



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0032136
(43) 공개일자 2017년03월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) A23L 33/135 (2016.01)
A23L 5/00 (2016.01) A61K 35/74 (2015.01)
A61K 47/36 (2017.01) C08B 37/08 (2006.01)
C08L 5/08 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2013.01)
A23L 33/135 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2015-0129986
(22) 출원일자 2015년09월14일
심사청구일자 2015년09월15일

(71) 출원인
일동바이오사이언스(주)
경기도 평택시 포승읍 포승공단로 17 ()

(72) 발명자
이승훈
경기도 용인시 기흥구 기흥로116번길 7, 101동
1403호 (신갈동, 새릉골풍림아파트)

강대중
경기도 용인시 기흥구 사은로126번길 46, 309동
404호 (보라동, 현대모닝사이드1차아파트)

강재훈
서울특별시 서초구 강남대로61길 23, 407호 (서초
동, 현대성우주상복합아파트)

(74) 대리인
이희숙, 김석만

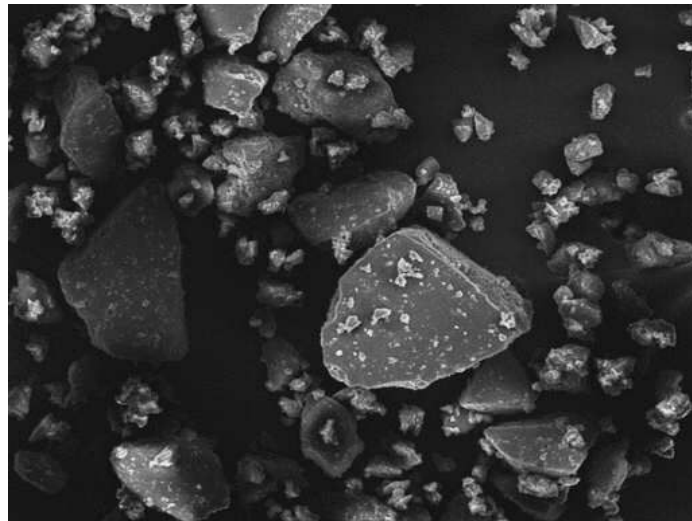
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **기능성 수화 히알루론산 및 이를 이용한 장 점막부착능이 우수하고 선택적 길항작용을 하는 코팅 유산균의 제조방법**

(57) 요약

본 발명은 기능성 수화 히알루론산 및 이를 이용한 장 점막부착능이 우수하고 선택적 길항작용을 하는 5세대 코팅 유산균의 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 유산균 발효성분이 천연고분자 물질인 히알루론산에 포집된 기능성 수화 히알루론산 및 이를 이용하여 코팅 유산균을 제조하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 기능성 수화 히알루론산을 이용하여 코팅된 4중코팅 유산균은 수용성 폴리머, 기능성 수화 히알루론산, 다공성 입자를 가지는 코팅제 및 단백질로 4중 코팅되어 장 점막부착능이 우수하고 장내 유해세균에 대해서는 항균작용을 나타내고 장내 유익균에 대해서는 생장 촉진역할을 하는 효과가 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23P 20/00 (2016.08)

A61K 35/74 (2013.01)

A61K 47/36 (2013.01)

C08B 37/0072 (2013.01)

C08L 5/08 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/3204 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

유산균 배양액 100 중량부 대비 히알루론산을 0.01 중량부 내지 1 중량부의 비율로 첨가하고 교반하여 녹인후, 농축하는 방법에 의해 제조된 유산균 발효물질이 포집된 기능성 수화 히알루론산.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 유산균 배양액은 다음과 같은 단계에 의해 제조되는 것을 특징으로 하는 기능성 수화 히알루론산:

- (a) 유산균 배양액을 110 내지 135℃에서 3 내지 7분간 가압열처리하는 단계;
- (b) 상기 (a) 단계에서 가압열처리된 배양액을 25 내지 35℃로 냉각하는 단계;
- (c) 상기 (b) 단계에서 냉각된 배양액을 105 내지 115℃에서 8 내지 12분간 가압열처리하는 단계;
- (d) 상기 (c) 단계에서 가압열처리된 배양액을 25 내지 35℃로 냉각하는 단계;
- (e) 상기 (d) 단계에서 냉각된 배양액을 75 내지 85℃에서 20 내지 40분간 열처리한 후 25 내지 35℃로 최종냉각하는 단계.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 유산균은 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.), 바이셀라 속(*Weissella* sp.)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유산균인 것을 특징으로 하는 기능성 수화 히알루론산.

청구항 4

제1항 또는 제2항의 기능성 수화 히알루론산으로 코팅된 유산균.

청구항 5

- (a) 유산균에 수용성 폴리머를 혼합하여 1차 코팅하는 단계;
- (b) 상기 (a) 단계에서 1차 코팅된 유산균에 제1항의 기능성 수화 히알루론산을 혼합하여 2차 코팅하는 단계;
- (c) 상기 (b) 단계에서 2차 코팅된 유산균에 다공성 입자를 가지는 코팅제를 혼합하여 3차 코팅하는 단계; 및
- (d) 상기 (c) 단계에서 3차 코팅된 유산균에 단백질을 혼합하여 4차 코팅하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 4중 코팅된 유산균의 제조방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 (a) 단계에서 수용성폴리머는 카르복시메틸셀룰로오스(carboxymethyl cellulose, CMC), 하이드록시에틸셀룰로오스(hydroxyethylcellulose, HEC), 잔탄검(xanthan gum, XG), 구아검(guar gum, GG), 폴리

비닐피롤리돈 (polyvinylpyrrolidone, PVP), 카보폴(carbopol), 소듐알기네이트(sodium alginate), 프로필렌 글리콜 알기네이트(propylene glycol alginate)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 4중 코팅된 유산균의 제조방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 (b) 단계에서 기능성 수화 히알루론산은 유산균 배양액 100 중량부 대비 히알루론산을 0.01 중량부 내지 1 중량부의 비율로 첨가하고 교반하여 녹인후 30 내지 60℃에서 감압농축하는 방법에 의해 제조된 유산균 발효물질이 포함된 것임을 특징으로 하는 4중 코팅된 유산균의 제조방법.

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 (c)단계에서 다공성 입자를 가지는 코팅제는 알지네이트(alginate), 말토덱스트린(maltodextrin,MD), 키토산(chitosan), 전분(starch), 폴리에틸렌글리콜(polyethyleneglycol, PEG), 트리아세틴(triacetin), 프로필렌 글리콜(propylene glycol), 아세틸트리에틸 시트레이트(acetyl triethyl citrate), 트리에틸 시트레이트(triethyl citrate), 또는 글리세린(glycerin)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 4중 코팅된 유산균의 제조방법.

청구항 9

제5항에 있어서, 상기 (d)단계에서 단백질은 탈지분유, 유청단백, 분리대두단백으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 4중 코팅된 유산균의 제조방법.

청구항 10

제5항에 있어서, 상기 유산균은 락토바실루스 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.), 비셀라 속(*Weissella* sp.)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 4중 코팅된 유산균의 제조방법.

청구항 11

제5항에 있어서, 상기 (a)단계에서 상기 수용성 폴리머는 유산균 배양액 100 중량부 대비 0.1중량부 내지 10중량부의 비율로 혼합하여 1차 코팅하는 단계;

상기 (b)단계에서 상기 히알루론산은 유산균 배양액 100 중량부 대비 0.01중량부 내지 0.5중량부의 비율로 혼합하여 2차 코팅하는 단계;

상기 (c)단계에서 상기 다공성 입자를 가지는 코팅제는 유산균 배양액 100 중량부 대비 0.1중량부 내지 10중량부의 비율로 혼합하여 3차 코팅하는 단계; 및

상기 (d)단계에서 상기 단백질은 유산균 배양액 100 중량부 대비 1중량부 내지 30중량부의 비율로 혼합하여 4차 코팅하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 4중 코팅된 유산균의 제조방법.

청구항 12

제5항의 제조방법으로 제조된 4중 코팅된 유산균.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 유산균은 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.), 비셀라 속(*Weissella* sp.)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 4중 코팅된 유산균.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 기능성 수화 히알루론산 및 이를 이용한 장 점막부착능이 우수하고 선택적 길항작용을 하는 코팅 유산균의 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 본 발명은 유산균 발효성분이 천연고분자 물질인 히알루론산에 포집된 “기능성 수화 히알루론산” 및 이를 이용하여 코팅 유산균을 제조하는 방법, 특히 수용성 폴리머, 기능성 수화 히알루론산, 다공성 입자를 가지는 코팅제 및 단백질로 코팅된 장 점막부착능이 우수하고 선택적 길항작용을 하는 기능성 코팅 유산균을 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인체의 장내에는 *bacteroides*, *eubacteria*, *bifidobacteria*, *lactobacilli* 등 400여종 이상의 미생물들이 서식하고 있다. 건강한 사람의 장에는 유산균으로 대표되는 유익균과 유해균이 균형(microflora)을 이루고 서식하고 있는데 유해환경, 비위생적인 음식섭취, 항생제 복용 등으로 장내균총이 교란되면서 유산균은 감소하고 대장균, 살모넬라 같은 유해균은 증가하게 된다.

[0003] 프로바이오틱스는 사람이나 동물의 위장관에 서식하면서 사람이나 동물에 유익한 효과를 나타내는 미생물체제로 *lactobacilli*, *bifidobacteria*, *enterococci* 등이 여기에 속한다.

[0004] 유산균의 장내 생리활성기능으로는 장내 세균총의 균형유지, 유해세균의 증식억제, 설사예방, 장내 상피세포보호, 독성물질의 흡수 저해, 발암 억제 등이 있다. 유산균이 프로바이오틱스로 작용하기 위해서는 장 점막세포에 결합하여 증식하면서 유해세균에 대한 길항력이 있어야 한다.

[0005] 유산균이 숙주의 장 점막에 부착되기 위해서는 숙주의 상재균총과의 경쟁을 통해 부착을 해야한다. Nurmi와 Rantala는 유해 미생물의 경쟁적 배제(competitive exclusion)를 처음으로 도입하였으며 갓 부화된 병아리에게 닭의 장 내용물을 접종한 결과, 살모넬라 감염이 감소하였다고 보고하였다. 닭의 정상 장내 미생물들은 장벽 표면 세포의 흡착부분에 더 잘 부착되었고, 지방산과 다른 항균성 물질을 생산하였으며, 영양소를 위한 경쟁 등에서 유리한 것으로 보고하였다.

[0006] 유산균은 숙주의 장 점막에 흡착하는 특성이 있으며 이는 유산균의 세포벽 구성성분인 lipoteichoic acid, 다당류, 단백질 등이 장 점막에 부착에 관여하기 때문인 것으로 알려지고 있다.

[0007] 유산균의 세포구조는 세포막과 그 위를 둘러싼 세포벽으로 구성된다. 세포벽은 기능적으로 유산균의 모양을 나타내며 세포막을 둘러싸 외부환경으로부터 유산균을 보호한다. 세포벽의 4가지 중요성분에는 펩티도글리칸, 테이코익산, S-layer, 다당류가 있으며, 장 점막의 extracellular matrix (ECM)와의 결합에 관여한다. ECM은 상피세포와 내피세포의 근간이 되는 안정한 거대분자 조직이다. 유산균은 장점막의 수지상세포(Dendritic cell, DC)와 결합한 후 정상작용을 비롯한 여러가지 세포적 신호를 전달하여 면역질환 등을 예방한다.

[0008] 유산균이 경쟁적 배제를 통해 장점막에 원활하게 부착되면 장내에서 다른 미생물들에게 영향을 미치는 여러가지 물질을 생산하고 이 중, 젖산(lactic acid)은 장 내용물을 산성화시켜 다른 미생물의 생존을 억제한다.

[0009] 일반적으로 유산균이 장내에서 정상작용을 발휘하기 위해서는 유해균인 대장균과 살모넬라 등 보다 장점막과의 결합력이 우수해야 하나 그람음성 세균인 대장균과 살모넬라보다 그람양성 세균으로 분류되는 유산균이 상대적으로 장점막과의 결합력이 떨어진다. 또한 유산균도 분리원에 따라 부착능이 차이를 보인다. 또한 *Lactobacillus*속의 유산균은 소장점막과 부착친화력이 상대적으로 우수하고 *Bifidobacterium*속의 프로바이오틱스균은 대장점막과 친화력이 우수하다. 또한 식물 유래의 프로바이오틱스는 식물체 표면에 부착되어 공생하여 진화되어 왔기 때문에 동물의 장 점막에 부착효율이 떨어지게 된다.

[0010] 한편, 종래의 유산균의 코팅기술은 1세대부터 4세대까지 위장관 통과시 생존율에 따라 구분해왔다. 제 1세대는 비코팅 유산균, 2세대는 장용코팅 유산균, 3세대는 마이크로캡슐화 유산균, 4세대 유산균은 단백질 코팅 유산균으로 위장관 통과시 얼마나 많은 수의 유산균이 장에 도달하는가에 초점을 두었다. 또한, 5세대 코팅기술로 일컬어지는 히알루론산 기반의 4중코팅 유산균은(한국 등록특허 10-1280232 참조) 기존의 단일 내지 3중코팅 유산균과 비교해 내열성, 내산성 및 내담즙성이 현저히 향상되어 유산균의 생존율에 크게 기여하였다.

[0011] 히알루론산을 기반으로한 종래의 4중코팅 유산균 제조기술은 천연고분자인 히알루론산을 코팅제로 사용하여 종래 단일 내지 3중 코팅 유산균과 비교해 내열성, 내산성 및 내담즙성 등이 현저히 개선되었으나, 장 점막 부착효율, 정착시간, 그람음성 병원성균주를 경쟁적으로 배제하는 효과에 있어서는 여전히 한계가 있었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 이에, 본 발명자들은 상기 종래의 유산균 코팅 기술들이 갖고 있는 한계점을 극복하여, 장 점막 부착효율, 장 점막 내 정착시간, 장내 유해균에 대한 경쟁적 억제 효과가 현저히 향상된 유산균 코팅기술을 개발하기 위해 연구를 거듭하였다. 그 결과, 유산균 발효성분이 천연고분자 물질인 히알루론산에 포함된 “기능성 수화 히알루론산”을 개발하였고, 상기 기능성 수화 히알루론산이 유해균에 대해서는 증식 억제작용, 유익균에 대해서는 증식 촉진 작용을 나타냄을 확인한 후 목적하는 효과를 발휘하는 유산균 코팅제로서 사용될 수 있음에 착안하여 본 발명을 완성하게 되었다.

