



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0085425
(43) 공개일자 2023년06월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/50 (2006.01) A23L 33/135 (2016.01)
A23P 10/30 (2016.01) A61K 35/00 (2015.01)
A61K 35/744 (2015.01) A61K 35/745 (2015.01)
G16C 20/10 (2019.01) G16C 20/30 (2019.01)

(52) CPC특허분류

A61K 9/5089 (2013.01)
A23L 33/135 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2021-0173579

(22) 출원일자 2021년12월07일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 용소로 45, 부경대학교내 (대연동)

(72) 발명자

김영목

부산광역시 남구 분포로 111, 109동 1103호(용호동, 엘지메트로시티)

유대웅

경상남도 창원시

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

위병갑

전체 청구항 수 : 총 11 항

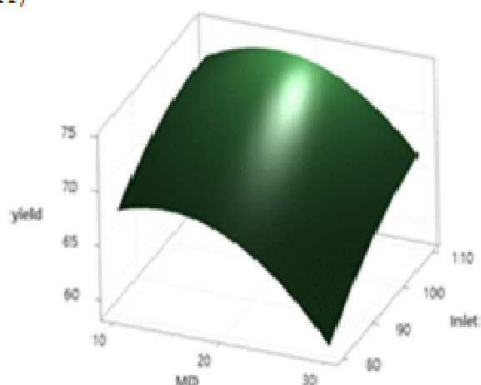
(54) 발명의 명칭 유산균 캡슐 및 신바이오텍스의 제조방법

(57) 요약

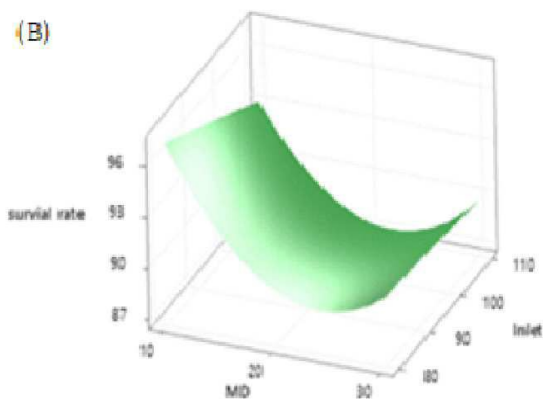
본 발명은 반응표면분석법(Response Surface methodology, RSM)을 이용하여 최적의 조건으로 유산균 캡슐 및 신바이오텍스를 제조하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도2

(A)



(B)



(52) CPC특허분류

A23P 10/30 (2016.08)
A61K 35/744 (2013.01)
A61K 35/745 (2013.01)
A61K 9/5036 (2013.01)
A61K 9/5063 (2013.01)
G16C 20/10 (2019.02)
G16C 20/30 (2019.02)
A61K 2035/115 (2013.01)

송예준

부산광역시 남구 대연동 수영로 334번길 43 하니빌
 301호

(72) 발명자

이창현

부산광역시 사상구 주례로 127 동주하이츠빌라 다
 동 502호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1525011514
과제번호	202000732
부처명	해양수산부
과제관리(전문)기관명	해양수산과학기술진흥원
연구사업명	해양산업수요기술개발사업(R&D)
연구과제명	유산균이 살아있는 고농도 발효 GABA소금의 개발 및 상용화 계획
기 여 율	1/1
과제수행기관명	(주)마린바이오프로세스
연구기간	2020.05.18 ~ 2021.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

유산균과 피복 물질을 분무 건조기에 투입한 후 분무건조하여 유산균 캡슐을 제조하는 단계를 포함하며, 상기 피복물질의 농도는 5 내지 40%이고 분무 건조기의 입구 온도는 75~90℃인 것인, 유산균 캡슐의 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 유산균은 락토바실러스속 균주 또는 비피도박테리움 균주인 것인, 유산균 캡슐의 제조 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 피복 물질은 말토덱스트린, 이눌린, 치아(chia) 시드 및 아마 시드로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 유산균 캡슐의 제조 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 유산균과 피복 물질의 투입 속도는 90~110 mL/hr이고, 분무 건조기의 오토마이저(atomizer)의 압력은 110~130 kPa인 것인, 유산균 캡슐의 제조 방법.

