



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년08월09일
 (11) 등록번호 10-1172839
 (24) 등록일자 2012년08월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 11/04 (2006.01) *C12N 1/20* (2006.01)
A23L 1/314 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2011-0116878
 (22) 출원일자 2011년11월10일
 심사청구일자 2011년11월10일
 (56) 선행기술조사문헌
 US07157258 B2*
 KR100387245 B1
 US20070098847 A1
 KR1020110067841 A
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
주식회사 늘부
 경기 성남시 중원구 도촌동 575
주식회사 유라에프에스
 충청북도 음성군 대소면 대동로692번길 178
 (72) 발명자
김동철
 경기도 하남시 김단산로 228-16, 태주빌딩 105호
 (창우동)
김순진
 서울특별시 서초구 명달로 97-14, 201호 (서초동,
 트라움하우스3차)
 (74) 대리인
박종욱

전체 청구항 수 : 총 5 항

심사관 : 안규정

(54) 발명의 명칭 **코팅 유산균의 제조방법 및 상기 코팅 유산균을 포함하는 보쌈용 수육의 제조방법**

(57) 요약

본 발명은 카나우바 왁스(carnauba wax) 또는 올리브 왁스(olive wax)로 코팅 처리된 코팅 유산균의 제조방법 또는 상기 방법에 의해 제조된 코팅 유산균을 함유하는 보쌈용 수육의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명의 코팅 유산균은 pH 2.1의 인공위액에서, 0.5%의 옥스갈(oxgall)용액에서 그리고, 40℃, 상대습도 70%에서 내산성 및 내담즙성 그리고 가속시험에 대해 우수한 생존율을 보였다. 또한, 본 발명의 코팅 유산균을 함유하는 보쌈용 수육을 제조하는 과정에서 90-100℃의 온도의 물에서 가열하였음에도, 보쌈용 수육에 존재하는 유산균은 1.5×10^4 - 1.7×10^4 cfu/g의 생존율을 보였다. 따라서, 본 발명의 코팅 유산균은 열, 위액, 담즙 등의 외부 환경으로부터 보호되어 상기 코팅 유산균을 함유하는 보쌈용 수육을 제조하더라도 체내에서 유산균의 유용할 활성을 보일 것으로 기대된다.

특허청구의 범위

청구항 1

다음의 단계를 포함하는 코팅 유산균의 제조방법:

- (a) (a-1) 유산균을 MRS 배지에 접종하여 유산균의 농도가 10^{10} - 10^{11} CFU/ml가 되도록 배양하는 단계; (a-2) 상기 단계 (a-1)의 배양된 유산균을 원심 분리하여 유산균을 수집하고 생리식염수로 세척하는 단계; (a-3) 유산균의 농도가 10^{10} CFU/ml가 되도록 상기 단계 (a-2)의 세척된 유산균에 탈지유 안정제를 첨가하고 교반하는 단계; (a-4) 상기 단계 (a-3)의 결과물인 유산균을 동결하고 최종 수분함량이 2.0-3.0%가 되도록 진공 건조하는 단계; 및 (a-5) 상기 단계 (a-4) 동결 및 진공 건조된 유산균을 60-100 메쉬의 망이 달린 분쇄기를 이용하여 분쇄하여 준비된 유산균 분말을 유동층 혼합을 통해 공기 중에 분산시켜 부유 상태로 준비하는 단계;
- (b) 카나우바 왁스(carnauba wax) 또는 올리브 왁스(olive wax)를 90-130℃에서 용해하고 스크린필터를 이용하여 여과하여 코팅용 유지를 준비하는 단계;
- (c) 압축공기를 냉각한 후 마이크로 필터로 여과하고, 이를 70-110℃의 온도로 가열하여 이송용 압축공기를 준비하는 단계;
- (d) 상기 단계 (c)의 준비된 압축공기를 이용하여 상기 단계 (b)의 여과된 코팅용 유지를 코팅제 이송용 튜브로 이송하는 단계; 및
- (e) 상기 단계 (a)의 부유 상태의 유산균 분말에 상기 단계 (d)의 이송된 코팅용 유지를 분사하여 코팅(coating)하는 단계.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 유산균은 락토바실러스 알리멘타리우스(*Lactobacillus alimentarius*), 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*), 락토바실러스 아시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 카세이(*Lactobacillus casei*), 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*), 락토바실러스 델브루에키(*Lactobacillus delbrueckii*), 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*), 락토바실러스 불가리쿠스(*Lactobacillus bulgaricus*), 락토바실러스 헬베티쿠스(*Lactobacillus helveticus*), 류코노스톡 멘센테로이드스(*Leuconostoc mesenteroides*), 스트렙토코커스 서모필러스(*Streptococcus thermophilus*), 스트렙토코커스 락티스(*Streptococcus lactis*), 엔테로코커스 파에시엄(*Enterococcus faecium*), 엔테로코커스 파에칼리스(*Enterococcus faecalis*), 비피도박테리움 비피덤(*Bifidobacterium bifidum*), 비피도박테리움 인판티스(*Bifidobacterium infantis*), 비피도박테리움 브라베(*Bifidobacterium brave*) 및 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*)으로 구성된 균으로부터 선택되는 유산균인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

