



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2009년01월14일
(11) 등록번호 10-0878339
(24) 등록일자 2009년01월06일

(51) Int. Cl.

A23C 9/123 (2006.01) C12N 1/20 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0072765

(22) 출원일자 2007년07월20일

심사청구일자 2007년07월20일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020040110868 A*

WO2002091833 A1*

KR1020060130371 A*

JP57206338 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자

김세현

서울 강남구 청담동 삼익APT 14동 1002호

김영훈

경기 남양주시 도농동 2-1 부영그린타운 203동 1401호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

윤여강, 이문섭

전체 청구항 수 : 총 6 항

심사관 : 류민정

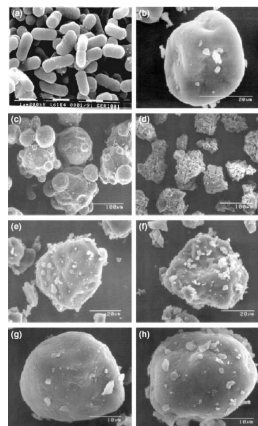
(54) 프리바이오틱 기질을 이용한 유산균의 이중 미세피복 방법

(57) 요약

본 발명은 본 발명은 프리바이오틱 기질을 이용한 유산균의 이중 미세피복 방법에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 유산균을 배양한 후 냉동 건조된 균체를 만드는 단계, 상기 냉동 건조된 균체를 프리바이오틱 코팅물질로 혼성화 시스템(hybridisation system)을 사용하여 1차 피복과정을 수행하는 단계, 및 상기 1차 피복된 균체를 장용 코팅 물질(enteric coating materials)로 2차 피복과정을 수행하는 단계를 포함하는 내산성 및 내열성을 향상시키기 위한 유산균의 이중 미세피복 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 본 발명은 여러 형태의 건식 피복된 락토바실러스 애시도필러스 RP32의 각종 스트레스에 대한 내성을 평가하였으며, 특히 산성, 높은 염분, 고온, 그리고 다양한 온도에서의 생존성 등이 평가하였다. 선택된 프리바이오틱 기질과 수레테릭의 이중 건식 피복된 락토바실러스 애시도필러스 RP32는 내산 및 내열성이 피복되지 않은 락토바실러스 애시도필러스 RP32 보다 월등히 뛰어난 것으로 나타났다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

오세중

광주 서구 치평동 쌍용금호APT 209동 1001호

박동준

경기 용인시 수지구 풍덕천2동 현대프라임 아파트
201-1501

안은영

서울 영등포구 양평동3가 현대 6차 아파트 608동
2303호

특허청구의 범위

청구항 1

하기 단계를 포함하는 내산성 및 내열성을 향상시키기 위한 유산균의 이중 미세피복 방법:

- a) 유산균을 배양한 후 냉동 건조된 균체를 만드는 단계;
- b) 혼성화 시스템(hybridisation system)을 이용하여 상기 냉동 건조된 균체와 프리바이오틱 기질의 중량비가 7:1 내지 11:1(w/w), 회전원통의 속도가 12,000 내지 18,000 rpm, 수행 온도가 20-30℃, 그리고 수행 시간은 2-4분으로 혼성화하여 냉동 건조된 균체를 프리바이오틱 기질로 1차 피복과정을 수행하는 단계; 및
- c) 상기 1차 피복된 균체를 장용 코팅 물질(enteric coating materials)에서 2차 피복과정을 수행하는 단계.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 유산균은 애시도필러스 유산균인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, a) 단계에서 배양된 유산균을 원심 분리한 펠렛(pellets)을 락토오스를 포함하는 탈지유에 현탁한 후 건조하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

삭제

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 프리바이오틱스 기질은 프럭토올리고사카라이드(fructooligosaccharide, FOS), 락툴로오스(lactulose) 또는 라피노오스(raffinose)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 장용 코팅 물질은 수레테릭(Sureteric)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 1항 내지 3항, 제 5항 또는 제 6항 중 어느 한 항에 따른 방법으로 제조된 내산성 및 내열성이 향상된 이중 미세피복 유산균.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- <1> 본 발명은 프리바이오틱 기질을 이용한 유산균의 이중 미세피복 방법에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 유산균을 배양한 후 냉동 건조된 균체를 만드는 단계, 상기 냉동 건조된 균체를 프리바이오틱 코팅물질로 혼성화 시스템(hybridisation system)을 이용하여 1차 피복과정을 수행하는 단계, 및 상기 1차 피복된 균체를 장용 코팅 물질(enteric coating materials)로 2차 피복과정을 수행하는 단계를 포함하는 내산성 및 내열성을 향상시키기 위한 유산균의 이중 미세피복 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- <2> 미세피복 기술(microencapsulation)은 음식, 의학, 화장품 산업에서 폭넓게 이용되어져 왔다. 유제품 산업에서 미세피복은 세균배양액의 생존성을 증가시키고 배달을 용이하게 하기 위해 적용되어져 왔다. Teixeira 등(1995)은 유산균의 미세피복이 특히 음식처리 중에 일어나는 산, 알칼리, 열, 염분 스트레스와 같은 열악한 조건하에서의 저장동안 유산균의 안정도와 생존능력을 강화할 수 있다고 보고하였다. 최근에 몇몇의 연구들이 다양한 피복기술을 사용하여 미세피복된 유산균의 가능성을 보고하였다((Rao 등, 1989; Favaro-Trindade와

Grosso, 2002). 그러나 스프레이 건조(spray-drying) 방법과 같은 일반적으로 식품공정에 사용되고 있는 건조 피복기술은 단일 크기의 캡슐들의 고온처리와 생성과 관련된 세균의 생존능력에 있어 한계를 나타내고 있는 실정이다(Park 등, 2002).

