



등록특허 10-2430949



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년08월11일

(11) 등록번호 10-2430949

(24) 등록일자 2022년08월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) C12N 1/00 (2017.01)

(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2021.05)
C12N 1/005 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0174893

(22) 출원일자 2021년12월08일

심사청구일자 2021년12월08일

(56) 선행기술조사문헌

KR102009732 B1*

KR1020170032136 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

일동바이오사이언스(주)

경기도 평택시 포승읍 포승공단로 17 ()

(72) 발명자

김광섭

경기도 평택시 청북읍 안청로1길 21, 102동 1308호(평택청북 LH B12단지)

배철민

경기도 평택시 지체동삼로 163, 114동 201호(동삼동, 더샵지체역센트럴파크1BL아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

인비전 특허법인

전체 청구항 수 : 총 3 항

심사관 : 이현지

(54) 발명의 명칭 생산성과 안정성이 우수한 다중코팅 유산균

(57) 요약

본 발명은 다중 코팅된 유산균의 제조방법에 관한 것으로, 유산균에 수용성 폴리머를 혼합하여 1차 코팅 유산균을 형성하는 단계; 상기 1차 코팅 유산균에 히알루론산을 혼합하여 2차 코팅 유산균을 형성하는 단계; 상기 2차 코팅 유산균에 수용성 당을 혼합하여 3차 코팅 유산균을 형성하는 단계; 및 상기 3차 코팅 유산균에 알러지를 유발하지 않는 단백질 물질을 코팅하여 4차 코팅 유산균을 형성하는 단계를 포함한다.

(72) 발명자

오상기

충청남도 천안시 서북구 불당19로 111, 201동 130
2호(불당동, 천안불당린스트라우스2단지)

반오현

충청북도 청주시 흥덕구 직지대로761번길 25(운천
동)

양정우

서울특별시 강북구 삼양로74길 8, 103동 101호(미
아동, 경남아너스빌)

명세서

청구범위

청구항 1

다중 코팅된 유산균의 제조방법에 있어서,
유산균에 수용성 폴리머를 혼합하여 1차 코팅 유산균을 형성하는 단계;
상기 1차 코팅 유산균에 히알루론산을 혼합하여 2차 코팅 유산균을 형성하는 단계;
상기 2차 코팅 유산균에 수용성 당을 혼합하여 3차 코팅 유산균을 형성하는 단계; 및
상기 3차 코팅 유산균에 알러지를 유발하지 않는 단백질 물질을 코팅하여 4차 코팅 유산균을 형성하는 단계를 포함하며,
상기 수용성 폴리머는 구아검(guar gum, GG)을 포함하며,
상기 수용성 당은 트레할로스(Trehaltose)를 포함하며,
상기 단백질 물질은 완두겍톤을 포함하며,
상기 유산균은 Streptococcus thermophilus IDCC 2201을 포함하는 제조방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서,
상기 1차 코팅 유산균 형성 단계에서 상기 수용성 폴리머의 농도는 0.01 내지 0.1 w/v%이고,
상기 2차 코팅 유산균 형성 단계에서 상기 히알루론산의 농도는 0.002 내지 0.05 w/v%이고,
상기 3차 코팅 유산균 형성 단계에서 상기 수용성 당의 농도는 3 내지 13 w/v%이고,
상기 4차 코팅 유산균 형성 단계에서 상기 단백질의 농도는 0.2 내지 1.5 w/v%인 제조방법.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

다중코팅 유산균에 있어서,
제1항 및 제5항 중 어느 한 항에 의해 제조된 다중코팅 유산균.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 생산성과 안정성이 우수한 다중코팅 유산균에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 유산균은 발효를 통해 유산(Lactic acid)를 생산하는 세균을 의미하며, 소화기내 정착시 유해균의 증식을 저해하여 정장효과가 있다고 알려져 있다. 유산균은 건강기능식품으로 주로 발효식품인 김치, 된장, 치즈, 요구르트 등에서 분리되며, 특이적인 기능성을 연구를 통하여 식약처 개별인정형 원료로써 인정받고 있다. 예를 들어, 유산균은 장내에서 증식하여 유해균 증식 억제, 면역과민반응 개선, 체지방 감소, 갱년기 증상 완화 등에 도움이 될 수 있음이 증명되었다. 그러나 유산균은 소화기관을 거치면서 위산(위)과 담즙산(소장)에 의한 사멸로 장까지 살아서 도달하지 못하는 경우가 있다.

[0003] 이러한 문제점을 해결하기 위하여 다양한 연구가 진행되고 있으며, 대표적인 방법으로 유산균을 장까지 살아갈 수 있도록 코팅을 하는 것이다. 그러나 종래의 코팅기술은 제품의 안전성 등을 위하여 추가적인 동결건조 보호제를 필요로 하였다. 또한, 코팅제인 탈지분유, 유청단백, 분리대두단백 등은 알러지 유발물질로 분류되는 점에서 개선이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 한국특허공개 제2009-0082035호 (2009년 07월 29일 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 생산성과 안정성이 우수한 다중코팅 유산균 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명은 다중 코팅된 유산균의 제조방법에 있어서, 유산균에 수용성 폴리머를 혼합하여 1차 코팅 유산균을 형성하는 단계; 상기 1차 코팅 유산균에 히알루론산을 혼합하여 2차 코팅 유산균을 형성하는 단계; 상기 2차 코팅 유산균에 수용성 당을 혼합하여 3차 코팅 유산균을 형성하는 단계; 및 상기 3차 코팅 유산균에 알러지를 유발하지 않는 단백질 물질을 코팅하여 4차 코팅 유산균을 형성하는 단계를 포함하는 것에 의해 달성된다.

[0007] 상기 수용성 폴리머는, 카르복시메틸셀룰로오스(carboxymethyl cellulose, CMC), 하이드록시에틸셀룰로오스(hydroxyethylcellulose, HEC), 잔탄검(xanthan gum, XG), 구아검(guar gum, GG), 폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone, PVP), 카보폴(carbopol), 소듐알기네이트(sodium alginate) 및 프로필렌글리콜 알기네이트(propylene glycol alginate) 중 적어도 어느 하나를 포함할 수 있다.

[0008] 상기 수용성 당은, 수크로스(Sucrose), 트레할로스(Trehalose), 말토스(Maltose), 락토스(Lactose) 및 프락토올리고당(Fructo-oligosaccharide) 중 적어도 어느 하나를 포함할 수 있다.

