



(19) 대한민국특허청(KR)  
 (12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0098605  
 (43) 공개일자 2008년11월11일

(51) Int. Cl.

*A23C 9/123* (2006.01) *A23C 9/12* (2006.01)  
*A23C 9/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-7019424

(22) 출원일자 2008년08월07일

심사청구일자 2008년08월07일

번역문제출일자 2008년08월07일

(86) 국제출원번호 PCT/JP2007/071341

국제출원일자 2007년11월01일

(87) 국제공개번호 WO 2008/099543

국제공개일자 2008년08월21일

(30) 우선권주장

JP-P-2007-00032646 2007년02월13일 일본(JP)

(71) 출원인

모리나가 뉴교 가부시키가이샤

일본 도쿄도 미나도구 시바 5쵸메 33-1

(72) 발명자

시미즈 가네타다

일본국 가나가와Ken 자마시 히가시하라 5쵸메 1반  
 83고 모리나가 뉴교 가부시키가이샤 쇼쿠팅기반겐  
 큐쇼나이

미야지 가즈히로

일본국 가나가와Ken 자마시 히가시하라 5쵸메 1반  
 83고 모리나가 뉴교 가부시키가이샤 쇼쿠팅소고겐  
 큐쇼나이

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

리엔목특허법인

전체 청구항 수 : 총 8 항

#### (54) 신규 유산균을 이용한 발효유의 제조방법

#### (57) 요 약

본 발명은 유산균으로서, 비피도박테리움속균과 하기의 균학적 성질 : (1) 10% 환원 탈지분유 배지에서 25~37℃의 온도 범위로 16시간 배양한 경우에, 배지가 응고하는 발효성; (2) 상기 배지에서 비피도박테리움 통검과 혼합 배양한 경우에, pH가 4.4~4.6에 도달했을 때 상기 비피더스 균수를  $5 \times 10^8$  CFU/g 이상으로 하는 비피도박테리움 통검의 생육 촉진성; 및 (3) 상기 배지에서 비피도박테리움 통검과 혼합 배양한 경우에, pH가 4.4~4.6에 도달했을 때 급냉하여 10℃에서 2주간 유지한 경우에, 비피도박테리움 통검의 생잔율을 30% 이상으로 하는 비피도박테리움 통검의 저장 생잔성 촉진성을 가진 락토코쿠스속균을 이용하여 발효시키는 것을 특징으로 하는 발효유의 제조방법 및 해당 제조방법에 의해 제조된 발효유에 관한 것이다.

(72) 발명자

**오가와 고이치**

일본국 가나가와켄 자마시 히가시하라 5쵸메 1반  
83고 모리나가 뉴교 가부시키가이샤 쇼쿠팅소고겐  
큐쇼나이

**기소 요시아키**

일본국 가나가와켄 자마시 히가시하라 5쵸메 1반  
83고 모리나가 뉴교 가부시키가이샤 쇼쿠팅소고겐  
큐쇼나이

---

**이시다 다카코**

일본국 가나가와켄 자마시 히가시하라 5쵸메 1반  
83고 모리나가 뉴교 가부시키가이샤 쇼쿠팅소고겐  
큐쇼나이

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

유산균으로서 비피도박테리움(*Bifidobacterium*)속균과, 락토코쿠스(*Lactococcus*)속균을 이용하여 발효시키는 것을 포함하는 발효유의 제조 방법으로서, 상기 락토코쿠스속균이,

- (1) 10%(W/W) 환원 탈지분유 배지에서 25~37°C의 온도 범위로 16시간 배양한 경우에 배지가 응고하는 발효성;
- (2) 10%(W/W) 환원 탈지분유 배지에서 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*)과 혼합 배양한 경우에, pH가 4.4~4.6에 도달했을 때 비피도박테리움 롱검의 균수를  $5 \times 10^8$  CFU/g 이상으로 하는 비피도박테리움 롱검의 생육 촉진성; 및
- (3) 10%(W/W) 환원 탈지분유 배지에 비피도박테리움 롱검과 혼합 배양한 경우에, pH가 4.4~4.6에 도달했을 때 급냉하여 10°C에서 2주간 유지할 경우의 비피도박테리움 롱검의 생잔율을 30% 이상으로 하는 비피도박테리움 롱검의 저장 생잔성 촉진성의 균학적 성질을 갖는, 발효유의 제조방법.

### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 락토코쿠스속균이 크실로오스 자화성을 갖지 않고, 또 디아세틸 및 아세토인을 생성하지 않는 발효유의 제조방법.

### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 락토코쿠스속균이 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스(*Lactococcus lactis* subsp.*lactis*)인 발효유의 제조방법.

### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 락토코쿠스속균의 균주가 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스 MCC852(FERM BP-10742), 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스 MCC857(FERM BP-10757), 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스 MCC859(FERM BP-10744), 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스 MCC865(FERM BP-10745), 및 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스 MCC866(FERM BP-10746)으로 이루어지는 군에서 선택되는 1이상인 발효유의 제조방법.

### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서.

상기 비피도박테리움속균이 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*)인 발효유의 제조방법.

### 청구항 6

제5항에 있어서,

상기 비피도박테리움 롱검의 균주가 비피도박테리움 롱검 FERM BP-7787인 발효유의 제조방법.

### 청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 유산균으로서 다시 스트렙토코쿠스 서모필러스(*Streptococcus thermophilus*) 및 락토바실러스 불가리쿠스(*Lactobacillus bulgaricus*)를 이용하는 발효유의 제조방법.

### 청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 기재된 발효유의 제조방법에 의해 제조된 발효유.

## 명세서

### 기술분야

- <1> 본 발명은 락토코쿠스(Lactococcus)에 속하는 신규 유산균을 이용한 발효유의 제조방법, 및 해당 제조 방법에 의해 제조된 발효유에 관한 것이다.
- <2> 본원은 2007년 2월 13일에 출원된 일본특허출원 2007-032646호에 기초하여 우선권을 주장하고, 그 내용을 여기에 원용한다.

