



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년08월18일

(11) 등록번호 10-2567744

(24) 등록일자 2023년08월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) C08K 11/00 (2006.01)
C08K 5/1545 (2006.01) C08L 3/02 (2006.01)
C08L 5/02 (2006.01) C08L 5/04 (2006.01)
C12N 1/04 (2017.01) C12N 11/10 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2021.05)
C08K 11/00 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-7022939

(22) 출원일자(국제) 2016년02월11일

심사청구일자 2021년02월09일

(85) 번역문제출일자 2017년08월17일

(65) 공개번호 10-2017-0110631

(43) 공개일자 2017년10월11일

(86) 국제출원번호 PCT/CA2016/050129

(87) 국제공개번호 WO 2016/127260

국제공개일자 2016년08월18일

(30) 우선권주장

62/114,829 2015년02월11일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

W02007079147 A2

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 13 항

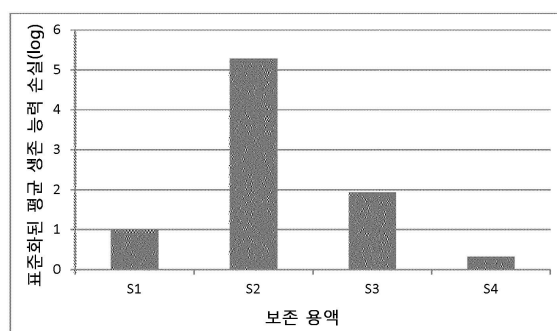
심사관 : 최성호

(54) 발명의 명칭 생존 가능한 대장균을 삽입하기 위한 향상된 건조 기질, 이의 제조 방법 및 용도

(57) 요약

기질에 삽입된 생존 가능한 대장균(*E. coli*)이 제공되며, 상기 기질은 수분 활성(a_w) ≤ 0.3 을 가지며, 상기 기질은 하이드로콜로이드 형성 다당류인 제 1 다당류, 제 1 다당류와 상이한 제 2 다당류, 및 수크로오스, 트레할로오스 또는 이의 조합을 포함하는 이당류를 포함한다. 또한 이의 제조 방법 및 용도가 제공된다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

C08K 5/1545 (2013.01)

C08L 3/02 (2013.01)

C08L 5/02 (2013.01)

C08L 5/04 (2013.01)

C12N 1/04 (2013.01)

C12N 11/10 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

W02013142792 A1

W02011094469 A2

Biocatalysis and
Biotransformation.,27:348-359(2009.)

KR1020150012449 A

KR1020150012445 A

명세서

청구범위

청구항 1

생존 가능한 대장균(*Escherichia. coli*, *E. coli*)을 위한 저장 조성물을 제조하기 위한 방법으로서,
상기 방법은

- a) 가교된 알지네이트에 삽입된 대장균을 포함하는 입자, 및 말토덱스트린 또는 텍스트란을 포함하며 수크로오스 또는 트레할로스를 추가로 포함하는 보존 용액을 형성하는 단계 및
- b) 수분 활성 ≤ 0.3 을 얻기 위해 입자를 건조하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,
상기 건조하는 단계는 공기 건조를 포함하는 것인 방법.

청구항 3

제 2 항에 있어서,
상기 건조하는 단계는 상기 입자를 공기 건조기에 건조하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서,
상기 건조하는 단계는 상기 입자를 데시케이터에 건조하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서,
상기 건조하는 단계는 공기 건조기에서 1차 건조 및 데시케이터에서 2차 건조를 포함하는 것인 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서,
단계 a)에서, 입자는 대장균의 초기 CFU를 포함하고,
단계 b) 이후에, 0.30 이하의 CFU 로그 손실이 있는 것인 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서,
상기 입자는 10 미만의 수크로오스 또는 트레할로스/말토덱스트린 또는 텍스트란의 비율을 포함하며, 여기서 비율은 중량%/중량%인 방법.

청구항 8

제 7 항에 있어서,
비율은 5 미만인 방법.

청구항 9

제 7 항에 있어서,
비율은 1인 방법.

청구항 10

제 1 항에 있어서,
상기 입자는 L-글루탐산의 염을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 11

제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서,
대장균은 비병원성 대장균인 방법.

청구항 12

제 11 항에 있어서,
대장균은 2005년 1월 21일에 수탁 번호 IDAC 210105-01로 캐나다의 국제 기탁 기관(IDAC, International Depository Authority of Canada)에 기탁된 비병원성 대장균 균주인 방법.

청구항 13

제 12 항에 있어서,
단계 a)에서, 입자는 대장균 배양 매질을 더 포함하는 것인 방법.

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 일반적으로 생존 가능한 대장균을 삽입하기 위한 향상된 건조 기질(matrices), 이의 제조 방법 및 용도의 분야에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 박테리아 포자는 건조하고 탈수된 상태로 무기한 존재할 수 있는 휴면 생물 형태이다. 사람의 경우, 세균성 포자는 설사와 같은 약한 위장병 치료를 위한 처방전 없이 구입할 수 있는 예방약이나 건강식품 또는 영양 보조제로 사용할 수 있다. 농업 산업에서 박테리아 포자는 성장 촉진제와 같은 항생제의 잠재적 대안으로 주목받고 있다(Hong et al., *FEMS Microbiology Reviews*, 2005, 29:813-835). 대장균(*E. coli*)은 포자 형성이 아니며, 이로써 포자 형성 박테리아보다 건조 및/또는 탈수 조건에 저항력이 낮다. 그럼에도 불구하고, 많은 응용분야에서, 주어진 목적을 위한 충분한 생존력 및/또는 충분한 박테리아 생체 활성을 제공하는 형태로 대장균 박테리아를 보존하고 저장하는 것이 필요하다.

[0003] 이와 관련하여, 박테리아에 대한 다양한 실질적 보존 및 저장 조건이 이전에 제안되었다.

- [0004] 동결 건조(lyophilisation이라 부름)는 건조 중 온도가 낮기 때문에 박테리아의 보존 및 저장에 종종 사용된다(Rhodes, *Exploitation of microorganisms* ed. Jones, DG, 1993, p. 411-439, London: Chapman & Hall). 그러나, 시간과 에너지 집약적인 것뿐만 아니라 생존력을 현저히 감소시키는 바람직하지 않은 특성을 가지고 있다. 보호제가 제안되었지만, 동결 건조 동안 주어진 첨가제에 의해 제공되는 보호는 미생물의 종류에 따라 다양하다(Font de Valdez et al., *Cryobiology*, 1983, 20: 560-566).
- [0005] 건조와 같은 공기 건조는 또한 박테리아의 보존 및 저장을 위해 사용되어왔다. 진공 건조는 동결 건조와 유사한 공정이지만, 0° - 40℃에서 30분 내지 수시간 동안 행해진다. 이 공정의 장점은 제품이 동결되지 않아 에너지 소비 및 관련 경제적 영향이 감소한다는 것이다. 제품의 관점에서, 동결 손상이 방지된다. 그러나, 저온 또는 주변 온도에서의 건조는 느리고, 오염을 피하기 위해 추가 예방 조치가 필요하며, 종종 불충분한 생존 능력을 가져온다(Lievense et al., *Adv Biochem Eng Biotechnol.*, 1994, 51:71-89).
- [0006] 칼슘-알지네이트(Ca-alginate) 비드와 같은 하이드로콜로이드 형성 다당류 기질 내에 박테리아를 캡슐화하는 것은 또한 다양한 용도의 광범위하고 증가하는 범위에서 박테리아의 보존 및 저장에 사용되어왔다(Islam et al., *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, 20:1367-1377). 박테리아를 대사적 및 생리학적으로 알맞은 상태로 유지하여 원하는 이점을 얻기 위해서, 이런 기질에 적합한 방부제를 첨가하는 것이 제안되어왔다. 방부제 제제는 전형적으로 적합한 담체 내에 활성제 및 저장, 수송 동안과 표적 구역에서 미생물 세포의 안정화 및 보호를 돕는 첨가제를 함유한다.
- [0007] 만니톨은 동결 건조 동안 Ca-알지네이트 캡슐화 박테리아에 대한 알맞은 방부제 성분으로서 기술되었는데 이는 실온하에서 10주까지의 높은 박테리아 생존 능력 및 0.2 미만의 수분 활성(a_w)을 제공하기 때문이다(Efuiwewwere et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1999, 51:100-104). 트레할로오스 및 당 알코올의 상승작용 혼합물은 공기-건조된 Ca-알지네이트 캡슐화 박테리아에 대한 효과적인 방부제 성분으로 기술되어 있는데, 트레할로오스의 유리 전이 온도가 수크로오스보다 상당히 높기 때문에, 즉 각각 110℃ vs 65℃, 트레할로오스가 수크로오스 대신에 사용된다(US 8,097,245). 카르복실산 염 및 가수분해된 단백질의 상승작용 혼합물은 또한 동결 건조된 칼슘-알지네이트 캡슐화 박테리아에 알맞은 방부제 성분으로 기술되었다(U.S. 2013/0,296,165). 두 경우 모두, 상승작용 혼합물은 효과적인 건조를 용이하게 하기 위해 진공하에 발포 또는 비등시킬 필요 없이 강화된 유리질 구조를 제공한다.
- [0008] 그러나 새로운 제제의 개발은 어려운 과제이며 모든 제제가 정해진 박테리아에 효과적이지는 않다(Youg et al., *Biotechnol Bioeng.*, 2006 Sep 5; 95(1):76-83).

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 상기의 관점에서, 대장균 박테리아에 대한 개선된 보존 및 저장 조건을 제공할 필요가 있다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명은 넓게는 기질에 삽입된 생존 가능한 대장균(*E. coli*)에 관한 것이며, 상기 기질은 ≤ 0.3 의 수분 활성(a_w)을 가지며, 상기 기질은 하이드로콜로이드 형성 다당류인 제 1 다당류, 제 1 다당류와 상이한 제 2 다당류, 및 수크로오스, 트레할로오스 또는 이의 조합을 포함하는 이당류를 포함한다.
- [0011] 본 발명은 또한 넓게는 기질을 형성하기 위한 조성물에 관한 것이며, 상기 조성물은 하이드로콜로이드 형성 다당류인 제 1 다당류, 제 1 다당류와 상이한 제 2 다당류 및 수크로오스, 트레할로오스 또는 이의 조합을 포함하는 이당류 및 대장균(*E. coli*)을 포함한다.
- [0012] 본 발명은 또한 넓게는 생존 가능한 대장균(*E. coli*)을 포함하는 미립자를 제공하는 방법에 관한 것이다.
- [0013] 본 발명은 또한 넓게는 생존 가능한 대장균(*E. coli*)을 포함하는 기질에 관한 것이며, 상기 기질은 ≤ 0.3 의 수분 활성(a_w)을 가지며, 상기 기질은 하이드로콜로이드 형성 다당류인 제 1 다당류, 제 1 다당류와 상이한 제 2 다당류, 및 수크로오스, 트레할로오스 또는 이의 조합을 포함하는 이당류를 포함한다.
- [0014] 본 명세서에서 설명되고 상호 배타적이지 않은 실시태양의 모든 특징은 서로 결합될 수 있다. 한 실시태양의 구성요소는 추가 설명 없이 다른 실시태양에서 이용될 수 있다. 본 발명의 다른 양태 및 특징은 첨부 도면과 함께

특정 실시태양에 대한 다음 설명을 검토하면 당업자에게 명백해질 것이다.

발명의 효과

[0015] 본 발명의 내용 중에 포함되어 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 특정 실시태양의 상세한 설명은 첨부된 도면을 참조하여 하기에 제공된다.

도 1은 본 발명의 한 실시태양에 따른 박테리아 배양액을 제조하기 위한 비 제한적인 흐름도를 도시한다.

