드스페이스 가스 크로마토그래피를 통해 아세트알데히드에 대하여 샘플을 분석하였다. 설정은 불꽃 이온화 검출기(FID)가 있는 가스 크로마토그래피에 연결된 정적 헤드스페이스 샘플러로 구성되었다. 그 목적을 위해 다음의 장비가 사용되었다:
- [0090] HS-오토샘플러: HS40XI, TurboMatrix 110, Perkin Elmer.
- [0091] HS-소프트웨어: HSControl v.2.00, Perkin Elmer.
- [0092] GC: Autosystem XL, Perkin Elmer.
- [0093] GC-소프트웨어: Turbochrom navigator, Perkin Elmer.
- [0094] 컬럼: HP-FFAP 25 m x 0.20 mm x 0.33  $\mu\text{m}$ , Agilent Technologies.
- [0095] 알려진 농도의 표준물질을 사용하여 반응 계수(보정)을 결정하였고, 사용된 반응 계수가 하나의 분석 시리즈 내에서 뿐만 아니라 시리즈들 간에서 및 시간(개월)에 따라 안정하도록 조절하기 위하여 대조군(controls)이 사용되었다. 샘플 및 대조군 내 휘발성물질의 농도(ppm)를 표준물질에서 나온 반응 계수를 사용하여 결정하였다. 1 g의 요거트 샘플에 200  $\mu\text{l}$ 의 4N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 을 첨가함으로써 샘플을 준비하고, 즉시 HSGC로 분석하였다.
- [0096] 그 결과를 도 2에 나타내었는데, 이 도면은 Lb. 퍼멘텀 14591가 발효유 제품에서 발효 중에 스타터 배양물에 의해 생성되는 아세트알데히드 농도를 감소시키는 능력을 갖는다는 것을 보여준다.
- [0097] 실시예 3:
- [0098] 시판되는 스타터 배양물의 기능 분석
- [0099] 3가지 시판되는 스타터 배양물은 서로 상이한 산성화 프로파일에 기초하여 선택되었다. 3가지는 냉동된 F-DVS CH-1, F-DVS YoFlex Mild 2.0 및 F-DVS YF-L901이었고, 하나는 동결건조된 FD-DVS YF-L812이었다. 산성화 프로파일의 차이를 시험하기 위하여, 반(semi) 지방 우유를 탈지분유로 1% 지방 및 4.5% 단백질로 표준화시킨 다음,  $85 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 30분 동안 열처리하고, 즉시 냉각시켰다. 4가지 서로 상이한 시판되는 배양물(F-DVS CH-1, F-DVS YoFlex Mild 2.0, F-DVS YF-L901 또는 FD-DVS YF-L812) 중 하나를 0.02% (v/w)로 접종하고, 접종된 우유를 200 ml 병들에 분배하였다. 모든 병을  $43 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 수조에서 인큐베이션시키고, pH가 4.5에 도달할 때까지 이 조건에서 발효시켰다. 발효 동안 pH를 지속적으로 측정하였다. 그런 다음, 병들을  $6^\circ\text{C}$ 에서 43일 동안 저장하고, 후산성화 수준을 결정하기 위하여 pH를 7일 간격으로 측정하였다.
- [0100] 3가지 시판되는 스타터 배양물 F-DVS CH-1, F-DVS YoFlex Mild 2.0, F-DVS YF-L901 및 FD-DVS YF-L812의 산성화 프로파일을 도 3에 나타내었다. F-DVS CH-1은 4.87 시간 동안 pH 4.55에 도달하는 신속한 발효시간을 보였다. F-DVS YoFlex Mild 2.0은 5.29 시간 동안 pH 4.55에 도달하는 중간 발효 시간을 보였다. FD-DVS YF-L812 및 F-DVS YF-L901은 각각 6.45 시간 및 5.87 시간 동안 pH 4.55에 도달하는 보다 느린 발효를 보였다. 후산성화 프로파일은 FD-DVS YF-L812 및 F-DVS YoFlex Mild 2.0에 있어서 낮은 수준의 후산성화를 보였고 ( $6^\circ\text{C}$ 에서 43일 동안 저장한 후 각각  $\Delta\text{pH}=0.12$  및  $\Delta\text{pH}=0.11$ ), F-DVS YF-L901에 있어서 중간 수준의 후산성화를 보였으며 ( $6^\circ\text{C}$ 에서 43일 동안 저장한 후  $\Delta\text{pH}=0.26$ ), F-DVS CH-1에 있어서 높은 수준의 후산성화를 보였다 ( $6^\circ\text{C}$ 에서 43일 동안 저장한 후  $\Delta\text{pH}=0.55$ )(도 4).
- [0101] 실시예 4:
- [0102] 2가지 서로 상이한 스타터 배양물로 발효시킬 경우, 아세트알데히드 함량에 대한 9가지 Lb 퍼멘텀 균주의 효과
- [0103] 9가지 Lb. 퍼멘텀 균주를 아세트알데히드 함량을 낮추는 능력에 대하여 시험하였다.
- [0104] 저지방(1.5% w/v) 균질 우유를  $90 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 20분 동안 열처리하고 즉시 냉각시켰다. 2가지 시판되는 스타터 배양물(F-DVS CH-1 또는 FD-DVS YF-L812)을 0.02% (v/w)로 우유에 접종하고, 접종된 우유를 200 ml 병들에 분배