청구항 5

유산균과 프리바이오틱스를 분무 건조기에 투입한 후 분무건조하여 신바이오틱스를 제조하는 단계를 포함하며, 상기 프리바이오틱스의 농도는 5 내지 40%이고 분무 건조기의 입구 온도는 75~90℃인 것인, 신바이오틱스의 제조 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 유산균은 락토바실러스속 균주 또는 비피도박테리움 균주인 것인, 신바이오틱스의 제조 방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 프리바이오틱스는 이눌린, 치아(chia) 시드 및 아마 시드로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 신바이오틱스의 제조 방법.

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 유산균과 프리바이오틱스의 투입 속도는 90~110 mL/hr이고, 분무 건조기의 오토마이저(atomizer)의 압력은 110~130 kPa인 것인, 신바이오틱스의 제조 방법.

청구항 9

반응표면분석법(Response Surface methodology, RSM)을 이용하여 유산균 캡슐의 제조시 최적 조건을 결정하는 것을 포함하는, 최적 조건 결정 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 유산균과 피복물질의 투입 속도, 피복 물질의 농도, 분무 건조기의 입구 온도 및 분무 건조기의 오토마이저의 압력 조건을 결정하는 것인, 최적 조건 결정 방법.

청구항 11

제9항에 있어서, 캡슐화 수율 및 유산균 생존률을 확인하여 최적 조건을 결정하는 것인, 최적 조건 결정

방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 반응표면분석법(Response Surface methodology, RSM)을 이용하여 최적의 조건으로 유산균 캡슐 및 신바이오틱스를 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 유산균은 열 내성이 약하고 일반적인 건조 방법으로는 생산수율이 낮기 때문에 다양한 방법의 건조화 방법에 대한 연구가 필요하다. 일반적인 분말화는 입자가 작고 고온 분말과 입자 크기가 일정수준 이상인 과립형태로 구분할 수 있다. 가장 일반적인 분말화 기술은 4가지이며 이는 분무건조, 동결건조, 열풍건조 및 롤러 또는 드럼 건조이다.

[0003] 유산균 등의 미생물을 제제로 하여 산업적 응용을 위해 다양한 방법이 사용되고 있지만, 일반적으로 열 내성이 약한 미생물의 경우 높은 열에 노출되는 건조 방법은 치명적이며 생균수가 감소되는 등의 단점이 발생하는데 동결건조 등의 낮은 온도에서 안전하게 분말화하는 방법이 있지만 이는 생산량 대비 비용이 높으며 대량 생산에는 적합하지 않음

[0004] 대량 생산에 가장 적합한 방법은 분무건조 등이 있는데 분무건조의 경우 표면적이 넓어지면서 다른 건조방법에 비해 짧게 높은 온도에 노출되고 대량으로 생산이 가능하다는 장점이 있으나 높은 열에 노출되기 때문에 유산균 제제 등의 생균수를 유지하기 위해서는 캡슐화(encapsulation) 기술을 접목하거나 완충제나 보호제 등을 이용하여 분말화하고 있다.

[0005] 유산균의 분무건조 시 사멸하는 균수를 감소시키고 생균수를 증가시키기 위한 기술 중 하나인 캡슐화는 wall material을 첨가하여 core material을 보호함과 동시에 분무건조 등의 공정을 통하여 분말화하는 기술이다.

[0006] 구체적으로 캡슐화란 고체, 액체 및 기체상의 물질을 특정한 물질 및 조직 내부에 봉입하여, 특정 조건에서 조절된 속도로 내용물을 방출할 수 있도록 포장하는 기술로 이 때, 크기가 수 μm ~mm의 범위로 포장하는 것을 encapsulation이라고 하며, 모양은 일반적으로 구형이지만 원래의 물질구조에 따라 다양한 형태(타원형, 직육면체 등)으로 변할 수 있다.

[0007] 캡슐화(Encapsulation)는 에멀전 또는 마이셀의 형태로 수용액상에서 존재하며 건조 시 각 소재 중 수분이 제거되고 분말형태로 건조되며 또한 다시 수용액상에 용해시켰을 때는 다시 에멀전이나 마이셀의 형태를 유지할 수도 있다.