도 2는 본 발명의 한 실시태양에 따라 삽입된 대장균을 갖는 비드를 건조하기 위한 비 제한적인 흐름도를 도시한다.

도 3은 본 발명의 한 실시태양에 따른 공기 건조 후의 박테리아 생존 능력에 대한 보존 용액 S1, S2, S3 및 S4의 효과를 나타내는 비 제한적인 막대 그래프를 도시한다.

도 4는 본 발명의 한 실시태양에 따른 공기 건조 후의 박테리아 생존 능력에 대한 보존 용액 S1, S5, S6 및 S7의 효과를 나타내는 비 제한적인 막대 그래프를 도시한다.

도 5는 본 발명의 한 실시태양에 따른 공기 건조 후의 박테리아 생존 능력에 대한 보존 용액 S1, S0, S8 및 S9의 효과를 나타내는 비 제한적인 막대 그래프를 도시한다.

도 6은 본 발명의 한 실시태양에 따른 공기 건조 후의 박테리아 생존 능력에 대한 보존 용액 S1, S10, S11 및 S12의 효과를 나타내는 비 제한적인 막대 그래프를 도시한다.

도 7은 본 발명의 한 실시태양에 따른 공기 건조 후의 박테리아 생존 능력에 대한 보존 용액 S1, S13, S14 및 S15의 효과를 나타내는 비 제한적인 막대 그래프를 도시한다.

도 8은 본 발명의 한 실시태양에 따른 공기 건조 후의 박테리아 생존 능력에 대한 보존 용액 S1, S16, S17 및 S18의 효과를 나타내는 비 제한적인 막대 그래프를 도시한다.

도 9는 본 발명의 한 실시태양에 따른 공기 건조 후의 박테리아 생존 능력에 대한 보존 용액 S1 및 S19의 효과를 나타내는 비 제한적인 막대 그래프를 도시한다.

도 10은 도 3 내지 9에 관한 미가공 데이터를 도시한다.

도면에서, 실시태양은 예로서 도시된다. 상세한 설명 및 도면은 단지 특정 실시태양을 설명하기 위한 것이며 이해를 돕는 것이다. 청구범위는 본 발명에 기재된 실시태양에 의해 제한되어서는 안 되며, 상세한 설명 전체와 일치하는 가장 넓은 해석으로 주어져야 한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 본 발명의 원리가 실행될 수 있는 방식을 설명하기 위해 특정 실시예를 설명할 것이다.

[0018] 본 발명에 기술된 대장균 박테리아는 생존 가능한 박테리아인데, 즉, 건조한 기질에 삽입된 박테리아는 비활성 상태인 것으로 간주될 수 있는 반면에, 이들 박테리아는 기질을 수분에 노출시킬 때 활성 상태로 회복될 수 있다.

[0019] 본 발명에 기술된 대장균 박테리아는 임의의 재조합 또는 야생형 대장균 균주 또는 이들의 임의의 혼합물을 포함한다. 한 실시태양에서, 대장균은 비병원성 균주이다. 한 실시태양에서, 비병원성 대장균 균주는 2005년 1월 21일에 수탁 번호 IDAC 210105-01로 캐나다의 국제 기탁 기관(IDAC)에 기탁된 균주 또는 2013년 6월 20일에 수탁 번호 200613-01로 캐나다의 국제 기탁 기관(IDAC)에 기탁된 균주 또는 이의 조합이다.

[0020] 본 발명에 기술된 기질은 하이드로콜로이드 형성 다당류를 포함한다. 몇몇 다당류가 본 발명에 기재된 바와 같이 단독으로 또는 이들의 임의의 조합으로 사용하기에 적합하다.

[0021] 고 아밀로오스 전분은 전분 과립을 끓는 물에 가수분해하고, 고 전단 혼합기를 사용하여 과립을 분산시키고 용액을 약 0-10℃로 냉각시킨 후 견고한 겔을 형성할 수 있는 다당류이다. 겔의 견고성 및 강도는 용액 중 전분 농도에 따라 달라지며, 10% w/v까지의 최대 작업 농도를 가진다. 얇게 썬 전분 겔 기질은 또한 방부 혼합물에 살아있는 박테리아를 보유할 수 있으며, 장 또는 위액에 의해 대부분 소화되지 않기 때문에 박테리아는 전분 기

질 내에서 위 파괴로부터 보호된다. 제어 방출 메커니즘은 고 아밀로오스 전분이 장내 미생물에 의해 쉽게 소화되며 이때 전달된 살아있는 박테리아는 손상되지 않은 형태로 방출된다는 사실에 의해 제공된다.

[0022] 펙틴은 고 아밀로오스 전분과 매우 유사한 또 다른 적합한 다당류이다. 펙틴은 펙틴 겔 기질의 강도가 당 폴리머들의 카복실기 사이에 다리를 형성하는 Ca^{2+} 와 같은 2가 양이온의 첨가에 의해 추가로 증가될 수 있기 때문에 추가적인 이점이 있다.

[0023] 알지네이트는 2가 양이온과 가교 결합하여 견고한 겔 기질을 형성할 수 있는 다른 적합한 다당류이다. 알지네이트는 알지네이트 다당류를 2가 양이온, 예를 들어, Ca^{2+} 와 내부적으로 가교 결합시킴으로써, 예를 들어, 알지네이트를 얇은 실, 끈 또는 실질적으로 구형의 구슬 형태로 Ca^{2+} 바스에 압출시킴으로써 단단한 겔 기질로 경화시킬 수 있다. 알지네이트는 Ca^{2+} 와 상호 작용시 경화된다. 기질의 다른 제조 방법은 혼합물을 Ca^{2+} 를 함유하는 바스에 분무 원자화하는 것이다.

[0024] 한 실시태양에서, 하이드로콜로이드 형성 다당류는 0.1% 내지 20%의 값으로 전체 건조 물질의 중량%로 기질에 존재한다. 한 실시태양에서, 하이드로콜로이드 형성 다당류는 이 안의 임의의 값을 포함하여, 0.1% 내지 19%, 또는 0.1% 내지 18%, 또는 0.1% 내지 17%, 0.1% 내지 16%, 또는 0.1% 내지 15%, 또는 0.1% 내지 14%, 또는 0.1% 내지 13%, 또는 0.1% 내지 12%, 또는 1% 내지 12%의 값으로 전체 건조 물질의 중량%로 기질에 존재한다.

[0025] 본 발명에 기술된 기질은 이당류 및 다당류를 추가로 포함한다. 본 발명은 기질에 포함시키기에 적합한 여러 농도 및 비율을 개시한다. 한 실시태양에서, 중량%/중량%로 이당류/다당류의 적절한 비율은 10 미만 또는 더욱 바람직하게는 5 미만이다. 한 실시태양에서, 중량%/중량%로 이당류/다당류의 비율은 약 1이다.

[0026] 한 실시태양에서, 이당류는 이 안의 임의의 값을 포함하여, 0.1% 내지 90%, 또는 0.1% 내지 75%, 또는 0.1% 내지 50%, 또는 0.1% 내지 35%, 또는 0.1% 내지 20%, 또는 0.1% 내지 15%, 또는 0.1% 내지 10%의 값으로 전체 건조 물질의 중량%로 기질에 존재한다.

[0027] 한 비 제한적인 실시태양에서, 이당류는 수크로오스를 포함한다.

[0028] 추가의 비 제한적인 실시태양에서, 이당류는 트레할로오스를 포함한다.

[0029] 한 비 제한적인 실시태양에서, 다당류는 말토덱스트린을 포함한다.

[0030] 추가의 비 제한적인 실시태양에서, 다당류는 텍스트란을 포함한다.

[0031] 추가의 비 제한적인 실시태양에서, 텍스트란은 20 내지 70 kDa의 분자량을 갖는다.

[0032] 한 실시태양에서, 기질은 L-글루탐산의 염을 추가로 포함한다. 한 비 제한적인 실시태양에서, 염은 L-글루탐산의 나트륨 염이다.

[0033] 본 발명에 기술된 기질은 $0.04 \leq a_w \leq 0.3$, 예를 들어 $0.04 \leq a_w \leq 2.5$, $0.04 \leq a_w \leq 2.0$, $0.04 \leq a_w \leq 1.5$ 등의 수분 활성("a_w")을 갖는다. 본 발명의 내용에서 "수분 활성" 또는 "a_w"은 물의 가용성을 지칭하고 한 시스템 내의 물의 에너지 상태를 나타낸다. 수분 활성은 예를 들어, Aqualab Water Activity Meter 4TE(Decagon Devices, Inc., U.S.A.)를 사용하여 당업계에 공지된 재료 및 절차에 따라 측정될 수 있다.

[0034] 기질을 형성하기 위한 조성물이 또한 제공되며, 상기 조성물은 하이드로콜로이드 형성 다당류인 제 1 다당류, 제 1 다당류와 상이한 제 2 다당류 및 수크로오스, 트레할로오스 또는 이의 조합을 포함하는 이당류 및 대장균(*E. coli*)을 포함한다.

[0035] 생존 가능한 대장균(*E. coli*)을 포함하는 미립자를 제공하는 방법이 또한 제공되며, 상기 방법은 하이드로콜로이드 형성 다당류인 제 1 다당류, 제 1 다당류와 상이한 제 2 다당류 및 수크로오스, 트레할로오스 또는 이의 조합을 포함하는 이당류 및 대장균(*E. coli*)을 포함하는 입자를 제공하는 단계 및 상기 입자를 수분 활성(a_w) ≤ 0.3으로 건조시키는 단계를 포함한다.

[0036] 한 비 제한적인 실시태양에서, 생존 가능한 대장균은 입자에서 적어도 0.4, 또는 적어도 0.5, 또는 적어도 0.6, 또는 적어도 0.7의 a_w 배수 감소를 유지한다.

[0037] 실시예

[0038] 다음의 각각의 실시예에서, 3개의 보존 용액을 보존 용액 S1과 함께 테스트하였다. 테스트는 3회 수행하였고, 1회 표준 편차는 하기 식에 따라 계산하였다:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n}}$$

[0040] n: 샘플의 수 및 $\bar{x}$: 샘플 개체군의 평균

[0041] 하기 실시예의 각각에서, 세균 생존 능력은 당 업계에 공지된 프로토콜에 따라 콜로니 형성 단위(CFU)의 수를 측정함으로써 평가하였다.

[0042] 하기 실시예에서 사용된 보존 용액을 표 1에 나타내었다.

