(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년08월12일
(11) 등록번호 10-2009731
(24) 등록일자 2019년08월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *A23L 29/00* (2016.01)
A23L 33/135 (2016.01) *C12N 1/00* (2017.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2013.01)
A23L 29/065 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2019-0043610
(22) 출원일자 2019년04월15일
심사청구일자 2019년04월15일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020020069863 A*
KR101698379 B1
KR100437984 B1
KR1020020069862 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
주식회사 셀바이오텍
경기도 김포시 월곶면 애기봉로409번길 50
(72) 발명자
정명준
서울특별시 서초구 신반포로 270, 113동 2001호 (반포동, 반포자이아파트)
(74) 대리인
특허법인 정안

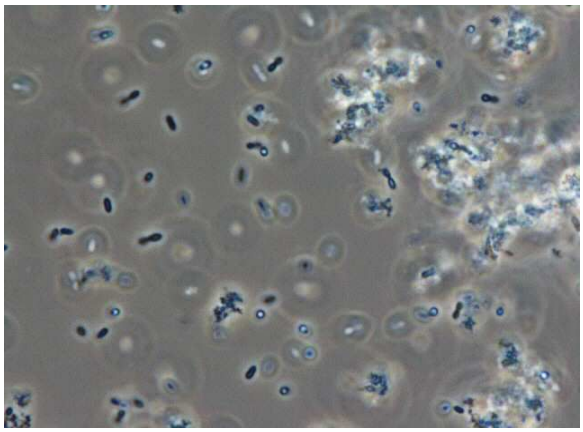
전체 청구항 수 : 총 11 항 심사관 : 김지연

(54) 발명의 명칭 **단백질 가수분해물을 이용한 단백질-다당류 이중코팅 유산균의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 단백질 가수분해물을 이용한 단백질-다당류 이중코팅 유산균의 제조방법 및 이 방법에 의해 제조된 이중코팅을 갖는 유산균에 관한 것이다. 본 발명에 따라 제조된 단백질-다당류 이중코팅을 갖는 유산균은 동결건조생존율, 내산성, 및 내담즙성이 매우 우수하다. 따라서, 본 발명의 단백질-다당류 이중코팅을 갖는 유산균은 발효유, 가공유, 장류, 가공식품, 기능성 음료, 기능성 식품, 일반 식품 등의 제조시에 매우 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A23L 33/135 (2016.08)
C12N 1/005 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

(a) 단백질 수용액에 단백질 가수분해효소를 처리하여 단백질 가수분해 수용액을 제조하는 단계;

(b) 상기 제조된 단백질 가수분해 수용액에 유산균 배양을 위한 당 성분 및 질소원 성분을 첨가하여 살균한 후 유산균을 접종하여 배양하는 단계;

(c) 상기 배양하여 얻은 유산균의 발효 배양액으로부터 유산균의 균체를 회수하는 단계;

(d) 상기 회수한 유산균의 균체에 동결보호제 수용액 및 다당류 수용액을 첨가하여 혼합 및 균질화시키는 단계; 및

(e) 상기 균질화된 유산균 균체 수용액을 동결 건조시키는 단계;

를 포함하는 단백질-다당류 코팅의 이중코팅을 갖는 유산균의 제조방법으로서,

상기 단계 (a)에서 단백질의 가수분해율은

(i) 단백질 가수분해효소를 처리하기 전의 단백질 수용액의 흡광도 측정값(시작점 OD)과 단백질 가수분해효소를 처리한 후의 단백질 수용액의 흡광도 측정값(종결점 OD)의 차이인 ΔOD값을 상기 시작점 OD값으로 나눈 값의 100분율 값;

또는

(ii) 단백질 가수분해효소를 처리하기 전의 단백질 수용액을 원심분리하여 얻는 침전물의 무게 측정값(시작점 ppt)과 단백질 가수분해효소를 처리한 후의 단백질 수용액을 원심분리하여 얻는 침전물의 무게 측정값(종결점 ppt)의 차이인 Δppt값을 상기 시작점 ppt값으로 나눈 값의 100분율 값이고;

상기 단계 (a)에서의 단백질은 탈지분유, 대두분리단백(ISP), 또는 탈지분유 및 대두분리단백(ISP)의 혼합물이고,

상기 탈지분유의 가수분해율은 76% - 92%이고,

상기 대두분리단백의 가수분해율은 62% - 80%이고,

상기 탈지분유 및 대두분리단백 혼합물의 가수분해율은 77% - 83%인 것을 특징으로 하는 이중코팅을 갖는 유산균의 제조 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 탈지분유의 가수분해율은 80% - 90%인 것을 특징으로 하는, 단백질-다당류 코팅의 이중코팅층을 갖는 유산균의 제조방법.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 대두분리단백의 가수분해율은 70% - 80%인 것을 특징으로 하는, 단백질-다당류 코팅의 이중코팅층을 갖는 유산균의 제조방법.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

제 1 항에 있어서, 상기 탈지분유 및 대두분리단백 혼합물의 가수분해율은 78% - 83%인 것을 특징으로 하는, 단백질-다당류 코팅의 이중코팅층을 갖는 유산균의 제조방법.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (b)의 유산균 배양을 위한 당 성분은 혼합유당, 과당, 설탕(Sucrose) 및 포도당으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 단백질-다당류 코팅의 이중코팅층을 갖는 유산균의 제조방법.

청구항 15

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (b)의 유산균 배양을 위한 질소원 성분은 효모추출물 또는 소이펩톤인 것을 특징으로 하는, 단백질-다당류 코팅의 이중코팅층을 갖는 유산균의 제조방법.

청구항 16

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (d)의 동결보호제는 트레할로스, 말토덱스트린, 만니톨, 및 탈지분유로 이루어지는 군에서 선택된 1종 또는 이들의 2종 이상의 혼합물인 것을 특징으로 하는, 단백질-다당류 코팅의 이중코팅층을 갖는 유산균의 제조방법.

청구항 17

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (d)의 다당류는 검(gum)류, 수용성식이섬유, 난소화성 말토덱스트린, 불용성식이섬유, 전분, 리벤(Levan) 및 저항성전분으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 단백질-다당류 코팅의 이중코팅층을 갖는 유산균의 제조방법.

청구항 18

제 1 항에 있어서, 상기 유산균은 스트렙토코커스(Streptococcus)속, 락토코커스(Lactococcus)속, 엔테로코커스(Enterococcus)속, 락토바실러스(Lactobacillus)속, 페디오코커스(Pediococcus)속, 류코노스톡(Leuconostoc)속, 비셀라(Weissella)속 및 비피도박테리움(Bifidobacterium)속으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 균주인 것을 특징으로 하는, 단백질-다당류 코팅의 이중코팅을 갖는 유산균의 제조방법.

청구항 19

제 1 항, 제 5 항, 제 8 항, 제 11 항, 제 14 항 내지 제 18 항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된, 단백질-다당류 코팅의 이중코팅을 갖는 유산균.

청구항 20

제 1 항, 제 5 항, 제 8 항, 제 11 항, 제 14 항 내지 제 18 항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 단백질-다당류 코팅의 이중코팅을 갖는, 유산균을 포함하는 식품 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 단백질 가수분해물을 이용한 단백질-다당류 이중코팅 유산균의 제조방법 및 이 방법에 의해 제조된 이중코팅을 갖는 유산균에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 유산균(lactic acid bacteria)은 락트산균 또는 젖산균이라고도 하며, 포유류의 장내에 서식하여 잡균에 의한 이상 발효를 방지하여 정장제로도 이용되는 중요한 세균이다. 예를 들어, 불가리아 젖산균(L. bulgaricus)은 가장 오래 전부터 알려진 유산균으로, 요구르트의 제조에 사용되며, 치즈나 발효 버터 제조 시의 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 사용된다. 또한, 락티스 젖산 구균(L. lactis)은 DL-젖산을 생성하며, 이것은 항상 우유 속에 존재하여 버터 또는 치즈 제조에 사용되며 낙농용 젖산균으로서 가장 중요한 균이다.

