(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년08월12일
(11) 등록번호 10-2009732
(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 10-2019-0043611
(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

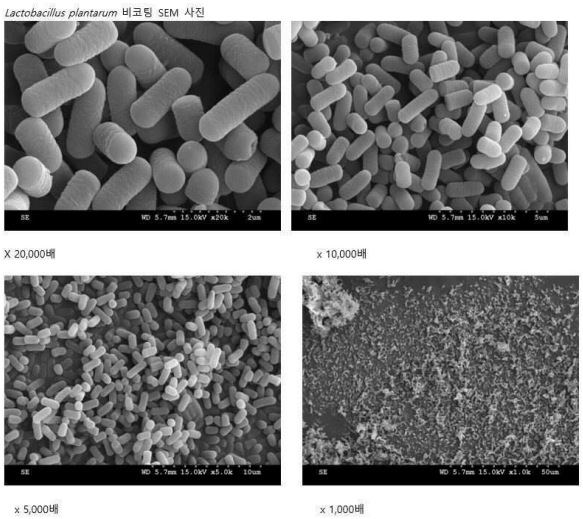
전체 청구항 수 : 총 15 항 심사관 : 김지연

(54) 발명의 명칭 **세포 농축 방법에 의한 이중코팅 유산균의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 배양한 유산균의 균체를 원심분리에 의해 농축시켜 조밀하게 회수한 후 동결보호제, 단백질 및 다당류에 의해 이중코팅 하여 단백질-다당류 이중코팅된 유산균을 제조하는 방법에 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.

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

다음의 단계를 포함하는 단백질-다당류 코팅의 이중코팅을 갖는 유산균의 제조방법:

(a) 유산균 배양을 위한 당 성분 및 질소원 성분을 포함하는 배지에서 유산균을 접종하여 배양하는 단계;

(b) 상기 배양된 유산균 균체를 분리하여 1.0% - 2.5%의 농축율로 농축하는 단계로서, 상기 농축율은, 분리된 균체량/배양액 중량 X 100 (%)의 계산식으로 산출되는 것인, 단계;

(c) 상기 농축된 유산균 균체에 동결보호제 수용액 및 단백질 수용액을 첨가하여 혼합 및 균질화하는 단계;

(d) 상기 균질화된 유산균 균체에 다당류 수용액을 첨가하여 혼합 및 균질화하는 단계; 및

(e) 상기 균질화된 유산균 균체를 동결건조하는 단계.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (a)에서 농축은 원심분리방법에 의해 행하는 것을 특징으로 하는, 단백질-다당류 코팅의 이중코팅을 갖는 유산균의 제조방법.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 원심분리에 의한 농축시 1회 토출량은 2 내지 10 kg인 것을 특징으로 하는, 단백질-다당류 코팅의 이중코팅을 갖는 유산균의 제조방법.

청구항 6

제 4 항에 있어서, 원심분리에 의한 농축시 유량은 800 내지 2000 L/hr인 것을 특징으로 하는, 단백질-다당류 코팅의 이중코팅을 갖는 유산균의 제조방법.

청구항 7

제 4 항에 있어서, 원심분리에 의한 농축시 배출 간격(discharging interval)은 350 내지 640s인 것을 특징으로 하는, 단백질-다당류 코팅의 이중코팅을 갖는 유산균의 제조방법.

청구항 8

제 4 항에 있어서, 원심분리에 의한 농축시 Small part ejection은 4,000 내지 10,000 ms인 것을 특징으로 하는, 단백질-다당류 코팅의 이중코팅을 갖는 유산균의 제조방법.

청구항 9

제 4 항에 있어서, 상기 원심분리에 의한 농축시 후드 플러싱(hood flushing) 기능은 차단하는 것을 특징으로 하는, 단백질-다당류 코팅의 이중코팅을 갖는 유산균의 제조방법.

청구항 10

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (c)에서 동결보호제는 트레할로스, 말토덱스트린, 만니톨, 및 솔비톨로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 단백질-다당류 코팅의 이중코팅을 갖는 유산균의 제조방법.

청구항 11

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (c)에서 단백질은 탈지분유, 대두분리단백(ISP), 유청단백, 및 아미노산으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 단백질-다당류 코팅의 이중코팅을 갖는 유산균의 제조방법.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 상기 아미노산은 아르기닌(Arginine), 글루탐산(Glutamic acid), 라이신(Lysine), 아스파르트산(Aspartic acid), 아스파라진(Asparagin), 글루타민(Glutamine), 프롤린(Proline), 또는 페닐알라닌(phenylalanine)인 것을 특징으로 하는, 단백질-다당류 코팅의 이중코팅을 갖는 유산균의 제조방법.

청구항 13

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

청구항 14

제 13 항에 있어서, 상기 검(gum)류는 잔탄검(Xantan gum), 아라비아검(Arabic gum), 구아검(Guar gum), 젤란검(Gellan gum), 카라야검(Karaya gum), 또는 로커스트빈검(Locust bean gum)이고; 상기 수용성식이섬유는 폴리덱스트로즈(Polydextrose), 글루코만난(Glucomannan), 베타-글루칸(β-glucan), 펙틴(Pectin), 또는 알긴산(Alginic acid)이고; 상기 불용성식이섬유는 치커리추출분말, 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 리그닌, 또는 이눌린인 것을 특징으로 하는, 단백질-다당류 코팅의 이중코팅을 갖는 유산균의 제조방법.

청구항 15

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 16

제 1 항, 제 4 항 내지 제 15 항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된, 단백질-다당류 코팅의 이중코팅을 갖는

유산균.

청구항 17

제 1 항, 제 4 항 내지 제 15 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 세포 농축 방법에 의해 이중코팅을 갖는 유산균을 제조하는 방법 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 배변 활동을 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 사용하는데 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. 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 연구노력한 결과, 배양된 유산균의 균체를 원심분리에 의해 농축시켜 조밀하게 회수한 후 동결보호제, 단백질 및 다당류에 의해 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 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) 유산균 배양을 위한 당 성분 및 질소원 성분을 포함하는 배지에서 유산균을 접종하여 배양하는 단계;

[0021] (b) 상기 배양된 유산균 균체를 분리하여 1.0% - 10.0%의 농축율로 농축하는 단계;

[0022] (c) 상기 농축된 유산균 균체에 동결보호제 수용액 및 단백질 수용액을 첨가하여 혼합 및 균질화하는 단계;

[0023] (d) 상기 균질화된 유산균 균체에 다당류 수용액을 첨가하여 혼합 및 균질화하는 단계; 및

[0024] (e) 상기 균질화된 유산균 균체를 동결건조하는 단계.