[0008] 의약품의 주요 핵심 성분의 보호, 미생물 제제화를 위한 분말화, 오일류 등의 분말화 등에 다양하게 캡슐화 기술을 접목되어 연구되고 있고 산업현장에서도 다양하게 사용되고 있으며 또한 미생물 제제의 분말화와 더불어 생존률을 높이기 위해서도 다양한 방면으로의 연구가 수행되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1378974호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 이에, 본 발명은 반응표면분석법(Response Surface methodology, RSM)을 이용하여 유산균 캡슐 및 신바이오틱스의 제조를 위한 최적의 조건을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 유산균과 피복 물질을 분무 건조기에 투입한 후 분무건조하여 유산균 캡슐을 제조하는 단계를 포함하며, 상기 피복물질의 농도는 5 내지 40%이고 분무 건조기의 입구 온도는 75~90℃인 것인, 유산균 캡슐의 제조 방법을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 유산균과 프리바이오틱스를 분무 건조기에 투입한 후 분무건조하여 신바이오틱스를 제조하는 단계를 포함하며, 상기 프리바이오틱스의 농도는 5 내지 40%이고 분무 건조기의 입구 온도는 75~90℃인 것인, 신바이오틱스의 제조 방법을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 반응표면분석법(Response Surface methodology, RSM)을 이용하여 유산균 캡슐의 제조시 최적 조건을 결정하는 것을 포함하는, 최적 조건 결정 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명의 반응표면분석법(Response Surface methodology, RSM)을 이용하여 유산균 캡슐의 제조시 최적 조건을 결정할 수 있어 유산균 캡슐의 수율 및 유산균의 생존율을 증가시킬 수 있으며, 신바이오틱스를 효과적으로 제조할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 있어서 *L. plantarum* D-12의 캡슐화시 (A) 캡슐화 수율(Y_1) 및 (B) 유산균 생존율(Y_2)을 함수로 하여 CCD 결과를 3D 플롯팅하여 나뉜 것이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 있어서 *L. plantarum* D-12의 캡슐화시 (A) 캡슐화 수율(Y_1) 및 (B) 유산균 생존율(Y_2)을 함수로 하여 CCD 결과를 3D 플롯팅하여 나뉜 것이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 있어서 *L. plantarum* D-12의 캡슐화시 이눌린 농도(x_1) 및 입구 온도(x_2)를 함수로 하여 신바이오틱스 수율(Y_1) 및 생존율(Y_2)의 최적 조건을 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 있어서 *L. plantarum* D-12의 신바이오틱스의 SEM 이미지이다. A : 동결건조 파우더; B: *L. plantarum* D-12의 신바이오틱스.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 이하 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예들을 상세히 설명한다. 이하의 설명에 있어, 당업자에게 주지 저명한 기술에 대해서는 그 상세한 설명을 생략할 수 있다. 또한, 본 발명을 설명함에 있어서, 관련된 공지 기능 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있다. 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다.

[0017] 따라서 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0019] 본 발명은 유산균과 피복 물질을 분무 건조기에 투입한 후 분무건조하여 유산균 캡슐을 제조하는 단계를 포함하며, 상기 피복물질의 농도는 5 내지 40%이고 분무 건조기의 입구 온도는 75~90℃인 것인, 유산균 캡슐의 제조 방법에 관한 것이다.

[0020] 상기 피복물질의 농도 및 분무 건조기의 입구 온도는 피복 물질과 유산균의 종류에 따라 변경될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0021] 상기 유산균은 락토바실러스속 균주 또는 비피도박테리움 균주일 수 있으며, 예를 들어, 락토바실러스 플란타툼 균주일 수 있으며, 바람직하게는 락토바실러스 플란타툼(*L. plantarum*) D12 균주일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0022] 상기 피복 물질은 본 분야에서 피복 물질 또는 프리바이오틱스로 사용하는 물질이라면 제한없이 사용할 수 있으

며, 예를 들어, 말토덱스트린, 이눌린, 치아(chia) 시드, 아마 시드 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0023] 상기 유산균과 피복 물질의 투입 속도 및 분무 건조기의 오토마이저(atomizer)의 압력은 유산균과 피복 물질의 종류에 따라 달라질 수 있으며, 예를 들어, 유산균과 피복 물질의 투입 속도는 90~110 mL/hr이고, 분무 건조기의 오토마이저(atomizer)의 압력은 110~130 kPa일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0024] 또한 본 발명은 유산균과 프리바이오틱스를 분무 건조기에 투입한 후 분무건조하여 신바이오틱스를 제조하는 단계를 포함하며, 상기 프리바이오틱스의 농도는 5 내지 40%이고 분무 건조기의 입구 온도는 75~90℃인 것인, 신바이오틱스의 제조 방법을 제공한다.