표 1

보존 용액	다당류	이당류	L-글루탐산의 염	다당류 / 이당류 / 유기산의 염 비율
S0	¹ x	x	x	N/A ²
S1	텍스트란 40	수크로오스	예	5:7:1
S2	텍스트란 40 (5중량%)	x	x	N/A
S3	x	수크로오스 (7중량%)	x	N/A
S4	텍스트란 40	트레할로오스	예	5:7:1
S5	텍스트란 20	수크로오스	예	5:7:1
S6	텍스트란 70	수크로오스	예	5:7:1
S7	말토텍스트린	수크로오스	예	5:7:1
S8	텍스트란 40	수크로오스	예	10:1:1
S9	텍스트란 40	수크로오스	예	1:10:1
S10	텍스트란 40 (다른 제조사)	수크로오스	예	5:7:1
S11	x	수크로오스	예	7:1
S12	텍스트란 70	트레할로오스	예	5:7:1
S13	텍스트란 40	수크로오스	x	5:7
S14	텍스트란 40	수크로오스	예	5:3:1
S15	텍스트란 40	수크로오스	예	5:5:1
S16	말토텍스트린	트레할로오스	예	5:7:1
S17	말토텍스트린	트레할로오스	예	10:1:1
S18	말토텍스트린	트레할로오스	예	1:10:1
S19	텍스트란 40	말토오스	예	5:7:1

[0044] ¹x는 부존재를 의미한다

[0045] ²N/A는 적용할 수 없음을 의미한다

[0046] 1. 실시예 1

[0047] a. 대장균 배양액

[0048] 도 1을 참조하여, 대장균 균주를 비 동물성 트립틱 소이 아가(Tryptic Soy Agar) 상에서 제 1 단계(100)에서 배양하였다. 그런 후에 6개의 분리된 콜로니를 사용하여 제 2 단계(200)에서 37℃에서 2시간 동안 대장균을 배양하고 30mL의 비 동물성 트립틱 소이 브로스(TSB)(1L의 TSB의 경우: 20g 소이 펩톤(Soy Peptone) A3 SC-(Organotechnie), 2.5g 무수 텍스트로스 USP(J.T. Baker), 5g 염화나트륨 USP - (J.T. Baker) 및 2.5g 이염기성 인산 칼륨 USP - (Fisher Chemical))에서 200rpm으로 교반하였다. 생성된 배양액 1을 TSB에서 10배 희석하고 사용하여 제 3 단계(300)에서 대장균 균주를 37℃에서 2시간 동안 배양하고 100mL의 비 동물성 TSB에서

200rpm으로 교반하였다. 생성된 배양액 2를 TSB에서 10배 희석하고 사용하여 제 4 단계(400)에서 대장균 균주를 37℃에서 5시간 동안 배양하고 1L의 비 동물성 TSB에서 200rpm으로 교반하였다. 생성된 배양물 3을 사용하여 대장균을 기질에 삽입시켰다. 본 발명에 기술된 배양 프로토콜에 대한 변형 및 개선이 가능하고, 본 교시에 비추어 당업자에게 명백해질 것이다. 예를 들어, 비병원성 대장균은 또한 당업계에 공지된 프로토콜(Son & Taylor, Curr. Protoc. Microbiol., 2012, 27: 5A.4.1 - 5A.4.9)에 따라 혐기성 조건에서 배양될 수 있다. 후속 실시예의 비드를 제조함에 있어서, 2005년 1월 21일에 캐나다 국제 기탁국(IDAC)에 등록 번호 IDAC 210105-01로 기탁된 비병원성 대장균 균주가 선택될 수 있다.

[0049] b. 기질 제조

[0050] Bacto™ 펩톤(1.5 g, BD, Mississauga, Canada)을 1.5 L의 가열된 물과 혼합하여 혼합물을 수득하였다. 알지네이트(30g Grindsted®, DuPont™ Danisco®, Mississauga, Canada)를 자석 막대로 360rpm으로 혼합하면서 천천히 혼합물에 첨가 하였다. 알지네이트의 완전한 가용화는 3시간 후에 이루어져, 2% 알지네이트(m / v) 용액을 얻었다. 그런 후에, 자기 막대를 포함하는 용액을 표준 조건하에서 가압 멸균하였다. 본 발명에 기술된 기질 제조 프로토콜에 대한 변형 및 개선이 가능하고 본 교시의 관점에서 당업자에게 명백해질 것이다.

[0051] c. 기질에 대장균 삽입

[0052] 다음을 자기 막대로 혼합하면서 가압 멸균된 기질 용액에 순서대로 첨가하여 슬러리를 얻었다: 1L의 비 동물성 TSB 및 도 1을 참조하면, 1L의 비 동물성 TSB 속 0.5L의 생성된 대장균의 배양액 3. 슬러리를 중합 바스(물속 300 mM CaCl₂, 0.1 wt./v. % Bacto™ tryptone, 0.1 wt./v. % Bacto™ peptone 및 0.05 wt./v. % g Bacto™ 효모 추출액)를 사용하여 Thermo Scientific™ Reacti-Vap™ 증발기로부터 적합하게 된 9개 출구 주사기 시스템을 사용하여 비드를 형성하였다. 슬러리를 주입하면서 바스를 부드럽게 교반하였다. 기질 비드를 약 30분 동안 가교 결합시킨 다음, 생성된 경화 비드를 수거하였다. 기술된 삽입 프로토콜에 대한 변형 및 개선이 가능하고 본 교시의 관점에서 당업자에게 명백해질 것이다.

[0053] d. 삽입된 대장균의 건조 및 테스트

[0054] 각 보존 용액에 대해 건조 및 테스트를 적어도 세 번 수행하였다. 도 2를 참조하여, 제 1 단계(500)에서 기질에 삽입된 대장균을 갖는 비드를 약 20분 동안 약하게 교반하면서 보존 용액 S1, 보존 용액 S2, 보존 용액 S3 또는 보존 용액 S4에 놓았다. 각각의 경우, 총 CFU의 측정(550)은 보존 용액에 담근 후 수행하였다. 제 2 단계(600)에서, 비드를 실온에서 공기 건조기의 트레이 건조기 상에 약 24시간 동안 놓아 반건조 비드를 얻었다. 각각의 경우에, 수분 활성 a_w의 측정(650)을 아쿠아랩(Aqualab) 수분 활성 측정기 4TE(Decagon Devices, Inc., U.S.A.)를 사용하여 반건조 비드에 대해 수행하였다. 제 3 단계(700)에서, 반건조 비드를 약 64시간 동안 데시케이터에 놓았고 여기서 건조 및 여과된 공기를 불어 넣었다. 본 발명의 한 실시태양에 따르면, 건조 공정(800)은 적어도 두 단계를 포함한다: 공기 건조기에 실온에서 24시간 동안 비드를 배치하고 반건조 비드를 얻는 것을 포함하는 단계(600) 및 반건조 비드를 64시간 동안 데시케이터에 놓고 건조된 비드를 얻는 것을 포함하는 단계(700). 각각의 경우에 총 CFU의 측정(750) 및 물 a_w의 측정(760)을 건조 비드에 대해 수행하였다. ≤0.3의 수분 활성 a_w를 갖는 건조 비드를 수득하였다.

[0055] 각각의 경우 및 도 2를 참조하여, a_w 배수 감소는 다음에 따라 계산하였다:

[0056]
$$a_w \text{ 배수 감소} = \frac{650 - 760}{650}$$

[0057] 각각의 경우 및 도 2를 참조하여, 생존 능력 손실을 다음에 따라 계산하였다:

[0058]
$$CFU \text{ 손실} = \log_{10}(550) - \log_{10}(750)$$

[0059] 각각의 경우에, 보존 용액 S1으로 얻은 결과에 대한 평균 생존 능력 손실 및 표준화된 평균 생존 능력 손실을 계산하였다.

[0060] 결과를 도 3에 나타내었다. 보존 용액 S4는 0.142 ± 0.004의 수분 활성을 유지하면서 0.32의 표준화된 평균 생존 능력 손실을 나타내었다.

[0061] 실시예 1의 결과를 편집하여 표 2 및 표 3에 나타내었다. 이러한 결과는 보존 용액 S4의 원소가 건조된 기질에 삽입된 대장균의 생존 능력 및 건조 공정(700)에 대한 이의 저항성에 상당한 영향을 미친다는 것을 입증한다.

표 2

[0062]

샘플	단계 550	단계 750		
	평균 CFU	평균 CFU	평균 CFU 손실 (log ₁₀)	표준화된 CFU손실(log ₁₀)
S1	$3 \times 10^{11} \pm 9 \times 10^{10}$	$1.4 \times 10^{11} \pm 4.3 \times 10^9$	0.32 ± 0.14	1
S2	$2.3 \times 10^{11} \pm 5.5 \times 10^{10}$	$5.4 \times 10^9 \pm 2.7 \times 10^9$	1.66 ± 0.3	5.18
S3	$2.6 \times 10^{11} \pm 4.9 \times 10^{10}$	$7.4 \times 10^{10} \pm 4.3 \times 10^{10}$	0.61 ± 0.32	1.90
S4	$3.1 \times 10^{11} \pm 7 \times 10^{10}$	$2.5 \times 10^{11} \pm 9.7 \times 10^{10}$	0.11 ± 0.08	0.34

표 3

[0063]

샘플	단계 650	단계 760	
	평균 a _w	평균 a _w	a _w 배수 감소
S1	0.473 ± 0.020	0.165 ± 0.010	0.65
S2	0.278 ± 0.021	0.054 ± 0.009	0.81
S3	0.423 ± 0.022	0.150 ± 0.026	0.64
S4	0.488 ± 0.022	0.142 ± 0.004	0.71

[0064] e. 건조된 삽입된 대장균을 사료에 포함시키기("펠릿화(pelleting)")

[0065] 건조된 기질을 사료에, 예를 들어 사료 첨가제의 형태로 포함시키는 프로토콜은 당업계에 공지되어있다. 이러한 실시예의 예시는, 예를 들어, 500g 내지 1000g의 건조된 기질 비드를 1톤의 사료에 포함시킴으로써 수행될 수 있다. 원한다면, 사료는 또한 적절한 양의 불활성화된 효모 제품을 포함할 수 있다. 예를 들어, 삽입된 대장균을 포함하는 건조된 기질 비드를 균질화 탱크에서 다른 모든 성분과 혼합한다. 바람직하게는, 혼합물은 펠릿화 공정 동안 연속적으로 혼합된다. 그런 후에 혼합된 재료를 압출기 쪽으로 펌핑한다. 그런 후에 압출기로 들어갈 예정인 혼합 재료상에 증기를 가한다(즉, 혼합물의 온도는 이 단계에서 증가한다). 그런 후에 압출기 내부를 통과하는 동안 혼합물에 적절한 압력을 가한다(압력과 온도는 최고 온도에 도달하는 지점, 약 75℃를 증가시킨다). 그런 후에 성형된 펠릿을 압출기에서 냉각 탱크로 배출한다(급속 온도가 30-40℃로 떨어지고 다시 냉각되어 주위 온도에 도달한다). 사료 첨가제(삽입된 대장균을 포함하는 기질)를 포함하는 펠릿 피드는, 예를 들어 백 / 용기에 저장될 수 있다. 본 발명에 기술된 펠릿화 프로토콜에 대한 변형 및 개선이 가능하며 본 교시에 비추어 당업자에게 명백해질 것이다.

[0066] 2. 실시예 2

[0067] 각 보존 용액에 대해 건조 및 테스트를 적어도 세 번 수행하였다. 도 2를 참조하여, 제 1 단계(500)에서 실시예 1에서 제조된 비드를 약 20분 동안 약하게 교반하면서 보존 용액 S1, 보존 용액 S5, 보존 용액 S6 또는 보존 용액 S7에 놓았다. 각각의 경우, 총 CFU의 측정(550)은 보존 용액에 담근 후 수행하였다. 제 2 단계(600)에서, 비드를 실온에서 공기 건조기의 트레이 건조기 상에 약 24시간 동안 놓아 반건조 비드를 얻었다. 각각의 경우에, 수분 활성 a_w의 측정(650)을 아쿠아랩(Aqualab) 수분 활성 측정기 4TE(Decagon Devices, Inc., U.S.A.)를 사용하여 반건조 비드에 대해 수행하였다. 제 3 단계(700)에서, 반건조 비드를 약 64시간 동안 데시케이터에 놓았고 여기서 건조 및 여과된 공기를 불어 넣었다. 본 발명의 한 실시태양에 따르면, 건조 공정(800)은 적어도 두 단계를 포함한다: 공기 건조기에 실온에서 24시간 동안 비드를 배치하고 반건조 비드를 얻는 것을 포함하는 단계(600) 및 반건조 비드를 64시간 동안 데시케이터에 놓고 건조된 비드를 얻는 것을 포함하는 단계(700). 각각의 경우에 총 CFU의 측정(750) 및 물 a_w의 측정(760)을 건조 비드에 대해 수행하였다. ≤0.3의 수분 활성 a_w를 갖는 건조 비드를 수득하였다.