삭제

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (e) 코팅용 유지는 코팅 유산균의 총 중량을 기준으로 하여 20-40 중량%로 포함되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

다음의 단계를 포함하는 보쌈용 수육의 제조방법:

- (i) 상기 제 1 항, 제 2항, 또는 제 4 항 중 어느 한 방법으로 제조된 코팅 유산균을 준비하는 단계;
- (ii) 상기 단계 (i)의 코팅 유산균, 정제염, 정백당, L-글루타민산나트륨, 마늘분말, 양파분말, 후추분말, 포

도당, 소주 및 정제수를 혼합하여 염지액을 준비하는 단계;

(iii) 상기 단계 (ii)의 염지액에 돈육을 침지하여 숙성시킨 다음 돈육 표면의 수분을 건조시키는 단계; 및

(iv) 상기 단계 (iii)의 결과물인 돈육을 90-100℃의 물에서 가열하는 단계.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 단계 (ii)의 염지액은 정제수 100 중량부에 대하여 코팅 유산균 5-50 중량부, 정제염 5-20 중량부, 정백당 5-20 중량부, L-글루타민산나트륨 5-15 중량부, 마늘분말 15-35 중량부, 양파분말 1-15 중량부, 후추분말 0.5-5 중량부, 포도당 1-10 중량부 및 소주 5-15 중량부를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 유산균이 열, 위액, 담즙 등의 외부 환경으로부터 보호되는 코팅 유산균의 제조방법, 상기 방법에 의해 제조된 코팅 유산균, 상기 코팅 유산균을 함유하는 보쌈용 수육의 제조방법 및 상기 방법에 의해 제조된 보쌈용 수육에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 일반적으로, 유산균은 장에 정착하여 장관운동 활성화, 유해균 억제, 비타민 및 면역증강 물질 촉진 등 다양한 생리활성 효과를 발휘하는데, 인체의 구조상 사람이 유산균 섭취 시 장까지 도달하기까지는 위를 거치게 되어 있어 위에서 분비되는 위산으로 인해 유산균이 사멸하여 유산균 본래의 생리활성 기능을 발휘하지 못하게 되는 경우가 많다.

[0003] 특히, 종래의 비코팅 유산균 원말의 제조공정은 유산균 발효, 균체 회수, 동결 건조의 과정으로 이루어지는데, 이러한 비코팅 유산균 분말은 공기, 수분, 온도조건에 민감하게 반응하므로 저장 및 유통안정성과 2차 제품 제조시의 가공안정성을 확보하기에 어려움이 있다. 또한, 사람 및 동물의 섭취 시에는 위산 및 담즙산과의 직접적인 접촉에 의해 급격히 사멸하므로 장내정착성 및 유산균 고유의 효능, 효과를 보장할 수 없는 문제점이 있었다.

[0004] 이러한 문제점을 해결하기 위해 유산균을 코팅하여 사용하게 되었는데, 유산균 코팅 기술로는 대한민국 공개특허 제2002-0069862호에서는 유산균 제품에 단백질을 코팅하는 단백질 코팅 유산균의 제조방법에 대해 개시되어 있고, 대한민국 공개특허 제2002-0069863호에는 유산균에 단백질과 다당류를 이중 코팅하는 단백질 및 다당류를 이용한 이중코팅 유산균 원말의 제조방법에 대해 개시되어 있으며, 대한민국 공개특허 제2009-0082035호에는 단백질, 다당류 및 나노입자로 3중 코팅된 유산균의 제조방법, 상기 방법으로 제조된 3중 코팅된 유산균 및 이를 포함하는 제품에 대해 개시되어 있고, 대한민국 공개특허 제2006-0118037호에는 김치 발효액을 구아검과 젤란검으로 1차 코팅, 카제인 단백질을 가해 2차 코팅 처리하고 동결 건조시킨 다음 다시마분말을 액화시켜 만든 용액을 가지고 3차 코팅 처리하는 기술이 개시되어 있다.

[0005] 그러나, 본 발명자들은 상술한 코팅 기술과 달리 간단한 방법으로 코팅 유산균을 제조하고, 상기 코팅 유산균이 열, 위액, 담즙 등의 외부 환경으로부터 보호되어 상기 코팅 유산균을 함유하는 보쌈용 수육을 제조하더라도 체내에서 유산균을 이용할 수 있는 기술 개발의 필요성을 인식하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제2002-0069862호
(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허 제2002-0069863호