[0025] 상기 프리바이오틱스는 피복 물질로 작용하여 상기 유산균을 캡슐화하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0026] 상기 프리바이오틱스의 농도 및 분무 건조기의 입구 온도는 프리바이오틱스와 유산균의 종류에 따라 변경될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0027] 상기 유산균은 락토바실러스속 균주 또는 비피도박테리움 균주일 수 있으며, 예를 들어, 락토바실러스 플란타룸 균주일 수 있으며, 바람직하게는 락토바실러스 플란타룸(*L. plantarum*) D12 균주일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0028] 상기 프리바이오틱스는 본 분야에서 프리바이오틱스로 사용하는 물질이라면 제한 없이 사용할 수 있으며, 예를 들어, 이눌린, 치아(chia) 시드, 아마 시드 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0029] 상기 유산균과 프리바이오틱스의 투입 속도 및 분무 건조기의 오토마이저(atomizer)의 압력은 유산균과 프리바이오틱스의 종류에 따라 달라질 수 있으며, 예를 들어, 유산균과 프리바이오틱스의 투입 속도는 90~110 mL/hr이고, 분무 건조기의 오토마이저(atomizer)의 압력은 110~130 kPa일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0031] 또한, 본 발명은 반응표면분석법(Response Surface methodology, RSM)을 이용하여 유산균 캡슐의 제조시 최적 조건을 결정하는 것을 포함하는, 최적 조건 결정 방법에 관한 것이다.

[0032] 상기 방법은 유산균과 피복물질의 투입 속도, 피복 물질의 농도, 분무 건조기의 입구 온도 및 분무 건조기의 오토마이저의 압력 조건을 다양화하여 높은 캡슐화 수율 및 유산균 생존율을 보이는 조건을 최적 조건으로 결정하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0034] 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0036] <실시예 1> 락토바실러스 플란타룸(*L. plantarum*) D12의 분리 동정

[0037] 다시마 김치 25 g을 채취하여 0.1M phosphate buffer saline (PBS, pH 7.2) 225 mL로 10배 희석 후 3분간 균질화를 진행하였다. Bromocresol purple를 0.002%(w/v) 첨가한 deMan Rogosa Sharpe (MRS; Difco, Detroit, MI, USA) Agar 배지에 도말 후 37℃에서 24시간 배양하여 단일 집락의 주변의 노란색으로 변한 것을 유산균으로 판단하여 분리하였다. 분리된 유산균은 MRS broth에 24시간 전배양 후 genomic DNA(Chelex bead; Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 추출한 후 27F와 1492R primer를 이용하여 16S rRNA 염기서열을 분석하였다. 분석 결과는 National Center for Biotechnology Information의 database 자료와 비교하여 동정하였다.

[0039] <실시예 2> 캡슐화(Encapsulation) 가능성 탐색

[0040] 실시예 1에서 분리 동정된 락토바실러스 플란타룸(*L. plantarum*) D-12은 사용 전까지 -70℃에서 동결 보관하였으며, 동결 보관된 *L. plantarum* D-12균은 해동 후 MRS broth 배지 500 mL에 1 mL를 현탁하여 37℃ 진탕 배양기(DS 301-FL, Dasol science, Hwasung, Korea)에서 18시간 진탕배양 후 9 log₁₀ CFU/g 농도로 사용하였다. 상업적으로 널리 쓰이는 캡슐화 피복물질(wall material)인 말토덱스트린을 균 농도별로 배양액과 혼합 후 Spray

dryer (ADL311S, Yamato Scientific Co., Ltd Tokyo, Japan)를 활용하여 *L. plantarum* D-12을 캡슐화하였으며, 캡슐화 조건인 말토덱스트린의 농도, 입구 온도, 유속, 시료 주입량 등의 조건은 표 1 및 2에 기재된 바와 같으며, 이의 최적 조건은 캡슐화 전·후 무게 비율 변화에 따른 캡슐화 수율과 *L. plantarum* D-12의 생존율 (pour plate법 활용/MRS agar, 37℃, 48시간 배양) 확인을 통해 RSM(반응표면분석법)으로 탐색하였다.