[0068] 각각의 경우 및 도 2를 참조하여, a_w 배수 감소는 다음에 따라 계산하였다:

[0069]
$$a_w \text{ 배수 감소} = \frac{650 - 760}{650}$$

[0070] 각각의 경우 및 도 2를 참조하여, 생존 능력 손실을 다음에 따라 계산하였다:

[0071]
$$CFU \text{ 손실} = \log_{10}(550) - \log_{10}(750)$$

[0072] 각각의 경우에, 보존 용액 S1으로 얻은 결과에 대한 평균 생존 능력 손실 및 표준화된 평균 생존 능력 손실을 계산하였다.

[0073] 결과를 도 4에 나타내었다. 보존 용액 S7은 0.298 ± 0.013 의 수분 활성을 유지하면서 0.38의 표준화된 평균 생존 능력 손실을 나타내었다.

[0074] 실시예 2의 결과를 편집하여 표 4 및 표 5에 나타내었다. 이러한 결과는 보존 용액 S7의 원소가 건조된 기질에 삽입된 대장균의 생존 능력 및 건조 공정(700)에 대한 이의 저항성에 상당한 영향을 미친다는 것을 입증한다.

표 4

[0075]

샘플	단계 550	단계 750		
	평균 CFU	평균 CFU	평균 CFU 손실 ($\log_{10}$)	표준화된 CFU손실($\log_{10}$)
S1	$3.3 \times 10^{11} \pm 9.2 \times 10^{10}$	$1.8 \times 10^{11} \pm 2.7 \times 10^{10}$	0.26 ± 0.07	1
S5	$3.5 \times 10^{11} \pm 7.7 \times 10^{10}$	$2.6 \times 10^{11} \pm 6 \times 10^{10}$	0.13 ± 0.17	0.5
S6	$3.1 \times 10^{11} \pm 5.8 \times 10^{10}$	$2.8 \times 10^{11} \pm 1.7 \times 10^{11}$	0.10 ± 0.29	0.38
S7	$3.4 \times 10^{11} \pm 3.7 \times 10^{10}$	$2.7 \times 10^{11} \pm 1 \times 10^{10}$	0.10 ± 0.06	0.38

표 5

[0076]

샘플	단계 650	단계 760	
	평균 a_w	평균 a_w	a_w 배수 감소
S1	0.535 ± 0.020	0.230 ± 0.012	0.57
S5	0.530 ± 0.049	0.249 ± 0.009	0.53
S6	0.586 ± 0.143	0.260 ± 0.013	0.56
S7	0.541 ± 0.045	0.298 ± 0.013	0.45

[0077] 3. 실시예 3

[0078] 각 보존 용액에 대해 건조 및 테스트를 적어도 세 번 수행하였다. 도 2를 참조하여, 제 1 단계(500)에서 실시예 1에서 제조된 비드를 약 20분 동안 약하게 교반하면서 보존 용액 S1, 보존 용액 S0, 보존 용액 S8 또는 보존 용액 S9에 놓았다. 각각의 경우, 총 CFU의 측정(550)은 보존 용액에 담근 후 수행하였다. 제 2 단계(600)에서, 비드를 실온에서 공기 건조기의 트레이 건조기 상에 약 24시간 동안 놓아 반건조 비드를 얻었다. 각각의 경우에, 수분 활성 a_w 의 측정(650)을 아쿠아랩(Aqualab) 수분 활성 측정기 4TE(Decagon Devices, Inc., U.S.A.)를 사용하여 반건조 비드에 대해 수행하였다. 제 3 단계(700)에서, 반건조 비드를 약 64시간 동안 데시케이터에 놓았고 여기서 건조 및 여과된 공기를 불어 넣었다. 본 발명의 한 실시태양에 따르면, 건조 공정(800)은 적어도 두 단계를 포함한다: 공기 건조기에 실온에서 24시간 동안 비드를 배치하고 반건조 비드를 얻는 것을 포함하는 단계(600) 및 반건조 비드를 64시간 동안 데시케이터에 놓고 건조된 비드를 얻는 것을 포함하는 단계(700). 각각의 경우에 총 CFU의 측정(750) 및 물 a_w 의 측정(760)을 건조 비드에 대해 수행하였다. ≤ 0.3 의 수분 활성 a_w 를 갖는 건조 비드를 수득하였다.

[0079] 각각의 경우 및 도 2를 참조하여, a_w 배수 감소는 다음에 따라 계산하였다:

[0080]
$$a_w \text{ 배수 감소} = \frac{650 - 760}{650}$$

[0081] 각각의 경우 및 도 2를 참조하여, 생존 능력 손실을 다음에 따라 계산하였다:

[0082]
$$CFU \text{ 손실} = \log_{10}(550) - \log_{10}(750)$$

[0083] 각각의 경우에, 보존 용액 S1으로 얻은 결과에 대한 평균 생존 능력 손실 및 표준화된 평균 생존 능력 손실을 계산하였다.

[0084] 결과를 도 5에 나타내었다.

[0085] 실시예 3의 결과를 편집하여 표 6 및 표 7에 나타내었다.

표 6

[0086]

샘플	단계 550	단계 750		
	평균 CFU	평균 CFU	평균 CFU 손실 (log ₁₀)	표준화된 CFU손실(log ₁₀)
S1	2.2x10 ¹¹ ± 2.9x10 ¹⁰	1.7x10 ¹¹ ± 9.3x10 ⁹	0.11 ± 0.05	1
S0	1.9x10 ¹¹ ± 2x10 ¹⁰	1.5x10 ⁶ ± 1.5x10 ⁶	5.28 ± 0.53	47.7
S8	2.8x10 ¹¹ ± 4.6x10 ¹⁰	5.9x10 ¹⁰ ± 2.3x10 ¹⁰	0.70 ± 0.15	6.28
S9	2.4x10 ¹¹ ± 5.4x10 ¹⁰	1.5x10 ¹¹ ± 1.5x10 ¹⁰	0.18 ± 0.04	1.64

표 7

[0087]

샘플	단계 650	단계 760	
	평균 a _w	평균 a _w	a _w 배수 감소
S1	0.453 ± 0.010	0.241 ± 0.005	0.47
S0	0.331 ± 0.022	0.037 ± 0.002	0.89
S8	0.366 ± 0.010	0.062 ± 0.006	0.83
S9	0.451 ± 0.010	0.275 ± 0.032	0.39

[0088] 4. 실시예 4

[0089] 각 보존 용액에 대해 건조 및 테스트를 적어도 세 번 수행하였다. 도 2를 참조하여, 제 1 단계(500)에서 실시예 1에서 제조된 비드를 약 20분 동안 약하게 교반하면서 보존 용액 S1, 보존 용액 S10, 보존 용액 S11 또는 보존 용액 S12에 놓았다. 각각의 경우, 총 CFU의 측정(550)은 보존 용액에 담근 후 수행하였다. 제 2 단계(600)에서, 비드를 실온에서 공기 건조기의 트레이 건조기 상에 약 24시간 동안 놓아 반건조 비드를 얻었다. 각각의 경우에, 수분 활성 a_w의 측정(650)을 아쿠아랩(Aqualab) 수분 활성 측정기 4TE(Decagon Devices, Inc., U.S.A.)를 사용하여 반건조 비드에 대해 수행하였다. 제 3 단계(700)에서, 반건조 비드를 약 64시간 동안 데시케이터에 놓았고 여기서 건조 및 여과된 공기를 불어 넣었다. 본 발명의 한 실시태양에 따르면, 건조 공정(800)은 적어도 두 단계를 포함한다: 공기 건조기에 실온에서 24시간 동안 비드를 배치하고 반건조 비드를 얻는 것을 포함하는 단계(600) 및 반건조 비드를 64시간 동안 데시케이터에 놓고 건조된 비드를 얻는 것을 포함하는 단계(700). 각각의 경우에 총 CFU의 측정(750) 및 물 a_w의 측정(760)을 건조 비드에 대해 수행하였다. ≤0.3의 수분 활성 a_w를 갖는 건조 비드를 획득하였다.

[0090] 각각의 경우 및 도 2를 참조하여, a_w 배수 감소는 다음에 따라 계산하였다:

[0091]
$$a_w \text{ 배수 감소} = \frac{650 - 760}{650}$$

[0092] 각각의 경우 및 도 2를 참조하여, 생존 능력 손실을 다음에 따라 계산하였다:

[0093] $CFU \text{ 손실} = \log_{10}(550) - \log_{10}(750)$

[0094] 각각의 경우에, 보존 용액 S1으로 얻은 결과에 대한 평균 생존 능력 손실 및 표준화된 평균 생존 능력 손실을 계산하였다.

[0095] 결과를 도 6에 나타내었다. 보존 용액 S7은 0.58의 표준화된 평균 생존 능력 손실을 나타내었다.

[0096] 실시예 4의 결과를 편집하여 표 8 및 표 9에 나타내었다.

표 8

[0097]

샘플	단계 550	단계 750		
	평균 CFU	평균 CFU	평균 CFU 손실 ($\log_{10}$)	표준화된 CFU손실($\log_{10}$)
S1	$3.7 \times 10^{11} \pm 5.2 \times 10^{10}$	$2.8 \times 10^{11} \pm 4.46 \times 10^{10}$	0.12 ± 0.01	1
S10	$4 \times 10^{11} \pm 1 \times 10^{11}$	$3.3 \times 10^{11} \pm 3.11 \times 10^{10}$	0.07 ± 0.12	0.58
S11	$3.3 \times 10^{11} \pm 3.9 \times 10^{10}$	$1.9 \times 10^{11} \pm 1.77 \times 10^{10}$	0.24 ± 0.03	1.91
S12	$4 \times 10^{11} \pm 2.9 \times 10^{10}$	$5.3 \times 10^{11} \pm 9.27 \times 10^{10}$	-0.12 ± 0.08	-0.94

표 9

[0098]

샘플	단계 650	단계 760	
	평균 a_w	평균 a_w	a_w 배수 감소
S1	0.475 ± 0.023	0.123 ± 0.007	0.74
S10	0.490 ± 0.026	0.135 ± 0.007	0.72
S11	0.419 ± 0.016	0.201 ± 0.038	0.52
S12	0.494 ± 0.026	0.165 ± 0.006	0.66

[0099] 5. 실시예 5

[0100] 각 보존 용액에 대해 건조 및 테스트를 적어도 세 번 수행하였다. 도 2를 참조하여, 제 1 단계(500)에서 실시예 1에서 제조된 비드를 약 20분 동안 약하게 교반하면서 보존 용액 S1, 보존 용액 S13, 보존 용액 S14 또는 보존 용액 S15에 놓았다. 각각의 경우, 총 CFU의 측정(550)은 보존 용액에 담근 후 수행하였다. 제 2 단계(600)에서, 비드를 실온에서 공기 건조기의 트레이 건조기 상에 약 24시간 동안 놓아 반건조 비드를 얻었다. 각각의 경우에, 수분 활성 a_w 의 측정(650)을 아쿠아랩(Aqualab) 수분 활성 측정기 4TE(Decagon Devices, Inc., U.S.A.)를 사용하여 반건조 비드에 대해 수행하였다. 제 3 단계(700)에서, 반건조 비드를 약 64시간 동안 데시케이터에 놓았고 여기서 건조 및 여과된 공기를 불어 넣었다. 본 발명의 한 실시태양에 따르면, 건조 공정(800)은 적어도 두 단계를 포함한다: 공기 건조기에 실온에서 24시간 동안 비드를 배치하고 반건조 비드를 얻는 것을 포함하는 단계(600) 및 반건조 비드를 64시간 동안 데시케이터에 놓고 건조된 비드를 얻는 것을 포함하는 단계(700). 각각의 경우에 총 CFU의 측정(750) 및 물 a_w 의 측정(760)을 건조 비드에 대해 수행하였다. ≤ 0.3 의 수분 활성 a_w 를 갖는 건조 비드를 수득하였다.

