



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0104395
 (43) 공개일자 2019년09월09일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *A23L 33/135* (2016.01)
C12N 1/04 (2017.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2013.01)
A23L 33/135 (2016.08)
- (21) 출원번호 10-2019-7023565
- (22) 출원일자(국제) 2018년01월12일
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2019년08월09일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2018/050761
- (87) 국제공개번호 WO 2018/134135
 국제공개일자 2018년07월26일
- (30) 우선권주장
 62/448,066 2017년01월19일 미국(US)
 17159494.8 2017년03월07일
 유럽특허청(EPO)(EP)

- (71) 출원인
 듀폰 뉴트리션 바이오사이언시즈 에이피에스
 덴마크 디케이-1411 코펜하겐 케이 랑게브로가테
 1
- (72) 발명자
 홀라드 크리스토프
 미국 53716 위스콘신주 매디슨 어그리컬처 드라이
 브 3322 다니스코 유에스에이 인코포레이티드 씨
 /오
 바뱅 조프리
 프랑스 75017 파리 튀 브뤼네 20 다니스코 프랑스
 에스에이에스 씨/오
- (74) 대리인
 특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 **부형제를 갖는 건조된 미생물**

(57) 요약

본 발명은 저장 수명 (shelf-life) 이 증가한 건조된 미생물을 제공한다.

(52) CPC특허분류

C12N 1/04 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/3204 (2013.01)

A23Y 2220/03 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

(a) 건조된 미생물, 및 (b) 분말 형태의 포스페이트 염의 배합물을 포함하는 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 포스페이트가 K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , $MgHPO_4$, $Mg[H_2PO_4]_2$, $CaHPO_4$, $Ca[H_2PO_4]_2$ 및 이의 혼합물에서 선택되는 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 포스페이트 염이 K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 및 이의 혼합물에서 선택되는 조성물.

청구항 4

제 1 항, 제 2 항 또는 제 3 항에 있어서, 포스페이트 염이 HPO_4^{2-} 및 $H_2PO_4^-$ 의 염의 혼합물인 조성물.

청구항 5

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서, 포스페이트 염이 pH 6 내지 9 로 pH 조정되는 조성물.

청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서, 포스페이트 염이 pH 6.8-7.2 로 pH 조정되는 조성물.

청구항 7

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 포스페이트 염이 미생물 및 포스페이트 염의 총 중량을 기준으로 적어도 50 중량% 의 양으로 존재하는 조성물.

청구항 8

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서, 포스페이트 염이 미생물 및 포스페이트 염의 총 중량을 기준으로 적어도 60 중량% 의 양으로 존재하는 조성물.

청구항 9

제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 있어서, 포스페이트 염이 미생물 및 포스페이트 염의 총 중량을 기준으로 적어도 80 중량% 의 양으로 존재하는 조성물.

청구항 10

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서, 미생물이 동결건조되는 조성물.

청구항 11

제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서, 미생물이 프로바이오틱 (probiotic) 인 조성물.

청구항 12

제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 있어서, 미생물이 락토바실리 (lactobacilli), 비피도박테리아 (bifidobacteria), 사카로마이세스 (saccharomyces) 및 이의 혼합물에서 선택되는 조성물.

청구항 13

제 1 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항에 있어서, 미생물이 바실러스 코아굴란스 (Bacillus coagulans), 비피도박테리움 롬쿰 하위종 인판티스 (Bifidobacterium longum subsp. infantis), 락토바실러스 애시도필러스

(Lactobacillus acidophilus), 락토바실러스 파라카세이 (Lactobacillus paracasei), 락토바실러스 존소니이 (Lactobacillus johnsonii), 락토바실러스 플란타룸 (Lactobacillus plantarum), 락토바실러스 류테리 (Lactobacillus reuteri), 락토바실러스 류테리 프로텍티스 (Lactobacillus reuteri protectis), 락토바실러스 류테리 프로덴티스 (Lactobacillus reuteri prodentis), 사카로마이세스 보울라르디이 (Saccharomyces boulardii), 락토바실러스 람노시스 (Lactobacillus rhamnosus), 락토바실러스 카세이 (Lactobacillus casei), 락토바실러스 플란타룸 (Lactobacillus plantarum), 락토바실러스 파라카세이 (Lactobacillus paracasei) 및 이의 혼합물에서 선택되는 조성물.

청구항 14

제 1 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항에 있어서, 미생물이 락토바실러스 에시도필러스인 조성물.

청구항 15

제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는 단위 미생물 용량.

청구항 16

제 15 항에 있어서, 조성물을 함유하는 캡슐의 형태인 단위 미생물 용량.

청구항 17

제 15 항에 있어서, 조성물을 함유하는 사체 (sachet) 의 형태인 단위 미생물 용량.

청구항 18

제 15 항에 있어서, 정제 형태인 단위 프로바이오틱 용량.

청구항 19

제 15 항에 있어서, 분말화된 영양 포물라 (powdered nutritional formula) 형태인 단위 프로바이오틱 용량.

청구항 20

하기 단계를 포함하는 제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 따른 조성물의 제조 방법:

- (i) (a) 건조된 미생물, 및 (b) 분말 형태의 포스페이트 염을 제공하는 단계; 및
- (ii) 건조된 미생물, 및 분말 형태의 포스페이트 염을 혼합하여 조성물을 제공하는 단계.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 건조된 미생물의 분야에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 예를 들어 동결- 또는 분무-건조에 의해, 저장을 위해 미생물을 건조시키는 것은 일반적이다. 이러한 건조된 미생물은 산업적 및 식품 용도에서, 예를 들어 치즈 및 요거트의 생산에서, 및 또한 프로바이오틱 (probiotic) 으로서 사용된다. 저장 동안 건조된 유기체의 생존력은 일부 정도로 저하되어, 시간이 흐름에 따라 살아있는 세포 수가 감소한다. 이는 특히 고습도 환경에서 문제점이다.

[0003] 프로바이오틱은 적절한 투약량에서 투여되는 경우 인간 또는 동물 건강에 이로운 살아있는 미생물이다. 프로바이오틱을 투여하는 한 방식은, 부형제와 혼합되고 캡슐 또는 사체 (sachet) 에 패키징된 건조된 프로바이오틱의 섭취를 통한 것이다. 불행하게도, 건조된 프로바이오틱 세포는 저장 동안 매우 안정하지 않아, 살아있는 세포 수가 시간의 흐름에 따라 감소하여, 치료가 덜 효과적이 되게 한다. 이는 특히, 프로바이오틱이 고 습도 함량을 갖는 부형제와 배합되는 경우, 용기 벽이 외부 대기 수분에 투과성인 경우, 그리고 프로바이오틱이 높은 상대 습도 환경에서 저장되는 경우에 해당한다.

발명의 내용

[0004] **발명의 개요**

- [0005] 제 1 양태에서, 본 발명은 (a) 건조된 미생물, 및 (b) 분말 형태의 포스페이트 염의 배합물을 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0006] 제 2 양태에서, 본 발명은 (a) 건조된 미생물, 및 (b) 분말 형태의 포스페이트 염의 혼합물을 포함하는 조성물을 함유하는 단위 미생물 용량을 제공한다.
- [0007] 제 3 양태에서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 조성물의 제조 방법을 제공한다:
- [0008] (i) (a) 건조된 미생물, 및 (b) 분말 형태의 포스페이트 염을 제공하는 단계; 및
- [0009] (ii) 건조된 미생물, 및 분말 형태의 포스페이트 염을 혼합하여 조성물을 제공하는 단계.