[0009] 상기 단백질 물질은, 완두렙톤, 쌀단백 및 효모추출물 중 적어도 어느 하나를 포함할 수 있다.

[0010] 상기 1차 코팅 유산균 형성 단계에서 상기 수용성 폴리머의 농도는 0.01 내지 0.1 w/v%이고, 상기 2차 코팅 유산균 형성 단계에서 상기 히알루론산의 농도는 0.002 내지 0.05 w/v%이고, 상기 3차 코팅 유산균 형성 단계에서 상기 수용성 당의 농도는 3 내지 13 w/v%이고, 상기 4차 코팅 유산균 형성 단계에서 상기 단백질의 농도는 0.2 내지 1.5 w/v%일 수 있다.

[0011] 상기 수용성 폴리머는 구아검을 포함하며, 상기 수용성 당은 트레할로스를 포함하며, 상기 단백질은 완두렙톤을 포함할 수 있다.

[0012] 상기 유산균은 락토바실러스 속(Lactobacillus sp.), 비피도박테리움 속(Bifidobacterium sp.), 스트렙토코커스 속(Streptococcus sp.), 락토코커스 속(Lactococcus sp.), 엔테로코커스 속 (Enterococcus sp.), 클로스트리디움 속(Clostridium sp.) 및 바실러스 속(Bacillus sp.) 중 적어도 어느 하나를 포함할 수 있다.

[0013] 상기 유산균은 Streptococcus thermophilus IDCC 2201를 포함할 수 있다.

[0014] 상기 본 발명의 목적은 다중코팅 유산균에 있어서, 상기 방법에 의해 제조된 다중코팅 유산균에 의해 달성된다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에 따르면 생산성과 안정성이 우수한 다중코팅 유산균 조성물이 제공된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 이하 도면을 참조하여 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[0017] 첨부된 도면은 본 발명의 기술적 사상을 더욱 구체적으로 설명하기 위하여 도시한 일 예에 불과하므로 본 발명의 사상이 첨부된 도면에 한정되는 것은 아니다. 또한 첨부된 도면은 각 구성요소 간의 관계를 설명하기 위해 크기와 간격 등이 실제와 달리 과장되어 있을 수 있다.

[0018] 본 발명은 높은 생산성과 안정성을 얻기 위한 유산균 코팅방법에 관한 것이다.

[0019] 본 발명의 유산균은 락토바실러스 속(Lactobacillus sp.), 비피도박테리움 속(Bifidobacterium sp.), 스트렙토코커스 속(Streptococcus sp.), 락토코커스 속(Lactococcus sp.), 엔테로코커스 속 (Enterococcus sp.), 클로스트리디움 속(Clostridium sp.) 및 바실러스 속(Bacillus sp.) 중 적어도 어느 하나를 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0020] 본 발명의 유산균은 스트렙토코커스 써모필루스(Streptococcus thermophilus) 균종일 수 있으며, 특히 Streptococcus thermophilus IDCC 2201일 수 있다.

[0021] 유산균은 4중 코팅으로 이루어질 수 있으며, 코팅단계에 따라 1차 코팅 유산균, 2차 코팅 유산균, 3차 코팅 유산균 및 4차 코팅 유산균이 형성된다.

[0022] 각 코팅은 여과된 유산균액을 코팅제와 교반하여 수행된다. 교반은 상온, 10℃ 내지 30℃ 또는 20℃ 내지 30℃에서 1분 내지 60분, 2분 내지 30분 또는 3분 내지 10분 수행될 수 있다.

[0023] 1차 코팅 유산균은 유산균에 수용성 폴리머를 혼합하여 얻어진다.

[0024] 수용성 폴리머는 카르복시메틸셀룰로오스(carboxymethyl cellulose, CMC), 하이드록시에틸셀룰로오스(hydroxyethylcellulose, HEC), 잔탄검(xanthan gum, XG), 구아검(guar gum, GG), 폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone, PVP), 카보폴(carbopol), 소듐알기네이트(sodium alginate) 및 프로필렌글리콜 알기네이트(propylene glycol alginate) 중 적어도 어느 하나를 포함할 수 있다.

[0025] 수용성 폴리머는 유산균 표면 접합력이 우수하여 코팅시 외부공기의 유입을 차단하고 2차 코팅제인 히알루론산과의 결합력이 우수한 바인더(binder)로 역할을 하는 것이 적합하다. 유산균의 대부분이 혐기성균(anaerobe)이므로 기체 차단성이 우수하며 식품 및 의약품용으로 사용할 수 있는 기체가 바람직하다.

[0026] 1차 코팅 유산균 형성 단계에서 수용성 폴리머의 농도는 0.01 내지 0.2 w/v%, 0.01 내지 0.1 w/v% 또는 0.02 내지 0.08 w/v%일 수 있다.

[0027] 2차 코팅 유산균은 1차 코팅 유산균에 히알루론산을 혼합하여 얻는다.

[0028] 히알루론산은 수분활성 조절기능의 천연 고분자 물질로서 외부유입수분을 제어한다.

[0029] 2차 코팅 유산균 형성 단계에서 히알루론산의 농도는 0.002 내지 0.1 w/v%, 0.002 내지 0.05 w/v% 또는 0.005 내지 0.03 w/v%일 수 있다.

[0030] 3차 코팅 유산균은 2차 코팅 유산균에 수용성 당을 혼합하여 얻는다.

[0031] 수용성 당은 균체표면에 코팅막을 형성하여 외부 수분 및 습윤 공기의 유입을 차단하고, 고농도 균액에 적용하여 동결건조 회수율을 증대시키는 역할을 하며, 생산 시 높은 초기 균수 확보를 가능하게 한다.

[0032] 수용성 당은 완전한 수용성을 가질 수 있다. 수용성 당은 식물유래이나, 옥수수 유래 성분은 배제된다. 수용성

당은 동결건조 보호제의 기능을 수행한다.