[0004] 상기와 같이 유용한 유산균은 장에 정착하여 장관 운동을 활성화시켜 변비나 설사증을 개선시키고 배변활동을 원활하게 해주며, 그 외에 면역력 향상, 항고지혈, 항아토피, 다이어트 효과, 항당뇨, 항암 등 다양한 생리활성을 나타내므로 건강기능식품, 정장용 의약품, 피부개선용 화장품, 사료첨가제 등에 널리 사용되고 있다. 그런데 상기한 생리학적 효과를 발휘하기 위해서는, 기존에 요거트 등 식품으로 섭취하는 양보다 훨씬 더 많은 양의 유산균을 섭취해야 한다. 따라서 유산균만을 분리하여 분말이나 캡슐 형태로 간편하게 먹는 방법이 대중화되어 있다.

[0005] 이러한 유산균은 주로 발효산물을 이용하는 다른 산업용 미생물과는 달리 생균 자체를 이용하기 때문에 유통기간 및 섭취시 소화과정 중 생존율의 유지는 매우 중요한 문제이다. 즉, 유산균은 생균제 자체로서 경구 섭취시 인체 내 pH가 3이하로 내려가는 위장과 소장에서 분비되는 소화효소 및 담즙산에 의해 생육이 저해되어 대장에 도달하는 생균수가 감소할 뿐만 아니라 장내 정착률이 저하되는 문제가 있다.

[0006] 이 때문에 유산균은 효용과 가치면에서 매우 유익한 균임에도 불구하고 상당히 불안정하여 장기간 보관하고 사

용하는데 많은 제약이 따르며, 이를 이용한 발효유제품 및 생균제는 제조과정과 보관기간 중 산소나 산화 스트레스에 의하여 생존율이 크게 감소되어 산업적 활용이나 경구섭취시의 효능 발휘에 장애가 되고 있다.

[0007] 상기와 같은 문제점을 해결하고자 유산균을 코팅하는 다양한 방법이 개발되었는데 초기에는 캡슐제를 이용한 장용 코팅제와 젤라틴, 다당류, 검류 등을 이용한 마이크로캡슐화 등이 있었지만 고가의 코팅제를 사용하거나 공정이 추가되는 문제점이 지적되어 왔다.

[0008] 이를 해결하기 위해 고농도의 유산균이 살아있는 이중 구조의 젤리를 제조하는 방법, 수용성 폴리머, 히알루론산, 다공성 입자를 가지는 코팅제 및 단백질을 추가하여 4중 코팅하는 방법(대한민국 특허출원 제10-2011-0134486호), 수용성 폴리머, 기능성 수화 히알루론산, 다공성 입자 및 단백질을 이용하여 4중 코팅하는 방법(대한민국 특허출원 제10-2015-0129986호), 장내생존율을 증대시키기 위해 유산균을 카제인, 코팅제, 식용유지, 락토바실러스 플란타룸의 Extracellular Polymeric Substance, 및 알긴산으로 코팅하는 방법(대한민국 특허출원 제10-2016-0172568호), 장내정착성 향상을 위해 실크 피브로인으로 코팅하는 방법(대한민국 특허출원 제10-2017-0045326호)등이 경쟁적으로 개발되어 왔다.

[0009] 그러나 이와 같이 개선된 유산균 코팅 기술 또한 유산균의 표면을 완전히 코팅하지 못하여 여전히 동결건조 생존율, 유산균의 내열성, 내산성 및 내담즙성, 장정착성 등이 충분히 우수하지 못하며 보관 및 유통 과정에서 생존율이 떨어진다는 문제점이 있다.

[0010] 본 명세서에서 언급된 특허문헌 및 참고문헌은 각각의 문헌이 참조에 의해 개별적이고 명확하게 특정된 것과 동일한 정도로 본 명세서에 참조로 삽입된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0012] (특허문헌 0001) 대한민국 특허출원 제10-2011-0134486호

(특허문헌 0002) 대한민국 특허출원 제10-2015-0129986호

(특허문헌 0003) 대한민국 특허출원 제10-2016-0172568호

(특허문헌 0004) 대한민국 특허출원 제10-2017-0045326호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명자들은 유산균의 동결건조생존율, 저장안정성, 내산성, 및 내담즙성을 향상시킬 수 있는 유산균 코팅방법을 개발하기 위해 연구 노력한 결과, 단백질을 가수분해한 후 이를 이용하여 다당류 및 동결보호제와 함께 유산균을 이중코팅하면 유산균의 동결건조생존율, 내산성, 내담즙성을 크게 향상시킬 수 있음을 실험적으로 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0014] 따라서, 본 발명의 목적은 유산균의 동결건조생존율, 저장안정성, 내산성, 및 내담즙성이 향상되도록 가수분해된 단백질을 이용하여 유산균을 효과적으로 이중코팅하는 방법을 제공하는 것에 있다.

[0015] 본 발명의 다른 목적은 이중코팅이 형성되어 유산균의 동결건조생존율, 저장안정성, 내산성, 및 내담즙성이 향상된 유산균을 제공하는 것에 있다.

[0016] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 이중코팅된 유산균을 포함하는 식품 조성물을 제공하는 것에 있다.

[0017] 본 발명의 다른 목적 및 기술적 특징은 이하의 발명의 상세한 설명, 청구의 범위 및 도면에 의해 보다 구체적으로 제시된다.

과제의 해결 수단

[0019] 본 발명의 일 양태에 따르면, 다음의 단계를 포함하는 단백질-다당류 코팅의 이중코팅을 갖는 유산균의 제조방법을 제공한다:

[0020] (a) 단백질 수용액에 단백질 가수분해효소를 처리하여 단백질의 가수분해율이 45% - 95%인 단백질 가수분해 수용액을 제조하는 단계;

[0021] (b) 상기 제조된 단백질 가수분해 수용액에 유산균 배양을 위한 당 성분 및 질소원 성분을 첨가하여 살균한 후 유산균을 접종하여 배양하는 단계;

[0022] (c) 상기 배양하여 얻은 유산균의 발효 배양액으로부터 유산균의 균체를 회수하는 단계;

[0023] (d) 상기 회수한 유산균의 균체에 동결보호제 및 다당류 수용액을 첨가하여 혼합 및 균질화시키는 단계; 및

[0024] (e) 상기 균질화된 유산균 균체 수용액을 동결 건조시키는 단계.

[0025] 단백질 가수분해물의 제조

[0026] 본 발명에서 유산균의 코팅에 사용되는 단백질은 가수분해 처리한 후 사용한다.

[0027] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 단백질의 가수분해 처리는 단백질이 포함된 단백질 수용액에 단백질 가수분해효소를 첨가한 후 가수분해 반응시켜 행할 수 있다.

[0028] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 단백질의 가수분해율은 45% - 95% 범위가 바람직하다.

[0029] 본 발명에서 단백질의 가수분해율은 효소에 의해 단백질이 가수분해된 정도를 나타내는 의미이며, i) 효소에 의한 가수분해 처리 전과 처리 후의 단백질 수용액의 흡광도 차이를 측정하는 방법, ii) 효소에 의한 가수분해 처리 전과 처리 후의 단백질 수용액을 원심분리하여 얻어지는 침전물의 무게의 차이를 측정하는 방법, 또는 iii) 상기 2가지 방법을 사용하여 측정한 값의 평균값에 의해 산출될 수 있다.

[0030] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명에서 상기 단백질의 가수분해율은 단백질 가수분해효소를 처리하기 전의 단백질 수용액의 흡광도(OD, Optical Density) 측정값("시작점 OD")과 단백질 가수분해효소를 처리한 후의 단백질 수용액의 흡광도 측정값("종결점 OD")의 차이인 ΔOD 값을 상기 시작점 OD값으로 나눈 값의 100 분율값(%)이다. 즉, 상기 단백질의 가수분해율은 다음의 계산식으로 산출될 수 있다: 가수분해율 (%) = [ΔOD]/[시작점 OD] X 100.

[0031] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명에서 상기 단백질의 가수분해율은 단백질 가수분해효소를 처리하기 전의 단백질 수용액을 원심분리하여 얻는 침전물의 무게 측정값("시작점 ppt")과 단백질 가수분해효소를 처리한 후의 단백질 수용액을 원심분리하여 얻는 침전물의 무게 측정값("종결점 ppt")의 차이인 Δppt 값을 상기 시작점 ppt값으로 나눈 값의 100분율값(%)이다. 즉, 상기 단백질의 가수분해율은 다음의 계산식으로 산출될 수 있다: 가수분해율 (%) = [Δppt]/[시작점 ppt] X 100

[0032] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 2가지 방법으로 측정한 가수분해율의 평균값을 사용할 수 있다.