도면의 간단한 설명

- [0010] **도 1** 은 본 발명에 따른 부형제 ("K₂HPO₄") 대 종래의 부형제 ("MCC") 또는 무-부형제 ("동결건조된 프로바이오틱") 와 혼합된 상이한 박테리아 균주에 대한 30°C 에서 습한 조건 ($a_w = 0.4$) 에서의 3 개월 저장 후 생존 % 를 나타낸다.
- 도 2** 는 본 발명에 따른 부형제 ("K₂HPO₄") 대 종래의 부형제 ("MCC") 와 혼합된 동결건조된 락토바실러스 애시도필러스 (Lactobacillus acidophilus) 에 대한 a_w ($a_w = 0.1$, $a_w = 0.2$ 및 $a_w = 0.3$) 에 따른 30°C 에서 3 개월 후 생존 % 를 나타낸다.
- 도 3** 은 6 개월 후 30°C 에서 습한 조건 하 ($a_w 0.4$) 배합물 중 K₂HPO₄ 부형제의 퍼센트에 따른 락토바실러스 애시도필러스의 생존 % 를 나타낸다.
- 도 4** 는 6 개월 후 30°C 에서 습한 조건 하 ($a_w 0.4$) MCC 를 갖는 배합물 중 K₂HPO₄ 부형제의 퍼센트에 따른 락토바실러스 애시도필러스의 생존 % 를 나타낸다.
- 도 5** 는 1 개월 후 및 3 개월 후 30°C 에서 건조한 조건 하 ($a_w 0.1$) 동결건조된 락토바실러스 애시도필러스 분말의 생존 % 에 대한 부형제 pH 의 영향을 나타낸다. "KP" 는 pH 가 표시된 pH 로 조정된 K₂HPO₄ 를 나타내고, "K₂HPO₄" 는 pH 조정이 없는 K₂HPO₄ 를 나타내며, "MCC" 는 미세결정질 셀룰로오스를 나타낸다.
- 도 6** 은 3 개월 후 30°C 에서 습한 조건 하 ($a_w 0.4$) 동결건조된 락토바실러스 애시도필러스 분말의 생존 % 에 대한 부형제 pH 의 영향을 나타낸다. "K₂HPO₄" 는 pH 가 표시된 pH 로 조정된 K₂HPO₄ 를 나타내고, "MCC" 는 미세결정질 셀룰로오스를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] **발명의 상세한 설명**

- [0012] 본원에 언급된 모든 문서가 참조로 포함된다.
- [0013] 본 발명자들은 놀랍게도, 부형제로서 포스페이트 염을 사용함으로써 건조된 미생물의 생존이 개선된다는 것을 발견하였다. 효과는 높은 수분 활성 (a_w) 환경에서 특히 주목할만하다. 높은 수분 활성은 $a_w > 0.15$ 인 것으로 고려된다.
- [0014] 전형적으로, 미생물 건조 분말, 특히 프로바이오틱은 미생물 농도가 표준화되도록 부형제와 배합된다. 특히 미생물이 캡슐 및 사체에 혼입되는 경우 가장 많이 사용되는 부형제 중 하나는 미세결정질 셀룰로오스 (MCC) 이다. 발명자들은 MCC 를 참조 부형제로서 사용하였다. 발명자들은 포스페이트 염의 사용이, MCC 부형제에서의 거의 0% 생존과 비교하여, 3 개월에 걸쳐 건조된 미생물의 60% 초과 생존을 제공할 수 있다는 것을 발견하였다. 이러한 효과는 특히 높은 수분 활성 환경 ($a_w > 0.15$, 특히 $a_w > 0.2$, 보다 특히 $a_w > 0.3$) 에서 주목할만하다.

- [0015] 수분 활성은 바람직하게는 노점계 (dew point hygrometer) 에 의해 측정된다.
- [0016] 미생물 생존율은 두 가지 상이한 방식으로 표현된다.
- [0017] A) 생존 퍼센트
- [0018] 생존 % = (저장 후 CFU / CFU t₀) X 100%
- [0019] B) Log 손실
- [0020] Log 손실 = Log (CFU t₀) - Log (저장 후 CFU)
- [0021] **건조된 미생물**
- [0022] 본 발명의 조성물은 건조된 미생물을 함유한다. 미생물, 특히 프로바이오틱은 임의의 수단에 의해 건조될 수 있으나, 동결-건조 및 분무-건조가 바람직하고, 동결-건조가 특히 바람직하다.
- [0023] 미생물이라는 표현은 임의의 박테리아 또는 효모, 또는 이들의 혼합물, 및 특히 프로바이오틱을 포함하는 것을 의미한다.
- [0024] 프로바이오틱이라는 용어는 숙주에게 건강상의 이익을 부여하는 목적으로 숙주에게 투여되는 임의의 살아있는 미생물을 포함한다. 특히, 이는 효모 또는 박테리아, 또는 이들 중 임의의 것의 혼합물일 수 있다.
- [0025] 건조된 미생물, 특히 프로바이오틱은 전달에 적합한 임의의 형태로 제공될 수 있다. 예를 들어, 건조된 미생물, 특히 프로바이오틱은 과립 또는 분말의 형태로 제공될 수 있다. 한 양태에서 미생물, 특히 프로바이오틱은 분말 형태이다.
- [0026] 본 발명의 조성물은 미생물, 특히 프로바이오틱의 한 종, 미생물, 특히 프로바이오틱의 한 균주, 미생물, 특히 프로바이오틱의 종의 혼합물, 또는 미생물, 특히 프로바이오틱의 균주의 혼합물을 함유할 수 있다. 한 양태에서 본 발명의 조성물은 미생물, 특히 프로바이오틱의 한 종, 및 임의로는, 미생물, 특히 프로바이오틱의 한 균주를 함유한다. 한 양태에서 본 발명의 조성물은 미생물, 특히 프로바이오틱의 균주의 혼합물을 함유한다. 한 양태에서 본 발명의 조성물은 미생물, 특히 프로바이오틱의 종의 혼합물을 함유한다.
- [0027] 바람직한 구현예에서, 미생물, 특히 프로바이오틱은 락토바실리 (lactobacilli), 비피도박테리아 (bifidobacteria), 사카로마이세스 (saccharomyces) 및 이의 혼합물에서 선택된다.
- [0028] 더 바람직한 구현예에서, 미생물, 특히 프로바이오틱은 바실러스 코아굴란스 (*Bacillus coagulans*), 비피도박테리움 론굽 하위종 인판티스 (*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*), 락토바실러스 애시도필러스 (*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 파라카세이 (*Lactobacillus paracasei*), 락토바실러스 존소니이 (*Lactobacillus johnsonii*), 락토바실러스 플란타룸 (*Lactobacillus plantarum*), 락토바실러스 류테리 (*Lactobacillus reuteri*), 락토바실러스 류테리 프로텍티스 (*Lactobacillus reuteri protectis*), 락토바실러스 류테리 프로덴티스 (*Lactobacillus reuteri prodentis*), 사카로마이세스 보울라르디이 (*Saccharomyces boulardii*), 락토바실러스 람노서스 (*Lactobacillus rhamnosus*), 락토바실러스 카세이 (*Lactobacillus casei*), 락토바실러스 플란타룸 (*Lactobacillus plantarum*), 락토바실러스 파라카세이 (*Lactobacillus paracasei*) 및 이의 혼합물에서 선택되는 중에서 선택된다.
- [0029] 더 바람직한 구현예에서, 미생물, 특히 프로바이오틱은 락토바실러스 애시도필러스, 락토바실러스 카세이, 비피도박테리움 락티스 (*Bifidobacterium lactis*) 및 이의 혼합물에서 선택되는 중에서 선택된다.
- [0030] 한 양태에서, 미생물, 특히 프로바이오틱은 균주 바실러스 코아굴란스 GBI-30, 6086, 비피도박테리움 론굽 하위종 인판티스 35624, 락토바실러스 애시도필러스 NCFM, 락토바실러스 파라카세이 St11 (또는 NCC2461), 락토바실러스 존소니이 La1 (= 락토바실러스 LC1, 락토바실러스 존소니이 NCC533), 락토바실러스 플란타룸 299v, 락토바실러스 류테리 ATCC 55730 (락토바실러스 류테리 SD2112), 락토바실러스 류테리 프로텍티스 (DSM 17938, ATCC 55730 의 딸 균주), 락토바실러스 류테리 프로덴티스 (조합으로 DSM 17938/ATCC 55730 및 ATCC PTA 5289), 사카로마이세스 보울라르디이, 락토바실러스 람노서스 GR-1, 락토바실러스 류테리 RC-14, 락토바실러스 애시도필러스 CL1285, 락토바실러스 카세이 LBC80R, 락토바실러스 플란타룸 HEAL 9, 락토바실러스 파라카세이 8700:2 및 이의 혼합물의 미생물에서 선택된다.
- [0031] 한 양태에서, 미생물, 특히 프로바이오틱은 균주 락토바실러스 애시도필러스 (NCFM 균주), 락토바실러스 카세이

(LPC37 균주), 비피도박테리움 락티스 (HN0019) 및 이의 혼합물의 프로바이오틱에서 선택된다.

