

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6876705号
(P6876705)

(45) 発行日 令和3年5月26日(2021.5.26)

(24) 登録日 令和3年4月28日(2021.4.28)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 1/20 (2006.01)
C 08 L 5/00 (2006.01)
A 23 L 33/135 (2016.01)

C 12 N 1/20
C 12 N 1/20
C 08 L 5/00
A 23 L 33/135

C
A

請求項の数 13 (全 39 頁)

(21) 出願番号 特願2018-533599 (P2018-533599)
 (86) (22) 出願日 平成28年9月19日 (2016.9.19)
 (65) 公表番号 特表2018-532034 (P2018-532034A)
 (43) 公表日 平成30年11月1日 (2018.11.1)
 (86) 國際出願番号 PCT/KR2016/010415
 (87) 國際公開番号 WO2017/048098
 (87) 國際公開日 平成29年3月23日 (2017.3.23)
 審査請求日 平成31年4月16日 (2019.4.16)
 (31) 優先権主張番号 10-2015-0129986
 (32) 優先日 平成27年9月14日 (2015.9.14)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
韓国(KR)

(73) 特許権者 518067342
イルドン ファーマスティカル カンパニー リミテッド
大韓民国 06752 ソウル ソチヨード 27-ギル ボモ-ロ 2 (イルドン ファーマスティカル カンパニー リミテッド、ヤンジェードン)
 (74) 代理人 110002354
特許業務法人平和国際特許事務所
 (72) 発明者 リ、スン-フン
大韓民国 16959 キョンギード ヨンイン-シ キフング 116ボン-ギル キフン-ロ 7 101-1403
(セレウンゴル プンリム アパート、シンガルードン)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】機能性水和ヒアルロン酸及びこれを利用した優れた腸粘膜付着能及び選択的拮抗作用を有するコーキング乳酸菌の製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

間欠滅菌された乳酸菌培養液100重量部に対してヒアルロン酸を0.001重量部～1重量部の割合で添加し、攪拌し、溶解した後、濃縮する方法により製造された乳酸菌発酵物質が捕集された、機能性水和ヒアルロン酸であって、前記乳酸菌発酵物質が有害細菌付着抑制物質を含み、前記有害細菌付着抑制物質がリポタコ酸及びペプチドグリカンからなる群から選択されることを特徴とする、前記機能性水和ヒアルロン酸。

【請求項2】

前記間欠滅菌された乳酸菌培養液は、以下の手順によって製造されることを特徴とする
請求項1記載の機能性水和ヒアルロン酸：

10

- (a) 乳酸菌培養液を110～135℃で3～7分間加圧熱処理する段階；
- (b) 前記(a)段階で加圧熱処理された培養液を25～35℃に冷却する段階；
- (c) 前記(b)段階で冷却された培養液を105～115℃で8～12分間加圧熱処理する段階；
- (d) 前記(c)段階で加圧熱処理された培養液を25～35℃に冷却する段階；
- (e) 上記(d)段階で冷却された培養液を75～85℃で20～40分間熱処理した後、25～35℃に最終冷却する段階。

【請求項3】

前記乳酸菌はラクトバチルス属(Lactobacillus sp.)、ビフィドバクテリウム属(Bifidobacterium sp.)、ストレプトコッカス属(Streptococcus sp.)、ラクトコッカス属

20

(*Lactococcus* sp.)、エンテロコッカス属 (*Enterococcus* sp.)、ペディオコッカス属 (*Pediococcus* sp.)、リューコノストック属 (*Leuconostoc* sp.)、ワイセラ属 (*Weissella* sp.) からなる群より選ばれた一つ以上の乳酸菌であることを特徴とする請求項1又は2記載の機能性水和ヒアルロン酸。

【請求項4】

請求項1又は2記載の機能性水和ヒアルロン酸でコーティングされた乳酸菌。

【請求項5】

(a) 乳酸菌に水溶性ポリマーを混合して1次コーティングする段階；
 (b) 前記(a)段階で1次コーティングされた乳酸菌に請求項1記載の機能性水和ヒアルロン酸を混合して、2次コーティングする段階であって、前記乳酸菌発酵物質が有害細菌付着抑制物質を含み、前記付着抑制物質がリポタイコ酸及びペプチドグリカンからなる群から選択されることを特徴とする段階；
 (c) 前記(b)段階で2次コーティングされた乳酸菌に多孔性粒子を有するコーティング剤を混合して3次コーティングする段階；及び

(d) 前記(c)段階で3次コーティングされた乳酸菌にタンパク質を混合して、4次コーティングする段階を含むことを特徴とする四重コーティングされた乳酸菌の製造方法。 10

【請求項6】

前記(a)段階で水溶性ポリマーは、カルボキシメチルセルロース (carboxymethyl cellulose、CMC)、ヒドロキシエチルセルロース (hydroxyethylcellulose、HEC)、キサンタンガム (xanthan gum、XG)、グアーガム (guar gum、GG)、ポリビニルピロリドン (polyvinylpyrrolidone、PVP)、カーボポール (carbopol (登録商標))、アルギン酸ナトリウム (sodium alginate)、アルギン酸プロピレングリコール (propylene glycol alginate) からなる群より選ばれた一つ以上であることを特徴とする、請求項5記載の四重コーティングされた乳酸菌の製造方法。 20

【請求項7】

前記(b)段階で機能性水和ヒアルロン酸は、間欠滅菌された乳酸菌培養液100重量部に対してヒアルロン酸を0.001重量部～1重量部の割合で添加して攪拌して溶解した後、30～60で減圧濃縮する方法により製造された乳酸菌発酵物質が捕集されたことを特徴とする、請求項5記載の四重コーティングされた乳酸菌の製造方法。 30

【請求項8】

前記(c)段階で多孔性粒子を有するコーティング剤は、アルギン酸 (alginate)、マルトデキストリン (maltodextrin、MD)、キトサン (chitosan)、でん粉 (starch)、ポリエチレングリコール (polyethyleneglycol、PEG)、トリアセチン (triacetin)、プロピレングリコール (propylene glycol)、クエン酸アセチルトリエチル (acetyl triethyl citrate)、クエン酸トリエチル (triethyl citrate)、又はグリセリン (glycerin) からなる群より選ばれた一つ以上であることを特徴とする、請求項5記載の四重コーティングされた乳酸菌の製造方法。 30

【請求項9】

前記(d)段階でタンパク質は脱脂粉乳、乳清タンパク質、分離大豆タンパク質からなる群より選ばれた一つ以上であることを特徴とする、請求項5記載の四重コーティングされた乳酸菌の製造方法。 40

【請求項10】

前記乳酸菌はラクトバチルス属 (*Lactobacillus* sp.)、ビフィドバクテリウム属 (*Bifidobacterium* sp.)、ストレプトコッカス属 (*Streptococcus* sp.)、ラクトコッカス属 (*Lactococcus* sp.)、エンテロコッカス属 (*Enterococcus* sp.)、ペディオコッカス属 (*Pediococcus* sp.)、リューコノストック属 (*Leuconostoc* sp.)、ワイセラ属 (*Weissella* sp.) からなる群より選ばれた一つ以上であることを特徴とする、請求項5記載の四重コーティングされた乳酸菌の製造方法。

【請求項11】

前記(a)段階において、前記水溶性ポリマーは乳酸菌培養液100重量部に対して0.1重

50

量部～10重量部の割合で混合して1次コーティングする段階；

前記(b)段階において、前記ヒアルロン酸は間欠滅菌された乳酸菌培養液100重量部に対して0.001重量部～0.5重量部の割合で混合して2次コーティングする段階；

前記(c)段階において、前記多孔性粒子を有するコーティング剤は乳酸菌培養液100重量部に対して0.1重量部～10重量部の割合で混合して3次コーティングする段階；及び

前記(d)段階において、前記タンパク質は乳酸菌培養液100重量部に対して1重量部～30重量部の割合で混合して4次コーティングする段階を含むことを特徴とする、請求項5記載の四重コーティングされた乳酸菌の製造方法。

【請求項12】

請求項5記載の製造方法で製造された四重コーティングされた乳酸菌。 10

【請求項13】

前記乳酸菌はラクトバチルス属(*Lactobacillus* sp.)、ビフィドバクテリウム属(*Bifidobacterium* sp.)、ストレプトコッカス属(*Streptococcus* sp.)、ラクトコッカス属(*Lactococcus* sp.)、エンテロコッカス属(*Enterococcus* sp.)、ペディオコッカス属(*Pediococcus* sp.)、リューコノストック属(*Leuconostoc* sp.)、ワイセラ属(*Weissella* sp.)からなる群より選ばれた一つ以上であることを特徴とする、請求項12記載の四重コーティングされた乳酸菌。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】 20

【0001】

本発明は、機能性水和ヒアルロン酸及びこれを利用した優れた腸粘膜付着能及び選択的拮抗作用を有するコーティング乳酸菌の製造方法に関するもので、より詳細には、本発明は、乳酸菌発酵成分が天然高分子物質であるヒアルロン酸に捕集された“機能性水和ヒアルロン酸”、及びこれをを利用してコーティング乳酸菌を製造する方法、特に水溶性ポリマー、機能性水和ヒアルロン酸、多孔性粒子を有するコーティング剤及びタンパク質でコーティングされた、優れた腸粘膜付着能及び選択的拮抗作用を有する機能性コーティング乳酸菌を製造する方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】 30

本出願は、2015年9月14日に出願された韓国特許出願第10-2015-0129986号に基づく優先権を主張し、前記明細書全体は参照により本出願に援用する。

【0003】

人体の腸内には*Bacteroides*、*Eubacteria*、*Bifidobacteria*、*Lactobacilli*等400種以上の微生物が棲息している。健康な人の腸には乳酸菌に代表される有益菌と有害菌が均衡を成して棲息している(microflora)が、有害な環境、非衛生的な食品摂取、抗生剤服用等で腸内細菌叢が攪乱されると、乳酸菌は減少して、大腸菌、サルモネラのような有害菌が増加するようになる。

【0004】

プロバイオティクスは、ヒトや動物の胃腸管に棲息しながらヒトや動物に有益な効果を示す微生物製剤であり、*Lactobacilli*、*Bifidobacteria*、*Enterococci*等がこれに属する。

【0005】

乳酸菌の腸内生理活性機能には、腸内細菌叢の均衡維持、有害細菌の増殖抑制、下痢予防、腸内上皮細胞の保護、毒性物質の吸収阻害、発癌抑制等がある。乳酸菌がプロバイオティクスとして作用するには、腸の粘膜細胞に結合し、増殖し、有害細菌に対する拮抗力を有しなければならない。

【0006】

乳酸菌が宿主の腸粘膜に付着するには、宿主の常在菌叢との競争を介して付着しなければならない。NurmiとRantalaは、有害微生物の競争的排除を初めて導入し、孵化したばかり

りのヒヨコに鶏の腸内容物を接種した結果、サルモネラ感染が減少したと報告した。鶏の正常腸内微生物は、腸壁表面細胞の吸着部分にさらによく付着し、脂肪酸や他の抗菌性物質を生産し、栄養素のための競争等で有利であると報告した。

【0007】

乳酸菌は宿主の腸粘膜に吸着する特性があり、これは、乳酸菌の細胞壁構成成分であるリポタイコ酸、多糖類、タンパク質等が腸粘膜付着に関与するためと知られている。

【0008】

乳酸菌の細胞構造は、細胞膜とそれを取り囲む細胞壁で構成される。細胞壁は機能的に乳酸菌の形を示し、細胞膜を取り囲んで外部環境から乳酸菌を保護する。細胞壁の4つの重要な成分には、ペプチドグリカン (peptidoglycan)、タイコ酸 (teichoic acid)、S層、多糖類があり、腸粘膜の細胞外マトリックス (ECM)との結合に関与する。ECMは、上皮細胞と内皮細胞の根幹となる安定した巨大分子組織である。乳酸菌は、腸粘膜の樹状細胞 (dendritic cell、DC) と結合した後、整腸作用をはじめとする様々な細胞シグナルを伝達して免疫疾患等を予防する。

【0009】

乳酸菌が競争的排除を介して腸粘膜に円滑に付着すると、腸内で他の微生物に影響を与える様々な物質を生産し、このうち、乳酸は腸内容物を酸性化させて他の微生物の生存を抑制する。

【0010】

一般的に、乳酸菌が腸内で整腸作用を発揮するためには、有害菌である大腸菌やサルモネラ等より腸粘膜との結合力が優れていなければならないが、グラム陽性細菌に分類される乳酸菌は、グラム陰性細菌である大腸菌とサルモネラよりも、相対的に腸粘膜との結合力が落ちる。また、乳酸菌も分離源によって付着能が異なる。また、*Lactobacillus*属の乳酸菌は小腸粘膜と付着親和力が相対的に優れ、*Bifidobacterium*属のプロバイオティクス菌は大腸粘膜との親和力が優れている。さらに、植物由来のプロバイオティクスは、植物体の表面に付着して共生して進化してきたため、動物の腸粘膜への付着効率は低下している。

20

【0011】

一方、従来の乳酸菌のコーティング技術は、1世代から4世代まで、胃腸管通過時の生存率によって区分されてきた。第1世代は非コーティング乳酸菌、2世代は腸用コーティング乳酸菌、3世代はマイクロカプセル化乳酸菌、4世代の乳酸菌はタンパク質コーティング乳酸菌であって、胃腸管通過の際、どれほど多数の乳酸菌が腸に到達するかに焦点を合せた。また、5世代のコーティング技術と言われるヒアルロン酸をベースにした四重コーティング乳酸菌は（特許文献1）、従来の单一～三重コーティング乳酸菌と比べて耐熱性、耐酸性及び耐胆汁性が著しく向上しており、乳酸菌の生存率に大きく寄与した。

30

【0012】

ヒアルロン酸をベースにした従来の四重コーティング乳酸菌の製造技術は、天然高分子のヒアルロン酸をコーティング剤として使用して、従来の单一～三重コーティング乳酸菌と比べて耐熱性、耐酸性及び耐胆汁性等が著しく改善されたものの、腸粘膜付着効率、定着時間、グラム陰性病原性菌株を競争的に排除する効果においては依然として限界があった。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0013】

【特許文献1】韓国登録特許第10-1280232号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

そこで、本発明者らは、前記従来の乳酸菌コーティング技術が有している限界を克服して、腸粘膜付着効率、腸粘膜内定着時間、腸内有害菌に対する競争的抑制効果が著しく向

50

上した乳酸菌のコーティング技術を開発するために研究を重ねた。その結果、乳酸菌発酵成分が天然高分子物質のヒアルロン酸に捕集された“機能性水和ヒアルロン酸”を開発して、前記機能性水和ヒアルロン酸が有害菌に対しては増殖抑制作用、有益菌に対しては増殖促進作用を示すことを確認して、目的とする効果を発揮する乳酸菌コーティング剤として使用できることに着目して本発明を完成した。

【0015】

従って、本発明の目的は、乳酸菌培養液100重量部に対してヒアルロン酸を0.001重量部～1重量部の割合で添加して攪拌溶解した後、30～60℃で減圧濃縮する方法により製造された、乳酸菌発酵物質が捕集された機能性水和ヒアルロン酸を提供することである。