중심 합성 계획(CCD)에 따라 말토덱스트린 농도 [X_1 10 ~ 30% (w/v)] 및 분무건조 입구온도 [X_2 80 ~ 110℃]를 독립변수로 부호화하여 13개의 조건에 의해 제조된 분말의 수율과 유산균 생존율은 표 3 및 도 1과 같다. 신바이오틱스 수율은 57 ~ 76%, 유산균 생존율은 85~196% 범위로 관찰되었다.

표 1

Coded levels and variables used in CCD for encapsulation of *L. plantarum* D-12

Independent variables	Symbol	Range and level		
		-1	0	+1
Maltodextrin concentration (% w/v)	X_1	10	20	30
Inlet temperature (°C)	X_2	80	95	110

표 2

Matrix CCD experimental design for encapsulation of *L. plantarum* D-12

Run no.	Experimental factor			
	Coded values ¹⁾		Actual values	
	X_1	X_2	maltodextrin concentration (%, w/v)	Inlet temperature (°C)
1	0	0	20	95
2	-1	0	30	95
3	1	1	10	80
4	1	0	30	80
5	0	1	20	95
6	0	0	20	80
7	1	-1	20	110
8	0	0	20	95
9	0	0	10	95
10	-1	1	20	95
11	0	0	10	110
12	-1	-1	30	110
13	0	-1	20	95

¹⁾ X_1 =Maltodextrin concentration (%), X_2 =Inlet temperature of spray dryer (°C)

표 3

Experimental design for CCD and its results for synbiotics of *L. plantarum* D-12

Run no.	Experimental factor			
	Synbiotics condition ¹⁾		Y_1 (Yield, %)	Y_2 (Survival rate, %)
	x_1	x_2		
1	30	95	75.84	88.12±0.77 ²⁾
2	25	95	71.05	92.24±0.11
3	35	110	72.49	84.07±0.47
4	35	95	72.98	86.46±0.52
5	30	110	73.82	84.07±0.47
6	30	95	76.94	87.29±0.11
7	35	80	73.54	100.43±0.59
8	30	95	75.44	86.82±0.17
9	30	95	78.89	83.46±0.11
10	25	110	63.39	90.79±0.13
11	30	95	78.95	87.14±0.60
12	25	80	68.25	98.56±1.35
13	30	80	74.29	97.47±0.91
Predicted	10	86	71.70	97.43

¹⁾ x_1 =Inulin concentration (%), x_2 =Inlet temperature of spray dryer (°C)

²⁾Mean±SD

상기 결과에 근거하여, 캡슐화시 말토덱스트린 농도, 입구 온도, 유속, 시료 주입량 등의 최적 조건은 하기 표 4와 같으며, 이러한 최적 조건에 따라 캡슐화를 한 결과, 캡슐화 예측 수율(Y_1) 및 유산균 생존율(Y_2)은 69.55% 및 96.37%로 예측되며, 캡슐화 수율 및 유산균 생존율은 77.94% 및 98.80%로 나타났다(표 5). 이는 말토덱스트린을 활용한 *L. plantarum* D-12의 캡슐화의 최적 조건이라 판단된다.

표 4

Optimization spray drying condition for encapsulation of *L. plantarum* D-12

Factor	Condition
Feeding rate	100 mL/hr
Atomizer pressure	120 kPa
Maltodextrin concentration	10%
Inlet temperature	86°C

표 5

Predicted values from CCD and measured values of yield and survival rate of encapsulation of *L. plantarum* D-12

	Predicted	Measured
Yield (%)	69.55	77.94±5.46 ¹⁾
Survival rate (%)	96.37	98.80±0.40

<실시예 3> 캡슐화를 활용한 *L. plantarum* D12의 신바이오틱스 최적화

실시예 2에서 규명한 캡슐화 조건 (유속, 주입량)을 바탕으로 하여 프로바이오틱스인 *L. plantarum* D-12 및 캡

술화 피복물질로서 프리바이오틱스인 이눌린(inulin)을 활용하여 Spray dryer를 활용한 신바이오틱스 제조를 위한 최적 캡슐화 조건(이눌린 농도 및 입구 온도)을 신바이오틱스 수율과 *L. plantarum* D-12의 생존율(실시에 2 참조)을 바탕으로 RSM으로 탐색하였다.