### 배경기술

- <3> 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) 등의 비피도박테리움(*Bifidobacterium*)속균(이하, 「비피더스균」라고 함)은 사람의 장관 내에서 형성되는 장내 균총의 우세균종 중 하나이다. 비피더스균은 장내 세균의 밸런스를 회복하는 정장 작용이나 면역 증강 작용, 발암 억제 작용 등을 갖는 것이 알려져 있다. 이 때문에, 최근 생활자의 건강 지향의 고조와 함께, 비피더스균 발효유 등의 살아있는 비피더스균을 포함하는 식품에 대한 수요가 높아지고 있다.
- <4> 비피더스균은 유성(乳性) 배지에서의 증식성이 나쁘다. 이 때문에, 발효유 중에 일정량의, 예를 들어,  $1 \times 10^7$ CFU/mL의 비피더스균을 함유시키기 위해 통상 다양한 생육 촉진 물질을 첨가하고 있다. 그러나, 해당 생육 촉진 물질은 일반적으로 값이 비싸고, 또한 풍미가 손상될 우려도 있다. 또, 비피더스균은 산성 조건하에서의 저장이 어려워 사멸하기 쉽다. 이 때문에, 발효유 제품 등이 유통하는 과정에서 발효유 제품 중 살아있는 비피더스균량은 가속도적으로 감소해 버린다.
- <5> 그래서, 비피더스균의 생육성이나 저장 생잔성을 개선함으로써 살아있는 비피더스균을 많이 함유하는 발효유를 제조할 수 있을 뿐만 아니라, 살아있는 비피더스균이, 제조 직후와 마찬가지로, 소비자가 섭취하는 시점에서도 풍부하게 함유되어 있는 발효유를 제조할 수 있는 것을 기대할 수 있다.
- <6> 비피더스균 이외의 유산균과 혼합 발효시킴으로써 해당 생육 촉진 물질 등을 첨가하지 않고, 비피더스균의 생육성이나 저장 생잔성을 개선하는 다양한 방법이 개시되어 있다. 발효유 제조에서의 비피더스균의 생육성을 개선시키는 방법에 대해서는, 예를 들어, (1) 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스(*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*), 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 크레모리스(*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) 및 비피더스균을 함유하는 것을 특징으로 하는 요구르트 및 그 제조 방법이 개시되어 있다(예를 들어, 일본특허공개 제3,364,491호 참조.).
- <7> 그 밖에 발효유의 비피더스균의 저장 생잔성을 개선시키는 방법에 대해서는, 예를 들어, (2) 젖을 주성분으로 하는 배지에서 비피도박테리움 브레베(*Bifidobacterium breve*), 및 디아세틸 및 아세토인(acetoin)을 생성하지 않는 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스를 혼합 배양하는 것을 특징으로 하는 비피더스균 발효유의 제조 방법이 개시되어 있다(예를 들어, 일본특허 제3,068,484호 참조).

### 발명의 상세한 설명

- <8> [발명의 개시]
- <9> [발명이 해결하고자 하는 과제]
- <10> 그렇지만, 상기 (1)의 방법에서는, 비피더스균의 생육이 촉진되고, 발효 시간을 단축할 수 있지만, 일본특허 제3,364,491호에는 비피더스균의 저장 생잔성에 대해서는 일체 기재가 없다. 한편, 상기 (2)의 방법에서는 특정 비피더스균과 특정 유산균으로 이루어지는 혼합균을 이용함으로써 증식 촉진 효과와 생잔성 개선 효과가 모두 인정되지만, 비피도박테리움 브레베 이외의 비피더스균, 예를 들어, 식품에 범용되고 있는 비피도박테리움 롱검에 대해서는 전혀 기재가 없다.
- <11> 본 발명은 비피더스균의 생육성이나 저장 생잔성을 개선시킬 수 있는 유산균을 이용한 발효유의 제조방법 및 그 제조방법에 의해 제조된 발효유를 제공하는 것을 목적으로 한다.
- <12> [과제를 해결하기 위한 수단]
- <13> 본 발명자는 상기 과제를 해결하기 위해 예의 연구한 결과, 10%(W/W) 환원 탈지분유 배지에서의 발효성이 우수

한 유산균의 균주에 대해 비피도박테리움 통검과의 혼합 배양에 의한 발효 시험을 수행하여, pH가 4.4~4.6에 도달했을 때 비피도박테리움·통검의 균수를  $5 \times 10^8$  CFU/g 이상으로 하는 비피도박테리움 통검의 생육 촉진성, 그리고 발효 종료 후에 급냉하여 10°C에서 2주일간 저장한 경우 비피도박테리움 통검의 생잔 비율을 30% 이상으로 하는 비피도박테리움 통검의 저장 생잔성을 촉진하는 특성을 갖는 유산균을 찾아냈다. 그리고, 해당 유산균을 이용함으로써 비피더스균을 대량으로 함유하고, 또 저장 생잔성도 뛰어난 발효유를 얻을 수 있음을 발견하고, 본 발명을 완성시켰다.

<14> 즉, 본 발명은 유산균으로서 비피도박테리움(*Bifidobacterium*)속균과, 하기의 균학적 성질을 가진 락토코쿠스(*Lactococcus*)속균을 이용하여 발효시키는 것을 특징으로 하는 발효유의 제조방법을 제공하는 것이다.

<15> (1) 10%(W/W) 환원 탈지분유 배지에서 25~37°C의 온도 범위에서 16시간 배양한 경우에, 배지가 응고하는 발효성, (2) 10%(W/W) 환원 탈지분유 배지에서 비피도박테리움 통검과 혼합 배양한 경우에, pH가 4.4~4.6에 도달했을 때 비피도박테리움 통검의 균수를  $5 \times 10^8$  CFU/g 이상으로 하는 비피도박테리움 통검의 생육 촉진성, 및 (3) 10%(W/W) 환원 탈지분유 배지에서 비피도박테리움 통검과 혼합 배양한 경우에, pH가 4.4~4.6에 도달했을 때 급냉하여 10°C에서 2 주간 저장한 경우의 비피도박테리움 통검의 생잔 비율을 30% 이상으로 하는 비피도박테리움 통검의 저장 생잔성 촉진성.

<16> 또한, 본 발명은 상기 락토코쿠스속균이 크실로오스(xylose) 자화성을 갖지 않고, 또한 디아세틸 및 아세토인을 생성하지 않는 것을 특징으로 하는 발효유의 제조방법을 제공하는 것이다.

<17> 또한, 본 발명은 상기 락토코쿠스속균이 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스(*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*)인 발효유의 제조방법을 제공하는 것이다.

<18> 또한, 본 발명은 상기 락토코쿠스속균의 균주가 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스 MCC852(FERM BP-10742), 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스 MCC857(FERM BP-10757), 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스 MCC859(FERM BP-10744), 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스 MCC865(FERM BP-10745), 및 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스 MCC866(FERM BP-10746)으로 이루어지는 군에서 선택되는 1이상인 발효유의 제조방법을 제공하는 것이다.

<19> 또한, 본 발명은 상기 비피도박테리움속균이 비피도박테리움 통검(*Bifidobacterium longum*)인 발효유의 제조방법을 제공하는 것이다.

<20> 또한, 본 발명은 상기 비피도박테리움 통검의 균주가 비피도박테리움 통검 FERM BP-7787인 발효유의 제조방법을 제공하는 것이다.

