



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년07월05일
(11) 등록번호 10-1280232
(24) 등록일자 2013년06월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 11/02 (2006.01) C12N 1/20 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0134486

(22) 출원일자 2011년12월14일

심사청구일자 2011년12월14일

(65) 공개번호 10-2013-0067682

(43) 공개일자 2013년06월25일

(56) 선행기술조사문헌

KR101000364 B1

KR1020060118037 A

KR1020070104140 A

(73) 특허권자

일동제약주식회사

서울특별시 서초구 바우피로27길 2 (양재동)

(72) 발명자

이승훈

경기도 용인시 기흥구 신갈동 새릉골풍림아파트
101동 1403호

강대중

경기도 용인시 기흥구 보라동 현대모닝사이드1차
아파트 309-404

강재훈

서울시 강남구 대치동 국제아파트 2-303

(74) 대리인

이희숙

전체 청구항 수 : 총 8 항

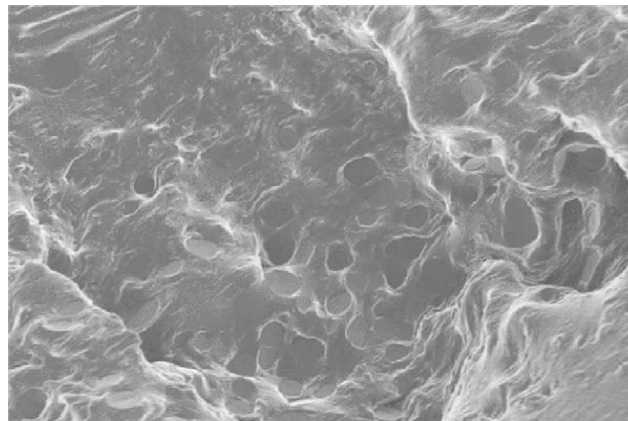
심사관 : 한지혜

(54) 발명의 명칭 4중 코팅 유산균의 제조방법 및 그 방법으로 제조된 4중 코팅 유산균

(57) 요약

본 발명은 4중 코팅된 유산균의 제조방법, 그 방법으로 제조된 4중 코팅된 유산균을 제공한다. 본 발명의 방법으로 코팅된 유산균은 유산균에 수용성 폴리머, 히알루론산, 다공성 입자를 가지는 코팅제, 단백질을 혼합하여 4중 코팅함으로써, 종래 비코팅, 단일, 2중, 3중코팅 유산균군에 비하여 내산성 및 내담즙성이 우수하고, 저온 또는 고온으로 인한 사멸율이 낮으므로, 유산균 본래의 생리활성 기능을 소실하지 않을 수 있다. 따라서 본 발명의 코팅 방법은 유산균의 생리활성 기능을 유지할 수 있게 하여 산업적으로 유용한 방법이다.

대표도 - 도5



특허청구의 범위

청구항 1

- (a) 유산균에 수용성 폴리머를 혼합하여 1차 코팅하는 단계;
- (b) 상기 (a)단계에서 1차 코팅된 유산균에 히알루론산을 혼합하여 2차 코팅하는 단계;
- (c) 상기 (b)단계에서 2차 코팅된 유산균에 다공성 입자를 가지는 코팅제를 혼합하여 3차 코팅하는 단계; 및
- (d) 상기 (c)단계에서 3차 코팅된 유산균에 단백질을 혼합하여 4차 코팅하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 4중 코팅된 유산균의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 (a)단계에서 수용성폴리머는 카르복시메틸셀룰로오스(carboxymethyl cellulose, CMC), 하이드록시에틸셀룰로오스(hydroxyethylcellulose, HEC), 잔탄검(xanthan gum, XG), 구아검(guar gum, GG), 폴리비닐피롤리돈 (polyvinylpyrrolidone, PVP), 카보폴(carbopol), 소듐알기네이트(sodium alginate), 프로필렌 글리콜 알기네이트(propylene glycol alginate)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 4중 코팅된 유산균의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 (c)단계에서 다공성 입자를 가지는 코팅제는 알지네이트(alginate), 말토덱스트린(maltodextrin, MD), 키토산(chitosan), 전분(starch), 폴리에틸렌글리콜(polyethyleneglycol, PEG), 트리아세틴(triacetin), 프로필렌 글리콜(propylene glycol), 아세틸트리에틸 시트레이트(acetyl triethyl citrate), 트리에틸 시트레이트(triethyl citrate), 또는 글리세린(glycerin)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 4중 코팅된 유산균의 제조방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 (d)단계에서 단백질은 탈지분유, 유청단백, 분리대두단백으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 4중 코팅된 유산균의 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 유산균은 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.), 비피도박테리움 속(*Bifidobacterium* sp.), 스트렙토코커스 속(*Streptococcus* sp.), 락토코커스 속(*Lactococcus* sp.), 엔테로코커스 속(*Enterococcus* sp.), 페디오코커스 속(*Pediococcus* sp.), 류코노스톡 속(*Leuconostoc* sp.), 비셀라 속(*Weissella* sp.)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 4중 코팅된 유산균의 제조방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 (a)단계에서 상기 수용성 폴리머는 유산균 배양액 100 중량부 대비 0.1중량부 내지 10중량부의 비율로 혼합하여 1차 코팅하는 단계;

상기 (b)단계에서 상기 히알루론산은 유산균 배양액 100 중량부 대비 0.001중량부 내지 5중량부의 비율로 혼합하여 2차 코팅하는 단계;

상기 (c)단계에서 상기 다공성 입자를 가지는 코팅제는 유산균 배양액 100 중량부 대비 0.1중량부 내지 10중량

부의 비율로 혼합하여 3차 코팅하는 단계; 및

상기 (d)단계에서 상기 단백질은 유산균 배양액 100 중량부 대비 1중량부 내지 30중량부의 비율로 혼합하여 4차 코팅하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 4중 코팅된 유산균의 제조방법.

청구항 7

제1항의 제조방법으로 제조된 4중 코팅된 유산균.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 유산균은 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.), 비피도박테리움 속(*Bifidobacterium* sp.), 스트렙토코커스 속(*Streptococcus* sp.), 락토코커스 속(*Lactococcus* sp.), 엔테로코커스 속(*Enterococcus* sp.), 페디오코커스 속(*Pediococcus* sp.), 류코노스톡 속(*Leuconostoc* sp.), 비셀라 속(*Weissella* sp.)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 4중 코팅된 유산균.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 4중 코팅 유산균의 제조방법, 그 방법으로 제조된 4중 코팅 유산균에 관한 것이다. 보다 상세하게는 본 발명은 수용성 폴리머, 히알루론산, 다공성 입자를 가지는 코팅제, 단백질로 4중 코팅된 유산균의 제조방법, 상기 방법으로 제조된 4중 코팅된 유산균에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 유산균(lactic acid bacteria)은 락트산 균 또는 젖산균이라고도 하며, 포유류의 장내에 서식하여 잡균에 의한 이상발효를 방지해 정장제(整腸劑)로도 이용되는 유용한 세균이다. 예를 들어, 불가리아젖산균(*L. bulgaricus*)은 가장 오래 전부터 알려진 유산균으로, 요구르트의 제조에 사용되며 치즈나 발효 버터 제조시의 스타터로도 사용된다. 또한, 호기성 젖산균(*L. acidophilus*)은 사람 및 모든 포유류와 그 밖의 동물의 장에 존재하며, 버터 또는 우유의 제조나 장내 자가 중독의 치료에 사용되기도 한다. 한편 락티스 젖산구균(*L. lactis*)은 DL-젖산을 생성하며, 항상 우유 속에 존재하여 버터 또는 치즈 제조에 사용되고 낙농용 젖산균으로서 가장 중요한 균이다.

[0003] 상기와 같이 유용한 유산균은 장에 정착하여 장관운동 활성화, 유해균 억제, 비타민 및 면역증강 물질 촉진 등 다양한 생리활성 효과를 발휘하는데, 인체의 구조상 사람이 유산균을 섭취하면 유산균이 위산 또는 담즙 산으로 인해 사멸하여 유산균 본래의 생리활성 기능을 발휘하지 못하게 되는 경우가 많았다.

[0004] 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해, 유산균을 코팅하는 방법이 개발되었는데, 종래 유산균의 코팅 기술로는 캡슐제를 이용한 장용코팅제와 젤라틴, 당류, 껌류 등을 이용한 마이크로캡슐화(microencapsulation) 공정 등이 있었다.

[0005] 구체적으로 종래 유산균의 코팅 기술은 유산균체의 회수 공정 이후에 코팅제를 투입하는 별도의 코팅공정에 의해 실시되는 것을 특징으로 하였다. 보다 구체적으로 종래 유산균 코팅공정은 유산균 분말에 매우 미세한 구형의 비드(Bead) 형성능이 있는 수용액상의 코팅제 조성물이 가해지고, 교반 및 혼합 후 동결 건조하는 것을 특징으로 하였다.

[0006] 상기의 종래 유산균의 코팅 기술은 통상의 방법으로 배양된 유산균체를 회수하고 건조시켜 분말화한 다음, 코팅제 조성물을 혼합하여 교반하는 공정이 이루어지므로, 고가의 코팅제 및 공정추가에 따르는 비용부담이 발생하며 기타 미생물의 혼입이 우려되므로 무균조작에 어려움이 발생하는 문제점이 지적되었으며, 또한 액상 코팅 후 동결 건조하는 과정에서는 우수한 생존률 및 안정성을 확보하기 위해서 동결보호제 및 안정제의 사용이 필요하므로 재료 또는 공정의 충돌이나 중복이 발생하는 문제점이 있었다.

[0007] 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여, 공기, 수분과의 직접적인 반응이 억제되며 내열성, 내산성 및 내담즙성이 강화되어 생균 안정성 및 가공 안정성이 증강된 3중 코팅 유산균의 제조방법(대한민국 특허출원 제10-2008-

10397호)이 개발되었다. 구체적으로 상기 제조방법은 저렴한 단백질 소재를 이용하여 단백질로 단일 코팅된 유산균을 제조한 다음, 잔탄검(xantan gum), 셀룰로즈(cellulose) 또는 리벤(levan)과 같은 다당류를 사용하여 2중 코팅하고, 젤라틴(gelatin), 카세인(casein), 레시틴(lecithin)과 같은 나노입자를 사용하여 3중 코팅하는 것을 특징으로 하였다.

[0008] 그러나 상기의 개선된 종래 유산균의 코팅 기술 또한 유산균의 표면을 완전히 코팅할 수 없어, 상기의 방법으로 제조된 유산균은 내열성, 내산성 및 내담즙성이 충분히 우수하지 못한 문제점이 여전히 지적되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 이에 본 발명자들은 4중 코팅기술 이용하여, 내열성, 내산성 및 내담즙성이 우수한 수용성 폴리머, 히알루론산, 다공성 입자를 가지는 코팅제, 단백질로 4중 코팅된 유산균의 제조방법을 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기와 같은 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은

[0011] ((a) 유산균에 수용성 폴리머를 혼합하여 1차 코팅하는 단계;

[0012] (b) 상기 (a)단계에서 1차 코팅된 유산균에 히알루론산을 혼합하여 2차 코팅하는 단계;

[0013] (c) 상기 (b)단계에서 2차 코팅된 유산균에 다공성 입자를 가지는 코팅제를 혼합하여 3차 코팅하는 단계; 및

[0014] (d) 상기 (c)단계에서 3차 코팅된 유산균에 단백질을 혼합하여 4차 코팅하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 4차 코팅된 유산균의 제조방법을 제공한다.