[0026] 유산균 및 유산균 배양

[0027] 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), 락토바

실러스 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.

[0028] 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 subnε. 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, 기탁번호: 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 락토바실러스 플란타룸 CBT-LP(Lactobacillus plantarum, CBT-LP) 일 수 있다.

[0029] 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.

[0030] 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.

[0031] 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.

[0032] 본 발명에서 상기 유산균의 배양을 위한 질소원 성분은 효모추출물 또는 소이펩톤을 사용할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0033] 이 밖에 유산균의 배양을 위해, 미량성분으로서 제이인산칼륨, 황산마그네슘, 황산망간, 염화칼슘, 구연산칼륨, 초산나트륨, L-아스코르빈산, L-글루타민산, L-시스테인염산염, 폴리소르베이트80 등을 더 첨가할 수 있다.

[0034] 유산균 균체의 농축 단계

[0035] 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.

[0036] 본 발명에서 사용되는 용어 "유산균의 농축율"은 유산균을 배양하여 분리한 후의 농축된 정도를 의미하고, 바람직하게는 "분리된 균체량/배양액 중량 X 100(%)"의 계산식에 따라 산출할 수 있다. 따라서, 본 발명에서 상기 농축율의 수치가 작을 수록 유산균이 더 조밀(compact)하게 농축되었음을 나타낸다.

[0037] 본 발명에서 유산균의 농축율은 1.0% - 10.0%의 범위일 수 있고, 바람직하게는 1.0% - 8.0%, 1.0% - 6.0%, 1.0% - 4.0%, 1.0% - 3.0%, 1.0% - 2.5%, 1.5% - 2.5%, 1.0% - 2.0%, 또는 1.5% - 2.0% 범위일 수 있다.

[0038] 상기 범위의 농축율로 유산균 균체를 회수하여 단백질 및 다당류의 이중코팅 공정을 행하고 동결건조 시키는 경우, 유산균의 동결건조생존율, 내산성, 및 내담즙성의 특성이 확연히 향상된다. 이러한 향상 효과는 상기 잔여 유리수 및 결합수의 제거가 용이하며, 건조과정에서 유산균 균체에 가해지는 열량이 적게 되고, 동결건조시에 세포 손상이 감소되기 때문이다.

[0039] 또한, 상기 범위의 농축율로 유산균 균체를 농축할 경우 농축 수득율이 증가할 수 있다.

[0040] 본 발명에서 용어 "농축 수득율"은 "[분리후 생균수 x 분리된 균체중량]/[분리전 생균수 x 배양액 중량] x 100(%)"으로 산출할 수 있다.

[0041] 본 발명에서 유산균을 농축하는 방법은 특별히 제한되지 않으나, 바람직하게는 원심분리 방법에 의해 농축할 수 있다. 본 발명에서 유산균 농축에 사용되는 원심분리기는 예를 들어 디스크 타입(disc type)의 고속 원심분리기 또는 튜블러 타입(tubular type)의 고속 원심분리기를 이용할 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0042] 본 발명의 구체적인 일 실시예에 따르면, 유산균 농축에 디스크 타입의 고속 원심분리기가 사용될 수 있으며, 이의 상세한 구조는 도 3a 및 도 3b에 도시되어 있다. 상기 디스크 타입의 고속 원심분리기의 작동 원리를 도 3a 및 도 3b에 도시된 구조를 참조하여 설명하면 다음과 같다.

[0043] 먼저, 유입라인(1)을 통해 유입되는 배양액은 회전하는 보울(bowl)의 원심력에 의해 분리되며, 이때 비중이 큰 유산균 균체는 홀딩 스페이스(5)에 포집되고, 비중이 작은 분리 여액은 디스크로 이루어진 디스크 스택(4)을 통과한 후, 구심펌프(3)에 의해 여액라인(2)을 통해 외부로 배출된다. 상기 홀딩 스페이스(5)에 포집된 유산균 균체는 컨트롤 유닛(13)에서 설정한 배출 간격(discharging interval)에 따라 배출구(6)을 통해 배출된다.

[0044] 분리된 유산균 균체가 홀딩 스페이스(5)로부터 배출되는 원리는 다음과 같다.

[0045] 클로징 작동수 밸브(14)가 개방되면서 클로징 챔버(12)에 작동수(operating water)가 다 채워질 때 보울과 가스캣, 슬라이딩 피스톤(11)이 밀착하여 클로징 챔버(12)가 완전히 밀폐된다. 컨트롤 유닛(13)에 의해 설정된 배출 간격 동안 균체 분리가 진행되고, 배출 간격에 도달되면, 환상 밸브(7)가 개방되면서 클로징 챔버(12)의 작동수가 스토리지 챔버(9)에 채워지며 슬라이딩 피스톤(11)이 하강되면서 균체가 배출된다. 즉, 스토리지 챔버(9)의 수위에 의해 슬라이딩 피스톤(11)이 하강 되며 균체가 배출되는데, 오프닝 작동수 밸브(15)가 열리면 환상밸브(7)가 개방되고 클로징 챔버(12)에 있던 물이 비워지면서 슬라이딩 피스톤(11)이 하강한다. 이 때 보울(bowl)은 열리고 홀딩 스페이스(5)에 포집된 유산균 균체는 배출구(6)를 통해 배출하게 된다. 배출되는 동안 클로징 작동수는 클로징 챔버(12)로 흘러 들어가 다시 채워지고 환상 밸브(7)는 오프닝 작동수가 멈춘 후 닫히게 된다.

[0046] 작동수(operating water)의 이동은 "small part ejection"(pre-filling time)으로 조절 가능하다. 다시 말해, "small part ejection"에 의해 고형물의 부분배출을 조절할 수 있으며, 스토리지 챔버(9)로 들어가는 물의 양에 따라 토출량의 조절이 가능하다.