- [0033] 수용성 당은 수크로스(Sucrose), 트레할로스(Trehaltose), 말토스(Maltose), 락토스(Lactose) 및 프락토올리고당(Fructo-oligosaccharide) 중 적어도 어느 하나를 포함할 수 있다.
- [0034] 3차 코팅 유산균 형성 단계에서 상기 수용성 당의 농도는 2 내지 20 w/v%, 3 내지 13w/v% 또는 5 내지 9w/v%일 수 있다.
- [0035] 4차 코팅 유산균은 3차 코팅 유산균에 알러지를 유발하지 않는 단백질 물질을 코팅하여 얻는다.
- [0036] 단백질은 3차 코팅된 다공성 당류 코팅제 표면에 결합하여, 보다 높은 수분 흡수율 방지효과를 유도하는 역할을 하며, 우수한 균체 보호능과 알러지 유발물질 배제한다.
- [0037] 단백질 물질은, 완두펍톤, 쌀단백 및 효모추출물 중 적어도 어느 하나를 포함한다.
- [0038] 완두펍톤은 분리 완두 단백질이며, 쌀단백은 분리 쌀 단백질이다.
- [0039] 완두펍톤, 쌀단백 및 효모추출물은 각각 완두, 쌀, 효모를 Proteases, Cellulases, Amylases 등의 효소를 처리하여 용도에 따라 적절한 정도의 가수분해를 진행한 후 생산한 건조분말에 필요 시 아미노산을 첨가한 제품으로, 다양한 크기의 단백질 분자와 아미노산을 포함하여 미생물 성장 또는 동결건조 보호제로써 효과를 나타내는 제품이다.
- [0040] 4차 코팅 유산균 형성 단계에서 단백질의 농도는 0.1내지 2.0 w/v% 0.2 내지 1.5 w/v% 또는 0.3 내지 0.7 w/v%일 수 있다.
- [0041] 이상의 방법으로 제조된 다중코팅 유산균은 고농도 유산균액의 동결건조 결과물에서 높은 균수를 확보하였고, 수분 흡수율 효과적으로 방지하여 안정성을 증대시켰다. 또한 알러지를 유발하지 않으면서 내산성, 내담즙성도 우수하다.
- [0042] 이하 실험예를 통하여 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0043] [실험예 1] 3차 코팅제 실험
- [0044] 여과된 고농도 유산균액을 상온(25℃)에 맞추고 교반을 시작하여 구아검(0.05 %, w/v)를 첨가한 후 5분간 교반하여 1차 코팅을 완료하였다. 고농도 유산균액에서 유산균 농도는 2200 내지 2800억 CFU/mL였다.
- [0045] 유산균은 락토바실러스 플란타럼 IDCC 3501, 락토바실루스 카제이 IDCC 4351, 비피도박테리움 락티스 IDCC 4301의 3종을 사용하였다.
- [0046] 3종의 1차 코팅 유산균에 히알루론산을 0~0.02%범위에서 2차 코팅을 실시하여 2차 코팅 유산균을 얻었다. 1차 코팅 유산균과 히알루론산의 혼합시간은 5분이었다.
- [0047] 2차 코팅 유산균에 수크로스(Sucrose), 트레할로스(Trehaltose), 말토스(Maltose), 락토스(Lactose) 및 프락토올리고당(Fructo-oligosaccharide)의 당류를 사용하여 3차 코팅을 수행하여 3차 코팅 유산균을 얻었다. 비교예로 말토텍스트린을 사용하였다.
- [0048] 3차 코팅에서도 혼합시간은 5분이었다.
- [0049] 이후 말토텍스트린으로 코팅한 샘플은 분산매를 추가로 현탁하고 5분간 교반하여 균일화를 실시하였다.
- [0050] 3차 코팅 유산균을 -45℃에서 3시간 냉동한 후 동결건조하여 분말화시킨 후, 생균수를 측정하였다.
- [0051] 표 1 내지 표 3에 유산균 종류별로 3차 코팅에 사용한 코팅제의 종류와 농도에 따른 생균수를 나타내었다.

[0052] <표 1> 락토바실루스 플란타럼 IDCC 3501 (동결건조전 균액 균수: 2420억 CFU/mL)

히알루론산 농도 (% w/v)	트레할로스농도 (% w/v) *세균수: $\times 10^8$ CFU/g					말토덱스트린농도(% w/v) *세균수: $\times 10^8$ CFU/g			
	0	2	4.5	7	9	0.4	4	8	12
0	312	3849	3940	4554	3896	1810	3742	2808	2612
0.001	401	3831	4408	4682	4212	1791	3304	2904	2350
0.01	369	3904	4109	4865	4118	1855	3654	3168	2684
0.02	469	3855	3989	4734	3945	1408	3747	2895	2591
히알루론산 농도 (% w/v)	수크로스농도 (% w/v) *세균수: $\times 10^8$ CFU/g					말토스농도(% w/v) *세균수: $\times 10^8$ CFU/g			
	4	6	8	12		4	6	8	12
0	4196	4265	4489	4215		2432	2507	3707	2948
0.001	4128	4219	4612	4124		2601	2614	3788	2936
0.01	4164	4372	4608	4267		2561	2597	3903	3015
0.02	4091	4325	4589	4245		2631	2624	3849	3091
히알루론산 농도 (% w/v)	프락토올리고당농도 (% w/v) *세균수: $\times 10^8$ CFU/g								
	0.005	0.01	0.02	0.03					
0	2383	3628	4375	4130					
0.001	2549	3568	4524	4142					
0.01	2518	3544	4515	4181					
0.02	2542	3637	4492	4165					

[0053]

[0054] <표 2> 락토바실루스 카제이 IDCC 4351 (동결건조전 균액 균수: 2350억 CFU/mL)

히알루론산 농도 (% w/v)	트레할로스농도 (% w/v) *세균수: $\times 10^8$ CFU/g					말토덱스트린농도(% w/v) *세균수: $\times 10^8$ CFU/g			
	0	2	4.5	7	9	0.4	4	8	12
0	754	2422	3150	3894	3799	612	3212	2912	2714
0.001	791	2432	3201	3909	3694	749	3109	2994	2694
0.01	706	2501	3074	3958	3587	669	2948	3018	2940
0.02	699	2398	3198	3898	3708	769	3069	2947	2888
히알루론산 농도 (% w/v)	수크로스농도 (% w/v) *세균수: $\times 10^8$ CFU/g					말토스농도(% w/v) *세균수: $\times 10^8$ CFU/g			
	4	6	8	12		4	6	8	12
0	3463	3689	3759	3626		3251	3265	3456	3427
0.001	3470	3721	3781	3579		3194	3303	3497	3466
0.01	3397	3796	3849	3617		3267	3342	3575	3472
0.02	3519	3791	3811	3664		3217	3378	3537	3399
히알루론산 농도 (% w/v)	프락토올리고당농도 (% w/v) *세균수: $\times 10^8$ CFU/g								
	0.005	0.01	0.02	0.03					
0	3085	3116	3688	3551					
0.001	3035	3016	3705	3570					
0.01	3161	2959	3721	3564					
0.02	3152	2976	3738	3592					

