



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0051902
(43) 공개일자 2016년05월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 33/00 (2016.01) A23K 1/16 (2006.01)
A23L 29/00 (2016.01) A23L 3/3571 (2006.01)
A61K 35/742 (2014.01) C12R 1/24 (2006.01)
C12R 1/245 (2006.01) C12R 1/25 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0140102
(22) 출원일자 2014년10월16일
심사청구일자 2014년10월16일

(71) 출원인
한국식품연구원
경기도 성남시 분당구 안양판교로1201번길 62 (백현동)
(72) 발명자
박해웅
광주광역시 광산구 수등로123번길 21, 110동 1101호 (신가동, 수완지구 호반베르디움1차아파트)
김태운
광주광역시 남구 효사랑길 14, 103동 1608호(봉선동, 포스코더샵아파트)
(74) 대리인
특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 15 항

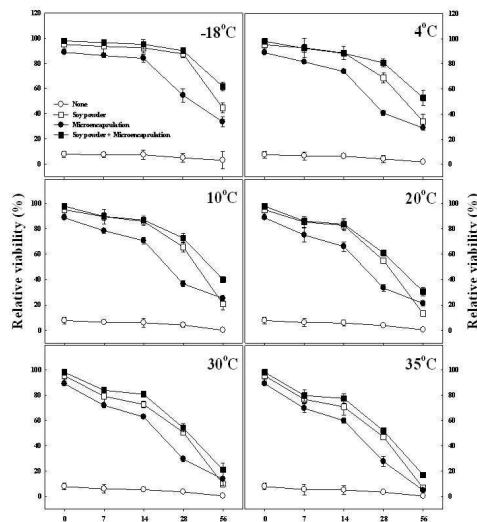
(54) 발명의 명칭 유산균이 포집되어 있는 알지네이트 비드 및 동결보호제로서 콩가루를 포함하는 생존율이 증진된 유산균 조성물, 및 이의 제조방법 및 용도

(57) 요약

본 발명은 유산균이 포집되어 있는 알지네이트 비드 및 동결보호제로서 콩가루를 포함하는 유산균 조성물, 이의 제조방법 및 이의 용도를 제공한다.

본 발명에서 유산균의 동결보호를 위해 사용하는 알지네이트 비드와 콩가루는 유산균 조성물을 제조함에 있어서 균체의 보호 효과가 종래의 동결보호제를 사용한 경우에 비해 매우 뛰어날 뿐만 아니라, 식품첨가등급의 재료로서 안전성을 제공해 준다. 따라서, 본 발명에 따른 유산균 조성물은 미생물의 생존율을 극대화시켜 유산균을 식품, 의약, 사료, 발효용 첨가제 등으로 활용함에 있어서 제품의 품질 및 유통기간을 증진시키며, 유산균을 낮은 단가로 공급할 수 있게 한다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

이중희

광주광역시 북구 일곡마을로 10, 402동 110호(일곡동, 청솔4차아파트)

최학중

광주광역시 서구 풍암순환로 183, 제101동 1506호(풍암동, 우미광장아파트)

장자영

광주광역시 광산구 장덕로95번길 45, 105동 1401호(장덕동, 수완GS자이아파트)

강미란

광주광역시 서구 풍암순환로 10, 202동 1506호(풍암동, 호반.중흥아파트)

곽현정

광주광역시 남구 정율성로 7, 204동 705호(양림동, 휴먼시아2차아파트)

하상현

광주광역시 서구 풍금로11번길 12-20, 305호(풍암동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711007351

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 세계김치연구소

연구사업명 세계김치연구소연구운영비지원

연구과제명 중소·중견 김치제조업 활성화를 위한 맞춤형 중견 산업화 기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 세계김치연구소

연구기간 2013.01.01 ~ 2017.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

유산균이 포집되어 있는 알지네이트 비드 및 동결보호제로서 콩가루를 포함하는 유산균 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 조성물은 당류, 아미노산, 펩타이드, 젤라틴, 글리세롤, 당알콜, 유청, 알긴산, 아스코르빈산, 효모 추출물, 탈지유, 트레할로스 및 마늘 추출물로부터 선택되는 하나 이상의 추가의 동결보호제를 더 포함하는 유산균 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 유산균은 김치 유래의 유산균인 유산균 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 유산균은 *Lactobacillus* 속, *Lactococcus*속, *Weissella* 속, *Streptococcus* 속, *Enterococcus*속, *Bifidobacterium* 속, *Leuconostoc* 속 및 *Pediococcus* 속으로 이루어지는 균으로부터 선택되는 1종 이상의 유산균인 유산균 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 유산균은 *Lactobacillus brevis*, *Lactococcus lactis*, *Weissella cibaria*, *Weissella koreensis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc citreum*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium animalis* 및 *Pediococcus pentosaceus*로 이루어진 균으로부터 선택되는 1종 이상의 유산균인 유산균 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 유산균이 포집되어 있는 알지네이트 비드는 콩가루 수용액에 침지되어 있는 것인 유산균 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 조성물은 동결된 형태 또는 동결건조된 분말의 형태인 유산균 조성물.

청구항 8

유산균이 포집되어 있는 알지네이트 비드 및 동결보호제로서의 콩가루의 혼합물을 동결 또는 동결건조하는 것을 포함하는 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 유산균 조성물의 제조방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 혼합물은 유산균이 포집되어 있는 알지네이트 비드를 콩가루 수용액에 침지하여 얻어지는 것인 유산균 조성물의 제조방법.

청구항 10

동결 형태의 유산균 제제 또는 동결건조 유산균 분말 제제의 제조에 있어서, 유산균이 포집되어 있는 알지네이트 비드에 대해 동결보호제로서 콩가루를 첨가하여 동결 또는 동결건조하는 것을 포함하는 유산균의 동결 보호 방법.

청구항 11

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 유산균 조성물을 포함하는 식품.

청구항 12

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 유산균 조성물을 포함하는 건강기능식품.

청구항 13

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 유산균 조성물을 포함하는 의약.