<21> 또한, 본 발명은 상기 유산균으로서, 다시 스트렙토코쿠스 서모필러스(*Streptococcus thermophilus*) 및 락토바실러스 불가리쿠스(*Lactobacillus bulgaricus*)를 이용하는 것을 특징으로 하는 발효유의 제조방법을 제공하는 것이다.

<22> 또한, 본 발명은 상기 어느 하나에 기재된 발효유의 제조방법에 의해 제조된 발효유를 제공하는 것이다.

### [발명의 효과]

<24> 본 발명의 발효유의 제조방법에 의해 종래에 없는 비피더스균, 특히 비피도박테리움 통검을 많이 함유하는 발효유를 효율적으로 제조할 수 있다. 또한, 본 발명의 발효유는 살아있는 비피더스균, 특히 비피도박테리움 통검의 함유량이 유통과정에서도 충분히 유지되기 때문에, 정장 효과가 더 높고, 건강 관리 측면에서도 유용하다.

### [발명을 실시하기 위한 최량의 형태]

<26> 본 발명은 비피더스균과, 상기 (1), (2), 및 (3)의 특성을 갖는 락토코쿠스 속균을 이용하여 발효시키는 것을 특징으로 하는 발효유의 제조방법이다. 특히, 비피도박테리움 통검을 이용하여 발효시키는 발효유의 제조에 적합하다.

<27> 본 발명에서 이용되는 비피도박테리움 통검으로는 비피도박테리움 통검 FERM BP-7787주, 비피도박테리움 통검 타입 균주 ATC15707주 등이 있다. 비피도박테리움 통검 FERM BP-7787주는 유성 배지에서의 발효성, 유통과정에서의 내산성, 및 위산 내성이 뛰어나기 때문에, 특히 바람직하다. 비피도박테리움 통검 FERM BP-7787주는 독립 행정법인 산업기술종합연구소 특허생물기탁센터(일본 이바라기현 쓰쿠바시 히가시 1쵸메 1번지 1중앙 제6(우편 번호 305-8566))에 2001년 10월 31일에 수탁되어 있다.

- <28> 본 발명에서 이용되는 락토코쿠스속균은 상기 (1), (2), 및 (3)의 특성을 갖는 것이다.
- <29> (1)은 발효성에 관한 것이다. 10%(W/W)환원 탈지분유 배지에서 25~37°C의 온도 범위에서 16시간 배양했을 때, 배지를 응고시킬 수 있을 만큼 증식이 빠르고 강한 발효성을 가진 유산균이면, 발효유 제조시에 비피도박테리움 통검의 생육성 등을 더욱 효과적으로 개선할 수 있다. 여기서 「배지가 응고한다」란, 산발효에 의해 배지의 pH가 유단백질의 등전점을 밀들고, 유단백질이 응집하고, 배지가 응고하는 것을 의미한다. 또한, 「10%(W/W)환원 탈지분유 배지」는 환원 탈지분유(예를 들어, 모리나가유업사 제조)를 10질량% 농도로 물에 용해하여 제조할 수 있다.
- <30> 통상 락토코쿠스속균에 적합한 발효 온도 범위는 20~30°C이지만, 본 발명의 락토코쿠스속균은 25~37°C의 온도 범위에서 강한 발효성을 갖는 균이다. 즉, 본 발명의 락토코쿠스속균은 비피도박테리움 통검에 적합한 발효 온도 범위(30~40°C)에서 충분한 발효성을 가진 균이다.
- <31> (2)는 비피도박테리움 통검의 생육 촉진성에 관한 것이다. 10%(W/W)환원 탈지분유 배지 등의 유성 배지는 pH가 4.6 부근이 되면, 통상 함유되는 카제인 등이 침전하고, 배지 전체가 응고하여 풍미, 식감 및 외관이 우수해진다. 이 때문에, 발효유 제품을 제조하는 경우에는, 일반적으로 pH가 4.6 부근에 도달했을 때 급냉함으로써 발효를 정지한다. 따라서, 10%(W/W)환원 탈지분유 배지에서 비피도박테리움 통검과 혼합 배양한 경우에, pH가 4.4~4.6에 도달했을 때 비피도박테리움 통검의 균수를  $5 \times 10^8$ CFU/g 이상으로 하는 고농도로 할 수 있는 생육 촉진성을 가진 유산균이면, 발효유 제조시 발효유 중 비피도박테리움 통검의 함유량을 더욱 효과적으로 개선할 수 있다.
- <32> (3)은 비피도박테리움 통검의 저장 생잔성 촉진성에 관한 것이다. 발효유 제품의 품질 유지 기한은 일반적으로 10°C 이하의 저장 조건에서 2주일 정도이다. 따라서, 10%(W/W)환원 탈지분유 배지에서 비피도박테리움 통검과 혼합 배양한 경우에, pH가 4.4~4.6에 도달했을 때 급냉하여 10°C에서 2주일 유지한 경우, 비피도박테리움 통검의 생잔 비율을 30% 이상으로 할 수 있는 저장 생잔성 촉진성을 가진 유산균이면, 품질 유지 기한 종료 직전에도 충분한 양의 비피도박테리움 통검을 함유할 수 있는 발효유를 제조할 수 있다.
- <33> 본 발명의 락토코쿠스속균은, 예를 들어, 이하의 방법으로 얻을 수 있다. 우선, 각종 시료로부터 균주를 분리하고, 이 중에서 10%(W/W)환원 탈지분유 배지에서의 발효성이 우수한 것, 즉, 10%(W/W)환원 탈지분유 배지에서 25~37°C의 온도 범위에서 16시간 배양했을 때 배지를 응고시킬 수 있는 발효성을 가진 것을 선택한다. 이어, 선택된 균과 비피도박테리움 통검의 혼합 배양 시험을 하고, 상기 (2) 및 (3)에 규정되는 비피도박테리움 통검의 생육 촉진성 및 저장 생잔성 촉진성을 가진 균주를 선택함으로써 얻을 수 있다. 또한, 크실로오스 자화성을 갖지 않고, 또한 디아세틸 및 아세토인을 생성하지 않는 균주를 선택하는 것이 바람직하다.
- <34> 이하, 보다 상세히 설명한다.
- <35> 1. 균주의 취득
- <36> 본 발명자는 상기한 성질을 가진 균주를 자연계로부터 취득해야 하고, 일본 국내의 자연계로부터 채집한 샘플을 염기성 희석액(1980년 총문사 발행, 미츠오카 도모타리저 「장내균의 세계」 322페이지. 이하, 참고문헌 1이라고 기재함)에 희석하고, Briggs liver broth(상기 참고문헌 1, 319페이지)의 평판에 도포하고, 30°C에서 혐기배양했다. 그리고, 얻어진 콜로니 중에서 연쇄구균의 형태를 나타내고, 또한 도포 표본의 현미경 관찰에 의해 그램 양성균을 집어냈다. 그 집어낸 균을 BL 한천 배지 평판에 화선도포(streak-inoculate)하고, 상기한 바와 동일한 방법으로 혐기배양을 반복하고, 순수단리된 균주를 얻었다. 이러한 균주를 하기의 방법을 이용하여 우선 10%(W/W)환원 탈지분유 배지중에서의 발효 시험을 수행하고, 상기 (1)에서 규정되는 발효성을 가진 균주를 20주 얻었다. 이어서, 비피도박테리움 통검과의 혼합 배양 시험을 하여, pH가 4.4~4.6에 도달했을 때 비피도박테리움 통검의 균수를  $5 \times 10^8$ CFU/g 이상으로 할 수 있는 생육 촉진성과, pH가 4.4~4.6에 도달했을 때 급냉하여 10°C에서 2주일 유지한 경우에, 비피도박테리움 통검의 생잔 비율을 30% 이상으로 할 수 있는 저장 생잔성 촉진성을 가진 균주를 5주 취득했다. 해당 5균주는 각각 MCC852, MCC857, MCC859, MCC865, MCC866이라고 명명했다.
- <37> 2. 균학적 성질
- <38> 상기 5균주의 균학적 성질을 이하에 나타낸다. 또한, 균학적 성질을 측정하기 위한 시험은 거의 대부분 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Peter H. A. Sneath편, 제2권, Williams and Wilkins Company, 1986년에 따라 수행하였다.