[0013] 따라서, 본 발명의 목적은 유산균 배양액 100 중량부 대비 히알루론산을 0.01 중량부 내지 1 중량부의 비율로 첨가하고 교반하여 녹인 후 30 내지 60℃에서 감압농축하는 방법에 의해 제조된 유산균 발효물질이 포함된 기능성 수화 히알루론산을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 다른 목적은 상기 기능성 수화 히알루론산으로 코팅된 유산균을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 다른 목적은 (a) 유산균에 수용성 폴리머를 혼합하여 1차 코팅하는 단계; (b) 상기 (a)단계에서 1차 코팅된 유산균에 기능성 수화 히알루론산을 혼합하여 2차 코팅하는 단계; (c) 상기 (b)단계에서 2차 코팅된 유산균에 다공성 입자를 가지는 코팅제를 혼합하여 3차 코팅하는 단계; 및 (d) 상기 (c)단계에서 3차 코팅된 유산균에 단백질을 혼합하여 4차 코팅하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 4중 코팅된 유산균의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 다른 목적은 상기 4중 코팅된 유산균의 제조방법에 따라 제조된 4중 코팅된 유산균을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0017] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 유산균 배양액 100 중량부 대비 히알루론산을 0.01 중량부 내지 1 중량부의 비율로 첨가하고 교반하여 녹인후 30 내지 60℃에서 감압농축하는 방법에 의해 제조된 유산균 발효물질이 포함된 기능성 수화 히알루론산을 제공한다.

[0018] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여 기능성 수화 히알루론산으로 코팅된 유산균을 제공한다.

[0019] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, (a) 유산균에 수용성 폴리머를 혼합하여 1차 코팅하는 단계; (b) 상기 (a)단계에서 1차 코팅된 유산균에 기능성 수화 히알루론산을 혼합하여 2차 코팅하는 단계; (c) 상기 (b)단계에서 2차 코팅된 유산균에 다공성 입자를 가지는 코팅제를 혼합하여 3차 코팅하는 단계; 및 (d) 상기 (c)단계에서 3차 코팅된 유산균에 단백질을 혼합하여 4차 코팅하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 4중 코팅된 유산균의 제조방법을 제공한다.

[0020] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 4중 코팅된 유산균의 제조방법에 따라 제조된 4중 코팅된 유산균을 제공한다.

[0021] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0022] 본 발명은 유산균 배양액 100 중량부 대비 히알루론산을 0.01 중량부 내지 1 중량부의 비율로 첨가하고 교반하여 녹인후, 농축하는 방법에 의해 제조된 유산균 발효물질이 포함된 기능성 수화 히알루론산을 제공한다.

[0023] 본 발명에서 상기 기능성 수화 히알루론산은 유산균 배양액을 히알루론산에 포집시킨 것으로, 장내 유해균에 대

해서는 생육 억제작용을 나타내며, 유익균에 대해서는 아무런 영향을 미치지 않거나 이의 증식을 도와주는 성분을 포함하고 있는 히알루론산을 의미한다.

- [0024] 한편, 본 발명자들은 장내 세균총 중 유익균으로 분류되는 세균의 대표적 균주는 유산균이므로 유산균에는 영향을 미치지 않거나 또는 유산균의 증식에 도움이 되는 성분을 추출하기 위해 유산균 발효물을 이용하고자 하였고, 이를 히알루론산에 포집시킴으로써 목적하는 효과를 나타내는 코팅제를 개발하고자 하였다.
- [0025] 즉, 세포 구조물에 포함되어 있는 대표성분인 리포테이코익산(lipoteichoic acid), 펩티도글리칸(peptidoglycan)등의 유해세균 부착저해물질 및 유해세균의 증식을 억제하고 유익균의 생육을 증진시키는 유산균 발효산물을 히알루론산에 포집시켜 기능성 수화 히알루론산을 제작하였다.
- [0026] 구체적으로, 본 발명에서 상기 기능성 수화 히알루론산은 유산균 배양액 100 중량부 대비 히알루론산을 0.01 중량부 내지 1 중량부의 비율로 첨가하고 교반하여 녹인 후 30 내지 60℃에서 감압농축하는 방법에 의해 제조될 수 있다. 보다 바람직하게는, 유산균 배양액 100 중량부 대비 히알루론산 0.01 중량부 내지 0.5 중량부로 혼합하고, 가장 바람직하게는 0.01 중량부 내지 0.25 중량부로 혼합하여 제조한다. 상기와 같은 방법에 의해 유산균 발효물질이 히알루론산에 포집되어 장내 유해세균에 대해서는 항균작용을 나타냄과 동시에 유익균에 대해서는 증식 촉진 작용을 나타낼 수 있다. 특히 유산균 배양액은 가압 및 틴달화(tyndallization)함으로써 유산균 또는 이의 배양물에 포함되어 있는 대표성분인 리포테이코익산(lipoteichoic acid), 펩티도글리칸(peptidoglycan)등의 유해세균 부착저해물질 및 유해세균의 증식을 억제하고 유익균의 생육을 증진시키는 효과를 나타낼 수 있다.
- [0027] 한편, 본 발명에서 상기 유산균 배양액은 틴달화(tyndallization)된 것일 수 있으며, 바람직하게는 상기 유산균 배양액은 다음과 같은 단계에 의해 제조될 수 있다:
- [0028] (a) 유산균 배양액을 110 내지 135℃에서 3 내지 7분간 가압열처리하는 단계;
- [0029] (b) 상기 (a) 단계에서 가압열처리된 배양액을 25 내지 35℃로 냉각하는 단계;
- [0030] (c) 상기 (b)단계에서 냉각된 배양액을 105 내지 115℃에서 8 내지 12분간 가압열처리하는 단계;
- [0031] (d) 상기 (c) 단계에서 가압열처리된 배양액을 25 내지 35℃로 냉각하는 단계;
- [0032] (e) 상기 (d) 단계에서 냉각된 배양액을 75 내지 85℃에서 20 내지 40분간 열처리한 후 25 내지 35℃로 최종냉각하는 단계.
- [0033] 기능성 수화 히알루론산을 제조하기 위한 상기 유산균은 항균성분의 발효물을 생산하는 유산균으로, 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.), 바이셀라 속(*Weissella* sp.)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유산균이며, 바람직하게는 *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 gasicomitatum*, *Leuconostoc gellidum*, *Leuconostoc inhae*, *Leuconostoc kimchii*, *Leuconostoc lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Leuconostoc paramesenteroides*, *Weissella cibaria*, *Weissella confusa*, *Weissella koreensis*, *Weissella soli*, *Weissella viridescens*로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유산균, 더 바람직하게는 *Lactobacillus acidophilus* IDCC 3302 일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0034] 본 발명의 일실시예에 따르면, 유산균 배양액이 포집된 기능성 수화 히알루론산은 장내 유해세균으로 볼 수 있는 살모넬라 티피뮤리움의 장 점막 부착능을 저해할뿐만 아니라, 생육을 저해하는 효과를 나타내는 것으로 확인되었다(실시예 2 및 실시예 3).
- [0035] 본 발명의 다른 일실시예에 따르면, 본 발명자들은 기능성 수화 히알루론산이 장내 유익균의 성장에 미치는 영향을 평가하기 위해 유산간균, 비피더스균, 유산구균으로 대표되는 락토바실러스 람노스(*Lactobacillus rhamnosus*), 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) 및 엔테로코커스 페시움(*Enterococcus faecium*)에

기능성 수화 히알루론산을 처리하였고, 그 결과 기능성 수화 히알루론산을 처리한 균에서 각각의 미생물의 증식이 현저히 촉진되는 것을 확인하였다(실시예 4). 한편, 본 발명의 상기 실시예에 따르면, 일반적인 히알루론산은 이러한 유해균 저해효과 및 유익균 증식 촉진효과를 나타내지 못하는 것으로 확인되어 본 발명에 따른 기능성 수화 히알루론산이 유산균 발효물질을 포집함으로써 독특한 기능적 특성을 나타낸다는 것을 알 수 있었다.

- [0036] 상기한 바와 같은 실험 결과를 통해, 기능성 수화 히알루론산이 장내 유익균의 증식은 촉진하면서 유해균의 생장은 저해할 수 있는 선택적 길항작용을 나타내어 유산균의 장 점막 부착능과 부착시간을 증대시킬 코팅제로 사용될 수 있다는 것을 알 수 있었다.
- [0037] 따라서, 본 발명은 상기 기능성 수화 히알루론산으로 코팅된 유산균을 제공한다.
- [0038] 본 발명은 또한 상기 기능성 수화 히알루론산을 이용하여 장 점막부착능이 우수하고 선택적 길항작용을 하는 4중 코팅된 유산균 제조방법을 제공한다. 구체적으로,
- [0039] 본 발명의 4중 코팅된 유산균의 제조방법은
- [0040] (a) 유산균에 수용성 폴리머를 혼합하여 1차 코팅하는 단계;
- [0041] (b) 상기 (a)단계에서 1차 코팅된 유산균에 기능성 수화 히알루론산을 혼합하여 2차 코팅하는 단계;
- [0042] (c) 상기 (b)단계에서 2차 코팅된 유산균에 다공성 입자를 가지는 코팅제를 혼합하여 3차 코팅하는 단계; 및
- [0043] (d) 상기 (c)단계에서 3차 코팅된 유산균에 단백질을 혼합하여 4차 코팅하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0044] (a) 유산균에 수용성 폴리머를 혼합하여 1차 코팅하는 단계;
- [0045] 상기 수용성 폴리머는 유산균 표면 접합력을 증대시키기 위해 기능성 수화 히알루론산과의 가교 형성능을 평가하여 선정하였다. 구체적으로 본 발명의 균체 막막코팅제로 사용되면서 기능성 수화 히알루론산의 가교형성능이 우수한 수용성 폴리머는 이에 한정되지는 않지만, 카르복시메틸셀룰로오스(carboxymethyl cellulose, CMC), 하이드록시에틸셀룰로오스(hydroxyethylcellulose, HEC), 잔탄검(xantha gum, XG), 구아검(guar gum, GG), 폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone, PVP), 키토산(chitosan), 아라비아검(arabia gum), 카보폴(carbopol), 소듐알기네이트(sodium alginate), 프로필렌글리콜 알기네이트(propylene glycol alginate)으로 이루어진 균에서 선택되는 것이 바람직하다. 바람직하게는 카르복시메틸셀룰로오스(carboxymethyl cellulose, CMC), 하이드록시에틸셀룰로오스(hydroxyethylcellulose, HEC), 잔탄검(xantha gum, XG), 구아검(guar gum, GG), 폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone, PVP), 키토산(chitosan), 아라비아검(arabia gum), 카보폴(carbopol)이며, 더욱 바람직하게는 카르복시메틸셀룰로오스(carboxymethyl cellulose, CMC), 폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone, PVP), 키토산(chitosan), 아라비아검(arabia gum), 카보폴(carbopol)이며, 가장 바람직하게는 카르복시메틸셀룰로오스(carboxymethyl cellulose, CMC)이다.
- [0046] 상기 수용성 폴리머는 유산균 배양액 100중량부 대비 0.1 중량부 내지 10 중량부의 비율로 혼합하여 1차 코팅한다. 바람직하게는 유산균 배양액 100 중량부 대비 수용성 폴리머 0.1 중량부 내지 5 중량부로 혼합하고, 가장 바람직하게는 0.1 중량부 내지 0.5 중량부로 혼합한다.
- [0047] 본 발명의 실시예에서는 카르복시메틸셀룰로오스(carboxymethyl cellulose, CMC)이 2차 코팅제인 기능성수화 히알루론산과의 가교형성능이 우수함을 확인하였다(표 3참조).
- [0048] 따라서 이 기제를 농도별로 0.1%(w/v)부터 0.4%(w/v)로 적용하였을 때, 0.2%(w/v)사용시 가장 높은 가교 형성능을 나타내었다(표 4참조).
- [0049] (b) 상기 (a) 단계에서 1차 코팅된 유산균에 기능성 수화 히알루론산을 혼합하여 2차 코팅하는 단계 :
- [0050] 상기 (b) 단계에서 (a) 단계의 1차 코팅된 유산균에 기능성 수화 히알루론산을 혼합하여 2차 코팅한다. 상기 기능성 수화 히알루론산은 장내 유해균을 억제시키는 항균용 유산균 발효물이 포집되어 있어 장내 유해균을 제어한다.
- [0051] 상기 기능성 수화 히알루론산은 유산균 배양액 100 중량부 대비 기능성 수화 히알루론산 0.01 중량부 내지 0.5 중량부, 바람직하게는 0.001 중량부 내지 0.05 중량부, 더욱 바람직하게는 0.001 중량부 내지 0.005 중량부로 혼합한다.