[0047] 상기 "small part ejection"은 클로징 챔버(12)의 작동수가 스토리지 챔버(9)로 이동하는 시간이며, 이에 따라 배출시간이 결정된다. 즉, "small part ejection"은 배출구의 개폐를 조절하는 시간으로 볼 수 있으며, "small part ejection"이 길수록 개방 시간이 짧아 토출량이 적고, "small part ejection"이 짧을수록 개방 시간이 길어 토출량이 많아진다.

[0048] 이어서, 연속적으로 스토리지 챔버(9)의 작동수가 드레인 노즐(drain nozzle)(8)을 통해 드레인 됨과 동시에 클로징 작동수 밸브(14)가 개방되고, 클로징 챔버(12)에 다시 작동수로 채워지며 슬라이딩 피스톤(11)이 상승하여 재밀착한다.

[0049] 위와 같은 과정이 반복되면서 유산균 균체의 분리가 행해진다.

[0050] 한편, 후드 플러싱(hood flushing)은 균체 분리 후 균체 배출 직전에 농축액의 원활한 흐름을 위해 후드 플러싱

라인(16)을 통해 공급되는 정제수로 보울의 외벽을 세척하는 과정을 의미한다. 상기 후드 플러싱을 행하는 경우, 배출되는 분리 유산균 균체가 희석되어 농축율이 하락할 수 있다.

[0051] 본 발명에서 원심분리 방법에 의해 유산균을 농축할 때에 농축율에 영향을 미칠 수 있는 분리 조건으로는, 토출량, 유량, 배출간격(discharging interval), small part ejection (pre-filling time), 및 후드 플러싱(hood flushing)의 조건 등이 있다.

[0052] 상기 "토출량"은 유산균 배양액의 분리를 시작하여 배출간격(Discharging interval) 후 유산균 균체가 배출될 때의 양을 의미한다.

[0053] 상기 "유량(ℓ/h)"은 유산균 배양액에 대하여 단위시간 동안 분리목적으로 원심분리기에 유입되는 양을 의미한다.

[0054] 상기 배출간격은 배양액 분리를 시작하여 분리된 유산균 균체가 배출될 때까지의 소요시간을 의미한다.

[0055] 상기 후드 플러싱은 균체 배출 직전에 농축액의 원활한 흐름을 위해 정제수로 보울의 외벽을 세척하는 과정을 의미하며, 이에 의해 배출되는 분리 유산균 균체가 희석되어 농축율이 하락할 수 있다.

[0056] 상기 small part ejection (pre-filling time)은 스토리지 챔버(9)의 수위에 의해 슬라이딩 피스톤(11)이 하강되고 배출되는 때에, 클로징 챔버(12)에서 스토리지 챔버(9)로 작동수가 공급되는 시간을 의미하며, 스토리지 챔버(9)에 작동수를 채우는 시간이 짧을수록 보울의 개방시간이 길어지게 된다.

[0057] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 원심분리 방법에 의해 유산균을 농축할 때에 1회 토출량은 2 - 10 kg이고, 보다 바람직하게는 2.0 - 5.5 kg이다.

[0058] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 원심분리 방법에 의해 유산균을 농축할 때에 유량은 800 - 2000 L/hr이고, 보다 바람직하게는 1,200 - 1,600 L/hr이다.

[0059] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 원심분리 방법에 의해 유산균을 농축할 때에 배출간격은 350 - 640s이고, 보다 바람직하게는 390 - 600s이다.

[0060] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 원심분리 방법에 의해 유산균을 농축할 때에 Small part ejection은 4,000 - 10,000 ms이고, 보다 바람직하게는 6,000 - 9,000 ms이다.

[0061] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 원심분리 방법에 의해 유산균을 농축할 때에 후드 플러싱(Hood Flushing) 기능을 차단할 수 있다.

[0062] 동결보호제

[0063] 본 발명의 방법에서 유산균을 동결건조 하여 유산균의 저장 안정성을 증진시킬 수 있다. 동결건조 처리를 위해 농축된 유산균 균체에 동결보호제를 첨가하여 혼합 및 균질화한다. 본 발명에서 동결보호제는 동결보호제가 포함된 수용액 형태로 사용될 수 있다.

[0064] 본 발명의 방법에서 사용할 수 있는 동결보호제는 트레할로스, 말토덱스트린, 만니톨, 및 솔비톨로 이루어지는 군에서 선택된 1종 또는 이들의 혼합물을 사용할 수 있다. 바람직하게는 동결보호제는 트레할로스, 말토덱스트린, 만니톨 및 솔비톨로 이루어지는 혼합물을 사용할 수 있다.

[0065] 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.

[0066] 상기 동결보호제 수용액은 유산균 균체 대비 적절한 양을 첨가하여 사용할 수 있으며, 바람직하게는 농축된 유산균 균체 중량 대비 0.1 - 50중량%, 0.1 - 40중량%, 0.1 - 30중량%, 0.1 - 20중량%, 또는 0.1 - 15중량%의 범위로 첨가하여 사용할 수 있다.

[0067] 단백질 코팅

[0068] 본 발명에서 유산균의 동결건조생존율, 내산성 및 내담즙성을 향상시키기 위해 농축된 유산균을 단백질로 코팅할 수 있다.

[0069] 단백질 코팅을 위해 농축된 유산균 균체에 단백질 성분을 첨가한 후 혼합 및 균질화한다.

[0070] 본 발명에서 단백질 성분은 단백질 성분이 포함된 수용액 형태로 사용할 수 있다.

[0071] 본 발명에서 유산균의 코팅에 사용될 수 있는 단백질은 탈지분유(skim milk), 대두분리단백(ISP), 유청단백, 및 아미노산으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 사용할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0072] 상기 아미노산은 아르기닌(Arginine), 글루탐산(Glutamic acid), 라이신(Lysine), 아스파르트산(Aspartic acid), 아스파라진(Asparagin), 글루타민(Glutamine), 프롤린(Proline), 또는 페닐알라닌(phenylalanine)일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0073] 상기 단백질 성분으로서 탈지분유, 대두분리단백, 및 유청단백은 단백질 분해효소 처리하여 가수분해된 형태를 사용할 수 있다.

[0074] 본 발명에서 단백질 코팅에 사용될 수 있는 단백질 성분은 탈지분유, 아르기닌, 또는 아스파라진일 수 있다.