[0033] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 유산균 코팅에 사용되는 단백질은 탈지분유, 대두분리단백(ISP), 또는 탈지분유 및 대두분리단백(ISP)의 혼합물일 수 있다.

[0034] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명에서 탈지분유의 가수분해율은 59% - 93% 일 수 있고, 바람직하게는 75% - 92%, 더욱 바람직하게는 80% - 90%일 수 있다.

[0035] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명에서 대두분리단백의 가수분해율은 45% - 86% 일 수 있고, 바람직하게는 61% - 80% 일 수 있고, 더욱 바람직하게는 70% - 80% 일 수 있다.

[0036] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명에서 상기 탈지분유 및 대두분리단백 혼합물의 가수분해율은 75% - 93% 일 수 있고, 바람직하게는 76% - 85% 일 수 있고, 더욱 바람직하게는 78% - 83% 일 수 있다.

[0037] 본 발명에서 사용되는 단백질 가수분해 효소는 단백질을 아미노산 또는 펩티드 수준으로 분해하는 효소를 의미한다. 본 발명에서 단백질 가수분해 효소는 상용화된 Alcalase, Flavourzyme, Neutrase, Protamax 등을 선택하여 사용할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0038] 본 발명에서 단백질을 가수분해 처리하면 반수용성 펩티드(peptide)가 생성되는 것으로 추정된다. 상기 반수용성 펩티드는 단백질 가수분해 처리시에 아미노산으로 완전히 가수분해되지 않고 남아 있는 펩티드를 의미하며, 본 발명 방법에서 가수분해율이 높을 수록 반수용성 펩티드의 양이 적어지게 되고, 가수분해율이 낮을수록 그 양이 증가한다. 상기 반수용성 펩티드는 동결건조시에 세포에 가해지는 물리적 충격에 의한 단백질의 변성을 완화시켜 동결건조생존율을 향상시키는 역할을 한다. 반면 상기 반수용성 펩티드가 단백질 가수분해 수용액내에

과량으로 존재하는 경우 배양액이 소수성으로 변화하고 이에 의해 유산균의 뭉침을 유도하여 유산균의 배양성을 억제할 수 있다.

[0039] 따라서, 본 발명에서 상기한 범위의 단백질 가수분해율 보다 낮은 경우, 가수분해되지 않은 다량의 반수용성 펩티드에 의해 배양액의 소수성이 높아져 유산균이 뭉쳐 분열이 원활하지 않게 되고 결국 유산균의 배양성이 나빠진다. 반대로, 단백질 가수분해물이 상기한 범위의 단백질 가수분해율 보다 높은 경우, 분해되지 않은 반수용성 펩티드의 양이 충분하지 않아 동결건조시 유산균에 가해지는 물리적 충격에 의한 단백질 변성을 충분히 완화시킬 수 없게 되어 동결생존율이 낮아지는 문제점이 있다.

[0040] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 탈지분유의 가수분해시에 탈지분유 수용액에 대해, 탈지분유의 농도는 0.5 - 10.0중량%, 바람직하게는 1.0 - 6.0중량%일 수 있고, 단백질 가수분해효소의 농도는 0.0005 - 0.010중량%, 바람직하게는 0.001 - 0.008중량% 일 수 있다.

[0041] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 대두분리단백(ISP)의 가수분해시에 대두분리단백 수용액에 대해, 대두분리단백의 농도는 0.10 - 3.0중량%, 바람직하게는 0.15 - 1.0중량% 일 수 있고, 단백질 가수분해효소의 농도는 0.001 - 0.10중량%, 바람직하게는 0.005 - 0.030중량% 일 수 있다.

[0042] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 탈지분유 및 대두분리단백 혼합물의 가수분해시에 탈지분유 및 대두분리단백 혼합물 수용액에 대해, 탈지분유 및 대두분리단백 혼합물의 농도는 0.05 - 2.0중량%, 바람직하게는 0.10 - 0.40중량%일 수 있고, 단백질 가수분해효소의 농도는 0.05 - 4.0중량%, 바람직하게는 0.5 - 3.0중량%일 수 있다.

[0043] 유산균 배양 및 단백질 코팅

[0044] 상기 제조된 단백질 가수분해 수용액에 유산균 배양을 위한 당 성분 및 질소원 성분을 첨가하여 살균한 후 유산균을 접종하여 배양한다.

[0045] 본 발명에서 상기 코팅의 대상이 되는 유산균은 산을 생성하고 약산성 조건에서도 증식할 수 있는 유산균으로서, 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.) 및 비셀라 속(Weissella sp.) 중 어느 하나 이상일 수 있고, 바람직하게는 락토바실러스 플란타룸(Lactobacillus plantarum), 락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei), 락토바실러스 람노서스(Lactobacillus rhamnosus), 락토바실러스 알리멘타리우스 (Lactobacillus alimentarius), 락토바실러스 사케이(Lactobacillus sakei), 락토바실러스 아시도필루스(Lactobacillus acidophilus), 락토바실러스 가세리(Lactobacillus gasseri), 락토바실러스 델브루엑키(Lactobacillus delbrueckii), 락토바실러스 퍼멘텀(Lactobacillus fermentum), 락토바실러스 불가리쿠스(Lactobacillus bulgaricus), 류코노스톡 메센테로이드스(Leuconostoc mesenteroides), 엔테로코커스 페시움(Enterococcus faecium), 엔테로코커스 페컬리스(Enterococcus faecalis), 스트렙토코커스 서모필러스(Streptococcus thermophilus), 스트렙토코커스 락티스(Streptococcus lactis), 스트렙토코커스 훼칼리스(Streptococcus faecalis), 비피도박테리엄 인판티스(Bifidobacterium infantis), 비피도박테리움 비피덤(Bifidobacterium bifidum), 비피도박테리움 롱검(Bifidobacterium longum), 비피도박테리움 브레브(Bifidobacterium breve), 및 락토코커스 락티스(Lactococcus lactis subsp. lactis)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

[0046] 또한, 본 발명에서 상기 유산균으로 바람직하게는 락토바실러스 플란타룸 CBT-LP(Lactobacillus plantarum CBT-LP, 기탁번호: KCTC 10782BP), 락토바실러스 델브루엑키 서브 불가리쿠스 CBT-LG(Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus CBT-LG, 기탁번호: KCTC 11864BP), 락토바실러스 아시도필루스 CBT-LA(Lactobacillus acidophilus CBT-LA, 기탁번호: KCTC 11906BP),락토바실러스 람노서스 CBT-LR(Lactobacillus rhamnosus CBT-LR, 기탁번호: KCTC 12202BP), 락토바실러스 루테리CBT-LU(Lactobacillus reuteri CBT-LU, 기탁번호: KCTC 12397BP), 락토바실러스 카제이 CBT-LC(Lactobacillus casei CBT-LC, 기탁번호: KCTC 12398BP) 락토바실러스 파라카제이 CBT-LPC(Lactobacillus paracasei CBT-LPC, 기탁번호: KCTC 12451BP), 락토바실러스 헬베티쿠스 CBT-LH(Lactobacillus helveticus CBT-LH, 기탁번호: KCTC 12670BP), 비피도박테리움 인판티스 CBT-BT(Bifidobacterium infantis CBT-BT, 기탁번호: KCTC 11859BP), 비피도박테리움 락티스 CBT-BL(Bifidobacterium lactis CBT-BL, 기탁번호: KCTC 11904BP), 비피도박테리움 비피덤 CBT-BF(Bifidobacterium bifidum CBT-BF, 기탁번호: KCTC 12199BP), 비피도박테리움 롱검 CBT-BG(Bifidobacterium longum CBT-BG, 기탁번호: KCTC 12200BP), 비피도박테리움 브레브 CBT-BR(Bifidobacterium breve CBT-BR, 기탁