하였다. 9개의 병에 Lb. 퍼멘텀 균주를  $1 \times 10^7$  CFU/g의 농도로 접종하였고, 각 스타터 배양물이 접종된 1개의 병을 기준물로 사용하여 스타터 배양물만을 접종하였다. 모든 병을  $43 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 수조에서 인큐베이션시키고, pH가  $4.55 \pm 0.1$ 에 도달할 때까지 이 조건에서 발효시켰다. 발효 후, 병을 격렬히 흔들어서 응고물을 파괴하고 얼음에서 냉각시켰다. 병들을  $7 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 14일 동안 저장하였다.

[0105] 시험된 Lb. 퍼멘텀 균주는 다음과 같다: Lb. 퍼멘텀 CHCC12798, Lb. 퍼멘텀 CHCC12797, Lb. 퍼멘텀 CHCC14591, Lb. 퍼멘텀 CHCC14588, Lb. 퍼멘텀 CHCC15844, Lb. 퍼멘텀 CHCC15865, Lb. 퍼멘텀 CHCC15847, Lb. 퍼멘텀 CHCC15926, 및 Lb. 퍼멘텀 CHCC2008.

[0106] 제14일에 복잡한 매트릭스에서 휘발성물질을 분석하기 위한 민감한 방법인 정적 헤드스페이스 가스 크로마토그래피를 통해 아세트알데히드에 대하여 샘플을 분석하였다. 설정은 불꽃 이온화 검출기(FID)가 있는 가스 크로마토그래피에 연결된 정적 헤드스페이스 샘플러로 구성되었다. 그 목적을 위해 다음의 장비가 사용되었다:

[0107] HS-오토샘플러: HS40XI, TurboMatrix 110, Perkin Elmer.

[0108] HS-소프트웨어: HSControl v.2.00, Perkin Elmer.

[0109] GC: Autosystem XL, Perkin Elmer.

[0110] GC-소프트웨어: Turbochrom navigator, Perkin Elmer.

[0111] 컬럼: HP-FFAP 25 m x 0.20 mm x 0.33  $\mu\text{m}$ , Agilent Technologies.

[0112] 알려진 농도의 표준물질을 사용하여 반응 계수(보정)을 결정하였고, 사용된 반응 계수가 하나의 분석 시리즈 내에서 뿐만 아니라 시리즈들 간에서 및 시간(개월)에 따라 안정하도록 조절하기 위하여 대조군(controls)이 사용되었다. 샘플 및 대조군 내 휘발성물질의 농도(ppm)를 표준물질에서 나온 반응 계수를 사용하여 결정하였다. 1 g의 요거트 샘플에 200  $\mu\text{l}$ 의 4N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 을 첨가함으로써 샘플을 준비하고, 즉시 HSGC로 분석하였다.

[0113] 그 결과를 도 5에 나타내었는데, 다음 각각의 균주가 발효유 제품에서 발효 중에 스타터 배양물에 의해 생성되는 아세트알데히드 농도를 감소시키는 능력을 갖는다는 것을 보여준다: Lb. 퍼멘텀 CHCC12798, Lb. 퍼멘텀 CHCC12797, Lb. 퍼멘텀 CHCC14591, Lb. 퍼멘텀 CHCC14588, Lb. 퍼멘텀 CHCC15844, Lb. 퍼멘텀 CHCC15865, Lb. 퍼멘텀 CHCC15847, Lb. 퍼멘텀 CHCC15926, 및 Lb. 퍼멘텀 CHCC2008.