청구항 14

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 유산균 조성물을 포함하는 사료.

청구항 15

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 유산균 조성물을 포함하는 발효용 첨가제.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 유산균이 포집되어 있는 알지네이트 비드 및 동결보호제로서 콩가루를 포함하는 생존율이 증진된 유

산균 조성물, 및 이의 제조방법 및 용도에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 유산균은 자연계에 널리 존재하며 포도당 또는 유당과 같은 탄수화물을 혐기적으로 이용하여 유산을 생산하는 세균이다. 유산균은 사람이나 동물의 장내에 서식하면서 장내 이상 발효를 억제하고 장 기능을 활성화시키며, 감염에 대한 저항성, 면역 증진 작용 등의 유익한 작용을 하는 것으로 알려져 있어 유산균을 포함하는 프로바이오틱스(probiotics) 조성물이 활발히 개발되고 있다. 유산균은 또한 다양한 채소와 과일에서도 발견되는데, 요구르트, 우리나라의 김치나 독일의 사우어크라우트(sauerkraut)와 같은 발효식품에서 그 발효과정에 중요한 역할을 담당하는 것으로 보고되어, 발효 식품의 제조시, 식품의 품질 균일화 및 품질 유지를 위해 우수한 유산균 균주를 분리 선발하여 식품 제조시 첨가할 수 있는 식품 발효용 미생물 첨가제로서 개발하기 위한 연구가 진행 중에 있다.
- [0003] 프로바이오틱스로서의 유산균 제제 또는 식품 발효용 미생물 첨가제를 유통하기 위해서는 미생물의 보존을 위한 제제화가 필요한데, 동결/동결건조는 대부분의 미생물을 효과적으로 장기 보존할 수 있는 방법이다. 오염방지, 저장, 수송, 경제성 등에서 동결/동결건조는 탁월한 장점을 찾을 수 있지만, 동결/동결건조 과정에서 균체의 활성과 생존율이 급격하게 감소하게 되므로 미생물 균체의 생존율을 극대화 할 수 있는 방법이 요구된다.
- [0004] 기존의 유산균 동결건조 분말의 제조공정은 수용성 배지 등을 사용하여 혐기적 발효장치 내에서 이루어지는 유산균 발효 생산, 원심분리 및 한외여과를 사용한 균체 회수, 그리고 급속동결 및 동결건조의 순서로 이어진다. 이러한 과정은 동결시 얼음입자가 만들어지면서 세포의 막 구조를 손상시키고 유산균 분말이 공기, 수분, 온도 조건에 민감하게 반응하기 때문에 저장 및 유통안정성과 가공안정성을 확보하기에 어려움이 있다. 이를 개선하기 위하여 유산균이 사멸하지 않고 유지될 수 있는 수단으로 당류 및 아미노산, 탈지유, 젤라틴, 구연산 등의 동결보호제를 단독 또는 조합하여 첨가한다. 동결보호제는 유산균 분말에 물리화학적 안정성을 부여함으로써 단순 동결건조된 유산균 분말에 비하여 높은 생존율을 나타낸다.
- [0005] 그러나, 주요 유산균에 대한 종균화 사업으로 동결건조 후 미생물 제제화가 실행되고 있지만, 아직까지는 실제 동결건조 후 생존율이 60-70%에 머물러 있어 생산비용의 증가라는 문제점이 나타나고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명은 동결 또는 동결건조 후 미생물의 생존율을 향상시킨 유산균 조성물, 이의 제조방법 및 이의 용도를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0007] 본 발명은 유산균이 포집되어 있는 알지네이트 비드 및 동결보호제로서 콩가루를 포함하는 유산균 조성물, 이의 제조방법 및 이의 용도를 제공한다.
- [0008] 본 발명의 유산균 조성물은 유산균의 생존율을 향상시킬 수 있는 수단으로서, 유산균을 알지네이트 비드에 포집하고 이와 함께 동결보호제로서 콩가루를 사용하는 것을 특징으로 한다.
- [0009] 하기 실시예에서 확인할 수 있는 바와 같이, 유산균의 동결보호제로서 기존에 사용되고 있는 탈지유, 효모 추출물 또는 트레할로스에 비해 콩가루를 동결보호제로서 사용하였을 때 유산균의 동결건조 후 생존율이 월등히 향상됨을 확인하였다. 또한, 콩가루를 동결보호제로 사용함과 더불어 유산균을 알지네이트 비드에 포집하여 사용하는 것이 유산균을 알지네이트 비드로 코팅하지 않은 채 콩가루를 동결보호제로 사용하는 것이나 단순히 유산균을 알지네이트 비드로 코팅시켜 사용하는 것에 비해 유산균의 생존율을 월등히 향상시키는 것으로 나타났다.
- [0010] 본 발명에서 동결보호제로서 사용되는 콩가루는 통상 시판되고 있는 제품을 구입하여 이용할 수 있으며, 특별히 그 종류에 제한이 없다. 콩가루는 식품첨가등급의 재료로서 여러가지 식품에 첨가되고 있는 안정성 높은 물질이

므로 본 발명에 따른 유산균 조성물의 제조에도 유용하게 사용될 수 있다.