- [0052] (c) 상기 (b)단계에서 2차 코팅된 유산균에 다공성 입자를 가지는 코팅제를 혼합하여 3차 코팅하는 단계 :
- [0053] 상기 다공성 코팅제는 균체에 다공성 입자성을 가진 기체의 코팅제로서, 외부 수분 및 습윤 공기의 유입을 차단시키는 역할을 한다. 다공성 입자를 가지는 것은 상기 3차 코팅제로 사용가능하며, 구체적으로는 이에 한정되지는 않지만 알기네이트(alginate), 말토덱스트린(maltodextrin, MD), 폴리에틸렌글리콜(polyethyleneglycol, PEG), 트리아세틴(triaetin), 아세틸트리에틸 시트레이트(acetyl triethyl citrate) 또는 트리에틸 시트레이트(triethyl citrate)이 포함되며, 바람직하게는 알기네이트(alginate), 말토덱스트린(maltodextrin, MD), 폴리에틸렌글리콜(polyethyleneglycol, PEG)일 수 있으며, 가장 바람직하게는 말토덱스트린(maltodextrin,MD)을 말한다.
- [0054] 상기 다공성 코팅제는 유산균 배양액 100중량부 대비 0.1 중량부 내지 10중량부의 비율, 바람직하게는 0.1 중량부 내지 5중량부, 더욱 바람직하게는 0.1 중량부 내지 0.5 중량부로 혼합된다.
- [0055] (d) 상기 (c)단계에서 3차 코팅된 유산균에 단백질을 혼합하여 4차 코팅하는 단계 :
- [0056] 상기 단백질은 3차 코팅된 유산균에 다공성 입자구조를 가진 3차 코팅제의 공극을 채우기 위하여 혼합되며, 이에 한정되지는 않지만 바람직하게는 탈지분유, 유청단백, 분리대두단백으로 이루어진 균에서 선택된 단백질, 바람직하게는 유청단백을 말한다.
- [0057] 상기 4차 코팅제인 단백질은 유산균 배양액 100 중량부 대비 단백질 1중량부 내지 30중량부의 비율로 혼합되며, 바람직하게는 1중량부 내지 10중량부, 가장 바람직하게는 5 내지 10 중량부로 혼합된다.
- [0058] 상기 본 발명의 방법으로 제조된 4중 코팅된 유산균은 종래 비코팅, 단일 코팅, 2중 코팅, 3중 코팅된 유산균뿐만 아니라 4중 코팅된 유산균에 비하여 장 점막 부착능이 매우 우수하다. 본 발명의 일실시예에 따르면, 기능성 수화 히알루론산을 이용하여 4중 코팅된 유산균은 종래 4중 코팅 유산균과 비교해 in vitro 및 in vivo 상에서 장 점막 부착능이 우수한 것으로 나타났다. 이러한 효과는 인간의 장 점막과 유사한 환경이라고 할 수 있는 상재균이 존재하는 조건에서도 우수하게 나타났다는 점에서 그 의미가 매우 크다고 할 수 있다.
- [0059] 한편, 코팅된 유산균이 숙주의 장에 도달한 이후에 장 점막에 부착되기 위해서는 숙주의 상재균총과의 경쟁을 통해야만 한다. 뿐만 아니라, 유산균이 장 점막에 부착되어 유익한 생리학적 활성을 나타내기 위해서는 장 점막의 유해균의 증식은 억제하고 유익균의 증식은 촉진하는 효과를 나타내는 것이 바람직하다는 점에서 본 발명의 4중 코팅된 유산균은 종래 비코팅, 단일 코팅, 2중 코팅, 3중 코팅 및 4중 코팅된 유산균과 비교해 매우 우수하다고 할 수 있다.
- [0060] 구체적으로, 본 발명의 일실시예에 따르면 기능성 수화 히알루론산을 이용하여 4중 코팅된 유산균은 종래의 비코팅 또는 4중 코팅된 유산균에 비해 유해균과의 경쟁적 부착 저해능이 매우 우수하여, 상재균이 존재하는 상황에서도 유산균의 장 점막 부착능을 향상시킬 수 있다는 것을 알 수 있었다. 뿐만 아니라, 본 발명의 방법에 따라 4중 코팅된 유산균의 2차 코팅제인 기능성 수화 히알루론산은 유해균에 대해서는 증식을 억제하는 효과가 있는 반면, 유익균의 증식은 촉진하는 효과가 있는 것으로 확인되어, 유해균에 대해서만 선택적으로 길항작용을 나타낸다는 것을 알 수 있었다.
- [0061] 본 발명의 4중 코팅된 유산균은 우수한 장 점막 부착능 및 유해균에 대한 선택적 길항작용 이외에도, 4중 코팅으로 인해 구조적으로 안정하여 수분, 공기 등의 외부 환경인자를 효율적으로 차단시켜 높은 경시적 안정성을 나타낼 수 있으며, 내산성 및 내담즙산성이 매우 우수하다.
- [0062] 또한 본 발명의 4중 코팅된 유산균은 상기와 같은 방법으로 제조된 것을 특징으로 한다. 따라서, 본 발명의 4중 코팅된 유산균은 종래의 4중 코팅된 유산균이 가지는 우수한 내산성 및 내담즙성을 유지하면서, 비코팅, 4중코팅된 유산균에 비하여 장내 균총 중 유해세균 억제능이 우수하여 유해세균 증가시 효율적으로 정상화 시킬 수 있다. 또한 장내 균총 중 유익균인 유산균총의 증식을 도와 효율적인 장내 균총 정상화에 기여한다.
- [0063] 한편, 본 발명의 다른 일실시예에 따르면 본 발명의 기능성 수화 히알루론산은 4중코팅된 유산균뿐만 아니라 2중 또는 3중 코팅된 유산균에 코팅제로 사용되었을 경우에도, 일반 히알루론산을 이용하여 유산균을 코팅하였을 때와 비교해 월등히 향상된 장 점막 부착능을 나타내었다는 점에서 기능성 수화 히알루론산이 그 자체로서 우수한 장 점막 부착능 및 유해세균에 대한 길항작용을 나타내는 코팅제로 사용될 수 있음을 알 수 있었다.
- [0064] 뿐만 아니라, 기능성 수화 히알루론산을 이용하여 2중 또는 3중 코팅된 유산균은 일반 히알루론산을 이용하여 2중 또는 3중 코팅된 유산균과 비교해 동등한 정도의 내산성 및 내담즙산성을 나타내는 것으로 보아, 기능성 수

화 히알루론산을 제조하는 과정에서 히알루론산 고유의 유산균 보호 효과는 그대로 유지되는 판단할 수 있었다.

[0065] 상기한 바와 같이, 본 발명의 기능성 수화 히알루론산으로 코팅된 유산균은 일반 히알루론산을 이용하여 코팅된 유산균과 비교해 동등한 정도의 내산성 및 내담즙성을 나타낼 뿐만 아니라, 우수한 장 점막 부착능 및 유해세균에 대한 선택적 길항작용을 나타내며, 이러한 유산균 코팅제 및 유산균 코팅방법에 대해서는 종래에 보고된 바가 없는 것으로, 본 발명자가 기능성 수화 히알루론산을 유산균의 코팅에 이용함으로써 나타난 효과인 바, 이는 본 발명에서 최초로 보고하는 것이다.

발명의 효과

[0066] 본 발명의 기능성 수화 히알루론산은 유해균에 대해서는 증식 억제작용 및 유익균에 대해서는 증식 촉진 작용을 나타내어 선택적 길항작용을 나타내는 효과가 있으며, 본 발명의 기능성 수화 히알루론산을 이용해 코팅된 유산균은 일반 히알루론산을 이용해 코팅된 유산균과 비교해 우수한 장 점막 부착능 및 유해균에 대한 선택적 길항작용을 나타내는 효과가 있다.

[0067] 특히, 본 발명의 기능성 수화 히알루론산을 이용해 4중 코팅된 유산균은 유산균에 수용성 폴리머, 기능성 수화 히알루론산, 다공성 입자를 가지는 코팅제, 단백질을 혼합하여 4중 코팅함으로써, 종래 비코팅, 단일, 2중, 3중 및 4중 코팅 유산균에서는 나타나지 않은 우수한 장 점막 부착능 및 유해세균에 대한 선택적 길항작용을 나타낼 뿐만 아니라, 내산성 및 내담즙성도 매우 우수하여 유산균 본래의 생리활성 기능을 소실하지 않는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0068] 도 1은 기능성 수화 히알루론산의 형상을 나타낸 사진이다.
- 도 2는 기능성 수화 히알루론산의 살모넬라 티피뮤리움 KCTC 2054에 대한 생육 저해능을 평가한 결과이다.
- 도 3은 락토바실러스 아시도필루스 IDCC 3302의 배양액이 포집된 기능성 수화 히알루론산원료의 락토바실러스 람노서스에 대한 증식 촉진효과를 평가한 사진이다(A: 일반 히알루론산 처리 대조군, B: 기능성 수화 히알루론산 처리군).
- 도 4는 락토바실러스 아시도필루스 IDCC 3302의 배양액이 포집된 기능성 수화 히알루론산원료의 비피도박테리움 룡검에 대한 증식 촉진효과를 평가한 사진이다(A: 일반 히알루론산 처리 대조군, B: 기능성 수화 히알루론산 처리군).
- 도 5는 락토바실러스 아시도필루스 IDCC 3302의 배양액이 포집된 기능성 수화 히알루론산원료의 엔테로코커스 페시움에 대한 증식 촉진효과를 평가한 사진이다(A: 일반 히알루론산 처리 대조군, B: 기능성 수화 히알루론산 처리군).
- 도 6은 기능성 수화 히알루론산을 이용하여 2중 코팅된 락토바실러스 아시도필루스 IDCC 3302, 비코팅 및 일반 히알루론산을 이용하여 2중 코팅된 락토바실러스 아시도필루스 IDCC 3302의 장내 정착성을 비교한 도면이다.
- 도 7은 기능성 수화 히알루론산을 이용하여 2중 코팅된 락토바실러스 아시도필루스 IDCC 3302, 비코팅 및 일반 히알루론산을 이용하여 2중 코팅된 락토바실러스 아시도필루스 IDCC 3302가 장내 살모넬라균의 생육에 미치는 영향을 평가한 도면이다.
- 도 8은 기능성 수화 히알루론산을 이용하여 3중 코팅된 락토바실러스 아시도필루스 IDCC 3302, 비코팅 및 일반 히알루론산을 이용하여 3중 코팅된 락토바실러스 아시도필루스 IDCC 3302의 장내 정착성을 비교한 도면이다.
- 도 9는 기능성 수화 히알루론산을 이용하여 3중 코팅된 락토바실러스 아시도필루스 IDCC 3302, 비코팅 및 일반 히알루론산을 이용하여 3중 코팅된 락토바실러스 아시도필루스 IDCC 3302가 장내 살모넬라균의 생육에 미치는 영향을 평가한 도면이다.
- 도 10은 기능성 수화 히알루론산을 이용하여 4중 코팅된 락토바실러스 아시도필루스 IDCC 3302, 비코팅 및 일반 히알루론산을 이용하여 4중 코팅된 락토바실러스 아시도필루스 IDCC 3302의 장내 정착성을 비교한 도면이다.
- 도 11은 기능성 수화 히알루론산을 이용하여 4중 코팅된 락토바실러스 아시도필루스 IDCC 3302, 비코팅 및 일반 히알루론산을 이용하여 4중 코팅된 락토바실러스 아시도필루스 IDCC 3302가 장내 살모넬라균의 생육에 미치는 영향을 평가한 도면이다.
- 도 12는 본 발명에 사용된 비코팅된 락토바실러스 아시도필루스 IDCC 3302의 형상을 나타낸 SEM 사진이다.

도 13은 락토바실러스 아시도필루스 IDCC 3302에 카르복시메틸셀룰로오스를 혼합하여 1차 코팅된 유산균의 형상을 나타낸 SEM 사진이다.

도 14는 카르복시메틸셀룰로오스로 1차 코팅된 락토바실러스 아시도필루스 IDCC 3302 에 기능성 수화 히알루론산을 혼합하여 2차 코팅된 유산균의 형상을 나타낸 SEM 사진이다.

도 15는 카르복시메틸셀룰로오스 및 기능성 수화 히알루론산으로 2차 코팅된 락토바실러스 아시도필루스 IDCC 3302 에 말토덱스트린을 혼합하여 3차 코팅된 유산균의 형상을 나타낸 SEM 사진이다.

도 16은 카르복시메틸셀룰로오스, 기능성 수화 히알루론산 및 말토덱스트린으로 3차 코팅된 락토바실러스 아시도필루스 IDCC 3302 에 유청단백을 혼합하여 4차 코팅된 유산균의 형상을 나타낸 SEM 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0069]

이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0070]

단, 하기 실시예에는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0071]

<실시예 1>

[0072]

기능성 수화 히알루론산 조제

[0073]

대표적 유산균인 락토바실러스 아시도필루스 IDCC 3302 (*Lactobacillus acidophilus* IDCC 3302) 발효균체를 티달화(tyndallization)함으로써 락토바실러스 아시도필루스 IDCC 3302 세포 구조물에 포함되어 있는 대표성분인 리포테이코익산(lipoteichoic acid), 펩티도글리칸(peptidoglycan)등의 유해세균 부착저해물질 및 유해세균의 증식을 억제하고 유익균의 생육을 증진시키는 유산균 발효산물을 히알루론산에 포집시키고자 하였다. 이를 위해 충분히 배양된 락토바실러스 아시도필루스 IDCC 3302 균액을 121℃-5분간 가압열처리 (압력게이지상 1.2기압) 한 후, 균액을 30℃로 냉각하였다. 이를 다시 110℃-10분간 가압열처리 (압력게이지상 0.8기압) 한 후, 균액을 30℃로 냉각한 후, 다시 80℃-30분간 열처리한 후, 30℃로 최종냉각하여 부착저해 유산균액을 준비하였다.

[0074]

이 배양액을 60℃에서 초기 부피의 1/10까지 감압농축하고 여기에 히알루론산 0.01~1% (w/v)을 넣어 충분히 교반하여 녹인 후, 50℃에서 추가적인 감압농축하고 건조하여 도 1에서 보는 바와 같이 기능성 수화히알루론산원료를 조제하였다.

[0075]

<실시예 2>

[0076]

기능성 수화 히알루론산의 부착저해능

[0077]

기능성 수화 히알루론산의 유해균 부착저해능을 평가하기 위해서, 인체 장내 상피세포 계열인 Caco-2 세포주 *in vitro* 모델을 사용하였다. Caco-2 세포주 *in vitro* 모델은 분극화 현성(polarization), 기능성 brush border 및 가수분해효소 분비 등 성숙한 장 세포 특성을 그대로 잘 나타낸다. 유산균이 장내 점막세포와 결합하는 데에는 유산균의 리간드가 특정 수용체와 상호 작용하는 것이 필요하기 때문에, 장내의 Caco-2 세포는 실제적으로 유산균의 장 정착성을 연구하는데 있어서 가장 유용한 *in vitro* 모델 중 하나로 알려져 있다 (Microbiol.59(12):4121-4128, Gut.35:483-489, FEMS microbiology.Lett.91:213-218 등).

[0078]

구체적으로, 기능성 수화 히알루론산을 Caco-2 cells에 먼저 처리한 후, 살모넬라 티피뮤리움 KCTC 2054를 부착시켰을때 Caco-2 cells에 부착되어 있는 살모넬라 티피뮤리움 KCTC 2054의 균수를 측정하여 이를 저해율로 환산하는 방법을 사용하였다.

[0079]

이때 대조군으로 기능성 수화 히알루론산 샘플 대신, 일반 히알루론산을 사용하였다. 보다 구체적으로는 Caco-2 cell monolayer는 Caco-2 cells를 10% (v/v) fetal calf serum과 20 ul/ml의 gentamicin을 첨가한 DMEM에 1.2×10^5 cells/ml농도로 접종하고 6-well tissue culture plate (BD, USA) well 당 1 ml 분주하여 7일간 배양한 후, phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2)으로 2회 세척하여 제조하였다. Caco-2 monolayer가 형성된 각 well에 기능성 수화 히알루론산 용액 0.5 ml를 넣어 90분간 반응시켰다. 대조군은 히알루론산 용액을 사용하였다. 살모넬라 티피뮤리움 KCTC 2054 샘플 0.5ml (1×10^8 cfu/ml)를 넣어 90분간 반응시켰다. 반응 후, 상층액을 제거하고 Caco-2 cells를 PBS로 2회 세척하여 부착되지 않은 살모넬라 티피뮤리움 KCTC 2054를 제거하였다. Tween 80 0.04% (w/v) 1 ml를 가하여 Caco-2 cells에 부착된 살모넬라 티피뮤리움 KCTC 2054를 회수하고 생균수를 측정하였다. 이에 대한 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

기능성 수화 히알루론산의 살모넬라 티피뮤리움 KCTC 2054 부착저해능

구분	대조군-히알루론산	기능성수화히알루론산
살모넬라 티피뮤리움 부착저해율(%)	< 1%	46%

[0080]

[0081]

상기 표 1에 나타난 바와 같이, 대조군인 일반 히알루론산의 경우 살모넬라 티피뮤리움의 부착저해율은 거의 나타나지 않은 반면, 기능성 수화 히알루론산의 경우 46%의 부착 저해율을 나타내는 것으로 확인되었다. 즉, 기능성 수화 히알루론산을 유산균의 코팅제로 사용할 경우, 유산균이 장 점막에 부착됨은 물론 장내 유해균과의 경쟁적 제거에 도움이 될 것으로 판단되었다.