- <39> (I) 균형(BL 한천 배지 평판에서 30°C, 72시간 혼기배양했을 때의 광학현미경 관찰시)
- <40> 크기: 직경 1~2 μm
- <41> 형상: 연쇄구균
- <42> (II) 그램 염색성: 양성
- <43> (III) 리트머스 밀크: 응고
- <44> (IV) 아포 형성: 음성
- <45> (V) 글루코오스부터의 가스 생성: 없음
- <46> (VI) 운동성: 없음
- <47> (VII) 카탈라아제 활성: 음성
- <48> (VIII) 아르기닌디카르복실라아제 시험: 양성
- <49> (IX) 구연산으로부터의 가스 생산: 음성
- <50> (X) 온도 감수성(60°C 30분간 및 65°C 30분간): 모두 감수성
- <51> (XI) 글루코오스의 분해 산물: L-젖산

[표 1]

	균주	MCC852	MCC857	MCC859	MCC865	MCC866	ATCC19435
XII	생육 온도	10°C	+S	+S	+	+S	+S
		40°C	+	+	+	+	+
		45°C	-	-	-	-	-
XIII	식염 내성	2%	+	+	+	+	+
		3%	+	+	+	+	+
		4%	+	+	+	+	+
		6.5%	(+)S	-	-	(+)S	(+)S
XIV	pH 내성	9.2	+	+	+	+	+
		9.6	+S	+	+	-	-
XV	메틸렌블루 내 성	0.01%	+	+	+	+	+
		0.1%	+	+	+	+	+
		0.3%	±	+S	+	+S	-
XVI	아르기닌으로부터의 암모니아의 생산	+	+	+	+	±	+

XVII	당 자화성	아라비노오스	-	-	-	-	-
		크실로오스	-	-	-	-	+
		람노오스	-	-	-	-	+
		리보오스	+	+	+S	+	+
		글루코오스	+	+	+	+	+
		만노오스	+	+	+	+	+
		프리토오스	+	+	+	+	+
		갈락토오스	+	+	+	+	+
		수크로오스	-	-	-	-	-
		말토오스	+	+	+	+	+
		셀로비오스	+	+	+	+	+
		락토오스	+	+	+	+	+
		트레하로오스	+	+	+	+	+
		멜리비오스	-	-	-	-	-
		라파노오스	-	-	-	-	-
		멜레지토오스	-	-	-	-	-
		텍스트린	+	+	+	+	+
		전분	+S	+	-	+	±S
		글리코겐	-	-	-	-	-
		이눌린	-	-	-	-	-
		만니톨	(+)S	+	+	-	-
		솔비톨	-	-	-	-	-
		이노시톨	-	-	-	-	-
		에스크린	+	+	(+)S	+	+
		살리신	+	+	+S	+	+
		아미그다린	-	±	-	(+)S	(+)S
		메틸글루코시드	-	-	-	-	-
		글루콘산Na	-	±	+	-	-

+: 양성 ; (+): 약양성 ; ±: 극히 약양성 ; -: 음성 ; S: 늦게 반응

<54> 상기 (I)~(XI)에 나타내는 균학적 성질은 상기 5균주 전체에 공통되며, 또한, 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스의 타입 균주인 ATCC19435 와도 공통되었다. (XII) 생육 온도, (XIII) 식염 내성, (XIV) pH내성, (XV) 메틸렌블루 내성, (XVI) 아르기닌으로부터의 암모니아의 생산, 및 (XVII) 당의 발효성에 대해서는 각각 표 1에 나타내는 성질을 나타냈다. 또한, 당의 발효성은 미츠오카의 당발효성용 배지(1974년, 미츠오카 토모타리저 「유산균의 세균학」, 임상검사 18, 1163~1172페이지)를 이용하여 28종류의 당에 대해 시험을 수행했다.

<55> 이상의 결과로부터 상기 5균주는 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스균종의 균학적 성질을 공통적으로 갖고 있는 것이 분명하다. 즉, 상기 5균주는 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스균종인 것이 확인되었다. 한편, 상기 (XII)~(XVII)에 나타내는 균학적 성질로부터 상기 5균주는 특히 크실로오스 자화성을 갖지 않는 점에서 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스균 타입 균주와는 다른 것이 분명하다.

<56> 그래서, 출원인은 상기 5 균주를 독립행정법인 산업기술종합연구소 특허생물기탁센터(일본 이바라키현 쓰쿠바시 히가시 1쵸메 1번지 1 중앙 제6(우편번호 305-8566))에 신규 균주로서 기탁했다. 수탁 번호는 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스 MCC852주가 FERM BP-10742, 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스 MCC857주가 FERM BP-10757, 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스 MCC859주가 FERM BP-10744, 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스 MCC865주가 FERM BP-10745, 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스 MCC866주가 FERM BP-10746이다. 또한, 기탁일은 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스 MCC852, 859, 865, 및 866주가 2006년 12월 1일이고, 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스 MCC857주가 2007년 1월 10일이다.