[0051] 반응표면분석법 및 신바이오틱스 최적화

[0052] MINITAB 프로그램(MINITAB Ver. 19, MINITAB, Pennsylvania, USA)을 활용하여 프리바이오틱스(INL) 농도와 분무건조 입구 온도에 따른 신바이오틱스 최적화에 대한 실험계획은 중심합성 계획(central composite design, CCD)을 적용하여 다음과 같이 설정하였다. INL 농도와 분무건조 입구 온도를 독립변수로하여 실험하였으며, 실험 범위에 따라 부호화 및 부호화가 되지 않은 실제 실험값을 각각 표 6에 표기 하였으며, CCD에 따라 13구간으로 설정하여 실험을 진행하였다(표 7).

표 6

Coded levels and variables used in CCD for synbiotics of *L. plantarum* D-12

Independent variables	Symbol	Range and level		
		-1	0	+1
Inulin concentration (% w/v)	x_1	25	30	35
Inlet temperature (°C)	x_2	80	95	110

표 7

Matrix CCD experimental design for synbiotics of *L. plantarum* D-12

Run no.	Experimental factor			
	Coded values ¹⁾		Actual values	
	x_1	x_2	Inulin concentration (% w/v)	Inlet temperature (°C)
1	0	0	30	95
2	-1	0	25	95
3	1	1	35	110
4	1	0	35	95
5	0	1	30	110
6	0	0	30	95
7	1	-1	35	80
8	0	0	30	95
9	0	0	30	95
10	-1	1	25	110
11	0	0	30	95
12	-1	-1	25	80
13	0	-1	30	80

¹⁾ x_1 =Inulin concentration (%), x_2 =Inlet temperature of spray dryer (°C)

[0055] 독립변수(X_1 , X_2)와 종속변수(Y_1 , Y_2) 상호 간의 관계에 따라 제시되는 반응 표면 회귀 계수 및 분산 분석 결과를 토대로 모델(model), 1차항(linear), 2차항(quadratic), 교차항(cross-product) 및 적합성 결여도(lack of fit) 각각의 유의성(P -value)에 대한 인정 ($P<0.05$) 여부를 확인하였고, 이들 결과값에 대하여 최종적으로 결정 계수(R^2)를 확인하여 최적 조건을 산출하였다. 또한, 이를 근거로 하여 독립변수 및 종속변수의 설계 모형 적합성은 반응 최적화 도구를 이용하여 종속변수에 대한 각각의 최대값(Maximum value)을 설정하여 분석하였다. 독

립변수에 의해 영향을 받는 종속변수는 건조수율(Y_1), 유산균의 생존율 (Y_2)로 설정하였고, 각 실험의 회귀 분석 결과는 다음 2차항 회귀 모형 식으로 나타내었다.

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_1^2 + b_4X_2^2 + b_5X_1X_2$$

Y: 종속변수, b_1 – b_2 – b_3 – b_4 – b_5 : 회귀변수, X_1 , X_2 : 독립변수

유산균의 캡슐화

유산균의 encapsulation은 spray dryer(ADL311S, Yamato Scientific Co., Ltd. Tokyo, Japan)을 활용하여 반응 표면 분석법에 제시된 실험 조건하에 시료 주입량(100 mL/hr) 및 atomizer pressure(120 kPa)은 고정하고 프리바이오틱스(INL)의 농도 및 분무건조 입구온도를 달리하여 실험을 진행하였다.

신바이오틱스 수율

신바이오틱스 수율(%)은 유산균 배양액의 고형물 함량을 105℃ 상압건조 가열법을 통하여 구한 후 배양액의 고형분 함량과 첨가된 INL 함량 대비 최종 신바이오틱스 무게(g)의 비로 나타내었다.

$$\text{신바이오틱스 수율 (\%)} = \frac{\text{신바이오틱스 무게}}{\text{유산균 배양액의 고형물 함량} + \text{첨가된 inulin 함량}} \times 100$$

유산균 생존율

유산균의 생존율은 pour plate 법으로 분석하였으며, 신바이오틱스화 전 유산균 배양액은 1 mL, 신바이오틱스 분말은 1 g을 9 mL의 멸균 생리 식염수에 10진 희석 후 MRS agar배지와 혼합 분주하여 37℃ 배양기(HQ-DI84, Core Tech, uiwangsi, korea)에서 48시간 배양 후 계수하여 하기 식에 의해 초기 유산균수 대비 신바이오틱스화 후 유산균수 비를 계산하여 생존율로 나타내었다.