- <3> 혼성화 시스템으로 개발된 건조 피복 기술은 이러한 제한들을 극복하기 위해 발전되어져 왔다. 혼성화 시스템은 여섯 개의 날개와 고정자 및 분말 재순환 회전력을 가진 초고속 회전원통으로 구성된다. 용기 안에 위치되는 그분말혼합액(호스트와 게스트의 미립자)은 초고속으로 회전하는 날개에 의해 생성된 증기로 팽 채워지며, 공정 동안, 미립자들은 호스트 미립자들의 표면위에 게스트 미립자들의 피복에 의해 정연한 혼합물을 형성하는 원리를 가지고 있다. 스프레이-건조 피복을 포함하는 다른 미세피복 기술들과 비교할 때 본 발명에서의 혼성화 시스템은 높은 미세피복능을 나타내며, 30℃ 이하의 온도를 유지시키는 쿨링 시스템을 사용하여 열로 야기된 세균의 손상을 최소화시킬 수 있다고 보고되고 있다(Takafumi et al., 1993).
- <4> 유산균의 미세피복 물질에 있어 전분, 알지네이트, 카라기난, 그리고 키토산 등의 다당류가 폭넓게 연구되고 있다(Koo 등, 2001). 그러나 단지 일부 연구들만이 코팅 물질의 소스로서 기능성 올리고사카라이드의 응용에 관해 연구해오고 있다. 최근에, 프리바이오틱 올리고사카라이드가 상부 소화기관에서 프로바이오틱스의 생존성을 증진시킨다는 이론이 발전해오고 있다(Corcoran 등, 2005).
- <5> 프리바이오틱 기질은 글루코오스, 갈락토오스 및 프락토오스와 같은 단당류가 2~8개 정도 결합한 당질이다. 그러나 최근에 기능성식품이 갖고 있는 프리바이오틱스란 대부분의 당질이 신체 내 소화효소에 의하여 구성단당으로 분해되어 흡수되는데 반하여 소화효소에 의해 분해되지 않고 대장에 도달되어 장내 유용세균인 비피더스균에게 선택적으로 이용되는 당질을 말한다. 난소화성 주요당질을 소화성당질과 난소화성당질로 나눌 수 있는데 프리바이오틱 기질들은 난소화성이므로 위에서 분해되지 않고 대장에 존재하는 비피더스균과 같은 유익균에 의해 아세테이트(acetate), 프로피오네이트(propionate)와 같은 휘발성 지방산(volatile fatty acid)로 전환되므로 칼로리가 거의 없다.
- <6> 모든 프리바이오틱 기질들은 아마 화학적 구성성분, 결합타입, 그리고 순도에 따라 다른 기능성을 가지는 것으로 보고되고 있다. 이러한 올리고사카라이드들은 비피도 박테리아와 락토바실러스와 같은 유익한 토착 장내 미생물상에 의해 선택적으로 사용되고, 독소생산 클로스트리디아, 박테로이드스 및 병원성 대장균과 같은 잠재적인 병원균들의 생장을 저해할 수 있다(de Vaux 등, 2002). 또한, 이러한 올리고사카라이드의 이용은 유산균과 같은 유익균들의 장내 유점에 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다. 따라서 프리바이오틱 유산균과 함께 프리바이오틱스를 사용하는 것은 당 이용원으로서 프리바이오틱 올리고사카라이드를 사용하는 프리바이오틱의 효능 이외에 프로바이오틱 균주의 활성을 향상시키는 시너지효능을 나타낼 수 있다.
- <7> 락토바실러스 애시도필러스 RP32(*Lactobacillus acidophilus* RP32, ATCC 43121)는 뛰어난 내산성능과 호스트에서 콜레스테롤 저하효과를 보였다(Gilliland 등, 1985). 본 발명자들은 락토바실러스 애시도필러스 RP32의 생존능력에 대한 7가지의 프리바이오틱 기질들의 효과 방법을 확립하였으며, 혼성화 시스템을 이용하여 효과적인 프로바이오틱 제제 생산을 위한 새로운 이중 건식-피복방법을 개발하였다.
- <8> 이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구노력한 결과, 프리바이오틱 기질을 이용하여 유산균을 이중 미세피복 하는 경우, 유산균의 생존율에는 영향을 주지 않으면서 실제 식품에 사용되는 유산균주의 내산성능 및 내열성능을 크게 향상시킬 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <9> 따라서, 본 발명의 주된 목적은 유산균의 내산성 및 내열성 향상을 위하여 기존에 사용되어지는 피복물질 이외에 생리활성능력이 우수한 프리바이오틱 기질을 피복물질로 이용하는 새로운 개념의 이중 피복방법을 제공하는 데 있다.
- <10> 본 발명의 다른 목적은 상기 프리바이오틱 기질을 이용하여 이중 미세피복한 유산균을 제공하는데 있다.

과제 해결수단

- <11> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 내산성 및 내열성을 향상시키기 위한 유산균의 이중 미세피복 방법을 제공한다:

- <12> a) 유산균을 배양한 후 냉동 건조된 균체를 만드는 단계;
- <13> b) 상기 냉동 건조된 균체를 프리바이오틱 기질로 혼성화 시스템(hybridisation system)을 이용하여 1차 피복과정을 수행하는 단계; 및
- <14> c) 상기 1차 피복된 균체를 장용 코팅물질(enteric coating materials)에서 2차 피복과정을 수행하는 단계.
- <15> 본 발명에서, 미세피복 또는 미세캡슐화(microencapsulation)란 일반적으로 영양성분, 유익균 등의 특정 조건에 불안정한 물질을 위산, 열, 염도, 수분 등으로부터 보호하거나 용해성, 분산성을 높이기 위하여 지방, 젤라틴, 당질 등의 보호물질을 사용하여 미세 포장하는 기술을 말하는 것으로, 본 발명에서는 ‘코어’로서 유산균을, 코팅제로서 당질을 이용하여 위산에 의해 사멸되는 유산균을 최소화한 방법을 말한다. 상기 당질로 코팅된 유산균이 포함된 유제품은 위산 및 소화효소에 의해 분해되지 않고 대장에 도달되어 대장 내에서 유산균의 활성화를 향상시킬 수 있다.
- <16> 본 발명의 방법에서, 상기 유산균은 일반적으로 장내 유익균으로서 유제품 생산에 주로 이용되는 유산균인 비피더스, 루테리, 카제이, 애시도필러스 유산균 등을 사용할 수도 있으며, 바람직하게는 애시도필러스 유산균(*Lactobacillus acidophilus*)이 적당하다.
- <17> 본 발명의 방법에서, a) 단계에서 배양된 유산균을 원심분리한 펠렛(pellets)을 락토오스를 포함하는 탈지유(skim milk)에 현탁한 후 건조하는 것을 특징으로 한다.
- <18> 본 발명의 방법에서, b) 단계에서 상기 혼성화 시스템은 냉동 건조된 균체와 프리바이오틱스 코팅물질(프리바이오틱 기질)의 중량비가 7:1 내지 11:1(w/w), 회전원통(rotor)의 속도가 12,000 내지 18,000 rpm, 수행 온도가 20-30℃, 그리고 수행 시간은 2-4분인 것이 바람직하다. 더욱 바람직한 혼성화 시스템의 조건은 본 발명의 실시예에서와 같이, 냉동 건조된 균체와 프리바이오틱스 코팅물질의 중량비는 9:1, 회전원통의 속도는 15,000 rpm, 수행 온도는 25-30℃, 그리고 수행 시간은 3분이다. 특히 혼성화 시스템의 수행시간이 6분 이상 진행될 경우는 생균의 활성을 저하시키는 것으로 확인하였다.
- <19> 본 발명에 있어서, 상기 프리바이오틱스 코팅물질은 프럭토올리고사카라이드(fructooligosaccharide, FOS), 락툴로오스(lactulose) 또는 라피노오스(raffinose)인 것을 특징으로 한다.
- <20> 본 발명의 프리바이오틱스(prebiotics) 또는 프리바이오틱 기질이란 식품 및 건강 관련 사업에 널리 사용되고 있는 장 건강 개선 기능성 물질로서, 식이섬유, 올리고당, 흡수 되지 않는 당류 등이 장내 미생물의 성장에 영향을 주는데 특히, 인체에 유익한 장내 미생물의 성장을 도와주는 성분을 프리바이오틱 물질이라고 한다. 본 발명에서는 장내 유익균인 유산균의 내산성 및 내열성 향상을 위하여 프리바이오틱 물질을 사용하여 이중피복하는 방법을 개발하였다. 본 발명의 프리바이오틱 물질로는 이눌린, 자일리톨, 솔비톨, 만니톨, FOS, 락툴로오스 또는 라피노오스를 사용하여 유산균을 1차 피복을 수행할 수 있는데, 피복 후 균 성장을 고려하면 FOS, 락툴로오스 또는 라피노오스를 사용하는 것이 바람직하다.
- <21> 본 발명의 방법에서, 상기 장용 코팅 물질(enteric coating materials)은 유산균의 특성을 극대화할 수 있는 어떤 피복물질도 가능할 수 있으나, 바람직하게는 상업적으로 입수가 용이한 건식 코팅제제, 즉 산가용성 피복물질인 유드라짓(Eudragit, methacrylate copolymer), 수레테릭(Sureteric, poly-vinylacetate phthalate) 및 컴프리트(Compritol, glyceryl behenate)로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것을 사용하는데, 보다 바람직하게는 산 가용성 피복 제제로 폴리메타크릴레이트계 폴리머를 사용한다. 가장 바람직하게는 pH 중성에서 용해되는 슈레테릭이 적당하다.
- <22> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 방법으로 제조된 내산성 및 내열성이 향상된 이중 미세피복 유산균을 제공한다.
- <23> 본 발명은 유산균의 프리바이오틱 기질 이용능력의 표준 평가방법을 제공하며, 고기능성의 혼성화 시스템을 이용한 이중 마이크로캡슐 제조방법과 이중 건식 피복된 락토바실러스 균종의 각종 스트레스에 대한 내성을 파악할 수 있는 방법과 활성에 관한 기초 자료를 제공한다.
- <24> 본 발명은 여러 형태의 건식 피복된 락토바실러스 애시도필러스 RP32의 각종 스트레스에 대한 내성을 평가하는 방법에 있어, 산성, 높은 염분, 고온, 그리고 다양한 온도에서의 생존성 등이 평가되었다. 선택된 프리바이오틱과 장용 코팅물질(수레테릭)의 이중 건식 피복된 락토바실러스 애시도필러스 RP32는 내산 및 내열성이 피복되지 않은 락토바실러스 애시도필러스 RP32보다 월등히 뛰어난 것으로 나타났다. 또한, 본 발명은 락토바실러스 애시도필러스 RP32의 성장을 위한 프리바이오틱스 이용능력을 평가할 수 있는 구체적인 방법 및 락토바실러스 애시