- [0011] 본 발명에 따른 유산균 조성물은 동결보호제로서 콩가루 외에도, 종래에 동결보호제로서 알려져 있던 성분들을 추가로 포함할 수 있다.
- [0012] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 조성물은 당류, 아미노산, 펩타이드, 젤라틴, 글리세롤, 당알콜, 유청, 알긴산, 아스코르빈산, 효모 추출물, 탈지유, 트레할로스 및 마늘 추출물로부터 선택되는 하나 이상의 추가의 동결보호제를 더 포함할 수 있다. 상기 추가의 동결보호제를 콩가루와 조합사용하는 것이 미생물의 생존율을 보다 향상시켜주는 것은 아닐 수 있으나, 본 발명에 따른 미생물 첨가제 조성물의 사용에 따른 식품의 맛, 향, 식감 등의 변화나 제품 생산 비용 등을 고려할 때 추가의 동결보호제를 적절히 조합하여 사용하는 것이 가능하다.
- [0013] 한편, 본 발명의 유산균 조성물에서 포함할 수 있는 유산균의 종류는 특별히 제한되지 않으며, 구체적인 유산균의 종류는 발효시키고자 하는 식품의 종류에 따라 해당 식품 발효를 위해 적합한 것으로 종래에 연구되어 왔거나 사용되어 온 것이면 어떠한 것이든 이용가능하다. 본 발명에 있어서 유산균은 단독으로 또는 1종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.
- [0014] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 유산균은 김치 유래의 유산균이고, 상기 식품은 김치일 수 있다. 하기 실시예에서는 알지네이트 비드 및 콩가루를 이용한 본 발명에 따른 유산균 조성물을 제조하고, 김치 유래 유산균에 대한 이들 성분의 동결보호 효능을 평가하였다.
- [0015] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 유산균은 *Lactobacillus* 속, *Lactococcus*속, *Weissella* 속, *Leuconostoc* 속, *Streptococcus* 속, *Enterococcus*속, *Bifidobacterium* 속, 및 *Pediococcus* 속으로 이루어지는 균으로부터 선택되는 1종 이상의 유산균일 수 있다. 본 발명의 바람직한 구체예에서, 상기 유산균은 *Lactobacillus brevis*, *Lactococcus lactis*, *Weissella cibaria*, *Weissella koreensis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc citreum*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium animalis* 및 *Pediococcus pentosaceus*로 이루어진 균으로부터 선택되는 1종 이상의 유산균일 수 있다.
- [0016] 본 발명에 따른 유산균은 알지네이트 비드에 포집된 상태로 유산균 조성물 내에 포함된다. 알지네이트 비드에 유산균을 포집시키는 방법은 특별히 제한되지 않는다. 예를 들어, 유산균을 알긴산 수용액(Na-alginate)에 첨가 후 CaCl₂ 용액에 적하하여 유산균이 포집되어 있는 알지네이트 비드를 제조할 수 있다.
- [0017] 알지네이트 비드의 형성을 위해 유산균과 혼합되는 상기 알긴산 수용액은 1% 내지 3%(w/v)의 농도를 가질 수 있다. 상기 범위 내일 때 유산균의 생존율이 우수하며, 알지네이트 비드의 제조를 위해서도 적합하다.
- [0018] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 알지네이트 비드는 0.8 내지 3 mm의 크기를 가질 수 있다. 알지네이트 비드는 상기 범위 내의 크기일 때 유산균 코팅으로 인한 생존율 상승 및 제조 상의 용이성을 제공한다.
- [0019] 유산균이 포집되어 있는 알지네이트 비드는 동결보호제와의 병용 사용을 위해 콩가루와 혼합될 수 있다. 본 발명에 따른 유산균 조성물의 제조 방법이 이에 제한되는 것은 아니나, 예를 들어, 유산균이 포집되어 있는 알지네이트 비드를 콩가루 수용액에 침지한 후 동결건조하는 방법으로 동결보호제를 처리할 수 있다. 다르게는, 유산균을 알긴산 수용액에 첨가 후 CaCl₂ 용액에 적하하여 유산균이 포집되어 있는 알지네이트 비드를 제조함에 있어서, 알긴산 수용액에 유산균과 콩가루를 동시에 첨가시킬 수도 있다.
- [0020] 본 발명에 따른 유산균 조성물은 동결된 형태 또는 동결건조된 분말의 형태일 수 있다. 액상의 종균을 배양하여 사용하기 보다는 동결된 형태 또는 동결건조된 분말의 형태의 유산균 조성물로 제조하여 보급하는 것이 유산균이 활용되는 제품의 품질 향상 및 품질의 안정성 향상을 위해 유리하다.
- [0021] 본 발명은 또한 유산균이 포집되어 있는 알지네이트 비드 및 동결보호제로서의 콩가루의 혼합물을 동결 또는 동결건조하는 것을 포함하는 상기 유산균 조성물의 제조방법을 제공한다.
- [0022] 예를 들어, 유산균은 김치 등의 식품으로부터 순수 분리하여 얻을 수 있으며, 이들은 통상의 방법을 활용하여 배양할 수 있다. 이렇게 배양된 유산균을 알지네이트 비드에 포집시키고, 콩가루 또는 추가의 동결보호제와 함께 적절한 농도로 혼합하고 -50 내지 -90 °C의 저온에서 54 내지 90시간 동안 동결 또는 동결건조하여 본 발명에 따른 유산균 조성물을 제조할 수 있다.