[0055]

[0056] <표 3> 비피도박테리움 락티스 IDCC 4301 (동결건조전 균액 균수: 2540억 CFU/ml)

히알루론산 농도 w/v(%)	트레할로스농도 (% w/v)					말토덱스트린농도(% w/v)			
	*세균수: $\times 10^8$ CFU/g					*세균수: $\times 10^8$ CFU/g			
	0	2	4.5	7	9	0.4	4	8	12
0	394	2285	3436	3661	3619	984	3449	3316	2965
0.001	501	2164	3346	3619	3639	546	3464	3319	3016
0.01	449	2197	3468	3731	3519	914	3574	3061	2969
0.02	458	2118	3584	3716	3619	648	3346	3298	2816
히알루론산 농도 (% w/v)	수크로스농도 (% w/v)					말토스농도(% w/v)			
	*세균수: $\times 10^8$ CFU/g					*세균수: $\times 10^8$ CFU/g			
	4	6	8	12		4	6	8	12
0	3358	3379	3534	3428		2897	3093	3277	3274
0.001	3410	3518	3612	3391		2924	3139	3217	3369
0.01	3997	3526	3601	3477		2984	3124	3349	3346
0.02	3425	3507	3585	3374		2903	3087	3326	3291
히알루론산 농도 (% w/v)	프락토올리고당농도 (% w/v)								
	*세균수: $\times 10^8$ CFU/g								
	0.005	0.01	0.02	0.03					
0	2389	3345	3463	3359					
0.001	2685	3630	3540	3233					
0.01	2429	3462	3588	3470					
0.02	2448	3425	3513	3346					

[0057]

[0058] 표에서 보는 바와 같이 3차 코팅제의 마이크로캡슐화 효과는 말토덱스트린보다 수용성 당이 우수하다는 것을 확인할 수 있다. 특히 수용성 당을 사용한 경우 별도의 분산매 추가과정을 생략하여도 말토덱스트린보다 효과가 우수하여, 수용성 당의 동결건조 보호 효과를 확인할 수 있다.

[0059] [실험예 2] 4차 코팅제 실험

[0060] 구아검(0.05 %, w/v)-히알루론산(0.01 %, w/v)-트레할로스(7 %, w/v)를 단계별 코팅제로 사용하고, 각 코팅제 투입 후 5분간 교반하여 3차 코팅 유산균을 마련하였다. 유산균은 락토바실러스 플란타럼 IDCC 3501, 락토바실러스 카제이 IDCC 4351, 비피도박테리움 락티스 IDCC 4301의 3종이었다.

[0061] 3차 코팅 유산균에 완두렙톤 및 효모추출물을 이용하여 4차 코팅을 수행하였다. 단백질의 농도를 변화시켰으며, 4차 코팅 역시 상온에서 5분간 수행하였다. 비교예로 분리대두단백을 사용하였다.

[0062] 4차 코팅을 실시한 후, 균체를 -45℃에서 3시간 냉동한 후 동결건조하여 분말화시킨 후, 생균수를 측정하였다.

[0063] 각 유산균 별로 단백질의 종류, 농도 및 생균수는 표 4 내지 표 6과 같다.

[0064] <표 4> 락토바실러스 플란타럼 IDCC 3501(동결건조전 균액 균수: 2420억 CFU/ml)

단백질 첨가농도 (%, w/v)	분리대두단백 *세균수: $\times 10^8$ CFU/g	완두렙톤 *세균수: $\times 10^8$ CFU/g	효모추출물 *세균수: $\times 10^8$ CFU/g
0	4565	4484	4601
0.2	4778	4940	4580
0.5	4737	5674	4844
0.8	4930	5701	4995
6	4437	4241	4435

[0065]

[0066] <표 5> 락토바실러스 카제이 IDCC 4351(동결건조전 균액 균수: 2350억 CFU/ml)

단백질 첨가농도 (%, w/v)	분리대두단백 *세균수: $\times 10^8$ CFU/g	완두렙톤 *세균수: $\times 10^8$ CFU/g	효모추출물 *세균수: $\times 10^8$ CFU/g
0	3755	3645	3774
0.2	3789	3701	3842
0.5	4250	4406	4037
0.8	3945	4389	4096
6	3843	3957	4163

[0067]

[0068] <표 6> 비피도박테리움 락티스 IDCC 4301 (동결건조전 균액 균수: 2540억 CFU/ml)

단백질 첨가농도 (%, w/v)	분리대두단백 *세균수: $\times 10^8$ CFU/g	완두펩톤 *세균수: $\times 10^8$ CFU/g	효모추출물 *세균수: $\times 10^8$ CFU/g
0	3361	3248	3319
0.2	3248	3890	4068
0.5	3549	4681	3956
0.8	3694	4762	4267
6	2815	3514	3989

[0069]

[0070] 표 4 내지 표 6에서 보는 바와 같이 효모추출물과 완두 펩톤이 분리대두단백보다 우수함을 확인하였다.

[0071] 이상의 실험결과로부터 구아검(0.05%, w/v)-히알루론산(0.01%, w/v)-트레할로스(7%, w/v)-완두펩톤(0.5%, w/v)을 이용한 실시예의 다중코팅 유산균을 도출하였으며, 내산성 및 내담즙성 등을 실험하였다.

[0072] 비교예로는 기존 제품인 구아검, 히알루론산, 말토덱스트린 및 분리대두단백을 사용한 다중코팅 유산균을 사용하였다.

[0073] [실험예 3] 유산균 내산성(Acid tolerance) 실험

[0074] 내산성은 소화관 중 위(stomach)에 유산균이 통과할 때 위산(gastric acid)에 노출되게 되는데 이러한 환경을 실험한 것이다. MRS 배지에 10 % HCl 를 적하하여 pH를 2.3, 2.5으로 적정한 다음, 멸균하여 사용하였으며, 내산성 실험용 배지로 사용하였다. 유산균 1g을 0.9% 멸균생리식염수 100mL에 현탁하여 5분간 교반 후 1mL을 취하여 내산성 실험용 배지에 접종하고, 0시간, 1시간, 2시간 동안 반응시킨 후 생균수 분석을 실시하였고 그 결과는 다음표와 같다.