[0015] 또한 본 발명은 상기의 제조 방법으로 제조된 4중 코팅된 유산균을 제공한다.

[0016] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0017] 본 발명의 4중 코팅된 유산균 제조방법은

[0018] (a) 유산균에 수용성 폴리머를 혼합하여 1차 코팅하는 단계;

[0019] (b) 상기 (a)단계에서 1차 코팅된 유산균에 히알루론산을 혼합하여 2차 코팅하는 단계;

[0020] (c) 상기 (b)단계에서 2차 코팅된 유산균에 다공성 입자를 가지는 코팅제를 혼합하여 3차 코팅하는 단계; 및

[0021] (d) 상기 (c)단계에서 3차 코팅된 유산균에 단백질을 혼합하여 4차 코팅하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0022] (a) 유산균에 수용성 폴리머를 혼합하여 1차 코팅하는 단계:

[0023] 상기 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. 구체적으로 본 발명의 균체 박막코팅제로 사용된 수용성 폴리머는 이에 한정되지는 않지만 카르복시메틸셀룰로오스(carboxymethyl cellulose, CMC), 하이드록시에틸셀룰로오스(hydroxyethylcellulose, HEC), 잔탄검(xanthan gum, XG), 구아검(guar gum, GG), 폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone, PVP), 카보폴(carbopol), 소듐알기네이트(sodium alginate), 프로필렌 글리콜 알기네이트(propylene glycol alginate)으로 이루어진 군에서 선택되는 것이 바람직하다. 더욱 바람직하게는 카르복시메틸셀룰로오스(carboxymethyl cellulose, CMC), 하이드록시에틸셀룰로오스(hydroxyethylcellulose, HEC), 잔탄검(xanthan gum, XG), 구아검(guar gum, GG), 폴리비닐피롤

리돈 (polyvinylpyrrolidone, PVP) 또는 카보폴(carbopol)이며, 바람직하게는 카르복시메틸셀룰로오스(carboxymethyl cellulose, CMC), 하이드록시에틸셀룰로오스(hydroxyethylcellulose, HEC), 잔탄검(xanthan gum, XG), 구아검(guar gum, GG), 폴리비닐피롤리돈 (polyvinylpyrrolidone, PVP) 또는 카보폴(carbopol), 가장 바람직하게는 폴리비닐피롤리돈 (polyvinylpyrrolidone, PVP)이다.

[0024] 또한 상기 유산균은 이에 한정되지는 않지만 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.), 비피도박테리움 속(*Bifidobacterium* sp.), 스트렙토코커스 속(*Streptococcus* sp.), 락토코커스 속(*Lactococcus* sp.), 엔테로코커스 속(*Enterococcus* sp.), 페디오코커스 속(*Pediococcus* sp.), 류코노스톡 속(*Leuconostoc* sp.), 바이셀라 속(*Weissella* sp.)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유산균이며, 바람직하게는 *Lactobacillus acidophilus* IDCC 3302, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus plantum*, *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus faecium*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Pediococcus acidolacticii*, *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc carnosum*, *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc gasicomitatum*, *Leuconostoc gellidum*, *Leuconostoc inhae*, *Leuconostoc kimchii*, *Leuconostoc lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Leuconostoc paramesenteroides*, *Weissella cibaria*, *Weissella confusa*, *Weissella koreensis*, *Weissella soli*, *Weissella viridescens*로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유산균, 더 바람직하게는 *Lactobacillus acidophilus* IDCC 3302이다.

[0025] 상기 수용성 폴리머는 유산균 배양액 100중량부 대비 0.1 중량부 내지 10 중량부의 비율로 혼합하여 1차 코팅한다. 바람직하게는 유산균 배양액 100 중량부 대비 수용성 폴리머 0.1 중량부 내지 5 중량부로 혼합하고, 가장 바람직하게는 0.1 중량부 내지 0.5 중량부로 혼합한다.

[0026] 본 발명의 일실시예에서는 폴리비닐피롤리돈이 유산균의 표면에 막막(film)구조를 형성하고 기체 차단성을 높여 유산균의 생존율을 높이고 바인더로써 2차 코팅제인 히알루론산과의 결합력이 우수함을 확인하였다(표 1 참조). 따라서 이 기체를 중합도에 따라 폴리비닐피롤리돈 K-25, K-30, K-90으로 구분하여 락토바실러스 아시도필루스 IDCC 3302의 1차 코팅 원료를 조제하여 생균수를 MRS agar plate에서 각각 평가하였다.

[0027] 그 결과, 폴리비닐피롤리돈 K-25를 락토바실러스 아시도필루스 IDCC 3302 균체에 0.1 %(w/v)로 사용하였을 때 가장 높은 생존균수를 나타내었다(표 2 참조).

[0028] (b) 상기 (a)단계에서 1차 코팅된 유산균에 히알루론산을 혼합하여 2차 코팅하는 단계:

[0029] 상기 (b)단계에서 (a)단계의 1차 코팅된 유산균에 히알루론산을 혼합하여 2차 코팅한다. 상기 히알루론산은 수분활성 조절기능의 천연 고분자 물질로서 외부유입수분을 제어한다.

[0030] 상기 히알루론산은 유산균 배양액 100중량부 대비 히알루론산 0.01 중량부 내지 5중량부, 바람직하게는 0.001 중량부 내지 0.05 중량부, 더욱 바람직하게는 0.001 중량부 내지 0.005 중량부로 혼합된다.

[0031] 본 발명의 일실시예에서는 히알루론산의 최적 농도를 산출하기 위해 폴리비닐피롤리돈 K-25의 농도에 따른 히알루론산 농도를 조합하여 락토바실러스 아시도필루스 IDCC 3302의 2차 코팅 원료를 조제한 후, 생균수를 MRS agar plate에서 각각 평가하였다.

[0032] 그 결과, 폴리비닐피롤리돈 0.1 %(w/v)와 히알루론산 0.001 %(w/v)를 사용하여 2차 코팅한 락토바실러스 아시도필루스 IDCC 3302의 발현균수가 가장 높게 평가되었다(표 3 참조).

[0033] (c) 상기 (b)단계에서 2차 코팅된 유산균에 다공성 코팅제를 혼합하여 3차 코팅하는 단계:

[0034] 상기 다공성 코팅제는 균체에 다공성 입자성을 가진 기체의 코팅제로서, 외부 수분 및 습윤 공기의 유입을 차단시키기 역할을 한다. 마이크로캡슐화(microencapsulation)에 사용되며, 다공성 입자를 가지는 것은 상기 3차 코팅제로 사용가능하며, 구체적으로는 이에 한정되지는 않지만 알기네이트(alginate), 말토덱스트린(maltodextrin, MD), 키토산(chitosan), 전분(starch), 폴리에틸렌글리콜(polyethyleneglycol, PEG), 트리아세

틴(triacetin), 프로필렌 글리콜(propylene glycol), 아세틸트리에틸 시트레이트(acetyl triethyl citrate), 트리에틸 시트레이트(triethyl citrate), 또는 글리세린(glycerin)이 포함되며, 바람직하게는 알기네이트(alginate), 말토덱스트린(maltodextrin, MD), 키토산(chitosan), 전분(starch) 또는 폴리에틸렌글리콜(polyethyleneglycol, PEG)일 수 있으며, 더 바람직하게는 말토덱스트린(maltodextrin, MD)을 말한다.

[0035] 상기 다공성 코팅제는 유산균 배양액 100중량부 대비 0.1 중량부 내지 10 중량부의 비율, 바람직하게는 0.1 중량부 내지 5 중량부, 더욱 바람직하게는 0.1 중량부 내지 0.5 중량부로 혼합된다.

[0036] 본 발명의 일실시예에서는 코팅제의 마이크로캡슐화 효과가 상대적으로 가장 높은 기제로 선정된 3차 코팅제인 말토덱스트린과, 2차 코팅제인 히알루론산과의 가장 최적의 결합효율을 구성하기 위해 히알루론산 농도에 따른 말토덱스트린 농도를 조합하여 락토바실루스 아시도필루스 IDCC 3302의 3차 코팅 원료를 조제한 후, 생균수를 MRS agar plate에서 각각 평가하였다.

[0037] 그 결과, 히알루론산 0.001 %(w/v)와 말토덱스트린 0.4 %(w/v)를 사용하여 3차 코팅한 락토바실루스 아시도필루스 IDCC 3302의 발현균수가 가장 높게 평가되었다.

[0038] (d) 상기 (c)단계에서 3차 코팅된 유산균에 단백질을 혼합하여 4차 코팅하는 단계:

[0039] 상기 단백질은 3차 코팅된 유산균에 다공성 입자구조를 가진 3차 코팅제의 공극을 채우기 위하여 혼합되며, 이에 한정되지는 않지만 바람직하게는 탈지분유, 유청단백, 분리대두단백으로 이루어진 군에서 선택된 단백질, 바람직하게는 유청단백을 말한다.

[0040] 상기 4차 코팅제인 단백질은 유산균 배양액 100중량부 대비 단백질 1중량부 내지 30중량부의 비율로 혼합되며, 바람직하게는 1중량부 내지 10중량부, 가장 바람직하게는 5 내지 10 중량부로 혼합된다.

[0041] 본 발명의 일실시예에서는 락토바실루스 아시도필루스 IDCC 3302의 3차 코팅제로 말토덱스트린 0.4 %(w/v)를 최적 농도로 선정한 후, 다공성 입자구조를 가진 말토덱스트린의 공극을 채울 단백질의 종류를 선발하고 최적농도를 산출하기 위해, 평가한 결과, 유산균 배양액 100 중량부 대비 폴리비닐피롤리돈 K-25 0.1 %(w/v), 히알루론산 0.001 %(w/v), 말토덱스트린 0.4 %(w/v), 유청단백 6 %(w/v)를 사용하였을 때 4차 코팅한 락토바실루스 아시도필루스 IDCC 3302의 발현균수가 가장 높게 평가되었다.

[0042] 상기 본 발명의 방법으로 4중 코팅된 유산균은 구조적으로 안정하여 수분, 공기등의 외부 환경인자를 효율적으로 차단시켜 높은 경시적 안정성을 나타낼 수 있으며, 이에 의하여 종래 비코팅, 단일 코팅, 2중 코팅, 3중 코팅된 유산균에 비하여 내산성, 내담즙성이 월등하다. 이외에도 4℃의 냉장 보관 실험이나 15℃, 25℃, 37℃에서의 보관 실험과 -70℃에서의 동결 실험 및 50℃에서의 열풍건조 실험에서도 종래 비코팅, 단일 코팅, 2중 코팅, 3중 코팅된 유산균에 비하여 본 발명에 의한 4중 코팅된 유산균이 다수 생존하였다 (실시예 2 내지 8 참조)

[0043] 또한 본 발명의 4중 코팅된 유산균은 상기와 같은 방법으로 제조된 것을 특징으로 한다. 따라서 본 발명의 4중 코팅된 유산균은 종래 비코팅, 단일 코팅, 2중 코팅, 3중 코팅된 유산균에 비하여 내산성, 내담즙성이 월등히 우수하며, 동결건조시 세포질 결정화로 인한 세포사멸율이 낮고, 열풍건조방식에서 건조온도에 노출되었을 때, 열안정성이 높기에, 위산 또는 담즙산, 저온 또는 고온으로 인해 사멸되어 유산균 본래의 생리활성 기능이 소실되지 않을 수 있다.