$$\text{Survival rate (\%)} = N/N_0 \times 100$$

N = 신바이오틱스화 후 유산균 수 ($\log_{10}$ CFU/g)

N_0 = 신바이오틱스화 전 유산균 수 ($\log_{10}$ CFU/g)

구조분석

신바이오틱스 입자 표면 구조는 scanning electron microscope(SEM)을 활용하여 분석하였다. 먼저, 샘플 분말들을 gold ion coating 한 후 주사전자현미경(CZ/MIRA I LHM/H.S, TESCAN Brno, Czech)으로 분석하였으며, 주사전자현미경 조건은 5.0 kV, 500 ~ 1,000배율로 하였다. 동결건조된 *L. plantarum* D-12 분말을 대조구로 하여 신바이오틱스 *L. plantarum* D-12과 비교 분석하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 반복 측정 후 평균과 표준편차로 나타내었다. RSM 모델의 통계적 유의성 및 적합성 결여 그리고 회귀계수는 MINITAB (Minitab Statistical Software, version 19)의 분산분석(analysis of variance, ANOVA)을 통해 결정하였으며, P -value가 0.05 이하인 것을 유의미하다고 판단하였다.

결과

중심 합성 계획(CCD)에 따라 이눌린(INL) 농도[X_1 25 ~ 35% (w/v)] 및 분무건조 입구온도[X_2 80 ~ 110℃]를 독립변수로 부호화하여 13개의 조건에 의해 제조된 신바이오틱스의 수율과 유산균 생존율은 표 8 및 도 2와 같다.

신바이오틱스 수율은 63 ~ 78%, 유산균 생존율은 83~100% 범위로 관찰되었다.

[0074] 유산균의 생존율은 INL의 농도가 증가함에 따라 미비하게 감소하는 경향을 나타냈는데, 이는 INL 농도의 증가에 따른 초기균수의 상대적 감소 때문이다. 신바이오틱스 수율은 INL 농도가 25%에서 30% 증가함에 따라 약 68%에서 75%로 약 7%정도 증가하였으며 INL 농도가 35%까지 증가 시 수율은 다시 약 3% 정도 감소하는 추세를 나타내었다. 이는 고형분 함량 증가가 일정 농도까지는 수율 증가에 긍정적인 영향을 주지만 일정 농도를 넘어서게 되면 점도의 상승으로 분무건조실 벽면점착으로 인한 수율 저하로 이어지게 되며 나아가 산업적으로는 상당한 경제적 손실을 유발한다.

[0075] 신바이오틱스화 전 유산균 수는 $9.26 \pm 0.3 \log_{10}$ cfu/mL의 범위로 측정되었으며, 신바이오틱스화에 따른 유산균 수는 $7.76 \pm 0.3 \sim 9.10 \pm 0.1 \log_{10}$ cfu/mL범위로 측정되었다. 신바이오틱스화에 따른 유산균 생존율은 입구온도 80℃일때 약 100% 생존율을 나타냈으나 110℃로 증가함에 따라 생존율이 $7.16 \sim 8.15 \log_{10}$ cfu/mL범위로 약 84.47%로 감소하는 것을 확인할 수 있었지만, 이는 FAO/WHO (2002) 발표에 근거하여 $6 \sim 7 \log_{10}$ cfu/mL 이상의 유산균을 함유하고 있어 섭취효과(장내 미생물 환경을 개선)는 충분할 것으로 판단된다. 이러한 유산균의 생존율 감소는 DNA 및 RNA의 변성, 세포질 막의 탈수, 수분 감소에 따른 세포막의 파열과 같은 세포 손상에 의한 것으로 설명된다(Behboudi-Jobbehdar 등, 2013). 신바이오틱스 용액 고형물 함량이 증가할수록 점도가 같이 증가하여 더 높은 분무건조 입구 온도가 요구되며 이는 유산균의 생존율을 감소시킨다. Huang 등 (2016)에 따르면 캡슐화 전 높은 고형분 함량은 분무건조기 입구 온도의 상승을 유발하며 이로 인해 건조 후 유산균 생존율 감소를 초래하며, 나아가 프로바이오틱스의 품질 저하를 초래하여 적정 농도의 고형분 함량이 요구되어진다. Bustamante 등(2020)의 연구에서는 입구온도를 90 ~ 110℃의 범위로 실험하였을 때 가장 낮은 온도인 90℃에서 가장 높은 *L. acidophilus* La-05 생존율이 관찰되었다. 또한, INL의 농도 증가에 따른 유산균 생존율 증가를 확인하여 INL은 피복물질 및 프리바이오틱스으로써 유산균의 열적 안정성 증진 및 손상 예방 효과를 확인하였다.