[0101] 각각의 경우 및 도 2를 참조하여, a_w 배수 감소는 다음에 따라 계산하였다:

[0102]
$$a_w \text{ 배수 감소} = \frac{650 - 760}{650}$$

[0103] 각각의 경우 및 도 2를 참조하여, 생존 능력 손실을 다음에 따라 계산하였다:

[0104] $CFU \text{ 손실} = \log_{10}(550) - \log_{10}(750)$

[0105] 각각의 경우에, 보존 용액 S1으로 얻은 결과에 대한 평균 생존 능력 손실 및 표준화된 평균 생존 능력 손실을 계산하였다.

[0106] 결과를 도 7에 나타내었다. 보존 용액 S7은 0.35의 표준화된 평균 생존 능력 손실을 나타내었다.

[0107] 실시예 5의 결과를 편집하여 표 10 및 표 11에 나타내었다.

표 10

샘플	단계 550	단계 750		
	평균 CFU	평균 CFU	평균 CFU 손실 (log ₁₀)	표준화된 CFU손실(log ₁₀)
S1	$4.1 \times 10^{11} \pm 3.8 \times 10^{10}$	$2.7 \times 10^{11} \pm 3.44 \times 10^{10}$	0.18 ± 0.10	1
S13	$3.8 \times 10^{11} \pm 4.2 \times 10^{10}$	$2.6 \times 10^{11} \pm 2.7 \times 10^{10}$	0.15 ± 0.02	0.85
S14	$3.8 \times 10^{11} \pm 6.1 \times 10^{10}$	$2.2 \times 10^{11} \pm 3.55 \times 10^{10}$	0.24 ± 0.08	1.35
S15	$4.4 \times 10^{11} \pm 1.5 \times 10^{10}$	$3.8 \times 10^{11} \pm 6.37 \times 10^{10}$	0.06 ± 0.07	0.35

표 11

샘플	단계 650	단계 760	
	평균 a _w	평균 a _w	a _w 배수 감소
S1	0.501 ± 0.041	0.177 ± 0.008	0.65
S13	0.562 ± 0.101	0.247 ± 0.012	0.56
S14	0.465 ± 0.031	0.133 ± 0.013	0.71
S15	0.502 ± 0.037	0.198 ± 0.016	0.60

[0110] 6. 실시예 6

[0111] 각 보존 용액에 대해 건조 및 테스트를 적어도 세 번 수행하였다. 도 2를 참조하여, 제 1 단계(500)에서 실시예 1에서 제조된 비드를 약 20분 동안 약하게 교반하면서 보존 용액 S1, 보존 용액 S16, 보존 용액 S17 또는 보존 용액 S18에 놓았다. 각각의 경우, 총 CFU의 측정(550)은 보존 용액에 담근 후 수행하였다. 제 2 단계(600)에서, 비드를 실온에서 공기 건조기의 트레이 건조기 상에 약 24시간 동안 놓아 반건조 비드를 얻었다. 각각의 경우에, 수분 활성 a_w의 측정(650)을 아쿠아랩(Aqualab) 수분 활성 측정기 4TE(Decagon Devices, Inc., U.S.A.)를 사용하여 반건조 비드에 대해 수행하였다. 제 3 단계(700)에서, 반건조 비드를 약 64시간 동안 데시케이터에 놓았고 여기서 건조 및 여과된 공기를 붙여 넣었다. 본 발명의 한 실시태양에 따르면, 건조 공정(800)은 적어도 두 단계를 포함한다: 공기 건조기에 실온에서 24시간 동안 비드를 배치하고 반건조 비드를 얻는 것을 포함하는 단계(600) 및 반건조 비드를 64시간 동안 데시케이터에 놓고 건조된 비드를 얻는 것을 포함하는 단계(700). 각각의 경우에 총 CFU의 측정(750) 및 물 a_w의 측정(760)을 건조 비드에 대해 수행하였다. ≤0.3의 수분 활성 a_w를 갖는 건조 비드를 수득하였다.

[0112] 각각의 경우 및 도 2를 참조하여, a_w 배수 감소는 다음에 따라 계산하였다:

$$[0113] \quad a_w \text{ 배수 감소} = \frac{650 - 760}{650}$$

[0114] 각각의 경우 및 도 2를 참조하여, 생존 능력 손실을 다음에 따라 계산하였다:

$$[0115] \quad CFU \text{ 손실} = \log_{10}(550) - \log_{10}(750)$$

[0116] 각각의 경우에, 보존 용액 S1으로 얻은 결과에 대한 평균 생존 능력 손실 및 표준화된 평균 생존 능력 손실을 계산하였다.

[0117] 결과를 도 8에 나타내었다.

[0118] 실시예 6의 결과를 편집하여 표 12 및 표 13에 나타내었다.

표 12

[0119]

샘플	단계 550	단계 750		
	평균 CFU	평균 CFU	평균 CFU 손실 (log ₁₀)	표준화된 CFU손실(log ₁₀)
S1	$3.3 \times 10^{11} \pm 3.4 \times 10^{10}$	$3.1 \times 10^{11} \pm 4.92 \times 10^{10}$	0.03 ± 0.07	1
S16	$3.6 \times 10^{11} \pm 4.1 \times 10^{10}$	$4.4 \times 10^{11} \pm 9.91 \times 10^{10}$	-0.07 ± 0.11	-2.68
S17	$3.2 \times 10^{11} \pm 4.5 \times 10^{10}$	$2.3 \times 10^{11} \pm 5.05 \times 10^{10}$	0.15 ± 0.05	5.57
S18	$2.7 \times 10^{11} \pm 3.9 \times 10^{10}$	$4.2 \times 10^{11} \pm 4.76 \times 10^{10}$	-0.19 ± 0.06	-6.98

표 13

[0120]

샘플	단계 650	단계 760	
	평균 a _w	평균 a _w	a _w 배수 감소
S1	0.734 ± 0.164	0.155 ± 0.003	0.79
S16	0.575 ± 0.862	0.136 ± 0.015	0.76
S17	0.742 ± 0.167	0.039 ± 0.004	0.95
S18	0.536 ± 0.003	0.176 ± 0.029	0.67

[0121] 7. 실시예 7

[0122] 각 보존 용액에 대해 건조 및 테스트를 적어도 세 번 수행하였다. 도 2를 참조하여, 제 1 단계(500)에서 실시예 1에서 제조된 비드를 약 20분 동안 약하게 교반하면서 보존 용액 S1 또는 보존 용액 S19에 놓았다. 각각의 경우, 총 CFU의 측정(550)은 보존 용액에 담근 후 수행하였다. 제 2 단계(600)에서, 비드를 실온에서 공기 건조기의 트레이 건조기 상에 약 24시간 동안 놓아 반건조 비드를 얻었다. 각각의 경우에, 수분 활성 a_w의 측정(650)을 아쿠아랩(Aqualab) 수분 활성 측정기 4TE(Decagon Devices, Inc., U.S.A.)를 사용하여 반건조 비드에 대해 수행하였다. 제 3 단계(700)에서, 반건조 비드를 약 64시간 동안 데시케이터에 놓았고 여기서 건조 및 여과된 공기를 불어 넣었다. 본 발명의 한 실시태양에 따르면, 건조 공정(800)은 적어도 두 단계를 포함한다: 공기 건조기에 실온에서 24시간 동안 비드를 배치하고 반건조 비드를 얻는 것을 포함하는 단계(600) 및 반건조 비드를 64시간 동안 데시케이터에 놓고 건조된 비드를 얻는 것을 포함하는 단계(700). 각각의 경우에 총 CFU의 측정(750) 및 물 a_w의 측정(760)을 건조 비드에 대해 수행하였다. ≤0.3의 수분 활성 a_w를 갖는 건조 비드를 수득하였다.

[0123] 각각의 경우 및 도 2를 참조하여, a_w 배수 감소는 다음에 따라 계산하였다:

[0124]
$$a_w \text{ 배수 감소} = \frac{650 - 760}{650}$$

[0125] 각각의 경우 및 도 2를 참조하여, 생존 능력 손실을 다음에 따라 계산하였다:

[0126]
$$CFU \text{ 손실} = \log_{10}(550) - \log_{10}(750)$$

[0127] 각각의 경우에, 보존 용액 S1으로 얻은 결과에 대한 평균 생존 능력 손실 및 표준화된 평균 생존 능력 손실을 계산하였다.

[0128] 결과를 도 9에 나타내었다.

[0129] 실시예 7의 결과를 편집하여 표 14 및 표 15에 나타내었다.

표 14

샘플	단계 550	단계 750		
	평균 CFU	평균 CFU	평균 CFU 손실 (log ₁₀)	표준화된 CFU손실(log ₁₀)
S1	$3.5 \times 10^{11} \pm 4.4 \times 10^8$	$3.2 \times 10^{11} \pm 4.13 \times 10^{10}$	0.03 ± 0.05	1
S19	$3.3 \times 10^{11} \pm 2.6 \times 10^{10}$	$2.4 \times 10^{11} \pm 2.06 \times 10^{10}$	0.13 ± 0.06	3.83

표 15

샘플	단계 650	단계 760	
	평균 a _w	평균 a _w	a _w 배수 감소
S1	0.660 ± 0.200	0.158 ± 0.026	0.76
S19	0.561 ± 0.085	0.129 ± 0.010	0.77

8. 실시예 8

각 보존 용액에 대해 건조 및 테스트를 적어도 세 번 수행하였다. 실시예 1에서 제조된 비드를 약 20분 동안 약 하게 교반하면서 보존 용액 S1, 보존 용액 S2, 보존 용액 S3 및 보존 용액 S4에 놓았다. 그런 후에 비드를 실온 에서 공기 건조기의 트레이 건조기 상에 약 24시간 동안 놓아 반건조 비드를 얻었다. 그런 후에 반건조 비드를 약 64시간 동안 데시케이터에 놓았고 여기서 건조 및 여과된 공기를 불어 넣었다. ≤0.3의 수분 활성 a_w를 갖는 건조 비드를 수득하였다.

각각의 경우에, 균주 생존 능력은 건조된 비드의 CFU/g을 측정함으로써 4℃ 저장 조건하에서 4주 동안 테스트하 였다. 테스트를 적어도 3회 수행하였고 표준 편차를 1회 계산하였다.

실시예 8의 결과를 표 16에 나타내었으며 모든 보존 용액은 4℃에서 저장될 때 4주 동안 사료 첨가제 균주 안정 성을 제공하였다.

표 16

보존 용액	4주 후 CFU/g 차이(log)
S1	0.2
S2	0.1
S3	0.1
S4	0

9. 실시예 9

각 보존 용액에 대해 건조 및 테스트를 적어도 세 번 수행하였다. 실시예 1에서 제조된 비드를 약 20분 동안 약 하게 교반하면서 보존 용액 S1, 보존 용액 S5, 보존 용액 S6 및 보존 용액 S7에 놓았다. 그런 후에 비드를 실온 에서 공기 건조기의 트레이 건조기 상에 약 24시간 동안 놓아 반건조 비드를 얻었다. 그런 후에 반건조 비드를 약 64시간 동안 데시케이터에 놓았고 여기서 건조 및 여과된 공기를 불어 넣었다. ≤0.3의 수분 활성 a_w를 갖는 건조 비드를 수득하였다.

각각의 경우에, 균주 생존 능력은 건조된 비드의 CFU/g을 측정함으로써 4℃ 저장 조건하에서 4주 동안 테스트하 였다. 테스트를 적어도 3회 수행하였고 표준 편차를 1회 계산하였다.