【0016】

本発明の他の目的は、前記機能性水和ヒアルロン酸でコーティングされた乳酸菌を提供することである。

【0017】

本発明の他の目的は、(a)乳酸菌に水溶性ポリマーを混合して1次コーティングする段階；(b)前記(a)段階で1次コーティングされた乳酸菌に機能性水和ヒアルロン酸を混合して2次コーティングする段階；(c)前記(b)段階で2次コーティングされた乳酸菌に多孔性粒子を有するコーティング剤を混合して3次コーティングする段階；及び(d)前記(c)段階で3次コーティングされた乳酸菌にタンパク質を混合して、4次コーティングする段階を含むことを特徴とする、四重コーティングされた乳酸菌の製造方法を提供することである。

【0018】

本発明の他の目的は、前記の四重コーティングされた乳酸菌の製造方法により製造された、四重コーティングされた乳酸菌を提供することである。

【0019】

[技術的解決方法]

前記の目的を達成するために、本発明は乳酸菌培養液100重量部に対してヒアルロン酸を0.001重量部～1重量部の割合で添加して、攪拌して溶解した後、30～60℃で減圧濃縮する方法により製造された、乳酸菌発酵物質が捕集された機能性水和ヒアルロン酸を提供する。

【0020】

本発明の他の目的を達成するために、機能性水和ヒアルロン酸でコーティングされた乳酸菌を提供する。

【0021】

本発明の他の目的を達成するために、(a)乳酸菌に水溶性ポリマーを混合して1次コーティングする段階；(b)前記(a)段階で1次コーティングされた乳酸菌に機能性水和ヒアルロン酸を混合して2次コーティングする段階；(c)前記(b)段階で2次コーティングされた乳酸菌に多孔性粒子を有するコーティング剤を混合して3次コーティングする段階；及び(d)前記(c)段階で3次コーティングされた乳酸菌にタンパク質を混合して、4次コーティングする段階を含むことを特徴とする、四重コーティングされた乳酸菌の製造方法を提供する。

【0022】

本発明の他の目的を達成するために、本発明は、前記四重コーティングされた乳酸菌の製造方法により製造された、四重コーティングされた乳酸菌を提供する。

【0023】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0024】

本発明は、乳酸菌培養液100重量部に対してヒアルロン酸を0.001重量部～1重量部の割合で添加して、攪拌して溶解した後、濃縮する方法により製造された、乳酸菌発酵物質が捕集された機能性水和ヒアルロン酸を提供する。

【0025】

10

20

30

40

50

本発明において、前記機能性水和ヒアルロン酸とは、乳酸菌培養液をヒアルロン酸に捕集させたもので、腸内有害菌に対しては生育抑制作用を示し、有益菌に対しては何等の影響も与えないか、又はこれの増殖を手助けする成分を捕集しているヒアルロン酸を意味する。

【0026】

一方、本発明者らは、腸内細菌叢の内、有益菌に分類される細菌の代表的菌株は乳酸菌であるため、乳酸菌には影響を及ぼさないか、又は乳酸菌の増殖に役立つ成分を抽出するために、乳酸菌発酵物の利用を試み、これをヒアルロン酸に捕集させることによって、目的とする効果を示すコーティング剤の開発を試みた。

【0027】

つまり、細胞構造物に含まれている代表成分であるリポタイコ酸 (lipoteichoic acid) 、ペプチドグリカン (peptidoglycan) 等の有害細菌付着阻害物質、及び、有害細菌の増殖を抑制して、有益菌の生育を促進させる乳酸菌発酵産物を、ヒアルロン酸に捕集させて、機能性水和ヒアルロン酸を製作した。

【0028】

具体的には、本発明において、前記機能性水和ヒアルロン酸は、乳酸菌培養液100重量部に対してヒアルロン酸を0.001重量部～1重量部の割合で添加して、攪拌して溶解した後、30～60℃で減圧濃縮する方法により製造することができる。より好ましくは、乳酸菌培養液100重量部に対してヒアルロン酸0.001重量部～0.5重量部で混合して、最も好ましくは0.001重量部～0.25重量部で混合して製造する。前記のような方法により、乳酸菌発酵物質がヒアルロン酸に捕集されて腸内の有害細菌に対しては抗菌作用を示すと同時に、有益菌に対しては増殖促進作用を示す。特に乳酸菌培養液は加圧及び間欠滅菌 (tyndallization) することにより、乳酸菌又はその培養物に含まれている代表成分のリポタイコ酸 (lipoteichoic acid) 、ペプチドグリカン (peptidoglycan) 等の有害細菌付着阻害物質及び有害細菌の増殖を抑制して有益菌の生育を促進させる効果を示す。

【0029】

一方、本発明において、前記乳酸菌培養液は、間欠滅菌されたものでもあって、好ましくは、前記乳酸菌培養液は、以下の段階により製造することができる：

- (a) 乳酸菌培養液を110～135℃で3～7分間、加圧熱処理する段階；
- (b) 前記(a)段階で加圧熱処理された培養液を25～35℃に冷却する段階；
- (c) 前記(b)段階で冷却された培養液を105～115℃で8～12分間加圧熱処理する段階；
- (d) 前記(c)段階で加圧熱処理された培養液を25～35℃に冷却する段階；
- (e) 前記(d)段階で冷却された培養液を75～85℃で20～40分間熱処理した後、25～35℃に最終冷却する段階。

【0030】

機能性水和ヒアルロン酸を製造するための、前記乳酸菌は、抗菌成分の発酵物を生産する乳酸菌であって、ラクトバチルス属、ビフィドバクテリウム属、ストレプトコッカス属、ラクトコッカス属、エンテロコッカス属、ペディオコッカス属、リューコノストック属、ワイセラ属からなる群より選ばれた一つ以上の乳酸菌であり、好ましくは *Lactobacillus acidophilus* IDCC 3302、*Lactobacillus bulgaricus*、*Lactobacillus casei*、*Lactobacillus fermentum*、*Lactobacillus gasseri*、*Lactobacillus helveticus*、*Lactobacillus rhamnosus*、*Lactobacillus johnsonii*、*Lactobacillus paracasei*、*Lactobacillus plantarum*、*Lactobacillus reuteri*、*Lactobacillus salivarius*、*Bifidobacterium bifidum*、*Bifidobacterium breve*、*Bifidobacterium infantis*、*Bifidobacterium lactis*、*Bifidobacterium longum*、*Enterococcus faecium*、*Enterococcus faecalis*、*Streptococcus faecium*、*Streptococcus faecalis*、*Streptococcus thermophilus*、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*、*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*、*Pediococcus acidolacticii*、*Pediococcus pentosaceus*、*Leuconostoc carnosum*、*Leuconostoc citreum*、*Leuconostoc gasimenti*、*Leuconostoc gelidum*、*Leuconostoc inhae*、*Leuconostoc kimchii*、*Leuconost*

10

20

30

40

50

oc lactis、*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*、*Leuconostoc parmesenteroides*、*Weissella cibaria*、*Weissella confusa*、*Weissella koreensis*、*Weissella soli*、*Weissella viridescens*からなる群より選ばれた一つ以上の乳酸菌、より好ましくは*Lactobacillus acidophilus* IDCC 3302でもあるが、これに限定されるものではない。

【0031】

本発明の一実施例によると、乳酸菌培養液が捕集された機能性水和ヒアルロン酸は、腸内有害細菌とみなすことができるサルモネラティフィミュリウムの腸粘膜付着能を阻害するばかりでなく、生育を阻害する効果を示すことが確認された（実施例2及び実施例3）。

【0032】

本発明の他の一実施例によると、本発明者らは、機能性水和ヒアルロン酸が腸内有益菌の成長に及ぼす影響を評価するために、乳酸桿菌、ビフィダス菌、乳酸球菌に代表されるラクトバチルスラムノサス、ビフィドバクテリウムロンゴム及びエンテロコッカスファシウムに機能性水和ヒアルロン酸を処理し、その結果、機能性水和ヒアルロン酸を処理した群から、それぞれの微生物の増殖が著しく促進されることを確認した（実施例4）。一方、本発明の前記一実施例によると、一般的なヒアルロン酸はこのような有害菌阻害効果及び有益菌増殖促進効果が示されないことが確認され、本発明に係る機能性水和ヒアルロン酸が乳酸菌発酵物質を捕集することにより、独特の機能的特性を示すことが分かった。

10

【0033】

前記のような実験結果を通じて、機能性水和ヒアルロン酸が腸内有益菌の増殖は促進しながら有害菌の成長は阻害できる選択的拮抗作用を示し、乳酸菌の腸粘膜付着能と付着時間を増大させるコーティング剤として使用できることが分かった。

20

【0034】

従って、本発明は前記機能性水和ヒアルロン酸でコーティングされた乳酸菌を提供する。

【0035】

本発明は、また、前記機能性水和ヒアルロン酸を利用して、優れた腸粘膜付着能及び選択的拮抗作用を有する四重コーティングされた乳酸菌の製造方法を提供する。具体的には、本発明の四重コーティング乳酸菌の製造方法は、

(a) 乳酸菌に水溶性ポリマーを混合して1次コーティングする段階；

(b) 前記(a)段階で1次コーティングされた乳酸菌に機能性水和ヒアルロン酸を混合して2次コーティングする段階；

30

(c) 前記(b)段階で2次コーティングされた乳酸菌に多孔性粒子を有するコーティング剤を混合して3次コーティングする段階；及び

(d) 前記(c)段階で3次コーティングされた乳酸菌にタンパク質を混合して、4次コーティングする段階を含むことを特徴とする。

【0036】

また、本発明の四重コーティングされた乳酸菌の製造方法は、

(a) 乳酸菌にカルボキシメチルセルロースを混合して1次コーティングする段階；

(b) 前記(a)段階で1次コーティングされた乳酸菌に機能性水和ヒアルロン酸を混合して2次コーティングする段階；

40

(c) 前記(b)段階で2次コーティングされた乳酸菌に多孔性粒子を有するコーティング剤を混合して3次コーティングする段階；及び

(d) 前記(c)段階で3次コーティングされた乳酸菌にタンパク質を混合して4次コーティングする段階を含むことを特徴とする。

【0037】

また、本発明の四重コーティングされた乳酸菌の製造方法は、

(a) 乳酸菌に水溶性ポリマーを混合して1次コーティングする段階；

(b) 前記(a)段階で1次コーティングされた乳酸菌に機能性水和ヒアルロン酸を混合して2次コーティングする段階；

(c) 前記(b)段階で2次コーティングされた乳酸菌に多孔性粒子を有するマルトデ

50

キストリンを混合して3次コーティングする段階；及び

(d) 前記(c)段階で3次コーティングされた乳酸菌にタンパク質を混合して4次コーティングする段階を含むことを特徴とする。

【0038】

また、本発明の四重コーティングされた乳酸菌の製造方法は、

(a) 乳酸菌に水溶性ポリマーを混合して1次コーティングする段階；

(b) 前記(a)段階で1次コーティングされた乳酸菌に機能性水和ヒアルロン酸を混合して2次コーティングする段階；

(c) 前記(b)段階で2次コーティングされた乳酸菌に多孔性粒子を有するコーティング剤を混合して3次コーティングする段階；及び

(d) 前記(c)段階で3次コーティングされた乳酸菌に乳清タンパク質を混合して、4次コーティングする段階を含むことを特徴とする。

【0039】

好ましくは、本発明の四重コーティングされた乳酸菌の製造方法は、

(a) 乳酸菌にカルボキシメチルセルロースを混合して1次コーティングする段階；

(b) 前記(a)段階で1次コーティングされた乳酸菌に機能性水和ヒアルロン酸を混合して2次コーティングする段階；

(c) 前記(b)段階で2次コーティングされた乳酸菌に多孔性粒子を有するマルトデキストリンを混合して3次コーティングする段階；及び

(d) 前記(c)段階で3次コーティングされた乳酸菌に乳清タンパク質を混合して4次コーティングする段階を含むことを特徴とする。

【0040】

(a) 乳酸菌の水溶性ポリマーを混合して1次コーティングする段階：

前記水溶性ポリマーは、乳酸菌の表面接着力を増大させるために、機能性水和ヒアルロン酸との架橋形成能を評価して選定した。具体的には、本発明の菌体薄膜コーティング剤として使用され、機能性水和ヒアルロン酸の架橋形成能が優れた水溶性ポリマーは、これに限定はされないが、カルボキシメチルセルロース (carboxymethyl cellulose、CMC)、ヒドロキシエチルセルロース (hydroxyethylcellulose、HEC)、キサンタンガム (xanthan gum、XG)、グーガム (guar gum、GG)、ポリビニルピロリドン (polyvinylpyrrolidone、PVP)、キトサン (chitosan)、アラビアガム (arabia gum)、カーボポール (carbopol)、アルギン酸ナトリウム (sodium alginate)、アルギン酸プロピレングリコール (propylene glycol alginate) からなる群より選ばれることが望ましい。好ましくは、カルボキシメチルセルロース (carboxymethyl cellulose、CMC)、ヒドロキシエチルセルロース (hydroxyethylcellulose、HEC)、キサンタンガム (xanthan gum、XG)、グーガム (guar gum、GG)、ポリビニルピロリドン (polyvinylpyrrolidone、PVP)、キトサン (chitosan)、アラビアガム (arabia gum)、カーボポール (carbopol) であり、さらに好ましくはカルボキシメチルセルロース (carboxymethyl cellulose、CMC)、ポリビニルピロリドン (polyvinylpyrrolidone、PVP)、キトサン (chitosan)、アラビアガム (arabia gum)、カーボポール (carbopol) であり、最も好ましくはカルボキシメチルセルロース (carboxymethyl cellulose、CMC) である。

【0041】

前記水溶性ポリマーは、乳酸菌培養液100重量部に対して0.1重量部～10重量部の割合で混合して1次コーティングする。具体的には、水溶性ポリマーの混合比率を例に挙げると、乳酸菌培養液100重量部に対して0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10.0でもあって、乳酸菌培養液100重

10

20

30

40

50

量部に対して0.1重量部～10重量部の範囲内であれば、前記の数値に限定されない。好ましくは、水溶性ポリマーを、乳酸菌培養液100重量部に対して0.1重量部～5重量部で混合して、最も好ましくは0.1重量部～0.5重量部で混合する。

【0042】

好ましくは、前記水溶性ポリマーとして、カルボキシメチルセルロースを、乳酸菌培養液100重量部に対して0.1重量部～10重量部の割合で混合して1次コーティングすることができる。具体的には、CMCの混合割合を例に挙げると、乳酸菌培養液100重量部比0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10.0でもあって、乳酸菌培養液100重量部に対して0.1重量部～10重量部の範囲内であれば前記の数値に制限されない。好ましくは、前記水溶性ポリマーとしてCMCを乳酸菌培養液100重量部に対してCMC 0.1重量部～5重量部で混合して、最も好ましくは0.1重量部～0.5重量部で混合する。

【0043】

本発明の一実施例では、カルボキシメチルセルロースが2次コーティング剤の機能性水和ヒアルロン酸との架橋形成能が優れていることを確認した（表3参照）。

【0044】

従って、この基剤を濃度別に0.1%（w/v）から0.4%（w/v）で使用したとき、0.2%（w/v）で使用した場合に、最も高い架橋形成能を示した（表4参照）。

【0045】

(b) 前記(a)段階で1次コーティングされた乳酸菌に機能性水和ヒアルロン酸を混合して2次コーティングする段階：

前記(b)段階で、(a)段階の1次コーティングされた乳酸菌に機能性水和ヒアルロン酸を混合して2次コーティングする。前記機能性水和ヒアルロン酸は、腸内有害菌を抑制する抗菌性の乳酸菌発酵物が捕集されていて、腸内有害菌を制御する。