번호: KCTC 12201BP), 페디오코커스 펜토사세우스 CBT-PP(Pediococcus pentosaseus CBT-PP, 기탁번호: KCTC 10297BP), 락토코커스 락티스 서브 락티스 CBT-SL(Lactococcus lactis sub sp. lactis CBT-SL, 기탁번호: KCTC 11865BP), 스트렙토코커스 서모필러스 CBT-ST(Streptococcus thermophilus CBT-ST, 기탁번호: KCTC 11870BP), 엔테로코커스 페컬리스 CBT-EFL(Enterococcus faecalis CBT-EFL, 기탁번호: KCTC 12394BP), 및 엔테로코커스 페시움 CBT-EF(Enterococcus faecium CBT-EF , 기탁번호: KCTC 12450BP)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 바람직하게는 락토바실러스 아시도필루스 CBT-LA(Lactobacillus acidophilus CBT-LA), 락토바실러스 플란타룸 CBT-LP(Lactobacillus plantarum CBT-LP), 스트렙토코커스 서모필러스 CBT-ST(Streptococcus thermophilus CBT-ST) 및 엔테로코커스 페시움 CBT-EF(Enterococcus faecium CBT-EF), 비피도박테리움 롱굼 CBT-BG(Bifidobacterium longum CBT-BG)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으며, 보다 바람직하게는 스트렙토코커스 서모필러스 CBT-ST(Streptococcus thermophilus CBT-ST), 비피도박테리움 브레브 CBT-BR(Bifidobacterium breve CBT-BR), 락토바실러스 아시도필루스 CBT-LA(Lactobacillus acidophilus CBT-LA) 일 수 있다.

[0047] 본 발명에서 하기와 같이 유산균의 코팅을 위하여 원료로는 유산균의 생균이 포함된 것이라면, 제형 혹은 제조방법에 제한없이 사용될 수 있으나, 바람직하게는 유산균의 배양액을 사용할 수 있다.

[0048] 본 발명에서 상기 유산균의 배양액을 얻기 위한 유산균의 배양 조건 역시 특별히 제한하지 않으며, 당해 기술분야에서 유산균의 배양을 위해 일반적으로 사용되는 조건이라면 제한없이 사용될 수 있으나, 예를 들면, MRS, BL, M17, NB, 또는 BHI 등의 배지에 유산균을 접종하여 35 - 40℃의 온도 및 질소 가스 또는 이산화탄소 가스로 치환된 혐기 조건하에 6 - 48 시간 동안 배양할 수 있다.

[0049] 본 발명에서 상기 유산균의 배양을 위한 당 성분은 혼합유당, 과당, 설탕(Sucrose) 또는 포도당을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 균주 특성에 맞게 선택하여 사용할 수 있다.

[0050] 본 발명에서 상기 유산균의 배양을 위한 질소원 성분은 효모추출물 또는 소이펩톤을 사용할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0051] 이 밖에 유산균의 배양을 위해, 미량성분으로서 제이인산칼륨, 황산마그네슘, 황산망간, 염화칼슘, 구연산칼륨, 초산나트륨, L-아스코르빈산, L-글루타민산, L-시스테인염산염, 폴리소르베이트80 등을 더 첨가할 수 있다.

[0052] 유산균 균체의 회수 및 농축

[0053] 유산균을 배양한 배양액으로부터 여액을 최대한 많이 제거하여 고형분인 유산균 균체(Cell Mass)의 비중이 높은 상태로 농축한다. 유산균 균체를 조밀하게 농축할수록 동결건조 유산균 제조에서 다음과 같은 이점을 갖는다: i) 트레이(Tray)당 분주량이 감소하고 증발시켜야 할 수분의 양도 적게 되고, ii) 동결과정에서 삼투압 차이에 의한 수분 유출로 동결속도가 빠르며, iii) 빙결정이 작고 균일하며 세포형태의 변화도 작게 되어 곧, 동결중의 유산균 세포막의 손상이 적게 되고, iv) 동결과정에서의 변성도 적게 일어난다.

[0054] 본 발명에서 유산균을 회수 및 농축하는 방법은 특별히 제한되지 않으나, 바람직하게는 원심분리 방법에 의해 회수 및 농축할 수 있으며, 예를 들어 디스크 타입(dis type)의 고속 원심분리기 또는 튜블러 타입(tubular type)의 고속 원심분리기를 이용하여 농축할 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0055] 동결보호제의 첨가

[0056] 본 발명의 방법에서 유산균을 동결건조 하여 유산균의 저장 안정성을 증진시킬 수 있다. 동결건조 처리를 위해 회수 및 농축된 유산균 균체에 동결보호제를 첨가하여 혼합 및 균질화한다. 바람직하게는 동결보호제 성분이 첨가된 동결보호제 수용액을 사용할 수 있다.

[0057] 본 발명의 방법에서 사용할 수 있는 동결보호제는 트레할로스, 말토덱스트린, 만니톨, 및 탈지분유로 이루어지는 군에서 선택된 1종 또는 이들의 2종 이상의 혼합물을 사용할 수 있다. 바람직하게는 동결보호제는 트레할로스, 말토덱스트린, 만니톨 및 탈지분유로 이루어지는 혼합물을 사용할 수 있다. 본 발명에서 동결보호제는 동결보호제 성분이 1 - 90중량%, 1 - 80중량%, 1 - 75중량%, 1 - 70중량%, 1 - 65중량%, 또는 1 - 60중량% 포함된 수용액의 형태로 제조하여 농축된 유산균 균체에 첨가하여 사용할 수 있다.

[0058] 상기 동결보호제 수용액은 유산균 균체 대비 적절한 양을 첨가하여 사용할 수 있으며, 바람직하게는 유산균 균체 중량 대비 0.001 - 99중량%, 0.01 - 95중량%, 0.1 - 95중량%의 범위로 첨가하여 사용할 수 있다.

[0059] 다당류 코팅

[0060] 본 발명에서 유산균의 동결건조생존율, 내산성 및 내담즙성을 향상시키기 위해 농축된 유산균을 다당류로 코팅할 수 있다.

[0061] 다당류 코팅을 위해 농축된 유산균 균체에 다당류 성분을 첨가한 후 혼합 및 균질화 한다. 바람직하게는 다당류 성분이 첨가된 다당류 수용액을 사용할 수 있다.

[0062] 본 발명에서 유산균의 다당류 코팅에 사용될 수 있는 다당류는 검(gum)류, 수용성식이섬유, 난소화성 말토덱스트린, 불용성식이섬유, 전분, 리벤(Levan), 및 저항성전분으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 상기 검(gum)류는 잔탄검(Xantan gum), 아라비아검(Arabic gum), 구아검(Guar gum), 젤란검(Gellan gum), 카라야검(Karaya gum), 및 로커스트빈검(Locust bean gum)으로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상의 성분일 수 있다. 상기 수용성식이섬유는 폴리덱스트로즈(Polydextrose), 글루코만난(Glucomannan), 베타-글루칸(β-glucan), 펙틴(Pectin), 또는 알긴산(Alginic acid)일 수 있다. 상기 불용성식이섬유는 치커리추출분말, 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 리그닌 또는 이눌린일 수 있다.

[0063] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 다당류 코팅에 사용되는 다당류는 잔탄검 및 셀룰로오스의 혼합물일 수 있다.

[0064] 본 발명에서 다당류 코팅은 다당류 성분이 1 - 80중량%, 1 - 75중량%, 1 - 70중량%, 1 - 65중량%, 1 - 60중량%, 또는 1 - 50중량% 포함된 다당류 수용액의 형태로 제조하여 농축된 유산균 균체에 첨가한 후 혼합 및 균질화하는 방식으로 행할 수 있다.

[0065] 상기 다당류 수용액은 유산균 균체 중량 대비 적절한 양을 첨가하여 사용할 수 있으며, 바람직하게는 유산균 균체 중량 대비 0.001 - 99중량%, 0.01 - 95중량%, 0.1 - 95중량%의 범위로 첨가하여 사용할 수 있다.

[0066] 동결건조

[0067] 상술한 바와 같이, 단백질 코팅된 유산균 균체에 동결보호제 및 다당류 성분을 첨가하고 혼합 및 균질화한 유산균 균체를 동결건조한다.

[0068] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 상기 설명된 방법에 의해 제조된 단백질-다당류 이중코팅을 갖는 유산균을 제공한다.