실시예 9의 결과를 표 17에 나타내었으며 모든 보존 용액은 4℃에서 저장될 때 4주 동안 사료 첨가제 균주 안정 성을 제공하였다.

표 17

보존 용액	4주 후 CFU/g 차이(log)
S1	0.2
S5	0.1
S6	0
S7	0.1

10. 실시예 10

각 보존 용액에 대해 건조 및 테스트를 적어도 세 번 수행하였다. 실시예 1에서 제조된 비드를 약 20분 동안 약하게 교반하면서 보존 용액 S1, 보존 용액 S0, 보존 용액 S8 및 보존 용액 S9에 놓았다. 그런 후에 비드를 실온에서 공기 건조기의 트레이 건조기 상에 약 24시간 동안 놓아 반건조 비드를 얻었다. 그런 후에 반건조 비드를 약 64시간 동안 데시케이터에 놓았고 여기서 건조 및 여과된 공기를 불어 넣었다. ≤ 0.3 의 수분 활성 a_w 를 갖는 건조 비드를 수득하였다.

각각의 경우에, 균주 생존 능력은 건조된 비드의 CFU/g을 측정함으로써 4°C 저장 조건하에서 4주 동안 테스트하였다. 테스트를 적어도 3회 수행하였고 표준 편차를 1회 계산하였다.

실시예 10의 결과를 표 18에 나타내었으며 모든 보존 용액은 4°C에서 저장될 때 4주 동안 사료 첨가제 균주 안정성을 제공하였다.

표 18

보존 용액	4주 후 CFU/g 차이(log)
S1	0
S0	2.4
S8	0.1
S9	0

11. 실시예 11

각 보존 용액에 대해 건조 및 테스트를 적어도 세 번 수행하였다. 실시예 1에서 제조된 비드를 약 20분 동안 약하게 교반하면서 보존 용액 S1, 보존 용액 S10, 보존 용액 S11 및 보존 용액 S12에 놓았다. 그런 후에 비드를 실온에서 공기 건조기의 트레이 건조기 상에 약 24시간 동안 놓아 반건조 비드를 얻었다. 그런 후에 반건조 비드를 약 64시간 동안 데시케이터에 놓았고 여기서 건조 및 여과된 공기를 불어 넣었다. ≤ 0.3 의 수분 활성 a_w 를 갖는 건조 비드를 수득하였다.

각각의 경우에, 균주 생존 능력은 건조된 비드의 CFU/g을 측정함으로써 4°C 저장 조건하에서 4주 동안 테스트하였다. 테스트를 적어도 3회 수행하였고 표준 편차를 1회 계산하였다.

실시예 11의 결과를 표 19에 나타내었으며 모든 보존 용액은 4°C에서 저장될 때 4주 동안 사료 첨가제 균주 안정성을 제공하였다.

표 19

보존 용액	4주 후 CFU/g 차이(log)
S1	0.1
S10	0.1
S11	0.4
S12	0.2

12. 실시예 12

각 보존 용액에 대해 건조 및 테스트를 적어도 세 번 수행하였다. 실시예 1에서 제조된 비드를 약 20분 동안 약하게 교반하면서 보존 용액 S1, 보존 용액 S13, 보존 용액 S14 및 보존 용액 S15에 놓았다. 그런 후에 비드를

실온에서 공기 건조기의 트레이 건조기 상에 약 24시간 동안 놓아 반건조 비드를 얻었다. 그런 후에 반건조 비드를 약 64시간 동안 데시케이터에 놓았고 여기서 건조 및 여과된 공기를 불어 넣었다. ≤ 0.3 의 수분 활성 a_w 를 갖는 건조 비드를 수득하였다.

[0154] 각각의 경우에, 균주 생존 능력은 건조된 비드의 CFU/g을 측정함으로써 4℃ 저장 조건하에서 4주 동안 테스트하였다. 테스트를 적어도 3회 수행하였고 표준 편차를 1회 계산하였다.

[0155] 실시예 12의 결과를 표 20에 나타내었으며 모든 보존 용액은 4℃에서 저장될 때 4주 동안 사료 첨가제 균주 안정성을 제공하였다.

표 20

보존 용액	4주 후 CFU/g 차이(log)
S1	0
S13	0
S14	0.1
S15	0.1

[0157] 13. 실시예 13

[0158] 각 보존 용액에 대해 건조 및 테스트를 적어도 세 번 수행하였다. 실시예 1에서 제조된 비드를 약 20분 동안 약하게 교반하면서 보존 용액 S1, 보존 용액 S16, 보존 용액 S17 및 보존 용액 S18에 놓았다. 그런 후에 비드를 실온에서 공기 건조기의 트레이 건조기 상에 약 24시간 동안 놓아 반건조 비드를 얻었다. 그런 후에 반건조 비드를 약 64시간 동안 데시케이터에 놓았고 여기서 건조 및 여과된 공기를 불어 넣었다. ≤ 0.3 의 수분 활성 a_w 를 갖는 건조 비드를 수득하였다.

[0159] 각각의 경우에, 균주 생존 능력은 건조된 비드의 CFU/g을 측정함으로써 4℃ 저장 조건하에서 4주 동안 테스트하였다. 테스트를 적어도 3회 수행하였고 표준 편차를 1회 계산하였다.

[0160] 실시예 13의 결과를 표 21에 나타내었으며, 모든 보존 용액은 4℃에서 저장될 때 4주 동안 사료 첨가제 균주 안정성을 제공하였다.

표 21

보존 용액	4주 후 CFU/g 차이(log)
S1	0
S16	0
S17	0
S18	0.1

[0162] 14. 실시예 14

[0163] 각 보존 용액에 대해 건조 및 테스트를 적어도 세 번 수행하였다. 실시예 1에서 제조된 비드를 약 20분 동안 약하게 교반하면서 보존 용액 S1 및 보존 용액 S19에 놓았다. 그런 후에 비드를 실온에서 공기 건조기의 트레이 건조기 상에 약 24시간 동안 놓아 반건조 비드를 얻었다. 그런 후에 반건조 비드를 약 64시간 동안 데시케이터에 놓았고 여기서 건조 및 여과된 공기를 불어 넣었다. ≤ 0.3 의 수분 활성 a_w 를 갖는 건조 비드를 수득하였다.

[0164] 각각의 경우에, 균주 생존 능력은 건조된 비드의 CFU/g을 측정함으로써 4℃ 저장 조건하에서 4주 동안 테스트하였다. 테스트를 적어도 3회 수행하였고 표준 편차를 1회 계산하였다.

[0165] 결과를 표 22에 나타내었으며, 모든 보존 용액은 4℃에서 저장될 때 4주 동안 사료 첨가제 균주 안정성을 제공하였다.

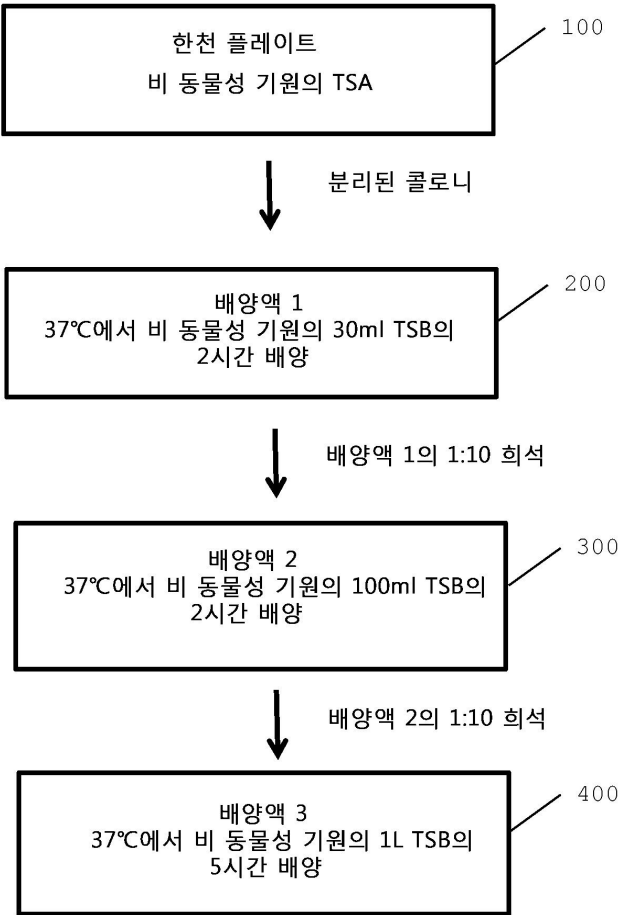
표 22

보존 용액	4주 후 CFU/g 차이(log)
S1	0.1
S19	0.1

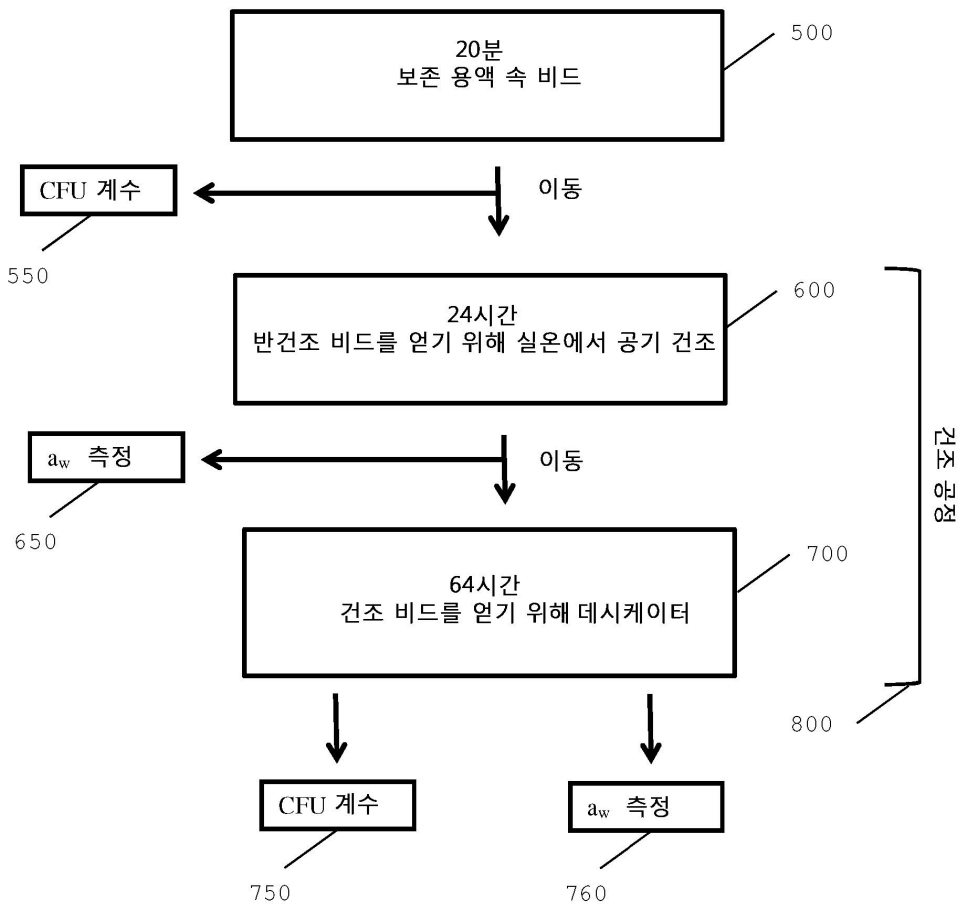
- [0167] 요약하면, 본 발명자는 놀랍게도 예기치 않게 본 발명에 기술된 바와 같이 삽입된 생존 가능한 대장균을 포함하는 기질이 이의 상업적 사용을 위해 주어진 시간 동안, 예를 들어 4주 동안 충분한 박테리아 CFU의 생존 능력을 보존할 수 있다는 것을 관찰하였다. 예를 들어, 기질은 펠렛 처리된 동물 사료에 성공적으로 포함되어 동물 사료는 저장/운반/취급되어 궁극적으로 박테리아와 일반적으로 관련된 유익한 효과를 제공하기에 충분한 동물 사료의 생존 가능한 CFU / g를 유지하면서 동물에게 투여될 수 있다.
- [0168] 독자의 편의를 위해 본 발명 전반에 걸쳐 제목이나 부제를 사용할 수는 있지만, 결코 본 발명의 범위를 제한하지는 않는다. 더욱이, 특정 이론들이 본 발명에 제안되고 공개될 수 있다; 그러나, 그들이 옳은지 여부에 관계없이, 어떠한 방식으로든 본 발명이 임의의 특정 이론 또는 작용 계획을 고려하지 않고 본 발명에 따라 실시되는 한 본 발명의 범위를 제한해서는 안 된다.
- [0169] 본 명세서 전반에 걸쳐 인용된 모든 참고 문헌은 모든 목적을 위해 그 전문이 참조로 포함된다.
- [0170] 본 명세서 전체에 걸쳐, 앞에 사용된 용어 "하나"는 하나 또는 그 이상의 용어가 포함하는 실시태양을 포함한다는 것을 당업자는 이해할 것이다. 당업자는 또한 본 명세서 전반에 걸쳐 "포함하는(including)", "함유하는(containing)" 또는 "특징으로 하는(characterized by)"과 동의어인 "포함하는(comprising)"이라는 용어는 포괄적이거나 제한이 없으며, 추가, 인용되지 않은 요소 또는 방법 단계를 배제하지 않는다.
- [0171] 달리 정의되지 않는 한, 본 발명에서 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 충돌이 있는 경우, 정의를 포함하는 본 문서가 우선한다.
- [0172] 본 발명에서 사용된 바와 같이, "대략", "약" 또는 "대체로"라는 용어는 일반적으로 당해 기술 분야에서 일반적으로 허용되는 오차 한계를 의미한다. 따라서, 본 발명에 주어진 수치적 양은 일반적으로 "대략", "약" 또는 "대체로"라는 용어가 명시적으로 언급되지 않은 경우 유추될 수 있는 이런 오차 한계를 일반적으로 포함한다.
- [0173] 본 발명은 특정 실시태양에서 상당히 상세하게 기술되었지만, 본 발명의 교시에 비추어 변형 및 개선이 가능하고 당업자에게 명백해질 것이다.