(특허문헌 0003) 대한민국 공개특허 제2009-0082035호

(특허문헌 0004) 대한민국 공개특허 제2006-0118037호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명자들은 체내에서 우수한 생존율을 보이고 열에 대해서도 안정성(stability)을 보일 수 있는 코팅 유산균 및 이를 이용한 보쌈용 수육을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 카나우바 왁스(carnauba wax) 또는 올리브 왁스(olive wax)를 부유 상태의 유산균 분말에 분사하여 코팅을 한 결과, pH 2.1의 인공위액에서, 0.5%의 옥스갈(oxgall)용액에서 그리고, 40℃, 상대습도 70%에서 내산성 및 내담즙성 그리고 가속시험에 대해 우수한 생존율을 보였고, 상기 코팅된 유산균을 염지액에 포함시켜 보쌈용 수육을 제조한 결과, $1.5 \times 10^4 - 1.7 \times 10^4$ cfu/g의 생존율을 보여 체내에서 유용할 활성을 보일 것으로 기대함으로써, 본 발명의 완성하였다.
- [0008] 따라서, 본 발명의 목적은 코팅 유산균의 제조방법을 제공하는데 있다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은 상술한 방법으로 제조된 코팅 유산균을 제공하는데 있다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상술한 코팅 유산균을 함유하는 보쌈용 수육의 제조방법을 제공하는데 있다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은 상술한 방법으로 제조된 보쌈용 수육을 제공하는데 있다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명 및 청구범위에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0013] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 코팅 유산균의 제조방법을 제공한다: (a) 준비된 유산균 분말을 유동층 혼합을 통해 공기 중에 분산시켜 부유 상태로 준비하는 단계; (b) 카나우바 왁스(carnauba wax) 또는 올리브 왁스(olive wax)를 90-130℃에서 용해하고 스크린필터를 이용하여 여과하여 코팅용 유지를 준비하는 단계; (c) 압축공기를 냉각한 후 마이크로 필터로 여과하고, 이를 70-110℃의 온도로 가열하여 이송용 압축공기를 준비하는 단계; (d) 상기 단계 (c)의 준비된 압축공기를 이용하여 상기 단계 (b)의 여과된 코팅용 유지를 코팅제 이송용 튜브로 이송하는 단계; 및 (e) 상기 단계 (a)의 부유 상태의 유산균 분말에 상기 단계 (d)의 이송된 코팅용 유지를 분사하여 코팅(Coating)하는 단계.
- [0014] 본 발명자들은 체내에서 우수한 생존율을 보이고 열에 대해서도 안정성(stability)을 보일 수 있는 코팅 유산균 및 이를 이용한 보쌈용 수육을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 카나우바 왁스(carnauba wax) 또는 올리브 왁스(olive wax)를 부유 상태의 유산균 분말에 분사하여 코팅을 한 결과, pH 2.1의 인공위액에서, 0.5%의 옥스갈(oxgall)용액에서 그리고, 40℃, 상대습도 70%에서 내산성 및 내담즙성 그리고 가속시험에 대해 우수한 생존율을 보였고, 상기 코팅된 유산균을 염지액에 포함시켜 보쌈용 수육을 제조한 결과, $1.5 \times 10^4 - 1.7 \times 10^4$ cfu/g의 생존율을 보여 체내에서 유용할 활성을 보일 것으로 기대된다.
- [0015] 본 발명에 이용되는 유산균은 당업계에 공지된 다양한 유산균을 포함한다. 본 명세서에서 용어 “유산균(lactic acid bacteria)”은 탄수화물 대사의 주산물로서 유산을 생산하는 박테리아 군을 의미한다. 바람직하게는, 본 발명에서 이용되는 유산균은, 락토코커스(Lactococcus), 락토바실러스(Lactobacillus), 류코노스톡(Leuconostoc), 프로리오니박테리움(Propionibacterium), 엔테로코커스(Enterococcus), 비피도박테리움(Bifidobacterium), 스트렙토코커스(Streptococcus) 및 페디오코커스(Pediococcus)로 구성된 군으로부터 선택되는 유산균이다. 보다 바람직하게는, 본 발명에서 이용되는 유산균은 락토바실러스 알리멘타리우스(Lactobacillus alimentarius), 락토바실러스 사케이(Lactobacillus sakei), 락토바실러스 아시도필러스(Lactobacillus acidophilus), 락토바실러스 카세이(Lactobacillus casei), 락토바실러스 가세리(Lactobacillus gasseri), 락토바실러스 델브루엑키(Lactobacillus delbrueckii), 락토바실러스 퍼멘텀

(*Lactobacillus fermentum*), 락토바실러스 불가리쿠스(*Lactobacillus bulgaricus*), 락토바실러스 헬베티쿠스(*Lactobacillus helveticus*), 류코노스톡 멘센테로이드스(*Leuconostoc mensenteroides*), 스트렙토코커스 서모필러스(*Streptococcus thermophilus*), 스트렙토코커스 락티스(*Streptococcus lactis*), 엔테로코커스 파에시엄(*Enterococcus faecium*), 엔테로코커스 파에칼리스(*Enterococcus faecalis*), 비피도박테리움 비피덤(*Bifidobacterium bifidum*), 비피도박테리움 인판티스(*Bifidobacterium infantis*), 비피도박테리움 브라베(*Bifidobacterium brave*) 및 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*)으로 구성된 균으로부터 선택되는 유산균이다. 보다 더 바람직하게는 락토바실러스 알리멘타리우스(*Lactobacillus alimentarius*), 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*), 락토바실러스 아시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 카세이(*Lactobacillus casei*), 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasserii*), 락토바실러스 델브루에키(*Lactobacillus delbrueckii*), 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*), 락토바실러스 불가리쿠스(*Lactobacillus bulgaricus*) 또는 락토바실러스 헬베티쿠스(*Lactobacillus helveticus*)이고, 보다 더욱 더 바람직하게는 락토바실러스 카세이(*Lactobacillus casei*)이다.