[0069] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 상기 설명된 방법에 의해 제조된 단백질-다당류 이중코팅을 갖는 유산균을 포함하는 식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0071] 본 발명은 단백질 가수분해물을 이용한 단백질-다당류 이중코팅 유산균의 제조방법 및 이 방법에 의해 제조된 이중코팅을 갖는 유산균에 관한 것이다. 본 발명에 따라 제조된 단백질-다당류 이중코팅을 갖는 유산균은 동결건조생존율, 내산성, 내담즙성이 매우 우수하다. 따라서, 본 발명의 단백질-다당류 이중코팅을 갖는 유산균은 발효유, 가공유, 장류, 가공식품, 기능성 음료, 기능성 식품, 일반 식품 등의 제조시에 매우 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0073] 도 1은 Streptococcus thermophillus CBT ST3 배양액(탈지분유 6.0%, 단백질분해효소 0.003%)의 현미경 관찰 사진이다.

도 2는 Bifidobacterium breve CBT BR3 배양액 (대두분리단백 0.90%, 단백질분해효소 0.015%)의 현미경 관찰 사진이다.

도 3은 Lactobacillus acidophilus CBT LA1 배양액 (탈지분유 2.0%, 대두분리단백 0.90%, 단백질분해효소 0.015%)의 현미경 관찰 사진이다.

도 4는 Streptococcus thermophillus CBT ST3를 본 발명의 방법에 따라 이중 코팅한 균체의 SEM 사진이다.

도 5는 Bifidobacterium breve CBT BR3를 본 발명의 방법에 따라 이중 코팅한 균체의 SEM 사진이다.

도 6은 Lactobacillus acidophilus CBT LA1을 본 발명의 방법에 따라 이중 코팅한 균체의 SEM 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0074] 본 명세서에서 설명된 구체적인 실시예는 본 발명의 바람직한 구현예 또는 예시를 대표하는 의미이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되지는 않는다. 본 발명의 변형과 다른 용도가 본 명세서 특허청구범위에 기재된 발명의 범위로부터 벗어나지 않는다는 것은 당업자에게 명백하다.

[0076] **실시예**

[0078] **실시예 1: 단백질의 가수분해율 측정**

[0080] 1-1. 가수분해율 측정 방법

[0081] 유산균 이중코팅에 사용되는 단백질원으로서 탈지분유(skim milk), 대두분리단백(ISP), 탈지분유 및 대두분리단백 혼합물에 대해 단백질 분해효소에 의한 가수분해율을 측정하였다. 탈지분유와 대두분리단백이 각각 다른 농도로 포함된 농도별 단백질 수용액을 제조하였다. 제조한 농도별 단백질 수용액을 교반기가 장착된 반응용기에 넣고, 60℃에서 100RPM으로 현탁 및 균질화한 후, 제조한 현탁액에 1N NaOH를 첨가하여 pH 8.2±0.2로 조절하였다. 아래 표 1, 표 2 및 표 3에 탈지분유, 대두분리단백, 및 탈지분유 + 대두분리단백 혼합물 현탁액을 각각 다른 농도로 제조한 예들을 나타냈다.

표 1

[0082]

탈지분유(Skim milk) 현탁액		
농도(%)	기질량(kg)	정제수(ℓ)
1.0%	6	594
2.0%	12	588
3.0%	18	582
4.0%	24	576
5.0%	30	570
6.0%	36	564

표 2

[0083]

대두분리단백(ISP) 현탁액		
농도(%)	기질량(kg)	정제수(ℓ)
0.15%	0.9	599.1
0.30%	1.8	598.2
0.45%	2.7	597.3
0.60%	3.6	596.4
0.75%	4.5	595.5
0.90%	5.4	594.6

표 3

[0084]

탈지분유(skim milk) + 대두분리단백(ISP) 혼합 현탁액				
탈지분유 (skim milk)		대두분리 단백(ISP)		정제수(ℓ)
농도(%)	기질량(kg)	농도(%)	기질량(kg)	
0.5%	3.0	0.10%	0.6	수용액 600ℓ 기준정제수투입
1.0%	6.0	0.20%	1.2	
1.5%	9.0	0.30%	1.8	
2.0%	12.0	0.40%	2.4	

[0085] pH를 조절한 현탁액에 각각 다른 농도의 단백질 분해효소(프로테아제, Alcalase)를 투입하여 2시간 동안 반응시켜 pH를 6.8 이하로 가수분해하였다. 현탁액의 pH 조절전을 시작점(효소 처리전), 효소 반응 2시간 후를 종결점으로 하여 단백질원에 대한 가수분해율을 측정하였다.

[0086] 탈지분유의 가수분해율은 분광광도계(SHIMADZU, UV-1280)를 이용해 610 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0087] 가수분해율 S (%) = [ΔOD]/[시작점 OD] x 100%

[0088] [ΔOD] = 시작점 OD - 종결점 OD

[0089] 대두분리단백(ISP)의 가수분해율은 마이크로원심분리기(한일, micro-12)를 이용해 13,000rpm으로 15 분간 1차 원심분리하여 상등액을 폐기하고, 다시 15 분간 2차 원심분리하여 침전물(ppt)의 무게를 측정하였다.

[0090] 가수분해율 I (%) =[Δppt]/[시작점 ppt] x 100%

[0091] [Δ ppt] = 시작점 ppt - 종결점 ppt

[0092] 탈지분유 및 대두분리단백 혼합물의 가수분해율은 흡광도 및 ppt 2가지의 특성을 측정하여 평균값으로 계산하였다.

[0093] 가수분해율 S & I (%) =[가수분해율 S + 가수분해율 I]/2

[0095] 1-2. 가수분해율 측정 결과

[0096] 탈지분유의 농도 및 효소 농도에 따른 탈지분유의 가수분해율을 측정한 결과는 아래의 표 4에 나타냈다.

표 4

[0097]

탈지분유와 단백질 분해 효소의 농도에 따른 가수분해율 측정 결과						
효소/Skim	1.0%	2.0%	3.0%	4.0%	5.0%	6.0%
0.001%	90.9%	75.4%	73.2%	68.9%	65.4%	59.4%
0.002%	91.9%	78.7%	75.6%	72.1%	69.7%	66.7%
0.003%	92.1%	85.0%	80.6%	76.2%	73.9%	71.6%
0.004%	92.7%	88.2%	86.1%	85.3%	80.4%	76.4%
0.005%	93.4%	91.0%	87.9%	86.9%	84.2%	81.9%

[0098] * 농도기준: 탈지분유 용액기준, w/w%

[0099] * 사용효소: 프로테아제 (제품명: Alcalase 2.4L FG, 제조사: Novozymes A/S Denmark)

[0100] 실험 결과, 동일한 효소 농도에서 가수분해율은 탈지분유의 농도가 증가할수록 감소하였고, 효소의 농도가 증가할수록 증가하는 경향을 보였다.

[0101] 대두분리단백의 농도와 효소 농도에 따른 대두분리단백의 가수분해율을 측정한 결과는 아래의 표 5에 나타내었다.

표 5

[0102]

대두분리단백과 단백질 분해 효소 농도에 따른 가수분해율 측정 결과						
효소/ISP	0.15%	0.30%	0.45%	0.60%	0.75%	0.90%
0.005%	81.6%	75.9%	68.1%	62.7%	53.3%	46.8%
0.010%	82.4%	77.3%	71.1%	65.4%	58.6%	50.3%
0.015%	83.7%	78.9%	74.0%	68.6%	62.7%	55.5%
0.020%	84.1%	80.0%	77.9%	72.6%	66.3%	60.7%
0.025%	85.6%	81.9%	79.1%	74.9%	69.9%	66.3%

[0103] * 농도기준: 분리대두단백(ISP) 용액기준, w/w%

[0104] * 사용효소: 프로테아제 (제품명: Alcalase 2.4L FG, 제조사: Novozymes A/S Denmark)

[0105] 동일한 효소 농도에서 대두분리단백의 가수분해율은 대두분리단백의 농도가 증가할수록 감소하였고, 효소의 농도가 증가할수록 증가하는 경향을 보였다.

[0106] 탈지분유 및 대두분리단백의 농도에 따른 가수분해율 측정 결과는 아래 표 6에 나타내었다.