도면

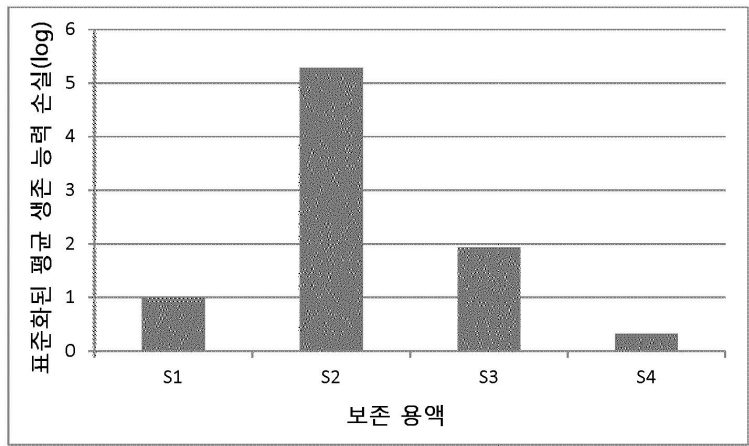
도면1



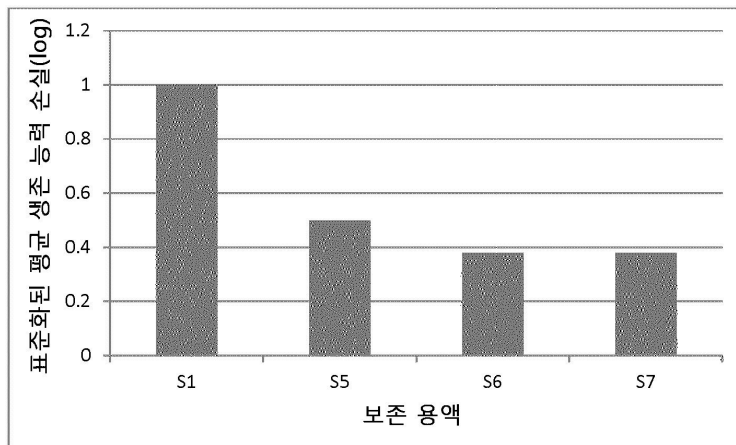
도면2



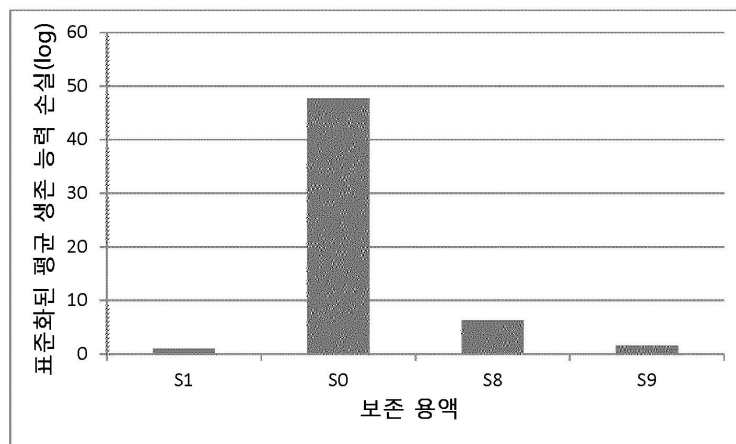
도면3



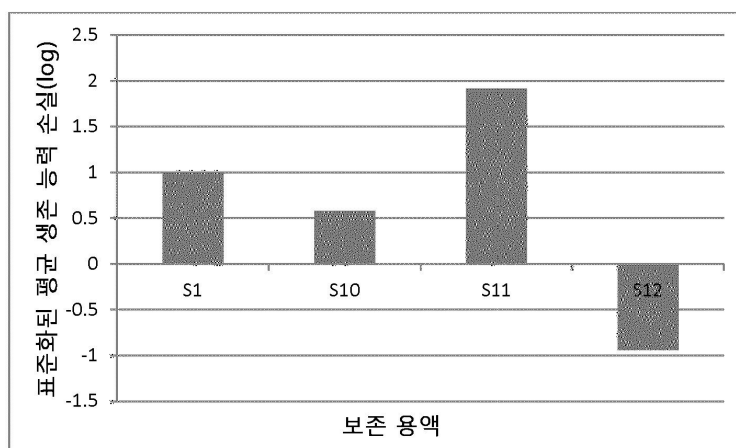
도면4



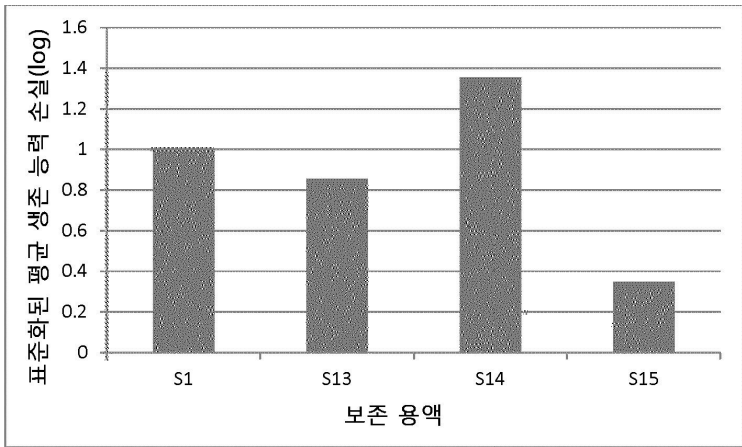
도면5



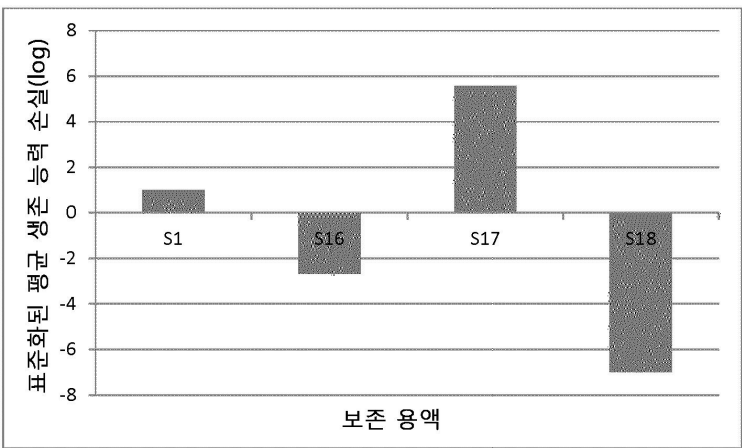
도면6



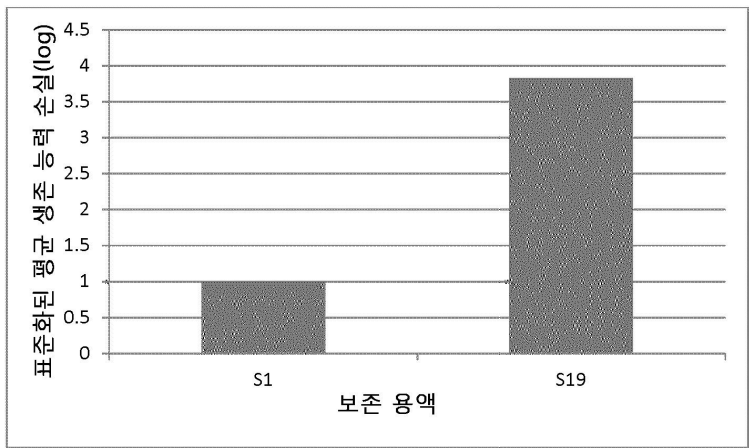
도면7



도면8



도면9



도면10

Test	Solution code	Replicates	Drying			a _w		Stability per week (CFU/g)				
			Before (CFU total)	After (CFU total)	difference (log)	Before	After	0	1	2	3	4
1	S1	A	3.1E+11	1.4E+11	-0.36	0.4502	0.1536	3.4E+09	4.5E+09	4.1E+09	4.4E+09	8.6E+09
		B	2.1E+11	1.4E+11	-0.17	0.4831	0.1740	3.8E+09	5.4E+09	4.8E+09	3.2E+09	4.8E+09
		C	3.9E+11	1.4E+11	-0.43	0.4871	0.1671	3.8E+09	5.0E+09	4.3E+09	4.9E+09	5.5E+09
	S2	A	2.3E+11	2.8E+09	-1.92	0.2549	0.0616	1.9E+08	9.9E+07	1.3E+08	1.9E+08	3.5E+08
		B	1.8E+11	8.1E+09	-1.34	0.2836	0.0561	5.4E+08	6.2E+08	4.5E+08	8.2E+08	5.4E+08
		C	2.9E+11	5.3E+09	-1.74	0.2961	0.0434	3.4E+08	1.1E+08	1.5E+08	2.0E+08	4.6E+08
	S3	A	2.3E+11	1.0E+11	-0.34	0.4215	0.1274	4.3E+09	1.8E+09	1.5E+09	4.5E+09	4.4E+09
		B	2.3E+11	2.5E+10	-0.96	0.4011	0.1437	1.1E+09	1.2E+09	1.7E+09	1.5E+09	2.3E+09
		C	3.1E+11	9.1E+10	-0.53	0.4459	0.1791	3.9E+09	5.9E+09	6.1E+09	3.2E+09	6.1E+09
	S4	A	2.9E+11	2.4E+11	-0.08	0.4687	0.1376	6.6E+09	6.3E+09	4.9E+09	5.0E+09	6.3E+09
		B	2.6E+11	1.6E+11	-0.20	0.4848	0.1429	4.6E+09	4.0E+09	5.3E+09	5.6E+09	4.2E+09
		C	3.9E+11	3.5E+11	-0.04	0.5114	0.1463	9.7E+09	5.8E+09	6.6E+09	6.2E+09	6.2E+09
2	S1	A	2.5E+11	1.5E+11	-0.24	0.5219	0.2174	3.7E+09	7.4E+09	5.8E+09	6.6E+09	5.9E+09
		B	4.3E+11	2.0E+11	-0.34	0.5582	0.2299	5.0E+09	5.0E+09	4.8E+09	6.9E+09	7.7E+09
		C	3.0E+11	1.9E+11	-0.20	0.5255	0.2416	4.9E+09	5.1E+09	6.3E+09	4.9E+09	5.9E+09
	S5	A	3.6E+11	2.0E+11	-0.24	0.5016	0.2470	5.4E+09	1.0E+10	8.3E+09	4.7E+09	6.4E+09
		B	4.3E+11	2.6E+11	-0.22	0.5011	0.2413	6.5E+09	5.8E+09	6.5E+09	2.8E+09	8.0E+09
		C	2.8E+11	3.2E+11	0.07	0.5864	0.2592	8.1E+09	7.4E+09	5.6E+09	5.7E+09	9.4E+09
	S6	A	2.8E+11	4.8E+11	0.23	0.7511	0.2747	1.2E+10	9.4E+09	6.2E+09	8.1E+09	8.8E+09
		B	3.8E+11	2.5E+11	-0.19	0.5017	0.2539	6.2E+09	5.6E+09	7.1E+09	5.9E+09	7.5E+09
		C	2.8E+11	1.3E+11	-0.33	0.5065	0.2511	3.3E+09	4.6E+09	7.2E+09	4.7E+09	5.0E+09
	S7	A	3.3E+11	2.8E+11	-0.07	0.5929	0.2840	7.0E+09	1.0E+10	8.5E+09	6.9E+09	1.0E+10
		B	3.8E+11	2.6E+11	-0.16	0.5190	0.3027	6.5E+09	8.1E+09	4.8E+09	4.7E+09	8.6E+09
		C	3.1E+11	2.7E+11	-0.06	0.5104	0.3086	6.6E+09	4.9E+09	4.9E+09	4.4E+09	6.2E+09
3	S1	A	2.0E+11	1.6E+11	-0.10	0.4418	0.2399	4.5E+09	5.6E+09	2.9E+09	4.1E+09	3.2E+09
		B	2.5E+11	1.7E+11	-0.17	0.4611	0.2366	4.9E+09	5.4E+09	4.0E+09	5.3E+09	4.6E+09
		C	2.1E+11	1.8E+11	-0.07	0.4561	0.2468	5.1E+09	5.3E+09	3.1E+09	4.9E+09	4.8E+09
	S0	A	1.8E+11	2.9E+05	-5.79	0.3066	0.0391	3.8E+04	4.4E+05	3.6E+04	4.7E+05	4.7E+05
		B	2.1E+11	1.0E+06	-5.31	0.3343	0.0362	1.4E+05	7.1E+05	9.4E+05	2.8E+06	1.5E+08
		C	1.7E+11	3.2E+06	-4.73	0.3510	0.0356	4.2E+05	8.5E+05	7.2E+05	9.4E+05	3.1E+06
	S8	A	3.2E+11	4.5E+10	-0.85	0.3631	0.0680	1.5E+09	1.9E+09	3.4E+09	3.2E+09	2.5E+09
		B	2.3E+11	4.7E+10	-0.69	0.3585	0.0565	1.5E+09	1.1E+09	1.6E+09	2.2E+09	1.9E+09
		C	3.0E+11	8.6E+10	-0.54	0.3777	0.0614	2.8E+09	1.9E+09	3.0E+09	4.2E+09	3.3E+09
	S9	A	2.3E+11	1.5E+11	-0.17	0.4625	0.2392	4.5E+09	4.5E+09	3.6E+09	3.8E+09	4.0E+09
		B	3.0E+11	1.7E+11	-0.25	0.4433	0.2862	4.8E+09	3.9E+09	3.8E+09	4.4E+09	4.5E+09
		C	1.9E+11	1.4E+11	-0.14	0.4472	0.3011	4.0E+09	5.0E+09	4.3E+09	4.8E+09	2.9E+09