[0082]

<실시예 3>

[0083]

기능성 수화 히알루론산의 유해균 길항작용

[0084]

기능성 수화 히알루론산의 장내 유해세균에 대한 항균력을 평가하기 위해 살모넬라 티피뮤리움 KCTC 2054에 대해 최소저지농도(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)를 구하여 장내 세균총 중 유해균에 미치는 영향을 비교하였다. 실험방법은 대한약전 외 의약품에 수재되어 있는 세균성장저지력 시험을 변형하여 사용하였다. 세부내용은 다음과 같다.

[0085]

1) 살모넬라 티피뮤리움 KCTC 2054 시험균 용액조제

[0086]

살모넬라 티피뮤리움 KCTC 2054 시험균 용액 조제를 위해 Brain Heart Infusion agar (BHI agar, BD, USA)에서 자란 살모넬라 티피뮤리움 KCTC 2054 균체를 1 loop 취하여 멸균된 BHI 액상배지 5 ml에 현탁하여 O.D. 620 nm 값 0.15로 조정하였다. 이 용액을 시험균 용액으로 사용하였다.

[0087]

2) 조작법

[0088]

기능성 수화 히알루론산 분말을 1% (w/v)~10% (w/v)의 농도가 되게 BHI 액상배지 20 ml에 각각 넣고 5~10분간 교반하면서 현탁하였다. 현탁액을 원심분리 (5,000 RPM/15분)한 후, 상등액을 membrane filter (0.45 μm)로 여과멸균 하였다. 각각 농도의 여과멸균액을 2 ml를 멸균된 4 ml 시험관에 넣고 살모넬라 티피뮤리움 KCTC 2054 시험균 용액을 2% (v/v) 접종하였다. 대조군으로 기능성 수화 히알루론산 샘플 대신, 일반 히알루론산을 사용하였다. 접종이 끝나면 37℃에서 24시간 동안 배양하면서 균의 성장을 관찰하였다.

[0089]

3) 판정

[0090]

배양 24시간 후에 균의 생장이 관찰된 농도를 확인하여 그 때의 농도값을 MIC 값으로 정하였다.

[0091]

이에 대한 결과를 하기 표 2 및 도 2에 나타내었다.

표 2

기능성 수화 히알루론산의 살모넬라 티피뮤리움 KCTC 2054에 대한 길항작용

구분	대조군-히알루론산	기능성수화히알루론산
살모넬라 티피뮤리움 최소생육저지농도	10% >	4% (w/v)

[0092]

[0093] 상기 표 2 및 도 2에 나타난 바와 같이 기능성 수화 히알루론산으로 살모넬라 티피뮤리움 KCTC 2054 균주에 대한 MIC값을 평가한 결과, 기능성 수화 히알루론산은 4%(w/v)의 농도에서 최소저지농도(MIC)를 나타내어 유해균에 대한 증식 억제효과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

[0094] <실시에 4>

[0095] **기능성 수화 히알루론산의 유익균 증식촉진작용**

[0096] 기능성 수화 히알루론산의 장내 유익균에 대한 영향력을 평가하기 위해 유산간균, 비피더스균, 유산구균으로 대표되는 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*), 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*), 엔테로코커스 페시움(*Enterococcus faecium*)을 사용하였다. 보다 상세하게는 장내 유익균 3종의 시험균 용액 조제를 위해 de Man-Rogosa-Sharpe agar(MRS, BD, USA)에서 자란 유익균 3종의 균체를 취하여 멸균된 MRS 액상배지 현탁한 후, 이 용액을 시험균 용액으로 사용한다.

[0097] 락토바실러스 아시도필루스 IDCC 3302의 기능성 수화 히알루론산 분말을 4% (w/v)의 농도가 되게 MRS 액상배지 20 ml에 각각 넣고 5-10분간 교반하면서 현탁한다. 대조군으로 기능성 수화 히알루론산 분말 대신 일반 히알루론산을 사용하였다.

[0098] 현탁액을 원심분리 (5,000 RPM/15분)한 후, 상등액을 membrane filter (0.45 um)로 여과멸균한다. 여과멸균액을 2 ml를 멸균된 4 ml 시험관에 넣고 유익균 3종을 각각 2% (v/v)씩 접종한다. 접종이 끝나면 37℃에서 24시간 동안 배양하면서 균의 성장을 현미경관찰을 통해 대조군과 증식도를 비교하여 도 3 내지 도 5에 나타내었다.

[0099] 도 3 내지 도 5에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 기능성 수화 히알루론산을 처리한 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*)(도 3), 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*)(도 4), 엔테로코커스 페시움(*Enterococcus faecium*)(도 5)에서, 일반 히알루론산 처리한 대조군과 비교해 각각의 균의 성장이 촉진되는 것을 확인할 수 있었다.

[0100] <실시에 5>

[0101] **유산균 표면박막 코팅 가교제 선정**

[0102] 유산균체 표면박막 코팅을 이루는 수용성폴리머와 기능성 수화 히알루론산의 가교형성능을 평가하여 가장 최적의 코팅 가교제를 선정하였다. 보다 상세하게는 기능성 수화 히알루론산을 3차 증류수에 4g/l의 농도로 녹인 용액과 수용성폴리머를 3차 증류수에 1%(w/v) 농도로 녹인 용액을 1 : 1 (v/v)의 부피비로 혼합하고 1분간 강하게 교반 후, 상온에서 30분간 방치하였다. 3차 증류수만을 기능성 수화 히알루론산과 혼합한 결과와 비교하여 가교친화성을 판단하였다. 가교가 형성되었을 경우, 기능성 수화 히알루론산의 평균 분자량이 증가하여 용액의 점도가 증가하게 된다. 점도의 측정은 24℃ 항온수조에서 점도 증가에 따라 측정시간이 증가하는 점도계(Ubbelohdeviscometer, SI analytics)에 용액을 넣고 ViscoClock (SI Analytics)를 이용하여 일정 구간을 통과하는 하강 소요시간을 측정하여 점도를 상대적으로 비교하였다(표 3).

[0103] 하기 표 3에서 볼 수 있는 바와 같이, 기능성 수화 히알루론산은 시험에 사용된 모든 수용성폴리머와 가교결합을 잘 형성하였으며, 그 중에서 특히 카르복시메틸셀룰로오스(CMC)와 가교결합을 가장 잘 형성하는 것으로 나타났다.

표 3

기능성 수화 히알루론산과의 가교형성을 위한 최적 코팅가교제 선정

구분	대조군	키토산	폴리비닐 피롤리돈	CMC	아라비아 검
하강시간 (sec)	548	584	595	625	560

[0104]

[0105] 기능성 수화 히알루론산과 가교결합을 가장 잘 형성하는 코팅 가교제인 CMC의 최적농도를 결정하기 위해 기능성 수화 히알루론산을 3차 증류수에 4g/L의 농도로 녹인 용액에 CMC 농도를 0.1%(w/v)부터 0.4%(w/v)까지 첨가하여 용액을 제조하고 가교 형성을 상대적으로 비교할 수 있는 ViscoClock (SI Analytics)를 이용하여 일정 구간을 통과하는 하강 소요시간을 측정하여 점도를 상대적으로 비교하였다.

[0106] 이에 대한 결과를 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

기능성 수화 히알루론산과의 가교형성을 위한 최적 CMC 농도

농도 (w/v)	None	0.1%	0.2%	0.3%	0.4%
하강시간 (sec)	548	625	632	583	567

[0107]

[0108] 상기 표 4에 나타낸 바와 같이, 기능성 수화 히알루론산과의 가교형성을 위한 최적 CMC 농도 결정실험에서는 0.2%(w/v)사용시 632초의 하강시간을 나타내어 상대적으로 가교형성능력이 우수한 농도로 나타났다.

[0109] <실시예 6>

[0110] **기능성 수화 2중코팅 유산균**

[0111] **<6-1> 기능성 수화 2중 코팅 유산균의 조제**

[0112] 본 발명에서는 한국 등록특허(제10-1280232호)의 명세서 실시예에 기재된 코팅 유산균의 조제방법을 토대로 유산균의 표면박막코팅제이면서 1차 코팅제로 CMC-Na, 2차 코팅제로 상기 <실시예 1>에서 조제한 기능성 수화 히알루론산을 사용하여 기능성 수화 2중 코팅 유산균을 조제하였다. 대조군으로 기능성 수화 히알루론산 대신 일반 히알루론산을 사용하여 2중 코팅 유산균을 조제하여 사용하였다.

[0113]

[0114] **<6-2> 기능성 수화 2중 코팅 유산균의 내산성 (acid tolerance)**

[0115] 유산균이 경구로 섭취된 이후에 인체의 소화기관 중 위(stomach)를 통과할 때 위산(gastric juice)에 노출되게 되는데, 이와 유사한 환경을 시험관 조건에서 조성하고, 기능성 수화 히알루론산 2중 코팅 유산균과 일반 히알루론산 2중 코팅 유산균의 생존율을 비교하여 내산성을 평가하였다.

[0116] 보다 상세하게는 MRS 배지에 10% HCl을 적하하여 pH를 2.3, 2.5으로 적정한 다음 멸균하여 사용하였으며, 시료 1g을 각각의 pH로 보정된 MRS 배지에 넣어 0시간, 1시간, 2시간 동안 반응시킨 후, 생균수 분석을 하였다. 이때, 실험에 사용한 유산균은 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.) 12종, 비피도박테리움 속(*Bifidobacterium* sp.) 4종, 스트렙토코커스 속(*Streptococcus* sp.) 1종, 엔테로코커스 속(*Enterococcus* sp.) 1종, 락토코커스 속(*Lactococcus* sp.) 1종을 기능성 수화 2중코팅 유산균과 히알루론산 2중 코팅유산균을 제조하여 비교하였다.

[0117] 이에 대한 결과를 하기 표 5에 나타내었다.

표 5

기능성 수화 히알루론산 2중 코팅 유산균의 내산성 결과

코팅 유무	시험균	pH 2.3 ($\times 10^8$ CFU/g)				pH 2.5 ($\times 10^8$ CFU/g)			
		0 시간	1 시간	2 시간	생존율 (%)	0 시간	1 시간	2 시간	생존율 (%)

히알루론산 2중 코팅	<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
	<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
	기능성 수화 히 알루론산 2중 코팅	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	120	71	60	50	120	81	64
<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	

[0119] 상기 표 5에 나타난 바와 같이, 기능성 수화 히알루론산 2중코팅 유산균과 일반 히알루론산 2중코팅 유산균의 내산성을 비교한 결과, 각 실험군에서 유사한 내산성을 나타내었다.

[0120] 이러한 결과는 기능성 수화 히알루론산이 제조되는 과정 중 유산균을 보호하는 히알루론산 고유의 특성이 파괴되지 않았기 때문으로 사료된다.

[0121] <6-3> 기능성 수화 2중 코팅 유산균의 내담즙산성 (bile tolerance)

[0122] 담즙산(bile acid)은 간(liver)에서 만들어져 담도로 빠져나와 소장(small intestine)으로 흘러나오고 소장 말단의 회장(ileum)에서 다시 95% 흡수되어 다시 간으로 들어가는 장관순환을 한다. 이 과정에서 소장에 정착한 유산균에 영향을 미친다.

[0123] 따라서 담즙산에 노출되었을 때 기능성 수화 히알루론산 2중 코팅 유산균과 히알루론산 2중 코팅 유산균의 생

존율을 시험관 환경에서 비교하였다. 보다 상세하게는 담즙산 0.3%가 첨가된 배지와 첨가되지 않은 배지를 멸균하여 사용하였으며 각각의 배지에 기능성 수화 히알루론산 2중코팅 유산균, 대조군인 일반 히알루론산 2중코팅 유산균 시료 1g 을 각각 접종하고 5시간 동안 반응시킨 후, 생균수 분석을 하여 내담즙산성을 비교하였다.

[0124] 이에 대한 결과를 하기 표 6에 나타내었다.

표 6

기능성 수화 히알루론산 2중 코팅 유산균의 내담즙산성 결과

[0125]

코팅유무	시험균	MRS	MRS+0.3% bile	생존율(%)
히알루론산 2중 코팅	<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
	<i>Lactococcus lactis</i>	121	72	60
	<i>Streptococcus thermophilus</i>	110	63	58
기능성 수화 히알루론산 2중 코팅	<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
	<i>Lactococcus lactis</i>	131	85	65
	<i>Streptococcus thermophilus</i>	120	127	58

[0126] 상기 표 6에 나타낸 바와 같이, 기능성 수화 히알루론산 2중코팅 유산균과 히알루론산 2중코팅 유산균의 내담즙

산성을 비교한 결과, 각 실험군에서 거의 차이없이 유사한 내담즙산성을 나타내었다. 따라서 기능성 수화 히알루론산은 제조과정 중 그 히알루론산의 고유의 특성이 파괴되지 않아 유산균에 코팅 후에도 유사한 효과를 나타낸 것으로 판단된다.

[0127] <6-4> 기능성 수화 2중 코팅 유산균의 비경쟁 부착능 (Non-competitive adhesion)

[0128] Caco-2 cell monolayer는 Caco-2 cells (한국세포주은행)를 10% (v/v) fetal calf serum과 20 ul/ml농도의 겐타마이신 (gentamicin)을 첨가한 Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (DMEM, Hyclone, USA)에 1.2 x 10⁵ cells/ml 농도로 접종하고 6-well tissue culture plate을 사용하여 well 당 1 ml 분주하여 7일간 배양한 후, 인산완충용액으로 2회 세척하여 제조하였다.

[0129] Caco-2 monolayer가 형성된 각 well에 비코팅 유산균과 히알루론산 2중코팅 유산균, 기능성 수화 히알루론산 2중코팅 유산균 샘플 1 ml를 넣어 90분간 반응시켰다. 상기 2중 코팅 유산균은 한국 등록특허(제10-1280232호)의 2중코팅 유산균 조제방법을 토대로 제조하였다.

[0130] 반응 후 상층액을 제거하고 Tween 80 0.04% (w/v) 1 ml를 가하여 Caco-2 cells에 부착된 유산균 샘플을 회수하고 헤모사이토메터를 이용한 관찰 균수를 측정하였다. 초기 균수 대비한 부착균수의 비율로 부착효율을 계산하였다.

[0131] 이에 대한 결과를 하기 표 7에 나타내었다.

[0132] 하기 표 7에서 볼 수 있는 바와 같이, 장점막과 유사한 Caco-2 cells에 대한 부착능 평가시 비코팅 유산균보다 히알루론산 2중코팅 유산균의 부착효율이 상대적으로 우수하였으며, 기능성 수화 히알루론산 2중코팅 유산균의 부착효율은 히알루론산 2중코팅 유산균과 비교해 전반적으로 더 향상된 부착효율을 나타내었다.