- [0016] 본 발명에 따르면, 유산균은 상술한 유산균의 1종 또는 1종 이상의 혼합 유산균을 이용할 수 있다.
- [0017] 이하, 코팅 유산균을 제조하기 위한 본 발명의 방법을 단계별로 상세하게 설명하면 다음과 같다:
- [0018] (a) 준비된 유산균 분말의 부유 상태로 준비
- [0019] 우선, 본 발명의 방법은 준비된 유산균 분말을 유동층 혼합을 통해 공기 중에 분산시켜 부유 상태로 준비하는 단계를 거친다.
- [0020] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 단계 (a)의 유산균 분말의 준비는 다음의 단계를 포함한다:
- [0021] (a-1) 유산균의 배양
- [0022] 먼저, 유산균을 MRS 배지에 접종하여 유산균의 농도가 10^{10} - 10^{11} CFU/ml가 되도록 배양한다.
- [0023] 본 발명에서 유산균을 배양하기 위한 배지는 당업계에 공지된 다양한 배지를 이용할 수 있으며, 예컨대 MRS 브로스(deMan Rogosa Sharpe broth), APT(All Purpose with Tween) 배지 또는 BHI(Brain Heart Infusion) 배지를 이용할 수 있으나, 가장 바람직하게는 MRS 브로스 배지이다.
- [0024] 이러한 배지에서 유산균을 30-37℃에서 12-30시간 동안 배양하여, 유산균의 농도가 10^{10} - 10^{11} CFU/ml가 되도록 한다.
- [0025] 상기 배지에 포함되는 탄소원으로 적합한 것은, 글루코오스, 수크로스, 말토오스, 프럭토오스, 락토오스, 자일로오스, 갈락토오스, 아라비노스 및 그의 조합으로 구성된 균으로부터 선택되며, 바람직하게는, 수크로스, 프럭토오스, 글루코오스, 갈락토오스, 아라비노스 및 락토오스이고, 보다 바람직하게는 수크로스, 프럭토오스 및 글루코오스이며, 가장 바람직하게는 글루코오스이다.
- [0026] 탄소원의 사용량은 바람직하게는 배지의 0.1-20 중량% 이고, 보다 바람직하게는 0.5-10 중량%이며, 가장 바람직하게는 1-3 중량%이다.
- [0027] (a-2) 상기 배양된 유산균의 수집 및 생리식염수로 세척
- [0028] 그 다음, 상기 단계 (a-1)의 배양된 유산균을 원심 분리하여 유산균을 수집하고 생리식염수로 세척한다.
- [0029] 구체적으로, 6,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 배양된 유산균을 수집하였으며, 이를 생리식염수(0.8% 염화나트륨)로 두 번 세척한다.
- [0030] 미생물의 배양의 상세한 내용은 Kubitschek, H. E., *Introduction to Research with Continuous Cultures*. Englewood Cliffs, N.J.:Prentice-Hall, Inc., 1970; Mandelstam, J., et al., *Biochemistry of Bacterial Growth*, 3rd ed. Oxford:Blackwell, 1982; Meynell, G.G., et al., *Theory and Practice in Experimental Bacteriology*, 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1970; Gerhardt, P., ed., *Manual of Methods for General Bacteriology*, Washington: Am. Soc. Microbiol, 1981에 개시되어 있으며, 상기 문헌들은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

- [0031] (a-3) 상기 세척된 유산균에 탈지유 안정제의 첨가 및 교반
- [0032] 그리고, 본 발명의 방법은 유산균의 농도가 10^{10} CFU/ml가 되도록 상기 단계 (a-2)의 세척된 유산균에 탈지유 안정제를 첨가하고 교반한다.
- [0033] (a-4) 상기 (a-3)의 결과물인 유산균의 동결 및 진공 건조
- [0034] 그 다음, 상기 단계 (a-3)의 결과물인 유산균을 동결하고 최종 수분함량이 2.0-3.0%가 되도록 진공상태에서 건조한다.
- [0035] 구체적으로, 배양된 유산균을 -42°C 에서 동결한 후, 진공상태에서 18°C 에서 진공 건조하여 최종 수분함량이 2.0-3.0%가 되도록 한다.
- [0036] 상기의 수분함량이 3.0%를 초과한 경우, 입자화되지 않고, 수분함량이 2.0% 미만인 경우에는 유산균이 쉽게 사멸하는 단점이 있다.
- [0037] (a-5) 상기 동결 및 진공 건조된 유산균의 분쇄
- [0038] 마지막으로, 상기 단계 (a-4) 동결 및 진공 건조된 유산균을 60-100 메쉬의 망이 달린 분쇄기를 이용하여 분쇄한다.
- [0039] 바람직한 구현예로서, 동결 및 진공 건조된 유산균 고품분을 80 메쉬의 망이 달린 분쇄기를 이용하여 입자를 크게 하여 총 40kg(수득률 : 20%)의 유산균 분말을 수득한다.
- [0040] 이러한 방법으로 코팅재료로 이용되는 유산균 분말을 제조할 수 있다.
- [0041] (b) 코팅용 유지의 준비
- [0042] 그 다음, 본 발명의 방법은 카나우바 왁스(carnauba wax) 또는 올리브 왁스(olive wax)를 $90-130^{\circ}\text{C}$ 에서 용해하고 스크린필터를 이용하여 여과하여 코팅용 유지를 준비한다.
- [0043] 본 명세서에서 용어 “코팅(coating)”은 물질의 외부를 둘러싸는 것을 말하는 것으로서, 특정 조건하에서 조절된 속도로 코어물질(내용물)을 방출할 수 있도록 코어물질의 외부를 피복하는 것을 의미하고, 특히 본 발명에서는 코어물질인 유산균이 열, 위액, 담즙 등의 외부 환경으로부터 보호되기 위한 목적으로 실시한다.
- [0044] 이러한 코팅을 위하여 본 발명에서는 유지를 채택하였으며, 가장 바람직하게는 카나우바 왁스(carnauba wax) 또는 올리브 왁스(olive wax)를 이용한다.
- [0045] 바람직한 구현예로서, 카나우바 왁스(carnauba wax) 또는 올리브 왁스(olive wax)를 110°C 에서 완전히 용해하여 80 메쉬 스크린필터로 여과하여 준비한다.
- [0046] (c) 이송용 압축공기의 준비
- [0047] 그리고, 본 발명의 방법은 압축공기를 냉각한 후 마이크로 필터로 여과하고, 이를 $70-110^{\circ}\text{C}$ 의 온도로 가열하여 이송용 압축공기를 준비한다.
- [0048] 구체적으로, 압축공기를 전(前)냉각 및 본(本)냉각하고 $1\mu\text{m}$ 및 $0.1\mu\text{m}$ 의 마이크로필터를 이용하여 순차적으로 여과한 다음, 여과한 압축공기를 90°C 에서 가열한 다음 코팅제 이송용 2중 튜브로 이동시킨다.
- [0049] (d) 상기 준비된 압축공기를 이용하여 상기 여과된 코팅용 유지를 코팅제 이송용 튜브로 이송
- [0050] 이어, 본 발명의 방법은 상기 단계 (c)의 준비된 압축공기를 이용하여 상기 단계 (b)의 여과된 코팅용 유지를