도필러스 RP32의 생장에 효과적인 프리바이오틱 기질들에 대한 정보를 제공한다. 본 발명의 프리바이오틱스 이용능력 평가방법에 있어서, 7가지의 프리바이오틱 기질이 사용되었으며, 그것들은 소비톨, 만니톨, 락툴로오스, 카일리톨, 이눌린, 프럭토올리고사카라이드, 그리고 라피노오스였다. 세균의 원심분리 및 세척 단계와 배양 및 균수측정의 단계를 거쳐 실시할 수 있다. 락토바실러스 애시도필러스 RP32의 생장에 효과적인 프리바이오틱 기질들인 플럭토올리고사카라이드, 락툴로오스, 그리고 라피노오스의 생육촉진 자료를 제공한다.

<25> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

효 과

<26> 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 락토바실러스 애시도필러스 RP32의 성장증진에 사용되는 프리바이오틱 기질로서 플럭토올리사카라이드, 락툴로오스 그리고 라피노오스로 선발하였고, 본 발명자들에 의해 확립한 혼성화 시스템을 사용하여 락토바실러스 애시도필러스 RP32에 각종 프리바이오틱 기질들을 이용한 이중 건식-피복 방법을 제시함으로써, 내산성능 및 내열성능을 크게 향상시킬 수 있음을 관찰하였다. 따라서 이를 이용하여 경구 투여 시 유산균의 생존율을 효과적인 증진시킬 수 있는 프리바이오틱 및 프로바이오틱 제제의 개발에 응용이 가능할 것으로 기대된다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<27> 실시예 1. 유산균주와 배지

<28> 락토바실러스 애시도필러스 RP32(*Lactobacillus acidophilus* RP32, ATCC 43121)는 고려대학교 식품미생물학 실험실에서 보관중인 균주보존액으로부터 획득되었고, 37℃에서 MRS 액체배지(MRS broth; Difco, Sparks, MD, USA)에 세 번 전 배양하였다. 균주보존액은 -80℃에서 보존시켰으며 동결방지제로 20% 글리세롤을 사용하였다. 건조-미세피복 공정에서 락토바실러스 애시도필러스 RP32를 10% 탈지유(skim milk), 0.3%의 글루코오스(glucose), 0.3% 박토펩톤(Bacto™ peptone), 박토프로테오스 펩톤 넘버3(Bacto™ proteose peptone No.3; Difco, Franklin Lakes, NJ, USA), 0.3% 효모 추출물(yeast extract)을 포함하는 pH 6.5의 우유배지(milk medium)에서 24시간 동안 배양하였으며, 배양기간 중 pH를 6.0으로 유지하기 위해 pH 자동 조절기(Jenco model 3671; Whatman Lab Sales, Hillsboro, OR, USA)를 사용하였다. 배양이 완료된 균주시료는 4℃에서 30분 동안 원심분리한 후, 펠렛은 10% 락토오스를 포함하는 10% 탈지유에 현탁한 후 냉동건조 하였으며, 사용하기 전까지 -80℃에 보존하였다.

<29> 실시예 2. 락토바실러스 애시도필러스 RP32의 생장에 대한 프리바이오틱 기질들의 효과

<30> 프리바이오틱 기질(prebiotic substrates)은 솔비톨(sorbitol), 만니톨(mannitol), 락툴로오스(lactulose), 자일리톨(xylitol) (all obtained from the Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), 이눌린(inulin)(RAFILOSE™ serif HP; Orafiti, Tienen, Belgium), 프럭토 올리고사카라이드(fructooligosaccharide, FOS; RAFTILOSE™ serif P95; Orafiti), 그리고 라피노오스(raffinose; Difco)를 선발하였다. 락토바실러스 애시도필러스 RP32의 하룻밤 배양액은 30분 동안 3000×g에서 원심분리 하였으며, 그 후 세포균체는 0.85% NaCl에 2번 세척을 실시하였다. 이 후 글루코오스와 쇠고기 추출물이 포함되지 않은 기본적인 MRS 배지에 다양한 농도(0%, 0.50%, 0.75%, 1.00%, 그리고 1.50%)를 포함하는 각각의 프리바이오틱 기질을 접종하였다. 글루코오스가 포함되어 있는 양성대조군과 프리바이오틱 기질들이 포함되어 있지 않은 음성 대조군을 제조하였다. 배양액은 혐기적 조건하(BBL Gas-Pak system ; Difco, Sparks, MD, USA)에서 24시간 동안 배양하였다. 생균수는 MRS 고체배지를 이용하여 표준 플레이트 방법으로 측정하였으며, 배양액의 pH 변화는 pH 측정기(Beckman Instruments Inc., Fullerton CA, USA)를 이용하여 측정하였다.

<31> 하기의 표 1은 본 발명에서 수행한 다양한 프리바이오틱 기질을 대상으로 락토바실러스 애시도필러스 RP32의 성장능력을 나타낸 것으로, 이들은 7종의 프리바이오틱 기질 중 프럭토올리고사카라이드, 락툴로오스, 그리고 라피노오스 3종의 기질을 효과적으로 이용할 수 있으며 균주의 배양을 최소 24시간을 처리해야 균주가 이용할 수 있을 것으로 보여졌다. 또한, 프리바이오틱 기질의 첨가 비율이 0%에서 1.5%로 증가함에 따라서 유의적으로 성장률이 증가되고 균주의 성장에 따라 pH가 저하되는 것으로 판단되었다.