【0046】

前記機能性水和ヒアルロン酸は、乳酸菌培養液100重量部に対して機能性水和ヒアルロン酸0.001重量部～1重量部を混合する。具体的には、機能性水和ヒアルロン酸の混合割合を例に挙げると、乳酸菌培養液100重量部に対して0.001、0.002、0.003、0.004、0.005、0.006、0.007、0.008、0.009、0.010、0.011、0.012、0.013、0.014、0.015、0.016、0.017、0.018、0.019、0.020、0.021、0.022、0.023、0.024、0.025、0.026、0.027、0.028、0.029、0.030、0.031、0.032、0.033、0.034、0.035、0.036、0.037、0.038、0.039、0.040、0.041、0.042、0.043、0.044、0.045、0.046、0.047、0.048、0.049、0.050、0.051、0.052、0.053、0.054、0.055、0.056、0.057、0.058、0.059、0.060、0.061、0.062、0.063、0.064、0.065、0.066、0.067、0.068、0.069、0.070、0.071、0.072、0.073、0.074、0.075、0.076、0.077、0.078、0.079、0.080、0.081、0.082、0.083、0.084、0.085、0.086、0.087、0.088、0.089、0.090、0.091、0.092、0.093、0.094、0.095、0.096、0.097、0.098、0.099、0.100重量部等で混合することができ、乳酸菌培養液100重量部に対して0.001重量部～1重量部の範囲内であれば前記の数値に制限されない。好ましくは、前記機能性水和ヒアルロン酸を、乳酸菌培養液100重量部に対して0.001重量部～0.05重量部で混合して、さらに好ましくは0.001重量部～0.005重量部で混合する。

【0047】

(c) 前記(b)段階で2次コーティングされた乳酸菌に多孔性粒子を有するコーティング剤を混合して3次コーティングする段階：

前記多孔性コーティング剤は、菌体に多孔性粒子を有する基剤のコーティング剤として、外部の水分及び湿潤空気の流入を遮断する役割をする。多孔性粒子を有するものを前

10

20

30

40

50

記3次コーティング剤として使用可能であり、具体的にはこれに限定はされないが、アルギン酸(alginate)、マルトデキストリン(maltodextrin、MD)、ポリエチレングリコール(polyethyleneglycol、PEG)、トリアセチン(triacetin)、クエン酸アセチルトリエチル(acetyl triethyl citrate)又はクエン酸トリエチル(triethyl citrate)が含まれ、好ましくはアルギン酸(alginate)、マルトデキストリン(maltodextrin、MD)、ポリエチレングリコール(polyethyleneglycol、PEG)でもあって、最も好ましくはマルトデキストリン(maltodextrin、MD)を意味する。

【0048】

前記多孔性コーティング剤は、乳酸菌培養液100重量部に対して0.1重量部～10重量部の割合で混合される。具体的には、多孔性コーティング剤の混合比率を例に挙げると、乳酸菌培養液100重量部比0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10.0でもあって、乳酸菌培養液100重量部に対して0.1重量部～10重量部の範囲内であれば、前記の数値に制限されない。好ましくは、前記多孔性コーティング剤を、乳酸菌培養液100重量部に対して0.1重量部～5重量部で混合して、より好ましくは0.1重量部～0.5重量部で混合する。

【0049】

好ましくは、前記多孔性コーティング剤として、マルトデキストリンを、乳酸菌培養液100重量部に対して0.1重量部～10重量部の割合で混合することができる。具体的には、MDの混合比率を例に挙げると、乳酸菌培養液100重量部に対して0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10.0でもあって、乳酸菌培養液100重量部に対して0.1重量部～10重量部の範囲内であれば、前記の数値に制限されない。好ましくは、前記多孔性コーティング剤としてMDを乳酸菌培養液100重量部に対して0.1重量部～5重量部で混合して、より好ましくは0.1重量部～0.5重量部で混合する。

【0050】

(d) 前記(c)段階で3次コーティングされた乳酸菌にタンパク質を混合して4次コーティングする段階：

前記タンパク質は、多孔性粒子構造を有する3次コーティング剤の空隙を満たすために、3次コーティングされた乳酸菌に混合され、これに限定はされないが、好ましくは脱脂粉乳、乳清タンパク質、分離大豆タンパク質からなる群より選ばれたタンパク質、好ましくは乳清タンパク質を意味する。

【0051】

前記4次コーティング剤のタンパク質は、乳酸菌培養液100重量部に対してタンパク質1重量部～30重量部の割合で混合され、具体的には4次コーティング剤のタンパク質の混合比率を例に挙げると、乳酸菌培養液100重量部比1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30でもあって、乳酸菌培養液100重量部に対して1重量部～30重量部の範囲内であれば前記の数値に制限されない。好ましくは4次コーティング剤のタンパク質を、乳酸菌培養液100重量部に対して1重量部～10重量部で混合し、最も好ましくは5重量部～10重量部で混合する。

【0052】

10

20

30

40

50

好ましくは、4次コーティング剤として、乳清タンパク質を、乳酸菌培養液100重量部に対してタンパク質1重量部～30重量部の割合で混合することができ、具体的には乳清タンパク質の混合割合を例に挙げると乳酸菌培養液100重量部に対して1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30でもあって、乳酸菌培養液100重量部に対して1重量部～30重量部の範囲内であれば前記数値に制限されない。好ましくは、4次コーティング剤として、乳清タンパク質を、乳酸菌培養液100重量部に対して1重量部～10重量部で混合して、最も好ましくは5重量部～10重量部で混合する。

【0053】

前記本発明の方法で製造された4次コーティング乳酸菌は、従来の非コーティング、單一コーティング、二重コーティング、三重コーティングされた乳酸菌だけでなく、四重コーティングされた乳酸菌に比べて腸粘膜付着能が極めて優れている。本発明の一実施例によれば、機能性水和ヒアルロン酸を利用して四重コーティングされた乳酸菌は、従来の四重コーティング乳酸菌と比べて *in vitro* 及び *in vivo* で腸粘膜付着能が優れていることが示された。このような効果は、ヒトの腸粘膜と類似した環境と言える常在菌が存在する条件でも優れていた点で、その意味が極めて大きいと言える。

【0054】

一方、コーティングされた乳酸菌が宿主の腸に達した後、腸の粘膜に付着するためには、宿主の常在菌叢との競争を逃さなければならない。さらに、乳酸菌が腸粘膜に付着して有益な生理学的活性を示すためには、腸粘膜の有害菌の増殖は抑制して有益菌の増殖は促進する効果を示すことが好ましい点で、本発明の四重コーティングされた乳酸菌は、従来の非コーティング、單一コーティング、二重コーティング、三重のコーティング及び四重コーティングされた乳酸菌と比べて極めて優れたものと言える。

【0055】

具体的には、本発明の一実施例によれば、機能性水和ヒアルロン酸を利用して、四重コーティングされた乳酸菌は、従来の非コーティング又は四重のコーティングされた乳酸菌に比べて有害菌との競争的付着阻害能が極めて優れていて、常在菌が存在する状況でも乳酸菌の腸粘膜付着能を向上させることができた。さらに、本発明の方法により四重コーティングされた乳酸菌の2次コーティング基剤の機能性水和ヒアルロン酸は、有害菌に対しては増殖を抑制する効果がある反面、有益菌の増殖は促進する効果があることが確認されて、有害菌に対してのみ選択的に拮抗作用を示すことが分かった。

【0056】

本発明の四重コーティングされた乳酸菌は、優れた腸粘膜付着能及び有害菌に対する選択的拮抗作用以外にも、四重コーティングにより構造的に安定し、水分、空気等の外部環境因子を効率的に遮断して、高い経時的安定性を示すことができ、耐酸性及び耐胆汁酸性が極めて優れている。

【0057】

また、本発明の四重コーティングされた乳酸菌は、前記のような方法で製造されたことを特徴とする。従って、本発明の四重コーティングされた乳酸菌は、従来の四重コーティングされた乳酸菌が有する優れた耐酸性及び耐胆汁性を維持しながら、非コーティング、四重コーティングされた乳酸菌に比べて腸内細菌叢の内、有害細菌抑制能が優れ、有害細菌の増加の際に効率的に正常化させることができる。また、腸内細菌叢の内、有益菌である乳酸菌叢の増殖を助け、効率的な腸内細菌叢の正常化に寄与する。

【0058】

一方、本発明の他の一実施例によれば、本発明の機能性水和ヒアルロン酸は、四重コーティングされた乳酸菌だけでなく、二重又は三重コーティングされた乳酸菌にコーティング剤として使用された場合にも、一般的なヒアルロン酸を利用して乳酸菌をコーティングした時と比べてはるかに向上した腸粘膜付着能を示した点で、機能性水和ヒアルロン酸がそれ自体で優れた腸粘膜付着能及び有害細菌に対する拮抗作用を示すコーティング剤として使用できることが分かった。

10

20

30

40

50

【0059】

これだけでなく、機能性水和ヒアルロン酸を使用して二重又は三重コーティングされた乳酸菌は、一般的なヒアルロン酸を使用して二重又は三重コーティングされた乳酸菌と比べて同じ程度の耐酸性及び耐胆汁酸性を示すことから、機能性水和ヒアルロン酸を製造する過程でヒアルロン酸固有の乳酸菌保護効果はそのまま維持されることが分かった。

【0060】

前記の通り、本発明の機能性水和ヒアルロン酸でコーティングされた乳酸菌は、一般的なヒアルロン酸を利用してコーティングされた乳酸菌と比べて同じ程度の耐酸性及び耐胆汁酸性を示すばかりでなく、優れた腸粘膜付着能及び有害細菌に対する選択的拮抗作用を示し、このような乳酸菌コーティング剤及び乳酸菌コーティング方法については、従来報告されたことのないもので、本発明者が機能性水和ヒアルロン酸を乳酸菌のコーティングに利用することにより表れた効果であるので、これは本発明で最初に報告するものである。10

【発明の効果】**【0061】****[有利な効果]**

本発明の機能性水和ヒアルロン酸は、有害菌に対しては増殖抑制作用を示し、有益菌に対しては増殖促進作用を示す選択的拮抗作用を示す効果があつて、本発明の機能性水和ヒアルロン酸を用いてコーティングされた乳酸菌は、一般的なヒアルロン酸を利用してコーティングされた乳酸菌と比べて優れた腸粘膜付着能及び有害菌に対する選択的拮抗作用を示す効果がある。20

【0062】

特に、本発明の機能性水和ヒアルロン酸を用いて、四重コーティングされた乳酸菌は、乳酸菌に水溶性ポリマー、機能性水和ヒアルロン酸、多孔性粒子を有するコーティング剤、タンパク質を混合して四重コーティングすることにより、従来非コーティング、単一、二重、三重及び四重コーティング乳酸菌では表われない、優れた腸粘膜付着能及び有害細菌に対する選択的拮抗作用を示すだけでなく、耐酸性及び耐胆汁性も極めて優れていて、乳酸菌本来の生理活性機能を消失しない効果がある。

【図面の簡単な説明】**【0063】**

【図1】図1は、機能性水和ヒアルロン酸の形状を示した写真である。30

【図2】図2は、機能性水和ヒアルロン酸のサルモネラティフィミュリウムKCTC 2054に対する成育阻害能を評価した結果である。

【図3】図3は、ラクトバチルスアシドフィルスIDCC 3302の培養液が捕集された機能性水和ヒアルロン酸原料の、ラクトバチルスマノサスに対する増殖促進効果を評価した写真である(A:一般的なヒアルロン酸処理対照群、B:機能性水和ヒアルロン酸処理群)。

【図4】図4は、ラクトバチルスアシドフィルスIDCC 3302の培養液が捕集された機能性水和ヒアルロン酸原料の、ビフィドバクテリウムロンガムに対する増殖促進効果を評価した写真である(A:一般的なヒアルロン酸処理対照群、B:機能性水和ヒアルロン酸処理群)
。

【図5】図5は、ラクトバチルスアシドフィルスIDCC 3302の培養液が捕集された機能性水和ヒアルロン酸原料の、エンテロコッカスファシウムに対する増殖促進効果を評価した写真である(A:一般的なヒアルロン酸処理対照群、B:機能性水和ヒアルロン酸処理群)。40

【図6】図6は、機能性水和ヒアルロン酸を利用して二重コーティングされたラクトバチルスアシドフィルスIDCC 3302、非コーティング及び一般的なヒアルロン酸を利用して二重コーティングされたラクトバチルスアシドフィルスIDCC 3302の腸内定着性を比較した図である。

【図7】図7は、機能性水和ヒアルロン酸を利用して二重コーティングされたラクトバチルスアシドフィルスIDCC 3302、非コーティング及び一般的なヒアルロン酸を利用して二重コーティングされたラクトバチルスアシドフィルスIDCC 3302が腸内サルモネラ菌の生育に及ぼす影響を評価した図である。50

【図8】図8は、機能性水和ヒアルロン酸を利用して三重コーティングされたラクトバチルスアシドフィルスIDCC 3302、非コーティング及び一般的なヒアルロン酸を利用して三重コーティングされたラクトバチルスアシドフィルスIDCC 3302の腸内定着性を比較した図である。

【図9】図9は、機能性水和ヒアルロン酸を利用して三重コーティングされたラクトバチルスアシドフィルスIDCC 3302、非コーティング及び一般的なヒアルロン酸を利用して三重コーティングされたラクトバチルスアシドフィルスIDCC 3302が腸内サルモネラ菌の生育に及ぼす影響を評価した図である。

【図10】図10は、機能性水和ヒアルロン酸を利用して四重コーティングされたラクトバチルスアシドフィルスIDCC 3302、非コーティング及び一般的なヒアルロン酸を利用して四重コーティングされたラクトバチルスアシドフィルスIDCC 3302の腸内定着性を比較した図である。
10

【図11】図11は、機能性水和ヒアルロン酸を利用して、四重コーティングされたラクトバチルスアシドフィルスIDCC 3302、非コーティング及び一般的なヒアルロン酸を利用して四重コーティングされたラクトバチルスアシドフィルスIDCC 3302が腸内サルモネラ菌の生育に及ぼす影響を評価した図である。

【図12】図12は、本発明に使用された非コーティングされたラクトバチルスアシドフィルスIDCC 3302の形状を示したSEM写真である。

【図13】図13は、ラクトバチルスアシドフィルスIDCC 3302にカルボキシメチルセルロースを混合して1次コーティングされた乳酸菌の形状を示したSEM写真である。
20

【図14】図14は、カルボキシメチルセルロースで1次コーティングされたラクトバチルスアシドフィルスIDCC 3302に機能性水和ヒアルロン酸を混合して、2次コーティングされた乳酸菌の形状を示したSEM写真である。

【図15】図15は、カルボキシメチルセルロース及び機能性水和ヒアルロン酸で2次コーティングされたラクトバチルスアシドフィルスIDCC 3302にマルトデキストリンを混合して3次コーティングされた乳酸菌の形状を示したSEM写真である。

【図16】図16は、カルボキシメチルセルロース、機能性水和ヒアルロン酸及びマルトデキストリンで3次コーティングされたラクトバチルスアシドフィルスIDCC 3302に、乳清タンパク質を混合して4次コーティングされた乳酸菌の形状を示したSEM写真である。