- [0023] 상기 조성물 내 유산균의 농도는 최종적으로 제조하고자 하는 제품의 종류, 사용되는 유산균의 종류, 발효의 정도 등에 따라 적절히 조절될 수 있으며, 콩가루의 농도는 함께 사용되는 추가의 동결보호제의 유무 등에 따라 조절될 수 있다.
- [0024] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 혼합물은 멸균수에 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{11}$ CFU/ml의 농도로 현탁되어 있는 유산균에 대해 상기 현탁액의 부피를 기준으로 5-20%(w/v), 예를 들어, 7 내지 15%(w/v), 8 내지 12%(w/v)의 콩가루를 첨가함으로써 얻을 수 있다. 콩가루를 상기 범위 내에서 동결보호제로 사용할 경우 탈지유, 효모 추출물 또는 트레할로스에 비해 동등 또는 월등하게 우수한 유산균 생존율을 나타낸다.
- [0025] 본 발명은 또한 동결/동결건조 형태의 유산균 조성물의 제조에 있어서, 유산균이 포집되어 있는 알지네이트 비드에 동결보호제로서 콩가루를 혼합하여 동결 또는 동결건조하는 것을 포함하는 유산균의 동결 보호 방법을 제공한다. 상기 방법을 구현하기 위한 구성은 앞서 설명한 바와 같다.
- [0026] 본 발명은 또한 상기 유산균 조성물의 용도를 제공한다. 한 구체예에서, 상기 조성물은 정장제, 생균제 또는 항균제로의 사용을 위한 것일 수 있다.
- [0027] 여기에서, '정장제'란 사람이나 동물의 장내 세균총의 이상 발효에 의하여 야기되는 제반증상을 치료 및 개선하는 제제를 말한다. 상기 증상으로는 이에 한정되지는 않으나 예를 들어, 유해 미생물에 의한 감염성 설사, 위장염, 염증성 장질환, 신경성 장염 증후군, 소장 미생물 과성장증 및 장 급이성 설사 등이 포함된다.
- [0028] 한편, '생균제'는 살아 있는 균 즉, 사람이나 동물이 섭취했을 때 위장관에 머물러 생존할 수 있는 미생물로서 특정 병리 상태를 예방하거나 치료할 수 있는 효과가 있는 미생물 제제를 말한다. 일반적으로 생균제는 장내세균총의 이상 발효에 의하여 야기되는 제반 증상을 치료하고 개선하는 효과가 있으며 사람 및 동물에 투여되면 장내의 소화관 벽에 밀집, 정착하여 유해 미생물이 정착하지 못하게 하는 작용을 하며 유산을 생성하여 장내 pH를 낮추어서 유해 미생물의 증식을 억제한다.
- [0029] 상기에서 '항균제'란 유해 미생물의 생육을 저해 또는 억제하는 활성을 갖는 제제를 말한다. 바람직하게는 상기 유해 미생물로는 생체 내 소화기관에 존재하면서 소화기관과 관련된 여러 질환을 유발하는 미생물일 수 있다. 상기 미생물은 살모넬라 갈리나룸(*Salmonella gallinarum*), 살모넬라 엔테리티디스(*Salmonella enteritidis*), 살모넬라 타이피머리움(*Salmonella typhimurium*), 포도상 구균(*Staphylococcus aureus*), 장독성 대장균(*enterotoxigenic E. coli*), 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*), 캄필러박터 제주니(*Campylobacter jejuni*), 클로스트리디움 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*) 및 이들의 조합일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0030] 상기 정장제, 생균제 또는 항균제로의 사용을 위한 조성물은 예를 들어, 식품, 의약 또는 사료에 포함되어 이들 제품에 유산균이 갖는 기능성을 부여할 수 있다.
- [0031] 한 구체예에서, 상기 조성물은 식품 조성물 또는 식품첨가용 조성물의 형태로 제공될 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 따른 식품 조성물은 하기 의약 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 건강기능식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가할 수 있다. 따라서 본 발명은 상기 유산균 조성물을 포함하는 식품을 제공한다. 이러한 식품으로는 예를 들어, 음료류, 유제품, 비타민 복합제, 건강기능식품 등이 있다.
- [0032] 예컨대, 본 발명의 식품 조성물이 발효유와 같은 음료류로 제조되는 경우 본 발명의 유산균 조성물 이외에도 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 각종 식물 추출액 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0033] 본 발명은 또한 상기 유산균 조성물을 포함하는 건강기능식품을 제공한다. 건강기능식품이란, 어떠한 유효성분을 음료, 차류, 향신료, 껌, 과자류 등의 식품소재에 첨가하거나, 캡슐화, 분말화, 현탁액 등으로 제조한 식품으로, 이를 섭취할 경우 건강상 특정한 효과를 가져오나, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있다. 이와 같이 하여 얻어지는 본 발명의 건강기능식품은, 일상적으로 섭취하는 것이 가능하기 때문에 매우 유용하다. 현재 유산균은 유독물질 및 부패균의 제거, 정장 작용, 항균 작용, 항암 작용 등을 위한 건강기능식품으로서 판매되고 있다.
- [0034] 식품에 있어서의 본 발명의 유산균 입자의 첨가량은, 식품의 종류에 따라 달라 일률적으로 규정할 수 없지만, 식품 본래의 맛을 손상시키지 않는 범위에서 첨가하면 되며, 대상 식품에 대하여 통상 0.01 내지 50 중량%, 바람직하기로는 0.1 내지 20 중량%의 범위이다. 과립, 정제 또는 캡슐형태의 식품의 경우에는 통상 0.1 내지 100 중량%, 바람직하기로는 0.5 내지 80 중량%의 범위에서 첨가할 수 있으며, 음료 형태의 식품의 경우에는 통상

1×10^8 내지 1×10^{10} CFU/ml 의 범위에서 첨가할 수 있다.