[0032] 미생물, 특히 프로바이오틱은 요구량의 미생물, 특히 프로바이오틱을 전달하기 위한 임의의 적합한 양으로 존재할 수 있다. 조성물의 g 당 미생물의 콜로니 형성 단위 (CFU) 로의 미생물, 특히 프로바이오틱의 '농도' 는 또한 당업계의 숙련자에 의해 선택될 수 있다. 한 양태에서, 미생물, 특히 프로바이오틱은 조성물의 g 당 적어도 1×10^8 CFU 의 양으로 존재한다. 한 양태에서, 미생물, 특히 프로바이오틱은 조성물의 g 당 적어도 1×10^9 CFU 의 양으로 존재한다. 한 양태에서, 미생물, 특히 프로바이오틱은 조성물의 g 당 적어도 1×10^{10} CFU 의 양으로 존재한다. 한 양태에서, 미생물, 특히 프로바이오틱은 조성물의 g 당 1×10^9 내지 5×10^9 CFU 의 양으로 존재한다.

[0033] 단위 프로바이오틱 용량으로서 제형화되는 경우, 용량은 프로바이오틱의 임의의 필요량을 함유한다. 전형적인 단위 용량은 용량 당 10^8 내지 10^{14} CFU, 보다 바람직하게는 용량 당 10^9 내지 10^{12} CFU, 특히 바람직하게는 용량 당 10^9 내지 10^{11} CFU 를 함유할 것이다.

[0034] 미생물, 특히 프로바이오틱은 건조된 형태이고, 바람직하게는 분무-건조 또는 동결건조된 형태, 특히 동결건조된 형태이다. 바람직하게는 건조된 미생물, 특히 프로바이오틱은 0.4 이하, 보다 바람직하게는 0.3 이하, 특히 바람직하게는 0.2 이하의 수분 활성을 갖는다. 보다 특히 바람직하게는, 건조된 미생물, 특히 프로바이오틱은 0.1 이하의 수분 활성을 갖는다.

[0035] **포스페이트 염**

[0036] 본 발명의 조성물은 포스페이트 염을 함유한다. 포스페이트 염은 인산 (H_3PO_4) 의 임의의 염이며, 디히드로젠 포스페이트 ($H_2PO_4^-$), 히드로젠 포스페이트 (HPO_4^{2-}) 및 포스페이트 (PO_4^{3-}) 를 기반으로 하는 염을 포함한다.

바람직한 구현예에서 본 발명의 조성물은 히드로젠 포스페이트 (HPO_4^{2-}), 또는 히드로젠 포스페이트 (HPO_4^{2-}) 및 디히드로젠 포스페이트 ($H_2PO_4^-$) 의 혼합물의 염을 함유한다.

[0037] 수소화 및 무수 포스페이트 염 둘 모두를 사용할 수 있다.

[0038] 포스페이트 염의 양이온은 특별히 제한되지 않는다. 바람직한 구현예에서, 포스페이트 염의 양이온은 소듐, 포타슘, 칼슘 및 마그네슘에서 선택된다. 적합한 포스페이트 염의 예는 K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , $MgHPO_4$, $Mg[H_2PO_4]_2$, $CaHPO_4$, $Ca[H_2PO_4]_2$ 를 포함한다. 특히 바람직한 구현예에서, 포스페이트 염은 포타슘 포스페이트 염이다.

[0039] 바람직하게는 포스페이트 염은 디포타슘 포스페이트 (K_2HPO_4), 또는 디포타슘 포스페이트 (K_2HPO_4) 및 포타슘 디히드로젠 포스페이트 (KH_2PO_4) 의 혼합물이다.

[0040] 바람직한 구현예에서, 포스페이트 염은 pH 6 내지 pH 9, 바람직하게는 pH 6.5 내지 8, 보다 특히 바람직하게는 pH 6.8 내지 7.2 로 pH 조정된다. 표현 "염의 pH" 는, 염이 물에 용해될 때 용액의 pH 를 의미한다. pH 는 디히드로젠 포스페이트, 히드로젠 포스페이트 및 포스페이트의 배합물을 사용하여 조정될 수 있다. 바람직한 구현예에서 HPO_4^{2-} 및 $H_2PO_4^-$ 염의 배합물이 사용된다. 원하는 pH 가 산출되도록 하는 이들 염의 상대량은 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 61.5/38.5 $HPO_4^{2-}/H_2PO_4^-$ 의 몰비는 pH 7 을 제공한다. 대안적으로, pH 조정된 염은 산 또는 염기로 PO_4^{3-} 및/또는 HPO_4^{2-} 의 염의 용액을 원하는 pH 로 적정한 다음, 생성 용액을 예를 들어 분무 건조에 의해 건조시킴으로써 제조될 수 있다.

[0041] 포스페이트 염은 건조된 미생물, 특히 프로바이오틱의 원하는 안정화를 제공하기 위한 임의의 적합한 양으로 본 발명의 조성물에 존재할 수 있다. 본 맥락에서, 중량% 는 미생물, 특히 프로바이오틱 및 포스페이트 염의 총 중량에 대해 제공된다. 한 양태에서, 포스페이트 염은 조성물의 적어도 10 중량% 의 양으로 존재한다. 한 양태에서, 포스페이트 염은 조성물의 적어도 20 중량% 의 양으로 존재한다. 한 양태에서, 포스페이트 염은 조성물의 적어도 30 중량% 의 양으로 존재한다. 한 양태에서, 포스페이트 염은 조성물의 적어도 40 중

량% 의 양으로 존재한다. 한 양태에서, 포스페이트 염은 조성물의 적어도 50 중량% 의 양으로 존재한다. 한 양태에서, 포스페이트 염은 조성물의 적어도 60 중량% 의 양으로 존재한다. 한 양태에서, 포스페이트 염은 조성물의 적어도 70 중량% 의 양으로 존재한다. 한 양태에서, 포스페이트 염은 조성물의 적어도 80 중량% 의 양으로 존재한다.

[0042] 한 양태에서, 포스페이트 염은 조성물의 10 내지 90 중량% 의 양으로 존재한다. 한 양태에서, 포스페이트 염은 조성물의 20 내지 90 중량% 의 양으로 존재한다. 한 양태에서, 포스페이트 염은 조성물의 30 내지 90 중량% 의 양으로 존재한다. 한 양태에서, 포스페이트 염은 조성물의 40 내지 90 중량%, 보다 바람직하게는 50 내지 80 중량% 의 양으로 존재한다. 한 양태에서, 포스페이트 염은 조성물의 50 내지 90 중량% 의 양으로 존재한다. 한 양태에서, 포스페이트 염은 조성물의 60 내지 90 중량% 의 양으로 존재한다. 한 양태에서, 포스페이트 염은 조성물의 70 내지 90 중량% 의 양으로 존재한다. 한 양태에서, 포스페이트 염은 조성물의 80 내지 90 중량% 의 양으로 존재한다. 본 맥락에서, 중량% 는 미생물, 특히 프로바이오틱 및 포스페이트 염의 총 중량에 대해 제공된다.

[0043] 미생물, 특히 프로바이오틱, 및 포스페이트 염 외의 성분이 조성물에 존재하는 경우, 포스페이트 염은 총 조성물의 적어도 10 중량% 의 양으로 존재한다. 한 양태에서, 포스페이트 염은 총 조성물의 적어도 20 중량% 의 양으로 존재한다. 한 양태에서, 포스페이트 염은 총 조성물의 적어도 30 중량% 의 양으로 존재한다. 한 양태에서, 포스페이트 염은 총 조성물의 적어도 40 중량% 의 양으로 존재한다. 한 양태에서, 포스페이트 염은 총 조성물의 적어도 50 중량% 의 양으로 존재한다. 한 양태에서, 포스페이트 염은 총 조성물의 적어도 59%, 또는 60 중량% 의 양으로 존재한다. 한 양태에서, 포스페이트 염은 총 조성물의 적어도 70 중량% 의 양으로 존재한다. 한 양태에서, 포스페이트 염은 총 조성물의 적어도 80 중량% 의 양으로 존재한다.