코팅제 이송용 튜브로 이송하는 단계를 거친다.

- [0051] 구체적으로 준비한 여과된 카나우바 왁스(carnauba wax) 또는 올리브 왁스(olive wax)를 각각 이송용 2중 튜브에 주입하여 이송용 압축공기에 의해 유산균 분말이 있는 챔버로 이송시킨다.
- [0052] (e) 상기 유산균 분말에 상기 코팅용 유지를 분사하여 코팅(coating)
- [0053] 마지막으로, 본 발명의 방법은 상기 단계 (a)의 부유 상태의 유산균 분말에 상기 단계 (d)의 이송된 코팅용 유지를 분사하여 코팅(coating)하는 단계를 포함한다.
- [0054] 구체적으로, 유산균 분말은 유동층 혼합을 통해 유산균의 미립자가 공기 중에 분산되어 부유 상태를 유지하고, 이송된 왁스를 60분 동안 분사하여 유산균 분말의 외부에 유지를 코팅한다.
- [0055] 이러한 방법으로 코팅된 유산균 분말은 코팅 수율이 95% 이상의 결과를 얻었다.
- [0056] 본 발명의 다른 바람직한 구현예에 따르면, 상기 단계 (e) 코팅용 유지는 코팅 유산균의 총 중량을 기준으로 하여 20-40 중량%로 포함하고, 보다 바람직하게는 25-35 중량%이며, 가장 바람직하게는 최종 제조된 코팅 유산균 분말에 대하여 코팅용 유지(왁스)가 30 중량%가 되도록 코팅된다.
- [0057] 이러한 방법으로 제조된 코팅 유산균은 실시예에서 명확히 입증된 바와 같이, pH 2.1의 인공위액에서, 0.5%의 옥스갈(oxgall)용액에서 그리고, 40℃, 상대습도 70%에서 내산성 및 내담즙성 그리고 가속시험에 대해 우수한 생존율을 보였다.
- [0058] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 본 발명의 방법에 의해 제조된 코팅 유산균을 제공한다.
- [0059] 본 발명의 코팅 유산균은 상술한 본 발명의 방법에 의해 제조된 것으로서, 이 둘 사이에 공통된 내용은 반복 기재에 따른 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.
- [0060] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 보쌈용 수육의 제조방법을 제공한다: (i) 상술한 본 발명의 방법으로 제조된 코팅 유산균을 준비하는 단계; (ii) 상기 단계 (i)의 코팅 유산균, 정제염, 정백당, L-글루타민산나트륨, 마늘분말, 양파분말, 후추분말, 포도당, 소주 및 정제수를 혼합하여 염지액을 준비하는 단계; (iii) 상기 단계 (ii)의 염지액에 돈육을 침지하여 숙성시킨 다음 돈육 표면의 수분을 건조시키는 단계; 및 (iv) 상기 단계 (iii)의 결과물인 돈육을 90-100℃의 물에서 가열하는 단계.
- [0061] 이하, 보쌈용 수육을 제조하기 위한 본 발명의 방법을 단계별로 상세하게 설명하면 다음과 같다:
- [0062] (i) 코팅 유산균의 준비
- [0063] 우선, 본 발명의 방법은 상술한 본 발명의 방법으로 제조된 코팅 유산균을 준비한다.
- [0064] 보쌈용 수육에 이용되는 코팅 유산균은 상술한 본 발명의 방법에 의해 제조된 것으로서, 이 둘 사이에 공통된 내용은 반복 기재에 따른 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.
- [0065] (ii) 염지액의 준비
- [0066] 그 다음, 본 발명의 방법은 상기 단계 (i)의 코팅 유산균, 정제염, 정백당, L-글루타민산나트륨, 마늘분말, 양파분말, 후추분말, 포도당, 소주 및 정제수를 혼합하여 염지액을 준비한다.
- [0067] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 염지액은 정제수 100 중량부에 대하여 코팅 유산균 5-50 중량부, 정제염 5-20 중량부, 정백당 5-20 중량부, L-글루타민산나트륨 5-15 중량부, 마늘분말 15-35 중량부, 양파분말 1-15 중량부, 후추분말 0.5-5 중량부, 포도당 1-10 중량부 및 소주 5-15 중량부를 포함하고, 보다 바람직하게는 정제수 100 중량부에 대하여 코팅 유산균 10-48 중량부, 정제염 7-17 중량부, 정백당 7-17 중량부, L-글루타민