표 6

[0107]

탈지분유 및 대두분리단백 혼합물 농도 및 효소 농도에 따른 가수분해율 측정 결과				
Skim/ISP	0.10%	0.20%	0.30%	0.40%
0.5%	92.7%	91.8%	90.6%	88.8%
1.0%	88.4%	87.2%	86.3%	85.1%
1.5%	84.6%	83.7%	82.6%	80.4%
2.0%	80.1%	78.9%	77.6%	76.8%

[0108] * 농도기준: 탈지분유와 대두분리단백 혼합 용액기준, w/w%

[0109] * 사용효소: 프로테아제 (제품명: Alcalase 2.4L FG, 제조사: Novozymes A/S Denmark) 0.015% 사용

[0110] 동일한 효소농도에서 가수분해율은 탈지분유 및 대두분리단백 혼합물의 농도가 증가할수록 감소하는 경향을 보였다. 동일 효소농도에서 대두분리단백은 단독으로 사용시보다 가수분해율이 더 높게 나타났다.

[0112] **실시예 2: 단백질의 가수분해율에 따른 배양성 측정**

[0114] 2-1: 탈지분유 농도별 가수분해율에 따른 배양성 실험

[0115] 실시예 1에서 제조한 단백질 가수분해 수용액에 혼합유당 30kg, 소이펩톤 6kg, 효모추출물 12kg, 제이인산칼륨 1.2kg, 황산마그네슘 120g, L-아스코르빈산 600g, L-글루타민산 240g, 폴리소르베이트-80 600g을 용해시키고 최종액량을 1,200L로 하여 열교환기(Alfalaval, 스웨덴)를 이용해 온도 130℃, 유량 1,850ℓ/h 조건으로 살균하고, 1.2KL 용량의 혐기적 발효관으로 이송하여 Streptococcus thermophillus CBT ST3 종균 5L를 접종한 후, 암모니아로 pH 6.0을 유지하면서 13시간 발효하였다. 발효 후 탈지분유 및 단백질 분해효소 농도별 가수분해율에 따른 유산균의 배양성을 측정하였다. 유산균 배양성 측정은 희석수 9 mℓ에 배양액 1 mℓ을 취하여 vortexing을 실시한 후 10진 희석법으로 생균수를 분석하였다. 측정 결과는 아래 표 7에 나타내었다.

표 7

[0116]

탈지분유 및 단백질분해효소 농도별 가수분해율에 따른 Streptococcus thermophillus CBT ST3 (KCTC 11870BP) 배양성 실험결과						
효소/Skim	1.0%	2.0%	3.0%	4.0%	5.0%	6.0%
0.001%	4.9E+09	7.1E+09	7.4E+09	7.3E+09	7.0E+09	6.7E+09
0.002%	5.0E+09	7.4E+09	7.6E+09	7.5E+09	7.2E+09	6.9E+09
0.003%	5.2E+09	*8.3E+09*	*8.2E+09*	*8.3E+09*	7.7E+09	7.1E+09
0.004%	5.2E+09	*8.2E+09*	*8.3E+09*	*8.2E+09*	*8.2E+09*	7.4E+09
0.005%	5.3E+09	*8.3E+09*	*8.4E+09*	*8.3E+09*	*8.3E+09*	7.6E+09

[0117] 실험결과, 표 7에서 보여지는 바와 같이 탈지분유를 2% 이상, 단백질 분해효소는 0.003% 이상 사용하였을 때 우수한 배양성을 확보할 수 있었다. 탈지 분유 농도를 계속 증가시켜 일정 수준 이후에서는 효소분해되지 않은 비율이 증가할수록 배양성은 오히려 하락하는 경향을 보였다. 이러한 결과는 도 1의 현미경 사진에서도 알 수 있는 바와 같이, 분해되지 않은 비공유결합의 소수성의 반수용성 펩티드 량 증가에 의해 배양액의 소수성이 높아져 유산균이 뭉쳐 균의 분열을 원활하지 않게 한 것 때문으로 추정되었다.

[0119] 2-2: 대두분리단백 농도별 가수분해율에 따른 배양성 실험

[0120] 탈지분유와 마찬가지로 실시예 1에서 확보한 가수분해 용해액에 포도당 24kg, 소이펩톤 6kg, 효모추출물 18kg, 초산나트륨 1.2kg, 구연산칼륨 1.2kg, 황산마그네슘 120g, L-시스테인염산염 1.8kg, L-아스코르빈산 600g, 폴리소르베이트-80 1.2kg을 용해시키고 최종액량을 1,200L로 하여 열교환기(Alfalaval, 스웨덴)를 이용해 온도 130℃, 유량 1,850ℓ/h 조건으로 살균하고 1.2KL 용량의 혐기적 발효관으로 이송하여 Bifidobacterium breve CBT BR3 종균 5L를 접종한 후 암모니아로 pH 6.5을 유지하면서 14시간 발효하였다. 발효 후 대두분리단백 및 단백질분해효소 농도별 가수분해율에 따른 유산균의 배양성을 측정하였다. 유산균의 배양성 측정은 희석수 9 mℓ에 배양액 1 mℓ을 취하여 vortexing을 실시한 후 10진 희석법으로 생균수를 분석하였다. 측정 결과는 표 8에 나타내었다.

표 8

[0121]

대두분리단백(ISP)과 단백질분해효소 농도별 가수분해율에 따른 Bifidobacterium breve CBT BR3(KCTC 12201BP) 배양성 측정 결과						
효소/ISP	**0.15%**	**0.30%**	**0.45%**	**0.60%**	**0.75%**	**0.90%**
0.005%	6.0E+09	8.0E+09	8.9E+09	***9.3E+09***	7.8E+09	6.9E+09
0.010%	6.1E+09	8.1E+09	9.0E+09	***9.4E+09***	8.3E+09	7.4E+09
0.015%	6.3E+09	8.2E+09	***9.3E+09***	***9.4E+09***	***9.3E+09***	8.2E+09
0.020%	6.3E+09	8.2E+09	***9.3E+09***	***9.4E+09***	***9.1E+09***	8.0E+09
0.025%	6.4E+09	8.4E+09	***9.4E+09***	***9.5E+09***	***9.5E+09***	7.9E+09

[0122] 실험결과, 표 8에서 보는 바와 같이 대두분리단백을 0.45% 이상, 단백질 분해 효소는 0.015% 이상 사용하여야 우수한 배양성을 확보할 수 있었다. 대두분리단백 농도를 계속 증가시켜 일정 수준 이후에서는 효소 분해되지 않은 비율이 증가할수록 배양성은 오히려 약간 하락하는 경향을 보였다. 이러한 결과는 도 2의 현미경 사진에서도 알 수 있는 바와 같이, 분해되지 않은 반수용성 펩티드(peptide)량 증가에 의해 배양액의 소수성이 높아져 유산균이 뭉쳐 균의 분열을 원활하지 않게 한 것 때문으로 추정되었다.

[0124] 2-3: 탈지분유와 대두분리단백 혼합 농도별 가수분해율에 따른 배양성 실험

[0125] 실시예 1에서 확보된 탈지분유 및 대두분리단백 혼합물의 가수분해 용해액에 결정과당 36kg, 효모추출물 36kg, 제이인산칼륨 2.4kg, 초산나트륨 6kg, 황산마그네슘 1.2kg, 황산망간 6g, L-시스테인염산염 1.2kg, L-아스코르빈산 1.2kg, 폴리소르베이트-80 2.4kg, 정제염 7.2kg을 용해시키고 최종액량을 1,200L로 하여 열교환기(Alfalaval, 스웨덴)를 이용해 온도 130℃, 유량 1,850ℓ/h 조건으로 살균하고 1.2KL 용량의 혐기적 발효관으로 이송하여 Lactobacillus acidophilus CBT LA1 종균 5L를 접종한 후 암모니아로 pH 5.5을 유지하면서 20시간 발효하였다. 발효 후 탈지분유, 대두분리단백 농도별 가수분해율에 따른 유산균의 배양성을 확인하였다. 유산균의 배양성 측정은 희석수 9 mℓ에 배양액 1 mℓ을 취하여 vortexing을 실시한 후 10진 희석법으로 생균수를 분석하였다. 측정 결과는 표 9에 나타내었다.