【発明を実施するための形態】

【0064】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0065】

但し、下記の実施例は本発明を例示するのみで、本発明の内容が下記の実施例に限定されるものではない。

【0066】

<実施例1>

機能性水和ヒアルロン酸の調製

【0067】

代表的乳酸菌であるラクトバチルスアシドフィルスIDCC 3302 (*Lactobacillus acidophilus* IDCC 3302) 発酵菌体を間欠滅菌 (tyndallization) することにより、ラクトバチルスアシドフィルスIDCC 3302細胞構造物に含まれている代表成分であるリポタイコ酸 (lipoteichoic acid)、ペプチドグリカン (peptidoglycan) 等の有害細菌付着阻害物質及び有害細菌の増殖を抑制して有益菌の生育を促進させる乳酸菌発酵産物を、ヒアルロン酸に捕集することを試みた。このために十分に培養されたラクトバチルスアシドフィルスIDCC 3302菌液を121 °Cで5分間加圧熱処理 (圧力ゲージ上1.2気圧) した後、菌液を30 °Cに冷却した。これを再び110 °Cで10分間加圧熱処理 (圧力ゲージ上0.8気圧) した後、菌液を30 °Cに冷却して、再び80 °Cで30分間熱処理後、30 °Cに最終冷却して付着阻害乳酸菌液を準備した。
40

【0068】

この培養液を、60℃で初期体積の1/10まで減圧濃縮して、ここにヒアルロン酸0.01~1% (w/v)を入れて十分に攪拌して溶解した後、50℃で追加の減圧濃縮を行い、乾燥して図1に示した通り機能性水和ヒアルロン酸の原料を調製した。

【0069】

<実施例2>

機能性水和ヒアルロン酸の付着阻害能

【0070】

機能性水和ヒアルロン酸の有害菌付着阻害能を評価するために、ヒトの腸内上皮細胞系であるCaco-2細胞 *in vitro*モデルを使用した。Caco-2細胞 *in vitro*モデルは、局在性 (polarization)、機能性な刷子縁及び加水分解酵素の分泌等、成熟した腸細胞の特性をそのまま示す。乳酸菌が腸内粘膜細胞と結合するには乳酸菌のリガンドが特定の受容体と相互作用することが必要なため、腸内のCaco-2細胞は実際に乳酸菌の腸定着性を研究する上で最も有用な *in vitro*モデルの一つとして知られている (Microbiol.59 (12) : 4121-4128、Gut.35 : 483-489、FEMS microbiology. Lett.91 : 213-218等)。
10

【0071】

具体的には、機能性水和ヒアルロン酸をCaco-2細胞にまず処理した後、サルモネラティフィミュリウムKCTC 2054を付着させ、Caco-2細胞に付着しているサルモネラティフィミュリウムKCTC 2054の菌数を測定して、これを阻害率に換算する方法を使用した。

【0072】

この時、対照群として、機能性水和ヒアルロン酸サンプルの代わりに一般的なヒアルロン酸を使用した。より具体的には、Caco-2単層細胞はCaco-2細胞を10% (v/v) ウシ胎仔血清と20 μl/ml ゲンタマイシンを添加したDMEMに 1.2×10^5 細胞/ml 濃度で接種して6ウェル組織培養プレート (BD、USA) 1ウェル当り1 ml 分株して7日間培養した後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS、pH 7.2) で2回洗浄して製造した。Caco-2単層が形成された各ウェルに機能性水和ヒアルロン酸溶液0.5mlを加えて90分間反応させた。対照群はヒアルロン酸溶液を使用した。サルモネラティフィミュリウムKCTC 2054サンプル0.5ml (1×10^8 cfu/ml) を入れて90分間反応させた。反応後、上澄み液を除去してCaco-2細胞をPBSで2回洗浄して、付着していないサルモネラティフィミュリウムKCTC 2054を除去した。0.04% (w/v) Tween 80 1mlを加えてCaco-2細胞に付着したサルモネラティフィミュリウムKCTC 2054を回収して生菌数を測定した。この結果を下記表1に示した。
20
30

【0073】

【表1】

機能性水和ヒアルロン酸のサルモネラティフィミュリウムKCTC 2054付着阻害能

区分	対照群-ヒアルロン酸	機能性水和ヒアルロン酸
サルモネラティフィミュリウム付着阻害率 (%)	<1%	46%

【0074】

前記表1に示した通り、対照群である一般的なヒアルロン酸の場合、サルモネラティフィミュリウムの付着阻害は殆ど示されていないのに対し、機能性水和ヒアルロン酸の場合46%の付着阻害率を示すことが確認された。つまり、機能性水和ヒアルロン酸を乳酸菌のコーティング剤として使用する場合、乳酸菌が腸粘膜に付着することは勿論、腸内有害菌との競争的除去に役立つものと判断された。
40

【0075】

<実施例3>

機能性水和ヒアルロン酸の有害菌拮抗作用

機能性水和ヒアルロン酸の腸内有害細菌に対する抗菌力を評価するために、サルモネラティフィミュリウムKCTC 2054に対して、最小発育阻止濃度 (Minimum Inhibitory Concentration、MIC) を求めて、腸内細菌叢の内、有害菌に及ぼす影響を比較した。実験方法は
50

、韓国薬局方の細菌増殖阻害試験を改変して用いた。詳細内容は下記の通りである。

【0076】

1) サルモネラティフィミュリウムKCTC 2054試験菌溶液の調製

サルモネラティフィミュリウムKCTC 2054試験菌溶液の調製のために、ブレインハートインキュージョン寒天培地 (BHI agar、BD、USA) で育ったサルモネラティフィミュリウムKCTC 2054菌体を1ループ取り、滅菌されたBHI液状培地5mlに懸濁してO.D. 620nm値0.15に調整した。この溶液を試験菌溶液として使用した。

【0077】

2) 操作法

機能性水和ヒアルロン酸粉末を1% (w/v) ~ 10% (w/v) の濃度になるようにBHI液状培地20mlにそれぞれ入れて5~10分間攪拌しながら懸濁した。懸濁液を遠心分離 (5,000RPM/15分) した後、上澄み液をメンブレンフィルター (0.45 μm) で濾過滅菌した。それぞれの濃度の濾過滅菌液2mlを、滅菌された4ml試験管に入れてサルモネラティフィミュリウムKCTC 2054試験菌溶液を2% (v/v) 接種した。対照群として機能性水和ヒアルロン酸サンプルの代わりに、一般的なヒアルロン酸を使用した。接種後、37℃で24時間培養しながら菌の成長を観察した。

10

【0078】

3) 判定

培養24時間後に菌の成長が観察された濃度を確認して、そのときの濃度値をMIC値とした。

20

【0079】

この結果を下記表2及び図2に示した。

【0080】

【表2】

機能性水和ヒアルロン酸のサルモネラティフィミュリウムKCTC 2054に対する拮抗作用

区分	対照群-ヒアルロン酸	機能性水和ヒアルロン酸
サルモネラティフィミュリウム最小発育阻止濃度	>10%	4% (w/v)

30

【0081】

前記表2及び図2に示した通り、機能性水和ヒアルロン酸についてサルモネラティフィミュリウムKCTC 2054菌株に対するMIC値を評価した結果、機能性水和ヒアルロン酸は、4% (w/v) の濃度で最小発育阻止濃度 (MIC) を示し、有害菌に対する増殖抑制効果を示すことが確認できた。

40

【0082】

<実施例4>

機能性水和ヒアルロン酸の有益菌増殖促進作用

【0083】

機能性水和ヒアルロン酸の腸内有益菌に対する影響力を評価するために、乳酸桿菌、ビフィダス菌、乳酸球菌に代表されるラクトバチルスラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*)、ビフィドバクテリウムロンガム (*Bifidobacterium longum*)、エンテロコッカスファシウム (*Enterococcus faecium*) を使用した。より詳細には、腸内有益菌3種の試験菌液の調製のため、de Man-Rogosa-Sharpe寒天培地 (MRS、BD、USA) で育った有益菌3種の菌体を取り、滅菌されたMRS液状培地に懸濁した後、この溶液を試験菌溶液として使用する。

50

【0084】

ラクトバチルスアシドフィルスIDCC 3302の機能性水和ヒアルロン酸粉末を、4% (w/v) の濃度になるようにMRS液状培地20mlにそれぞれ入れて5~10分間搅拌しながら懸濁する。対照群として機能性水和ヒアルロン酸粉末の代わりに一般的なヒアルロン酸を使用した。

【0085】

懸濁液を遠心分離 (5,000RPM/15分) した後、上澄み液をメンブレンフィルター (0.45 μm) で濾過滅菌する。濾過滅菌液2mlを滅菌された4ml試験管に入れて有益菌3種をそれぞれ2% (v/v) ずつ接種する。接種後、37℃で24時間培養しながら、菌の成長を、顕微鏡観察を通じて、対照群と増殖度を比較して図3~図5に示した。

10

【0086】

図3~図5に示した通り、本発明に係る機能性水和ヒアルロン酸を処理したラクトバチルスラムノサス (図3)、ビフィドバクテリウムロンガム (図4)、エンテロコッカスファシウム (図5) で、一般的なヒアルロン酸処理した対照群と比べて、それぞれの菌の成長が促進されることを確認できた。

【0087】**<実施例5>****乳酸菌の表面薄膜コーティング架橋剤選定****【0088】**

乳酸菌体表面薄膜コーティングをなす水溶性ポリマーと、機能性水和ヒアルロン酸との架橋形成能を評価して、最適のコーティング架橋剤を選定した。より詳細には、機能性水和ヒアルロン酸を3次蒸留水に4g/lの濃度で溶解した溶液と、水溶性ポリマーを3次蒸留水に1% (w/v) の濃度で溶解した溶液を1:1 (v/v) の体積比で混合して1分間強く搅拌した後、常温で30分間放置した。3次蒸留水のみを機能性水和ヒアルロン酸と混合した結果と比べて、架橋親和性を判断した。架橋が形成された場合、機能性水和ヒアルロン酸の平均分子量が増加して、溶液の粘度が増加するようになる。粘度の測定は、24℃の恒温水槽で、粘度增加によって測定時間が増加する粘度計 (Ubbelohde viscometer, SI analytics) に溶液を入れて、ViscoClock (SI Analytics) を利用して、一定区間を通過する下降所要時間を測定して、粘度を相対的に比較した (表3)。

20

【0089】

下記表3に示した通り、機能性水和ヒアルロン酸は試験に使用された全ての水溶性ポリマーと架橋結合をよく形成し、その中で特にカルボキシメチルセルロース (CMC) と架橋結合を最もよく形成することが示された。

30

【0090】**【表3】****機能性水和ヒアルロン酸との架橋形成のための最適なコーティング架橋剤選定**

区分	対照群	キトサン	ポリビニルピロリドン	CMC	アラビアガム
下降時間 (sec)	548	584	595	625	560

40

【0091】

機能性水和ヒアルロン酸と架橋結合を最もよく形成するコーティング架橋剤であるCMCの最適濃度を決定するために、機能性水和ヒアルロン酸を3次蒸留水に4g/Lの濃度で溶解した溶液に、CMC濃度を0.1% (w/v) から0.4% (w/v) まで添加した溶液を製造して、架橋形成を相対的に比較できるViscoClock (SI Analytics) を利用して一定区間を通過する下降所要時間を測定して、粘度を相対的に比較した。

【0092】

この結果を下記表4に示した。

【0093】

50

【表4】

機能性水和ヒアルロン酸との架橋形成のための最適なCMC濃度

濃度 (w/v)	添加せず	0.1%	0.2%	0.3%	0.4%
下降時間 (sec)	548	625	632	583	567

【0094】

前記表4に示した通り、機能性水和ヒアルロン酸との架橋形成のための最適なCMC濃度決定実験では、0.2% (w/v) 使用時に632秒の下降時間を示し、相対的に架橋形成能力が優れた濃度であることが示された。 10

【0095】

<実施例6>

機能性水和二重コーティング乳酸菌

【0096】

<6-1> 機能性水和二重コーティング乳酸菌の調製

【0097】

本発明では韓国登録特許（第10-1280232号）の明細書実施例に記載されたコーティング乳酸菌調製方法を基に、CMC-Naを1次コーティング剤とし、前記<実施例1>で調製した機能性水和ヒアルロン酸を2次コーティング剤とした乳酸菌の表面薄膜コーティング剤を使用して、機能性水和二重コーティング乳酸菌を調製した。対照群として機能性水和ヒアルロン酸の代わりに一般的なヒアルロン酸を使用して二重コーティング乳酸菌を調製して使用した。 20

【0098】

<6-2> 機能性水和二重コーティング乳酸菌の耐酸性 (acid tolerance)

【0099】

乳酸菌が経口で摂取された後で人体の消化器官の中で胃腸 (stomach) を通過する時、胃酸 (gastric juice) に晒されることになるが、これと類似した環境を試験管条件で作成して機能性水和ヒアルロン酸二重コーティング乳酸菌と一般的なヒアルロン酸の二重コーティング乳酸菌群の生存率を比較して耐酸性を評価した。 30

【0100】

より詳細には、MRS培地に10% HClを滴下してpHを2.3、2.5に調製後、滅菌して使用し、試料1gをそれぞれのpHに調製されたMRS培地に入れて0時間、1時間、2時間反応させた後、生菌数の分析を行った。このとき、実験に使用した乳酸菌は、ラクトバチルス属 (*Lactobacillus* sp) 12種、ビフィドバクテリウム属 (*Bifidobacterium* sp) 4種、ストレプトコッカス属 (*Streptococcus* sp) 1種、エンテロコッカス属 (*Enterococcus* sp) 1種、ラクトコッカス属 (*Lactococcus* sp) 1種であり、機能性水和二重コーティング乳酸菌とヒアルロン酸二重コーティング乳酸菌を製造して比較した。