발명의 효과

[0044] 따라서, 본 발명은 4중 코팅된 유산균의 제조방법, 그 방법으로 제조된 4중 코팅된 유산균을 제공한다. 본 발명의 방법으로 코팅된 유산균은 유산균에 수용성 폴리머, 히알루론산, 다공성 입자를 가지는 코팅제, 단백질을 혼합하여 4중 코팅함으로써, 종래 비코팅, 단일, 2중, 3중코팅 유산균에 비하여 내산성 및 내담즙성이 우수하고, 저온 또는 고온으로 인한 사멸율이 낮으므로, 유산균 본래의 생리활성 기능을 소실하지 않을 수 있다. 따라서 본 발명의 코팅 방법은 유산균의 생리활성 기능을 유지할 수 있게 하여 산업적으로 유용한 방법이다.

도면의 간단한 설명

- [0045] 도 1은 본 발명에 사용된 락토바실루스 아시도필루스 IDCC 3302의 형상을 나타낸 사진이다.
- 도 2는 락토바실루스 아시도필루스 IDCC 3302에 폴리비닐피롤리돈 K-25를 혼합하여 1차 코팅된 유산균의 형상을 나타낸 사진이다.
- 도 3은 도 2의 1차 코팅된 유산균에 히알루론산을 혼합하여 2차 코팅된 유산균의 형상을 나타낸 사진이다.
- 도 4는 도3의 2차 코팅된 유산균에 말토덱스트린을 혼합하여 3차 코팅된 유산균의 형상을 나타낸 사진이다.
- 도 5는 도4의 3차 코팅된 유산균에 유청단백을 혼합하여 4차 코팅된 유산균의 형상을 나타낸 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0046] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.
- [0047] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0048] <실시예 1>
- [0049] **4중코팅 유산균 조제**
- [0050] <1-1> 1차 박막코팅제 선정 및 최적농도
- [0051] 유산균 표면 접합력이 우수하여 코팅시 외부공기의 유입을 차단하고 2차 코팅제인 히알루론산과의 결합력이 우수한 바인더(binder)를 선정하였다. 이때 선정기준은 유산균의 대부분이 혐기성균(anaerobe)이므로 기체 차단성이 우수하며 식품 및 의약품용으로 사용할 수 있는 기체를 선정하였다.
- [0052] 본 발명에서는 균체 박막코팅제로 다음과 같은 폴리머를 사용한다. 본 발명에 유용하고 적절한 폴리머로 셀룰로오스 계열로 카르복시메틸셀룰로오스(carboxymethyl cellulose, CMC), 하이드록시에틸셀룰로오스(hydroxyethylcellulose, HEC), 검(gum)계열의 폴리머로 잔탄검(xanthan gum, XG), 구아검(guar gum, GG), 합성 폴리머계열로 폴리비닐피롤리돈 (polyvinylpyrrolidone, PVP), 카보폴(carbopol)을 포함한다. 상기의 폴리머는 락토바실루스 아시도필루스 IDCC 3302 (*Lactobacillus acidophilus* IDCC 3302) 배양액을 원심분리하여 수득된 균체에 일정량을 직접 첨가하여 균일화시킨 후 균체표면의 박막코팅이 되도록 한다. 상기 폴리머는 상기 락토바실루스 아시도필루스 IDCC 3302 (*Lactobacillus acidophilus* IDCC 3302) 배양액 100ml 당 각각 0.2g 씩 첨가하였다. 1차 박막코팅된 유산균을 분산매에 현탁시켜, -70℃ deep freezer에 3시간 동안 냉동시켰다. 냉동 1차 박막코팅 유산균 샘플을 동결 건조하여 분말화시킨 후, 생존균수를 측정하여 가장 높은 생존율을 보인 실험군을 1차 박막코팅 결합제로 선정하였다.

표 1

[0053] 1차 박막코팅제 선정시험결과

구분	None	CMC	HEC	XG	GG	PVPK-30	Carbopol
생존율 (%)	33.4	51.4	48.9	45.7	48.6	72.5	62.5

- [0054] 그 결과, [표 1]에서 보는 바와 같이 의약품 및 식품에서 결합제로 많이 사용되고 있는 폴리비닐피롤리돈이 다른 폴리머보다 상대적으로 높은 생존율을 나타내어 제조공정에서 유입되는 수분, 공기등의 위험인자에 대해 효율이 높은 방어기작을 나타내었다.

- [0055] 선정된 폴리비닐피롤리돈 K-30이 유산균의 표면에 박막(film)구조를 형성하고 기체 차단성을 높여 유산균의 생존율을 높이고 바인더로써 2차 코팅제인 히알루론산과의 결합력이 우수함을 확인하였다. 따라서 이 기체를 중합도에 따라 폴리비닐피롤리돈 K-25, K-30, K-90으로 구분하여 상기에서 기재된 방법과 동일하게 상기 락토바실루스 아시도필루스 IDCC 3302 (*Lactobacillus acidophilus* IDCC 3302) 배양액 100ml 당 0.1g 내지 0.5g 씩 첨가하여, 락토바실루스 아시도필루스 IDCC 3302을 1차 코팅하였다. 생존균수를 MRS agar plate에서 각각 평가하여

최종 선정하였다.

표 2

[0056] 락토바실러스 아시도필루스 IDCC 3302 적용 1차 코팅제 선정시험 결과

종류 w/v(%)	PVPK-25 (x 10 ⁸ CFU/g)	PVPK-30 (x 10 ⁸ CFU/g)	PVPK-90 (x 10 ⁸ CFU/g)
None	200	210	225
1	680	560	310
2	520	420	205
3	460	350	140
4	310	110	60
5	250	80	35

[0057] 그 결과, [표 2]에서 보는 바와 같이, 폴리비닐피롤리돈 K-25를 락토바실러스 아시도필루스 IDCC 3302 균체에 0.1% 사용하였을 때 상대적으로 가장 높은 생존균수를 나타내었다.

[0058] <1-2> 2차 코팅제 히알루론산의 최적농도

[0059] 락토바실러스 아시도필루스 IDCC 3302의 표면 부착 1차 코팅제로 폴리비닐피롤리돈 K-25를 선택한 후, 2차 코팅제인 수분활성 조절기능의 천연 고분자물질인 히알루론산의 최적 농도를 산출하기 위해 폴리비닐피롤리돈 K-25의 농도에 따른 히알루론산 농도를 조합하여 락토바실러스 아시도필루스 IDCC 3302의 2차 코팅 원료를 조제한 후, 생존균수를 MRS agar plate에서 각각 평가하여 최종 선정하였다. 구체적으로 상기 락토바실러스 아시도필루스 IDCC 3302 (*Lactobacillus acidophilus* IDCC 3302) 배양액 100ml 당 폴리비닐피롤리돈 K-25은 0.1g 내지 0.5g 씩 첨가하고, 히알루론산은 0.001g 내지 0.005g을 첨가하였다.

표 3

[0060] 폴리비닐피롤리돈 K-25와 히알루론산 농도조합실험 결과

PVPK-25 농도 w/v(%)	히알루론산 농도w/v(%) (x 10 ⁸ CFUof <i>L. acidophilus</i> IDCC 3302/g)					
	None	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005
None	200	350	335	280	270	150
1	680	760	715	695	630	570
2	520	630	570	550	490	455
3	460	515	520	480	475	430
4	310	430	420	350	330	280
5	250	380	370	310	260	180

[0061] 그 결과, [표 3] 에서 보는 바와 같이, 폴리비닐피롤리돈 0.1 w/v(%)와 히알루론산 0.001 w/v(%)를 사용하여 2차 코팅한 락토바실러스 아시도필루스 IDCC 3302의 발현균수가 상대적으로 가장 높게 평가되었다.

[0062] <1-3> 3차 코팅제 선정 및 최적농도

[0063] 폴리비닐피롤리돈-히알루론산으로 2차 코팅된 균체에 다공성 입자성을 가진 기체의 코팅을 통해 외부 수분 및 습윤 공기의 유입을 차단시키기 위해 최적의 3차 코팅제를 선정하였다. 일반적으로 다공성 입자성의 코팅제는 마이크로캡슐화(microencapsulation)기제로 많이 사용되며, 본 발명에서는 알기네이트(alginate), 말토덱스트린(maltodextrin, MD), 키토산(chitosan), 전분(starch), 폴리에틸렌글리콜(polyethyleneglycol, PEG)을

포함한다. 폴리비닐피롤리돈-히알루론산으로 구성된 2차 코팅된 락토바실러스 아시도필루스 IDCC 3302 구조체에 상기 3차 코팅제를 상기 락토바실러스 아시도필루스 IDCC 3302 (*Lactobacillus acidophilus* IDCC 3302) 배양액 100ml 당 0.1g 되게 첨가하여 균일화시킨 후 3차코팅이 되도록 한다. 3차 코팅된 균체를 분산매에 현탁시켜, -70℃ deep freezer에 3시간 동안 냉동시켰다. 냉동된 3차 코팅 유산균 샘플을 동결건조하여 분말화시킨 후, 생존균수를 측정하여 가장 높은 생존율을 보인 실험군을 3차 코팅제로 선정하였다.

표 4

[0064] 3차 코팅제 선정실험 결과

구분	알기네이트	말토덱스트린	키토산	전분	폴리에틸렌글리콜
생존율 (%)	74	85	71	65	68

[0065] 그 결과, [표4]에서 보는 바와 같이 3차 코팅제의 마이크로캡슐화 효과가 상대적으로 가장 높은 기제로 말토덱스트린이었다.

[0066]

[0067] 선정된 3차 코팅제인 말토덱스트린과 2차 코팅제인 히알루론산과의 가장 최적의 결합효율을 구성하기 위해 히알루론산 농도에 따른 말토덱스트린 농도를 조합하여 락토바실러스 아시도필루스 IDCC 3302의 3차 코팅 원료를 조제한 후, 생존수를 MRS agar plate에서 각각 평가하여 최종 선정하였다. 구체적으로 상기 락토바실러스 아시도필루스 IDCC 3302 (*Lactobacillus acidophilus* IDCC 3302) 배양액 100ml 당 히알루론산은 0.001g 내지 0.005g을 첨가하고, 말토덱스트린 0.1g 내지 0.5g을 첨가하였다.

표 5

[0068] 히알루론산과 말토덱스트린의 농도조합실험 결과

히알루론산 농도 w/v(%)	말토덱스트린 농도 w/v(%) (x 10 ⁸ CFU of <i>L. acidophilus</i> IDCC 3302/g)					
	None	1	2	3	4	5
None	200	380	460	690	710	700
0.001	350	590	660	740	820	770
0.002	335	550	615	700	790	695
0.003	280	515	520	535	600	555
0.004	270	480	495	515	520	490
0.005	150	445	450	465	480	475

[0069] 그 결과, [표 5]에서 보는 바와 같이, 히알루론산 0.001 %(w/v)와 말토덱스트린 0.4%(w/v)를 사용하여 3차 코팅한 락토바실러스 아시도필루스 IDCC 3302의 발현균수가 상대적으로 가장 높게 평가되었다.