- [0035] 다른 구체예에서, 본 발명은 또한 상기 조성물을 포함하는 의약을 제공한다. 한 구체예에서, 상기 의약은 정장제, 생균제 또는 항균제일 수 있다.
- [0036] 본 발명의 조성물을 의약의 제조를 위해 사용하는 경우, 투여를 위해서 상기 유산균 조성물 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 의약 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0037] 의약 조성물은 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등을 사용할 수 있다.
- [0038] 상기 의약 조성물의 제제 형태는 과립제, 산제, 정제, 캡슐제, 액제, 시럽, 등이 될 수 있으며, 공지의 방법을 통해 이를 제조할 수 있다.
- [0039] 정장제, 생균제 또는 항균제로서 사용할 경우 본 발명의 상기 유산균 조성물은 성인의 경우, 1일 1회 내지 수회 투여시, 조성물 내 생균수가 1×10^5 내지 1×10^{12} CFU/g, 바람직하게는 1×10^7 내지 1×10^{12} CFU/g이 되도록 투여할 수 있다. 치료상 유효량 및 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다. 그러므로, 투여될 최적의 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유산균 및 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다.
- [0040] 또한, 본 발명에 따른 조성물은 사료 조성물 또는 사료첨가용 조성물의 형태로 제공될 수 있다. 본 발명의 조성물을 포함하는 사료는 기존 항생제의 대체용으로 사용되어 장내 유해균의 생육을 억제하며 장내 균총을 안정되게 유지하여 가축의 건강상태를 양호하게 하여 가축의 증체량과 육질을 개선시키고 산유량 및 면역력을 증가시킬 수 있다. 본 발명의 사료 조성물은 이에 한정되지는 않으나 발효사료, 배합사료, 펠렛 형태 및 사일리지 (silage) 등의 형태로 제조될 수 있다. 예를 들어, 배합사료는 여러 종류의 일반사료와 본 발명의 유산균을 혼합하여 제조할 수 있으며, 상기 펠렛 형태의 사료는 상기 배합사료를 펠렛기에서 열과 압력을 가하여 제조할 수 있다.
- [0041] 사료에 포함되는 본 발명의 유산균 입자의 양은 1×10^6 내지 1×10^{10} CFU/g, 바람직하게는 1×10^6 CFU/g 내지 1×10^8 CFU/g 이 되도록 투여할 수 있다.
- [0042] 또한, 상기 본 발명에 따른 조성물들은 본 발명의 유산균 입자와 함께 인간을 포함하는 동물이 섭취하기에 적합하고 섭취시 유해 미생물의 생육을 억제하며 장내 균총의 균형을 개선시키는 활성을 가지는 공지된 미생물을 추가로 포함할 수 있다.
- [0043] 다른 구체예에서, 본 발명의 유산균 조성물은 발효용 첨가제로서의 사용을 위한 것일 수 있다. 유산균은 앞서 설명한 정장제, 생균제, 항균제로서의 직접적인 활용 외에도 식품 등의 발효를 위한 발효용 첨가제로도 활용되고 있다. 예를 들어, 김치의 제조시 본 발명에 따른 유산균 조성물을 발효용 첨가제로서 이용할 경우 김치의 발효를 도와 김치의 맛을 개선시킬 수 있을 뿐만 아니라, 저장기간을 증가시켜 김치의 유통기간을 증가시킬 수 있다. 이외에도 유산균은 발효 홍삼과 같은 건강기능식품의 제조 또는 발효 화장료의 제조시 사용되어 발효물의 기능성 향상을 이끌 수 있는 것으로 알려져 있으므로, 이들 발효물의 제조를 위한 발효용 첨가제로서 사용될 수 있다.

발명의 효과

- [0044] 본 발명에서 유산균의 동결보호를 위해 사용하는 알지네이트 비드와 콩가루는 유산균 조성물을 제조함에 있어서 균체의 보호 효과가 종래의 동결보호제를 사용한 경우에 비해 매우 뛰어날 뿐만 아니라, 식품첨가등급의 재료로서 안전성을 제공해 준다. 따라서, 본 발명에 따른 유산균 조성물은 미생물의 생존율을 극대화시켜 유산균을 식품, 의약, 사료, 발효용 첨가제 등으로 활용함에 있어서 제품의 품질 및 유통기간을 증진시키며, 유산균을 낮은 단가로 공급할 수 있게 한다.

도면의 간단한 설명

[0045]

도 1은 동결보호제 종류에 따른 유산균의 생존율을 비교한 그래프이다.

도 2는 동결보호제로서 사용된 콩가루의 농도에 따른 유산균의 생존율을 비교한 그래프이다.

도 3은 *Lactobacillus brevis* A101에 대해 증류수만 사용한 무처리 대조군, 동결보호제로서 콩가루를 사용한 군, 알지네이트 비드에 *Lactobacillus brevis* A101를 포집한 군, 알지네이트 비드에 *Lactobacillus brevis* A101를 포집한 후 콩가루 수용액에 침지한 군의 온도에 따른 *Lactobacillus brevis* A101의 생존율을 비교한 그래프이다.

도 4는 *Lactococcus lactis* CHJ10에 대해 증류수만 사용한 무처리 대조군, 동결보호제로서 콩가루를 사용한 군, 알지네이트 비드에 *Lactococcus lactis* CHJ10를 포집한 군, 알지네이트 비드에 *Lactococcus lactis* CHJ10를 포집한 후 콩가루 수용액에 침지한 군의 온도에 따른 *Lactococcus lactis* CHJ10의 생존율을 비교한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0046]

본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0047]

[실시예]

[0048]

하기 실시예에서는 유산균이 포집되어 있는 알지네이트 비드 및 동결보호제로서 콩가루를 포함하는 유산균 조성물을 제조하고, 유산균에 대한 알지네이트 비드 및 콩가루의 동결보호 효능을 평가하였다.

[0049]

사용 균주 및 균주 계수

[0050]

김치로부터 분리된 *Lacobacillus brevis* A101, *Lactococcus lactis* CHJ10 균주를 사용하였다. 실험균주는 유산균 배양에 적합한 MRS broth(Lactobacilli MRS agar, Difco) (표 1)에 접종하여 30℃에서 24시간 배양하여 활성화 시킨 후, MRS agar plate에 접종하여 4℃에서 4주 간격으로 계대배양하면서 보관하였다. 시험 균주의 계수는 MRS broth에 0.2% Bromophenol blue(BPB) 지시약 1%를 첨가하여 MRS-BPB 배지를 제조하여, 미생물 현탁액 100 μl을 도말 후 30℃에서 36-48시간 동안 배양하여 미생물 군집의 숫자를 계수하였다. 본 명세서 내에 표현한 상대적 생존율은 동결건조전 생균수에 대한 동결건조후 생균수의 비율을 백분율로 계산하고, 이를 그래프로 나타낸 것이다. 데이터는 평균 ± SD (n = 3)로 표현하였으며, 막대 그래프 상단에 표현된 서로 상이한 알파벳 문자는 각 군이 유의하게 차이를 나타낸다(p < 0.05).