【0101】

これに対する結果を下記表5に示した。 40

【0102】

【表5】

機能性水和ヒアルロン酸二重コーティング乳酸菌の耐酸性

	試験群	pH 2.3 (x10 ⁵ CFU/g)				pH 2.5 (x10 ⁵ CFU/g)			
		0 時間	1 時間	2 時間	生存率(%)	0 時間	1 時間	2 時間	生存率(%)
ヒアルロン酸二重コーティング	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	130	91	71	55	130	101	74	57
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	125	82	62	50	125	92	67	54
	<i>Lactobacillus casei</i>	145	95	75	52	145	105	81	56
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	122	82	64	53	122	92	68	56
	<i>Lactobacillus gasseri</i>	148	89	74	50	148	99	79	54
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	160	92	83	52	160	98	88	55
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	120	71	57	48	120	81	60	50
	<i>Lactobacillus paracasei</i>	130	89	71	55	130	99	74	57
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	122	83	69	57	122	93	73	60
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	132	77	58	44	132	87	64	49
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	144	91	79	55	144	101	80	56
	<i>Lactobacillus salivarius</i>	121	81	62	52	121	91	64	53
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	132	82	67	51	132	92	73	56
	<i>Bifidobacterium breve</i>	142	87	76	54	142	97	82	58
	<i>Bifidobacterium lactis</i>	124	75	64	52	124	85	73	59
機能性水和ヒアルロン酸二重コーティング	<i>Bifidobacterium longum</i>	142	93	82	58	142	102	88	62
	<i>Enterococcus faecium</i>	152	90	79	52	152	101	86	57
	<i>Lactococcus lactis</i>	105	81	52	50	105	91	61	59
	<i>Streptococcus thermophilus</i>	102	55	44	44	102	65	52	51
	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	120	71	60	50	120	81	64	54
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	115	62	51	45	115	72	58	51
	<i>Lactobacillus casei</i>	125	72	60	48	125	82	65	52
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	112	69	52	47	112	79	59	53
	<i>Lactobacillus gasseri</i>	138	71	60	44	138	81	69	50
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	120	62	55	46	120	72	61	51
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	110	55	46	42	110	65	57	52
	<i>Lactobacillus paracasei</i>	110	58	47	43	110	68	59	54
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	112	62	56	50	112	72	59	53
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	122	57	48	40	122	67	57	47
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	124	70	60	49	124	80	52	42
	<i>Lactobacillus salivarius</i>	102	52	42	42	102	62	48	48
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	112	58	48	43	112	68	60	54
	<i>Bifidobacterium breve</i>	122	62	53	44	122	72	67	55
	<i>Bifidobacterium lactis</i>	104	56	47	46	104	76	58	56
	<i>Bifidobacterium longum</i>	122	67	58	48	122	77	73	60
	<i>Enterococcus faecium</i>	123	60	51	42	123	70	68	56
	<i>Lactococcus lactis</i>	101	58	47	47	101	68	54	54
	<i>Streptococcus thermophilus</i>	103	43	39	38	103	63	47	46

【0103】

前記表5に示した通り、機能性水和ヒアルロン酸二重コーティング乳酸菌と一般的なヒアルロン酸の二重コーティング乳酸菌の耐酸性を比較した結果、各実験群から類似した耐酸性が示された。

【0104】

これらの結果は、機能性水和ヒアルロン酸が製造される過程で、乳酸菌を保護するヒア

10

20

30

40

50

ルロン酸固有の特性が破壊されなかつたためと考えられる。

【0105】

<6-3> 機能性水和二重コーティング乳酸菌の耐胆汁酸性 (bile tolerance)

胆汁酸 (bile acid) は、肝臓 (liver) から作られて胆道に出て小腸 (small intestine) に流れて小腸末端の回腸 (ileum) で95% 吸収され、再び肝臓に戻る腸管循環をする。この過程で小腸に定着した乳酸菌に影響を与える。

【0106】

従って、胆汁酸に晒されたとき機能性水和ヒアルロン酸二重コーティング乳酸菌と、ヒアルロン酸の二重コーティング乳酸菌群の生存率を試験管環境で比較した。より詳細には、胆汁酸0.3%が添加された培地と添加されていない培地を滅菌して使用してそれぞれの培地に機能性水和ヒアルロン酸の二重コーティング乳酸菌、対照群である一般的なヒアルロン酸二重コーティング乳酸菌の試料1gをそれぞれ接種して5時間反応させた後、生菌数の分析をして耐胆汁酸性を比較した。10

【0107】

この結果を下記表6に示した。

【0108】

【表6】

機能性水和ヒアルロン酸二重コーティング乳酸菌の耐胆汁酸性

	試験群	MRS	MRS + 0.3% 胆汁	生存率(%)
ヒアルロ ン酸二重 コーテイ ング	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	230	147	64
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	160	105	66
	<i>Lactobacillus casei</i>	150	97	65
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	170	115	68
	<i>Lactobacillus gasseri</i>	172	115	67
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	168	109	65
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	194	126	65
	<i>Lactobacillus paracasei</i>	215	129	60
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	227	131	58
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	168	104	62
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	175	119	68
	<i>Lactobacillus salivarius</i>	168	109	65
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	215	137	64
	<i>Bifidobacterium breve</i>	200	110	55
	<i>Bifidobacterium lactis</i>	225	121	54
	<i>Bifidobacterium longum</i>	220	125	57
	<i>Enterococcus faecium</i>	135	74	55
20	<i>Lactococcus lactis</i>	121	72	60
	<i>Streptococcus thermophilus</i>	110	63	58
機能性水 和ヒアル ロン酸二 重コーテ ィング	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	220	149	68
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	150	100	67
	<i>Lactobacillus casei</i>	140	91	65
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	166	112	68
	<i>Lactobacillus gasseri</i>	152	97	64
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	148	97	66
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	124	80	65
	<i>Lactobacillus paracasei</i>	115	69	60
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	127	74	58
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	158	97	62
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	165	112	68
	<i>Lactobacillus salivarius</i>	148	96	65
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	115	73	64
	<i>Bifidobacterium breve</i>	100	55	55
	<i>Bifidobacterium lactis</i>	125	67	54
	<i>Bifidobacterium longum</i>	120	76	64
	<i>Enterococcus faecium</i>	145	95	66
30	<i>Lactococcus lactis</i>	131	85	65
	<i>Streptococcus thermophilus</i>	120	127	58

【0109】

前記表6に示した通り、機能性水和ヒアルロン酸二重コーティング乳酸菌と、ヒアルロン酸二重コーティング乳酸菌の耐胆汁酸性を比較した結果、各実験群で殆ど差が無く、類似した耐胆汁酸性を示した。従って、機能性水和ヒアルロン酸は製造過程中に、そのヒアルロン酸固有の特性が破壊されず、乳酸菌にコーティングした後にも類似した効果を示したものと判断される。

【0110】

<6-4> 機能性水和二重コーティング乳酸菌の非競争的付着能

【0111】

Caco-2細胞単層はCaco-2細胞（韓国細胞バンク）を10%(v/v)ウシ胎仔血清と20 μl/ml濃度のゲンタマイシン（gentamicin）を添加したダルベッコ変形イーグル培地（DMEM、Hyclone、USA）に 1.2×10^5 細胞/ml濃度で接種して、6ウェル組織培養プレートを使用して1

10

20

30

40

50

ウェル当たり1ml分株して7日間培養した後、リン酸緩衝溶液で2回洗浄して製造した。

【0112】

Caco-2単層が形成された各ウェルに非コーティング乳酸菌と、ヒアルロン酸二重コーティング乳酸菌、機能性水和ヒアルロン酸二重コーティング乳酸菌サンプル1mlを入れて90分間反応させた。前記二重コーティング乳酸菌は韓国登録特許(第10-1280232号)の二重コーティング乳酸菌調製方法を基に製造した。

【0113】

反応後上澄み液を除去して0.04%(v/v) Tween80 1mlを添加してCaco-2細胞に付着した乳酸菌サンプルを回収して、ヘモサイトメータを利用して観察菌数を測定した。初期菌数に対する付着菌数の比率で付着効率を計算した。

10

【0114】

この結果は下記表7に示した。

【0115】

下記表7に示した通り、腸粘膜と類似したCaco-2細胞に対する付着能評価の際、非コーティング乳酸菌よりヒアルロン酸二重コーティング乳酸菌の付着効率が相対的に優れています、機能性水和ヒアルロン酸二重コーティング乳酸菌の付着効率は、ヒアルロン酸二重コーティング乳酸菌と比べて全般的により向上した付着効率を示した。

【0116】

【表7】

機能性水和ヒアルロン酸二重コーティングされた乳酸菌の非競争的付着能

20

区分	乳酸菌の付着能 (%)		
	非コーティング	ヒアルロン酸 二重コーティング	機能性水和 ヒアルロン酸 二重コーティング
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	26	44	48
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	5	27	29
<i>Lactobacillus casei</i>	8	31	34
<i>Lactobacillus fermentum</i>	5	24	28
<i>Lactobacillus gasseri</i>	12	26	28
<i>Lactobacillus helveticus</i>	15	28	34
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	35	47	54
<i>Lactobacillus paracasei</i>	17	33	40
<i>Lactobacillus plantarum</i>	15	29	35
<i>Lactobacillus reuteri</i>	8	15	18
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	34	52	56
<i>Lactobacillus salivarius</i>	5	14	20
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	13	28	33
<i>Bifidobacterium breve</i>	17	34	42
<i>Bifidobacterium lactis</i>	24	35	40
<i>Bifidobacterium longum</i>	23	33	38
<i>Enterococcus faecium</i>	38	54	55
<i>Lactococcus lactis</i>	32	45	48
<i>Streptococcus thermophilus</i>	14	26	32

30

【0117】

腸粘膜細胞に乳酸菌と競争する微生物が存在しないとき、基本腸粘膜付着能は、機能性水和ヒアルロン酸二重コーティング乳酸菌が、一般的なヒアルロン酸二重コーティング乳酸菌と比べて全般的に向上した付着効率を示した。このような結果から、機能性水和ヒアルロン酸の腸粘膜定着効果は、一般的なヒアルロン酸と同等又は向上した効果を示したので、機能性水和ヒアルロン酸の製造過程中にヒアルロン酸固有の腸粘膜粘着力が破壊されなかつたことが分かった。

40

【0118】

<6-5> 機能性水和二重コーティング乳酸菌の競争的付着阻害能 (Competitive exclusion)

50

【0119】

一般的に、乳酸菌が腸内で整腸作用を発揮するためには、有害菌である大腸菌とサルモネラ等よりも腸粘膜との結合力が優れていなければならないが、グラム陽性菌に分類される乳酸菌は、グラム陰性細菌である大腸菌とサルモネラより、相対的に腸粘膜との結合力が落ちる。従って、本発明者らは、機能性水和ヒアルロン酸二重コーティングされた乳酸菌が腸内で有益な生理学的活性を示し得るか否かをより明確に判断するために、常在菌が存在する条件で乳酸菌付着能の評価を試みた。

【0120】

常在菌の存在時、付着能の比較実験は、サルモネラティフィミュリウムKCTC 2054を指示菌として使用し、Caco-2細胞に先ず付着させた後、非コーティング乳酸菌、ヒアルロン酸二重コーティングされた乳酸菌、機能性水和ヒアルロン酸二重コーティング乳酸菌を処理したときの、Caco-2細胞に付着しているサルモネラティフィミュリウムKCTC 2054の菌数を測定して、これを阻害率に換算する方法を使用した。10

【0121】

より具体的には、Caco-2細胞単層はCaco-2細胞を10% (v/v) ウシ胎仔血清と20 μl/ml ゲンタマイシンを添加したダルベッコ改变イーグル培地 (DMEM、Hyclone、USA) に 1.2×10^5 細胞/mlの濃度で接種して6ウェル組織培養プレートを使用して1ウェル当たり1ml分株して7日間培養した後、リン酸緩衝溶液で2回洗浄して製造した。

【0122】

サルモネラティフィミュリウムKCTC 2054の試料は、それぞれブレインハートインキュベーション (BHI、BD、USA) 培養液10mlを遠心分離して菌体を回収し、リン酸緩衝溶液で2回洗浄した後、1mlのリン酸緩衝溶液に再懸濁して無血清DMEMに 1×10^8 CFU/mlの濃度に希釈して調製した。常在菌であるサルモネラティフィミュリウムKCTC 2054の試料液0.5mlをCaco-2単層が形成された各ウェルに入れて60分間反応させた。反応後、乳酸菌のサンプル (1×10^8 CFU/ml) を同量処理して90分間反応させた。20

【0123】

Caco-2細胞に付着したサルモネラティフィミュリウムKCTC 2054の生菌数測定のため、0.04% (w/v) Tween80 1mlを加えてCaco-2細胞から付着した常在菌であるサルモネラティフィミュリウムKCTC 2054を回収してBG寒天培地で生菌数を測定した。サルモネラティフィミュリウムKCTC 2054の付着阻害率は下記の通り計算した。30

【0124】

[サルモネラティフィミュリウム付着阻害率 (%)]

$$= [1 - (\text{試験群処理時のサルモネラティフィミュリウム付着菌数} / \text{DMEM処理時のサルモネラティフィミュリウム付着菌数})] \times 100 (\%)$$

【0125】

この結果を下記表8に示した。

【0126】

下記表8に示した通り、腸粘膜と類似したCaco-2細胞に有害菌であるサルモネラティフィミュリウムKCTC 2054を先に付着させた後、非コーティング、ヒアルロン酸二重コーティング、機能性水和ヒアルロン酸二重コーティングされた乳酸菌の競争有害菌の除去率を比較した結果、機能物質が含まれていない非コーティング乳酸菌は競争的除去の方法でサルモネラティフィミュリウムKCTC 2054を除去するので、相対的に最も低い除去効率を示し、機能性水和ヒアルロン酸二重コーティングされた乳酸菌は、非コーティングよりは相対的に高い有害菌除去効率を示した。40

【0127】

一方、機能性水和ヒアルロン酸二重コーティングされた乳酸菌は、競争的除去以外にも、既に付着されたサルモネラティフィミュリウムKCTC 2054に直接抗菌力を示すことにより、Caco-2細胞からサルモネラティフィミュリウムをスムーズに除去して、ヒアルロン酸によって有害菌が脱着された部位に定着するものと示された。

【0128】

10

20

30

40

50

一方、前記の機能性水和ヒアルロン酸二重コーティングされた乳酸菌の効果は、ラクトバチルアシドフィルスIDCC 3302の結果だけを見ても、非コーティング乳酸菌より47%優れた効果を示し、一般的なヒアルロン酸の二重コーティング乳酸菌と比べても33%以上の優れた効果を示すことが確認された。つまり、機能性水和ヒアルロン酸を乳酸菌のコーティング剤として使用すれば、従来の一般的な乳酸菌コーティング剤と比べて腸内有害菌阻害能が著しく向上することが分かった。

【0129】

【表8】

機能性水和ヒアルロン酸二重コーティングされた乳酸菌の競争的付着阻害能

10

区分	<i>Salmonella typhimurium</i> 付着阻害率 (%)		
	非コーティング	ヒアルロン酸 二重コーティング	機能性水和 ヒアルロン酸 二重コーティング
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	31	45	78
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	22	37	67
<i>Lactobacillus casei</i>	38	52	82
<i>Lactobacillus fermentum</i>	26	39	58
<i>Lactobacillus gasseri</i>	32	36	62
<i>Lactobacillus helveticus</i>	20	34	54
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	27	58	82
<i>Lactobacillus paracasei</i>	21	45	62
<i>Lactobacillus plantarum</i>	24	32	47
<i>Lactobacillus reuteri</i>	23	42	58
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	33	48	68
<i>Lactobacillus salivarius</i>	11	23	52
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	16	25	42
<i>Bifidobacterium breve</i>	15	24	35
<i>Bifidobacterium lactis</i>	18	22	38
<i>Bifidobacterium longum</i>	22	27	41
<i>Enterococcus faecium</i>	35	42	74
<i>Lactococcus lactis</i>	24	36	69
<i>Streptococcus thermophilus</i>	13	27	47

20

【0130】

30

<6-6> 機能性水和ヒアルロン酸二重コーティング乳酸菌のin vivo腸定着性

【0131】

機能性水和ヒアルロン酸二重コーティング乳酸菌のin vivo腸定着性実験のために、4週齢のICRマウスを試験群当たり5匹ずつ使用した。特にこの実験では、抗生素投与を通じて腸内細菌叢を攪乱させた後、腸内細菌叢の中でlactobacilliの修復に効果的な実験群を選抜する目的で行った。