표 7

[0133] 기능성 수화 히알루론산 2중 코팅된 유산균의 비경쟁 부착능

구분	유산균의 부착능(%)		
	비코팅	히알루론산 2중코팅	기능성수화히알루론산 2중코팅
<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

[0134] 장 점막 세포에 유산균과 경쟁하는 미생물이 존재하지 않을 때, 기본 장 점막 부착능은 기능성 수화 히알루론산 2중코팅 유산균이 일반적인 히알루론산 2중코팅 유산균과 비교해 전반적으로 향상된 부착효율을 나타냈다. 이러한 결과로부터 기능성수화 히알루론산의 장 점막 정착효과는 일반 히알루론산과 동등 또는 향상된 효과를 보였

기에 기능성 수화 히알루론산 제조과정 중 히알루론산의 고유의 장 점막 점착력이 파괴되지 않았음을 알 수 있었다.

[0135] <6-5> 기능성 수화 2중 코팅 유산균의 경쟁적 부착저해능 (Competitive exclusion)

[0136] 일반적으로 유산균이 장내에서 정상작용을 발휘하기 위해서는 유해균인 대장균과 살모넬라 등 보다 장점막과의 결합력이 우수해야 하나 그람음성세균인 대장균과 살모넬라보다 그람양성세균으로 분류되는 유산균이 상대적으로 장점막과의 결합력이 떨어진다. 따라서, 본 발명자들은 기능성 수화 히알루론산 2중 코팅된 유산균이 장내에서 유의한 생리학적 활성을 나타낼 수 있는지 여부를 보다 명확히 판단하기 위해서, 상재균이 존재하는 조건에서 유산균의 부착능을 평가하고자 하였다.

[0137]

[0138] 상재균 존재시 부착능 비교실험은 살모넬라 티피뮤리움 KCTC 2054를 지시균으로 사용하여 Caco-2 cells에 먼저 부착시킨 후, 비코팅, 히알루론산 2중 코팅된 유산균, 기능성 수화 히알루론산 2중 코팅 유산균을 처리하였을 때 Caco-2 cells에 부착되어 있는 살모넬라 티피뮤리움 KCTC 2054의 균수를 측정하여 이를 저해율로 환산하는 방법을 사용하였다.

[0139] 보다 더 구체적으로는 Caco-2 cell monolayer는 Caco-2 cells를 10% (v/v) fetal calf serum과 20 ul/ml의 gentamicin을 첨가한 Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (DMEM, Hyclone, USA)에 1.2×10^5 cells/ml 농도로 접종하고 6-well tissue culture plate을 사용하여 well 당 1 ml 분주하여 7일간 배양한 후, 인산완충용액으로 2회 세척하여 제조하였다.

[0140] 살모넬라 티피뮤리움 KCTC 2054의 시료는 각각 brain heart infusion (BHI, BD, USA) 배양액 10 ml를 원심분리하여 균체를 회수하고 인산완충용액으로 2회 세척한 다음 1 ml 인산완충용액에 재현탁하고 serum-free DMEM에 1×10^8 CFU/ml 농도로 희석하여 조제하였다. 상재균인 살모넬라 티피뮤리움 KCTC 2054 시료액 0.5 ml를 Caco-2 monolayer가 형성된 각 well에 넣고 60분간 반응시켰다. 반응 후, 유산균 샘플(1×10^8 CFU/ml)을 동량 처리하여 90분간 반응시켰다.

[0141] Caco-2 cells에 부착된 살모넬라 티피뮤리움 KCTC 2054의 생균수 측정을 위해 Tween 80 0.04% (w/v) 1 ml를 가하여 Caco-2 cells로부터 부착된 상재균인 살모넬라 티피뮤리움 KCTC 2054를 회수하고 BG agar 배지에서 생균수를 측정하였다. 살모넬라 티피뮤리움 KCTC 2054의 부착 저해율은 다음과 같이 계산하였다.

[0142] [살모넬라 티피뮤리움 부착저해율 (%)]

[0143] = $[1 - (\text{시험균 처리시의 살모넬라 티피뮤리움 부착균수} / \text{DMEM처리시의 살모넬라 티피뮤리움 부착균수})] \times 100$ (%)

[0144] 이에 대한 결과를 하기 표 8에 나타내었다.

[0145] 하기 표 8에서 볼 수 있는 바와 같이, 장점막과 유사한 Caco-2 cells에 유해균인 살모넬라 티피뮤리움 KCTC 2054를 먼저 부착시킨 후, 비코팅, 히알루론산 2중코팅, 기능성 수화 히알루론산 2중코팅된 유산균의 경쟁 유해균의 제거율을 비교한 결과, 기능물질이 포함되지 않은 비코팅 유산균은 경쟁제거의 방법으로 살모넬라 티피뮤리움 KCTC 2054를 제거하기 때문에 상대적으로 가장 낮은 제거효율을 보였으며, 기능성 수화 히알루론산 2중코팅된 유산균은 비코팅보다는 상대적으로 높은 유해균 제거효율을 나타냈다.

[0146] 한편, 기능성 수화 히알루론산 2중코팅된 유산균은 경쟁적 제거 이외에도 기부착된 살모넬라 티피뮤리움 KCTC 2054에 직접 항균력을 나타냄으로써 Caco-2 cells로부터 살모넬라 티피뮤리움을 원활하게 제거하고, 히알루론산에 의해 유해균이 탈착된 부위에 잘 정착하는 것으로 나타났다.

[0147] 한편, 상기한 기능성 수화 히알루론산 2중코팅된 유산균의 효과는 *Lactobacillus acidophilus* IDCC 3302의 결과만을 보더라도 비코팅 유산균보다는 47% 우수한 효과를 나타내었고, 일반 히알루론산 2중코팅 유산균과 비교해도 33% 이상 우수한 효과를 나타내는 것으로 확인되었다. 즉, 기능성 수화 히알루론산을 유산균의 코팅제로 사용한다면, 종래의 일반적인 유산균 코팅제들과 비교해 장내 유해균 저해능이 현저히 향상된다는 것을 알 수 있었다.

[0148]

기능성 수화 히알루론산 2중코팅된 유산균의 경쟁적 부착저해능

구분	<i>Salmonella typhimurium</i> 부착저해율(%)		
	비코팅	히알루론산 2중코팅	기능성수화히알루론산 2중코팅
<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 gasserii</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

[0149]

<6-6> 기능성 수화 히알루론산 2중 코팅 유산균의 in vivo 장 정착성

[0150]

기능성 수화 히알루론산 2중 코팅 유산균의 in vivo 장 정착성 실험을 위해서 4주령된 ICR 마우스를 시험군당 5마리씩 사용하였다. 특히 이 실험에서는 항생제 투여를 통해 장내 세균총을 교란시킨 후 장내 세균총 중 lactobacilli의 수복에 효과적인 실험군을 선발할 목적으로 진행하였다.

[0151]

실험군으로 비코팅 유산균, 히알루론산 2중코팅 유산균, 기능성 수화 히알루론산 2중 코팅 유산균 투여군, 유산균을 투여하지 않은 대조군으로 구성하였다. 시험기간은 총 6주로 첫 0.5주간은 실험동물의 적응기로 하였으며, 적응기가 끝난 다음 1주는 ampicillin 항생제 투여기간으로 매일 0.4g/l의 ampicillin을 음용수에 넣어 섭취하게 하였다.

[0152]

다음 2주간은 유산균을 경구투여 하였으며, 이때 균수는 1×10^{10} CFU/g을 사용하였다. 대조군으로는 유산균을 대신하여 PBS를 경구투여하였다. 다음 2.5주간은 유산균 투여를 중단하고 장내 균총변화를 관찰하였다. 전 시험기간 동안 매주 2회 각각의 실험군에서 분변샘플을 회수하여 lactobacilli의 균수를 LBS (Lactobacillus selective media, BD, USA) agar배지로 실험군별로 증식도의 차이를 분석하였다.

[0153]

이에 대한 결과를 도 6에 나타내었다.

[0154]

도 6에서 볼 수 있는 바와 같이, 비코팅 유산균보다 히알루론산 2중 코팅된 유산균과 기능성 수화 히알루론산 2중 코팅 유산균 투여군에서 투여 중단 후, 2.5주까지 분변에서 락토바실러스 균이 검출되는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 코팅유산균의 형태가 히알루론산 단독으로 기반한 구조여서 위산과 담즙산 등에 취약한 구조이기 때문에 두 개군이 모두 유사한 장내 정착성 패턴을 나타내었다.

[0155]

<6-7> 기능성 수화 히알루론산 2중 코팅 유산균의 in vivo 유해세균억제능

[0156]

In vivo에서 기능성 수화 히알루론산 2중 코팅 유산균의 유해세균 억제능을 확인하기 위해, 살모넬라 티피뮤리움 KCTC 2054를 감염시킨 마우스 모델에서 항균력을 조사하였다. 6주령된 female ICR 마우스 5마리/cage를 1개군으로 샘플은 비코팅 유산균, 히알루론산 2중 코팅 유산균, 기능성 수화 히알루론산 2중 코팅 유산균, PBS투여군(vehicle)의 총 4개군으로 구분하였다. 계류기간이 끝난 마우스를 대상으로 0.2%(w/v)테트라사이클린을 200 ul/mouse/day씩 1주일간 투여하여 마우스 고유의 장내 세균총을 억제 및 교란시켰다. 1주일 경과 후, 살모넬라

티피뮤리움 KCTC 2054 (1×10^8 CFU/ml)를 시료 투여기간 초기 3일간 200 ul/mouse/day씩 경구투여하고 4가지 샘플도 2주동안 200 ul/mouse/day씩 경구투여하였고, 이때 균수는 1×10^{10} CFU/g을 사용하였다 다음 2.5주간은 샘플 투여를 중단하고 유해균의 성장억제변화를 관찰하였다. 전 시험기간 동안 매주 2회 각각의 실험군에서 분변샘플을 회수하여 살모넬라 균수를 BG agar배지로 분석하였다.

[0157] 이에 대한 결과를 도 7에 나타내었다.

[0158] 도 7에서 볼 수 있는 바와 같이, 장내 상재균총을 항생제로 억제시킨 후 살모넬라 티피뮤리움 KCTC 2054로 감염시킨 마우스 모델에 비코팅, 히알루론산 2중코팅, 기능성 수화 히알루론산 2중코팅 유산균 샘플을 투여한 결과, 단순경쟁 배제역할을 하는 비코팅, 히알루론산 2중 코팅된 유산균은 살모넬라 티피뮤리움 KCTC 2054와 경쟁을 통해 생육을 억제함을 알 수 있었으며, 기능성 수화 히알루론산 2중코팅 유산균은 살모넬라 티피뮤리움 KCTC 2054에 대해 길항작용과 경쟁적 배제작용을 동시에 함으로써 10배 이상 효율적으로 살모넬라 티피뮤리움 KCTC 2054를 억제하는 것으로 확인되었다.

[0159]

[0160] <실시예 7>

[0161] 기능성 수화 3중코팅 유산균

[0162] <7-1> 기능성 수화 3중 코팅 유산균의 조제

[0163] 본 발명에서는 한국 등록특허(제10-1280232호)의 명세서 실시예의 유산균 코팅방법을 토대로 유산균의 표면박막 코팅제이면서 1차 코팅제로 CMC-Na, 2차 코팅제로 상기 <실시예 1>에서 조제한 기능성 수화 히알루론산을 사용하고 3차 코팅제로 말토덱스트린(maltodextrin)을 사용하여 기능성 수화 3중 코팅 유산균을 조제하였다. 대조군으로 기능성 수화 히알루론산 대신 일반 히알루론산을 사용하여 히알루론산 3중 코팅 유산균을 조제하여 사용하였다.

[0164] <7-2> 기능성 수화 3중 코팅 유산균의 내산성 (acid tolerance)

[0165] 내산성은 인체의 소화기관 중 위(stomach)에 유산균이 통과할 때 위산(gastric juice)에 노출되게 되는데 이러한 환경을 시험관 조건에서 기능성 수화 히알루론산 3중 코팅 유산균과 히알루론산 3중 코팅 유산균을 비교하였다[표9]. 실험방법은 본 발명의 실시예 <6-2>와 동일하게 진행하였다.

[0166] 이에 대한 결과를 하기 표 9에 나타내었다.

표 9

기능성 수화 히알루론산 3중코팅 유산균의 내산성 결과

[0167]

코팅 유무	시험군	pH 2.3 ($\times 10^8$ CFU/g)				pH 2.5 ($\times 10^8$ CFU/g)			
		0 시간	1 시간	2 시간	생존율 (%)	0 시간	1 시간	2 시간	생존율 (%)

히알루론산 3중 코팅	<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 gasserii</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
	<i>Bifidobacterium longum</i>	162	115	102	63	162	122	104	64
	<i>Enterococcus 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
	기능성 수화 히 알루론산 3중 코팅	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	136	91	78	58	136	101	84
<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 gasserii</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>Enterococcus 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

[0168] 상기 표 9에 나타난 바와 같이, 기능성 수화 히알루론산 3중코팅 유산균을 조제하여 내산성을 비교한 결과 일반 히알루론산을 사용한 3중코팅 유산균과 동등한 효과를 나타내었다. 이러한 결과는 기능성 수화 히알루론산이 제조되는 과정 중 유산균을 보호하는 히알루론산 고유의 특성이 파괴되지 않았기 때문으로 사료된다.

[0169] 한편, 상기 표의 결과 중 *Lactobacillus acidophilus* IDCC 3302 결과만을 비교해 봤을 때, 일반 히알루론산을 사용한 3중코팅 유산균은 60% (pH 2.3), 64% (pH 2.5) 의 내산성을 나타내었으며, 이는 상기 실시예 <6-2>의 히알루론산 2중코팅 유산균의 50% 대 내산성 보다 높게 평가되어 코팅의 효과가 내산성과의 상관관계에 있음을 알 수 있었다. 즉, 2중코팅보다는 3중코팅에서 내산성이 우수하게 나타나 코팅의 보호효과가 내산성 생존율에 반영된 것을 확인하였다.

[0170] <7-3> 기능성 수화 3중 코팅 유산균의 내담즙산성 (bile tolerance)

[0171] 담즙산(bile acid)에 노출되었을 때 기능성 수화 히알루론산 3중 코팅 유산균과 히알루론산 3중 코팅 유산균을 시험관 환경에서 비교하였다. 실험방법은 본 발명의 실시예 <6-3>와 동일하게 진행하였다.

[0172] 이에 대한 결과를 하기 표 10에 나타내었다.