[0075] <표 7> 유산균 내산성 실험 결과 비교예

균주명	비교예($\times 10^7$ CFU/mL)							
	pH 2.3				pH 2.5			
	0h	1h	2h	생존율	0h	1h	2h	생존율
<i>Lactobacillus plantarum</i> IDCC 3801	472	388	374	79%	472	421	410	87%
<i>Lactobacillus casei</i> IDCC 3461	427	367	332	78%	427	355	344	81%
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3802	110	97	82	75%	110	95	91	83%
<i>Lactobacillus reuteri</i> IDCC 3701	246	221	182	74%	246	215	210	85%
<i>Lactobacillus gasseri</i> IDCC 3101	181	155	142	78%	181	182	159	88%
<i>Lactobacillus salivarius</i> IDCC 3961	168	128	98	58%	168	128	110	65%
<i>Lactobacillus johnsonii</i> IDCC 9203	186	179	142	76%	186	157	140	75%
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> IDCC 3201	637	546	469	74%	637	546	499	78%
<i>Lactobacillus helveticus</i> IDCC 3801	191	163	149	78%	191	172	152	80%
<i>Lactobacillus fermentum</i> IDCC 3901	182	148	137	75%	182	149	139	76%
<i>Lactobacillus paracasei</i> IDCC 3401	354	254	238	67%	354	277	252	71%
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> IDCC 3601	132	108	94	71%	132	108	111	84%
<i>Bifidobacterium lactis</i> IDCC 4501	278	248	227	82%	278	253	244	88%
<i>Bifidobacterium longum</i> IDCC 4101	181	149	146	81%	181	161	150	83%
<i>Bifidobacterium bifidum</i> IDCC 4201	266	229	211	79%	266	222	217	82%
<i>Bifidobacterium breve</i> IDCC 4401	441	386	342	78%	441	381	360	82%
<i>Streptococcus thermophilus</i> IDCC 2201	438	337	281	64%	438	332	300	68%
<i>Lactococcus lactis</i> IDCC 2301	746	559	482	65%	746	597	520	70%
<i>Enterococcus faecium</i> IDCC 2102	817	641	510	62%	817	588	520	64%
<i>Bacillus coagulans</i> IDCC 1201	175	168	163	93%	175	165	160	91%
<i>Bacillus subtilis</i> IDCC 1101	128	114	109	85%	128	123	121	95%
<i>Clostridium butyricum</i> IDCC 9207	20	16	15	75%	20	16	16	80%

[0076]

[0077] <표 8> 유산균 내산성 실험 결과 실시예

균주명	실시예(x10 ⁷ CFU/mL)							
	pH 2.3				pH 2.5			
	0h	1h	2h	생존율	0h	1h	2h	생존율
<i>Lactobacillus plantarum</i> IDCC 3501	566	484	442	78%	566	511	487	86%
<i>Lactobacillus casei</i> IDCC 3451	438	352	341	78%	438	396	365	83%
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	121	98	93	77%	121	104	101	83%
<i>Lactobacillus reuteri</i> IDCC 3701	236	222	195	83%	236	219	202	86%
<i>Lactobacillus gasseri</i> IDCC 3101	165	163	139	84%	165	150	144	87%
<i>Lactobacillus salivarius</i> IDCC 3551	186	158	134	72%	186	136	136	73%
<i>Lactobacillus johnsonii</i> IDCC 9403	184	170	142	77%	184	151	144	78%
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> IDCC 3201	739	589	581	79%	739	624	599	81%
<i>Lactobacillus helveticus</i> IDCC 3001	215	174	172	80%	215	194	176	82%
<i>Lactobacillus fermentum</i> IDCC 3901	168	155	132	79%	168	164	139	83%
<i>Lactobacillus paracasei</i> IDCC 3401	362	283	254	70%	362	284	262	72%
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> IDCC 3601	150	133	115	77%	150	138	122	81%
<i>Bifidobacterium lactis</i> IDCC 4301	475	445	411	87%	475	426	420	88%
<i>Bifidobacterium longum</i> IDCC 4101	167	151	138	83%	167	152	143	86%
<i>Bifidobacterium bifidum</i> IDCC 4201	322	274	262	81%	322	287	265	82%
<i>Bifidobacterium breve</i> IDCC 4401	446	388	356	80%	446	388	375	84%
<i>Streptococcus thermophilus</i> IDCC 2201	421	354	315	75%	421	375	367	87%
<i>Lactococcus lactis</i> IDCC 3301	793	632	575	73%	793	694	625	79%
<i>Enterococcus faecium</i> IDCC 3102	848	622	595	70%	848	655	654	77%
<i>Bacillus coagulans</i> IDCC 1201	149	142	136	91%	149	141	134	90%
<i>Bacillus subtilis</i> IDCC 1101	171	154	148	87%	171	167	152	89%
<i>Clostridium butyricum</i> IDCC 9207	26	25	22	85%	26	23	23	88%

[0078]

[0079] [실험예 4] 유산균 내담즙성(Bile acid tolerance) 확인

[0080]

담즙산(bile acid)은 간(liver)에서 생성된 후 소장(small intestine)으로 분비된 후 소장 말단의 회장(ileum)에서 다시 95% 흡수되어 다시 간으로 들어가는 장관순환을 한다. 이 과정에서 담즙산은 소장에 정착한 유산균의 사멸을 유도할 수 있다. 따라서 담즙산에 노출시 실시예와 비교예의 생존율 차이를 시험관 조건에서 비교하였다. 담즙산은 0.3% (v/v)가 첨가되지 않은 배지와 첨가된 배지를 멸균하여 사용하였으며, 각각의 배지에 실시예와 비교예에 따른 4차 코팅 유산균 시료 1g을 0.9% 멸균생리식염수 100mL에 현탁하여 5분간 교반 후 1mL을 취하여 내담즙산성 실험용 배지에 각각 접종하고, 5 시간 동안 반응시킨 후, 0.9% NaCl 용액을 희석수로 사용하여 생균수 분석을 하였고 그 결과는 다음표와 같다.