4	S1	A	3.1E+11	2.3E+11	-0.14	0.4589	0.1150	5.7E+09	5.8E+09	4.5E+09	5.7E+09	4.9E+09
		B	3.9E+11	3.0E+11	-0.11	0.4655	0.1267	7.6E+09	6.0E+09	4.5E+09	6.6E+09	4.5E+09
		C	4.1E+11	3.1E+11	-0.12	0.5011	0.1272	7.8E+09	6.3E+09	4.7E+09	4.6E+09	6.1E+09
	S10	A	2.9E+11	3.2E+11	0.04	0.4617	0.1279	8.3E+09	6.6E+09	5.6E+09	5.9E+09	6.5E+09
		B	4.9E+11	3.1E+11	-0.20	0.4977	0.1363	7.6E+09	7.5E+09	6.9E+09	5.9E+09	6.2E+09
		C	4.2E+11	3.7E+11	-0.06	0.5117	0.1417	9.0E+09	7.8E+09	8.5E+09	6.6E+09	6.3E+09
	S11	A	2.8E+11	1.8E+11	-0.20	0.4289	0.1567	6.2E+09	3.9E+09	4.1E+09	5.5E+09	3.0E+09
		B	3.3E+11	1.8E+11	-0.27	0.4003	0.2199	6.2E+09	5.0E+09	4.0E+09	3.1E+09	2.6E+09
		C	3.6E+11	2.1E+11	-0.24	0.4287	0.2259	7.6E+09	8.1E+09	5.0E+09	6.3E+09	2.4E+09
	S12	A	3.8E+11	6.1E+11	0.20	0.5165	0.1639	1.6E+10	1.2E+10	1.1E+10	1.1E+10	9.0E+09
		B	4.4E+11	5.5E+11	0.10	0.4994	0.1719	1.5E+10	1.2E+10	1.1E+10	1.3E+10	9.7E+09
		C	3.9E+11	4.3E+11	0.04	0.4652	0.1596	1.1E+10	8.6E+09	1.1E+10	7.9E+09	5.2E+09
5	S1	A	4.5E+11	2.4E+11	-0.28	0.4816	0.1677	5.6E+09	4.5E+09	3.1E+09	5.5E+09	5.0E+09
		B	3.7E+11	3.1E+11	-0.09	0.5490	0.1824	7.3E+09	6.8E+09	7.0E+09	7.0E+09	7.6E+09
		C	4.0E+11	2.7E+11	-0.18	0.4739	0.1821	6.1E+09	5.9E+09	6.4E+09	5.5E+09	5.9E+09
	S13	A	3.7E+11	2.5E+11	-0.17	0.6726	0.2386	6.1E+09	5.6E+09	6.2E+09	6.0E+09	6.7E+09
		B	3.4E+11	2.5E+11	-0.14	0.4740	0.2422	6.1E+09	7.4E+09	5.0E+09	6.8E+09	5.9E+09
		C	4.2E+11	3.0E+11	-0.15	0.5405	0.2602	7.3E+09	6.3E+09	3.7E+09	7.5E+09	6.3E+09
	S14	A	3.1E+11	2.0E+11	-0.19	0.4778	0.1371	6.5E+09	4.9E+09	3.5E+09	5.3E+09	4.7E+09
		B	4.2E+11	2.6E+11	-0.20	0.4295	0.1184	8.4E+09	8.6E+09	6.2E+09	6.6E+09	5.0E+09
		C	4.2E+11	2.0E+11	-0.33	0.4864	0.1434	6.3E+09	8.4E+09	8.2E+09	9.0E+09	6.5E+09
	S15	A	4.2E+11	3.5E+11	-0.08	0.5324	0.1938	9.5E+09	8.5E+09	8.3E+09	1.1E+10	8.3E+09
		B	4.5E+11	3.4E+11	-0.12	0.4612	0.1854	9.5E+09	9.1E+09	8.3E+09	7.9E+09	7.6E+09
		C	4.5E+11	4.6E+11	0.01	0.5118	0.2164	1.2E+10	9.1E+09	8.9E+09	8.4E+09	7.3E+09
6	S1	A	2.9E+11	2.9E+11	0.00	0.7314	0.1529	7.1E+09	6.5E+09	7.3E+09	6.7E+09	6.7E+09
		B	3.5E+11	3.7E+11	0.02	0.8990	0.1590	9.0E+09	8.3E+09	8.9E+09	9.4E+09	8.2E+09
		C	3.5E+11	2.8E+11	-0.11	0.5714	0.1540	6.9E+09	5.3E+09	5.5E+09	6.8E+09	6.2E+09
	S16	A	3.5E+11	3.2E+11	-0.04	0.5313	0.1219	8.1E+09	8.9E+09	1.3E+10	1.2E+10	9.0E+09
		B	4.1E+11	4.9E+11	0.08	0.5198	0.1326	1.2E+10	1.1E+10	1.3E+10	1.7E+10	1.2E+10
		C	3.3E+11	4.9E+11	0.18	0.6745	0.1524	1.3E+10	1.1E+10	9.0E+09	1.3E+10	1.1E+10
	S17	A	3.0E+11	1.9E+11	-0.21	0.5994	0.0372	5.3E+09	6.5E+09	6.8E+09	5.5E+09	7.3E+09
		B	3.8E+11	2.9E+11	-0.12	0.9267	0.0439	8.2E+09	8.5E+09	9.8E+09	8.9E+09	1.1E+10
		C	3.0E+11	2.2E+11	-0.13	0.7010	0.0371	6.5E+09	7.0E+09	5.9E+09	5.8E+09	5.8E+09
	S18	A	2.5E+11	3.7E+11	0.17	0.5388	0.1469	9.6E+09	7.9E+09	1.2E+10	7.8E+09	6.3E+09
		B	3.2E+11	4.4E+11	0.14	0.5327	0.1771	1.1E+10	1.3E+10	8.7E+09	1.1E+10	1.1E+10
		C	2.5E+11	4.6E+11	0.26	0.5359	0.2048	1.2E+10	1.1E+10	9.4E+09	1.1E+10	9.4E+09
7	S1	A	3.5E+11	3.1E+11	-0.05	0.6498	0.1473	8.1E+09	8.0E+09	-	6.9E+09	5.9E+09
		B	3.5E+11	3.7E+11	0.03	0.4659	0.1387	9.7E+09	8.8E+09	-	7.3E+09	-
		C	3.5E+11	2.9E+11	-0.08	0.8656	0.1871	7.6E+09	9.9E+09	-	9.2E+09	7.9E+09
	S19	A	3.0E+11	2.5E+11	-0.08	0.6582	0.1401	6.8E+09	5.7E+09	-	4.3E+09	5.7E+09
		B	3.5E+11	2.6E+11	-0.13	0.5270	0.1194	7.0E+09	7.2E+09	-	5.8E+09	6.0E+09
		C	3.4E+11	2.2E+11	-0.19	0.4994	0.1280	6.0E+09	5.0E+09	-	4.6E+09	4.5E+09