[0044] 적합한 혼합물은 80 중량% 포스페이트 염 및 20 중량% 미생물, 특히 프로바이오틱이다.

[0045] 포스페이트 염은 바람직하게는 분말 형태이다. 바람직하게는 입자 크기 분포는 5-120 (보다 바람직하게는 5-90) 마이크론의 D10 값, 70-180 (보다 바람직하게는 80-140) 마이크론의 D50 값, 및 160-400 (보다 바람직하게는 180-350) 마이크론의 D90 값을 갖는다.

[0046] 미생물, 특히 프로바이오틱의 생존율은 특히 높은 수분 활성 ($a_w > 0.15$, 바람직하게는 $a_w > 0.2$, 보다 바람직하게는 $a_w > 0.3$) 조건 하에 증가한다.

[0047] 본 발명의 조성물은 바람직하게는 미생물, 특히 프로바이오틱의 생존율, 미생물 단독과 비교하여 적어도 30%, 보다 바람직하게는 적어도 40%, 특히 바람직하게는 60% 초과로 증가시킨다.

[0048] 본 발명의 조성물은 바람직하게는 습한 조건 하 ($a_w > 0.15$, 바람직하게는 > 0.2 , 보다 바람직하게는 > 0.3) 미생물, 특히 프로바이오틱의 생존율, 미생물 단독과 비교하여 적어도 1% 내지 30%, 보다 바람직하게는 적어도 20%, 특히 바람직하게는 30% 초과로 증가시킨다.

[0049] 본 발명의 조성물은 바람직하게는 프로바이오틱의 생존율, 부형제로서 MCC 를 갖는 프로바이오틱과 비교하여 적어도 30%, 보다 바람직하게는 적어도 40%, 특히 바람직하게는 60% 초과로 증가시킨다.

[0050] 본 발명의 조성물은 바람직하게는 습한 조건 하 ($a_w > 0.15$, 바람직하게는 > 0.2 , 보다 바람직하게는 > 0.3) 프로바이오틱의 생존율, 부형제로서 MCC 를 갖는 프로바이오틱과 비교하여 적어도 30%, 보다 바람직하게는 적어도 40%, 특히 바람직하게는 60% 초과로 증가시킨다.

[0051] **추가적인 성분**

[0052] 본 발명의 조성물은 프로바이오틱 및 포스페이트 염만을 함유할 수 있거나, 하나 이상의 추가적인 성분을 함유할 수 있다.

[0053] 한 구현예에서 조성물은 추가적인 부형제 예컨대 말토덱스트린, 미세결정질 셀룰로오스 (MCC), 프리바이오틱스 (prebiotics) 예컨대 이눌린, 프락토올리고당, 갈락토올리고당, 폴리덱스트로오스, 유동 보조제 예컨대 실리카, 마그네슘 스테아레이트를 추가로 포함한다.

[0054] 추가적인 성분이 존재하는 경우, 바람직하게는 이들은 총 조성물의 20 중량% 미만, 보다 바람직하게는 10 중량% 미만을 구성한다.

[0055] **용도**

- [0056] 본 발명의 조성물은 프로바이오틱으로서 인간 또는 동물에게 투여하기 위해 사용될 수 있거나, 산업 또는 식품 적용에 사용될 수 있다. 전형적인 식품 적용은 치즈, 요거트, 발효 콩 제품 (예컨대 미소 (miso), 낫토 등), 사워크라우트 (sauerkraut), 식용 알코올 제품 등의 제조를 포함한다. 전형적인 산업 적용은 산업 알코올 제조와 같은 발효에 의한 원재료 또는 마감재의 제조를 포함한다.
- [0057] **형태**
- [0058] 본 발명의 조성물은 예를 들어, 식품 또는 산업 사용 전에 또는 인간 또는 동물에게 투여하기 전에, 및/또는 적합한 투약 형태로 구분되기 전에, 저장 또는 운반을 위해 벌크 분말 믹스의 형태일 수 있다.
- [0059] 추가 양태에서, 본 발명은 인간 또는 동물에 투여하기 위한 단위 미생물 용량을 제공한다. 단위 미생물 용량은 적합한 양의 본 발명의 조성물을 포함하며, 이는 예를 들어 사쇄, 캡슐 또는 정제로 패키징될 수 있다. 전형적인 단위 용량은 용량 당 10^8 내지 10^{14} CFU, 보다 바람직하게는 용량 당 10^{10} 내지 10^{12} CFU 를 함유할 것이다.
- [0060] **방법**
- [0061] 추가 양태에서, 본 발명은 (i) (a) 건조된 미생물, 및 (b) 분말 형태의 포스페이트 염을 제공하는 단계; (ii) 건조된 미생물, 및 분말 형태의 포스페이트 염을 혼합하여 조성물을 제공하는 단계를 포함하는 본 발명의 조성물의 제조 방법을 제공한다. 방법의 바람직한 구현예에서, 미생물은 동결건조된다.
- [0062] 혼합은 미생물을 손상시키지 않는 임의의 방법에 의해 수행될 수 있다. 예를 들어, 적합한 용기 내에서의 회전 또는 진탕, 및/또는 페들과 같은 혼합 기구로의 혼합이 있다.
- [0063] **실시예**
- [0064] **물질**
- [0065] 하기의 동결건조된 프로바이오틱으로 실험을 수행하였다: 락토바실러스 에시도필러스 (NCFM 균주), 락토바실러스 카세이 (LPC37 균주), 비피도박테리움 락티스 (BBi), 비피도박테리움 락티스 (BBL) 및 비피도박테리움 락티스 (HN0019).
- [0066] 미세결정질 셀룰로오스는 Mingtai Chemical Company 로부터 공급받았고, 디포타슘 포스페이트는 BK Glulhi GmbH Company 에서 입수하였다.
- [0067] 사용한 캡슐은 Vcaps, 크기 0, CS, 하이프로멜로오스였다 (Capsugel cie).
- [0068] 실리카는 Evonik industries AG 에서 입수한 Sipernat 50s 였다.
- [0069] 마그네슘 스테아레이트는 Aceto corporation 에서 입수하였다.
- [0070] 말토덱스트린 (IT6) 은 Roquette 에서 입수하였다.
- [0071] **분석 방법**
- [0072] 수분 활성 측정 (a_w)
- [0073] Aqualab 3TE, Decagon 을 수분 활성 측정에 사용하였다. 샘플 (약 1 g) 을 거울, 광학 센서, 내부 팬 및 적외선 온도 센서를 포함하는 밀봉된 챔버의 헤드스페이스 내에서 평형화시킨다.
- [0074] **세포 계수 방법**
- [0075] 사용한 세포 계수 방법은 균주에 따른 품질 관리 실험실로부터의 방법이다. 결과를 제품 1 g 당 콜로니 형성 단위 (CFU/g) 로 제공하였다.
- [0076] 방법은 하기로 이루어졌다:
- [0077] (i) 1 g 의 샘플을 병 (bottle) 에 칭량하고; 멸균 펩톤수를 100 g 까지 첨가하고 혼합물을 벤치 탑 셰이커를 사용하여 400 rpm 에서 5 분 동안 혼합하였다. 혼합물을 실온에서 20 동안 둔 다음, 다시 5 분 동안 혼합하여 균질한 용액을 수득하였다. 본래 샘플로부터의 10^{-2} 희석을 얻었다.
- [0078] (ii) 후속 희석을 1:10 단계에서 실행하고, 1 ml 의 용액을 9 ml 의 펩톤수에 첨가하여 수행하였다.

용액을, 최대 속도에서 Vortex system 을 사용하여 20 초 동안 각각의 단계에서 균질화하였다.

[0079] (iii) MRS 한천 및 1% 의 시스테인을 사용하여 세포를 플레이팅하였다.