[0070] <1-4> 4차 코팅제 단백질의 선발 및 최적농도

[0071] 락토바실러스 아시도필루스 IDCC 3302의 3차 코팅제로 말토덱스트린 0.4%를 최적 농도로 선정한 후, 다공성 입자구조를 가진 말토덱스트린의 공극을 채울 단백질을 종류를 선발하고 최적농도를 산출하기 위해 락토바실러스 아시도필루스 IDCC 3302 (*Lactobacillus acidophilus* IDCC 3302) 배양액 100ml 당 2g 내지 10g을 각각 첨가하여 락토바실러스 아시도필루스 IDCC 3302 4차 코팅 원료를 조제한 후, 생존수를 MRS agar plate에서 각각 평가하여 최종 선정하였다.

표 6

[0072] 4차 코팅 단백질의 선발 및 최적 농도 산출실험결과

종류 농도 w/v(%)	탈지분유 (x 10 ⁸ CFU/g)	유청단백 (x 10 ⁸ CFU/g)	분리대두단백 (x 10 ⁸ CFU/g)
None	200	200	200
2	210	280	250
4	225	325	265
6	290	380	260
8	310	310	275
10	250	305	280

[0073] 그 결과, [표 6]에서 보는 바와 같이, 폴리비닐피롤리돈K-25 0.1%(w/v), 히알루론산 0.001%, 말토덱스트린 0.4%(w/v)의 비율로 3차 코팅한 락토바실러스 아시도필루스 IDCC 3302 균체에 유청단백을 6%(w/v) 사용하였을 때 4차 코팅한 락토바실러스 아시도필루스 IDCC 3302의 발현균수가 상대적으로 가장 높게 평가되었다.

[0074] <실시예 2>

[0075] 전자현미경(FE-SEM) 구조분석

[0076] 상기 실시예 1에서 조제한 4중 코팅 락토바실러스 아시도필루스 IDCC 3302의 성상을 조제 공정에 따라 전자현미경 촬영을 통해 구조적 분석을 하였다. 4중 코팅 유산균 조제공정을 단계적으로 전자현미경 구조분석을 하여 도 1 내지 도 5에 나타내었다.

[0077] 도 1 및 도 2에서 보는 바와 같이, 유산균에 폴리비닐피롤리돈K-25를 혼합하는 경우에, 유산균체 표면을 폴리비닐피롤리돈K-25가 필름과 같은 박막을 형성하면서 코팅된 것을 관찰 할 수 있었다(도2). 또한 폴리비닐피롤리돈 K-25와 히알루론산이 혼합되면서 구조적으로 히알루론산 구조가 더욱 조밀해지는 현상을 관찰할 수 있었으며(도 3), 다공성 입자구조인 말토덱스트린을 첨가하여 외부 수분과 온도가 쉽게 균체에 전달되지 않게 하고(도4), 마지막으로 유청단백으로 코팅을 진행하면서 균체가 외부로 노출되지 않도록 하였다(도5).

[0078] 4중 코팅 유산균 대량생산

[0079] 4중 코팅 락토바실러스 아시도필루스 IDCC 3302의 대량 생산시 재현성을 확인하기 위해, 비코팅 락토바실러스 아시도필루스 IDCC 3302와 생산성을 비교하였다. 생산규모는 1 ton 발효탱크에서 37℃, overnight 배양을 하였다. 균체 회수 후, 1차 코팅제로 폴리비닐피롤리돈K-25 0.1%(w/v), 2차 코팅제인 히알루론산 0.001%(w/v), 3차 코팅제인 말토덱스트린 0.4%(w/v), 4차 코팅제인 유청단백 6%(w/v)를 처리하여 4중 코팅 유산균원료 조제하였다. 대조균인 비코팅 락토바실러스 아시도필루스 IDCC 3302의 원료는 통상적인 원료 조제공정에 따라 조제하였다.

표 7

[0080] 히알루론산을 이용한 4중코팅 유산균의 대량생산시 비코팅 유산균과의 생산성 실험결과

구분	비코팅 락토바실러스 아시도필루스 IDCC 3302	히알루론산 다중코팅 락토바실러스 아시도필루스 IDCC 3302
종료 pH	4.3~4.4	
배양액 생균수(x10 ⁸ CFU/ml)	50	
원료 생균수(x10 ⁸ CFU/g)	150	320
발현율(%)	41.3	88

[0081] 그 결과, [표 7]에서 보는 바와 같이 1ton 탱크발효시, 4중코팅 락토바실러스 아시도필루스 IDCC 3302가 비코팅

락토바실러스 아시도필루스 IDCC 3302에 비해 2배 정도 생산성이 향상된 것을 확인하였다.

[0082] <실시예 4>

[0083] 내산성(Acid tolerance)

[0084] 내산성은 소화관 중 위(stomach)에 유산균제제가 통과할 때 위산(gastric acid)에 노출되게 되는데 이러한 환경을 시험관 조건에서 비코팅, 단일 코팅, 2중 코팅, 3중 코팅 유산균균과 4중 코팅 유산균균과 비교하였다. 본 발명의 실시예에서 단일 코팅 유산균은 상기 실시예 <1-1>에 기재된 방법으로 1차 코팅된 유산균이고, 상기 2중 코팅 유산균은 상기 실시예 <1-2>에 기재된 방법으로 2차 코팅된 유산균이고, 상기 3중 코팅 유산균은 상기 실시예 <1-3>에 기재된 방법으로 3차 코팅된 유산균이고, 4중 코팅 유산균은 상기 실시예 1에서 기재된 본 발명의 방법에 의해 4차 코팅된 유산균을 지칭하는 것이다.

[0085] 보다 상세하게 MRS 배지에 10 % HCl 를 적하하여 pH를 2.3, 2.5으로 적정한 다음, 멸균하여 사용하였으며, 시료 1g을 각각의 pH로 보정된 MRS 배지에 넣어 0시간, 1시간, 2시간 동안 반응시킨 후, 생균수 분석을 하였다. 이때, 실험에 사용한 유산균은 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.) 10종, 비피도박테리움 속(*Bifidobacterium* sp.) 5종, 스트렙토코커스 속 (*Streptococcus* sp.) 2종을 대상으로 실시예 3의 제조공정에 따라 제조된 4중코팅 유산균과 비코팅, 단일, 2중, 3중코팅 유산균을 제조하였다.

표 8

[0086] 본 발명의 4중코팅 유산균균의 내산성 결과

코팅 유무	시험균	pH 2.3 (x10 ⁸ CFU/g)				pH 2.5 (x10 ⁸ CFU/g)			
		0 시간	1 시간	2 시간	생존율 (%)	0 시간	1 시간	2 시간	생존율 (%)
비코팅	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	136	61	51	37	136	64	58	42
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	85	39	35	41	85	43	40	47
	<i>Lactobacillus casei</i>	79	37	27	34	79	40	34	43
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	93	42	35	37	93	43	40	43
	<i>Lactobacillus gasseri</i>	132	63	48	36	132	70	52	39
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	167	74	58	34	167	82	68	40
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	191	87	62	32	191	92	73	38
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	192	85	63	32	192	89	87	45
	<i>Lactobacillus plantrum</i>	120	56	43	35	120	65	58	48
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	145	62	51	35	145	72	61	42
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	123	55	45	36	123	72	50	40
	<i>Bifidobacterium breve</i>	188	79	60	31	188	84	67	35
	<i>Bifidobacterium infantis</i>	166	73	53	31	166	79	73	43
	<i>Bifidobacterium lactis</i>	170	76	54	31	170	87	59	34
	<i>Bifidobacterium longum</i>	171	72	61	35	171	77	70	40
	<i>Streptococcus faecalis</i>	90	40	29	32	90	48	39	43
	<i>Streptococcus faecium</i>	75	34	25	33	75	42	33	44

단일 코팅	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	180	91	82	45	180	111	98	54
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	125	68	55	44	125	76	61	48
	<i>Lactobacillus casei</i>	145	67	57	39	145	74	65	44
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	122	62	59	48	122	73	65	53
	<i>Lactobacillus gasseri</i>	148	82	65	43	148	91	74	50
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	171	95	74	43	171	98	80	46
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	200	102	92	46	200	113	100	50
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	207	95	82	39	207	105	91	43
	<i>Lactobacillus plantrum</i>	140	76	60	42	140	85	64	45
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	150	71	70	46	150	78	72	48
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	141	70	65	46	141	90	72	51
	<i>Bifidobacterium breve</i>	194	92	80	41	194	95	87	44
	<i>Bifidobacterium infantis</i>	182	94	77	42	182	97	85	46
	<i>Bifidobacterium lactis</i>	193	91	84	43	193	99	88	45
	<i>Bifidobacterium longum</i>	191	92	81	42	191	102	90	47
	<i>Streptococcus faecalis</i>	110	65	43	39	110	72	59	53
	<i>Streptococcus faecium</i>	96	52	48	50	96	58	53	55
2중 코팅	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	230	150	132	57	230	150	138	60
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	150	88	75	50	150	96	81	54
	<i>Lactobacillus casei</i>	170	107	90	52	170	101	90	52
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	172	112	109	63	172	125	115	66
	<i>Lactobacillus gasseri</i>	168	105	90	53	168	117	109	64
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	194	120	111	57	194	121	105	54
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	215	130	101	46	215	128	121	56
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	227	115	100	44	227	125	111	48
	<i>Lactobacillus plantrum</i>	168	105	85	50	168	110	89	52
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	175	98	90	51	175	113	98	56
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	168	111	90	53	168	125	99	58
	<i>Bifidobacterium breve</i>	215	132	125	58	215	138	127	59
	<i>Bifidobacterium infantis</i>	200	120	107	53	200	135	127	63
	<i>Bifidobacterium lactis</i>	225	131	104	46	225	141	124	55
	<i>Bifidobacterium longum</i>	220	112	101	45	220	122	110	50
	<i>Streptococcus faecalis</i>	135	70	63	46	135	75	70	51
	<i>Streptococcus faecium</i>	121	72	66	54	121	75	70	57

3중 코팅	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	260	180	162	62	260	195	182	70
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	160	108	85	53	160	128	95	59
	<i>Lactobacillus casei</i>	175	115	95	54	175	130	105	60
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	180	125	115	63	180	135	120	66
	<i>Lactobacillus gasseri</i>	198	138	120	60	198	140	135	68
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	204	140	131	64	204	145	141	69
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	248	155	121	48	248	166	141	56
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	277	166	145	52	277	178	155	55
	<i>Lactobacillus plantrum</i>	205	145	120	58	205	152	141	68
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	207	125	120	57	207	136	130	62
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	198	140	135	68	198	153	145	73
	<i>Bifidobacterium breve</i>	279	190	180	64	279	202	198	70
	<i>Bifidobacterium infantis</i>	280	170	157	56	280	205	185	66
	<i>Bifidobacterium lactis</i>	275	175	154	56	275	207	174	63
	<i>Bifidobacterium longum</i>	270	152	141	52	270	189	161	59
	<i>Streptococcus faecalis</i>	150	82	75	50	150	108	95	63
	<i>Streptococcus faecium</i>	132	91	86	65	132	101	92	69
4중 코팅	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	300	268	235	78	300	272	258	86
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	188	165	145	77	188	176	165	88
	<i>Lactobacillus casei</i>	175	155	136	78	175	171	142	81
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	205	178	155	76	205	196	155	76
	<i>Lactobacillus gasseri</i>	265	233	202	76	265	248	231	87
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	335	295	248	74	335	302	259	77
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	383	333	295	77	383	352	305	80
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	423	370	318	75	423	399	318	75
	<i>Lactobacillus plantrum</i>	240	211	188	78	240	225	204	85
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	290	254	222	77	290	263	248	86
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	247	215	196	79	247	233	206	83
	<i>Bifidobacterium breve</i>	377	335	294	78	377	348	304	81
	<i>Bifidobacterium infantis</i>	333	291	276	83	333	299	289	87
	<i>Bifidobacterium lactis</i>	340	300	281	83	340	312	295	87
	<i>Bifidobacterium longum</i>	343	301	275	80	343	321	289	84
	<i>Streptococcus faecalis</i>	180	156	140	78	180	167	151	84
	<i>Streptococcus faecium</i>	150	134	115	77	150	145	138	92

[0087] 그 결과, pH 2.1과 2.3으로 2시간 노출시켰을 때, 비코팅 유산균에 비해 폴리비닐피롤리돈 K25-히알루론산-말토덱스트린-유청단백 구조로 4중코팅된 유산균이 약 40%이상의 높은 내산성을 나타내었다.