산나트륨 6-13 중량부, 마늘분말 17-33 중량부, 양파분말 3-12 중량부, 후추분말 1-4 중량부, 포도당 2-7 중량부 및 소주 7-13 중량부를 포함하며, 보다 더 바람직하게는 정제수 100 중량부에 대하여 코팅 유산균 15-46 중량부, 정제염 8-13 중량부, 정백당 8-13 중량부, L-글루타민산나트륨 7-10 중량부, 마늘분말 19-33 중량부, 양파분말 4-9 중량부, 후추분말 1-3 중량부, 포도당 3-6 중량부 및 소주 8-12 중량부를 포함한다.

[0068] 상기 염지액에 성분들이 상기 함량을 가지는 경우에 가열 시에도 체내에서 활성을 보일 수 있는 유산균의 생존율을 나타내고, 보쌈 수육의 맛 및 향 등에 영향을 주어 보쌈용 수육의 전체적인 기호도가 우수한 효과를 보인다.

[0069] 상기 염지액에 이용되는 마늘분말, 양파분말 및 후추분말은 당업계에서 공지된 다양한 방법으로 물리적으로 잘게 부수는 예컨대, 전단(shearing), 밀링(milling) 또는 그라인딩방법을 포함하고, 밀, 나이프 커터 또는 믹서기를 이용하여 분말로 제조하여 이용할 수 있다.

[0070] (iii) 상기 염지액에 돈육의 침지 및 숙성 그리고 돈육 표면의 수분 건조

[0071] 그 다음, 본 발명의 방법은 상기 단계 (ii)의 염지액에 돈육을 침지하여 숙성시킨 다음 돈육 표면의 수분을 건조시키는 단계를 거친다.

[0072] 구체적으로, 상기 염지액에 돈육(삼겹살) 15 kg을 2시간 동안 침지하여 숙성을 시킨 후 실온에서 30분 동안 방치하여 돈육 표면의 수분을 건조한다.

[0073] (iv) 상기 단계 (iii)의 결과물인 돈육의 가열

[0074] 마지막으로, 본 발명의 방법은 상기 단계 (iii)의 결과물인 돈육을 90-100℃의 물에서 가열하는 단계를 포함한다.

[0075] 구체적으로, 본 발명의 방법은 수분을 건조시킨 상기 돈육을 90-100℃의 물에서 상태를 보면서 약 90분 정도 가열하여 보쌈용 수육을 제조한다.

[0076] 이러한 방법으로 보쌈용 수육을 제조할 수 있고, 상기 수육에 함유되어 있는 코팅 유산균은 90-100℃의 물에서 가열을 하여도 $1.5 \times 10^4 - 1.7 \times 10^4$ cfu/g의 생존율을 보임을 하기 실시예에서 명확히 확인하였다.

[0077] 그리고, 가열에 의해 생존한 코팅 유산균은 내산성, 내담즙성 및 가속시험에 대한 안정성을 보인 결과, 체내에서 유용할 활성을 보일 것으로 기대된다.

[0078] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 본 발명의 방법에 의해 제조된 보쌈용 수육을 제공한다.

[0079] 본 발명의 보쌈용 수육은 상술한 본 발명의 방법에 의해 제조된 것으로서, 이 둘 사이에 공통된 내용은 반복 기재에 따른 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재 생략한다.

발명의 효과

[0080] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0081] (i) 본 발명은 카나우바 왁스(carnauba wax) 또는 올리브 왁스(olive wax)로 코팅 처리된 코팅 유산균의 제조 방법, 상기 방법에 의해 제조된 코팅 유산균을 함유하는 보쌈용 수육의 제조방법에 관한 것이다.

[0082] (ii) 본 발명의 코팅 유산균은 pH 2.1의 인공위액에서, 0.5%의 옥스갈(oxgall)용액에서 그리고, 40℃, 상대습도 70%에서 내산성 및 내담즙성 그리고 가속시험에 대해 우수한 생존율을 보였다.

[0083] (iii) 또한, 본 발명의 코팅 유산균을 함유하는 보쌈용 수육을 제조하는 과정에서 90-100℃의 온도의 물에서 가열하였음에도, 보쌈용 수육에 존재하는 유산균은 $1.5 \times 10^4 - 1.7 \times 10^4$ cfu/g의 생존율을 보였다.