[0081] <표 9>

균주명	비교예(x10 ⁶ CFU/mL)			실시예(x10 ⁶ CFU/mL)		
	MRS	MRS+0.3% bile acid	생존율(%)	MRS	MRS+0.3% bile acid	생존율(%)
<i>Lactobacillus plantarum</i> IDCC 3501	472	456	97%	570	540	95%
<i>Lactobacillus casei</i> IDCC 3451	427	412	96%	440	410	93%
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	110	102	93%	121	111	92%
<i>Lactobacillus reuteri</i> IDCC 3701	246	251	102%	240	230	96%
<i>Lactobacillus gasseri</i> IDCC 3101	181	172	96%	174	163	94%
<i>Lactobacillus salivarius</i> IDCC 3551	168	149	89%	190	170	89%
<i>Lactobacillus johnsonii</i> IDCC 9203	186	177	96%	194	185	96%
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> IDCC 3201	643	599	93%	744	701	94%
<i>Lactobacillus helveticus</i> IDCC 3801	191	183	96%	220	209	96%
<i>Lactobacillus fermentum</i> IDCC 3901	182	164	90%	170	164	96%
<i>Lactobacillus paracasei</i> IDCC 3401	354	315	89%	360	332	92%
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> IDCC 3601	132	124	94%	130	121	93%
<i>Bifidobacterium lactis</i> IDCC 4301	278	271	97%	470	449	96%
<i>Bifidobacterium longum</i> IDCC 4101	181	168	93%	170	160	94%
<i>Bifidobacterium bifidum</i> IDCC 4201	266	255	96%	322	304	94%
<i>Bifidobacterium breve</i> IDCC 4401	441	414	94%	450	424	94%
<i>Streptococcus thermophilus</i> IDCC 2201	438	400	91%	420	400	95%
<i>Lactococcus lactis</i> IDCC 2301	746	669	90%	790	744	94%
<i>Enterococcus faecium</i> IDCC 2102	817	758	93%	850	796	94%
<i>Bacillus coagulans</i> IDCC 1201	175	169	97%	154	148	96%
<i>Bacillus subtilis</i> IDCC 1101	128	118	92%	172	158	92%
<i>Clostridium butyricum</i> IDCC 9207	20	18	90%	28	25	89%

[0082]

[0083] [실험예 5] 4중코팅에 의한 4℃ 안정성 비교 실험

[0084]

개선된 4중 코팅 유산균의 4℃ 안정성 실험을 위하여 고시형 유산균 18종, 기타가공품(식품)용 유산균 4종에 대하여 비교예 및 실시예의 유산균을 각기 밀봉포장하여 생존율을 측정하였다. 보다 상세하게는 생산된 유산균 분말을 50g씩 밀봉포장하여 4℃ 저온보관실에 보관하고, 시간 경과별 유산균 생균수 측정을 위하여 건강기능식품 공전에 등재된 유산균 분석법에 의거하여 균수를 측정하였다. 결과는 표 10과 같다.

[0085] <표 10>

균주명	비교예(x10 ⁶ CFU/g)					
	0일	30일	60일	180일	365일	생존율
<i>Lactobacillus plantarum</i> IDCC 3501	4737	4530	4301	4098	4126	87%
<i>Lactobacillus casei</i> IDCC 3451	4250	4105	3950	3783	3645	86%
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	1104	1051	1038	1032	984	89%
<i>Lactobacillus reuteri</i> IDCC 3701	2523	2312	2385	2209	2169	86%
<i>Lactobacillus gasseri</i> IDCC 3101	1798	1750	1762	1672	1658	92%
<i>Lactobacillus salivarius</i> IDCC 3551	1720	1620	1645	1556	1501	87%
<i>Lactobacillus johnsonii</i> IDCC 9203	1945	2012	1894	1810	1784	92%
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> IDCC 3201	6412	6604	6118	5714	5439	85%
<i>Lactobacillus helveticus</i> IDCC 3801	1894	1866	1809	1799	1674	88%
<i>Lactobacillus fermentum</i> IDCC 3901	1829	1755	1769	1649	1564	86%
<i>Lactobacillus paracasei</i> IDCC 3401	3512	3385	3194	3177	2959	84%
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> IDCC 3601	1336	1153	1095	1143	1218	91%
<i>Bifidobacterium lactis</i> IDCC 4301	2844	2590	2611	2498	2391	84%
<i>Bifidobacterium longum</i> IDCC 4101	1816	1903	1765	1708	1643	91%
<i>Bifidobacterium bifidum</i> IDCC 4201	2684	2706	2758	2439	2475	92%
<i>Bifidobacterium breve</i> IDCC 4401	4439	4260	4123	3918	3815	86%
<i>Streptococcus thermophilus</i> IDCC 2201	4387	4153	4231	3912	3737	85%
<i>Lactococcus lactis</i> IDCC 2301	7503	6849	6238	6085	6012	80%
<i>Enterococcus faecium</i> IDCC 2102	8237	7869	7380	6815	6613	80%
<i>Bacillus coagulans</i> IDCC 1201	1839	1768	1796	1801	1604	82%
<i>Bacillus subtilis</i> IDCC 1101	1309	1237	1152	1167	1062	81%
<i>Clostridium butyricum</i> IDCC 9207	232	214	217	203	197	85%
균주명	실시예(x10 ⁶ CFU/g)					
	0일	30일	60일	180일	365일	생존율
<i>Lactobacillus plantarum</i> IDCC 3501	5674	5561	5484	5317	5035	89%
<i>Lactobacillus casei</i> IDCC 3451	4406	4321	4427	4027	3836	87%
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	1218	1148	1162	1104	1056	87%
<i>Lactobacillus reuteri</i> IDCC 3701	4105	4054	3921	3845	3560	87%
<i>Lactobacillus gasseri</i> IDCC 3101	1649	1606	1548	1594	1533	93%
<i>Lactobacillus salivarius</i> IDCC 3551	1845	1801	1763	1680	1588	86%
<i>Lactobacillus johnsonii</i> IDCC 9203	1741	1728	1694	1666	1630	94%
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> IDCC 3201	7436	7265	7211	6852	6507	88%
<i>Lactobacillus helveticus</i> IDCC 3801	2219	2116	2096	2054	1994	90%
<i>Lactobacillus fermentum</i> IDCC 3901	1679	1578	1590	1494	1468	87%
<i>Lactobacillus paracasei</i> IDCC 3401	3623	3539	3367	3284	3069	85%
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> IDCC 3601	1341	1345	1275	1250	1201	90%
<i>Bifidobacterium lactis</i> IDCC 4301	4681	4664	4481	4260	4074	87%
<i>Bifidobacterium longum</i> IDCC 4101	1788	1649	1745	1634	1621	91%
<i>Bifidobacterium bifidum</i> IDCC 4201	3845	3764	3594	3602	3569	93%
<i>Bifidobacterium breve</i> IDCC 4401	4825	4682	4704	4436	4234	88%
<i>Streptococcus thermophilus</i> IDCC 2201	4324	4150	4186	3824	3691	85%
<i>Lactococcus lactis</i> IDCC 2301	7898	7201	7156	6859	6507	82%
<i>Enterococcus faecium</i> IDCC 2102	8534	8269	7965	7607	7020	82%
<i>Bacillus coagulans</i> IDCC 1201	1463	1436	1430	1370	1332	91%
<i>Bacillus subtilis</i> IDCC 1101	1652	1583	1582	1530	1490	90%
<i>Clostridium butyricum</i> IDCC 9207	289	264	265	257	246	85%