표 1

MRS 배지 조성

[0051]

성분	농도 (g/L)
프로테오스 펩톤	10
우육추출물	10
효모추출물	10
포도당	20
트윈 80	1
구연산암모늄	2
초산나트륨	5
황산마그네슘	0.1
황산망간	0.05
인산나트륨	2
증류수	1 L

[0052] 실시예 1. 동결보호제에 따른 김치 유래 유산균의 생존율 검정

[0053] (1) 동결보호제 종류에 따른 김치 유래 유산균의 생존율 비교

[0054] 김치미생물 생존율 향상을 위한 동결건조보호제로 식품첨가등급의 탈지유(Difco, USA), 효모추출물(Difco, USA), 콩가루(TATUA, NewZealand), Trehalose(WAKO, Japan)를 사용하였다. 멸균수를 대조구로 사용하였고 각 보호제 농도를 20%(v/v)로 제조하였다.

[0055] 김치 유래 유산균의 농도를 2.8×10^{10} cfu/ml로 고정하고 균 현탁액 1 ml와 동결보호제 용액 1 ml을 혼합하여 보호제의 최종농도가 10%가 되도록 하였다. 동결보호용액이 유산균에 충분히 확산되게 하기 위하여 1시간 동안 보관한 후 2시간 동안 -20°C 에서 보관한 후 -80°C 에서 2시간 보관하여 냉동시킨 후 동결건조기(EYELA Co., Japan)를 이용하여 -80°C 에서 24시간 동안 동결건조하였다.

[0056] 동결건조 후 김치 유래 유산균 분말을 MRS 고체배지에 도말하여 생존수를 조사하여 상대적 생존율을 계산하였다.

[0057] 도 1은 4 가지 식품첨가등급의 동결보호제를 첨가하여 김치미생물의 동결보호효과를 검정한 결과를 보여준다. 모든 동결보호제 처리구에서 동결보호제를 사용하지 않은 처리구보다 생존율이 증가하였다. 콩가루를 보호제로 사용하였을 경우 보호효과가 가장 우수하여 *Lb. brevis* A101 균주의 경우 동결건조 직후 90%의 가장 높은 생존율을 나타내었다. *Lc. lactis* CHJ10의 경우에서도 각각 94%의 높은 생존율을 기록하였다. 일반적으로 유산균의 동결보호제로 사용되는 탈지유 처리구에서 실험균주의 생존율은 각각 70~76% 수준으로 나타내어 본 연구결과 중 보호효과가 뛰어난 콩가루보다 비교적 낮은 수준이었다. 효모추출물 처리구 에서도 65%이상 보호효과를 기록하여 동결보호제로서의 가능성을 제시하였고, 천연 비환원성당인 트레할로스는 단백질의 동결에 의한 보호작용 건조에 따른 세포 보호 작용 등을 수행하여 미생물의 생명 보전 및 건조에 의한 영향에 작용하는 보호물질로서, *Lc. lactis* CHJ10 균주의 경우 45%의 낮은 생존율을 기록하였으나, *Lb. brevis* A101의 경우에는 각각 60%의 비교적 높은 생존율을 나타내었다.

[0058] (2) 콩가루 농도에 따른 김치 유래 유산균의 생존율 비교

[0059] 상기 방법에서 동결보호제로 활성이 가장 높은 콩가루의 농도만 달리하여, 이에 따른 유산균의 생존율 변화를 조사하였다. 도 2에서 볼 수 있는 바와 같이, 두 가지 실험균주에서 동결건조 후 생존율은 콩가루 농도 의존적으로 증가하지 않았다. 콩가루 10% 처리구에서 *Lb. brevis*와 *Lc. lactis* CHJ10 균주의 경우 동결보호 직후 각각 92.7%와 94.7%의 가장 높은 생존율을 기록하였으며, 15% 및 20%로 증가하였을 때 오히려 생존율은 감소하는 경향을 나타내었다.

[0060] 실시예 2. 알지네이트 비드에 포집된 유산균에 콩가루를 병용한 경우의 김치 유래 유산균의 생존율 검정

[0061] 콩가루를 동결보호제로 사용하면서 유산균의 생존율을 보다 향상시킬 수 있는지 확인하고자 하였다. 이에, 멸균수에 실험균주를 현탁하여 동결건조를 실시한 무처리 대조군, 동결보호제로 콩가루 용액을 사용한 실험군, 유산균을 알지네이트 비드로 포집한 실험군, 유산균을 알지네이트 비드에 포집하고 여기에 콩가루 수용액을 침지시킨 실험군을 대상으로, 실시예 1과 동일한 방식으로 실험을 수행하되, 동결건조 후의 저장온도 조건을 달리하여 그에 따른 실험균주의 상대적 생존율 변화를 분석하였다.

[0062] 도 3은 동결보호 조건을 달리한 *Lb. brevis* A101의 저장 온도 조건에 따른 상대적 생존율의 변화를 보여주는 그래프이다. 모든 온도 조건에서 0일차의 상대적 생존율은 동결건조 직후의 *Lb. brevis* A101의 생존율을 나타낸다. *Lb. brevis* A101의 동결건조 직후의 생존율을 분석해 보면, 멸균수에 실험균주를 현탁하여 동결건조를 실시한 직후 생존율은 10% 미만으로 매우 낮게 나타났다. 동결보호제로 콩가루 용액을 사용한 처리구는 동결건조 직후 95.1%의 생존율을 나타내었고, 유산균을 알지네이트 비드에 포집한 후 비드를 콩가루 10% 용액에 침지한 경우 동결건조 직후의 생존율은 97.9%를 나타내었다. 콩가루 수용액의 처리 없이 유산균이 포집된 알지네이트 비드만을 동결건조 한 경우 동결건조 직후의 유산균 생존율은 88.8%를 나타내어 유산균을 비드에 포집한 후 동결보호제에 침지하는 방법이 동결건조 직 후의 생존율이 가장 높은 것을 확인하였다.