[0075] 본 발명에서 단백질 코팅은 단백질 성분이 1 - 90중량%, 1 - 80중량%, 1 - 75중량%, 1 - 70중량%, 1 - 65중량%, 1 - 60중량%, 또는 1 - 50중량% 포함된 수용액의 형태로 제조하여 농축된 유산균 균체에 첨가한 후 혼합 및 균질화하는 방식으로 행할 수 있다.

[0076] 상기 단백질 수용액은 유산균 균체 중량 대비 0.1 - 50중량%, 0.1 - 40중량%, 0.1 - 30중량%, 0.1 - 20중량%, 또는 0.1 - 15중량%의 범위로 첨가할 수 있다.

[0077] 다당류 코팅

[0078] 본 발명에서 유산균의 동결건조생존율, 내산성 및 내담즙성을 향상시키기 위해 농축된 유산균을 다당류로 코팅할 수 있다.

[0079] 다당류 코팅을 위해 농축된 유산균 균체에 다당류 성분을 첨가한 후 혼합 및 균질화한다.

[0080] 본 발명에서 다당류 성분은 다당류가 포함된 수용액 형태를 사용할 수 있다.

[0081] 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.

[0082] 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.

[0083] 상기 수용성식이섬유는 폴리덱스트로즈(Polydextrose), 글루코만난(Glucomannan), 베타-글루칸(β-glucan), 펙틴(Pectin), 또는 알긴산(Alginic acid)일 수 있다.

[0084] 상기 불용성식이섬유는 치커리추출분말, 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 리그닌 또는 이눌린일 수 있다.

[0085] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 다당류 코팅에 사용되는 다당류는 잔탄검, 치커리추출분말, 셀룰로오스, 또는 리벤일 수 있다.

[0086] 본 발명에서 다당류 코팅은 다당류 성분이 1 - 80중량%, 1 - 75중량%, 1 - 70중량%, 1 - 65중량%, 1 - 60중량%, 또는 1 - 50중량% 포함된 수용액의 형태로 제조하여 농축된 유산균 균체에 첨가한 후 혼합 및 균질화하는 방식으로 행할 수 있다.

[0087] 상기 다당류 수용액은 유산균 균체 중량 대비 0.1 - 50중량%, 0.1 - 40중량%, 0.1 - 30중량%, 0.1 - 20중량%, 또는 0.1 - 15중량%의 범위로 첨가할 수 있다.

[0088] 동결건조

[0089] 상술한 바와 같이, 농축된 유산균 균체에 동결보호제, 단백질 성분, 및 다당류 성분을 첨가하고 혼합 및 균질화한 유산균 균체를 동결건조한다.

[0090] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 상기 설명된 방법에 의해 제조된 단백질-다당류 이중코팅을 갖는 유산균을 제공한다.

[0091] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 상기 설명된 방법에 의해 제조된 단백질-다당류 이중코팅을 갖는 유산균을 포함하는 식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0093] 본 발명은 배양한 유산균의 균체를 원심분리에 의해 농축시켜 조밀하게 회수한 후 동결보호제를 첨가하고, 단백질 및 다당류에 의해 이중코팅 하여 단백질-다당류 이중코팅된 유산균을 제조하는 방법에 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

[0095] 도 1은 코팅하지 않은 Latobacillus plantarum 균체의 SEM 사진이다.

도 2는 Latobacillus plantarum을 본 발명의 코팅 방법에 따라 이중 코팅한 후의 균체 SEM 사진이다.

도 3a은 디스크 타입의 고속 원심분리기의 단면도이다.

도 3b는 디스크 타입의 고속 원심분리기의 프리필 워터(10), 슬라이딩 피스톤(11), 클로징 챔버(12)를 보다 상세히 보여주는 부분 단면도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0096] 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.

[0098] **실시예**

[0100] **실시예 1: 농축율에 따른 수득율 실험**

[0101] 1-1. 분리조건에 따른 농축율 실험

[0102] 유산균 배양 후 분리 시 분리조건에 따른 농축율을 알아보기 위해 다음과 같이 실험하였다. Lactobacillus plantarum CBT-LP3 발효액을 별도의 저장탱크로 이송하여 25℃이하로 냉각한 후 디스크 타입(Disc type)의 고속 원심분리기를 이용하여 분리조건에 따른 농축율을 확인하였다. 통상적으로 가동시 배출(Discharging) 전 농축액(Cell mass)의 원활한 흐름을 위해 정제수로 보울(bowl)을 플러싱(flushing)하는 기능을 사용한다. 그러나 보다 조밀(compact)하게 균체를 확보하기 위해서는 농축율을 높여야 하고, 이는 후드 플러싱(Hood Flushing) 기능을 활용하는 방법이 있다. 유량은 유속에 따라 균체 분리능이 좌우되고 이에 따라 여액으로 유실되는 손실율이 최소로 유지하는 것이 필요하다. 유량이 낮으면 분리시간이 길어 이로 인하여 또한 분리중 생균의 사멸에 의한 손실이 발생된다.

[0104] (a) 농축율 1차 실험

[0105] 분리기(separator)를 7,200 rpm으로 가동하였다. 분리 전 산성 세척제(레라시드CIP, 대성C&S주식회사)를 이용해 분리기 CIP(Separator CIP)를 80℃로 1시간 진행하였다. 이 때 분리기 CIP는 Back pressure 2.9~3.2kgf/cm^2, 유량 4,000~6,000ℓ/h 조건으로 가동하였다. CIP 종료 후에는 Separator Chiller수를 1.2 ~ 2.0 kgf/cm^2 조건으로 순환시켜 25℃이하로 냉각 유지하였다. 정제수를 이용해 최대유량 조건하에 분리기 내부를 세정하였다(유량: 최대, 배출시간(Discharging Time): 100s, 토출: 8회) 세정한 분리기를 이용해 7,200 rpm으로 배양액을 원심분리하였다. 1차 실험 결과, 농축율은 4.0%, 처리액량은 1,200ℓ, 토출량은 48kg (8회 토출), Small part ejection 은 5,000ms, 유량은 1,200ℓ/h, 배출 간격(Discharging interval)은 390s이었다.