<32> [표 1]. 다양한 프리바이오틱 제제에 대한 락토바실러스 애시도필러스 RP32의 성장능력 검토

첨가농도 ¹ (%)	프리바이오틱 제제에 따른 균성장 ² (No. of viable cells $\pm$ SD) ³						
	이눌린	자일리톨	솔비톨	만니톨	FOS	락툴로오스	라피노오스
0	2.249 $\pm 0.030^a$	2.249 $\pm 0.030^a$	2.249 $\pm 0.030^a$	2.249 $\pm 0.030^a$	2.249 $\pm 0.030^a$	2.249 $\pm 0.030^a$	2.249 $\pm 0.031^a$
0.25	2.202 $\pm 0.108^{cd}$	1.189 $\pm 0.012^e$	2.119 $\pm 0.141^d$	2.300 $\pm 0.066^{bc}$	2.368 $\pm 0.039^{ab}$	2.451 $\pm 0.036^{ab}$	2.498 $\pm 0.099^a$
0.50	2.379 $\pm 0.034^a$	1.309 $\pm 0.558^b$	2.478 $\pm 0.044^a$	2.106 $\pm 0.046^a$	2.515 $\pm 0.060^a$	2.216 $\pm 0.053^a$	2.313 $\pm 0.043^a$
0.75	2.297 $\pm 0.108^d$	1.318 $\pm 0.039^e$	2.253 $\pm 0.081^d$	2.281 $\pm 0.016^d$	3.118 $\pm 0.115^a$	2.816 $\pm 0.168^b$	2.466 $\pm 0.019^c$
1.00	2.190 $\pm 0.000^d$	2.568 $\pm 0.006^c$	2.306 $\pm 0.015^d$	2.269 $\pm 0.084^d$	3.058 $\pm 0.092^b$	3.228 $\pm 0.163^a$	2.318 $\pm 0.051^d$
1.50	2.299 $\pm 0.047^d$	1.640 $\pm 0.117^e$	2.388 $\pm 0.011^d$	2.316 $\pm 0.031^d$	3.702 $\pm 0.090^a$	3.254 $\pm 0.076^b$	3.098 $\pm 0.024^c$

<33>

<34>

¹프리바이오틱 제제(기질)의 농도.

<35>

²세포성장 = $\log(\text{배양된 생균수}) - \log(\text{초기 생균수})$

<36>

³데이터는 3번 실험하여 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다.

<37>

^{a, b, c, d, e} 동일한 열(row)에 있는 위치자는 유의차를 나타낸다 ($p < 0.05$).

<38>

실시예 3. 혼성화 시스템을 사용한 이중 건식 피복 공정

<39>

본 발명에서 이중 건식-피복 공정은 기존의 박 등(2002)이 확립한 방법을 일부 변형하여 하이브리디제이션 장치(Nara Hybridization System, Model NHS-0 & NSH-1; Nara Machinery Co. Ltd, Tokyo, Japan; Takafumi 등, 1993)를 이용하여 수행되었다. 폴리 프탈레이트에 기초한 슈레테릭 장용 코팅 시스템(SuretericTM sans; Colorcon, Darford Kent, UK)을 본 발명에서 코팅 물질로서 사용하였다. 선택된 프리바이오틱스(프락토올리고사카라이드, 락툴로오스, 그리고 라피노오스)가 첫 번째 코팅 공정에서 cm^2 당 6kg의 공기압력 하에서 락토바실러스 애시도필러스 RP32('코어' 입자)의 분체가공에 바람직한 초기입도를 100-200 μm 가 되도록 실시하였다. 균체와 프리바이오틱스 코팅 물질의 비율은 9:1, 4:1 그리고 2:1(w/w)로 실시하였으며, 회전원통의 속도는 15,000 rpm(3분간)으로 고정하여 실시하였다. 공정 동안의 온도는 30℃ 아래로 유지되었다.

<40>

하기 표 2는 운전시간을 3분으로 고정시켜놓고 hybridizer의 rotor 회전 속도를 최고 수준인 15,000 rpm까지 증가시킨 후 생균수를 조사한 것이다. 그 결과 비처리 대조구의 생균수가 2.45×10^{10} CFU/g에 비하여 5,000, 7,000, 10,000, 15,000 rpm에서 모두 10^{10} CFU/g이상의 생균수를 나타나는 것으로 보아 동등한 수준으로 유지되었다. 이 같은 결과는 혼성화 시스템(hybridisation system)에 의한 미세캡슐화가 생균제의 활성에 유의적인 영향을 미치지 않음을 의미하는 것으로 관찰되었다.

<41>

[표 2]. 코팅 공정 조건에 따른 락토바실러스 애시도필러스 RP32의 생존율 변화

로터 스피드 (알피엠) ¹	생존율(CFU/g)
Control	2.45×10^{10}
5,000	1.71×10^{10}
7,000	1.46×10^{10}
10,000	1.08×10^{10}
15,000	1.44×10^{10}

<42>

<43> ¹혼성화 시스템에서 시간은 3 분으로 고정.

<44> 또한, 하기 표 3은 균주를 피복재와 혼합 후의 이러한 피복 공정에서 로터의 회전 속도를 15,000 rpm으로 고정시켜 놓고 운전시간에 따른 균주의 활성을 비교한 것이다. 유산균의 활성은 15,000 rpm, 3분의 처리 조건에서는 피복재와의 미세캡슐화 후에도 모두 비처리 대조구와 유사한 수준인 약 10^{10} CFU/g이상으로 나타나 유의적인 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 그러나 15,000 rpm에서 6분간 과도하게 미세캡슐화를 실시한 경우 유산균체의 활력은 평균 3.45×10^9 CFU/g로 비처리 대조구에 비하여 약 1/10 정도 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 과도한 처리시간의 연장은 생균체의 활성을 저하시킬 수 있을 것으로 생각된다.

<45> [표 3]. 수레테릭으로 단일 피복시 락토바실러스 애시도필러스 RP32의 생존율 변화

처리구	생존율(CFU/g)	
	3분 피복 ¹	6분 피복
I	3.85×10^{10}	2.25×10^9
II	3.60×10^{10}	2.70×10^9
III	6.30×10^{10}	2.75×10^9
IV	4.30×10^{10}	3.85×10^9
V	4.80×10^{10}	5.70×10^9
평균	4.57×10^{10}	3.45×10^9
대조구	3.25×10^{10}	

<46>

<47> ¹혼성화 시스템에서 로터 속도는 15,000 rpm으로 고정.

<48> 수레테릭 장용 코팅으로 구성된 두 번째 피복은 9:1 (w/w)(균체와 프리바이오틱스 코팅물질의 비율)로 동일한 조건하에서 적용되었다. 피복 처리후 시료는 에틸알코올로 분산시킨 후에 입자 분석기(CILAS 106; CILAS, France)로 입자크기를 분석하였다. 단일 건식-피복은 수레테릭 또는 프리바이오틱만을 사용한 시료로 실시하였다. 코팅 공정 후에, 건식-피복된 세포의 생균수 및 안정성은 표준 집종기술을 사용하여 72시간 동안 37℃에서 혐기적 조건으로 배양한 후, 생균수를 측정함으로써 평가하였다. 대조구로 사용된 비코팅 락토바실러스 애시도필러스 RP32는 코팅물질 없이 동일한 코팅공정에 의해 준비하였다.