[0063] 추가로, 저장 온도 조건의 차이에 따른 *Lb. brevis* A101의 상대적 생존율 변화를 분석하였다. 그 결과, -18°C 저장 조건에서 동결 보호제만 처리한 제제의 경우, 7일 경과 후의 생존율은 93.5%로 나타났고, 저장 28일 경과 후에는 87.6%, 56일에는 44.6%로 생존율이 점차 감소하였다. 유산균이 포집된 알지네이트 비드를 콩가루에 침지

하여 동결건조한 처리구는 저장 7일 차 생존율이 96.5%, 28일차에는 90.1%, 56일 경과 후에는 61.7%로 나타났다. 유산균이 포집된 알지네이트 비드만 동결건조 시킨 처리구는 저장 7일 경과 시 86.2%, 28일 경과 후 54.6%, 56일 저장한 제제에서는 33.5%로 나타나 위의 세가지 보호제 사용 방법 중 가장 낮은 생존율을 나타내었다.

[0064] 35℃에서 보관한 제제의 경우 동결 보호제만 처리한 제제의 경우, 7일 경과 후의 생존율은 76.5%로 나타났고, 저장 28일 경과 후에는 46.8%, 56일에는 6.5%로 생존율이 점차 감소하였다. 유산균을 알지네이트 비드에 포집한 후 동결보호제를 병행해서 사용한 처리구는 저장 7일 차 생존율이 79.5%, 28일차에는 51.6%, 56일 경과 후에는 16.8%로 나타났다. 유산균이 포집된 알지네이트 비드만 동결건조 시킨 처리구는 저장 7일 경과 시 69.4%, 28일 경과 후 27.4%, 56일 저장한 제제에서는 4.6%로 세 보호제 사용 방법 중 가장 생존율이 급격하게 감소하는 저장 온도로 확인되었다.

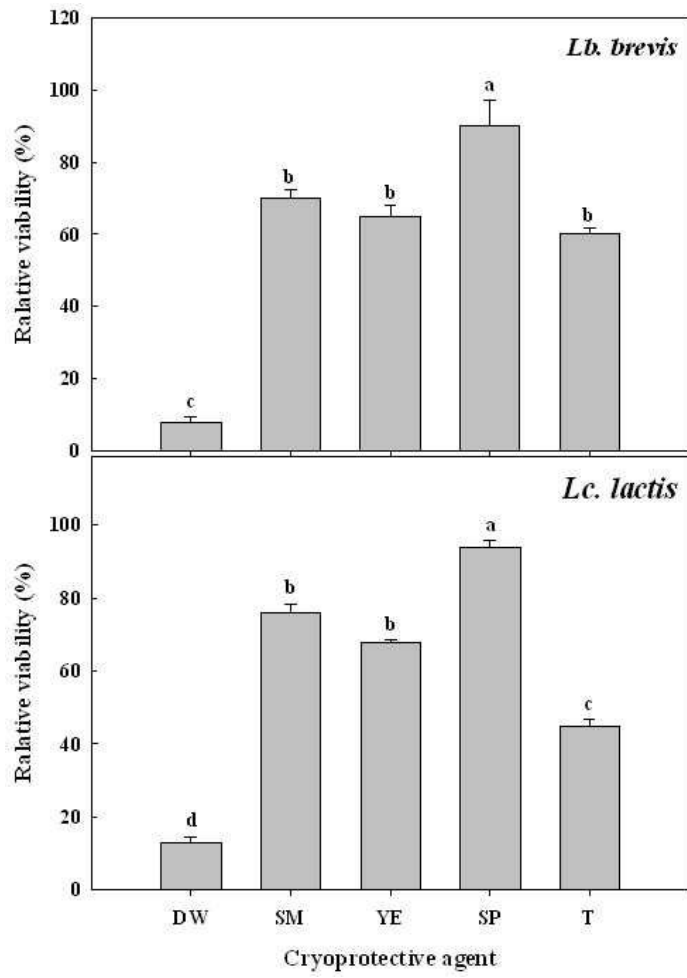
[0065] 도 4은 동결보호 조건을 달리한 *Lc. lactis* CHJ10의 저장 온도 조건에 따른 상대적 생존율의 변화를 보여주는 그래프이다. 모든 온도 조건에서 0일차의 상대적 생존율은 동결건조 직후의 *Lc. lactis* CHJ10의 생존율을 나타낸다. *Lc. lactis* CHJ10의 동결건조 직후의 생존율을 분석해 보면, 멸균수를 이용한 동결건조 직후 *Lc. lactis* CHJ10의 생존율은 10% 미만으로 나타났다. 동결보호제로 10% 콩가루 용액을 사용한 처리구의 경우에는 96.6%, *Lc. lactis* CHJ10를 알지네이트 비드에 포집 후 콩가루 용액에 침지한 경우 동결건조 직후의 생존율은 97.7%를 나타내었다. *Lc. lactis* CHJ10를 알지네이트 비드에 포집하여 비드만 동결건조한 처리구의 동결건조 직후의 생존율은 84.5%를 나타내어 *Lc. lactis* CHJ10 균주에서도 유산균을 알지네이트 비드에 포집한 후 콩가루에 침지하는 방법이 동결건조 직후의 유산균의 생존율이 가장 높은 것으로 나타났다.

[0066] 상기 두 균주에 대한 실험 결과를 정리하면, 알지네이트 비드에 유산균을 포집하여 동결보호제를 병행하여 사용한 처리구에서의 생존율이 동일한 동결보호제를 사용하였을 경우 또는 알지네이트 비드에 유산균을 포집하여 비드만 이용한 경우의 생존율보다 동결건조 직후 및 저장기간에 따라서도 비교적 높은 생존율을 나타내어 두 가지 방법을 조합하여 사용할 경우 각 보호제의 상승효과를 나타낼 수 있는 것으로 판단되었다.