### 3.10%(W/W)환원 탈지분유 배지에서의 발효성 시험

<58> 환원 탈지분유(모리나가유업사 제조)를 물로 용해하여 얻은 10%(W/W)환원 탈지분유 배지를 95℃에서 30분간 살균하고, 해당 환원 탈지분유 배지에 대해 각 균주의 스타터(starter)를 3%(V/V) 접종하고, 25, 30, 및 37℃의 각 온도에서 16시간 배양했다. 얻어진 배양액을 급냉하여 응고 상황, pH, 및 함유되는 유산균수를 측정했다. 유

산균수의 측정은 시판되고 있는 BCP첨가 플레이트 카운트 한천배지(에이肯기제사 제조) 평판에서 수행했다. 측정 결과를 표 2에 나타낸다.

<59> 또한, 대조균주로서 일본특허 제3,068,484호에 기재된 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스의 타입 균주 ATCC19435주를 이용했다.

<60> [표 2]

균주	배양조건								
	25℃, 16시간			30℃, 16시간			37℃, 16시간		
	균수 (CFU/g)	pH		균수 (CFU/g)	pH		균수 (CFU/g)	pH	
MCC-852	$2.0 \times 10^8$	4.53	응고	$1.5 \times 10^9$	4.44	응고	$8.0 \times 10^8$	4.63	응고
MCC-857	$1.7 \times 10^9$	4.53	응고	$1.5 \times 10^9$	4.41	응고	$1.1 \times 10^9$	4.5	응고
MCC-859	$1.4 \times 10^9$	4.54	응고	$8.5 \times 10^8$	4.44	응고	$8.1 \times 10^8$	4.59	응고
MCC-865	$2.0 \times 10^9$	4.52	응고	$1.5 \times 10^9$	4.42	응고	$8.8 \times 10^8$	4.63	응고
MCC-866	$2.0 \times 10^9$	4.52	응고	$1.3 \times 10^9$	4.4	응고	$8.5 \times 10^8$	4.61	응고
ATCC19435	$5.2 \times 10^8$	5.93	응고하지 않음	$4.4 \times 10^8$	5.65	응고하지 않음	$3.2 \times 10^8$	5.51	응고하 지않음

<62> 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스 MCC852, 857, 859, 865, 866의 각각의 균주, 즉 본 발명의 락토코쿠스 속균을 이용한 경우에는, 어떠한 온도 조건에서도 pH가 4.4~4.6까지 저하되어 배지가 응고했다. 또, 함유되는 유산균수도  $1 \times 10^9$  CFU/g 전후로 증식·발효성이 아주 좋은 것을 알았다.

<63> 한편, 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스의 타입 균주 ATCC19435주를 이용한 경우에는, 어떠한 온도 조건에서도 pH가 5.5 이상이고, 배지는 응고하지 않았다. 또, 본 발명의 락토코쿠스속균과 비교하여 특히 30℃ 이상에서 유산균수가 현저하게 적었다.

#### 4. 비피도박테리움 통검과의 혼합 배양 시험

<65> (1) 비피도박테리움 통검 FERM BP-7787주와의 혼합 배양 시험

<66> 대조균주로서 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스의 타입 균주 ATCC19435주를 이용했다.

<67> 우선, 후술하는 실시예 1에 기재된 방법으로, 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스 MCC852, 857, 859, 865, 866의 5균주의 각각의 배양물, 및 비피도박테리움 통검 FERM BP-7787주의 배양물을 제조했다.

<68> 비피도박테리움 통검 FERM BP-7787주는 독립행정법인 산업기술종합연구소 특허생물기탁센터(일본 이바라키현 쓰쿠바시 히가시 1쵸메 1번지 1 중앙 제6(우편번호 305-8566))에 2001년 10월 31일에 수탁되어 있다.

<69> 또한, 0.2%(W/W) 효모 엑스(Difco사 제조)가 함유된 10%(W/W)환원 탈지분유 배지 1000 mL를 90℃에서 30 분간 살균하고, 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스 타입 균주 ATCC19435주의 배양물을 30mL 접종하고, 30℃에서 16시간 배양하여, 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스의 타입 균주 ATCC19435주의 배양물을 제조했다.

<70> 10%(W/W)환원 탈지분유 배지를 90℃에서 10분간 살균하고, 해당 환원 탈지분유 배지에 대해 상기한 바와 같이 제조한 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스의 각 균주의 배양물 1%(V/V)와 비피도박테리움 통검 FERM BP-7787주의 배양물 1%(V/V)를 접종하고, 37℃에서 16시간 배양하여 발효유를 얻었다. 해당 발효유를 급냉하여 pH 및 함유되는 비피도박테리움 통검의 균수를 측정했다. 나아가, 10℃에서 2주일 저장하고, 저장 후 1주일 및 2주일의 비피도박테리움 통검의 균수를 측정했다. 비피도박테리움 통검의 균수의 측정은 TOS 프로파온산 한천배지(야쿠르트약품공업사 제조) 평판에서 수행했다. 측정 결과를 표 3에 나타내었다.

<71> [표 3]

균주	비피도박테리움 통검의 균수(CFU/g)			pH
	종료직후	1주일후	2주일후	
				종료직후

MCC852	$5.7 \times 10^8$	$5.5 \times 10^8$	$5.5 \times 10^8$	4.52
MCC857	$8.0 \times 10^8$	$7.5 \times 10^8$	$6.5 \times 10^8$	4.47
MCC859	$6.8 \times 10^8$	$6.9 \times 10^8$	$5.7 \times 10^8$	4.55
MCC865	$8.3 \times 10^8$	$8.0 \times 10^8$	$7.3 \times 10^8$	4.56
MCC866	$6.4 \times 10^8$	$6.3 \times 10^8$	$5.3 \times 10^8$	4.42
ATCC19435	$1.2 \times 10^8$	pH가 5이상에서 저장 시험을 실시할 수 없었다.		

<73> 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스 MCC852, 857, 859, 865, 866의 5균주를 각각 이용한 발효유는 발효후 pH가 대략 4.5이고, 비피도박테리움 통검의 균수가  $5 \times 10^8$ CFU/g 이상에 도달했다. 또, 해당 발효유를 10℃에서 2주일 저장한 경우의 비피도박테리움 통검의 균 생잔비율은 모두 80% 이상이었다.

<74> 한편, 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스의 타입 균주 ATCC19435주를 이용한 발효유는 발효가 진행되지 않고 발효후 pH가 5.0 이상으로 10℃에서의 저장 시험이 불가능했다. 또, 발효 종료직후의 비피도박테리움 통검의 균수도 대략  $1 \times 10^8$  CFU/g로 본 발명의 락토코쿠스속균과 비교하여 현저하게 적었다.

<75> 즉, 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스 MCC852, 857, 859, 865, 및 866의 5균주는 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스의 공지된 다른 균주보다도 비피도박테리움 통검 FERM BP-7787주에 대한 생육 촉진성 및 저장 생잔성 촉진성이 뛰어난 것이 분명하다.