[0086]

[0087] [실험예 6] 25℃ 안정성 비교 실험

[0088] 4차 코팅 유산균의 25℃ 안정성 실험을 위하여 고시형 유산균 18종, 기타가공품(식품)용 유산균 4종에 대하여 실시예 및 비교예의 4종 코팅 유산균을 각기 생산하여 밀봉포장하여 생존율을 측정하였다. 보다 상세하게는 생산된 유산균 분말을 50g씩 밀봉포장하여 25℃ 실온에 보관하고, 시간 경과별 유산균 생균수 측정을 위하여 건강 기능식품 공전에 등재된 유산균 분석법에 의거하여 균수를 측정하였다.

[0089] 결과는 표 11과 같다.

[0090] <표 11>

관주명	비교예($\times 10^6$ CFU/g)					
	0일	30일	60일	180일	365일	생존율
<i>Lactobacillus plantarum</i> IDCC 3501	4737	4653	4431	3904	3194	67%
<i>Lactobacillus casei</i> IDCC 3451	4250	3960	3763	3512	2961	70%
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	1104	1025	994	959	848	77%
<i>Lactobacillus reuteri</i> IDCC 3701	2523	2460	2384	2069	1873	74%
<i>Lactobacillus gasseri</i> IDCC 3101	1798	1658	1590	1462	1286	72%
<i>Lactobacillus salivarius</i> IDCC 3551	1720	1684	1630	1489	1324	77%
<i>Lactobacillus johnsonii</i> IDCC 9203	1945	1825	1787	1701	1540	79%
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> IDCC 3201	6412	5820	5841	5506	4505	70%
<i>Lactobacillus helveticus</i> IDCC 3801	1894	1706	1748	1530	1297	68%
<i>Lactobacillus fermentum</i> IDCC 3901	1829	1763	1634	1420	1291	71%
<i>Lactobacillus paracasei</i> IDCC 3401	3512	3464	3308	2965	2673	76%
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> IDCC 3601	1336	1294	1255	1102	998	76%
<i>Bifidobacterium lactis</i> IDCC 4301	2844	2647	2602	2327	1980	70%
<i>Bifidobacterium longum</i> IDCC 4101	1815	1702	1687	1532	1291	71%
<i>Bifidobacterium bifidum</i> IDCC 4201	2684	2465	2505	2384	1810	67%
<i>Bifidobacterium breve</i> IDCC 4401	4439	4238	4139	3964	3752	85%
<i>Streptococcus thermophilus</i> IDCC 2201	4387	4288	4003	3648	2760	63%
<i>Lactococcus lactis</i> IDCC 2301	7503	6238	5383	5094	4402	59%
<i>Enterococcus faecium</i> IDCC 2102	8237	7746	7658	6947	6405	78%
<i>Bacillus coagulans</i> IDCC 1201	1839	1744	1735	1628	1486	81%
<i>Bacillus subtilis</i> IDCC 1101	1309	1245	1121	1057	998	76%
<i>Clostridium butyricum</i> IDCC 9207	232	216	207	189	169	73%
관주명	실시예($\times 10^6$ CFU/g)					
	0일	30일	60일	180일	365일	생존율
<i>Lactobacillus plantarum</i> IDCC 3501	5674	5310	5045	4568	3948	70%
<i>Lactobacillus casei</i> IDCC 3451	4406	4325	4218	3699	3188	72%
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	1218	1110	1094	1002	974	80%
<i>Lactobacillus reuteri</i> IDCC 3701	4105	3820	3627	3489	3107	76%
<i>Lactobacillus gasseri</i> IDCC 3101	1649	1594	1488	1392	1290	78%
<i>Lactobacillus salivarius</i> IDCC 3551	1845	1724	1632	1599	1493	81%
<i>Lactobacillus johnsonii</i> IDCC 9203	1741	1645	1638	1524	1409	81%
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> IDCC 3201	7436	6815	6938	6209	5491	74%
<i>Lactobacillus helveticus</i> IDCC 3801	2219	2144	2098	1844	1643	74%
<i>Lactobacillus fermentum</i> IDCC 3901	1679	1688	1543	1427	1310	78%
<i>Lactobacillus paracasei</i> IDCC 3401	3623	3458	3512	2948	2795	77%
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> IDCC 3601	1341	1248	1267	1124	1057	79%
<i>Bifidobacterium lactis</i> IDCC 4301	4681	4483	4357	3842	3394	73%
<i>Bifidobacterium longum</i> IDCC 4101	1783	1654	1597	1326	1279	72%
<i>Bifidobacterium bifidum</i> IDCC 4201	3845	3609	3555	3164	2732	71%
<i>Bifidobacterium breve</i> IDCC 4401	4825	4655	4489	4233	4182	87%
<i>Streptococcus thermophilus</i> IDCC 2201	4324	4208	4129	3623	2937	68%
<i>Lactococcus lactis</i> IDCC 2301	7898	6480	5569	4964	4843	61%
<i>Enterococcus faecium</i> IDCC 2102	8634	8230	7956	7236	6709	79%
<i>Bacillus coagulans</i> IDCC 1201	1463	1399	1342	1367	1313	90%
<i>Bacillus subtilis</i> IDCC 1101	1652	1630	1557	1544	1516	92%
<i>Clostridium butyricum</i> IDCC 9207	229	249	242	237	230	80%

[0091]

[0092] [실험예 7] 37℃ 안정성 비교 실험

[0093] 37℃ 안정성 실험을 위하여 고시형 유산균 18종, 기타가공품(식품)용 유산균 4종에 대하여 비교예와 실시예에 따른 4중 코팅 유산균을 각기 생산하여 밀봉포장하여 생존율을 측정하였다. 보다 상세하게 생산된 유산균 분말을 50g씩 밀봉포장하여 37℃ 항온기에 보관하고, 시간 경과별 유산균 생균수 측정을 위하여 건강기능식품 공전에 등재된 유산균 분석법에 의거하여 균수를 측정하였다. 결과는 도 12와 같다.