<49> 따라서, 최종적으로 본 발명에서 이용한 혼성화 시스템을 이용한 유산균주 락토바실러스 애시도필러스 RP32의 미세캡슐화 조건 중 15,000 rpm, 3분 이하의 처리 조건에서는 비처리 대조구와 비교하였을 때 유산균의 활성에 거의 변화가 없는 것으로 판단되며 최종적으로 이중 건식 피복의 최적 조건으로 설정하였다.

<50> [표 4]. 다양한 프리바이오틱 기질을 이용한 이중 피복시 락토바실러스 애시도필러스 RP32의 생존율 변화

처리구		생존율 (CFU/g ¹)
프리바이오틱 기질	혼합농도 (균주:프리바이오틱 기질, w/w)	
프락토올리고 사카라이드	2:1	5.52 × 10 ⁹
	4:1	7.21 × 10 ⁹
	9:1	3.60 × 10 ¹⁰
락툴로스	2:1	3.60 × 10 ⁹
	4:1	9.17 × 10 ⁹
	9:1	3.20 × 10 ¹⁰
라피토스	2:1	6.32 × 10 ⁹
	4:1	6.83 × 10 ⁹
	9:1	3.80 × 10 ¹⁰
수레테릭 단일 피복		6.30 × 10 ¹⁰
대조구		1.47 × 10 ¹¹

<51>

<52> **실시예 4. 전자현미경 관찰**

<53> 마이크로 캡슐의 형태는 주사 전자현미경을 이용하여 관찰하였다. 주사 전자현미경을 이용한 관찰을 위해서, 프리바이오틱 기질들과 코팅되지 않은 세균들 그리고 건식-피복된 시료들은 이중-측면 점착성의 금속 테이프를 사용하여 스테르에 접착되었다. 그리고 나서, 이온-스푸터 코터를 사용하여 60초 동안 금-팔라듐 층으로 분사하였다. 피복처리에 의한 락토바실러스 애시도필러스 RP32의 세포표면은 주사 전자현미경(S-2380N;Hitachi, Tokyo, Japan)으로 15kV 전압을 이용해 관찰하였다.

<54> 도 1은 단일 및 이중 건식 피복된 락토바실러스 애시도필러스 RP32의 스캐닝 전자 현미경사진(SEM)을 나타낸 것이다 (a: 코팅되지 않은 대조구 락토바실러스 애시도필러스 RP32의 스캐닝 전자 현미경사진, b: 피복물질인 수레터릭으로 단일 캡슐화된 락토바실러스 애시도필러스 RP32, c: 프리바이오틱 기질인 프럭토올리고사카라이드, d: 프리바이오틱 기질인 락툴로오스, e: 프럭토올리고사카라이드로 단일 건식-피복된 락토바실러스 애시도필러스 RP32, f: 락툴로오스로 단일 건식-피복된 락토바실러스 애시도필러스 RP32, g : 프럭토올리고사카라이드와 수레터릭으로 이중 건식-피복된 락토바실러스 애시도필러스 RP32, h : 락툴로오스와 수레터릭으로 이중 건식-피복된 락토바실러스 애시도필러스 RP32.).

<55> 우선 피복소재로 사용된 수레터릭의 단일 건식-피복에서는 전체 처리구에서 균일한 피복효과가 관찰되었으며 매끄럽고 균일한 표면 특성을 나타내었다. 또한, 프리바이오틱 기질을 이용한 단일 건식-피복의 경우 초기성상은 프럭토올리고사카라이드의 경우 다양한 크기의 구형으로 균체 복합화에 의해 쉽게 부서지지 않았으며, 균체 입자가 프럭토올리고사카라이드 표면을 둘러싸는 모양이 관찰되었다. 락툴로오스는 격자 모양의 입자들이 덩어리를 이루는 모양을 나타내었으며 피복 정도는 프럭토올리고사카라이드를 사용한 처리구와 유사하였는데, 처리 후 생성물은 구형을 이루기보다 불균일한 입자를 이루고 있었으며 표면에 돌출된 격자 형태가 균체 복합화 후에도 관찰되었다. 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여 프리바이오틱 기질으로 일차 피복 후 기능성을 부여하기 위하여 수레터릭을 이용하여 이중 피복을 실시하였을 때 일차 피복된 시료의 이차 피복 후에는 균일하게 구형으로 표면이 변화된 모습을 확인할 수 있었다

<56> 투과전자현미경(TEM) 관찰을 위해 비코팅 및 건식-피복된 시료들은 0.1몰의 글리신-하이드로클로릭 산 완충액(pH 2.0)에 2% 글루타알데하이드와 2% 파라폼알데하이드를 첨가한 용액에 4℃에서 4시간 동안 고정시킨 후 1% 오스뮴 테트고사이드에서 4℃, 2시간동안 다시 고정화 과정을 실시하였다. 세척 후에, 시료들은 에탄올로 탈수하였으며 폴라비드 812 레진(Polyscience, Warrington, PA, USA)로 임베드(embed)시켰다. 울트라틴 60nm 섹션 후, 최종적으로 우라닐 아세트산과 시트르산으로 염색하였다. 그 후 Zeiss EM 912 TEM(LEO Electorn Microscope Ltd, Oberkochen, Germany)으로 세포내부의 형태를 평가하였다.

<57> 도 2는 건식 피복된 락토바실러스 애시도필러스 RP32의 투과전자현미경사진(TEM)을 나타낸 것이다 (a: 코팅되지 않은 락토바실러스 애시도필러스 RP32, b: 수레터릭으로 단일 건식-피복된 락토바실러스 애시도필러스 RP32, c: 프럭토올리고사카라이드와 수레터릭으로 이중 건식-피복된 락토바실러스 애시도필러스 RP32, 척도바: 5 마이크로미터)

<58> 비처리 대조구의 형상을 관찰하였을 때 유산균주의 외부에 어떠한 변화도 없는 것이 나타났으나, 피복재인 수레터릭을 이용하여 락토바실러스 애시도필러스 RP32를 캡슐한 후의 단면을 관찰하였을 때는 균주들의 겉을 둘러싸고 있는 피복재를 육안으로 확인할 수 있었다. 또한 이중 건식 피복 균주의 단면 모습은 대조구와 단일 피복처리구와는 달리 프리바이오틱 기질과 피복재의 이중 피복 효과로 균주들을 둘러싸고 있는 부분이 더 두터워졌음을 알 수 있었다.

<59> **실시예 5. 산, 열 그리고 열에 대한 내성의 측정**

<60> 인공위액이 이전에 묘사된 방법(Kobayashi 등, 1974)의 약간의 변형된 방법에 따라 1000 units/mL의 펩신이 첨가된 0.25M 포타슘 클로라이드-염산 완충액(pH 1.5)으로부터 전처리하였다. 코팅되거나 되지 않은 락토바실러스 애시도필러스 RP32(10^9 CFU /g)가 인공위액에 접종되었고, 그 후 37℃에서 0, 150, 300분 동안 배양하였다. 이 배양액의 순차적인 희석액(0.1% 멸균된 펩톤수)이 MRS 고체배지에 접종되었고, 생균수는 37℃에서 혐기적 조건으로 48시간 후에 측정하였다. 내염성 평가가 이전에 확립된 방법(Gardiner 등, 2000)을 일부 변형하여 실시하였다. 다양한 피복처리에 의한 락토바실러스 애시도필러스 RP32(10^9 CFU g/L)는 15% NaCl이 첨가된 글리신-하이드로클로릭산 완충액(pH 1.5)에 접종하였고, 37℃에서 0, 60, 180분 동안 배양되었다. 생균수는 이전에 기술한 방법으로 측정하였다. 또한, 내열성 실험을 위하여 락토바실러스 애시도필러스 RP32(10^9 CFU g/L)가 글리신-하

이드로클로릭산 완충액(pH 3.0)에서 접종되어졌고, 55℃에서 0, 40, 120, 180, 그리고 240분 동안 상온수조에서 진동상태로 배양하였다. 코팅물질은 0.1M 인산완충액(pH 7.0)에서 제거되었으며 생균수는 이전에 기술한 방법으로 측정하였다.