<76> 또한, 일본특허 제3,068,484호에 기재된 디아세틸 및 아세토인을 생성하지 않는 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스와 비피도박테리움 통검을 혼합 배양한 경우에는, 비피도박테리움 브레베를 이용한 경우와 달리 특허 제3068484호에 기재되어 있는 바와 같은 비피도박테리움 통검의 증식 촉진 효과와 생잔성 개선 효과의 어떠한 효과도 얻을 수 없는 것도 명백하다.

#### <77> (2) 비피도박테리움 통검 타입 균주 ATCC15707주의 혼합 배양 시험

<78> 본 발명의 락토코쿠스속균의 비피도박테리움 통검에 대한 생육 촉진성 및 저장 생잔성 촉진성을 비피도박테리움 통검 FERM BP-7787주와 비피도박테리움 통검 타입 균주 ATCC15707주를 이용하여 확인했다.

<79> 우선 후술하는 실시예 1에 기재된 방법으로, 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스 MCC857주의 배양물, 및 비피도박테리움 통검 FERM BP-7787주의 배양물을 제조했다.

<80> 또한, 후술하는 실시예 21에 기재된 방법으로, 스트렙토코쿠스 서모필러스(*Streptococcus thermophilus*) 및 락토바실러스 불가리쿠스(*Lactobacillus bulgaricus*)의 혼합 배양물을 제조했다.

<81> 또한, 0.2%(W/W)효모 추출물이 함유된 11%(W/W)탈지분유 배지를 90℃에서 30분간 살균하고, 해당 탈지분유 배지에 대해 비피도박테리움 통검 타입 균주 ATCC15707주의 스타터를 10%(V/V) 접종하고, 37℃에서 pH가 4.6이 될 때까지 배양하고, 비피도박테리움 통검 타입 균주 ATCC15707주의 배양물을 제조했다.

<82> 10%(W/W)환원 탈지분유 배지를 90℃에서 10분간 살균하고, 해당 환원 탈지분유 배지에 대해 상기한 바와 같이 제조한 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스 MCC857주의 배양물 1%(V/V)와, 비피도박테리움 통검 FERM BP-7787주의 배양물 1%(V/V) 또는 비피도박테리움 통검 타입 균주 ATCC15707주의 배양물 1%(V/V)와, 스트렙토코쿠스 서모필러스 및 락토바실러스 불가리쿠스의 혼합 배양물 0.01%(V/V)를 접종하고, 37℃에서 pH가 4.6이 될 때까지 배양하여 발효유를 얻었다. 해당 발효유를 급냉하여 함유되는 비피도박테리움 통검의 균수를 측정했다. 나아가, 10℃에 2주일 저장하고, 저장후 1주일 및 2주일후의 비피도박테리움 통검의 균수를 측정했다.

<83> 한편, 대조군으로서 10%(W/W)환원 탈지분유 배지를 90℃에서 10분간 살균하고, 해당 환원 탈지분유 배지에 대해 상기한 바와 같이 제조한 비피도박테리움 통검 FERM BP-7787주의 배양물 1.5%(V/V) 또는 비피도박테리움 통검 타입 균주 ATCC15707주의 배양물 1.5%(V/V)와 스트렙토코쿠스 서모필러스 및 락토바실러스 불가리쿠스의 혼합 배양물 0.4%(V/V)를 접종하고, 37℃에서 pH가 4.6이 될 때까지 배양하여 얻은 발효유의 비피도박테리움 통검의 균수를 동일하게 측정했다. 측정 결과를 표 4에 나타낸다.

&lt;84&gt;

[표 4]

&lt;85&gt;

MCC857	비피도박테리움 통검	비피도박테리움 통검의 균수(CFU/g)		
		종료직후	1주일후	2주일후
유	FERM BP-7787	$1.0 \times 10^9$	$1.0 \times 10^9$	$7.1 \times 10^8$
유	ATCC 15707	$6.5 \times 10^8$	$3.8 \times 10^8$	$2.0 \times 10^8$
무	FERM BP-7787	$2.0 \times 10^8$	$1.9 \times 10^8$	$4.0 \times 10^7$
무	ATCC 15707	$3.0 \times 10^7$	$1.1 \times 10^6$	미검출

&lt;86&gt;

비피도박테리움 통검 FERM BP-7787주와 비피도박테리움 통검 타입 균주 ATCC15707주의 두 균주 모두 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스 MCC857주와 혼합 배양함으로써 발효유 중의 비피도박테리움 통검의 균수는 현저하게 증대했다. 또, 10°C에서 2주일 저장한 후의 비피도박테리움 통검의 균생잔비율도 비피도박테리움 통검 FERM BP-7787주에서 71%, 비피도박테리움 통검 타입 균주 ATCC15707주에서 31%로 모두 30% 이상이었다.

&lt;87&gt;

이에 대해, 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스 MCC857주와 혼합 배양하지 않은 경우에는, 10°C에서 2주일간 저장한 후의 비피도박테리움 통검의 생잔비율은 비피도박테리움 통검 FERM BP-7787주에 20%이고, 비피도박테리움 통검 타입 균주 ATCC15707주에서는 살아있는 비피도박테리움 통검은 검출되지 않았다.

&lt;88&gt;

또한, 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스 MCC857주를 대신하여 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스 MCC852, 859, 865, 또는 866주를 각각 이용한 경우에도 동일한 결과가 나왔다.

&lt;89&gt;

즉, 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스 MCC852, 857, 859, 865, 866의 각각의 균주는 저장 생잔성이 뛰어난 비피도박테리움 통검 FERM BP-7787주 이외의 비피도박테리움 통검에 대해서도 우수한 생육 촉진성 및 저장 생잔성 촉진성을 갖는 것이 명백하다.

&lt;90&gt;

#### 5. 특허 제3364491호에 기재된 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 크레모리스의 혼합물과의 비교 시험

&lt;91&gt;

우선 상기 4(2)에 기재된 방법으로 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스 MCC857주의 배양물, 비피도박테리움 통검 타입 균주 ATCC15707주의 배양물, 및 스트렙토코쿠스 세모필러스 및 락토바실러스 불가리쿠스의 혼합 배양물을 제조했다.

&lt;92&gt;

10%(W/W)환원 탈지분유 배지를 90°C에서 10분간 살균하고, 해당 환원 탈지분유 배지에 대해 상기한 바와 같이 제조한 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스 MCC857주의 배양물 1%(V/V)와 비피도박테리움 통검 타입 균주 ATCC15707주의 배양물 1%(V/V)와, 스트렙토코쿠스 세모필러스 및 락토바실러스 불가리쿠스의 혼합 배양물 0.01%(V/V)를 접종하고, 37°C에서 pH가 4.6이 될 때까지 배양하여 발효유를 얻었다. 해당 발효유를 급냉하고 함유되어 있는 비피도박테리움 통검의 균수를 측정했다.