[0080] (iv) 각각의 측정을 위해, 4 개 플레이트를 계수하였다: 2 가지 상이한 부피의 세포 현탁액을 플레이팅하고, 각각의 부피를 이반복으로 하였다. 그런 다음, 플레이트 상에서 수득한 콜로니의 수를 더하고 이들 플레이트에 사용한 세포 현탁액 부피의 총 합계로 나누었다.

[0081] (vi) 플레이트를 37°C 에서 72 시간 동안 인큐베이션하였다.

[0082] **실시예 1**

[0083] **샘플의 제조**

[0084] 다양한 프로바이오틱 종을 MCC 와 배합하여, 1.5×10^{10} 내지 3×10^{10} CFU/g 의 CFU 를 수득하였다. 배합물을 20 분 동안 플라스틱 병에서 회전 (약 60tr/분) 에 의해 혼합하였다. 그런 다음, 캡슐을 배합물로 충전하였다. 샘플의 제조를 40% RH 및 25°C 에서 클린 룸 (clean room) 에서 실시하였다.

[0085] **고습도 노출 시험**

[0086] 말토텍스트린을, 평형에 도달할 때까지 40% RH 에서 대기 중에 노출시켰다. 그 결과, 말토텍스트린의 a_w 는 0.4 에 가까웠다. 동일한 방법을 사용하여, 0.3 및 0.1 의 a_w 에서 평형화된 말토텍스트린을 수득하였다.

[0087] 캡슐을 제조하고 하기로 충전하였다:

- [0088] 1. 프로바이오틱 분말 단독,
- [0089] 2. 프로바이오틱 (20 중량%)-MCC (80 중량%) 배합물, 및
- [0090] 3. 프로바이오틱 (20 중량%)- K_2HPO_4 (80 중량%) 배합물.

[0091] 이들 캡슐을 유리 병에 도입하였다. 대략 0.4 의 a_w 에서의 말토텍스트린을 상부에 첨가하고, 병을 원하는 시간 동안 진탕하였다.

[0092] 캡슐을 6 개월 동안 30°C 에서 환경 챔버에 저장하였다. CFU 및 a_w 를 0 개월, 1 개월 및 3 개월의 시기에 서 측정하여, 안정성 성능에 대한 부형제 유형의 영향을 평가하였다.

[0093] **생존의 계산**

[0094] 프로바이오틱 생존율을 2 가지 상이한 방식으로 표현하였다.

[0095] A) 생존 퍼센트

[0096]
$$\text{생존 \%} = (\text{저장 후 CFU} / \text{CFU } t_0) \times 100\%$$

[0097] B) Log 손실

[0098]
$$\text{Log 손실} = \text{Log} (\text{CFU } t_0) - \text{Log} (\text{저장 후 CFU})$$

[0099] **결과**

[0100] 사용한 부형제에 따른 3 개월 후 습한 조건 (a_w 0.4) 에서 박테리아의 상이한 균주의 생존 퍼센트를 표 1 에 나타낸다. MCC 는 프로바이오틱이 MCC 와 혼합되는 경우를 나타내고, K_2HPO_4 는 프로바이오틱이 K_2HPO_4 와 혼합되는 경우를 나타내며, "동결건조된 프로바이오틱" 은 프로바이오틱 분말 단독을 사용한 경우를 나타낸다.

[0101] 표 1.

표 1. 습한 조건 (a_w 0.4) 에서 및 부형제에 따른 3 개월 저장 후 상이한 박테리아 균주의 생존 퍼센트					
	락토바실러스 애시도필러스	락토바실러스 카세이	비피도박테리움 락티스 (BBI)	비피도박테리움 락티스 (BBL)	비피도박테리움 락티스 (HN019)
MCC	0%	0%	0%	1%	2%
K ₂ HPO ₄	35%	1%	5%	26%	20%
동결건조된 프로바이오틱	0%	0%	0%	0%	0%

[0102]

[0103]

도 1 은 그래프 형태로의 동일한 결과를 보여준다. MCC 는 프로바이오틱이 MCC 와 혼합되는 경우를 나타내고, K₂HPO₄ 는 프로바이오틱이 K₂HPO₄ 와 혼합되는 경우를 나타내며, "동결건조된 프로바이오틱" 은 프로바이오틱 분말 단독을 사용한 경우를 나타낸다.

[0104]

표 1 및 도 1 은 안정성에 대한 K₂HPO₄ 의 영향이 균주에 따라 가변적임을 보여준다. 생존은 MCC 또는 프로바이오틱 단독으로의 경우보다 부형제로서 K₂HPO₄ 를 사용하는 경우에 항상 더 높다. 부형제로서 K₂HPO₄ 의 사용이, 특히 습한 조건에서, 균주의 안정성 (생존) 을 개선시킨다는 것이 명백하다.

[0105]

상이한 습도 조건 하에서의 락토바실러스 애시도필러스 생존

[0106]

a_w 및 부형제에 따른 30°C 에서 3 개월 후 락토바실러스 애시도필러스의 생존 퍼센트를 표 2 에 나타낸다. MCC 는 프로바이오틱이 MCC 와 혼합된 경우를 나타내고, K₂HPO₄ 는 프로바이오틱이 K₂HPO₄ 와 혼합된 경우를 나타낸다.

[0107]

표 2.

표 2. 30°C 및 상이한 a_w 에서 및 부형제에 따른 3 개월 후 락토바실러스 애시도필러스의 생존 퍼센트			
a_w	0.1	0.3	0.4
MCC	78%	6%	0%
K ₂ HPO ₄	66%	39%	60%

[0108]

[0109]

도 2 는 그래프 형태로의 동일한 결과를 보여준다. MCC 는 프로바이오틱이 MCC 와 혼합되는 경우를 나타내고, K₂HPO₄ 는 프로바이오틱이 K₂HPO₄ 와 혼합된 경우를 나타낸다.

[0110]

표 2 및 도 2 는 K₂HPO₄ 로의 생존 퍼센트가 더 높은 습도 조건 ($a_w > 0.1$) 에서 MCC 로의 생존 퍼센트보다 항상 더 높다는 것을 보여준다. 더 낮은 습도 조건 ($a_w = 0.1$) 에서, K₂HPO₄ 및 MCC 로의 안정성은 유사하다.

[0111]

이러한 결과로부터, K₂HPO₄ 의 첨가가 습한 조건에서 균주의 안정성을 개선시킨다는 것이 나타날 수 있다.

[0112]

실시예 2

[0113]

이 실시예는 K₂HPO₄ 농도에 따른 습한 환경에서의 프로바이오틱의 안정성을 검토한다. Sipernat 50s 및 마그네슘 스테아레이트를 유동 보조제로서 첨가하여, 샘플 조성이 시판 배합 조성구와 유사하게 하였다. 이 실시예에 대해, 동결건조된 락토바실러스 애시도필러스 분말을 사용하였다. 실시예를 2 단계로 제조하였다. 파트 1 에서, 프로바이오틱을 오직 K₂HPO₄ 와 혼합하였다. 파트 2 에서, 프로바이오틱을 K₂HPO₄ 및 MCC 와 혼합하였다.

[0114]

샘플의 제조

[0115]

파트 1: K₂HPO₄ 와 혼합된 프로바이오틱

[0116]

동결건조된 락토바실러스 애시도필러스 분말, K₂HPO₄, Sipernat 50s 및 마그네슘 스테아레이트로 이루어지는 배합물을 제조하였다. Sipernat 50s 및 마그네슘 스테아레이트의 농도를 일정하게 유지시키면서, 동결건조된

락토바실러스 एस이도필러스의 농도를 서서히 증가시키고 K₂HPO₄ 의 농도를 서서히 감소시킨, 10 개 샘플을 제조하였다. 하기 표는 파트 1 에 대한 상이한 샘플의 기재를 나타낸다.

표 3.