[0088] <실시예 5>

[0089] 내담즙산성(Bile tolerance)

[0090] 담즙산(bile acid)은 간(liver)에서 만들어져 담도로 빠져나와 소장(small intestine)으로 흘러나오고 소장 말단의 회장(ileum)에서 다시 95%흡수되어 다시 간으로 들어가는 장관순환을 한다. 이 과정에서 소장에 정착한 유산균에 영향을 미친다. 따라서 담즙산에 노출되었을 때 4중 코팅된 유산균과 비코팅, 단일, 2중, 3중코팅 유산균의 생존율 차이를 시험관 환경에서 비교하였다. 보다 상세하게는 담즙산 0.3%가 첨가되지 않은 배지와 첨가된 배지를 멸균하여 사용하였으며, 각각의 배지에 4중코팅된 유산균과 비코팅, 단일, 2중, 3중코팅 유산균 시료 1g을 각각 접종하고, 5 시간 동안 반응시킨 후, 0.9% NaCl 용액을 희석수로 사용하여 생균수 분석을 하였다. 이때, 실험에 사용한 유산균은 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.) 10종, 비피도박테리움 속(*Bifidobacterium* sp.) 5종, 스트렙토코커스 속 (*Streptococcus* sp.) 2종을 대상으로 실시예 3의 제조공정에 따라 제조된 4중코팅

유산균과 비코팅, 단일, 2중, 3중코팅 유산균을 제조하였다.

표 9

본 발명의 4중코팅 유산균의 내담즙산성 결과

[0091]

코팅유무	시험균	MRS	MRS+0.3% bile	생존율(%)
비코팅	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	136	84	61
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	85	45	52
	<i>Lactobacillus casei</i>	79	40	50
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	93	49	52
	<i>Lactobacillus gasseri</i>	132	57	43
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	167	60	36
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	191	74	39
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	192	101	52
	<i>Lactobacillus plantrum</i>	120	66	55
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	145	72	49
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	123	60	48
	<i>Bifidobacterium breve</i>	188	55	29
	<i>Bifidobacterium infantis</i>	166	59	35
	<i>Bifidobacterium lactis</i>	170	64	38
	<i>Bifidobacterium longum</i>	171	63	36
	<i>Streptococcus faecalis</i>	90	29	32
	<i>Streptococcus faecium</i>	75	32	42
단일 코팅	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	180	122	68
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	125	72	58
	<i>Lactobacillus casei</i>	145	87	60
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	122	69	57
	<i>Lactobacillus gasseri</i>	148	78	53
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	171	76	45
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	200	94	47
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	207	124	60
	<i>Lactobacillus plantrum</i>	140	86	62
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	150	88	59
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	141	81	58
	<i>Bifidobacterium breve</i>	194	77	40
	<i>Bifidobacterium infantis</i>	182	83	46
	<i>Bifidobacterium lactis</i>	193	81	42
	<i>Bifidobacterium longum</i>	191	84	44
	<i>Streptococcus faecalis</i>	110	49	45
	<i>Streptococcus faecium</i>	96	45	47

2중 코팅	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	230	165	72
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	150	97	65
	<i>Lactobacillus casei</i>	170	115	68
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	172	115	67
	<i>Lactobacillus gasseri</i>	168	109	65
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	194	126	65
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	215	129	60
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	227	140	62
	<i>Lactobacillus plantrum</i>	168	114	68
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	175	113	65
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	168	107	64
	<i>Bifidobacterium breve</i>	215	118	55
	<i>Bifidobacterium infantis</i>	200	108	54
	<i>Bifidobacterium lactis</i>	225	128	57
	<i>Bifidobacterium longum</i>	220	121	55
	<i>Streptococcus faecalis</i>	135	81	60
	<i>Streptococcus faecium</i>	121	70	58
3중 코팅	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	260	208	80
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	160	124	78
	<i>Lactobacillus casei</i>	175	131	75
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	180	138	77
	<i>Lactobacillus gasseri</i>	198	142	72
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	204	144	71
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	248	178	72
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	277	202	73
	<i>Lactobacillus plantrum</i>	205	153	75
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	207	153	74
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	198	154	78
	<i>Bifidobacterium breve</i>	279	195	70
	<i>Bifidobacterium infantis</i>	280	201	72
	<i>Bifidobacterium lactis</i>	275	187	68
	<i>Bifidobacterium longum</i>	270	180	67
	<i>Streptococcus faecalis</i>	150	105	70
	<i>Streptococcus faecium</i>	132	99	75

4중코팅	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	300	288	96
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	188	181	96
	<i>Lactobacillus casei</i>	175	170	97
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	205	199	97
	<i>Lactobacillus gasseri</i>	265	254	96
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	335	321	96
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	383	369	96
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	423	402	95
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	240	232	97
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	290	285	98
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	247	240	97
	<i>Bifidobacterium breve</i>	377	361	96
	<i>Bifidobacterium infantis</i>	333	318	95
	<i>Bifidobacterium lactis</i>	340	329	97
	<i>Bifidobacterium longum</i>	343	316	92
	<i>Streptococcus faecalis</i>	180	169	94
	<i>Streptococcus faecium</i>	150	140	93

[0092] 그 결과, 각각의 유산균을 0.3% bile에 5시간 노출시켜 생존균수를 비교한 결과, [표9]에서 보는 바와 같이 4중 코팅된 유산균이 비코팅, 단일, 2중, 3중코팅 유산균에 비해 상대적으로 높은 내담즙산성을 나타내었다.

[0093] <실시예 6>

[0094] 동결시 생존율 비교

[0095] 유산균 생균제 원료를 생산하는 방법 중 가장 많이 사용되는 방법이 동결건조방식이다. 동결건조를 하기 위해서는 건조 전, 샘플을 동결해야하는데 이 과정에서 대부분의 유산균은 균체 내 세포질의 액상구조가 결정화되면서 부피가 팽창하게 되고 불규칙적인 생김 결정이 세포막을 손상시키면서 사멸에 이르게 된다. 4중코팅 유산균은 세포 내외의 수분을 히알루론산이 흡수하기 때문에 동결시 결정화에 따른 세포막 손상을 최소화한다. 본 발명에서는 4중코팅 유산균과 비코팅, 단일, 2중, 3중코팅 유산균이 동결시 생존율을 비교하여 히알루론산이 동결건조시 생존율을 높일 수 있는 신개념의 cryoprotective agent로 사용가능성을 확인하였다. 보다 상세하게 4중코팅 유산균을 분산용매 현탁액을 비코팅, 단일, 2중, 3중코팅 유산균 분산용매 현탁액을 각각 -70℃ deep freezer에 3시간동안 동결 후, 동결건조기에서 24시간 건조하였다. 건조된 각각의 시료 1g을 채취하여 생균수 분석을 하였다. 이때, 실험에 사용한 유산균은 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.) 10종, 비피도박테리움 속(*Bifidobacterium* sp.) 5종, 스트렙토코커스 속(*Streptococcus* sp.) 2종을 대상으로 실시예 3의 제조공정에 따라 4중코팅 유산균과 비코팅, 단일, 2중, 3중코팅 유산균을 제조하였다.

표 10

[0096] 본 발명의 4중코팅 유산균의 -70℃ 동결시 생존율 실험결과

균주	비코팅 유산균 의 생존율 (%)	단일코팅 유산 균의 생존율(%)	2중코팅 유산균 의 생존율(%)	3중코팅 유산균 의 생존율(%)	4중코팅 유산균의 생존 율(%)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	42	52	60	71	88
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	35	47	55	69	82
<i>Lactobacillus casei</i>	31	45	53	65	83
<i>Lactobacillus fermentum</i>	45	52	60	62	81
<i>Lactobacillus gasseri</i>	46	53	60	70	86

<i>Lactobacillus helveticus</i>	36	45	52	68	75
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	32	44	51	67	89
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	44	53	59	66	92
<i>Lactobacillus plantum</i>	31	41	51	64	72
<i>Lactobacillus reuteri</i>	35	46	51	65	73
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	49	55	60	71	86
<i>Bifidobacterium breve</i>	35	42	51	68	76
<i>Bifidobacterium infantis</i>	40	50	58	62	80
<i>Bifidobacterium lactis</i>	46	52	55	71	95
<i>Bifidobacterium longum</i>	48	55	60	72	91
<i>Streptococcus faecalis</i>	36	45	55	65	84
<i>Streptococcus faecium</i>	38	44	57	65	81

[0097] 그 결과, 동결시 4중코팅된 유산균군의 생존율이 비코팅 유산균군의 생존율보다 36~57% 증가된 것을 확인할 수 있었다.

[0098] <실시예 7>

[0099] 50℃ 열풍건조시 생존율 비교

[0100] 유산균의 원료 조제방식 중 균일한 입자 모양을 만들거나, 분무건조를 하기 위해서는 액상으로 캐리어(carrier)에 분무후 50℃ 정도에서 공기 중에서 건조하게된다. 이때 유산균은 대부분 열에 약하거나 공기에 취약하기 때문에 장시간 노출시 사멸하게 된다. 따라서 4중코팅된 유산균이 열에 대한 안정성을 검토하기 위해 4중코팅 유산균과 비코팅, 단일, 2중, 3중코팅 유산균을 50℃에서 3시간 노출시켜 건조시켜 원료를 조제하였다. 보다 상세하게는 균체 회수 후, 1차 코팅제로 폴리비닐피롤리돈 K-25, 2차 코팅제인 히알루론산, 3차 코팅제인 말토덱스트린, 4차 코팅제인 유청단백을 처리하여 원료 조제하였다. 대조군인 비코팅 유산균 원료는 통상적인 원료 조제공정에 따라 조제하였다. 건조된 각각의 시료 1g을 채취하여 생균수 분석을 하였다. 이때, 실험에 사용한 유산균은 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.) 10종, 비피도박테리움 속(*Bifidobacterium* sp.) 5종, 스트렙토코커스 속 (*Streptococcus* sp.) 2종을 대상으로 실시예 3의 제조공정에 따라 4중 코팅된 유산균과 비코팅, 단일, 2중, 3중코팅 유산균을 제조하였다.