표 9

[0126]

탈지분유(skim milk)와 대두분리단백(ISP) 혼합농도별 가수분해율에 따른 Lactobacillus acidophilus CBT LA1(KCTC 11906BP) 배양성 측정 결과				
Skim/ISP	**0.10%**	**0.20%**	**0.30%**	**0.40%**
0.5%	5.9E+09	6.1E+09	6.4E+09	6.3E+09
1.0%	6.2E+09	6.3E+09	7.2E+09	6.8E+09
1.5%	6.4E+09	7.0E+09	***8.2E+09***	7.2E+09
2.0%	6.8E+10	7.1E+09	***8.1E+09***	6.8E+09

[0127] 실험결과, 표 9에서 보여지는 바와 같이 탈지분유는 1.5% 이상, 대두분리단백은 0.3%수준 이상 혼합 사용하여야 우수한 배양성을 확보할 수 있었다. 혼합 농도를 계속 증가시켜 일정 수준이후에 도달해서는 배양성이 오히려 감소하는 경향을 보였다. 이러한 결과는 도 3의 현미경 사진에서도 알 수 있는 바와 같이 분해되지 않은 반수용성 펩티드(peptide)량 증가에 의해 배양액성의 소수성이 높아져 균이 뭉쳐 균의 분열을 원활하지 않게 한 것 때문으로 추정되었다.

[0129] **실시예 3: 단백질 가수분해율에 따른 동결건조 생존율 측정**

[0131] 3-1: 탈지분유 농도별 가수분해율에 따른 동결건조 생존율 실험

[0132] 실시예 2-1에서 확보한 발효액을 4.0ℓ/min 유속으로 튜블러 타입(Tubular Type)의 고속원심분리기(RPM 15,000 이상, G-force 13,200이상)를 이용해 균체와 잔존 단백질 성분을 침적시켜 코팅하면서 회수하였다. 트레할로스 3kg, 말토덱스트린 1kg, 만니톨 1kg, 탈지분유 1kg으로 조성된 동결보호제 수용액 10L를 가압 살균하여 제조하고, 잔탄검(Xantan gum) 20g, 셀룰로오스(Cellulose) 20g을 용해시킨 다당류 수용액 10L를 가압 살균하여 제조하였다. 이어서, 회수균체와, 상기 제조한 동결보호제 수용액 및 다당류 수용액을 휘퍼가 장착된 버티칼 혼합기에서 200 RPM으로 교반하여 균질화 시키고 -40℃의 예비동결고에서 급속동결한 후, 동결건조기 선반온도를 0℃

부터 2시간 단위 10℃씩 단계적 승온을 거쳐 최종적으로 37℃ 조건에서 동결건조하였다. 단백질 분해효소에 의한 가수분해과정에서 반수용성의 잔존 단백 성분은 균체를 포괄하여 단백질 코팅을 형성하였으며, 잔탄검(Xantan gum), 셀룰로오스(Cellulose) 다당류 성분은 균체 사이의 결합에 의해 매우 치밀한 구조를 지닌 균괴를 형성하였다. 이 때 반수용성의 펩티드량이 특정량에 비해 높을수록 균이 뭉치는 경향을 보이며 배양성이 저하되었고, 적정량의 반수용성 펩타이드는 동결건조과정에서 가해지는 열로부터 균체를 보호하여 우수한 동결생존율, 가속안정성, 내산성, 내담즙성을 나타내었다. 이에 따른 시험결과는 아래 표 10에 나타내었다.

표 10

[0133]

탈지분유, 단백질분해효소 농도별 가수분해율에 따른 Streptococcus thermophillus CBT ST3 (KCTC 11870BP) 동결건조 생존율 실험결과						
효소/Skim	**1.0%**	**2.0%**	**3.0%**	**4.0%**	**5.0%**	**6.0%**
0.001%	57.7%	72.9%	63.8%	60.3%	59.0%	58.1%
0.002%	56.2%	73.4%	65.6%	62.9%	59.6%	58.8%
0.003%	55.9%	***81.5%***	67.1%	64.4%	60.7%	59.6%
0.004%	54.5%	71.5%	68.6%	67.0%	64.3%	61.1%
0.005%	53.1%	69.0%	70.3%	67.7%	65.2%	63.9%

[0134] * 동결건조 생존율(%): 동결건조 전/후의 생균수와 중량을 고려해 동결건조 공정 후의 생존율을 확인하였다.

[0135] [동결건조 후 1g 당 생균수 x 동결건조 후 중량(g)]/[동결건조 전 1g 당 생균수 x 동결건조 전 중량(g)] x 100%

[0136] 상기 표 10에서 보여지는 바와 같이 탈지분유 2%, 단백질분해효소 0.003% 수준에서 가장 우수한 동결건조 생존율(81.5%)을 나타냈다. 탈지분유 농도가 증가할수록 가수분해율은 감소하고 동결건조생존율은 하락하는 경향을 나타낸다. 일정 수준의 분해되지 않은 반수용성 펩티드는 세포에 가해지는 물리적 요인에 의한 단백질 변성을 감소시키고 동결건조 생존율을 향상시키는 것으로 확인되었다. 배양성 및 동결건조 생존율을 확인한 결과 탈지분유 2.0% 및 효소 0.003% 처리시에 배양성과 동결건조 생존율이 모두 우수하였다.

[0138] 3-2: 대두분리단백 농도별 가수분해율에 따른 동결건조 생존율 실험

[0139] 실시예 3-1에서 설명된 실험 방법에 따라, 실시예 2-2에서 확보한 발효액을 사용하여 대두분리단백 농도별 가수분해율에 따른 동결건조 생존율 실험을 행한 결과를 아래 표 11에 나타내었다.

표 11

[0140]

대두분리단백과 단백질분해효소 농도별 가수분해율에 따른 Bifidobacterium breve CBT BR3(KCTC 12201BP) 동결건조 생존율 실험결과						
효소/ISP	**0.15%**	**0.30%**	**0.45%**	**0.60%**	**0.75%**	**0.90%**
0.005%	55.3%	64.9%	77.1%	63.2%	60.4%	58.6%
0.010%	57.9%	67.1%	78.9%	69.7%	63.2%	61.1%
0.015%	62.3%	68.1%	***85.2%***	70.4%	67.6%	64.8%
0.020%	65.9%	69.6%	76.1%	69.6%	65.8%	63.1%
0.025%	69.4%	70.1%	75.4%	68.4%	64.1%	61.1%

[0141] * 동결건조 생존율(%): 동결건조 전/후의 생균수와 중량을 고려해 동결건조 공정 후의 생존율을 확인하였다.

[0142] [동결건조 후 1g당 생균수 x 동결건조 후 중량(g)] / [동결건조 전 1g당 생균수 x 동결건조 전 중량(g)] x 100%

[0143] 상기 표 11에서 보여지는 바와 같이, 대두분리단백 0.45% 및 단백질분해 효소 0.015% 수준에서 우수한 동결건조 생존율(85.2%)을 확보할 수 있었다. 대두분리단백 농도가 증가할 수록 가수분해율은 감소하고, 동결건조생존율은 하락하는 경향을 나타내었다. 일정 수준의 분해되지 않은 반수용성 펩티드는 세포에 가해지는 물리적 요인에 의한 단백질 변성을 감소시키고, 동결건조 생존율은 향상시켰다. 배양성 및 동결건조 생존율을 확인한 결과, 대두분리단백 0.45% 및 효소 0.015% 처리 시에 배양성과 동결건조 생존율이 모두 우수하였다.

[0145] 3-3: 탈지분유 및 대두분리단백 농도별 가수분해율에 따른 동결건조 생존율 실험

[0146] 실시예 3-1에서 설명된 실험 방법에 따라, 상기 실시예 2-3에서 확보한 발효액을 사용하여 탈지분유 및 대두분리단백 농도별 가수분해율에 따른 동결건조 생존율 실험을 행한 결과는 아래 표 12에 나타내었다.