표 3: 실시예 2, 파트 1 에 대한 상이한 샘플의 기재										
	샘플 1	샘플 2	샘플 3	샘플 4	샘플 5	샘플 6	샘플 7	샘플 8	샘플 9	샘플 10
락토바실러스	5	10	15	20	25	30	35	40	45	49.5
एस이도필러스 (g)	44.5	39.5	34.5	29.5	24.5	19.5	14.5	9.5	4.5	0
K ₂ HPO ₄ (g)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Sipernat 50s (g)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
마그네슘 스테아레이트 (g)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
총 질량 (g)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
세포 수 배합물 (CFU/g)	3.5E10	7E10	1.05E11	1.4E11	1.75E11	2.1E11	2.45E11	2.8E11	3.15E11	3.47E11
K ₂ HPO ₄ % (W/W)	89%	79%	69%	59%	49%	39%	29%	19%	9%	0%

파트 2: K₂HPO₄ 및 MCC 와 혼합된 프로바이오틱

동결건조된 락토바실러스 एस이도필러스 분말, 및 K₂HPO₄, MCC, Sipernat 50s, 및 마그네슘 스테아레이트로 이루어지는 배합물을 제조하였다. 락토바실러스 एस이도필러스 분말, Sipernat 50s 및 마그네슘 스테아레이트의 농도를 일정하게 유지시키면서, K₂HPO₄ 의 농도를 서서히 증가시키고 MCC 의 농도를 서서히 감소시킨, 9 개 샘플을 제조하였다. 하기 표는 파트 2 에 대한 상이한 샘플의 기재를 나타낸다.

[0121]

표 4.

표 4: 실시예 2, 파트 2 에 대한 상이한 샘플의 기재																		
	샘플 11	샘플 12	샘플 13	샘플 14	샘플 15	샘플 16	샘플 17	샘플 18	샘플 19									
락토바실러스 애시도필러스 (g)	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5									
MCC (g)	42	37	32	27	22	17	12	7	0									
K ₂ HPO ₄ (g)	0	5	10	15	20	25	30	35	42									
Sipemat 50s (g)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25									
마그네슘 스테아레이트 (g)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25									
총 질량 (g)	50	50	50	50	50	50	50	50	50									
세포 수 배합물 (CFU/g)	5.25E10	5.25E10	5.25E10	5.25E10	5.25E10	5.25E10	5.25E10	5.25E10	5.25E10									
K ₂ HPO ₄ % (W/W)	0%	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	84%									

[0122]

결과

[0123]

파트 1 의 결과

[0124]

[0125]

30°C 에서 6 개월 후 습한 조건 하 (a_w 0.4) K₂HPO₄ 부형제의 중량% 에 따른 락토바실러스 애시도필러스의 생존 퍼센트를 표 5 에 나타낸다.

[0126] 표 5.

표 5. 30°C 에서 6 개월 후 습한 조건 하에서 (a_w 0.4) K_2HPO_4 부형제의 퍼센트에 따른 락토바실러스 애시도필러스의 생존 퍼센트	
배합물 중 K_2HPO_4 중량%	생존 %
0%	0%
9%	0%
19%	0%
29%	0%
39%	0%
49%	0%
59%	2%
69%	9%
79%	17%
89%	12%

[0127]

[0128] 도 3 은 그래프 형태의 동일한 결과를 보여준다.

[0129] 표 5 및 도 3 은 생존이 K_2HPO_4 의 양에 따라 가변적임을 보여준다. 결과는 50 중량% 초과 K_2HPO_4 로, 생존이 유의하게 증가한다는 것을 보여준다. 80 중량% 초과 K_2HPO_4 로 생존은, 80 중량% 에서보다 적지만, K_2HPO_4 부재인 경우보다 여전히 유의하게 더 양호하다.

[0130] **파트 2 의 결과**

[0131] 6 개월 후 30°C 에서 습한 조건 하 (a_w 0.4) MCC 를 갖는 배합물 중 K_2HPO_4 부형제의 퍼센트에 따른 락토바실러스 애시도필러스의 생존 퍼센트를 표 6 에 나타낸다.

[0132] 표 6.

표 6. 6 개월 후 30°C 에서 습한 조건 하 (a_w 0.4) MCC 를 갖는 배합물 중 K_2HPO_4 부형제의 퍼센트에 따른 락토바실러스 애시도필러스의 생존 퍼센트	
배합물 중 K_2HPO_4 %	생존 %
0%	0.0%
0%	0.0%
10%	0.0%
20%	0.0%
30%	0.0%
40%	0.2%
50%	0.8%
60%	3.2%
70%	15.3%
84%	20.4%

[0133]

[0134] 도 4 는 그래프 형태의 동일한 결과를 보여준다.

[0135] 표 6 및 도 4 는 생존이 K_2HPO_4 퍼센트에 따라 가변적이며 40 중량% 초과 K_2HPO_4 의 경우가 K_2HPO_4 부재의 경우보다 유의하게 더 양호하다는 것을 보여준다.

[0136] **실시예 3**

[0137] 락토바실러스 애시도필러스, 비피도박테리움 락티스, 락토바실러스 카세이에 대한 K_2HPO_4 부형제의 pH 의 영향을 평가하였다.

[0138] 다양한 pH 값을 갖는 K₂HPO₄ 를 포함하는 상이한 부형제를 제조하였다 (pH 6.5; pH 6.9; pH 7.1; pH 7.6; pH 8.1 및 pH 9). 상이한 pH 에서의 부형제를 하기 2 가지 방법 중 어느 하나에 의해 제조하였다:

[0139] 1. K₂HPO₄ 의 용액을 제조하고 인산을 첨가하여 용액의 pH 를 원하는 값으로 만든 다음, 용액을 분무 건조시켜 분말을 수득함; 또는

[0140] 2. K₂HPO₄ 를 건조 형태로 다양한 KH₂PO₄ 의 계산량과 배합하여 원하는 pH 를 제공함.

[0141] **샘플의 제조**

[0142] **파트 1: 건조한 조건 하에서의 생존에 대한 부형제 pH 의 영향:**

[0143] 동결건조된 락토바실러스 에시도필러스 분말을 다양한 pH 에서의 상이한 부형제와 배합하였다. 각각의 배합물의 조성은 80% 의 부형제 K₂HPO₄ 분말 및 20% 의 동결건조된 프로바이오틱 분말이었다. 배합물을 20 분 동안 플라스틱 병에서 회전 (약 60tr/분) 에 의해 혼합하였다. 사체를 배합물로 충전하였다. 샘플의 제조를 40% RH 및 25°C 에서 클린 룸에서 실시하였다. 시험 동안 사체를 3 개월 동안 건조한 습도 ($a_w \leq 0.1$) 에서 30°C 에서 저장하였다.

[0144] **파트 2: 습한 조건 하에서의 생존에 대한 부형제 pH 의 영향:**

[0145] 동결건조된 락토바실러스 에시도필러스 분말을 상이한 pH 에서의 상이한 K₂HPO₄ 분말, 및 MCC 와 배합하였다. 각각의 배합물의 조성은 80% 의 부형제 및 20% 의 동결건조 프로바이오틱 분말이었다. 배합물을 20 분 동안 플라스틱 병에서 회전 (약 60tr/분) 에 의해 혼합하였다. 샘플의 제조를 40% RH 및 25°C 에서 클린 룸에서 실시하였다. 캡슐을 배합물로 충전하고, 캡슐을 유리 병에 도입하였다. 그런 다음, 대략 0.4 의 a_w 에서의 말토덱스트린을 상부에 첨가하고, 병을 진탕하였다. 병을 3 개월 동안 30°C 에서 저장하였다.

[0146] 80% 의 건조 MCC 및 20% 의 동결건조된 프로바이오틱 분말로의 대조군을 제조하고, 동일한 방식으로 시험하였다.

[0147] **결과**

[0148] **파트 1 의 결과**

[0149] 1 및 3 개월 동안 30°C 에서 건조한 조건 하 ($a_w \leq 0.1$) 저장 후 K₂HPO₄ 부형제의 pH 에 따른 동결건조된 락토바실러스 에시도필러스의 생존을 표 7 에 나타낸다.

[0150] 표 7.