[0107] (b) 농축율 2차 실험

[0108] 상기 농축율 1차 실험 조건에서 Small part ejection 5,000ms을 6,000ms로 조정하여 농축율 2차 실험을 행하였다. 2차 실험결과 농축률은 3.5%, 처리액량은 1,200ℓ, 토출량은 42kg(8회토출), Small part ejection은 6,000ms, 유량은 1,200ℓ/h, 배출간격(Discharging interval)은 390s이었다.

[0110] (c) 농축율 3차 실험

[0111] 농축율을 높이기 위해, 상기 농축율 2차 실험 조건에서 유량을 1,200ℓ/h을 1,600ℓ/h으로, 배출간격(Discharging interval)을 390S을 410s으로 조정하여 농축율 3차 실험을 행하였다. 3차 실험결과 농축률은 3.0%, 처리액량은 1,200ℓ, 토출량은 36kg(7회 토출), Small part ejection은 6,000ms, 유량은 1,600ℓ/h, 배

출간격(Discharging interval)은 410s 이었다.

[0113] (d) 농축율 4차 실험

[0114] 농축율을 높이기 위해, 상기 농축율 3차 실험 조건에서 배출간격(Discharging interval) 410S을 450s으로 조정하여 농축율 4차 실험을 행하였다. 4차 실험 결과 농축율은 2.5%, 처리액량은 1,200ℓ, 토출량은 30kg(6회토출), Small part ejection은 6,000ms, 유량은 1,600ℓ/h, 배출간격(Discharging interval)은 450s이었다.

[0116] (e) 농축율 5차 실험

[0117] 상기 농축율 4차 실험에서 농축율을 2.0% 이상으로 높이기 위해, 후드 플러싱(Hood flushing) 기능을 통제하고, Small part ejection을 7,000ms으로, 유량을 1,600ℓ/h으로, 배출간격(Discharging interval)을 450S로 조정하여, 농축율 5차 실험을 행하였다. 5차 실험결과, 농축율은 2.0%, 처리액량은 1,200ℓ, 토출량은 24kg (6회토출), Small part ejection은 7,000ms, 유량은 1,600ℓ/h, 배출간격(Discharging interval)은 450s이었다.

[0119] (f) 농축율 6차 실험

[0120] 상기 농축율 5차 실험에서 농축율을 1.5% 이상으로 높이기 위해, Small part ejection을 8,000ms으로, 배출간격(Discharging interval)을 500S으로 조정하여, 농축율 6차 실험을 행하였다. 6차 실험결과, 농축율은 1.5%, 처리액량은 1,200ℓ, 토출량은 18kg (6회토출), Small part ejection은 8,000ms, 유량은 1,600ℓ/h, 배출간격(Discharging interval)은 500s이었다.

[0122] (g) 농축율 7차 실험

[0123] 농축율을 1.0% 이상으로 높이기 위해, 상기 농축율 6차 실험에서 Small part ejection을 9,000ms으로, 배출간격(Discharging interval) 640S으로 조정하여, 농축율 7차 실험을 행하였다. 7차 실험결과, 농축율은 1.0%, 처리액량은 1,200ℓ, 토출량은 12kg (5회토출), Small part ejection은 9,000ms, 유량은 1,600ℓ/h, 배출간격(Discharging interval)은 640s이었다.

[0124] 아래의 표 1에 유산균 분리시 농축율 실험에서 각 분리조건과 농축율을 정리하였다. 농축율은 분리된 균체량/배양액 중량 X 100(%)으로 산출하였다.

표 1

[0125]

분리조건에 따른 농축율							
분리조건농축율	1.0%	1.5%	2.0%	2.5%	3.0%	3.5%	4.0%
Hood Flushing	-	-	-	○	○	○	○
유량 (ℓ/h)	1,600	1,600	1,600	1,600	1,600	1,200	1,200
Discharging interval (s)	640	500	450	450	410	390	390
Small part ejection (ms)	9,000	8,000	7,000	6,000	6,000	6,000	5,000
1회 토출량 (kg)	2.40	3.00	4.00	5.00	5.15	5.25	6.00
Operating Water (kgf/cm^2)	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0

[0126] 1-2. 분리공정에서 농축율에 따른 농축 수득율

[0127] 농축 수득율은 배양액 분리 전/후의 생균수와 중량을 고려하여 동결 공정 후의 생존율을 확인하여 산출하였다.

[0128] [분리후 생균수 x 분리된 균체중량]/[분리 전 생균수 x 배양액 중량] x 100%

표 2

[0129]

농축율에 따른 농축 수득율							
	1.0%	1.5%	2.0%	2.5%	3.0%	3.5%	4.0%
LP	87%	***95%***	86%	83%	80%	78%	75%
SL	85%	***94%***	86%	81%	78%	75%	72%

BG	84%	91%	***94%***	88%	85%	82%	79%

[0130] 각 균주별 분리 후 수득하는 균체(cell mass)가 어느 수준까지는 조밀(compact)할수록 농축 수득율이 증가하였다.

[0132] **실시예 2: 이중코팅시 코팅제에 따른 동결건조 생존율, 내산성 및 내담즙성 측정**

[0133] 2-1. 1차 단백질 코팅제 선정

[0134] 먼저, 동결시간과 수득율을 확인하기 전에 1차 단백질 코팅제, 2차 다당류 코팅제 선정 실험을 진행하였다.

[0135] 상기 실시예 1에서 제조한 Lactobacillus plantarum CBT-LP3 1.5% 농축액에 비코팅, 동결보호제, 동결보호제에 단백질 코팅제를 첨가하는 방법으로 구분하여 실험하였다. 동결보호제는 트레할로스 3kg, 말토덱스트린 1kg, 만니톨 1kg, 솔비톨 1kg으로 조성된 동결보호제 수용액을 10L 제조하여 균체중량(농축액) 대비 10%를 투입하고, 단백질 코팅제는 1 - 50%의 단백질 수용액으로 제조하여 균체 중량 대비 10%를 휘퍼가 장착된 버티칼 혼합기에 투입 후 혼합 및 균질화하여 균체 표면에 단백질 코팅이 되도록 하였다. 이후 -40℃ 예비동결고에서 급속동결을 하고 동결건조하여 분말화 시킨 후 동결건조생존율, 내산성 및 내담즙성을 분석하였다. 하기 표 3에 분석 결과를 나타내었다.