표 12

[0147]

탈지분유 및 대두분리단백 농도별 가수분해율에 따른 Lactobacillus acidophilus CBT LA1 (KCTC 11906BP) 동결건조 생존율				
Skim/ISP	**0.10%**	**0.20%**	**0.30%**	**0.40%**
0.5%	57.7%	59.9%	66.2%	62.9%
1.0%	63.8%	65.3%	71.6%	67.6%
1.5%	70.1%	73.0%	***83.1%***	70.3%
2.0%	68.8%	70.1%	74.2%	68.6%

[0148] * 동결건조 생존율(%): 동결건조 전/후의 생균수와 중량을 고려해 동결건조 공정 후의 생존율을 확인하였다.

[0149] [동결건조 후 1g당 생균수 x 동결건조 후 중량(g)] / [동결건조 전 1g당 생균수 x 동결건조 전 중량(g)] x 100%

[0150] 상기 표 12에서 나타난 바와 같이, 탈지분유 1.5%, 대두분리단백 0.3% 혼합사용시 우수한 동결건조 생존율(83.1%)을 확보할 수 있었다. 혼합 농도가 증가할수록 가수분해율이 감소하고, 동결건조생존율은 하락하는 경향을 나타내었다. 일정 수준의 분해되지 않은 반수용성 펩티드(peptide)는 세포에 가해지는 물리적 요인에 의한 단백질 변성을 감소시키고, 동결건조 생존율은 향상시킨다. 배양성 및 동결건조 생존율을 확인한 결과 탈지분유 및 대두분리단백 혼합물을 각각 1.5%, 0.3% 처리시에 배양성과 동결건조 생존율이 모두 우수하였다.

[0152] **실시예 4: 이중코팅에 의한 가속안정성, 내산성, 내담즙성 실험**

[0153] 유산균을 코팅하지 않은 경우, 단백질 코팅만 행한 경우, 이중코팅한 경우에 가속안정성, 내산성 및 내담즙성 실험을 행하였다. 그 결과는 하기 표 13에 기재하였다.

표 13

[0154]

비코팅, 단백질코팅, 다당류코팅에 따른 가속안정성, 내산성, 내담즙성 실험결과								
균주	CBT ST3				CBT BR3			
단백질 가수분해조건	사용치 않음		Skim Milk 2% + 효소 0.003%		사용치 않음		ISP 0.45% + 효소 0.015%	
단백질 코팅	X	X	○	○	X	X	○	○
다당류코팅 (이중 코팅)	X	CMC-Na, XG	X	CMC-Na, XG	X	CMC-Na, XG	X	CMC-Na, XG
가속안정성	19.2%	38.3%	54.2%	***85.2%***	12.5%	33.2%	44.1%	***65.2%***
내산성	35.2%	52.8%	70.0%	***90.7%***	23.6%	51.2%	69.5%	***88.6%***
내담즙성	30.7%	50.5%	70.7%	***91.6%***	26.6%	51.8%	56.8%	***83.1%***

[0155] * CMC-Na: 셀룰로오스,

[0156] * XG: 잔탄검

[0157] * 가속안정성: 희석수 9 ㎖에 시료 1g을 취하여 vortexing을 실시한 후 10진 희석법으로 초기 생균수를 분석하였다. 추가적으로 시료를 40℃에 배양한 후 1주 단위로 4주까지 생균수 분석을 하며, 초기 생균수 대비 생존율을 확인하였다.

[0158] * 내산성: 1M HCl 용액으로 보정한 pH 2.1 MRS broth 용액 9.9ml에 각각의 시료 0.1g을 용해한 후, 37℃ 온도를 유지하며 0시간, 2시간째 생균수 분석하여 0시간 대비 생존율을 확인하였다.

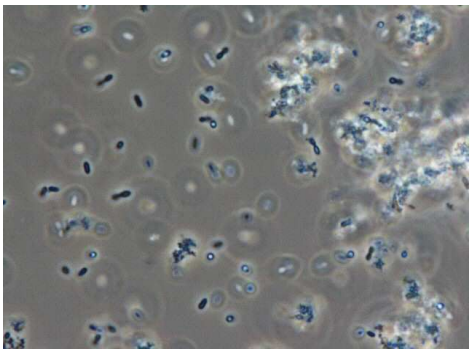
[0159] * 내담즙성: 0.5% oxgall이 첨가된 MRS broth 용액 9.9ml에 각각의 시료 0.1g을 용해한 후, 37℃ 온도를 유지하며 0시간, 2시간째 생균수 분석하여 0시간 대비 생존율을 확인하였다.

[0160] 비코팅, 단백질코팅, 이중코팅 비교 분석 결과, 이중코팅 된 유산균이 비코팅, 단일(단백질)코팅 유산균에 비하여 우수한 가속안정성, 내산성, 내담즙성을 확보할 수 있었다. 세포에 가해지는 물리적 요인에 의한 사멸율이 낮고 유산균 생리활성 기능을 소실하지 않을 수 있으므로 가속안정성, 내산성, 내담즙성을 향상시킨다.

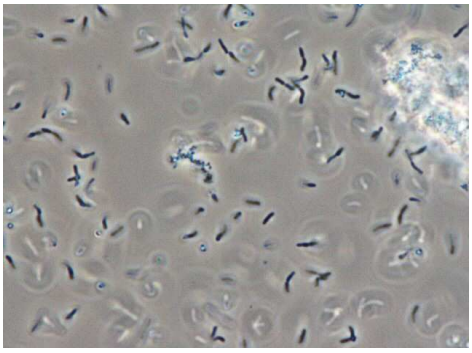
[0162] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

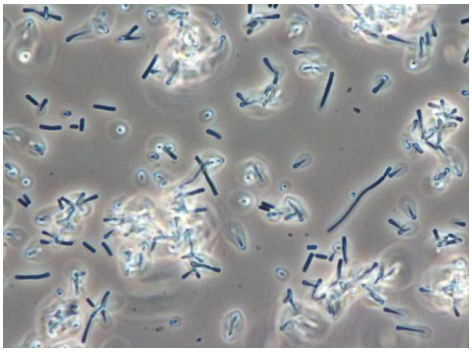
도면1



도면2

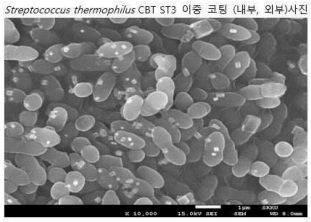


도면3

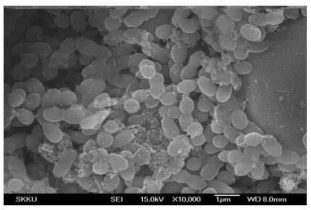


도면4

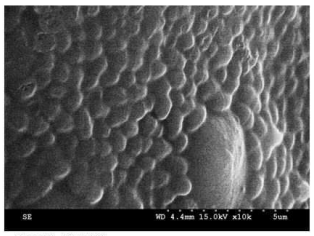
Streptococcus thermophilus CBT ST3 이중 코팅 (내부, 외부)사진



x 10,000 배, 내부사진



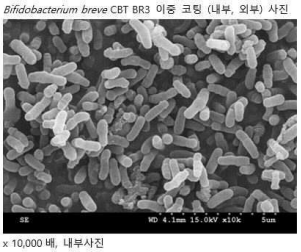
x 10,000 배 내부사진



x 10,000 배, 외부사진

도면5

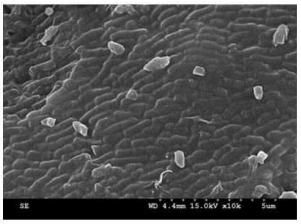
Bifidobacterium breve CBT BR3 이중 코팅 (내부, 외부) 사진



x 10,000 배, 내부사진



x 10,000 배 내부사진



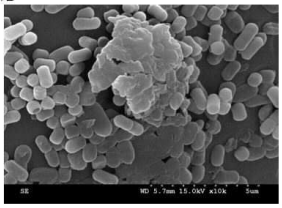
x 10,000 배, 외부사진

도면6

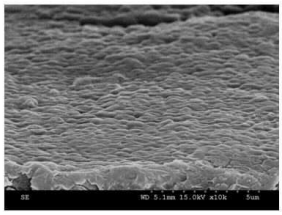
Lactobacillus acidophillus CBT ST3 비코팅 및 이중 코팅 사진



X 10,000배 (비코팅)



X 10,000배 (코팅, 내부)



X 10,000배 (코팅, 외부)