[0084] (iv) 따라서, 본 발명의 코팅 유산균은 열, 위액, 담즙 등의 외부 환경으로부터 보호되어 상기 코팅 유산균을 함유하는 보쌈용 수육을 제조하더라도 체내에서 유산균의 유용할 활성을 보일 것으로 기대된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0085] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0086] **실시예**

[0087] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 “% “는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (중량/중량) %, 고체/액체는 (중량/부피) %, 그리고 액체/액체는 (부피/부피) %이다.

[0088] **제조예 1: 코팅 유산균 분말의 제조**

[0089] 본 발명에서는 유산균으로 락토바실러스 카세이(*Lactobacillus casei*, Cell Biotech)를 사용하였으며, 증류수 1 L, 프로테오스 펩톤 10 g, 우육추출물 10 g, 효모추출물 5 g, 포도당 20 g, 트윈 80 1 g, 구연산암모늄 2 g, 초산나트륨 5 g, 황산마그네슘 0.1 g, 황산망간 0.05 g 및 인산나트륨 2 g을 포함하는 MRS 배지에 접종한 후 37 °C에서 12시간 동안 정지 배양하여 유산균의 농도가 10^{10} - 10^{11} CFU/ml가 되도록 하였다. 이어, 6,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 배양된 유산균을 수집하였으며, 이를 생리식염수(0.8% 염화나트륨)로 두 번 세척하였다. 유산균의 농도가 10^{10} CFU/ml가 되도록 탈지유 안정제를 첨가한 후 교반기를 이용하여 균일하게 교반하였다.

[0090] 그리고, 배양된 유산균을 -42°C에서 동결한 후, 진공상태에서 18°C에서 진공 건조하여 최종 수분함량이 2.0-3.0% 미만으로 하였다. 동결 및 진공 건조된 유산균 고형분을 80 메쉬의 망이 달린 분쇄기를 이용하여 입자를 고르게 하여 총 40kg(수득률 : 20%)의 유산균 분말을 수득하였다

[0091] 한편, 카나우바 왁스(carnauba wax) 또는 올리브 왁스(olive wax)를 약 110°C에서 완전히 용해하여 80 메쉬 스크린필터로 여과하여 준비하였다. 그리고, 압축공기를 전(前)냉각 및 본(本)냉각하고 1µm 및 0.1µm의 마이크로필터를 이용하여 순차적으로 여과한 다음, 여과한 압축공기를 90°C에서 가열한 다음 코팅제 이송용 2중 튜브로 이동시켰다. 준비한 여과된 카나우바 왁스(carnauba wax) 또는 올리브 왁스(olive wax)를 각각 이송용 2중 튜브에 주입하여 이송용 압축공기에 의해 유산균 분말이 있는 챔버로 이송시켰다. 이때, 유산균 분말은 유동층 혼합을 통해 유산균의 미립자가 공기 중에 분산되어 부유 상태를 유지하고, 이송된 왁스를 60분 동안 분사하여 최종 제조된 코팅 유산균 분말에 대하여 각각의 왁스가 30 중량%가 되도록 코팅하였다. 이때, 코팅 수율은 96%를 얻었으며, 상기 방법으로 반복적으로 코팅을 3회 실시한 결과, 모두 코팅 수율은 95% 이상의 결과를 얻었다.

[0092] **실험예 1: 코팅 유산균 분말의 내산성, 내담즙성 및 가속 시험**

[0093] 상기 제조예 1에서 준비한 코팅 유산균 분말(카나우바 왁스-코팅 유산균 분말(실시예 1) 또는 올리브 왁스-코팅 유산균 분말(실시예 2)) 및 코팅되지 않은 유산균 분말(락토바실러스 카세이)(비교예 1)에 대하여 내산성, 내담즙성 및 가속시험 안정성을 시험하였다. 구체적으로, 내산성 시험은 유산균 3.2×10^9 cfu/g을 pH 2.1의 인공위액에서, 그리고 내담즙성 시험은 3.4×10^9 cfu/g을 0.5%의 옥스갈(oxgall)용액에서 30, 60, 90 및 120분 동안 각각 반응시키고 생리식염수를 사용하여 십진 희석법으로 희석한 후, 고체 배지(agar plate)에 도말하여 유산균의 수를 계수하고, 그 결과는 아래 표 1에 정리하였다. 그리고, 가속시험은 유산균 3.5×10^9 cfu/g을 40°C, 상대 습도 70%에서 10, 20, 30 및 40일 동안 보존하고, 생리식염수를 사용하여 십진 희석법으로 희석한 후, 고체 배지(agar plate)에 도말하여 유산균의 수를 계수하고, 그 결과를 아래 표 2에 나타내었다. 한편, 비교예 1의 코팅되지 않은 유산균 분말은 상기 제조예 1에서 유산균을 배양하는 조건과 동일한 방법으로 배양하였으며, 배양된 유산균을 -42°C에서 동결한 후, 진공상태에서 18°C에서 진공 건조하여 최종 수분함량이 2.0-3.0% 미만으로 하여 이용하였다.