표 3

[0141]

1차 단백질 코팅목적 코팅제 선정 실험 결과							
구분		CBT-LP3			CBT-SL6		
		동결건조 생존율	내산성	내담즙성	동결건조 생존율	내산성	내담즙성
비코팅		30.2%	49.5%	50.4%	*26.7%*	*26.7%*	*23.2%*
동결 보호제	-	50.3%	59.7%	60.3%	*42.4%*	*42.1%*	*32.2%*
	탈지분유	***82.8%***	***74.5%***	***72.0%***	***73.5%***	***51.5%***	***50.9%***
	대두분리단백	70.1%	70.1%	69.9%	*62.1%*	*48.7%*	*48.1%*
	유청단백	69.4%	65.4%	59.3%	*58.9%*	*42.2%*	*41.6%*
	Arginine	***83.2%***	***73.5%***	***72.1%***	***72.8%***	***52.6%***	***53.3%***
	Lysine	68.4%	65.8%	62.1%	*60.3%*	*55.5%*	*50.8%*
	Asparagine	***81.9%***	***72.9%***	***72.5%***	***72.5%***	***51.9%***	***52.6%***
	Glutamine	71.2%	65.6%	63.7%	*47.3%*	*50.1%*	*41.2%*
	Glutamic acid	74.5%	66.6%	60.2%	*54.1%*	*44.4%*	*42.0%*
	Aspartic acid	68.6%	62.3%	62.0%	*49.3%*	*51.5%*	*40.1%*

[0142] 상기 표 3에서 보는 바와 같이 탈지분유, 아르기닌(Arginine), 아스파라진(Asparagine)으로 단백질 코팅하였을 때 비코팅 또는 동결보호제, 타 단백질보다 우수한 동결건조생존율, 내산성, 내담즙성을 확보할 수 있었다.

[0144] 2-2. 2차 다당류 코팅제 선정

[0145] 실시예 1에서 확보한 Lactobacillus plantarum CBT-LP 1.5% 농축액에 동결보호제, 단백질 코팅제, 다당류 코팅제를 첨가하여 다당류 코팅제 선정을 위한 실험을 진행하였다. 동결보호제는 트레할로스 3kg, 말토덱스트린 1kg, 만니톨 1kg, 솔비톨 1kg으로 조성된 동결보호제 수용액을 10L를 제조하여 균체중량 대비 10%를 투입하고, 단백질 코팅제는 탈지분유 5kg으로 조성된 단백질 수용액을 10L로 제조하여 균체중량 대비 10%를 휘퍼가 장착된 버티칼 혼합기에 투입후 혼합 균질화하여 균체표면에 1차 단백질 코팅이 되도록 하였다. 이후 1 - 10%의 다당류 수용액을 제조하여 균체중량 10% 투입 후 균질화하여 2차 다당류 코팅을 진행한 후 -40℃ 예비동결고에 급속동결을 하고 동결건조하여 분말화 시킨 후 동결건조생존율, 내산성, 내담즙성을 분석하였다. 하기 표 4에 분석결과를 나타내었다.

표 4

다당류 코팅 목적 코팅제 선정 실험 결과								
			CBT-LP3			CBT-SL6		
			동결건조 생존율	내산성	내담즙성	동결건조 생존율	내산성	내담즙성
동결보호제	-	-	50.3%	59.7%	60.3%	42.4%	42.1%	32.2%
	탈지분유	-	82.8%	74.5%	72.0%	73.5%	51.5%	50.9%
		Xantan Gum	**92.1%**	**93.2%**	**92.8%**	**83.6%**	**72.5%**	**73.2%**
		Arabic Gum	88.8%	82.3%	82.1%	79.6%	61.6%	60.3%
		Guar Gum	82.6%	76.8%	72.4%	73.6%	52.5%	52.0%
		Gellan Gum	84.6%	75.6%	74.2%	75.6%	53.1%	55.6%
		Karaya Gum	85.7%	80.1%	78.6%	73.5%	60.9%	54.3%
		Locust Bean Gum	83.4%	82.6%	72.1%	76.8%	55.4%	51.3%
		Pectin	87.6%	80.0%	76.6%	75.1%	63.3%	61.6%
		Alginic acid	86.3%	78.6%	76.8%	74.3%	52.5%	56.1%
		난소화성말토덱스트린	85.5%	84.5%	74.4%	75.6%	60.3%	52.1%
		치커리추출분말	**91.9%**	**90.1%**	**91.5%**	**82.6%**	**70.3%**	**71.3%**
		셀룰로오스	**94.3%**	**92.6%**	**91.9%**	**83.1%**	**71.6%**	**72.0%**
		이눌린	83.9%	85.3%	78.9%	78.1%	60.4%	55.1%
		Levan	**92.6%**	**93.0%**	**92.4%**	**81.9%**	**72.3%**	**71.4%**
		전분	84.4%	79.6%	73.6%	74.6%	60.0%	55.2%
		저항성전분	83.7%	77.7%	73.1%	75.4%	59.9%	51.1%

[0147] 상기 표 4에서 보는 바와 같이 잔탄검(Xantan Gum), 치커리추출분말, 셀룰로오스, 리벤(Levan) 다당류 코팅제를 사용하여 이중코팅하였을 때 우수한 동결건조생존율, 내산성, 내담즙성을 확보할 수 있었다.

[0149] **실시예 3: 동결공정에서 농축율에 따른 동결시간과 수득율**

[0150] 상기 실시예 1에서 확보한 Lactobacillus plantarum CBT-LP3 1.5%, Lactococcus Lactis CBT-SL6 1.5%, Bifidobacterium Longum CBT-BG7 2.0% 농축액을 휘퍼가 장착된 버티칼 혼합기 내에서 동결보호제와 균질화하고, 실시예 2에서 선정한 단백질로 1차 코팅, 다당류 코팅제로 2차 코팅을 수행하여 -40℃ 예비동결고에서 급속동결한 후 그에 따른 동결시간과 동결수득율 경향을 아래와 같이 확인하였다.