표 10

기능성 수화 히알루론산 3중코팅 유산균의 내담즙산성 결과

[0173]

코팅유무	시험균	MRS	MRS+0.3% bile	생존율(%)
히알루론산 3중 코팅	<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
	<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
	기능성 수화 히알루론산 3중 코팅	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	235	164
<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
<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

[0174] 상기 표 10에서 볼 수 있는 바와 같이, 5시간 담즙산에 노출하였을 때 기능성 수화 히알루론산 3중 코팅 유산균의 내담즙산성을 히알루론산 3중 코팅 유산균의 내담즙산성과 비교하였을 때, 70% 대의 유사한 생존율을 나타내

었다. 이러한 결과는 기능성 수화 히알루론산이 제조되는 과정 중 유산균을 보호하는 히알루론산 고유의 특성이 파괴되지 않았기 때문으로 사료된다.

[0175] <7-4> 기능성 수화 3중 코팅 유산균의 비경쟁 부착능 (Non-competitive adhesion)

[0176] 경쟁관계의 미생물이 존재하지 않은 상태에서 부착능을 비교하기 위해 상기 3중 코팅 유산균은 한국 등록특허 (제10-1280232호)의 3중코팅 유산균 조제방법을 토대로 제조하였다. 또한 비경쟁적 부착능을 평가하기 위해 본 발명의 실시예<6-4>와 동일하게 실시하였다.

[0177] 이에 대한 결과를 하기 표 11에 나타내었다.

[0178] 하기 표 11에서 볼 수 있는 바와 같이, 장점막과 유사한 Caco-2 cells에 대한 부착능 평가시 비코팅 유산균보다 기능성 수화 히알루론산 및 히알루론산 3중코팅 유산균의 부착효율이 상대적으로 우수하였으며, 기능성 수화 히알루론산 3중코팅 유산균의 부착효율은 히알루론산 3중코팅 유산균과 비교해 전반적으로 더 향상된 부착효율을 나타내었다.

표 11

[0179] 기능성 수화 히알루론산 3중코팅 유산균의 비경쟁 부착능

구분	유산균의 부착능(%)		
	비코팅	히알루론산 3중코팅	기능성수화히알루론산 3중코팅
<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 gasserii</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

[0180] <7-5> 기능성 수화 3중 코팅 유산균의 경쟁적 부착저해능 (Competitive exclusion)

[0181] 기능성 수화 히알루론산 3중 코팅된 유산균이 장내에서 유익한 생리학적 활성을 나타낼 수 있는지 여부를 보다 명확히 판단하기 위해서, 상재균이 존재하는 조건에서 유산균의 부착능을 평가하고자 본 발명의 실시예 <6-5>와 동일한 방법으로 실시하였다.

[0182] 이에 대한 결과를 하기 표 12에 나타내었다.

[0183] 하기 표 12에서 볼 수 있는 바와 같이, 장점막과 유사한 Caco-2 cells에 유해균인 살모넬라 티피뮤리움 KCTC 2054를 먼저 부착시킨 후, 비코팅, 히알루론산 3중코팅, 기능성 수화 히알루론산 3중코팅된 유산균의 경쟁 유해균의 제거율을 비교한 결과, 기능물질이 포함되지 않은 비코팅 유산균은 경쟁제거의 방법으로 살모넬라 티피뮤리움 KCTC 2054를 제거하기 때문에 상대적으로 가장 낮은 제거효율을 보였으며, 기능성 수화 히알루론산 3중코

팅된 유산균은 비코팅 및 히알루론산 3중코팅 유산균보다 현저히 우수한 유해균 제거효율을 나타냈다.

[0184] 한편, 이러한 기능성 수화 히알루론산 3중코팅된 유산균의 효과는 *Lactobacillus acidophilus* IDCC 3302의 결과만을 보더라도 비코팅 유산균보다는 51% 우수한 효과를 나타내었고, 일반 히알루론산 3중코팅 유산균과 비교해도 27% 이상 우수한 효과를 나타내는 것으로 확인되었다. 즉, 기능성 수화 히알루론산을 유산균의 코팅제로 사용한다면, 종래의 일반적인 유산균 코팅제들과 비교해 장내 유해균 저해능이 현저히 향상된다는 것을 알 수 있었다.

표 12

기능성 수화 히알루론산 3중코팅된 유산균의 경쟁적 부착저해능

구분	<i>Salmonella typhimurium</i> 부착저해율(%)		
	비코팅	히알루론산 3중코팅	기능성수화히알루론산 3중코팅
<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 gasserii</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

[0186] <7-6> 기능성 수화 히알루론산 3중 코팅 유산균의 in vivo 장 정착성

[0187] 기능성 수화 히알루론산 3중 코팅 유산균의 in vivo 장 정착성 실험을 위해서 본 발명의 실시예 <6-6>과 동일하게 실시하였다.

[0188] 이에 대한 결과를 도 8에 나타내었다.

[0189] 도 8에서 볼 수 있는 바와 같이, 비코팅 유산균보다 히알루론산 3중 코팅된 유산균과 기능성 수화 히알루론산 3중 코팅 유산균 투여군에서 투여 중단 후, 2.5주까지 분변에서 락토바실러스 균이 검출되는 것을 확인할 수 있었으며 그 효과는 기능성 수화 히알루론산 3중 코팅 유산균에서 가장 우수한 것으로 확인되었다.

[0190] 반면 비코팅 유산균은 투여 중단 후, 1주까지만 분변에서 락토바실러스 균이 검출되었으며, 기능성 수화 히알루론산 3중 코팅 유산균 그룹이 1.5주 더 연장되어 검출됨으로써 장 정착성이 가장 우수한 것으로 확인되었다.

[0191] 특히, 기능성 수화 히알루론산 3중코팅 유산균의 경우 경쟁적 배제(competitive exclusion)를 통한 장 점막의 부착뿐만 아니라, 증식 또한 활발해져 1×10^3 CFU 수준으로 *Lactobacillus* sp.이 검출됨으로써 항생제 및 살모넬라 티피뮤리움으로 교란된 장내 균총 중 유익균을 증식시키는 역할을 하는 것으로 판단되었다.

[0192] <7-7> 기능성 수화 히알루론산 3중 코팅 유산균의 in vivo 유해세균억제능

[0193] In vivo에서 기능성 수화 히알루론산 3중 코팅 유산균의 유해세균 억제능을 확인하기 위해, 살모넬라 티피뮤리

음 KCTC 2054를 감염시킨 마우스 모델에서 항균력을 본 발명 실시예<6-7>과 동일하게 실시하였다.

[0194] 이에 대한 결과를 도 9에 나타내었다.

[0195] 도 9에서 볼 수 있는 바와 같이, 장내 상재균총을 항생제로 억제시킨 후 살모넬라 티피뮤리움 KCTC 2054로 감염시킨 마우스 모델에 비코팅, 히알루론산 3중코팅, 기능성 수화 히알루론산 3중코팅 유산균 샘플을 투여한 결과, 단순경쟁 배제역할을 하는 비코팅, 히알루론산 3중 코팅된 유산균은 살모넬라 티피뮤리움 KCTC 2054와 경쟁을 통해 생육을 억제함을 알 수 있었으며, 기능성 수화 히알루론산 3중코팅 유산균이 더 효율적으로 오랜기간 살모넬라 티피뮤리움 KCTC 2054를 억제하는 것으로 확인되었다.

[0196] 이러한 결과는 항생제와 경쟁균인 살모넬라 티피뮤리움 KCTC 2054로 교란된 마우스의 장내 균총을 항균작용과 경쟁배제 역할을 기능성 수화 히알루론산 3중코팅된 유산균이 수행함으로써 유해균 증식은 항균력과 경쟁배제의 원리로 낮추고 유익균의 증식을 늘림으로써 장내환경을 빠르게 정상화하는 것으로 확인되었다.

[0197] <실시예 8>

[0198] 기능성 수화 히알루론산 4중코팅 유산균

[0199] <8-1> 기능성 수화 히알루론산 4중 코팅 유산균의 조제

[0200] 본 발명에서는 한국 등록특허(제10-1280232호)의 4중코팅 유산균 조제방법을 토대로 유산균의 표면박막코팅제이면서 1차 코팅제로 CMC-Na, 2차 코팅제로 상기 <실시예 1>에서 조제한 기능성 수화 히알루론산을 사용하고 3차 코팅제로 말토덱스트린(maltodextrin)을 사용하고 마지막 4차 코팅제로 유청단백으로 코팅하여 기능성 수화 히알루론산 4중 코팅 유산균을 조제하였다. 대조군으로 기능성 수화 히알루론산 대신 일반 히알루론산을 사용하여 히알루론산 4중 코팅 유산균을 조제하여 사용하였다.

[0201] <8-2> 기능성 수화 히알루론산 4중 코팅 유산균의 내산성 (acid tolerance)

[0202] 내산성은 인체의 소화기관 중 위(stomach)에 유산균이 통과할 때 위산(gastric juice)에 노출되게 되는데, 이와 유사한 환경을 시험관 조건에서 조성하여 기능성 수화 히알루론산 4중 코팅 유산균과 히알루론산 4중 코팅 유산균의 내산성을 생존율을 통해 비교하였다. 실험방법은 본 발명의 실시예 <6-2>와 동일하게 진행하였다.

[0203] 이에 대한 결과를 하기 표 13에 나타내었다.

표 13

기능성 수화 히알루론산 4중코팅 유산균의 내산성결과

[0204]

코팅 유무	시험균	pH 2.3 ($\times 10^8$ CFU/g)				pH 2.5 ($\times 10^8$ CFU/g)			
		0 시간	1 시간	2 시간	생존율 (%)	0 시간	1 시간	2 시간	생존율 (%)

히알루론산 4중 코팅	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	150	121	105	70	150	131	123	82
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	145	112	96	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 gasserii</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
	기능성 수화 히 알루론산 4중 코팅	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	146	111	100	69	146	121	112
<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 gasserii</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

[0205] 상기 표 13에 나타낸 바와 같이, 기능성 수화 히알루론산을 이용한 4중코팅 유산균의 내산성은 종래의 2중, 3중 코팅 유산균보다 높은 내산성을 나타내었으며, pH 2.5 조건에서 더 높은 내산성을 나타내었다. 이러한 결과는 4중코팅 유산균 본래의 높은 내산성 효과에 기인한 것으로 판단되며, 기능성 수화 히알루론산 4중코팅 유산균 또한 종래의 4중코팅 유산균의 내산성과 유사 패턴을 나타냄으로써 구조적으로 안정한 형태임을 예상할 수 있었다.

[0206] <8-3> 기능성 수화 히알루론산 4중코팅 유산균의 내담즙산성 (bile tolerance)

[0207] 담즙산(bile acid)에 노출되었을 때 기능성 수화 히알루론산 4중 코팅 유산균과 히알루론산 4중 코팅 유산균의 생존율을 시험관 환경에서 비교하였다. 실험방법은 본 발명의 실시예 <6-3>와 동일하게 진행하였다.

[0208] 이에 대한 결과를 하기 표 14에 나타내었다.

표 14

기능성 수화 히알루론산 4중코팅 유산균의 내담즙산성 결과

코팅유무	시험균	MRS	MRS+0.3% bile	생존율(%)
히알루론산 4중 코팅	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	245	206	84
	<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
	기능성 수화 히알루론산 4중 코팅	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IDCC 3302	235	185
<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

[0210] 상기 표 14에 나타난 바와 같이, 기능성 수화 히알루론산을 이용한 4중코팅 유산균의 내담즙산성에 대한 효과는 종래의 4중코팅 유산균과 큰 차이를 보이지 않아 구조적으로 안정한 형태를 유지하는 것으로 판단된다.

[0211] <8-4> 기능성 수화 히알루론산 4중코팅 유산균의 비경쟁 부착능 (Non-competitive adhesion)

[0212] 경쟁관계의 미생물이 존재하지 않은 상태에서 부착능을 비교하기 위해 상기 4중 코팅 유산균은 한국 등록특허 (제10-1280232호)의 4중코팅 유산균 조제방법을 토대로 제조하였다. 또한 비경쟁적 부착능을 평가하기 위해 본

발명의 실시예<6-4>와 동일하게 실시하였다.

[0213] 이에 대한 결과를 하기 표 15에 나타내었다.

[0214] 하기 표 15에서 볼 수 있는 바와 같이, 장점막과 유사한 Caco-2 cells에 대한 부착능 평가시 비코팅 유산균보다 히알루론산 4중코팅 유산균의 부착효율이 상대적으로 우수하였으며, 기능성 수화 히알루론산 4중코팅 유산균의 부착효율은 히알루론산 4중코팅 유산균과 동등한 부착효율을 나타내었다.

표 15

[0215] 기능성 수화 히알루론산 4중코팅된 유산균의 비경쟁 부착능

구분	유산균의 부착능(%)		
	비코팅	히알루론산 4중코팅	기능성수화히알루론산 4중코팅
<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

[0216] 기능성 수화 히알루론산을 이용한 4중코팅 유산균의 단순 부착능은 코팅수에 따라 더 부착효율이 높아진 것을 확인할 수 있었다. 즉, *Lactobacillus acidophilus* IDCC 3302의 결과만을 평가해 봤을 때, 기능성 수화 히알루론산 2중코팅 유산균(48% 부착율), 기능성 수화 히알루론산 3중코팅 유산균(56% 부착율), 기능성 수화 히알루론산 4중코팅 유산균(66% 부착율)로 코팅 수에 따라 20%이상 부착율이 높아졌다. 이러한 결과는 3차, 4차 코팅제인 말토덱스트린과 유청단백가 산성환경에 유산균의 노출을 최소화하고 2차 코팅제 또한 일정시간 노출시간을 줄여줌으로써 점막과의 상호작용을 최대화하였기 때문으로 예상된다.

[0217] **<8-5> 기능성 수화 히알루론산 4중코팅 유산균의 경쟁적 부착저해능 (Competitive exclusion)**

[0218] 기능성 수화 히알루론산 3중 코팅된 유산균이 장내에서 유익한 생리학적 활성을 나타낼 수 있는지 여부를 보다 명확히 판단하기 위해서, 상재균이 존재하는 조건에서 유산균의 부착능을 평가하고자 본 발명의 실시예 <6-5>와 동일한 방법으로 실시하였다.

[0219] 이에 대한 결과를 하기 표 16에 나타내었다.

[0220] 하기 표 16에서 볼 수 있는 바와 같이, 장점막과 유사한 Caco-2 cells에 유해균인 살모넬라 티피뮤리움 KCTC 2054를 먼저 부착시킨 후, 비코팅, 히알루론산 4중코팅, 기능성 수화 히알루론산 4중코팅된 유산균의 경쟁 유해균의 제거율을 비교한 결과, 기능물질이 포함되지 않은 비코팅 유산균은 경쟁제거의 방법으로 살모넬라 티피뮤리움 KCTC 2054를 제거하기 때문에 상대적으로 가장 낮은 제거효율을 보였으며, 기능성 수화 히알루론산 4중코팅된 유산균은 비코팅 및 일반 히알루론산 4중코팅 유산균보다 현저히 높은 유해균 제거효율을 나타냈다.