표 1

내산성 시험				내담즙성 시험			
노출시간 (분)	실시예1 (cfu/g)	실시예2 (cfu/g)	비교예1 (cfu/g)	노출시간 (분)	실시예1 (cfu/g)	실시예2 (cfu/g)	비교예1 (cfu/g)
0	3.2x10 ⁹	3.2x10 ⁹	3.2x10 ⁹	0	3.4x10 ⁹	3.4x10 ⁹	3.3x10 ⁹
30	3.2x10 ⁹	3.1x10 ⁹	3.0x10 ⁹	30	3.2x10 ⁹	3.3x10 ⁹	2.6x10 ⁹
60	3.0x10 ⁹	3.0x10 ⁹	2.4x10 ⁹	60	3.1x10 ⁹	3.2x10 ⁹	2.1x10 ⁹
90	2.8x10 ⁹	2.7x10 ⁹	1.8x10 ⁹	90	2.8x10 ⁹	2.9x10 ⁹	1.7x10 ⁹
120	2.5x10 ⁹	2.4x10 ⁹	1.0x10 ⁹	120	2.6x10 ⁹	2.7x10 ⁹	1.2x10 ⁹
생존율 (%)	78	75	31	생존율 (%)	76	79	36

[0094]

표 2

가속시험			
노출시간 (분)	실시예1 (cfu/g)	실시예2 (cfu/g)	비교예1 (cfu/g)
0	3.5x10 ⁹	3.5x10 ⁹	3.4x10 ⁹
10	3.3x10 ⁹	3.2x10 ⁹	2.1x10 ⁹
20	3.0x10 ⁹	2.9x10 ⁹	1.5x10 ⁹
30	2.8x10 ⁹	2.8x10 ⁹	0.8x10 ⁹
40	2.3x10 ⁹	2.4x10 ⁹	0.2x10 ⁹
생존율 (%)	66	67	6

[0095]

[0096]

상기 표 1 및 2에서 볼 수 있듯이, 실시예 1 및 2의 코팅된 유산균은 코팅되지 않은 유산균(비교예 1)에 비해서 내산성, 내담즙성 및 가속시험의 안정성에 있어 우수한 생존율을 보임을 알 수 있었다.

[0097]

제조예 2: 코팅유산균 분말을 포함하는 염지액의 제조

[0098]

다음 표 3과 같은 조성으로 각 성분을 칭량하여 코팅 유산균을 포함하는 염지액 3 L를 제조하였다:

표 3

-	실시예 3 (중량%)	실시예 4 (중량%)	실시예 5 (중량%)	실시예 6 (중량%)	비교예 2 (중량%)	비교예 3 (중량%)
실시예 1의 유산균 분말	10	20	-	-	-	-
실시예 2의 유산균 분말	-	-	10	20	-	-
비교예 1의 유산균 분말	-	-	-	-	10	20
정제염	5	5	5	5	5	5
정백당	5	5	5	5	5	5
L-글루타민산나트륨 (향미증진제)	4	4	4	4	4	4
마늘가루	15	10	15	10	15	10
양파가루	3	3	3	3	3	3
후추가루	1	1	1	1	1	1
포도당	2	2	2	2	2	2

[0099]

소주	5	5	5	5	5	5
정제수	50	45	50	45	50	45
합계	100	100	100	100	100	100

[0100] **제조예 3: 보쌈용 수육의 제조**

[0101] 상기 제조예 2에서 준비한 염지액에 돈육(삼겹살, 오스트리아산) 15 kg을 2시간 동안 침지하여 숙성을 시킨 후 실온에서 30분 동안 방치하여 돈육 표면의 수분을 건조하였다. 수분을 건조시킨 상기 돈육을 95℃의 온도의 물에서 상태를 보면서 약 90분 정도 삶아 보쌈용 수육을 제조하였다. 상기 제조예 2에서 준비한 염지액으로 제조한 각각의 보쌈용 수육을 각각 실시예 3 내지 6 그리고 비교예 2 및 3으로 이용하였다.

[0102] **실험예 2: 보쌈용 수육의 유산균 수 측정**

[0103] 상기 제조예 3에서 준비한 보쌈용 수육의 유산균의 수는 생리식염수를 사용하여 십진 희석법으로 희석한 후, 고체 배지(agar plate)에 도말하여 유산균의 수를 계수하였다. 그 결과는 아래 표 4에 정리하였다:

표 4

-	실시예 3 (cfu/g)	실시예 4 (cfu/g)	실시예 5 (cfu/g)	실시예 6 (cfu/g)	비교예 2 (cfu/g)	비교예 3 (cfu/g)
가열 전	2.8x10 ⁷	2.8x10 ⁷	2.9x10 ⁷	2.9x10 ⁷	2.3x10 ⁷	2.3x10 ⁷
가열 후	1.5x10 ⁴	1.7x10 ⁴	1.6x10 ⁴	1.7x10 ⁴	3.8x10	3.6x10

[0105] 상기 표 4에서 볼 수 있듯이, 실시예 3 내지 6의 보쌈용 수육은 비교예 2 및 3의 보쌈용 수육에 비해서 가열 후에도 우수한 생존율을 보임을 알 수 있어, 카나우바 왁스 또는 올리브 왁스로 코팅된 유산균 분말을 이용하여 보쌈용 수육을 제조하면 생존율 및 안정성(stability)이 우수한 코팅 유산균을 체내에서 이용할 수 있다고 판단된다.

[0106] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.