표 5

[0151]

Lactobacillus plantarum CBT-LP3							
농축율	**1.0%**	**1.5%**	**2.0%**	**2.5%**	**3.0%**	**3.5%**	**4.0%**
소요시간	6hrs	6.5hrs	7hrs	7.5hrs	8hrs	8.5hrs	9hrs
동결 수득율	92%	**94%**	91%	88%	85%	81%	78%

표 6

[0152]

Lactococcus Lactis CBT-SL6							
농축율	1.0%	1.5%	2.0%	2.5%	3.0%	3.5%	4.0%
소요시간	7hrs	7.5hrs	8hrs	8.5hrs	9hrs	9.5hrs	10hrs
동결 수득율	84%	83%	80%	76%	74%	71%	69%

표 7

[0153]

Bifidobacterium Longum CBT-BG7							
농축율	1.0%	1.5%	2.0%	2.5%	3.0%	3.5%	4.0%
소요시간	7hrs	7.5hrs	8hrs	8.5hrs	9hrs	9.5hrs	10hrs
동결 수득율	82%	80%	80%	78%	76%	75%	73%

[0154] 동결 수득율은 동결 전/후의 생균수와 중량을 고려해 동결 공정 후의 생존율을 확인하여 산출하였다.

[0155] [동결 후 생균수 x 동결 후 중량]/[동결 전 생균수 x 동결 전 중량] x 100%

[0156] 균체(cell mass)를 조밀(compact)하게 농축할수록 트레이(tray)당 분주량이 감소하고, 증발시켜야 할 수분 량도 적게 된다. 동결과정에서 삼투압 차이에 의한 수분 유출로 동결속도가 빠르다. 빙결정이 작고 균일하며 세포형태의 변화도 적었다(=동결중 유산균 세포막 손상 적다) 동결과정의 변성도 적게 일어난다. 동결시간이 길어짐에 따라 동결수득율은 하락하는 경향을 보였다.

[0158] **실시예 4: 동결건조공정에서 농축율에 따른 동결 생존율, 내산성, 내담즙성**

[0159] 상기 실시예 3에서 확보한 예비동결된 시료를 동결건조기(일신바이오베이스, IlShin Lab., 100Kg)에서 동결건조하여 분말화시킨 후 수분, aw, 동결건조생존율, 내산성, 내담즙성 경향을 확인하였다.

[0160] 건조 수득율(= 동결건조 생존율)은 동결건조 전/후의 생균수와 중량을 고려해 동결건조 공정 후의 생존율을 확인하였다.

[0161] [동결건조 후 생균수 x 동결건조 후 중량]/[동결건조 전 생균수 x 동결건조 전 중량] x 100%

[0162] 생균수 분석은 희석수 9 ㎖에 배양액 1㎖ 또는 원말 1g을 취하여 vortexing을 실시한 후 10진 희석법으로 생균수를 분석하였다. 내산성 분석은 활성화 시료 0.1g + 9.9 ㎖ pH 2.1 인공위액에 투입하여, 2시간 반응 후 생균수를 분석하여 행하였다. 내담즙성 분석은 활성화 시료 0.1g + 9.9㎖ 0.5% oxgall broth, 2시간 반응 후 생균수 분석을 행하였다.

표 8

[0163]

Lactobacillus plantarum CBT-LP3							
	1.0%	*1.5%*	2.0%	2.5%	3.0%	3.5%	4.0%
수분	1.0%	*1.3%*	1.5%	1.6%	1.8%	2.1%	2.6%
aw	0.004	*0.016*	0.023	0.029	0.035	0.042	0.063
동결건조 생존율	85%	*92%*	81%	77%	73%	70%	68%
내산성	88%	*90%*	88%	86%	83%	82%	81%

내담즙성	92%	***94%***	94%	92%	88%	87%	85%

표 9

[0164]

Lactococcus Lactis CBT-SL6							
	1.0%	***1.5%***	**2.0%**	**2.5%**	**3.0%**	**3.5%**	**4.0%**
수분	4.2%	***3.6%***	3.3%	3.0%	2.7%	2.3%	1.9%
aw	0.163	***0.106***	0.091	0.083	0.074	0.053	0.030
동결건조 생존율	83%	***81%***	77%	75%	73%	70%	66%
내산성	59%	***72%***	68%	66%	65%	63%	62%
내담즙성	55%	***73%***	68%	66%	65%	63%	60%

표 10

[0165]

Bifidobacterium Longum CBT-BG7							
	1.0%	**1.5%**	***2.0%***	**2.5%**	**3.0%**	**3.5%**	**4.0%**
수분	3.2%	2.7%	***2.3%***	1.9%	1.6%	1.4%	1.1%
Aw	0.081	0.063	***0.051***	0.04	0.031	0.023	0.012
동결건조 생존율	81%	78%	***78%***	76%	74%	71%	68%
내산성	49%	54%	***60%***	58%	57%	55%	55%
내담즙성	65	71%	***80%***	78%	79%	78%	75%

[0166] 상기 표 8, 표 9 및 표 10에서 나타난 바와 같이, 유산균 농축율이 1.5%, 또는 2.0%인 경우 동결건조생존율, 내산성, 내담즙성이 우수한 특성을 나타냈다.

[0168] 농축률이 높을수록 트레이(Tray)에 분주량이 적고, 높이가 낮게 형성된다. 또한, 건조과정에서 균체에 가해지는 열량이 적어 동결건조 생존율이 높으며, 동결건조에 의한 세포 손상(cell damage)가 적고 잔여 유리수 및 결합수 제거가 용이하다. 또한, 동결건조 생존율을 위해서 수분, aw는 필요 조건이나 너무 높으면 기능성(내산성, 내담즙성)은 감소한다. 건조과정에서 과탈수는 동결건조 생존율과 기능성(내산성, 내담즙성)에 좋지 않다.