#### 참고문헌

1. Tamime, A. Y., and H. C. Deeth. 1980. Yoghurt: technology and biochemistry. *J. Food Prot.* 43:939-977.
2. A. C. S. D. Chaves, M. Fernandez, A. L. S. Lerayer, I. Mierau, M. Kleerebezem, and J. Hugenholtz, 2002, Metabolic Engineering of Acetaldehyde Production by *Streptococcus thermophilus*
3. Lees, G. J., and G. R. Jago. 1976. Formation of acetaldehyde from threonine by lactic acid bacteria. *J. Dairy Res.* 43:75-83.

#### 기탁 및 전문가용 참조 사항

[0119] 출원인은 특허가 부여되는 날까지 아래 명시된 기탁된 미생물의 샘플을 전문가에게만 제공할 것을 요청한다.

[0120] 하기 균주들은 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig (DSMZ)에 2015년 7월 16일에 기탁되었고(기탁일 예외: 수탁번호 32096, 수탁번호 22584, 하기 참조), 수탁번호는 다음과 같다.

[0121] 락토바실러스 퍼멘텀 균주 CHCC12798: 32084

[0122] 락토바실러스 퍼멘텀 균주 CHCC12797: 32085

[0123] 락토바실러스 퍼멘텀 균주 CHCC14591: 32086

[0124] 락토바실러스 퍼멘텀 균주 CHCC14588: 32087

[0125] 락토바실러스 퍼멘텀 균주 CHCC15844: 32088

[0126] 락토바실러스 퍼멘텀 균주 CHCC15865: 32089

- [0127] 락토바실러스 퍼멘텀 균주 CHCC15847: 32090
- [0128] 락토바실러스 퍼멘텀 균주 CHCC15848: 32091
- [0129] 락토바실러스 퍼멘텀 균주 CHCC15926: 32096 (기탁일: 2015년 7월 22일)
- [0130] 락토바실러스 퍼멘텀 균주 CHCC2008: 22584 (기탁일: 2009년 5월 19일)
- [0131] 락토바실러스 람노수스 균주 CHCC15860: 32092
- [0132] 상기 기탁은 특히 절차를 목적으로 하는 미생물 기탁에 대한 국제적 인정에 관한 부다페스트 조약에 따라 이루어졌다.

### 수탁번호

- [0133]
- 기탁기관명 : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH  
수탁번호 : DSM32084  
수탁일자 : 20150716

기탁기관명 : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH  
수탁번호 : DSM32085  
수탁일자 : 20150716

기탁기관명 : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH  
수탁번호 : DSM32086  
수탁일자 : 20150716

기탁기관명 : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH  
수탁번호 : DSM32087  
수탁일자 : 20150716

기탁기관명 : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH  
수탁번호 : DSM32088  
수탁일자 : 20150716

기탁기관명 : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH  
수탁번호 : DSM32089  
수탁일자 : 20150716

기탁기관명 : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH  
수탁번호 : DSM32090

수탁일자 : 20150716

기탁기관명 : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

수탁번호 : DSM32091

수탁일자 : 20150716

기탁기관명 : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

수탁번호 : DSM32096

수탁일자 : 20150722

기탁기관명 : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

수탁번호 : DSM22584

수탁일자 : 20090519

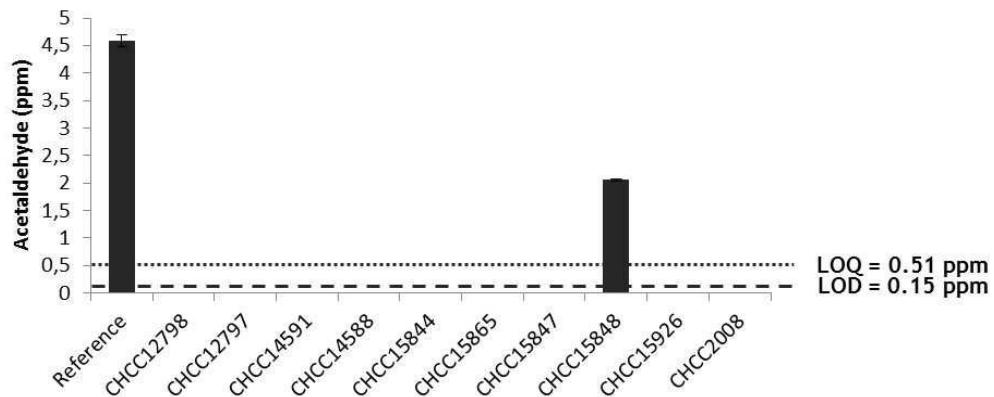
기탁기관명 : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