&lt;93&gt;

한편, 대조군으로서 10%(W/W)환원 탈지분유 배지를 90°C에서 10분간 살균하고, 해당 환원 탈지분유 배지에 대해 상기한 바와 같이 제조한 비피도박테리움 통검 타입 균주 ATCC15707주의 배양물 1%(V/V)와 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스와 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 크레모리스의 혼합물 「EZAL MA14」(Rhodia사 제조) 2%(V/V)를 접종하고, 38°C에서 pH가 4.6이 될 때까지 배양하여 얻은 발효유의 비피도박테리움 통검의 균수를 동일하게 측정했다. 또한, 「EZAL MA14」는 특허 제3364491에 기재된 「EZAL MR014」(Rhodia사 제조)에 해당하는 혼합물이다.

&lt;94&gt;

락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스 MCC857주를 이용한 발효유에서는 비피도박테리움 통검의 균수는  $5.5 \times 10^8$  CFU/g이었다. 이에 대해, 「EZAL MA14」를 이용한 발효유를  $10^6$ 배로 희석한 희석 용액으로부터는 비피도박테리움 통검이 전혀 검출되지 않고 해당 발효유에 함유되는 비피도박테리움 통검의 균수는  $1 \times 10^6$  CFU/g 이하인 것으로 판명되었다.

&lt;95&gt;

즉, 일본특허 제3,364,491호에 기재된 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스와 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 크레모리스를 비피도박테리움 통검과 혼합 배양한 경우에는, 일본특허 제3,364,491호에 기재되어 있는 바와 같은 비피더스균의 생육 촉진 및 발효 시간의 단축이라는 효과를 얻을 수 있는 것이 명백해졌다.

&lt;96&gt;

이상과 같이, 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스 MCC852, 857, 859, 865, 866의 5균주, 즉 본원 발명에 이

용되는 락토코쿠스속균은 비피더스균에 적합한 발효 온도 범위에서의 유성 배지에서 강한 발효성을 나타내고, 나아가 비피도박테리움 통검과 혼합 배양한 경우에, 비피더스균의 생육 및 저장 생잔에 대해 뛰어난 촉진 효과를 나타내는 것으로부터, 락토코쿠스속의 공지된 균주에서 볼 수 없었던 성질을 갖고 있는 것은 분명하다. 또, 본원 발명에 이용되는 락토코쿠스속균은 디아세틸 및 아세토인을 생성하지 않기 때문에, 풍미가 좋은 발효물을 제조할 수 있는 것도 기대할 수 있다.

<97> 본 발명에 있어서, 비피더스균과 락토코쿠스속균의 전배양에 이용되는 배지는 통상 이용되는 배지이면, 특별히 한정되지 않지만, 유성 배지인 것이 바람직하다. 취급이 간편하기 때문에, 환원 탈지분유 배지가 특히 바람직하다. 해당 환원 탈지분유 배지의 농도는 3%(W/W) 이상이 바람직하고, 8%(W/W) 이상이 특히 바람직하다. 그 밖에 이전배양에 이용되는 배지에는, 효모 추출물 등의 생육 촉진 물질이나 L-시스테인 등의 환원제 등을 첨가할 수 있다. 특히 비피더스균은 유성 배지에서의 증식성이 낮기 때문에, 생육 촉진 물질을 첨가한 배지를 이용하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 0.1~1%(W/W)의 효모 추출물을 함유한 배지를 이용할 수 있다. 또, 이전배양에 이용되는 배지는 살균 처리한 것을 이용한다. 해당 살균 처리는 통상 이용되는 방법으로 할 수 있으며, 예를 들어, 80~122°C에서 5~40분간, 바람직하게는 85~95°C에서 5~35분간의 가열 처리에 의해 수행할 수 있다.

<98> 본 발명에 있어서, 비피더스균과 락토코쿠스속균을 이용한 발효에 이용되는 발효용 베이스는 발효유의 제조에 통상 이용되는 베이스라면, 특별히 한정되지 않는다. 해당 베이스는 예를 들어, 우유, 탈지유, 생크림, 버터, 전지분유, 탈지분유 등에 필요에 따라 자탕(수크로오스)등의 감미료, 페틴, 과실, 과일쥬스, 한천, 젤라틴, 유지, 향료, 착색료, 안정제, 환원제 등을 배합하고, 통상의 방법에 따라 살균, 균질화, 냉각 등을 함으로써 조제할 수 있다.

<99> 비피더스균과 락토코쿠스속균의 스타터인 발효용 베이스에 대한 접종 비율은 특별히 한정되지 않지만, 100:1~1:10이 바람직하고, 10:1~1:1이 특히 바람직하다. 또, 해당 베이스에 첨가하는 양도 특별히 한정되지 않지만, 비피더스균과 락토코쿠스속균을 합한 첨가량이 발효용 베이스 대해 0.01~10(V/V)%가 바람직하고, 0.1~5(V/V)%가 특히 바람직하다.

<100> 본 발명에 이용하는 유산균에는 락토코쿠스속균의 비피더스균에 대한 생육 촉진 효과 및 저장 생잔성 촉진 효과를 저해하지 않는 범위에서 비피더스균과 락토코쿠스속균 외에 다른 유산균을 함유할 수도 있다. 그 다른 유산균은 통상 발효유의 제조에 이용되는 것이면 특별히 한정되지 않지만, 스트렙토코쿠스 서모필러스와 락토바실러스 불가리쿠스가 바람직하다. 비피더스균과 락토코쿠스속균을 합한 섭취량과, 그 밖의 유산균을 합한 섭취량의 스타터로서의 발효용 베이스에 대한 접종 비율은 락토코쿠스속균의 비피더스균에 대한 효과를 저해하지 않는 한 특별히 한정되지 않지만, 1000:1~10:1이 바람직하다.

<101> 본 발명의 발효류의 제조방법에서의 혼합 배양의 온도는 30°C~40°C가 바람직하고, 36°C~38°C가 특히 바람직하다. 비피더스균과 본 발명에 이용하는 락토코쿠스속균의 양쪽이 모두 충분히 생육가능한 온도 범위이기 때문이다. 또, 배양 시간은 제조하는 발효유의 종류에 따라 적절히 결정되는데, 5~18시간이 바람직하다.

<102> 배양후 얻어진 발효유는 그대로 식품으로 할 수도 있고, 예를 들어, 균질화하여 액상으로 가공할 수도 있다. 그 밖에 예를 들어, 과즙, 과실 등을 적절히 첨가할 수도 있다. 또, 용기에 충진하는 것 등은 특별히 한정되지 않고, 통상 이용되는 방법으로 수행할 수 있다.

### 실시예

<103> 다음에 실시예를 나타내어 본 발명을 더욱 상세히 설명하지만, 본 발명은 이하의 실시예에 한정되지 않는다.