표 11

[0101] 본 발명의 4중코팅 유산균군의 50℃ 열풍건조시 생존율 실험결과

균주	비코팅 유산균의 생존율 (%)	단일코팅 유산균의 생존율(%)	2중코팅 유산균의 생존율(%)	3중코팅 유산균의 생존율(%)	4중코팅 유산균의 생존율(%)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	24	35	41	52	67
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	32	39	41	48	61
<i>Lactobacillus casei</i>	35	39	43	49	63
<i>Lactobacillus fermentum</i>	25	32	45	51	62
<i>Lactobacillus gasseri</i>	29	40	52	61	70
<i>Lactobacillus helveticus</i>	24	35	40	42	59
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	28	39	45	51	65
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	28	37	42	53	66
<i>Lactobacillus plantum</i>	24	39	44	55	61
<i>Lactobacillus reuteri</i>	21	31	41	42	55
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	31	40	43	48	61
<i>Bifidobacterium breve</i>	20	32	41	47	58

<i>Bifidobacterium infantis</i>	19	24	29	35	48
<i>Bifidobacterium lactis</i>	27	35	41	52	64
<i>Bifidobacterium longum</i>	29	39	47	51	69
<i>Streptococcus faecalis</i>	41	45	52	59	72
<i>Streptococcus faecium</i>	46	49	55	62	78

[0102] 그 결과, 50℃ 열풍건조 동안 비코팅 유산균균에 비해 4중코팅된 유산균균이 28~43%의 생존율이 증가하였다.

[0103] <실시예 8>

[0104] 온도별 경시적 안정성

[0105] <8-1> 4중코팅된 유산균균과 비코팅, 단일, 2중, 3중코팅 유산균균의 4℃ 경시적 안정성 비교실험

[0106] 상기 실시예 3에서 제조된 본 발명에 의한 4중코팅된 유산균균과 비코팅, 단일, 2중, 3중코팅 유산균균을 365일 동안 4℃ 냉장보관 후, 시간 경과에 따라 원료 1g 당 유산균수를 측정하여 그 결과를 표 12에 기재하였다. 이때, 실험에 사용한 유산균은 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.) 10종, 비피도박테리움 속(*Bifidobacterium* sp.) 5종, 스트렙토코커스 속 (*Streptococcus* sp.) 2종을 대상으로 실시예 3의 제조공정에 따라 4중코팅된 유산균균과 비코팅, 단일, 2중, 3중코팅 유산균균을 제조하였다.

표 12

[0107] 본 발명의 4중코팅 유산균과 비코팅, 단일, 2중, 3중코팅 유산균균의 4℃ 경시적 안정성 비교실험

코팅 유무	시험균	4℃ 경시적 안정성				생존율 (%)
		0일	60일	180일	365일	
비코팅	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	150	137	124	93	62
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	94	90	79	56	59
	<i>Lactobacillus casei</i>	87	84	76	54	62
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	102	95	86	65	63
	<i>Lactobacillus gasseri</i>	132	119	100	87	65
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	167	145	125	116	69
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	191	141	138	130	68
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	211	179	142	116	54
	<i>Lactobacillus plantrum</i>	120	96	86	72	60
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	145	102	92	84	57
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	128	110	96	78	60
	<i>Bifidobacterium breve</i>	188	140	126	106	56
	<i>Bifidobacterium infantis</i>	166	142	166	100	60
	<i>Bifidobacterium lactis</i>	170	137	119	90	52
	<i>Bifidobacterium longum</i>	171	145	130	105	61
	<i>Streptococcus faecalis</i>	90	83	71	52	57
	<i>Streptococcus faecium</i>	75	68	64	52	69

단일 코팅	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	180	171	149	124	69
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	125	115	102	82	66
	<i>Lactobacillus casei</i>	145	137	119	98	68
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	122	111	107	85	70
	<i>Lactobacillus gasseri</i>	148	138	128	105	71
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	171	161	139	126	74
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	200	192	168	144	72
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	207	196	168	134	65
	<i>Lactobacillus plantrum</i>	140	128	119	95	68
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	150	132	113	93	62
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	141	135	121	97	69
	<i>Bifidobacterium breve</i>	194	182	150	128	66
	<i>Bifidobacterium infantis</i>	182	164	138	116	64
	<i>Bifidobacterium lactis</i>	193	175	141	113	59
	<i>Bifidobacterium longum</i>	191	179	149	127	67
	<i>Streptococcus faecalis</i>	110	102	89	68	62
	<i>Streptococcus faecium</i>	96	89	81	70	73
2중 코팅	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	230	201	178	165	72
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	150	141	125	103	69
	<i>Lactobacillus casei</i>	170	155	132	125	74
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	172	154	139	129	75
	<i>Lactobacillus gasseri</i>	168	151	139	120	72
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	194	179	165	147	76
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	215	188	174	165	77
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	227	194	180	156	69
	<i>Lactobacillus plantrum</i>	168	152	142	120	72
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	175	161	135	119	68
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	168	155	147	124	74
	<i>Bifidobacterium breve</i>	215	183	174	150	70
	<i>Bifidobacterium infantis</i>	200	181	155	136	68
	<i>Bifidobacterium lactis</i>	225	196	174	150	67
	<i>Bifidobacterium longum</i>	220	191	169	156	71
	<i>Streptococcus faecalis</i>	135	122	111	99	74
	<i>Streptococcus faecium</i>	121	115	109	90	75

3중 코팅	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	260	235	222	205	79
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	160	149	135	123	77
	<i>Lactobacillus casei</i>	175	168	151	136	78
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	180	171	149	144	80
	<i>Lactobacillus gasseri</i>	198	181	159	150	76
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	204	189	171	161	79
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	248	226	204	198	80
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	277	257	216	204	74
	<i>Lactobacillus plantrum</i>	205	189	169	159	78
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	207	191	171	153	74
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	198	174	166	156	79
	<i>Bifidobacterium breve</i>	279	249	211	200	72
	<i>Bifidobacterium infantis</i>	280	254	231	210	75
	<i>Bifidobacterium lactis</i>	275	244	206	195	71
	<i>Bifidobacterium longum</i>	270	251	209	197	73
	<i>Streptococcus faecalis</i>	150	139	128	118	79
	<i>Streptococcus faecium</i>	132	124	118	104	79
4중 코팅	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	300	291	278	272	90
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	188	185	175	171	91
	<i>Lactobacillus casei</i>	175	171	163	156	89
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	205	196	189	182	88
	<i>Lactobacillus gasseri</i>	265	254	248	246	93
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	335	321	315	308	92
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	383	374	345	327	85
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	423	411	401	398	94
	<i>Lactobacillus plantrum</i>	240	236	224	217	90
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	290	281	270	248	85
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	247	241	239	234	95
	<i>Bifidobacterium breve</i>	377	369	349	346	91
	<i>Bifidobacterium infantis</i>	333	321	303	301	90
	<i>Bifidobacterium lactis</i>	340	326	311	303	89
	<i>Bifidobacterium longum</i>	343	339	334	330	96
	<i>Streptococcus faecalis</i>	180	177	169	165	91
	<i>Streptococcus faecium</i>	150	149	142	140	93

[0108] 그 결과, 4℃ 냉장보관을 365일간 지속한 후, 4중코팅된 유산균군과 비코팅 유산균군 원료의 생존균수를 분석한 결과, 4중코팅된 유산균군이 비코팅 유산균군에 비하여 약 25~40% 생존율이 높았다.

[0109] <8-2> 본 발명의 4중코팅된 유산균군과 비코팅, 단일, 2중, 3중코팅 유산균군의 15℃ 경시적 안정성 비교실험

[0110] 상기 실시예 3에서 제조된 본 발명에 의한 4중코팅된 유산균군과 비코팅, 단일, 2중, 3중코팅 유산균군을 365일 동안 15℃ 보관 후, 시간 경과에 따라 원료 1g 당 유산균수를 측정하여 그 결과를 [표 13]에 기재하였다. 이때, 실험에 사용한 유산균은 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.) 10종, 비피도박테리움 속(*Bifidobacterium* sp.) 5종, 스트렙토코커스 속(*Streptococcus* sp.) 2종을 대상으로 실시예 3의 제조공정에 따라 4중코팅 유산균과 비코팅 유산균을 제조하였다.

표 13

[0111]

본 발명의 4중코팅 유산균군과 비코팅, 단일, 2중, 3중코팅 유산균군의 15℃ 경시적 안정성 비교실험

코팅 유무	시험균	15℃ 경시적 안정성				생존율 (%)
		0일	60일	180일	365일	
비코팅	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	150	135	104	81	54
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	94	88	69	49	52
	<i>Lactobacillus casei</i>	87	82	69	52	59
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	102	90	77	54	52
	<i>Lactobacillus gasseri</i>	132	113	97	79	59
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	167	140	122	109	65
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	191	121	97	89	46
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	211	115	149	125	59
	<i>Lactobacillus plantrum</i>	120	90	72	66	55
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	145	97	86	76	52
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	128	105	94	63	49
	<i>Bifidobacterium breve</i>	188	130	121	103	54
	<i>Bifidobacterium infantis</i>	166	137	111	93	56
	<i>Bifidobacterium lactis</i>	170	125	117	92	54
	<i>Bifidobacterium longum</i>	171	142	120	100	58
	<i>Streptococcus faecalis</i>	90	82	72	51	56
	<i>Streptococcus faecium</i>	75	67	60	39	52
단일 코팅	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	180	169	125	106	59
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	125	114	90	71	57
	<i>Lactobacillus casei</i>	145	133	110	91	63
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	122	111	89	68	56
	<i>Lactobacillus gasseri</i>	148	135	112	94	64
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	171	160	137	117	69
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	200	184	120	102	51
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	207	189	149	130	63
	<i>Lactobacillus plantrum</i>	140	120	101	79	57
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	150	136	103	84	56
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	141	125	95	74	53
	<i>Bifidobacterium breve</i>	194	171	135	114	59
	<i>Bifidobacterium infantis</i>	182	157	131	109	60
	<i>Bifidobacterium lactis</i>	193	169	139	111	58
	<i>Bifidobacterium longum</i>	191	174	142	120	63
	<i>Streptococcus faecalis</i>	110	101	89	66	60
	<i>Streptococcus faecium</i>	96	85	71	53	56

2중 코팅	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	230	201	191	174	76
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	150	137	111	94	63
	<i>Lactobacillus casei</i>	170	164	135	115	68
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	172	152	128	108	63
	<i>Lactobacillus gasseri</i>	168	158	139	119	71
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	194	175	164	143	74
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	215	184	142	120	56
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	227	201	179	156	69
	<i>Lactobacillus plantrum</i>	168	153	129	107	64
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	175	152	127	108	62
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	168	148	131	100	60
	<i>Bifidobacterium breve</i>	215	189	160	141	66
	<i>Bifidobacterium infantis</i>	200	174	151	136	68
	<i>Bifidobacterium lactis</i>	225	199	161	146	65
	<i>Bifidobacterium longum</i>	220	187	170	151	69
	<i>Streptococcus faecalis</i>	135	123	109	91	68
	<i>Streptococcus faecium</i>	121	111	94	76	63
3중 코팅	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	260	241	222	208	80
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	160	149	138	110	69
	<i>Lactobacillus casei</i>	175	161	145	126	72
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	180	171	150	120	67
	<i>Lactobacillus gasseri</i>	198	179	166	144	73
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	204	189	177	153	75
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	248	225	179	158	64
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	277	240	221	199	72
	<i>Lactobacillus plantrum</i>	205	189	169	147	72
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	207	195	171	140	68
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	198	170	155	126	64
	<i>Bifidobacterium breve</i>	279	256	221	198	71
	<i>Bifidobacterium infantis</i>	280	264	241	201	72
	<i>Bifidobacterium lactis</i>	275	251	225	189	69
	<i>Bifidobacterium longum</i>	270	259	230	197	73
	<i>Streptococcus faecalis</i>	150	140	132	108	72
	<i>Streptococcus faecium</i>	132	111	102	88	67