<61> 도 3은 다양한 기간 동안 산성조건에 노출시킨 후에 건식-피복된 락토바실러스 애시도필러스 RP32의 생존성을 나타낸 것이다 (검은 막대 : 0시간, 회색막대 2.5시간, 검은 회색바 : 5시간). 대조구와 단일 피복 처리구, 그리고 3종의 프리바이오틱 기질을 이용한 이중 피복 처리구와 비교하였을 때 2.5시간까지 유의적 차이는 관찰되지 않았으나, 5시간 배양 후에는 대조구와 단일 피복 처리구에 비하여 이중 피복 처리구가 유의적으로 높은 저항성이 관찰되었다.

<62> 도 4는 다양한 기간에서 염분조건에 노출시킨 후 건식 피복된 락토바실러스 애시도필러스 RP32의 생존성을 나타낸 것이다 (검은 막대 : 0시간, 회색막대 : 1시간, 검은회색 막대 : 3시간). 15% 소금 농도에서도 피복 전, 후 유산균의 유의적인 활성 저하는 나타나지 않았으며 따라서 실험에 사용된 이중 피복 조건에서는 유산균 세포막의 손상과 같은 물리적 손상을 일으키지 않는 것으로 사료된다.

<63> 반면, 도 5는 55℃의 조건에 노출시킨 후, 건식-피복된 락토바실러스 애시도필러스 RP32의 내열성을 나타낸 것이다 (-●-: 코팅되지 않는 세포, -○-: 단일 건식-피복된 세포, -▼-: 프럭토올리고사카라이드로 이중 건식-피복된 세포, -□- : 락툴로오스로 이중 건식-피복된 세포, -■-: 라피노오스로 이중 건식-피복된 세포). 홍미롭게도 열처리 후 초기 균수 대비 생균수 감소율은 120분 이후부터 대조구와 단일 피복 처리구, 그리고 이중 피복 처리구간의 유의적인 차이가 나타났으며 이중 건식-피복을 실시한 균주의 열안정성이 우수하였다. 또한 240분까지 장기간 열처리시 대조구와 처리구간의 균수는 더 큰 차이가 관찰되었다.

<64> 실시예 6. 각종 저장온도에 따른 생존능력 평가

<65> 코팅되었거나 코팅되지 않은 락토바실러스 애시도필러스 RP32의 각종 저장온도에 따른 생존성의 평가를 위해, 샘플들을 멸균된 각각의 폴리에틸렌 튜브에 위치시킨 후, 4, 25, 그리고 37℃에서 20일 동안 저장하였다. 계획된 저장간격(0, 3, 7, 12, 16, 그리고 20일)에 각각의 샘플을 채취하였으며, 세포의 생존율은 MRS 고체 배지위에 표준 접종 기술을 사용해서 측정하였다.

<66> 도 6은 다양한 저장온도 조건에서 이중 건식-피복된 락토바실러스 애시도필러스 RP32의 생존율 및 다양한 프리바이오틱 기질들의 효과를 나타낸 것이다. (a: 수레테릭으로 단일 건식-피복된 락토바실러스 애시도필러스 RP32의 생장곡선, b: 수레테릭과 프럭토올리고사카라이드로 이중 건식-피복된 락토바실러스 애시도필러스 RP32, c: 락툴로오스, d: 라피노오스로 이중 건식-피복된 락토바실러스 애시도필러스 RP32). 홍미롭게도 4와 25℃에서 저장 시 각 처리구간의 어떠한 차이도 관찰되지 않았으나 37℃ 저장 시 락툴로오스와 라피노오스로 이중 피복한 처리구의 경우 수레테릭 단일 피복과 비교하여 1-2 로그(log) 이상의 생존율 차이를 관찰할 수 있었다.

<67>

[참고문헌]

- Alvarez-Olmos, M.I. & Oberhelman, R.A. (2001). Probiotic agents and infectious diseases: a modern perspective on a traditional therapy. *Clinical Infectious Diseases*, **32**, 1567–1576.
- Bakan, J.A. (1973). Microencapsulation of foods and related products. *Food Technology*, **27**, 34–39.
- Brennan, M., Wanismail, B., Johnson, M.C. & Ray, B. (1986). Cellular damage in dried *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Food Protection*, **49**, 47–53.
- Corcoran, B.M., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F. & Stanton, C. (2005). Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. *Journal of Applied Microbiology*, **96**, 1024–1039.
- de Vaux, A., Morrison, M. & Hutkins, R.W. (2002). Displacement of *Escherichia coli* O157:H7 from rumen medium containing prebiotic sugars. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 519–524.
- Espina, F. & Packard, V.S. (1979). Survival of *Lactobacillus acidophilus* in a spray-drying process. *Journal of Food Protection*, **42**, 149–152.
- Favaro-Trindade, C.S. & Grosso, C.R.F. (2002). Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. *Journal of Microencapsulation*, **19**, 485–494.
- Gardiner, G.E., O'Sullivan, E., Kelly, J. et al. (2000). Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 2605–2612.
- Gibson, G.R., Saavedra, J.M., MacFarlane, S. & MacFarlane, G.T. (1997). Probiotics and intestinal infections. In: *Probiotics 2* (edited by R. Fuller). Pp. 10–39. London: Chapman & Hall.
- Gilliland, S.E., Nelson, C.R. & Maxwell, C. (1985). Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **49**, 377–381.

<68>

- Hidaka, H., Tashiro, Y. & Eida, T. (1991). Proliferation of bifidobacteria by oligosaccharides and their useful effect on human health. *Bifidobacteria Microflora*, **10**, 5-69.
- Hopkins, M.J. & Macfarlane, G.T. (2003). Nondigestible oligosaccharides enhance bacterial colonization resistance against *Clostridium difficile* in vitro. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**, 1920-1927.
- Kobayashi, Y., Tohyama, K. & Terashima, T. (1974). Studies on biological characteristics of *Lactobacillus*. II. Tolerance of the multiple antibiotic resistance-strain, *L. casei* PSR3002, to artificial digestive fluids. *Japanese Journal of Microbiology*, **29**, 691-697.
- Koo, S.M., Cho, Y.H., Huh, C.S., Baek, Y.J. & Park, J.Y. (2001). Improvement of the stability of *Lactobacillus casei* YIT 9018 by microencapsulation using alginate and chitosan. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **11**, 376-383.
- Laura, J.F. & Gibson, G.R. (2001). In vitro investigations of the effect of probiotics and prebiotics on selected human intestinal pathogens. *FEMS Microbiology Ecology*, **1310**, 1-9.
- Lian, W.C., Hsiao, H.C. & Chou, C.C. (2002). Survival of bifidobacteria after spray-drying. *International Journal of Food Microbiology*, **74**, 79-86.
- Makras, L., Van Acker, G. & De Vuyst, L. (2005). *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* 8700:2 degrades inulin-type fructans exhibiting different degrees of polymerization. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 6531-6537.
- Manning, T.S. & Gibson, G.R. (2004). Prebiotics. Best practice and research. *Clinical Gastroenterology*, **18**, 287-298.
- Park, D.J., An, E.Y., Kim, J.S. et al. (2002). Dry entric coating process of lactic acid bacteria by hybridization system. *Korean Journal of Food Science and Technology*, **34**, 856-861.
- Porubcan, R.S. & Sellars, R.L. (1979). *Lactic Starter Culture Concentrates*. New York, NY: Academic Press Inc.