표 7. 1 및 3 개월 동안 30°C 에서 건조한 조건 하 ($a_w \leq 0.1$) 저장 후 K ₂ HPO ₄ 부형제의 pH 에 따른 동결건조된 락토바실러스 에시도필러스의 생존		
부형제	1 개월 후 생존 %	3 개월 후 생존 %
K ₂ HPO ₄ pH 6.5	63%	59%
K ₂ HPO ₄ pH 6.9	87%	88%
K ₂ HPO ₄ pH 7.1	73%	63%
K ₂ HPO ₄ pH 7.6	68%	49%
K ₂ HPO ₄ pH 8.1	71%	68%
K ₂ HPO ₄ (pH 미조정)	58%	59%
MCC	50%	12%

[0151]

[0152] 도 5 는 그래프 형태의 동일한 결과를 보여준다.

[0153] 표 7 및 도 5 는 건조한 조건 하 생존/안정성이 pH 에 따라 가변적이지만, 단독 부형제로서 MCC 를 사용한 경우의 생존보다 모든 경우에 더 양호하다는 것을 보여준다. 안정성은 부형제의 pH 에 의해 영향받았다. 건

조건 하의 안정성에 대해, K_2HPO_4 의 최적 pH 는 6.9 내지 7.1 이다. 평가한 다른 종에는 비피도박테리움 락티스 및 락토바실러스 카세이가 포함되었다.

[0154] **파트 2 의 결과**

[0155] 3 개월 동안 30°C 에서 습한 조건 하 ($a_w = 0.4$) 저장 후 K_2HPO_4 부형제의 pH 에 따른 동결건조된 락토바실러스 애시도필러스의 생존을 표 8 에 나타낸다.

[0156] 표 8.

표 8. 3 개월 동안 30°C 에서 습한 조건 하 ($a_w = 0.4$) 저장 후 K_2HPO_4 부형제의 pH 에 따른 동결건조된 락토바실러스 애시도필러스의 생존	
부형제	생존 %
K_2HPO_4 pH 6.5	37%
K_2HPO_4 pH 6.9	50%
K_2HPO_4 pH 7.1	13%
K_2HPO_4 pH 7.6	14%
K_2HPO_4 pH 8.1	26%
K_2HPO_4 pH 9	41%
MCC	1%

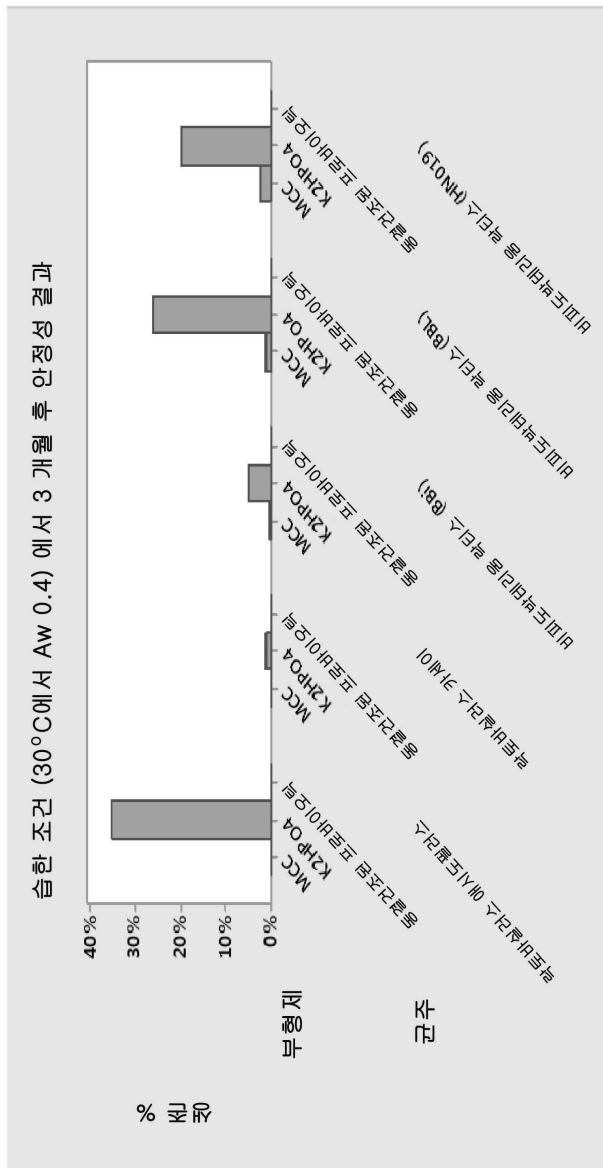
[0157]

[0158] 도 6 은 그래프 형태로의 동일한 결과를 보여준다.

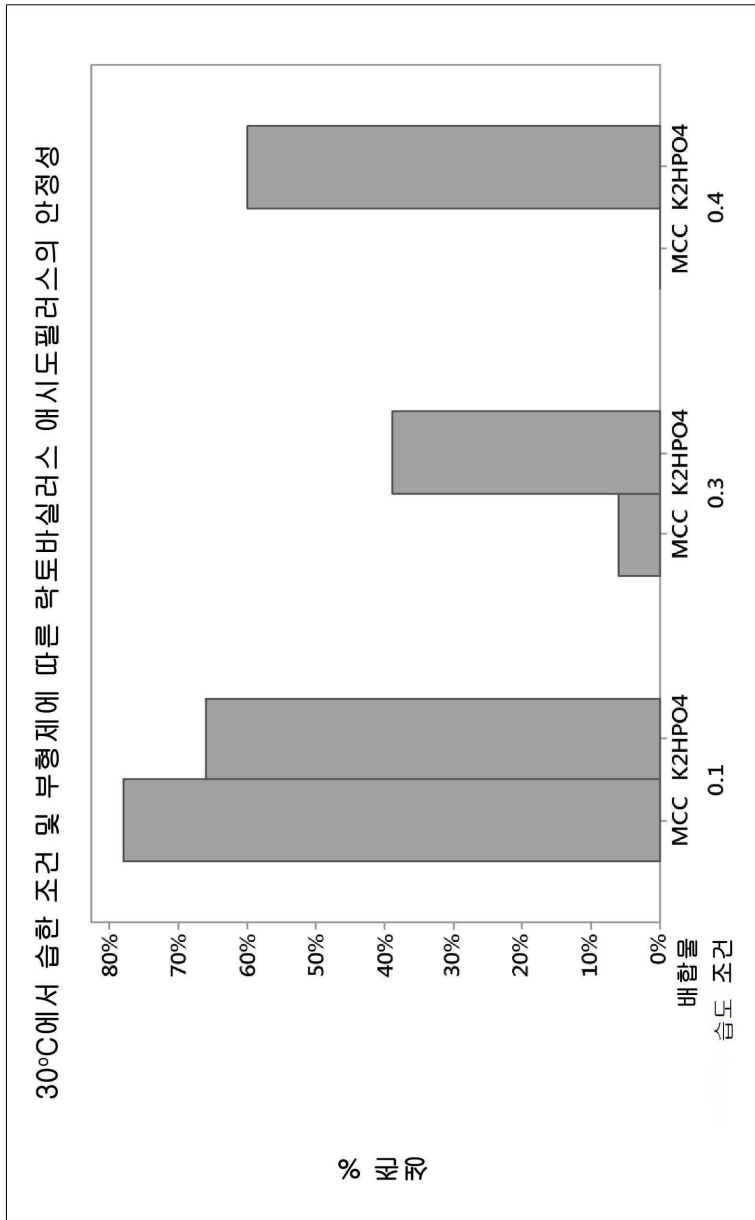
[0159] 표 8 및 도 6 은 안정성이 pH 값에 따라 가변적임을 보여준다. pH 가 조정된 모든 부형제는 습한 조건 하 MCC 분말의 경우보다 더 양호한 안정성을 갖는다. 습한 조건 하 최상의 안정성을 수득하기 위해서, 최적 pH 는 6.9 이다.