4중 코팅	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	300	281	255	266	88
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	188	175	165	162	86
	<i>Lactobacillus casei</i>	175	166	153	149	84
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	205	186	178	174	84
	<i>Lactobacillus gasseri</i>	265	244	135	226	85
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	335	298	285	272	81
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	383	358	335	318	83
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	423	397	371	360	85
	<i>Lactobacillus plantrum</i>	240	222	204	198	82
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	290	272	261	250	86
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	247	236	217	201	81
	<i>Bifidobacterium breve</i>	377	354	335	329	87
	<i>Bifidobacterium infantis</i>	333	318	297	276	82
	<i>Bifidobacterium lactis</i>	340	314	282	271	79
	<i>Bifidobacterium longum</i>	343	302	299	277	80
	<i>Streptococcus faecalis</i>	180	175	152	143	79
	<i>Streptococcus faecium</i>	150	148	139	129	86

[0112] 그 결과, 15℃ 보관을 365일간 지속한 후, 본 발명의 4중코팅 유산균과 비코팅 유산균 원료의 생존균수를 분석한 결과, 본 발명의 4중코팅 유산균이 비코팅 유산균에 비하여 약 30~40% 생존율이 높았다.

[0113] <8-3> 본 발명의 4중코팅 유산균과 비코팅, 단일, 2중, 3중코팅 유산균군의 25℃ 경시적 안정성 비교실험

[0114] 상기 실시예 3에서 제조된 본 발명에 의한 히알루론산 다중코팅 유산균과 비코팅 유산균을 365일 동안 25℃ 보관 후, 시간 경과에 따라 원료 1g 당 유산균수를 측정하여 그 결과를 [표 14]에 기재하였다. 이때, 실험에 사용한 유산균은 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.) 10종, 비피도박테리움 속(*Bifidobacterium* sp.) 5종, 스트렙토코커스 속(*Streptococcus* sp.) 2종을 대상으로 실시예 3의 제조공정에 따라 본 발명의 4중코팅 유산균과 비코팅, 단일, 2중, 3중코팅 유산균군을 제조하였다.

표 14

[0115] 4중코팅된 유산균군과 비코팅, 단일, 2중, 3중코팅 유산균군의 25℃ 경시적 안정성 비교실험

코팅 유무	시험군	25℃ 경시적 안정성				생존율 (%)
		0일	60일	180일	365일	

비코팅	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	150	120	89	75	50
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	94	73	54	46	48
	<i>Lactobacillus casei</i>	87	75	64	50	57
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	102	79	60	51	50
	<i>Lactobacillus gasseri</i>	132	106	87	75	56
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	167	124	106	100	59
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	191	113	82	70	36
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	211	160	137	121	57
	<i>Lactobacillus plantrum</i>	120	78	55	54	45
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	145	92	74	61	42
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	128	97	92	51	39
	<i>Bifidobacterium breve</i>	188	120	105	96	51
	<i>Bifidobacterium infantis</i>	166	127	96	77	46
	<i>Bifidobacterium lactis</i>	170	116	97	70	41
	<i>Bifidobacterium longum</i>	171	128	106	91	53
	<i>Streptococcus faecalis</i>	90	81	57	39	43
	<i>Streptococcus faecium</i>	75	62	50	46	61
단일 코팅	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	180	161	124	93	52
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	125	101	81	62	50
	<i>Lactobacillus casei</i>	145	122	101	85	59
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	122	100	82	62	51
	<i>Lactobacillus gasseri</i>	148	126	101	84	57
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	171	155	119	102	60
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	200	152	125	76	38
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	207	169	140	122	59
	<i>Lactobacillus plantrum</i>	140	120	88	65	47
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	150	113	89	67	45
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	141	120	80	59	42
	<i>Bifidobacterium breve</i>	194	158	124	100	52
	<i>Bifidobacterium infantis</i>	182	161	109	85	47
	<i>Bifidobacterium lactis</i>	193	152	101	81	42
	<i>Bifidobacterium longum</i>	191	145	123	105	55
	<i>Streptococcus faecalis</i>	110	92	70	49	45
	<i>Streptococcus faecium</i>	96	90	82	59	62

2중 코팅	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	230	179	140	121	53
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	150	123	99	78	52
	<i>Lactobacillus casei</i>	170	134	125	102	60
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	172	150	116	91	53
	<i>Lactobacillus gasseri</i>	168	146	119	97	58
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	194	169	145	120	62
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	215	174	109	86	40
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	227	175	159	136	60
	<i>Lactobacillus plantrum</i>	168	132	110	80	48
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	175	155	115	82	47
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	168	142	120	73	44
	<i>Bifidobacterium breve</i>	215	179	135	116	54
	<i>Bifidobacterium infantis</i>	200	177	111	98	49
	<i>Bifidobacterium lactis</i>	225	182	131	101	45
	<i>Bifidobacterium longum</i>	220	169	145	123	56
	<i>Streptococcus faecalis</i>	135	105	90	62	46
	<i>Streptococcus faecium</i>	121	102	99	76	63
3중 코팅	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	260	231	190	161	62
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	160	134	119	96	60
	<i>Lactobacillus casei</i>	175	152	131	119	68
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	180	160	130	109	61
	<i>Lactobacillus gasseri</i>	198	174	155	132	67
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	204	169	136	106	52
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	248	201	194	161	65
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	277	221	165	138	50
	<i>Lactobacillus plantrum</i>	205	165	130	102	50
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	207	174	120	99	48
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	198	162	140	112	57
	<i>Bifidobacterium breve</i>	279	241	195	161	58
	<i>Bifidobacterium infantis</i>	280	245	202	159	57
	<i>Bifidobacterium lactis</i>	275	229	192	165	60
	<i>Bifidobacterium longum</i>	270	239	198	148	55
	<i>Streptococcus faecalis</i>	150	129	98	87	58
	<i>Streptococcus faecium</i>	132	112	106	88	67

4중 코팅	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	300	261	248	236	78
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	188	165	145	142	75
	<i>Lactobacillus casei</i>	175	143	131	129	73
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	205	151	145	141	68
	<i>Lactobacillus gasseri</i>	265	221	195	194	73
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	335	265	255	241	71
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	383	336	295	282	73
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	423	374	341	339	80
	<i>Lactobacillus plantrum</i>	240	208	182	174	72
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	290	267	231	221	76
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	247	231	185	178	72
	<i>Bifidobacterium breve</i>	377	335	325	317	84
	<i>Bifidobacterium infantis</i>	333	298	252	249	74
	<i>Bifidobacterium lactis</i>	340	288	241	248	72
	<i>Bifidobacterium longum</i>	343	292	265	253	73
	<i>Streptococcus faecalis</i>	180	171	132	131	72
	<i>Streptococcus faecium</i>	150	147	131	122	81

[0116] 그 결과, 25℃ 보관을 365일간 지속한 후, 히알루론산을 이용한 4중코팅된 유산균군과 비코팅 유산균군 원료의 생존균수를 분석한 결과, 본 발명의 4중코팅된 유산균군이 비코팅 유산균군에 비하여 약 10~35% 생존율이 높았다.

[0117] <8-4> 본 발명의 4중코팅된 유산균군과 비코팅, 단일, 2중, 3중코팅 유산균군의 37℃ 경시적 안정성 비교실험

[0118] 상기 실시예 3에서 제조된 본 발명에 의한 본 발명의 4중코팅된 유산균군과 비코팅, 단일, 2중, 3중코팅 유산균군을 365일 동안 37℃ 보관 후, 시간 경과에 따라 원료 1g 당 유산균수를 측정하여 그 결과를 [표 15]에 기재하였다. 이때, 실험에 사용한 유산균은 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.) 10종, 비피도박테리움 속(*Bifidobacterium* sp.) 5종, 스트렙토코커스 속(*Streptococcus* sp.) 2종을 대상으로 실시예 3의 제조공정에 따라 본 발명의 4중코팅된 유산균군과 비코팅, 단일, 2중, 3중코팅 유산균군을 제조하였다.

표 15

[0119] 본 발명의 4중코팅된 유산균군과 비코팅, 단일, 2중, 3중코팅 유산균군의 37℃ 경시적 안정성 비교실험

코팅 유무	시험군	37℃ 경시적 안정성				생존율 (%)
		0일	60일	180일	365일	

비코팅	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	150	110	75	62	41
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	94	73	39	38	40
	<i>Lactobacillus casei</i>	87	60	59	43	49
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	102	63	55	42	40
	<i>Lactobacillus gasseri</i>	132	92	77	66	49
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	167	104	96	90	53
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	191	103	76	55	26
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	211	155	129	95	49
	<i>Lactobacillus plantrum</i>	120	63	46	36	30
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	145	83	68	35	24
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	128	96	87	56	45
	<i>Bifidobacterium breve</i>	188	115	91	71	37
	<i>Bifidobacterium infantis</i>	166	105	76	50	30
	<i>Bifidobacterium lactis</i>	170	98	75	35	20
	<i>Bifidobacterium longum</i>	171	118	91	75	43
	<i>Streptococcus faecalis</i>	90	75	47	32	36
	<i>Streptococcus faecium</i>	75	60	43	37	50
단일 코팅	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	180	152	108	77	43
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	125	101	88	55	44
	<i>Lactobacillus casei</i>	145	115	109	75	52
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	122	95	80	52	43
	<i>Lactobacillus gasseri</i>	148	112	106	75	51
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	171	134	125	92	54
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	200	152	91	58	29
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	207	169	136	105	51
	<i>Lactobacillus plantrum</i>	140	110	81	47	34
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	150	125	79	39	26
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	141	103	96	66	47
	<i>Bifidobacterium breve</i>	194	154	110	77	40
	<i>Bifidobacterium infantis</i>	182	155	126	90	35
	<i>Bifidobacterium lactis</i>	193	142	78	48	25
	<i>Bifidobacterium longum</i>	191	149	110	85	45
	<i>Streptococcus faecalis</i>	110	92	70	44	40
	<i>Streptococcus faecium</i>	96	85	71	49	52