【0132】

実験群に非コーティング乳酸菌、ヒアルロン酸二重コーティング乳酸菌、機能性水和ヒアルロン酸二重コーティング乳酸菌投与群、乳酸菌を投与していない对照群で構成した。試験期間は6週で、最初の0.5週間は実験動物の適応期にし、適応期が終った次の1週間はアンピシリン抗生素の投与期間で毎日0.4g/lのアンピシリンを飲用水に入れて摂取するようにした。

40

【0133】

次の2週間は、乳酸菌を経口投与して、この時の菌数は 1×10^{10} CFU/gを使用した。対照群には乳酸菌の代わりにPBSを経口投与した。次の2.5週間は乳酸菌投与を中止して腸内細菌叢の変化を観察した。全体の試験期間中、毎週2回それぞれの実験群で糞便サンプルを回収して、Lactobacilliの菌数をLBS (Lactobacillus selective media、BD、USA) 寒天培地で実験群別に増殖度の差を分析した。

【0134】

この結果を図6に示した。

50

【 0 1 3 5 】

図6に示した通り、非コーティング乳酸菌より、ヒアルロン酸二重コーティングされた乳酸菌と機能性水和ヒアルロン酸二重コーティング乳酸菌投与群で投与中止後、2.5週まで糞便からラクトバチルス菌が検出されることを確認できた。しかし、コーティング乳酸菌の形態がヒアルロン酸単独のベース構造であり、胃酸と胆汁酸等に脆弱な構造であるため、二つの群がすべて類似した腸内定着性パターンを示した。

【 0 1 3 6 】

< 6-7 > 機能性水和ヒアルロン酸二重コーティング乳酸菌の *in vivo* 有害細菌抑制能

【 0 1 3 7 】

機能性水和ヒアルロン酸二重コーティング乳酸菌の *in vivo* における有害細菌抑制能を確認するために、サルモネラティフィミュリウムKCTC 2054を感染させたマウスモデルにおける抗菌力を調査した。6週齢の雌ICRマウス5匹/ケージを1群にして、サンプルは、非コーティング乳酸菌、ヒアルロン酸二重コーティング乳酸菌、機能性水和ヒアルロン酸二重コーティング乳酸菌、PBS投与群 (vehicle) の合計4群に区分した。係留期間が終了したマウスを対象に、0.2% (w/v) テトラサイクリンを200 μl/マウス/日ずつ、1週間投与して、マウス固有の腸内細菌叢を抑制及び攪乱させ、1週間経過後、サルモネラティフィミュリウムKCTC 2054 (1×10^8 CFU/ml) をサンプル投与期間の初期3日間200 μl/マウス/日ずつ経口投与して、4つのサンプルも2週間に200 μl/マウス/日ずつ経口投与し、この時の菌数は 1×10^{10} CFU/gであった。次の2.5週間はサンプル投与を中止して有害菌の成長抑制変化を観察した。全体の試験期間中、毎週2回それぞれの実験群から糞便サンプルを回収して、サルモネラ菌数をBG寒天培地で分析した。

10

20

【 0 1 3 8 】

この結果を図7に示した。

【 0 1 3 9 】

図7に示した通り、腸内常在菌叢を抗生素で抑制させた後、サルモネラティフィミュリウムKCTC 2054で感染させたマウスモデルに非コーティング、ヒアルロン酸二重コーティング、機能性水和ヒアルロン酸二重コーティング乳酸菌サンプルを投与した結果、単純競争排除の役割をする非コーティング、ヒアルロン酸二重コーティングされた乳酸菌はサルモネラティフィミュリウムKCTC 2054との競争を通じて生育を抑制することが分かり、機能性水和ヒアルロン酸二重コーティング乳酸菌はサルモネラティフィミュリウムKCTC 2054に対して拮抗作用と競争的排除作用を同時にすることにより、10倍以上効率的にサルモネラティフィミュリウムKCTC 2054を抑制することが確認された。

30

【 0 1 4 0 】

< 実施例 7 >

機能性水和三重コーティング乳酸菌

【 0 1 4 1 】

< 7-1 > 機能性水和三重コーティング乳酸菌の調製

【 0 1 4 2 】

本発明では、韓国登録特許（第10-1280232号）の明細書の実施例の乳酸菌コーティング方法をもとに、CMC-Naを1次コーティング剤とし、前記実施例1で調製した機能性水和ヒアルロン酸を2次コーティング剤とし、マルトデキストリン (maltodextrin) を3次コーティング剤として使用して、機能性水和三重コーティング乳酸菌を調製した。対照群として機能性水和ヒアルロン酸の代わりに一般的なヒアルロン酸を使用してヒアルロン酸三重コーティング乳酸菌を調製して使用した。

40

【 0 1 4 3 】

< 7-2 > 機能性水和三重コーティング乳酸菌の耐酸性 (acid tolerance)

【 0 1 4 4 】

耐酸性は、人体の消化器官の中で、胃腸 (stomach) を乳酸菌が通過する際に、胃酸 (gastric juice) に晒されることになるが、これらの環境を試験管条件で機能性水和ヒアルロン酸三重コーティング乳酸菌と、ヒアルロン酸三重コーティング乳酸菌群を比較した [

50

表9]。実験方法は本発明の実施例<6-2>と同様に行った。

これに対する結果を下記表9に示した。

【0145】

【表9】

機能性水和ヒアルロン酸三重コーティング乳酸菌の耐酸性結果

	試験群	pH 2.3 ($\times 10^5$ CFU/g)				pH 2.5 ($\times 10^5$ CFU/g)			
		0 時間	1 時間	2 時間	生存率 (%)	0 時間	1 時間	2 時間	生存率 (%)
ヒアルロン酸三重コーティング	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	140	111	84	60	140	121	90	64
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	135	102	75	56	135	112	81	60
	<i>Lactobacillus casei</i>	155	115	91	59	155	127	96	62
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	132	102	79	60	132	112	83	63
	<i>Lactobacillus gasseri</i>	158	109	91	58	158	129	103	65
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	170	112	102	60	170	118	105	62
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	140	93	88	63	140	101	94	67
	<i>Lactobacillus paracasei</i>	150	110	85	57	150	119	98	65
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	132	105	68	52	132	113	79	60
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	142	97	69	49	142	107	84	59
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	154	113	90	59	154	121	95	62
	<i>Lactobacillus salivarius</i>	141	103	78	56	141	111	85	60
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	142	105	79	56	142	112	88	62
	<i>Bifidobacterium breve</i>	162	105	93	58	162	117	102	63
	<i>Bifidobacterium lactis</i>	144	97	82	57	144	105	94	65
機能性水和ヒアルロン酸三重コーティング	<i>Bifidobacterium longum</i>	162	115	102	63	162	122	104	64
	<i>Eaterococcus faecium</i>	162	110	93	58	162	121	100	62
	<i>Lactococcus lactis</i>	135	104	72	54	135	111	78	58
	<i>Streptococcus thermophilus</i>	122	77	61	50	122	85	63	52
	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	136	91	78	58	136	101	84	62
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	131	82	70	54	131	92	76	58
	<i>Lactobacillus casei</i>	151	94	84	56	151	102	86	57
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	127	90	74	59	127	99	79	62
	<i>Lactobacillus gasseri</i>	154	93	84	55	154	101	97	63
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	165	84	97	59	165	90	102	62
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	134	77	81	61	134	85	87	65
	<i>Lactobacillus paracasei</i>	145	78	81	56	145	88	91	63
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	127	86	64	51	127	92	75	59
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	136	79	61	45	136	87	72	53
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	150	90	84	56	150	100	93	62
	<i>Lactobacillus salivarius</i>	138	75	74	54	138	82	83	60
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	139	78	73	53	139	88	86	62
	<i>Bifidobacterium breve</i>	152	72	79	52	152	102	88	58
	<i>Bifidobacterium lactis</i>	138	79	70	51	138	96	81	59
	<i>Bifidobacterium longum</i>	152	89	91	60	152	97	103	68
	<i>Eaterococcus faecium</i>	150	82	78	52	150	90	93	62
	<i>Lactococcus lactis</i>	125	78	62	51	136	88	105	56
	<i>Streptococcus thermophilus</i>	112	67	53	48	127	83	95	54

【0146】

前記表9に示した通り、機能性水和ヒアルロン酸三重コーティング乳酸菌を調製して耐酸性を比較した結果、一般的なヒアルロン酸を使用した三重コーティング乳酸菌と同等の効果を示した。これらの結果は機能性水和ヒアルロン酸が製造される過程で、乳酸菌を保護するヒアルロン酸固有の特性が破壊されなかつたためと考えられる。

【0147】

一方、前記表の結果の中でラクラクトバチルスアシドフィルスIDCC 3302の結果だけを

10

20

30

40

50

比較したとき、一般的なヒアルロン酸を使用した三重コーティング乳酸菌は60% (pH2.3)、64% (pH2.5) の耐酸性を示し、これは、前記実施例<6-2>のヒアルロン酸二重コーティング乳酸菌の50%台の耐酸性よりも高く評価されており、コーティングの効果が耐酸性との相関関係にあることが分かった。つまり、二重コーティングより三重コーティングで耐酸性が優れて示され、コーティングの保護効果が耐酸性生存率に反映されたことを確認した。

【 0 1 4 8 】

<7-3> 機能性水和三重コーティング乳酸菌の耐胆汁酸性 (bile tolerance)

胆汁酸 (bile acid) に晒されたとき、機能性水和ヒアルロン酸の三重コーティング乳酸菌とヒアルロン酸三重コーティング乳酸菌群を試験管環境で比較した。実験方法は、本発明の実施例<6-3>と同様に行った。
この結果を下記表10に示す。

【 0 1 4 9 】

【表10】

機能性水和ヒアルロン酸三重コーティング乳酸菌の耐胆汁酸性

	試験群	MRS	MRS + 0.3%胆汁	生存率 (%)
ヒアルロン酸三重コーティング	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	245	181	74
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	160	121	76
	<i>Lactobacillus casei</i>	180	135	75
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	182	141	78
	<i>Lactobacillus gasseri</i>	168	130	77
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	152	114	75
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	144	99	69
	<i>Lactobacillus paracasei</i>	152	103	68
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	172	116	68
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	210	144	69
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	258	185	72
	<i>Lactobacillus salivarius</i>	190	161	75
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	243	170	70
	<i>Bifidobacterium breve</i>	255	163	64
	<i>Bifidobacterium lactis</i>	229	148	65
機能性水和ヒアルロン酸三重コーティング	<i>Bifidobacterium longum</i>	240	158	66
	<i>Enterococcus faecium</i>	260	187	72
	<i>Lactococcus lactis</i>	185	114	62
	<i>Streptococcus thermophilus</i>	151	96	64
	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	235	164	70
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	150	105	70
	<i>Lactobacillus casei</i>	170	122	72
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	162	116	72
	<i>Lactobacillus gasseri</i>	178	135	72
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	142	106	70
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	134	84	63
	<i>Lactobacillus paracasei</i>	142	88	62
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	162	98	61
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	193	121	63
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	232	157	68
	<i>Lactobacillus salivarius</i>	172	111	65
30	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	224	134	60
	<i>Bifidobacterium breve</i>	215	133	62
	<i>Bifidobacterium lactis</i>	219	137	62
	<i>Bifidobacterium longum</i>	210	130	62
	<i>Enterococcus faecium</i>	220	143	65
	<i>Lactococcus lactis</i>	175	107	58
	<i>Streptococcus thermophilus</i>	131	78	60

【0150】

40

前記表10に示した通り、5時間胆汁酸に晒されたときの、機能性水和ヒアルロン酸三重コーティング乳酸菌の耐胆汁酸性を、ヒアルロン酸三重コーティング乳酸菌の耐胆汁酸性と比較した時、70%台の類似した生存率を示した。このような結果は機能性水和ヒアルロン酸が製造される過程で乳酸菌を保護するヒアルロン酸固有の特性が破壊されなかつたためと思われる。

【0151】

<7-4> 機能性水和三重コーティング乳酸菌の非競争的付着能 (Non-competitive adhesion)

【0152】

競争関係の微生物が存在しない状態で付着能を比較するために、前記三重コーティング

50

乳酸菌は韓国登録特許（第10-1280232号）の三重コーティング乳酸菌調製方法を基に製造した。また非競争的付着能を評価するために本発明の実施例<6-4>と同様に実施した。

【0153】

この結果を下記表11に示した。

【0154】

下記表11に示した通り、腸粘膜と類似したCaco-2細胞に対する付着能を評価する際、非コーティング乳酸菌よりも機能性水和ヒアルロン酸及びヒアルロン酸三重コーティング乳酸菌の付着効率が相対的に比較的優れていて、機能性水和ヒアルロン酸三重コーティング乳酸菌の付着効率は、ヒアルロン酸三重コーティング乳酸菌と比べて全般的により向上した。

10

【0155】

【表11】

機能性水和ヒアルロン酸三重コーティング乳酸菌の非競争的付着能

区分	乳酸菌の付着能 (%)		
	非コーティング	ヒアルロン酸 二重コーティング	機能性水和 ヒアルロン酸 三重コーティング
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	26	54	56
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	5	37	42
<i>Lactobacillus casei</i>	8	41	47
<i>Lactobacillus fermentum</i>	5	34	39
<i>Lactobacillus gasseri</i>	12	36	40
<i>Lactobacillus helveticus</i>	15	38	43
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	35	57	63
<i>Lactobacillus paracasei</i>	17	43	55
<i>Lactobacillus plantarum</i>	15	39	43
<i>Lactobacillus reuteri</i>	8	25	36
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	34	62	64
<i>Lactobacillus salivarius</i>	5	24	35
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	13	38	46
<i>Bifidobacterium breve</i>	17	44	53
<i>Bifidobacterium lactis</i>	24	45	57
<i>Bifidobacterium longum</i>	23	43	49
<i>Enterococcus faecium</i>	38	59	62
<i>Lactococcus lactis</i>	32	55	64
<i>Streptococcus thermophilus</i>	14	36	48

20

30

【0156】

<7-5> 機能性水和三重コーティング乳酸菌の競争的付着阻害能(competitive exclusion)

【0157】

機能性水和ヒアルロン酸三重コーティングされた乳酸菌が腸内で有益な生理学的活性を示すことができるか否かをより明確に判断するために、常在菌が存在する条件で乳酸菌の付着能を評価するために、本発明の実施例<6-5>と同様な方法で実施した。

40

【0158】

これに対する結果を下記の表12に示した。

【0159】

下記表12に示した通り、腸粘膜と類似したCaco-2細胞に有害菌であるサルモネラフィミュリウムKCTC 2054を先に付着させた後、非コーティング、ヒアルロン酸三重コーティング、機能性水和ヒアルロン酸三重コーティングされた乳酸菌の競争有害菌の除去率を比べた結果、機能性物質が含まれていない非コーティング乳酸菌は競争的除去の方法でサルモネラフィミュリウムKCTC 2054を除去するために相対的に最も低い除去効率を示し、機能性水和ヒアルロン酸三重コーティングされた乳酸菌は、非コーティング及びヒアルロン酸三重コーティング乳酸菌よりも著しく優れた有害菌除去効率を示した。

50

【0160】

一方、このような機能性水和ヒアルロン酸三重コーティングされた乳酸菌の効果は、ラクトバチルスアシドフィルスIDCC 3302の結果だけを見ても、非コーティング乳酸菌より51%優れた効果を示し、一般的なヒアルロン酸三重コーティング乳酸菌と比べて27%以上優れた効果を示すことが確認された。つまり、機能性水和ヒアルロン酸を乳酸菌のコーティング剤として使用した場合、従来の一般的な乳酸菌コーティング剤と比べて、腸内有害菌阻害能が著しく向上したことが分かった。