부호의 설명

[0170]

1: 유입라인

2: 여액라인

3: 구심펌프(Centripetal pump)

4: 디스크 스택(disc stack)

5: 홀딩 스페이스(Holding space)

6: 배출구(Ejection port)

7: 환상 밸브(Annular valve)

8: 드레인 노즐(Drain nozzle)

9: 스토리지 챔버(Storage chamber)

10: 프리필 워터(Prefilling water)

11: 슬라이딩 피스톤(Sliding piston)

12: 클로징 챔버(Closing chamber)

13: 컨트롤 유닛(Control unit)

14: 클로징 작동수 밸브(Closing operating water valve)

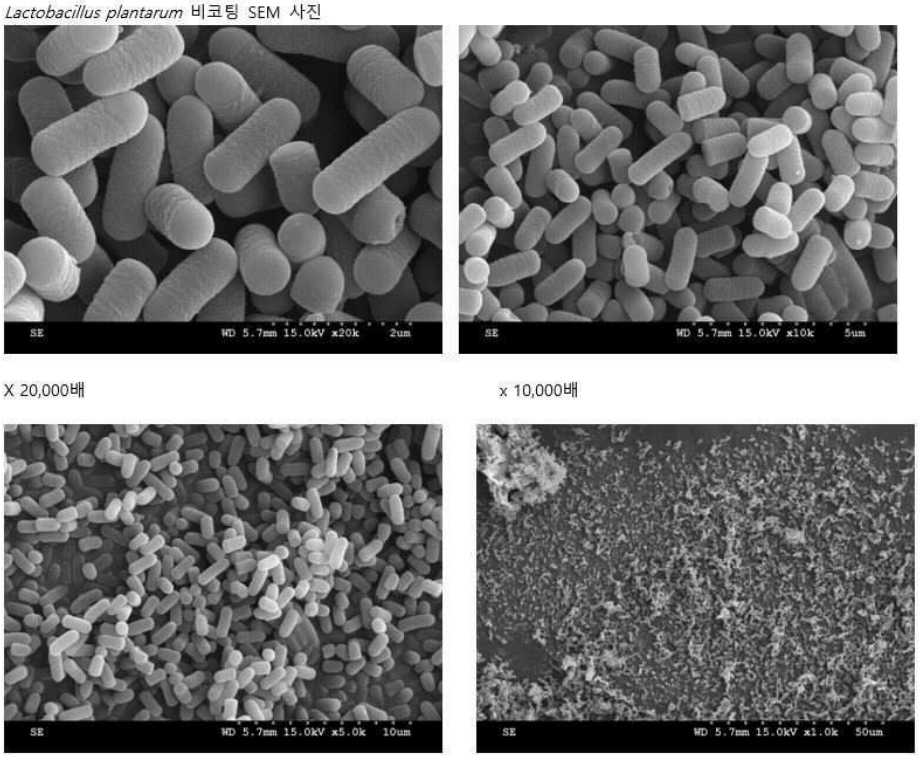
15: 오프닝 작동수 밸브(Opening operating water valve)

16: 후드 플러시 라인(Hood flush line)

도면

도면1

Lactobacillus plantarum 비코팅 SEM 사진

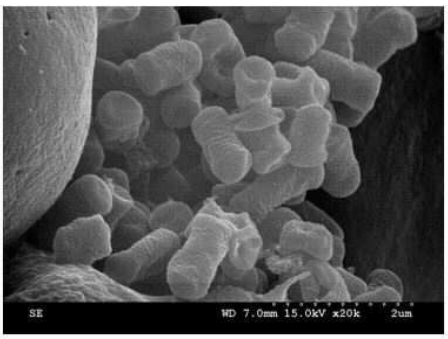


X 20,000배 x 10,000배

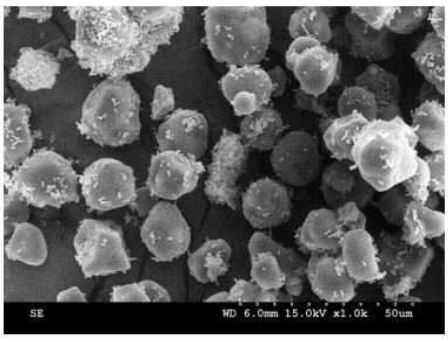
x 5,000배 x 1,000배

도면2

Lactobacillus plantarum 이중 코팅 SEM 사진 - 내부

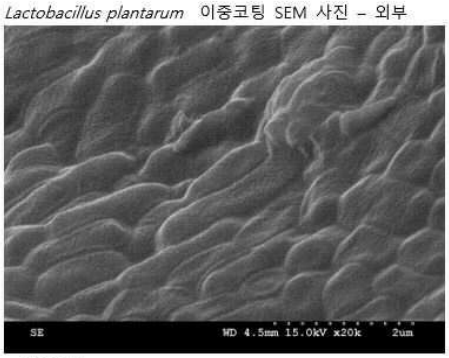


x 20,000배

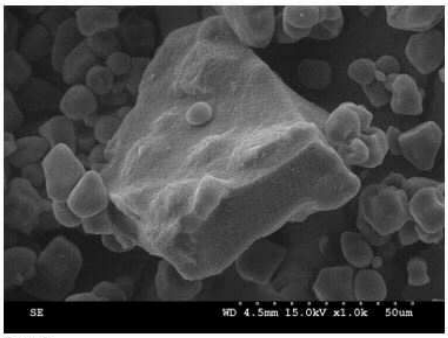


x 1,000배

Lactobacillus plantarum 이중코팅 SEM 사진 – 외부

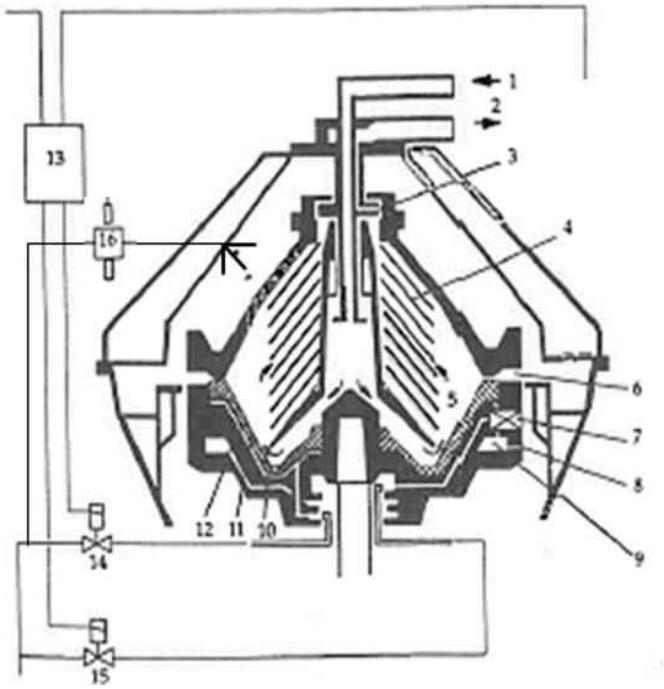


x 20,000배



x 1,000배

도면3a



도면3b