수탁번호 : DSM32092

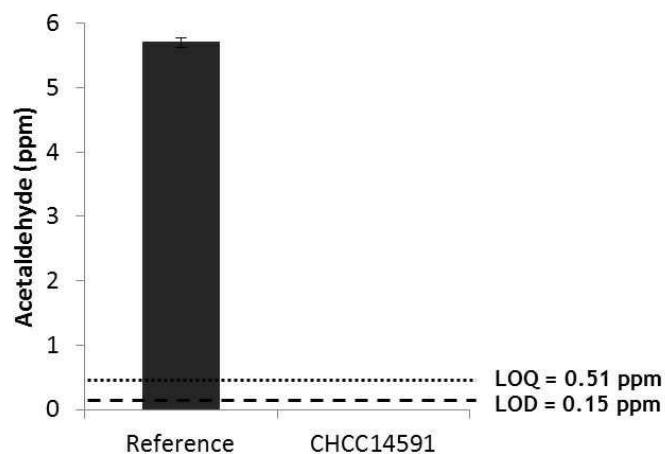
수탁일자 : 20150716

## 도면

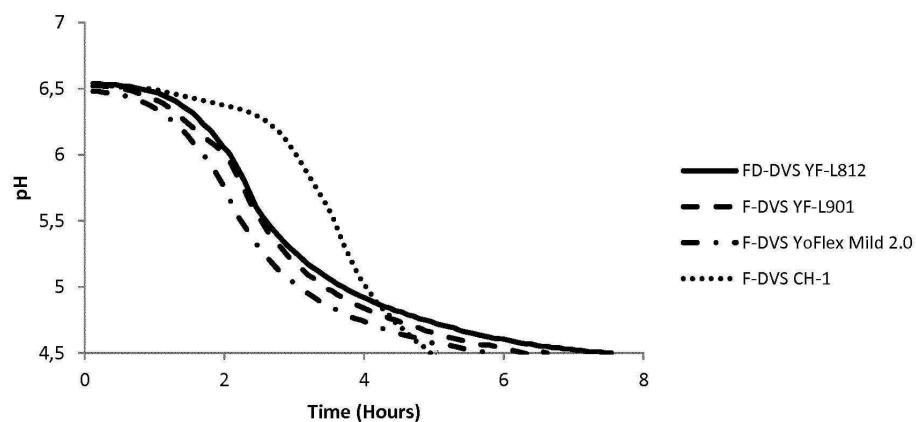
### 도면1



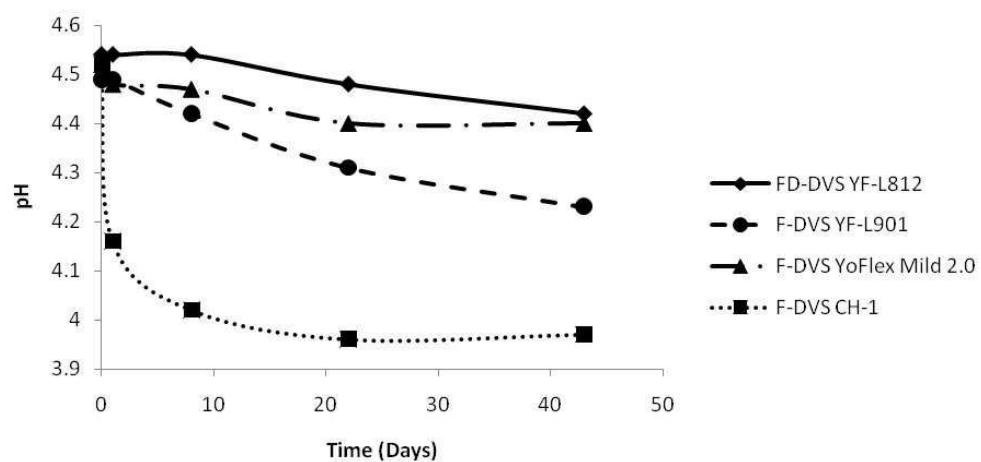
## 도면2



## 도면3



## 도면4



## 도면5