【0161】

【表12】

機能性水和ヒアルロン酸三重コーティングされた乳酸菌の競争的付着阻害能

10

区分	<i>Salmonella typhimurium</i> 付着阻害率 (%)		
	非コーティング	ヒアルロン酸 三重コーティング	機能性水和 ヒアルロン酸 三重コーティング
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	31	55	82
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	22	47	72
<i>Lactobacillus casei</i>	38	62	88
<i>Lactobacillus fermentum</i>	26	49	68
<i>Lactobacillus gasseri</i>	32	46	72
<i>Lactobacillus helveticus</i>	20	54	64
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	27	68	85
<i>Lactobacillus paracasei</i>	21	55	72
<i>Lactobacillus plantarum</i>	24	42	57
<i>Lactobacillus reuteri</i>	23	52	68
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	33	58	78
<i>Lactobacillus salivarius</i>	11	43	62
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	16	45	52
<i>Bifidobacterium breve</i>	15	44	55
<i>Bifidobacterium lactis</i>	18	42	68
<i>Bifidobacterium longum</i>	22	47	59
<i>Enterococcus faecium</i>	35	54	64
<i>Lactococcus lactis</i>	24	56	63
<i>Streptococcus thermophilus</i>	13	47	56

20

【0162】

<7-6> 機能性水和ヒアルロン酸三重コーティング乳酸菌のin vivo腸定着性

30

【0163】

機能性水和ヒアルロン酸三重コーティング乳酸菌のin vivo腸定着性実験のために、本発明の実施例<6-6>と同様に実施した。

【0164】

この結果を図8に示した。

【0165】

図8に示した通り、非コーティング乳酸菌より、ヒアルロン酸三重コーティングされた乳酸菌と機能性水和ヒアルロン酸三重コーティング乳酸菌投与群で投与中止後、2.5週まで糞便からラクトバチルス菌が検出されることを確認することができ、その効果は機能性水和ヒアルロン酸三重コーティング乳酸菌で最も優れたことが確認された。

40

【0166】

一方、非コーティング乳酸菌は投与中止後、1週間だけ糞便からラクトバチルス菌が検出され、機能性水和ヒアルロン酸三重コーティング乳酸菌グループが1.5週延長されて検出されることにより、腸定着性が最も優れていることが確認された。

【0167】

特に、機能性水和ヒアルロン酸三重コーティング乳酸菌の場合、競争的排除(competitive exclusion)を通じた腸粘膜の付着だけでなく、増殖も活発になり、 1×10^3 CFUレベルでラクトバチルス属(*Lactobacillus* sp)が検出されることにより、抗生剤及びサルモネ

50

ラフィミュリウムで攪乱された腸内細菌叢の中で、有益菌を増殖させる役割をするものと判断された。

【0168】

<7-7> 機能性水和ヒアルロン酸三重コーティング乳酸菌のin vivo有害細菌抑制能

【0169】

機能性水和ヒアルロン酸三重コーティング乳酸菌の有害細菌抑制能をin vivoで確認するため、サルモネラフィミュリウムKCTC 2054を感染させたマウスモデルにおいて抗菌力を本発明の実施例<6-7>と同様に実施した。

【0170】

この結果を図9に示した。

10

【0171】

図9に示した通り、腸内常在菌叢を抗生剤で抑制させた後、サルモネラフィミュリウムKCTC 2054で感染させたマウスモデルに非コーティング、ヒアルロン酸三重コーティング、機能性水和ヒアルロン酸三重コーティング乳酸菌サンプルを投与した結果、単純な競争的排除の役割をする非コーティング、ヒアルロン酸三重コーティングされた乳酸菌は、サルモネラフィミュリウムKCTC 2054との競争を通じて生育を抑制することが分かり、機能性水和ヒアルロン酸三重コーティング乳酸菌がより効率的に、長期間、サルモネラフィミュリウムKCTC 2054を抑制することが確認された。

【0172】

これらの結果は、抗生剤と競争菌であるサルモネラフィミュリウムKCTC 2054で攪乱されたマウスの腸内細菌叢を、抗菌作用と競争的排除の役割を機能性水和ヒアルロン酸三重コーティングされた乳酸菌が行うことにより、有害菌の増殖は抗菌力と競争的排除の原理によって抑え、有益菌の増殖をやすことにより、腸内環境を速やかに正常化することが確認された。

20

【0173】

<実施例8>

機能性水和ヒアルロン酸四重コーティング乳酸菌

【0174】

<8-1> 機能性水和ヒアルロン酸四重コーティング乳酸菌の調製

【0175】

30

本発明では、韓国登録特許（第10-1280232号）の四重コーティング乳酸菌調製方法をもとに、CMC-Naを1次コーティング剤とし、前記実施例1で調製した機能性水和ヒアルロン酸を2次コーティング剤として使用し、マルトデキストリン（maltodextrin）を3次コーティング剤として使用して、乳清タンパクを最後の4次コーティング剤としてコーティングして、機能性水和ヒアルロン酸四重コーティング乳酸菌を調製した。対照群として機能性水和ヒアルロン酸の代わりに一般的なヒアルロン酸を使用してヒアルロン酸四重コーティング乳酸菌を調製して使用した。

【0176】

<8-2> 機能性水和ヒアルロン酸四重コーティング乳酸菌の耐酸性（acid tolerance）

【0177】

40

耐酸性は人体の消化器官の中で胃腸（stomach）を乳酸菌が通過する際に、胃酸（gastric juice）に晒されることになるが、これと類似した環境を試験管条件で作成して機能性水和ヒアルロン酸四重コーティング乳酸菌とヒアルロン酸四重コーティング乳酸菌の耐酸性を、生存率を通じて比較した。実験方法は本発明の実施例<6-2>と同様に行った。

【0178】

これに対する結果を下記表13に示した。

【0179】

【表13】

機能性水和ヒアルロン酸四重コーティング乳酸菌の耐酸性結果

コーティング	試験群	pH 2.3 ($\times 10^3$ CFU/g)				pH 2.5 ($\times 10^3$ CFU/g)			
		0時間	1時間	2時間	生存率 (%)	0時間	1時間	2時間	生存率 (%)
ヒアルロン酸四重コーティング	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	150	121	105	70	150	131	123	82
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	145	112	98	66	145	132	125	86
	<i>Lactobacillus casei</i>	175	125	121	69	175	155	140	80
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	142	112	114	80	142	132	116	82
	<i>Lactobacillus gasseri</i>	178	129	121	68	178	149	132	74
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	190	122	137	72	190	162	150	79
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	160	103	118	74	160	143	134	84
	<i>Lactobacillus paracasei</i>	170	120	117	69	170	140	134	79
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	162	115	110	68	162	135	126	78
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	152	107	94	62	152	137	125	82
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	164	123	118	72	164	143	134	82
	<i>Lactobacillus salivarius</i>	161	113	119	74	161	143	135	84
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	152	115	109	72	152	135	125	82
	<i>Bifidobacterium breve</i>	172	115	134	78	172	155	151	88
	<i>Bifidobacterium lactis</i>	164	107	118	72	164	147	134	82
	<i>Bifidobacterium longum</i>	182	125	133	73	182	165	151	83
	<i>Enterococcus faecium</i>	172	120	127	74	172	150	144	84
	<i>Lactococcus lactis</i>	155	114	105	68	155	144	136	88
	<i>Streptococcus thermophilus</i>	142	97	88	62	142	117	102	72
機能性水和ヒアルロン酸四重コーティング	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	146	111	100	69	146	121	112	77
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	141	92	85	60	141	122	97	69
	<i>Lactobacillus casei</i>	172	134	112	65	172	144	129	75
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	138	100	95	69	138	120	109	79
	<i>Lactobacillus gasseri</i>	172	123	112	65	172	133	129	75
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	181	144	127	70	181	154	136	75
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	172	147	120	70	172	157	131	76
	<i>Lactobacillus paracasei</i>	169	128	110	65	169	138	127	75
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	160	126	104	65	160	136	120	75
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	144	99	86	60	144	109	99	69
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	152	110	103	68	152	120	114	75
	<i>Lactobacillus salivarius</i>	158	125	111	70	158	135	117	74
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	142	118	92	65	142	128	97	68
	<i>Bifidobacterium breve</i>	162	132	123	76	162	142	133	82
	<i>Bifidobacterium lactis</i>	155	129	109	70	155	139	118	76
	<i>Bifidobacterium longum</i>	172	139	124	72	172	149	132	77
	<i>Enterococcus faecium</i>	161	122	116	72	161	132	126	78
	<i>Lactococcus lactis</i>	142	108	92	65	142	128	105	74
	<i>Streptococcus thermophilus</i>	139	97	83	60	139	117	95	68

10

20

30

40

【0180】

前記表13に示した通り、機能性水和ヒアルロン酸を利用した四重コーティング乳酸菌の耐酸性は、従来の二重、三重のコーティング乳酸菌より高い耐酸性を示し、pH2.5の条件下で、より高い耐酸性を示した。これらの結果は四重コーティング乳酸菌本来の高い耐酸性効果に起因したものと判断され、機能性水和ヒアルロン酸四重コーティング乳酸菌もまた、従来の四重コーティング乳酸菌の耐酸性と類似したパターンを示すことから、構造的に安定した形態であることを予想することができた。

【0181】

<8-3> 機能性水和ヒアルロン酸四重コーティング乳酸菌の耐胆汁酸性 (bile tolerance)

50

胆汁酸 (bile acid) に晒されたときの、機能性水和ヒアルロン酸四重コーティング乳酸菌とヒアルロン酸四重コーティング乳酸菌の生存率を試験管の環境で比較した。実験方法は、本発明の実施例<6-3>と同様に行った。

【0182】

この結果を下記の表14に示した。

【0183】

【表14】

機能性水和ヒアルロン酸四重コーティング乳酸菌の耐胆汁酸性結果

コーティング	試験群	MRS	MRS + 0.3% 胆汁	生存率 (%)	
ヒアルロン酸四重コーティング	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	245	206	84	10
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	160	137	86	
	<i>Lactobacillus casei</i>	180	153	85	
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	182	160	88	
	<i>Lactobacillus gasseri</i>	168	146	87	
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	152	130	85	
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	144	113	79	
	<i>Lactobacillus paracasei</i>	152	118	78	
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	172	134	78	
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	210	165	79	
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	258	211	82	
	<i>Lactobacillus salivarius</i>	190	161	85	
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	243	194	80	
	<i>Bifidobacterium breve</i>	255	188	74	
	<i>Bifidobacterium lactis</i>	229	171	75	
	<i>Bifidobacterium longum</i>	240	182	76	
	<i>Enterococcus faecium</i>	260	187	72	
	<i>Lactococcus lactis</i>	185	133	72	
	<i>Streptococcus thermophilus</i>	151	111	74	
機能性水和ヒアルロン酸四重コーティング	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	235	185	79	20
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	150	117	78	
	<i>Lactobacillus casei</i>	170	130	77	
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	162	126	78	
	<i>Lactobacillus gasseri</i>	178	137	77	
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	142	107	76	
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	134	92	69	
	<i>Lactobacillus paracasei</i>	142	102	72	
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	162	110	68	
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	193	127	66	
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	232	160	69	
	<i>Lactobacillus salivarius</i>	172	113	66	
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	224	150	67	
	<i>Bifidobacterium breve</i>	215	141	66	
	<i>Bifidobacterium lactis</i>	219	148	68	
	<i>Bifidobacterium longum</i>	210	142	68	
	<i>Enterococcus faecium</i>	220	151	69	
	<i>Lactococcus lactis</i>	175	119	68	
	<i>Streptococcus thermophilus</i>	131	83	64	

【0184】

前記表14に示した通り、機能性水和ヒアルロン酸を利用した四重コーティング乳酸菌の耐胆汁酸性の効果に対する効果は、従来の四重コーティング乳酸菌との大きな差を示さないことから、構造的に安定した形態を維持するものと判断される。

【0185】

<8-4> 機能性水和ヒアルロン酸四重コーティング乳酸菌の非競争的付着能 (Non-competitive adhesion)

競争関係の微生物が存在していない状態で付着能を比較するために、前記の四重コーティング乳酸菌を、韓国登録特許（第10-1280232号）の四重コーティング乳酸菌調製方法を基に製造した。また、非競争的付着能を評価するために、本発明の実施例<6-4>と同様に実施した。

【0186】

この結果を下記の表15に示した。

【0187】

下記表15に示した通り、腸粘膜と類似したCaco-2細胞に対する付着能を評価する際、非コーティング乳酸菌よりヒアルロン酸四重コーティング乳酸菌の付着効率が相対的に優れています。機能性水和ヒアルロン酸四重コーティング乳酸菌の付着効率はヒアルロン酸四重コーティング乳酸菌と同等の付着効率を示しました。
10

【0188】

【表15】

機能性水和ヒアルロン酸四重コーティングされた乳酸菌の非競争付着能

区分	乳酸菌の付着能 (%)		
	非コーティング	ヒアルロン酸 四重コーティング	機能性水和 ヒアルロン酸 四重コーティング
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	26	64	66
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	5	47	48
<i>Lactobacillus casei</i>	8	51	47
<i>Lactobacillus fermentum</i>	5	54	49
<i>Lactobacillus gasseri</i>	12	56	50
<i>Lactobacillus helveticus</i>	15	58	53
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	35	67	63
<i>Lactobacillus paracasei</i>	17	53	49
<i>Lactobacillus plantarum</i>	15	59	55
<i>Lactobacillus reuteri</i>	8	45	42
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	34	72	68
<i>Lactobacillus salivarius</i>	5	44	42
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	13	58	55
<i>Bifidobacterium breve</i>	17	54	58
<i>Bifidobacterium lactis</i>	24	55	59
<i>Bifidobacterium longum</i>	23	53	55
<i>Enterococcus faecium</i>	38	69	66
<i>Lactococcus lactis</i>	32	65	62
<i>Streptococcus thermophilus</i>	14	56	53

【0189】

機能性水和ヒアルロン酸を利用した四重コーティング乳酸菌の単純付着能は、コーティングの数によりさらに、付着効率が高くなつたことを確認できた。つまり、ラクトバチルスアシドフィルスIDCC 3302の結果だけを評価したとき、機能性水和ヒアルロン酸の二重コーティング乳酸菌（48%付着率）、機能性水和ヒアルロン酸三重コーティング乳酸菌（56%付着率）、機能性水和ヒアルロン酸四重コーティング乳酸菌（66%付着率）でコーティング数によって20%以上付着率が高くなつた。これらの結果は、3次、4次コーティング剤のマルトデキストリンと乳清タンパク質が、酸性環境に対する乳酸菌の露出を最小化して、2次コーティング剤もまた、一定時間露出時間を減少させることにより、粘膜との相互作用を最大化したためと予想される。
40

【0190】

<8-5> 機能性水和ヒアルロン酸四重コーティング乳酸菌の競争的付着阻害能（Competitive exclusion）

機能性水和ヒアルロン酸四重コーティングされた乳酸菌が腸内で有益な生理学的活性を示すことができるか否かをより明確に判断するために、常在菌が存在する条件で乳酸菌の付着能を評価するため、本発明の実施例<6-5>と同じ方法で実施した。