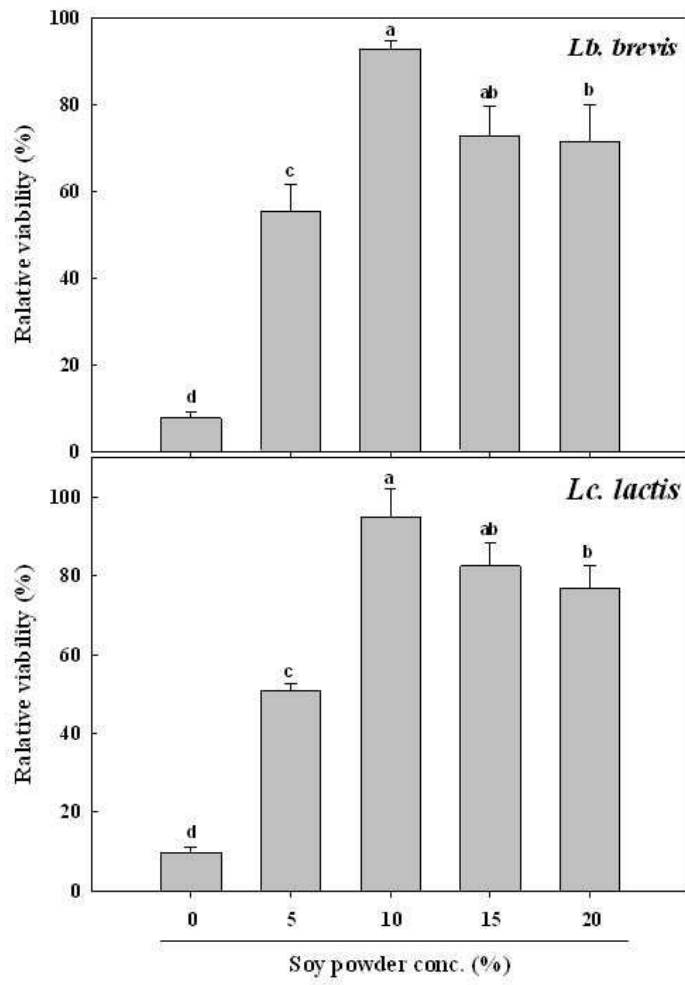
[0067] 또한, 저장기간이 경과될수록 모든 온도에서 제제의 생존율은 비례적으로 감소하였으나 저장 온도가 낮을수록 저장기간에 따른 생존율의 변화가 적은 것을 알 수 있었으며, 제제의 저장 온도는 -18℃ 내지 10℃ 경우 비교적 유산균의 생존율이 높게 나타나 이 온도 범위가 미생물 제제의 유통 온도로 이용하기에 가장 적합하다고 판단되었다.

도면

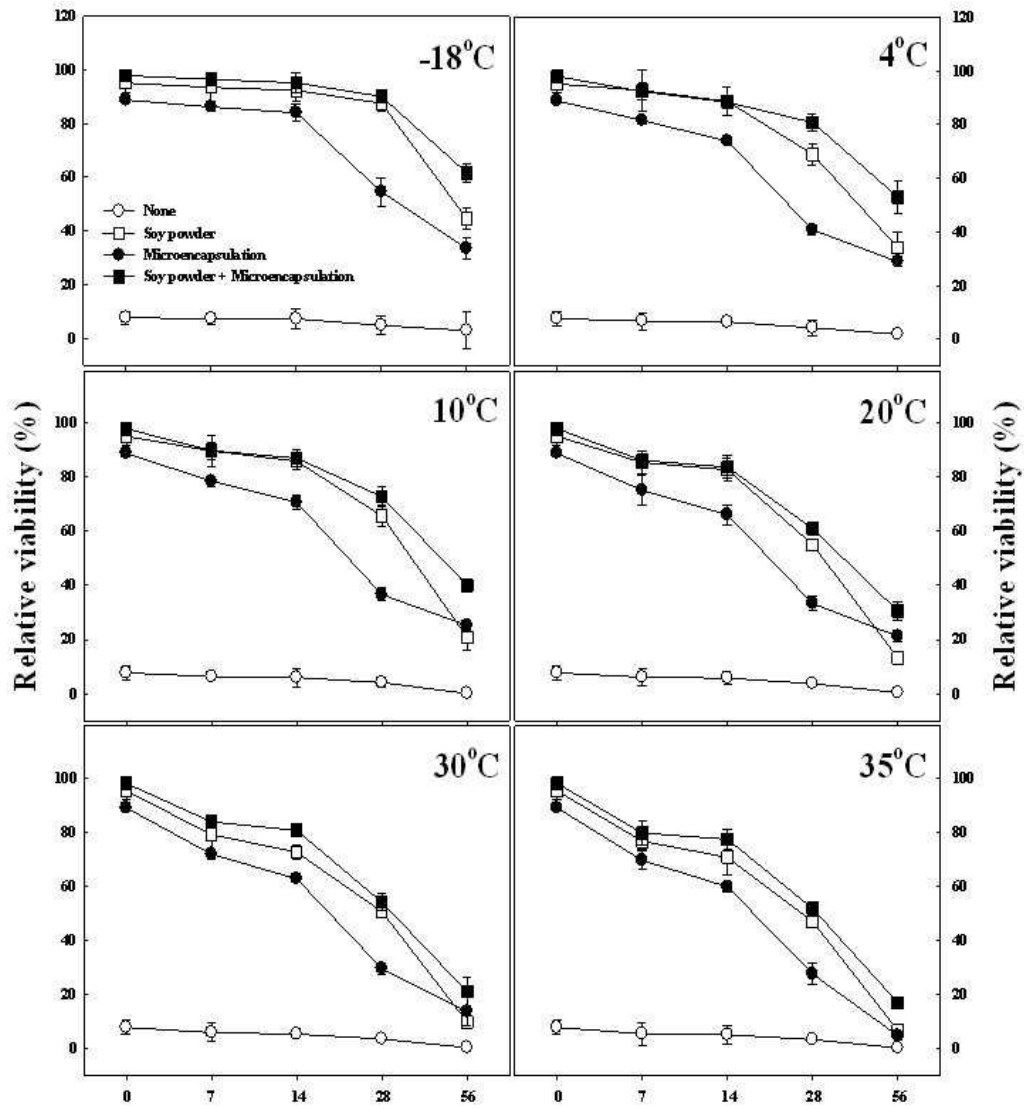
도면1



도면2



도면3



도면4