도면

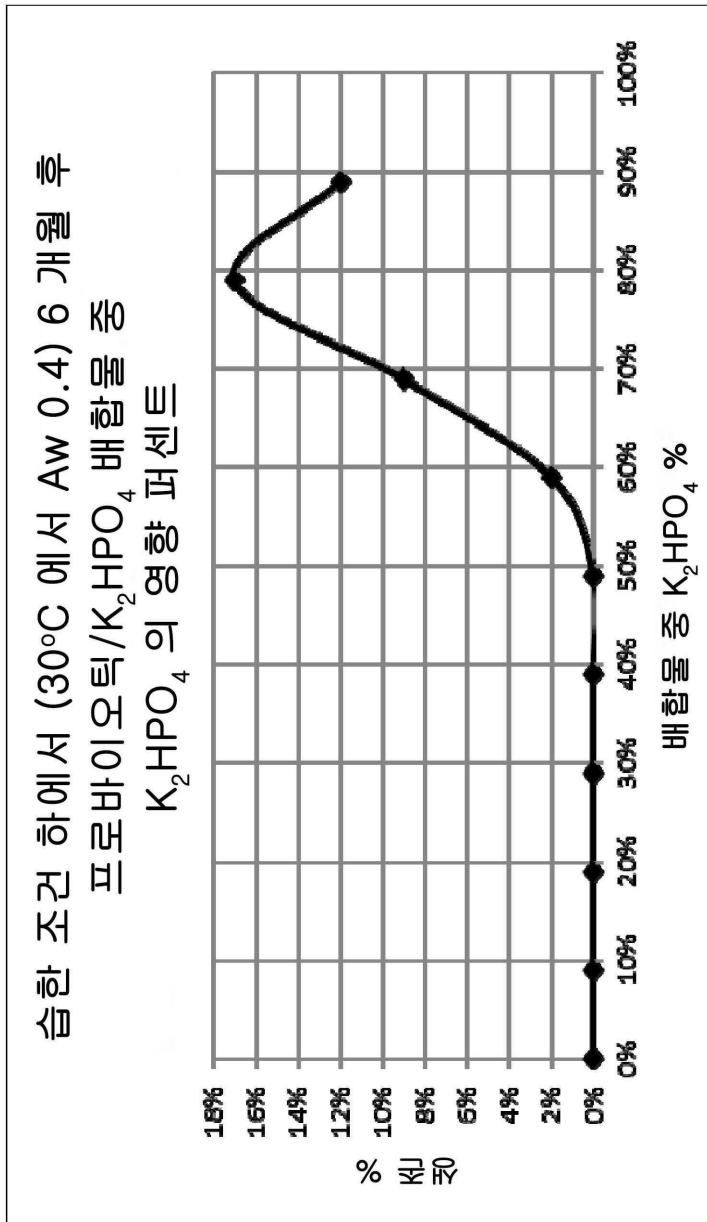
도면1



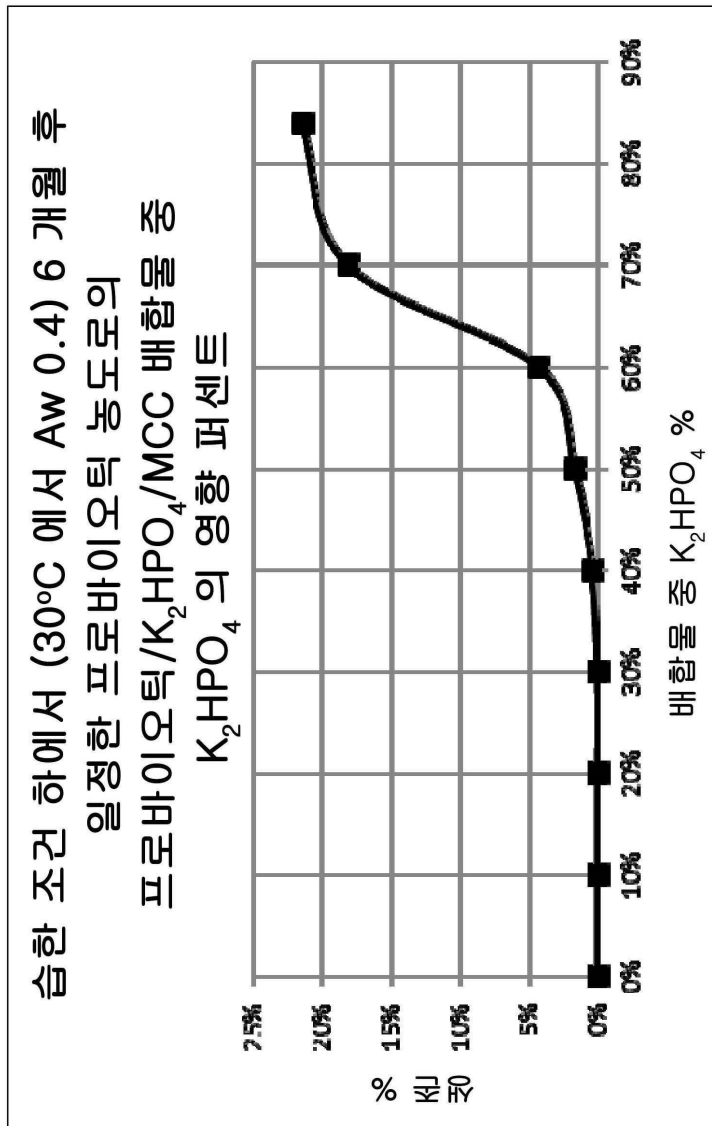
도면2



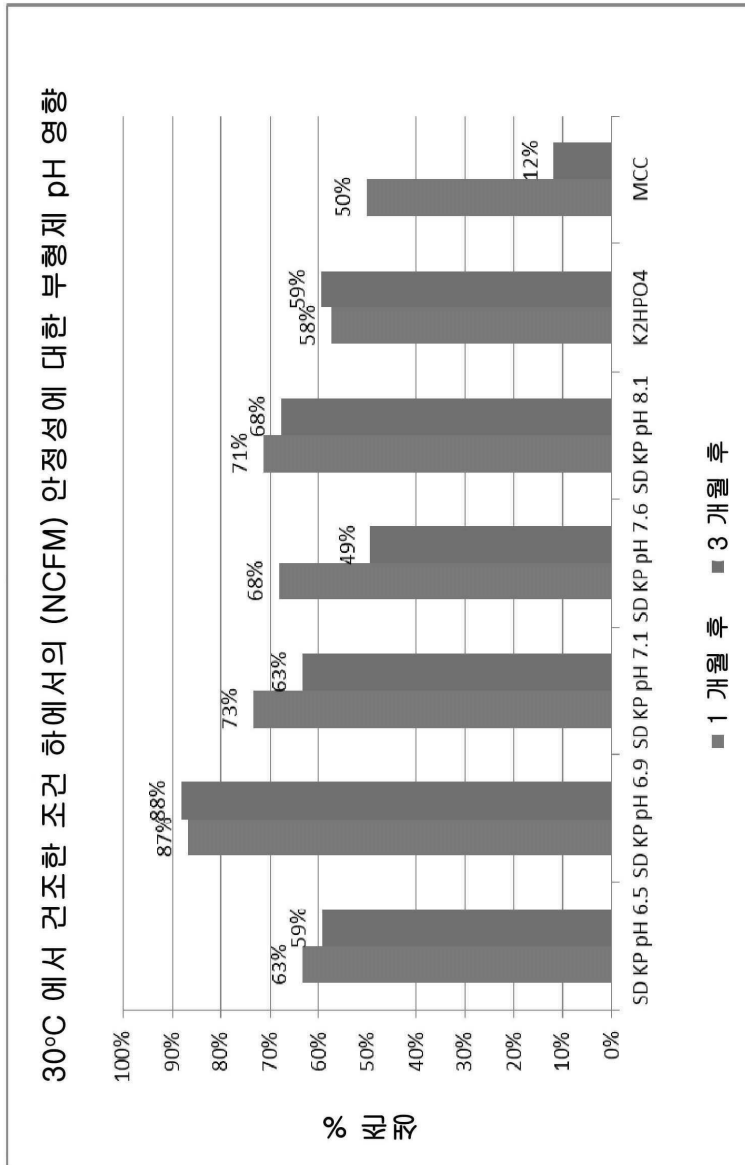
도면3



도면4



도면5



도면6

3 개월 후 30°C 에서 습한 조건 하에서의 (Aw 0.4)
 동결건조 락토바실러스 애시도필러스 분말 안정성에 대한 부형제 pH 영향