- Putney, S.D. (1998). Encapsulation of proteins for improved delivery. *Current Opinion in Chemical Biology*, **2**, 548–552.
- Rao, A.V., Shiwnarain, N. & Maharaj, I. (1989). Survival of microencapsulated *Bifidobacterium pseudolongum* in simulated gastric and intestinal juices. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, **22**, 345–349.
- Sheu, T.Y. & Marshall, R.T. (1993). Microentrapment of lactobacilli in calcium alginate gels. *Journal of Food Science*, **54**, 557–561.
- Sheu, T.Y., Marshall, R.T. & Heymann, H. (1993). Improving survival of culture bacteria in frozen desserts by microentrapment. *Journal of Dairy Science*, **76**, 1902–1907.
- Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P. & Kailasapathy, K. (2000). Encapsulation of probiotic bacteria with alginate–starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*, **62**, 47–55.
- Takafumi, I., Honda, H. & Koishi, M. (1993). Drug dissolution from indomethacin–starch hybrid powders prepared by the dry impact blending method. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **45**, 770–774.
- Teixeira, P., Castro, H. & Kirby, R. (1995a). Survival of *Lactobacillus delbruekii* ssp. *bulgaricus* following spray drying. *Journal of Dairy Science*, **78**, 1025–1031.
- Teixeira, P., Castro, H. & Kirby, R. (1995b). Spray drying as a method for preparing concentrated cultures of *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Applied Bacteriology*, **78**, 456–462.
- Thiel, W.J., Nguyen, L.T. & Sberna, F.J. (1986). Content uniformity of microdose tablets (dosage 1 microgram–10 mg) produced by fluid bed granulation of interactive mixtures. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **38**, 335–343.

<70>

도면의 간단한 설명

<71>

도 1은 단일 및 이중 건식 피복된 락토바실러스 애시도필러스 RP32의 스캐닝 전자 현미경사진(SEM)을 나타낸 것이다.

<72>

도 2는 건식 피복된 락토바실러스 애시도필러스 RP32의 투과전자현미경사진(TEM)을 나타낸 것이다.

<73>

도 3은 다양한 기간 동안 산성조건에 노출시킨 후에 건식-피복된 락토바실러스 애시도필러스 RP32의 생존성을 나타낸 것이다.

<74>

도 4는 다양한 기간에서 염분조건에 노출시킨 후 건식 피복된 락토바실러스 애시도필러스 RP32의 생존성을 나타낸 것이다.

<75>

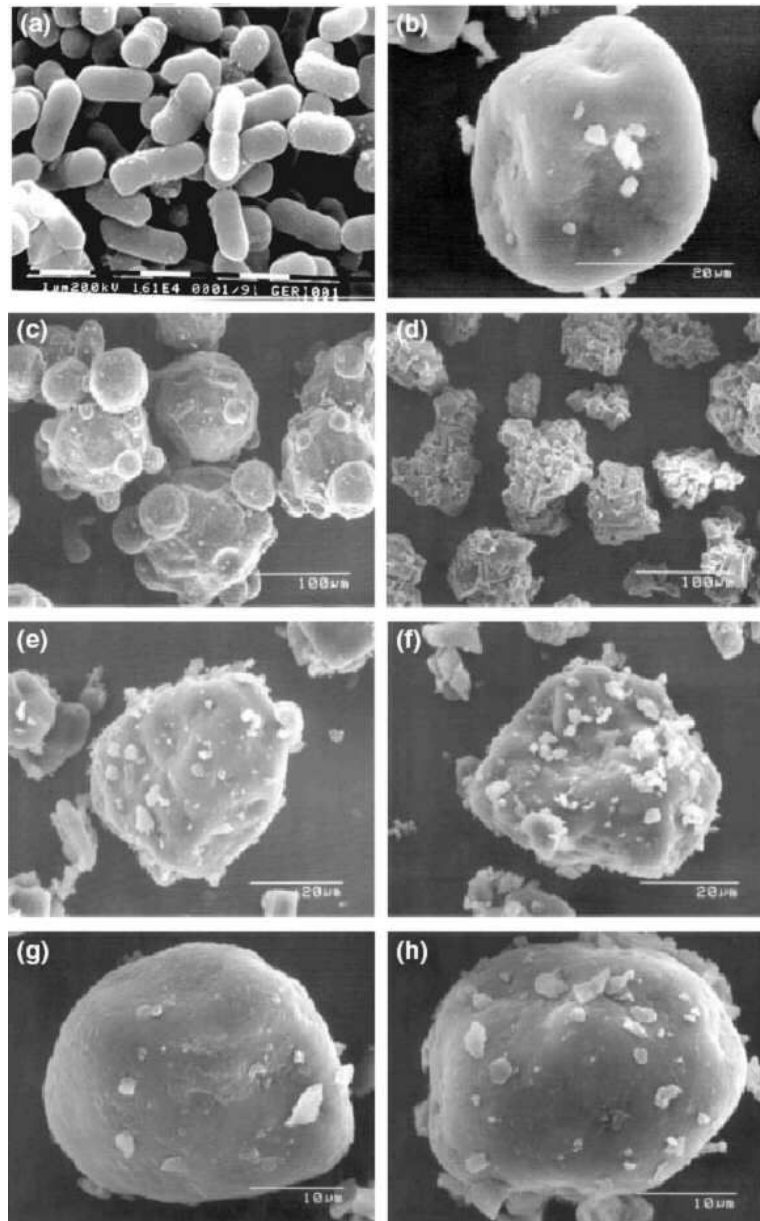
도 5는 55℃의 조건에 노출시킨 후, 건식-피복된 락토바실러스 애시도필러스 RP32의 내열성을 나타낸 것이다.