【0191】

10

20

30

40

50

この結果を下記表16に示した。

【0192】

下記表16に示した通り、腸粘膜と類似したCaco-2細胞に有害菌であるサルモネラフィミュリウムKCTC 2054を先に付着させた後、非コーティング、ヒアルロン酸四重コーティング、機能性水和ヒアルロン酸四重コーティングされた乳酸菌の競争有害菌の除去率を比較した結果、機能物質が含まれていない非コーティング乳酸菌は競争的除去の方法でサルモネラフィミュリウムKCTC 2054を除去したため、相対的に最も低い除去効率を示し、機能性水和ヒアルロン酸四重コーティングされた乳酸菌は、非コーティング及び一般的なヒアルロン酸四重のコーティング乳酸菌より著しく高い有害菌除去効率を示した。

【0193】

一方、このような機能性水和ヒアルロン酸四重コーティングされた乳酸菌の効果は、ラクトバチルスアシドフィルスIDCC 3302の結果だけを見ても、非コーティング乳酸菌よりも57%優れた効果を示し、一般的なヒアルロン酸四重コーティング乳酸菌と比べても31%以上優れた効果を示すことが確認された。つまり、機能性水和ヒアルロン酸を乳酸菌のコーティング剤として使用すると、従来の一般的な乳酸菌コーティング剤と比べて、腸内有害菌阻害能が著しく向上することが分かった。

【0194】

【表16】

機能性水和ヒアルロン酸四重コーティング乳酸菌の競争的付着阻害能

区分	<i>Salmonella typhimurium</i> 付着阻害率 (%)		
	非コーティング	ヒアルロン酸四重コーティング	機能性水和ヒアルロン酸四重コーティング
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	31	57	88
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	22	49	82
<i>Lactobacillus casei</i>	38	60	92
<i>Lactobacillus fermentum</i>	26	52	78
<i>Lactobacillus gasseri</i>	32	55	82
<i>Lactobacillus helveticus</i>	20	58	75
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	27	69	91
<i>Lactobacillus paracasei</i>	21	58	82
<i>Lactobacillus plantarum</i>	24	48	69
<i>Lactobacillus reuteri</i>	23	59	78
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	33	59	88
<i>Lactobacillus salivarius</i>	11	47	72
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	16	49	72
<i>Bifidobacterium breve</i>	15	47	65
<i>Bifidobacterium lactis</i>	18	48	78
<i>Bifidobacterium longum</i>	22	49	72
<i>Enterococcus faecium</i>	35	56	73
<i>Lactococcus lactis</i>	24	58	75
<i>Streptococcus thermophilus</i>	13	49	77

【0195】

機能性水和ヒアルロン酸の四重コーティング乳酸菌の競争的付着阻害能は、前記実施例<8-4>で評価した単純な付着能より効率が30%程度向上した。これらの結果は、従来の四重コーティング乳酸菌が競争的排除を通じた付着効率を高めて増殖したものであれば、機能性水和ヒアルロン酸四重コーティング乳酸菌は競争的排除を抗菌力と組み合わせ、競争菌株であるサルモネラフィミュリウムの活性度を下げることにより付着機会を増やしたためと予想される。

【0196】

<8-6> 機能性水和ヒアルロン酸四重コーティング乳酸菌のin vivo腸定着性

【0197】

機能性水和ヒアルロン酸の三重コーティング乳酸菌のin vivo腸定着性実験のために、

10

20

30

40

50

本発明の実施例<6-6>と同様に実施した。

【0198】

この結果を図10に示した。

【0199】

図10に示した通り、非コーティング乳酸菌と比較して、ヒアルロン酸四重コーティングされた乳酸菌と機能性水和ヒアルロン酸四重コーティング乳酸菌投与群では投与中止後、2.5週まで糞便からラクトバチルス菌が検出されることを確認することができ、その効果は機能性水和ヒアルロン酸四重コーティング乳酸菌で最も優れたことが確認された。

【0200】

一方、非コーティング乳酸菌は投与中止後、1週間まで糞便からラクトバチルス菌が検出され、機能性水和ヒアルロン酸四重コーティング乳酸菌グループが1.5週延長されて検出されることにより腸定着性が相対的に優れていることが確認された。 10

【0201】

<8-7> 機能性水和ヒアルロン酸四重コーティング乳酸菌のin vivo有害細菌抑制能

【0202】

機能性水和ヒアルロン酸四重コーティング乳酸菌のin vivo有害細菌抑制能を確認するために、サルモネラフィミュリウムKCTC 2054を感染させたマウスモデルにおいて、抗菌力を本発明の実施例<6-7>と同様に測定した。

【0203】

この結果を図11に示した。

20

【0204】

図11に示した通り、腸内常在菌叢を抗生剤で抑制させた後、サルモネラフィミュリウムKCTC 2054で感染させたマウスモデルに非コーティング、ヒアルロン酸四重コーティング、機能性水和ヒアルロン酸四重コーティング乳酸菌サンプルを投与した結果、単純な競争的排除の役割をする非コーティング、ヒアルロン酸四重コーティングされた乳酸菌は、サルモネラフィミュリウムKCTC 2054との競争を通じて生育を抑制することが分かり、機能性水和ヒアルロン酸四重コーティング乳酸菌がより効率的に、長期間サルモネラフィミュリウムKCTC 2054を抑制することが確認された。

【0205】

一方、抗菌力と競争的排除の役割を全て備えた機能性水和ヒアルロン酸四重コーティングされた乳酸菌は、サルモネラフィミュリウムKCTC 2054の感染後、最初から生育を抑制することにより、乳酸菌が受ける、有害菌であるサルモネラフィミュリウムKCTC 2054の影響を少なくて、乳酸菌の増殖により個体数を増やすことができ、増えた乳酸菌の個体数により投与中止2.5週間後までも正常菌叢を維持できるようにした。 30

【0206】

<実施例9>

電子顕微鏡(FE-SEM)の構造分析

【0207】

前記実施例1で調製した機能性水和ヒアルロン酸四重コーティングされたラクトバチルスアシドフィルスIDCC 3302の性状を調製工程に従って、電子顕微鏡撮影を通じて構造的分析を行った。機能性水和ヒアルロン酸四重コーティングされた乳酸菌調製工程を、段階的に電子顕微鏡構造解析をして図12～図16に示した。 40

【0208】

図12～図16に示した通り、乳酸菌にCMC-Naを混合する場合に、乳酸菌体表面をCMC-Naがフィルムのような薄膜を形成しながらコーティングしたことを観察することができた(図13)。また、CMC-Naと機能性水和ヒアルロン酸が混合されながら、構造的に機能性水和ヒアルロン酸構造がより緻密になる現象を観察することができ(図14)、多孔性粒子のマルトデキストリンを添加して、外部の水分と温度が容易に菌体に伝達されないようにして(図15)、最後に乳清タンパク質でコーティングを進めながら菌体が外部に晒されないようにした(図16)。 50

【0209】

つまり、1次～4次コーティング剤が順次添加されるほど、それぞれのコーティング剤が乳酸菌をコーティングしながら、より緻密で強固に乳酸菌が保護されることを確認できた。

【産業上の利用可能性】

【0210】

本発明の機能性水和ヒアルロン酸は、有害菌に対しては増殖抑制作用及び有益菌に対しては増殖促進作用を示し、選択的拮抗作用を示す効果があり、本発明の方法でコーティングされた四重コーティング乳酸菌は、乳酸菌に水溶性ポリマー、機能性水和ヒアルロン酸、多孔性粒子を有するコーティング剤、タンパク質を混合して四重コーティングすることにより、従来、非コーティング、単一、二重、三重及び四重のコーティング乳酸菌では表れなかった優れた腸粘膜付着能及び有害細菌に対する選択的拮抗作用を示すだけでなく、耐酸性及び耐胆汁性も極めて優れています、乳酸菌本来の生理活性機能を消失しない効果があつて産業上の利用可能性が非常に優れています。10

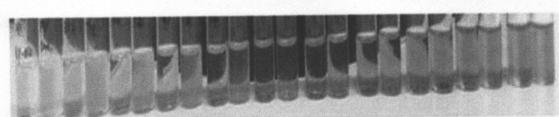
【図1】

【図1】



【図2】

添加せず	1% (w/v)	2% (w/v)	3% (w/v)	4% (w/v)	5% (w/v)	6% (w/v)	7% (w/v)	8% (w/v)	9% (w/v)	10% (w/v)
------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	-----------



【図3 A】

A



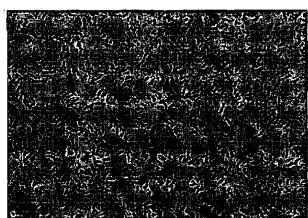
【図3 B】

B



【図4 A】

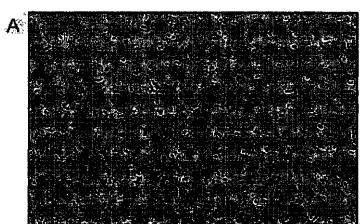
A



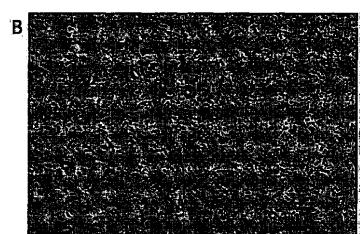
【図4B】



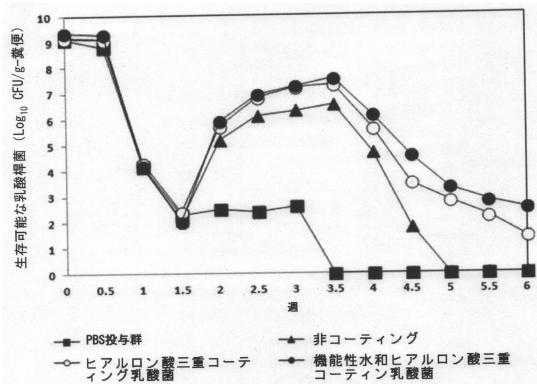
【図5A】



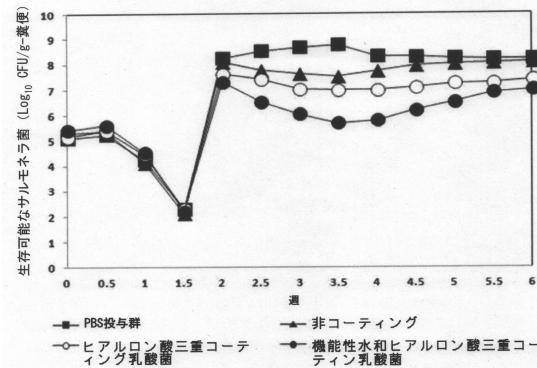
【図5B】



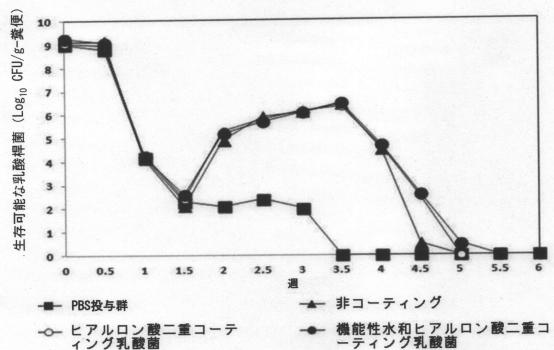
【図8】



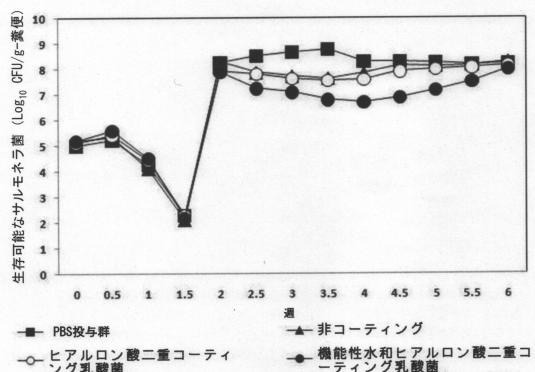
【図9】



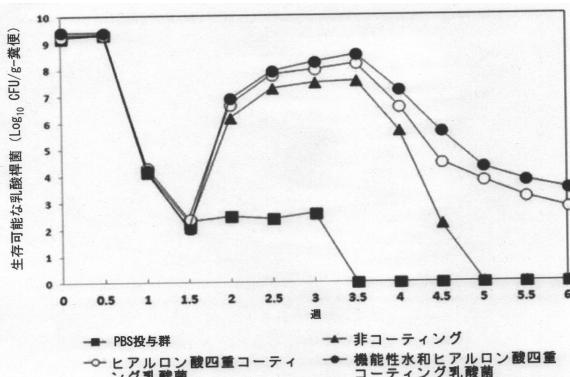
【図6】



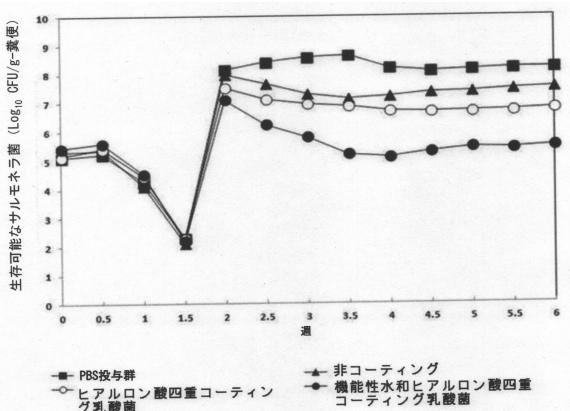
【図7】



【図10】

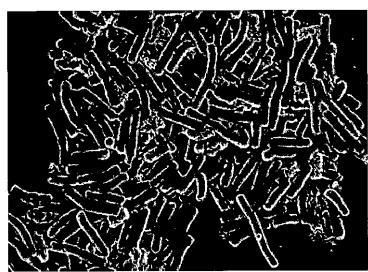


【図11】



【図 1 2】

【図 12】



【図 1 4】

【図 14】



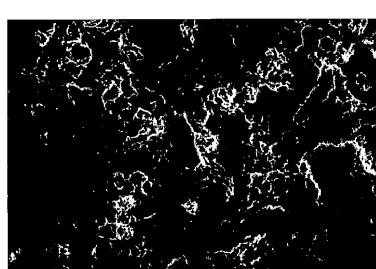
【図 1 3】

【図 13】



【図 1 5】

【図 15】



【図 1 6】

【図 16】



フロントページの続き

(72)発明者 カン、デ ジュン

大韓民国 17079 キョンギ - ド ヨンイン - シ キフン - グ 126ボン - ギル セウン -
ロ 46 309 - 404 (ヒュンダイ モーニングサイド 1 チャ アパート、ボラ - ドン
)

(72)発明者 カン、ジェ - フン

大韓民国 06616 ソウル ソチョ - グ 61 - ギル カンナム - デロ 23 407 (ヒ
ュンダイ スンワー アパート アンド ストアーズ、ソチョ - ドン)

審査官 川合 理恵

(56)参考文献 韓国公開特許第10 - 2013 - 0067682 (KR, A)

韓国公開特許第10 - 2013 - 0143329 (KR, A)

韓国公開特許第10 - 2007 - 0104140 (KR, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 1 / 20

C08L 5 / 00

A23L 33 / 135

C08B

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)