#### 실시예 1

<105> 10%(W/W) 환원 탈지분유(모리나가 유업사 제조)를 물에 용해하여 얻은 10%(W/W) 환원 탈지분유 배지 1000mL를 90°C에서 30분간 살균하고, 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스 MCC857주의 종균을 30mL 접종하고, 25°C에서 16시간 배양했다. 한편, 0.2%(W/W) 효모 추출물이 함유된 11%(W/W) 탈지분유 배지 1000mL를 90°C에서 30분간 살균하고, 비피도박테리움 통검 FERM BP-7787주의 종균을 100mL 접종하고, 37°C에서 6시간 배양했다.

<106> 이와는 별도로, 탈지분유, 전지분유, 페틴, 및 자당(수크로오스)로 이루어지는 원료를 혼합 용해하여 얻어진 유지방 0.5%(W/W), 무지유 고형분 8.0%(W/W), 자당 5.0%(W/W), 페틴 0.2%(W/W)로 이루어진 베이스 50L를 90°C에서 10분간 살균하고, 40°C로 냉각했다. 해당 살균한 베이스에 상기한 대로 전배양을 수행한 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스 MCC857주의 배양물 50mL와 비피도박테리움 통검 FERM BP-7787주의 배양물 500mL를 접종하고, 37°C에서 16시간 배양하여 발효유를 얻었다. 해당 발효유를 즉시 교반냉각하고, 냉각 발효유를 15MPa의 압

력으로 균질화하고, 200mL용 유리 용기에 채워 밀봉하여 드링크 요구르트를 얻었다. 얻어진 드링크 요구르트는 유산산도 0.68%, pH 4.64, 점도  $75\text{mPa} \cdot \text{s}$ 이고,  $7.0 \times 10^8 \text{CFU/g}$ 의 비피더스균을 함유하고 있었다. 이 해당 드링크 요구르트를 10°C에서 21일간 저장했을 때의 비피더스 균수는  $5.2 \times 10^8 \text{CFU/g}$ 이고, 생잔비율은 74%였다.

#### 실시예 2

<108> 10%(W/W) 환원 탈지분유 배지 1000mL을 90°C에서 30분간 살균하고, 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스 MCC866주의 종균을 30mL 접종하고, 25°C에서 16시간 배양했다. 한편, 0.2%(W/W) 효모 추출물이 함유된 11%(W/W) 탈지분유 배지 1000mL를 90°C에서 30분간 살균하고, 비피도박테리움 통검 FERM BP-7787주의 종균을 100mL 접종하고, 37°C에서 6시간 배양했다. 또한, 10%(W/W) 환원 탈지분유 배지 1500mL를 90°C에서 30분간 살균하고, 스트렙토코쿠스 서모필러스(한젠사 제조)와 락토바실러스 블가리쿠스(한젠사 제조)의 혼합 배양물 50mL를 접종하고, 35°C에서 5시간 배양했다.

<109> 이와는 별도로, 유지방 3.0%(W/W), 무지유 고형분 9.0%(W/W)로 이루어진 생유 50L를 70°C로 가온하고, 15MPa의 압력으로 균질화한 후, 90°C에서 10분간 살균하고, 40°C로 냉각했다. 해당 살균한 베이스에 상기한 바와 같이 전배양을 수행한 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스 MCC866주의 배양물 500mL와 비피도박테리움 통검 FERM BP-7787주의 배양물 500mL, 및 스트렙토코쿠스 서모필러스와 락토바실러스 블가리쿠스의 혼합 배양물 5mL를 접종하고, 500mL 용량의 수지 용기에 채워 밀봉하고 37°C에서 7시간 배양한 후 즉시 냉각했다. 얻어진 발효유는 유산산도 0.72%, pH 4.55이고,  $5.8 \times 10^8 \text{CFU/g}$ 의 비피더스균을 함유하고 있었다. 이 해당 발효유를 10°C에서 21일간 저장했을 때의 비피더스 균수는  $3.6 \times 10^8 \text{CFU/g}$ 이고, 생잔비율은 62%였다.

#### 실시예 3

<111> 10%(W/W) 환원 탈지분유 배지 1000mL을 90°C에서 30분간 살균하고, 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스 MCC865주의 종균을 30mL 접종하고, 25°C에서 16시간 배양했다. 한편, 0.2%(W/W) 효모 추출물이 함유된 11%(W/W) 탈지분유 배지 1000mL를 90°C에서 30분간 살균하고, 비피도박테리움 통검 FERM BP-7787주의 종균을 100mL 접종하고, 37°C에서 6시간 배양했다. 또, 10%(W/W) 환원 탈지분유 배지 1500mL를 90°C에서 30분간 살균하고, 스트렙토코쿠스 서모필러스(한젠사 제조)와 락토바실러스 블가리쿠스(한젠사 제조)의 혼합 배양물 50mL를 접종하고, 42°C에서 5시간 배양했다.

<112> 이와는 별도로, 유지방 3.4%(W/W), 무지유 고형분 12.2%(W/W)로 이루어진 생유 500L를 70°C로 가온하고, 15MPa의 압력으로 균질화한 후, 90°C에서 10분간 살균하고, 40°C로 냉각했다. 해당 살균한 베이스에 상기한 대로 전 배양을 수행한 락토코쿠스 락티스 서브스피시즈 락티스 MCC865주의 배양물 5L와 비피도박테리움 통검 FERM BP-7787주의 배양물 5L, 및 스트렙토코쿠스 서모필러스와 락토바실러스 블가리쿠스의 혼합 배양물 50mL를 접종하고, 37°C에서 7.5시간 배양한 후 즉시 냉각했다. 얻어진 발효유를 다시 교반에 의해 응고물(curd)을 과쇄하고, 과쇄 발효유와 통상의 방법에 의해 조제한 블루베리 보존제를 7:3의 비율로 혼합하고, 교반하여 균질하게 만든 후, 120mL 용량 산소 배리어성 종이용기에 충진하였다. 얻어진 블루베리 과육이 들어간 발효유는 유산산도 0.80%, pH 4.45이고,  $5.5 \times 10^8 \text{CFU/g}$ 의 비피더스균을 함유하고 있었다. 이러한 상기 블루베리 과육이 함유된 발효유를 10°C에서 21일간 저장했을 때의 비피더스 균수는  $3.9 \times 10^8 \text{CFU/g}$ 이고, 생잔비율은 71%였다.

#### **산업상 이용 가능성**

<113> 본 발명의 제조 방법에 의해 소비 기한 종료 직전이라도 살아있는 비피더스균을 종래보다 더 많이 함유하는 발효유를 제조할 수 있기 때문에, 발효유 등의 제조분야에서 이용할 수 있다.