2중 코팅	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	230	184	140	110	48
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	150	132	112	73	49
	<i>Lactobacillus casei</i>	170	153	131	96	57
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	172	154	112	82	48
	<i>Lactobacillus gasseri</i>	168	141	128	94	56
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	194	162	130	114	59
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	215	167	105	73	34
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	227	184	151	127	56
	<i>Lactobacillus plantrum</i>	168	132	90	65	39
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	175	135	85	54	31
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	168	142	116	84	50
	<i>Bifidobacterium breve</i>	215	162	123	96	45
	<i>Bifidobacterium infantis</i>	200	152	115	82	41
	<i>Bifidobacterium lactis</i>	225	169	109	72	32
	<i>Bifidobacterium longum</i>	220	170	140	107	49
	<i>Streptococcus faecalis</i>	135	113	91	56	42
	<i>Streptococcus faecium</i>	121	106	92	65	54
3중 코팅	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	260	221	189	150	58
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	160	142	132	94	59
	<i>Lactobacillus casei</i>	175	161	147	117	67
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	180	152	135	102	57
	<i>Lactobacillus gasseri</i>	198	174	152	128	65
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	204	182	160	138	68
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	248	162	142	104	42
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	277	233	209	188	68
	<i>Lactobacillus plantrum</i>	205	169	136	96	47
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	207	152	115	82	40
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	198	174	144	114	58
	<i>Bifidobacterium breve</i>	279	201	185	159	57
	<i>Bifidobacterium infantis</i>	280	223	177	148	53
	<i>Bifidobacterium lactis</i>	275	205	171	121	44
	<i>Bifidobacterium longum</i>	270	221	180	140	52
	<i>Streptococcus faecalis</i>	150	132	106	84	56
	<i>Streptococcus faecium</i>	132	110	101	76	58

4중 코팅	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	300	241	235	211	70
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	188	155	135	124	66
	<i>Lactobacillus casei</i>	175	132	121	114	65
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	205	138	125	122	59
	<i>Lactobacillus gasseri</i>	265	200	175	169	64
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	335	218	205	202	60
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	383	325	285	229	59
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	423	352	321	307	72
	<i>Lactobacillus plantrum</i>	240	188	162	151	63
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	290	231	201	192	66
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	247	222	185	151	61
	<i>Bifidobacterium breve</i>	377	312	285	264	70
	<i>Bifidobacterium infantis</i>	333	274	232	209	62
	<i>Bifidobacterium lactis</i>	340	265	241	221	65
	<i>Bifidobacterium longum</i>	343	281	265	219	64
	<i>Streptococcus faecalis</i>	180	165	132	114	63
	<i>Streptococcus faecium</i>	150	145	131	108	72

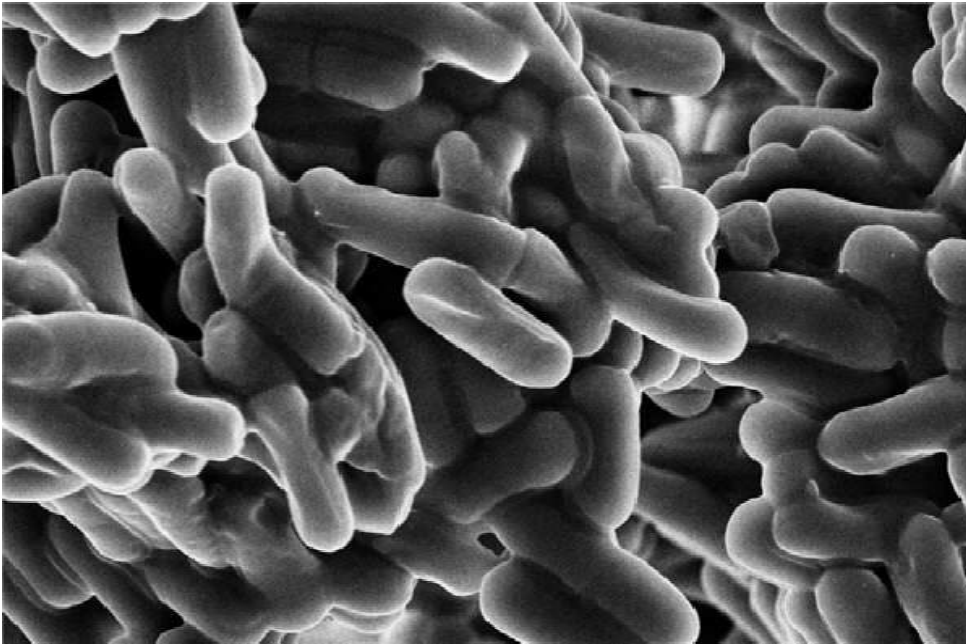
[0120] 그 결과, 37℃ 보관을 365일간 지속한 후, 본 발명의 4중코팅된 유산균군과 비코팅 유산균군 원료의 생존균수를 분석한 결과, 본 발명의 4중코팅된 유산균군이 비코팅 유산균군에 비하여 약 30%이상 생존율이 증가하였다.

산업상 이용가능성

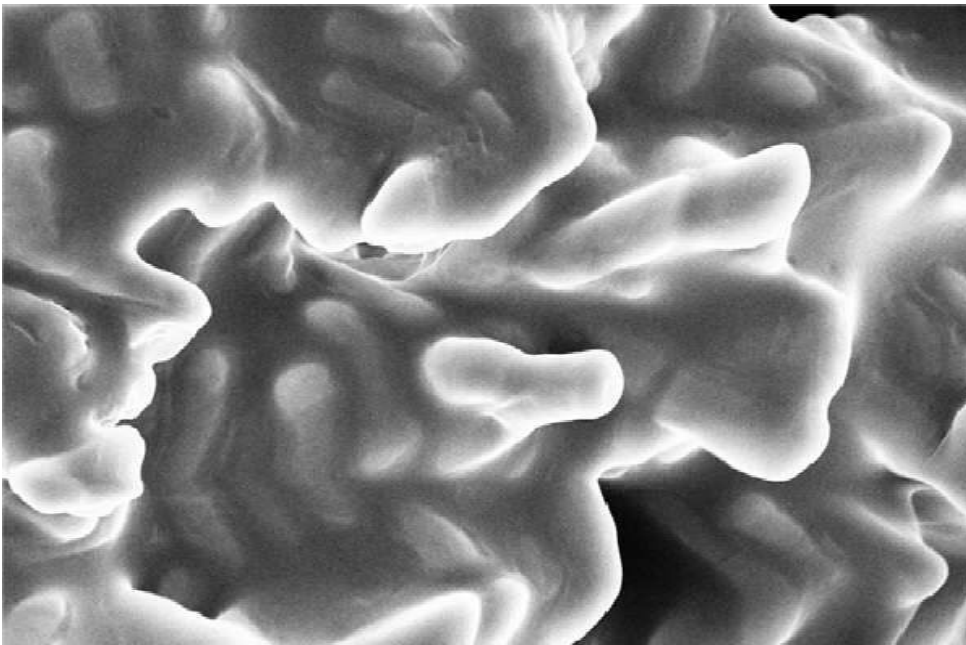
[0121] 이상 살펴본 바와 같이, 본 발명은 4중 코팅된 유산균의 제조방법, 그 방법으로 제조된 4중 코팅된 유산균을 제공한다. 본 발명의 방법으로 코팅된 유산균은 유산균에 수용성 폴리머, 히알루론산, 다공성 입자를 가지는 코팅제, 단백질을 혼합하여 4중 코팅함으로써, 종래 비코팅, 단일, 2중, 3중코팅 유산균군에 비하여 내산성 및 내담즙성이 우수하고, 저온 또는 고온으로 인한 사멸율이 낮으므로, 유산균 본래의 생리활성 기능을 소실하지 않을 수 있다. 따라서 본 발명의 코팅 방법은 유산균의 생리활성 기능을 유지할 수 있게 하여 산업적으로 유용한 방법이다.

도면

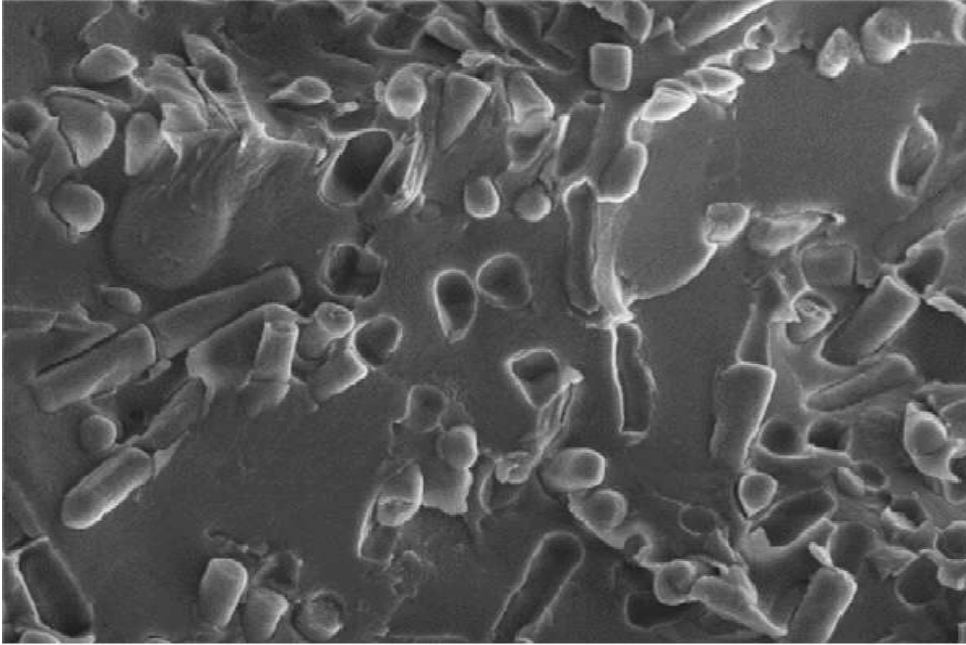
도면1



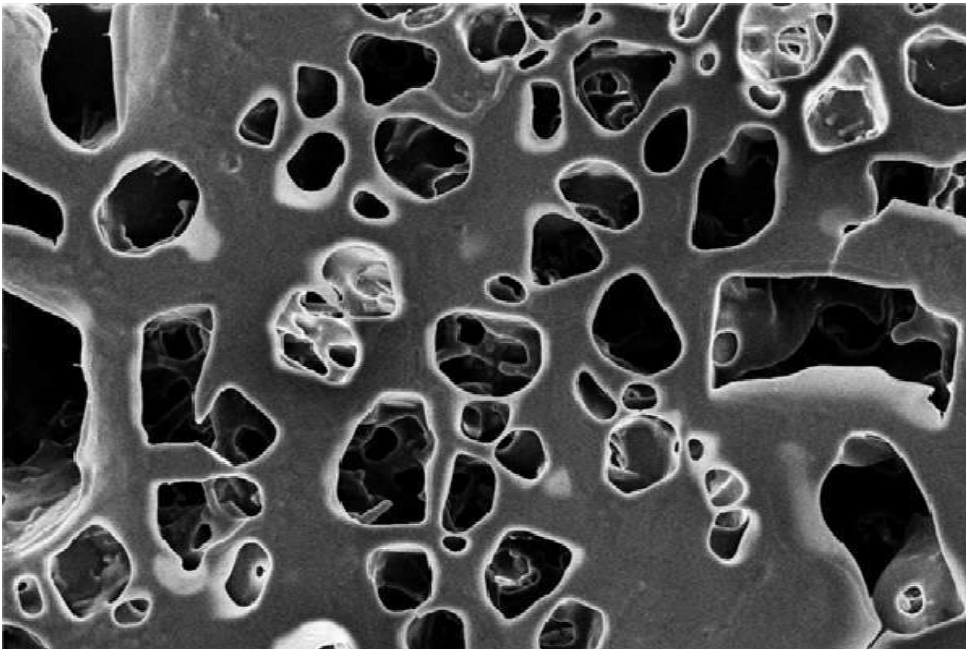
도면2



도면3



도면4



도면5