[0221] 한편, 이러한 기능성 수화 히알루론산 4중코팅된 유산균의 효과는 *Lactobacillus acidophilus* IDCC 3302의 결과만을 보더라도 비코팅 유산균보다는 57% 우수한 효과를 나타내었고, 일반 히알루론산 4중코팅 유산균과 비교해도 31% 이상 우수한 효과를 나타내는 것으로 확인되었다. 즉, 기능성 수화 히알루론산을 유산균의 코팅제로 사용한다면, 종래의 일반적인 유산균 코팅제들과 비교해 장내 유해균 저해능이 현저히 향상된다는 것을 알 수 있었다.

표 16

[0222] 기능성 수화 히알루론산 4중코팅된 유산균의 경쟁적 부착저해능

구분	<i>Salmonella typhimurium</i> 부착저해율(%)		
	비코팅	히알루론산 4중코팅	기능성수화히알루론산 4중코팅
<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

[0223] 기능성 수화 히알루론산의 4중코팅 유산균의 경쟁적 부착저해능은 상기 실시예 <8-4>에서 평가한 단순 부착능보다 효율이 30% 정도로 향상되었다. 이러한 결과는 종래의 4중코팅 유산균이 경쟁배제를 통한 부착효율을 높여 증식한 것이라면, 기능성 수화 히알루론산 4중코팅 유산균은 경쟁배제를 항균력과 같이 접목함으로써 경쟁 균주인 살모넬라 티피뮤리움의 활성도를 낮춤으로써 부착기회를 늘렸기 때문인 것으로 예상되었다.

[0224] <8-6> 기능성 수화 히알루론산 4중 코팅 유산균의 *in vivo* 장 정착성

[0225] 기능성 수화 히알루론산 3중 코팅 유산균의 *in vivo* 장 정착성 실험을 위해서 본 발명의 실시예 <6-6>과 동일하게 실시하였다.

[0226] 이에 대한 결과를 도 10에 나타내었다.

[0227] 도 10에서 볼 수 있는 바와 같이, 비코팅 유산균보다 히알루론산 4중 코팅된 유산균과 기능성 수화 히알루론산 4중 코팅 유산균 투여군에서 투여 중단 후, 2.5주까지 분변에서 락토바실러스 균이 검출되는 것을 확인할 수 있었으며 그 효과는 기능성 수화 히알루론산 4중 코팅 유산균에서 가장 우수한 것으로 확인되었다.

[0228] 반면 비코팅 유산균은 투여 중단 후, 1주까지만 분변에서 락토바실러스 균이 검출되어, 기능성 수화 히알루론산 4중 코팅 유산균 그룹이 1.5주 더 연장되어 검출됨으로써 장 정착성이 상대적으로 우수한 것으로 확인되었다.

[0229] <8-7> 기능성 수화 히알루론산 4중 코팅 유산균의 *in vivo* 유해세균억제능

[0230] *In vivo*에서 기능성 수화 히알루론산 4중 코팅 유산균의 유해세균 억제능을 확인하기 위해, 살모넬라 티피뮤리움 KCTC 2054를 감염시킨 마우스 모델에서 항균력을 본 발명 실시예<6-7>과 동일하게 실시하였다.

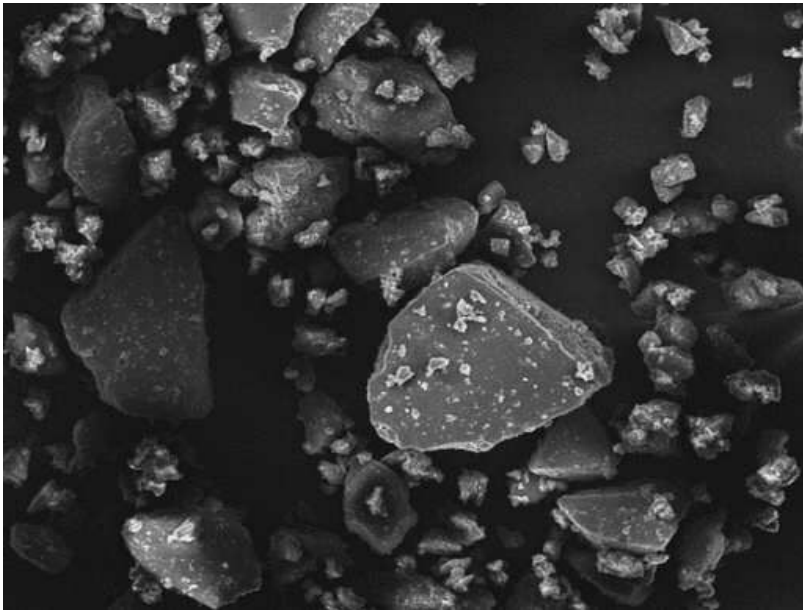
- [0231] 이에 대한 결과를 도 11에 나타내었다.
- [0232] 도 11에서 볼 수 있는 바와 같이, 장내 상재균총을 항생제로 억제시킨 후 살모넬라 티피뮤리움 KCTC 2054로 감염시킨 마우스 모델에 비코팅, 히알루론산 4중코팅, 기능성 수화 히알루론산 4중코팅 유산균 샘플을 투여한 결과, 단순경쟁 배제역할을 하는 비코팅, 히알루론산 4중 코팅된 유산균은 살모넬라 티피뮤리움 KCTC 2054와 경쟁을 통해 생육을 억제함을 알 수 있었으며, 기능성 수화 히알루론산 4중코팅 유산균이 더 효율적으로 오랜기간 살모넬라 티피뮤리움 KCTC 2054를 억제하는 것으로 확인되었다.
- [0233] 한편, 항균력과 생균의 경쟁배제 역할을 모두 갖춘 기능성 수화 히알루론산 4중코팅된 유산균은 살모넬라 티피뮤리움 KCTC 2054의 감염 후 처음부터 생육을 억제함으로써 유산균이 유해균인 살모넬라 티피뮤리움 KCTC 2054의 영향을 덜 받게 해주어 유산균의 증식으로 개체수를 늘릴 수 있고 늘어난 유산균의 개체수로 인해 투여 중단 2.5주후까지도 정상균총을 유지할 수 있도록 도와주었다.
- [0234] <실시예 9>
- [0235] **전자현미경(FE-SEM) 구조분석**
- [0236] 상기 실시예 1에서 조제한 기능성 수화 히알루론산 4중 코팅된 락토바실러스 아시도필루스 IDCC 3302의 성상을 조제공정에 따라 전자현미경 촬영을 통해 구조적 분석을 하였다. 기능성 수화 히알루론산 4중 코팅된 유산균 조제공정을 단계적으로 전자현미경 구조분석을 하여 도 12 내지 도 16 에 나타내었다.
- [0237] 도 12 내지 도 16에 나타낸 바와 같이, 유산균에 CMC-Na를 혼합하는 경우에, 유산균체 표면을 CMC-Na가 필름과 같은 박막을 형성하면서 코팅된 것을 관찰할 수 있었다(도 13). 또한, CMC-Na와 기능성 수화 히알루론산이 혼합되면서 구조적으로 기능성 수화 히알루론산 구조가 더욱 조밀해지는 현상을 관찰할 수 있었으며(도 14), 다공성 입자인 말토덱스트린을 첨가하여 외부 수분과 온도가 쉽게 균체에 전달되지 않게 하고(도 15), 마지막으로 유청 단백질로 코팅을 진행하면서 균체가 외부로 노출되지 않도록 하였다(도 16).
- [0238] 즉, 1차 내지 4차 코팅제가 순차적으로 첨가될수록 각각의 코팅제가 유산균을 코팅하면서 보다 조밀하고 견고하게 유산균이 보호되는 것을 확인할 수 있었다.

산업상 이용가능성

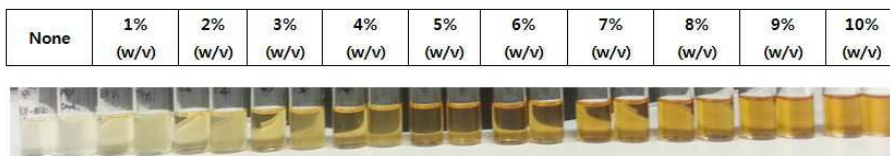
- [0239] 본 발명의 기능성 수화 히알루론산은 유해균에 대해서는 증식 억제작용 및 유익균에 대해서는 증식 촉진 작용을 나타내어 선택적 길항작용을 나타내는 효과가 있으며, 본 발명의 방법으로 코팅된 4중 코팅된 유산균은 유산균에 수용성 폴리머, 기능성 수화 히알루론산, 다공성 입자를 가지는 코팅제, 단백질을 혼합하여 4중 코팅함으로써, 종래 비코팅, 단일, 2중, 3중 및 4중 코팅 유산균에서는 나타나지 않은 우수한 장 점막 부착능 및 유해세균에 대한 선택적 길항작용을 나타낼 뿐만 아니라, 내산성 및 내담즙성도 매우 우수하여 유산균 본래의 생리활성 기능을 소실하지 않는 효과가 있어 산업상 이용가능성이 매우 우수하다.

도면

도면1

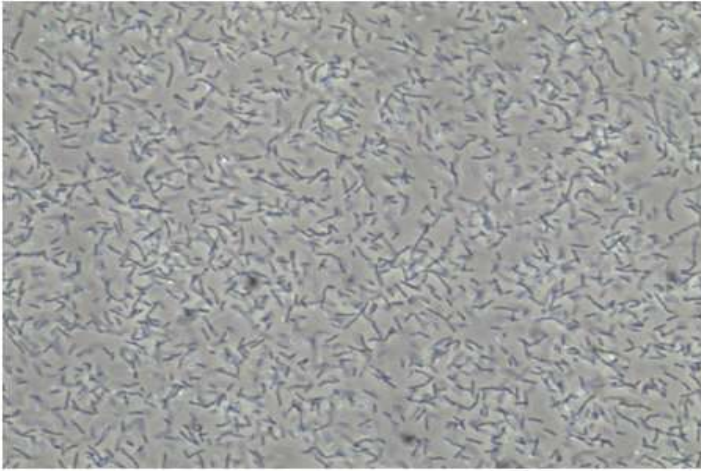


도면2

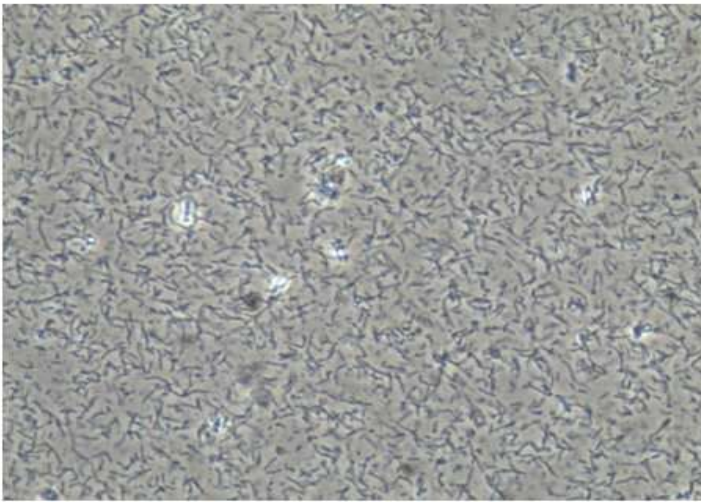


도면3

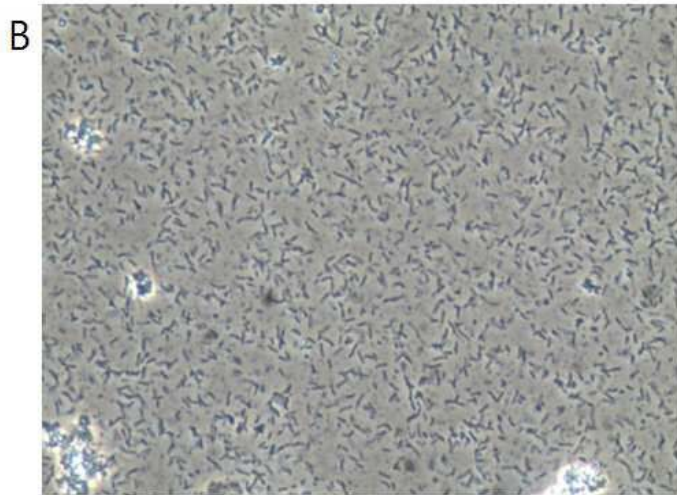
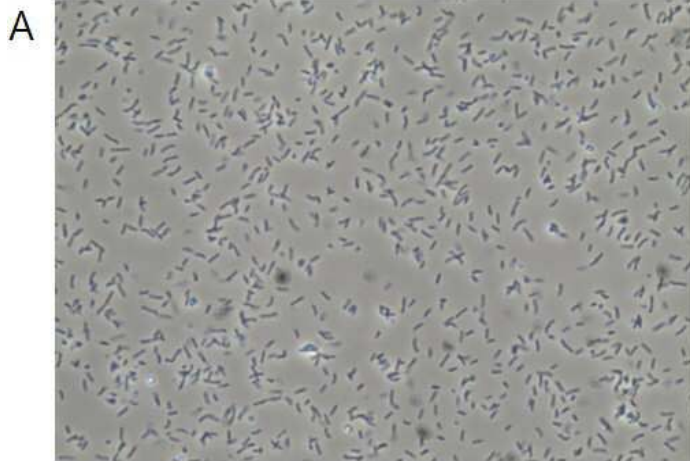
A