[0094] <표 12>

관주명	비교예(x10 ⁸ CFU/g)					
	0일	30일	60일	180일	365일	생존율
<i>Lactobacillus plantarum</i> IDCC 3501	4737	4312	4069	3522	2894	61%
<i>Lactobacillus casei</i> IDCC 3451	4250	3849	3607	3349	2855	67%
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	1104	1008	975	894	751	68%
<i>Lactobacillus reuteri</i> IDCC 3701	2523	2312	2158	1976	1769	70%
<i>Lactobacillus gasseri</i> IDCC 3101	1798	1545	1463	1259	1191	66%
<i>Lactobacillus salivarius</i> IDCC 3551	1720	1505	1463	1297	1141	66%
<i>Lactobacillus johnsonii</i> IDCC 9203	1945	1758	1713	1538	1350	69%
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> IDCC 3201	6412	5429	5375	4636	3603	56%
<i>Lactobacillus helveticus</i> IDCC 3801	1894	1655	1532	1372	1153	61%
<i>Lactobacillus fermentum</i> IDCC 3901	1829	1720	1632	1294	1031	56%
<i>Lactobacillus paracasei</i> IDCC 3401	3512	3178	3060	2243	1854	53%
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> IDCC 3601	1336	1141	1067	943	853	64%
<i>Bifidobacterium lactis</i> IDCC 4301	2844	2424	2328	2149	1905	67%
<i>Bifidobacterium longum</i> IDCC 4101	1815	1630	1468	1357	1140	63%
<i>Bifidobacterium bifidum</i> IDCC 4201	2684	2395	2218	2068	1650	61%
<i>Bifidobacterium breve</i> IDCC 4401	4439	4078	3947	3636	3141	71%
<i>Streptococcus thermophilus</i> IDCC 2201	4387	4164	3866	3541	2612	60%
<i>Lactococcus lactis</i> IDCC 2301	7503	6049	4961	4867	4215	56%
<i>Enterococcus faecium</i> IDCC 2102	8237	7441	7158	6590	5865	71%
<i>Bacillus coagulans</i> IDCC 1201	1839	1728	1694	1505	1454	79%
<i>Bacillus subtilis</i> IDCC 1101	1309	1254	1187	1023	989	76%
<i>Clostridium butyricum</i> IDCC 9207	232	206	197	172	159	69%
관주명	실시예(x10 ⁸ CFU/g)					
	0일	30일	60일	180일	365일	생존율
<i>Lactobacillus plantarum</i> IDCC 3501	5874	5049	4482	4257	3541	62%
<i>Lactobacillus casei</i> IDCC 3451	4406	3901	3584	3320	3015	68%
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	1218	1058	1012	945	832	68%
<i>Lactobacillus reuteri</i> IDCC 3701	4105	3655	3384	3210	2929	73%
<i>Lactobacillus gasseri</i> IDCC 3101	1649	1487	1408	1296	1084	66%
<i>Lactobacillus salivarius</i> IDCC 3551	1845	1620	1538	1509	1421	77%
<i>Lactobacillus johnsonii</i> IDCC 9203	1741	1568	1408	1354	1280	74%
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> IDCC 3201	7436	6357	6012	5619	4261	57%
<i>Lactobacillus helveticus</i> IDCC 3801	3219	2067	1943	1670	1423	64%
<i>Lactobacillus fermentum</i> IDCC 3901	1679	1504	1430	1377	1002	60%
<i>Lactobacillus paracasei</i> IDCC 3401	3623	3287	3147	2819	2117	58%
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> IDCC 3601	1341	1180	1094	967	878	65%
<i>Bifidobacterium lactis</i> IDCC 4301	4681	4489	4247	3921	3245	69%
<i>Bifidobacterium longum</i> IDCC 4101	1783	1602	1537	1240	1129	63%
<i>Bifidobacterium bifidum</i> IDCC 4201	3245	3450	3327	2908	2436	63%
<i>Bifidobacterium breve</i> IDCC 4401	4835	4484	4320	4185	3417	71%
<i>Streptococcus thermophilus</i> IDCC 2201	4324	4142	3902	3497	2761	64%
<i>Lactococcus lactis</i> IDCC 2301	7298	5947	5325	5004	4530	57%
<i>Enterococcus faecium</i> IDCC 2102	8534	8088	7780	7064	6276	74%
<i>Bacillus coagulans</i> IDCC 1201	1463	1376	1332	1305	1284	88%
<i>Bacillus subtilis</i> IDCC 1101	1652	1626	1543	1528	1429	87%
<i>Clostridium butyricum</i> IDCC 9207	289	252	247	246	224	78%

[0095]

[0096] 실험결과 생산성이 뛰어나고 알리지 유발물질을 포함하지 않는 실시예는 비교예와 동등 또는 우수한 안정성을 나타내었다.

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 1

【변경전】

다중 코팅된 유산균의 제조방법에 있어서,

유산균에 수용성 폴리머를 혼합하여 1차 코팅 유산균을 형성하는 단계;

상기 1차 코팅 유산균에 히알루론산을 혼합하여 2차 코팅 유산균을 형성하는 단계;

상기 2차 코팅 유산균에 수용성 당을 혼합하여 3차 코팅 유산균을 형성하는 단계; 및

상기 3차 코팅 유산균에 알리지를 유발하지 않는 단백질 물질을 코팅하여 4차 코팅 유산균을 형성하는 단계를 포함하며,

상기 수용성 폴리머는 구아검(guar gum,GG)을 포함하며,

상기 수용성 당은 트레할로스(Trehaltose)를 포함하며,

상기 단백질 물질은 완두콩을 포함하며,

상기 유산균은 Streptococcus thermophilus IDCC 2201을 포함하는 제조방법.

【변경후】

다중 코팅된 유산균의 제조방법에 있어서,

유산균에 수용성 폴리머를 혼합하여 1차 코팅 유산균을 형성하는 단계;

상기 1차 코팅 유산균에 히알루론산을 혼합하여 2차 코팅 유산균을 형성하는 단계;

상기 2차 코팅 유산균에 수용성 당을 혼합하여 3차 코팅 유산균을 형성하는 단계; 및

상기 3차 코팅 유산균에 알러지를 유발하지 않는 단백질 물질을 코팅하여 4차 코팅 유산균을 형성하는 단계를 포함하며,

상기 수용성 폴리머는 구아검(guar gum,GG)을 포함하며,

상기 수용성 당은 트레할로스(Trehaltose)를 포함하며,

상기 단백질 물질은 완두콩을 포함하며,

상기 유산균은 Streptococcus thermophilus IDCC 2201을 포함하는 제조방법.