<76>

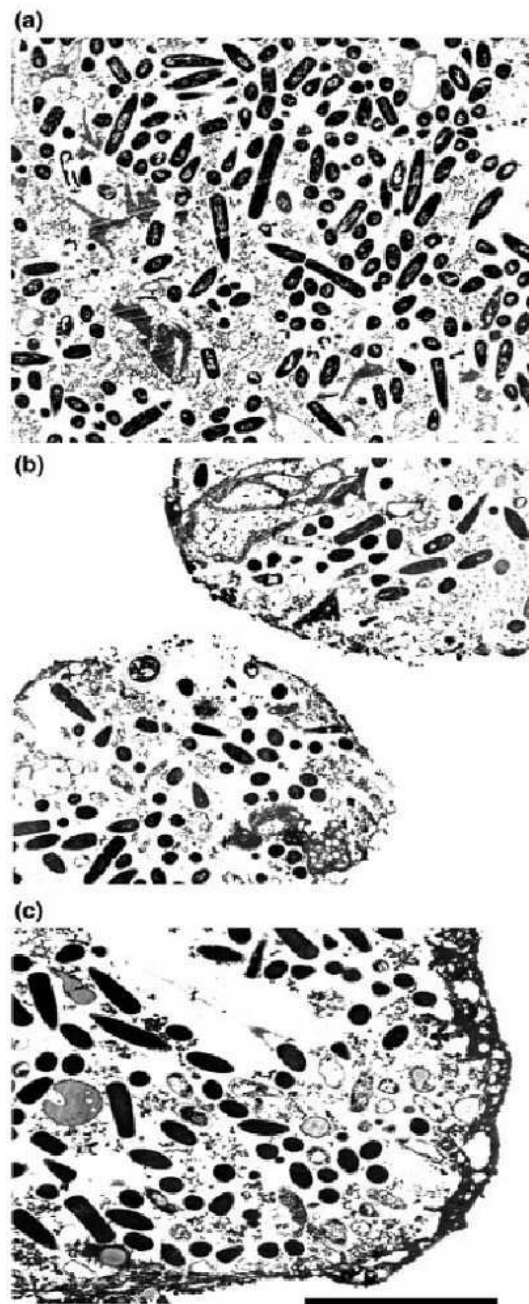
도 6은 다양한 저장온도 조건에서 이중 건식-피복된 락토바실러스 애시도필러스 RP32의 생존율 및 다양한 프리바이오틱 기질들의 효과를 나타낸 것이다.

도면

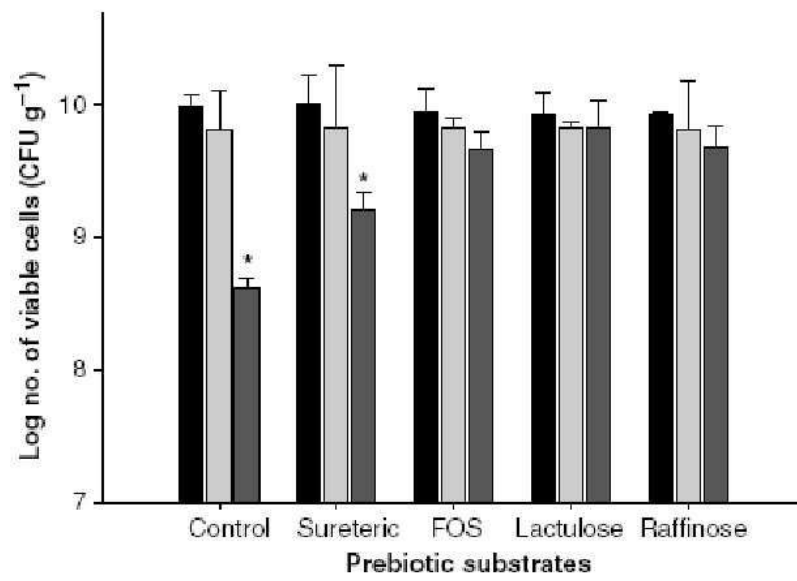
도면1



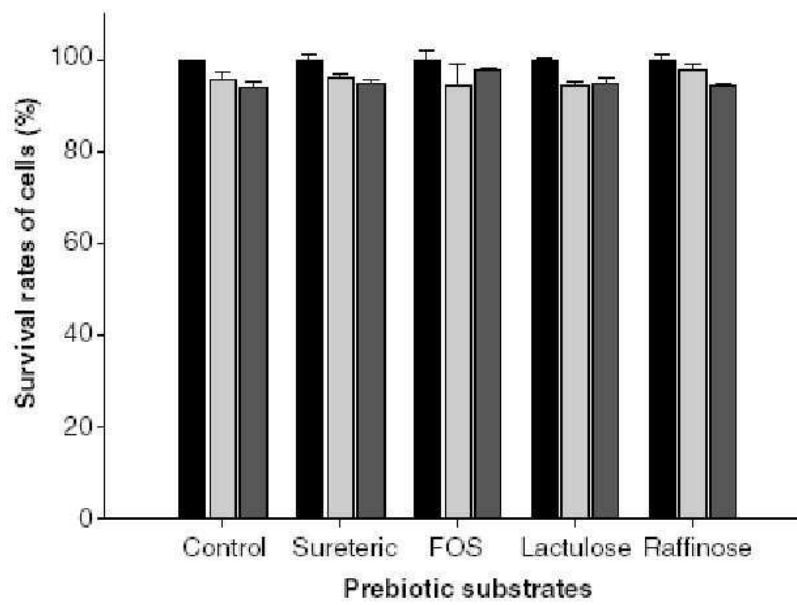
도면2



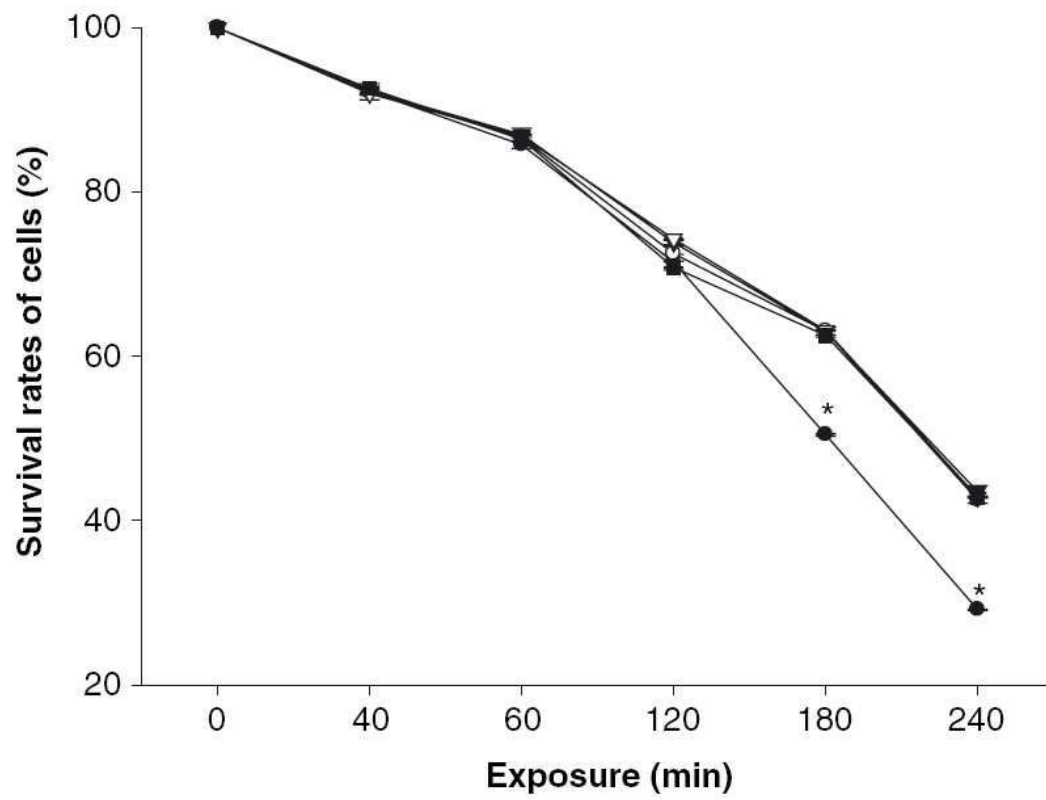
도면3



도면4



도면5



도면6