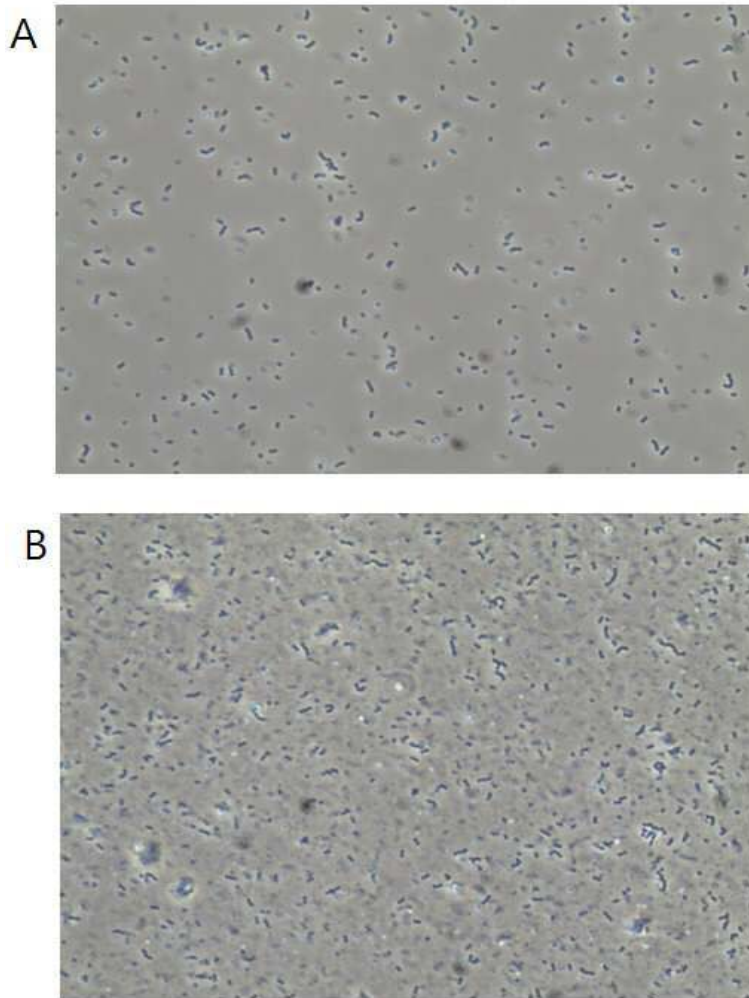
B



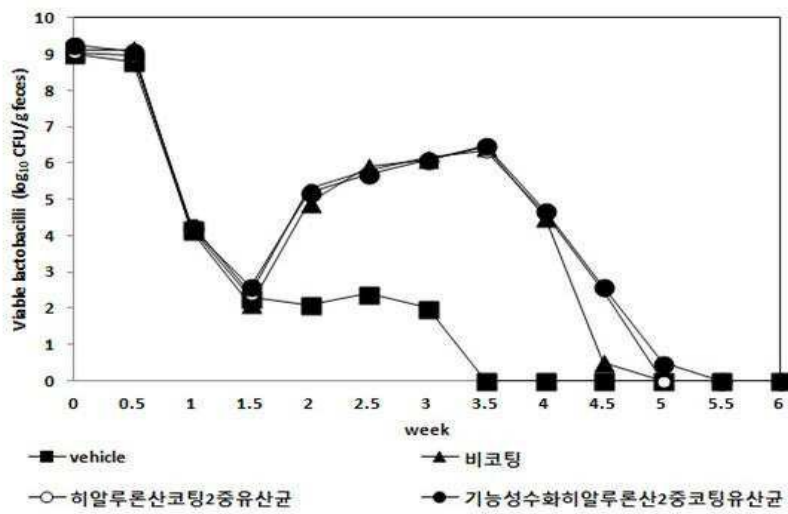
도면4



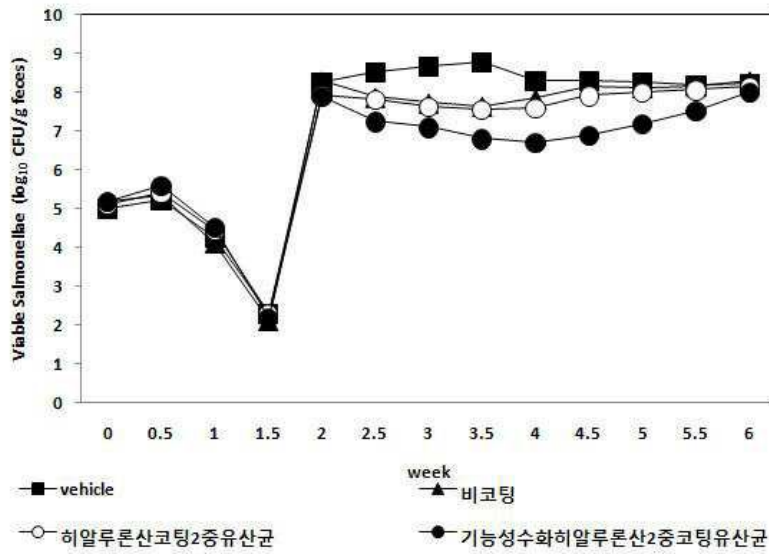
도면5



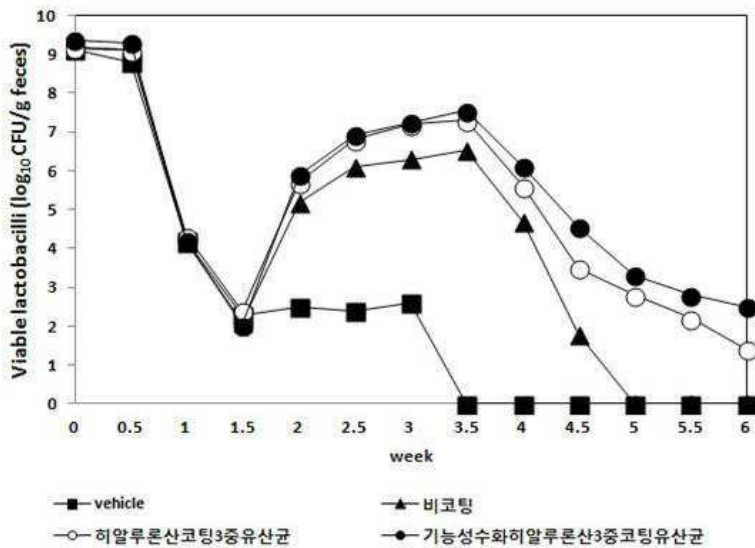
도면6



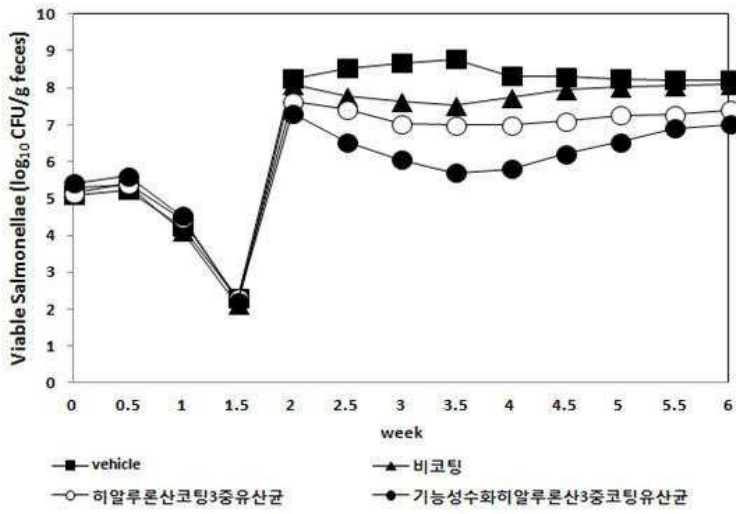
도면7



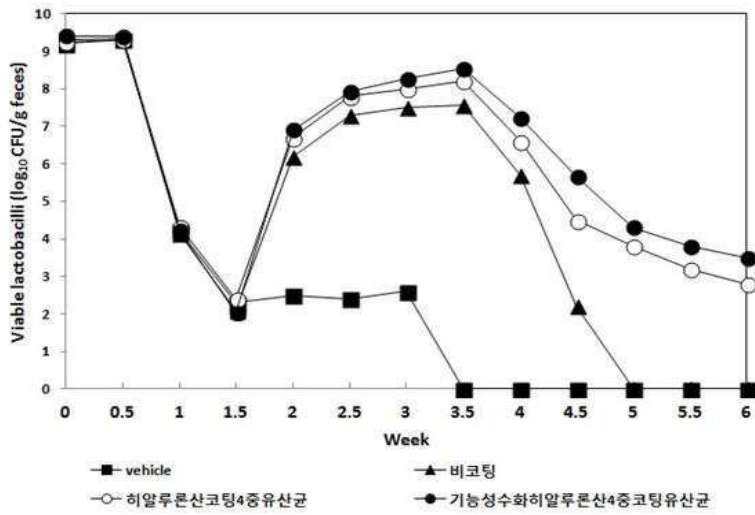
도면8



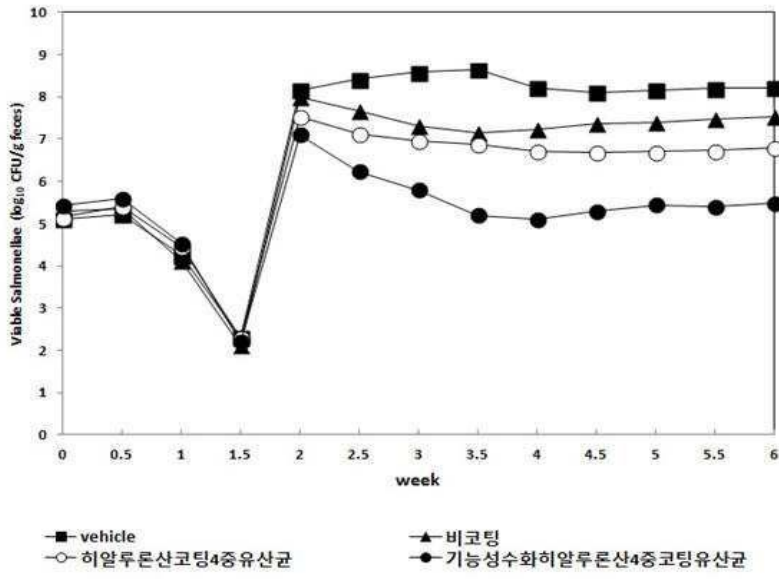
도면9



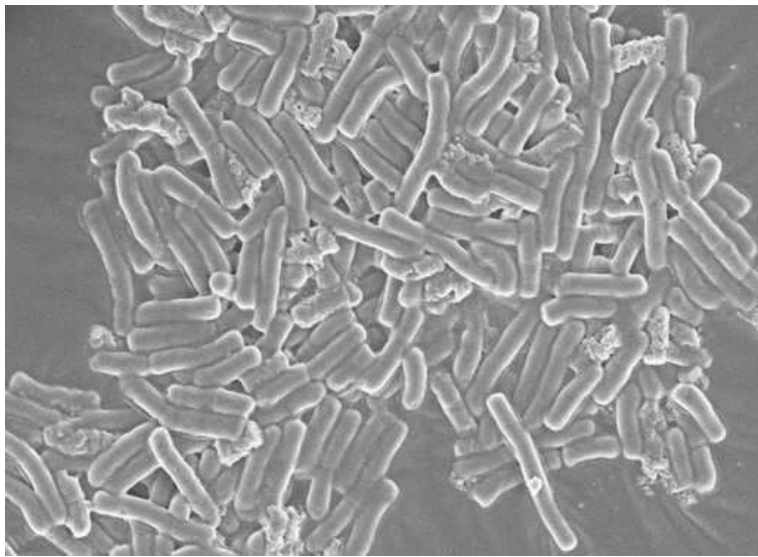
도면10



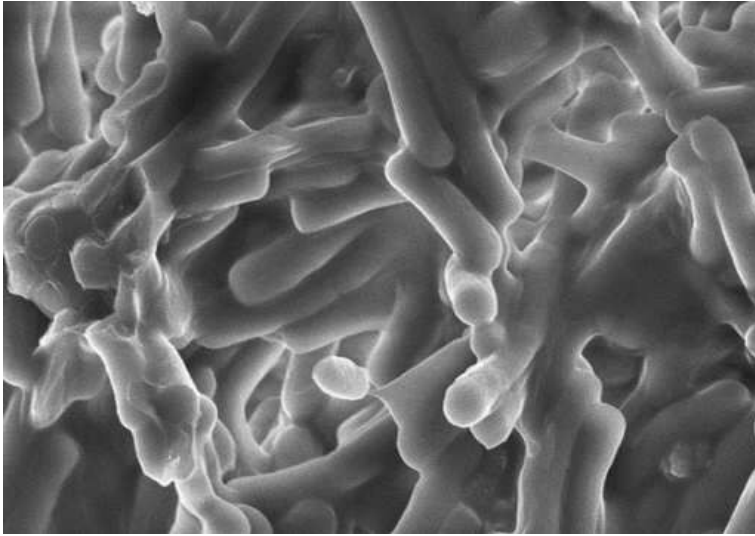
도면11



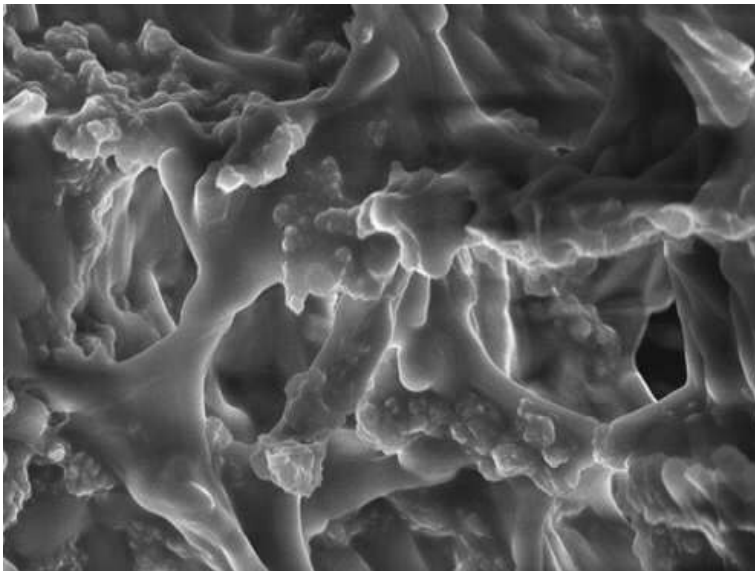
도면12



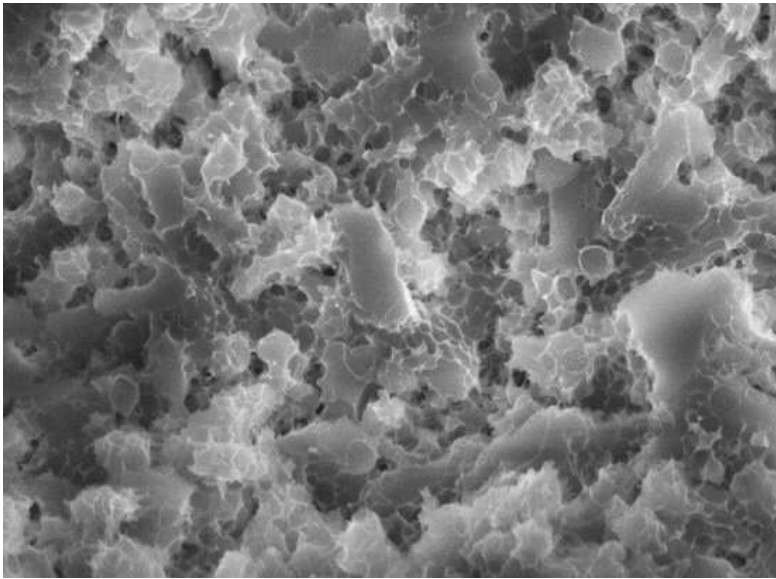
도면13



도면14



도면15



도면16