표 8

Experimental design for CCD and its results for synbiotics of <i>L. plantarum</i> D-12					
Run no.	Experimental factor			Y_1 (Yield, %)	Y_2 (Survival rate, %)
	Synbiotics condition ¹⁾				
	X_1	X_2			
1	30	95	75.84	88.12±0.77 ²⁾	
2	25	95	71.05	92.24±0.11	
3	35	110	72.49	84.07±0.47	
4	35	95	72.98	86.46±0.52	
5	30	110	73.82	84.07±0.47	
6	30	95	76.94	87.29±0.11	
7	35	80	73.54	100.43±0.59	
8	30	95	75.44	86.82±0.17	
9	30	95	78.89	83.46±0.11	
10	25	110	63.39	90.79±0.13	
11	30	95	78.95	87.14±0.60	
12	25	80	68.25	98.56±1.35	
13	30	80	74.29	97.47±0.91	
Predicted	10	86	71.70	97.43	

¹⁾ x_1 =Inulin concentration (%), x_2 =Inlet temperature of spray dryer (°C)

²⁾ Mean±SD

[0076]

[0077] INL 농도와 분무건조 입구 온도를 독립변수로 CCD에 따라 13구간으로 설정하여 실험을 진행하여 도출한 종속변수인 수율(Y_1) 및 유산균 존율(Y_2)을 바탕으로 *L. plantarum* D-12 신바이오틱스시 최적 프리바이오틱스(INL) 농도와 분무건조 입구 온도를 MINITAB 프로그램의 RSREG (response surface analysis by least-squares regression)를 활용하여 예측하였다. 신바이오틱스의 수율(Y_1) 및 유산균 생존율(Y_2)에 대한 반응모형방정식의

간결화를 목적으로 일차항, 이차항 및 교차항에 대한 유의성을 살펴본 결과(표 9), 유의성이 인정되는($P<0.05$) 항은 수율(Y_1)의 경우 일차항(x_1, x_2), 이차항(x_1^2, x_2^2) 및 유산균 생존율(Y_2)의 경우 일차항(x_1, x_2), 교차항(x_1x_2), 이차항(x_1^2, x_2^2)이었고 나머지 항들의 유의성은 인정되지 않았다. 따라서, 신바이오틱스 수율(Y_1) 및 유산균 생존율(Y_2)에 관한 반응모형모델은 $Y_1=-189.5+11.17x_1+1.986x_2-0.1972x_1^2-0.01283x_2^2$ ($R^2=0.8969$, $P\text{-value}=0.002$), $(Y_1)=326.3-3.88x_1-3.296x_2+0.1020x_1^2+0.01949x_2^2-0.0274x_1x_2$ ($R^2=0.9588$, $P\text{-value}=0.000$)과 같다. 반응모형 모델의 독립변수와 종속변수간의 상관관계를 ANOVA분석으로 살펴본 결과는 표 9와 같다. 신바이오틱스 제조 최적화를 위한 수율(Y_1)에 대한 반응모형 모델의 적합성 여부를 나타내는 적합 결여 검증의 경우 $P\text{-value}$ 가 0.364으로 0.05보다 높고, 결정계수(R^2)가 0.8969로 높으면서 모델값이 0.002로 0.05보다 낮아 설계된 모형이 적합한 것으로 판단되었고, 유산균 생존율(Y_2)의 경우 적합 결여 검증의 $P\text{-value}$ 가 0.748로 0.05보다 높고, 결정계수(R^2)가 0.9588로 높으며, 모델값이 0.000으로 0.05보다 낮아 적합한 것으로 확인되었다(Hou and Regenstein, 2004).

표 9

Analysis of variance (ANOVA) results of CCD for synbiotics of *L. plantarum* D-12

Independent variables	P-value				
	Model	Linear	Quadratic	Cross-product	Lack of fit
Yield(Y_1)	0.002	0.016	0.001	0.322	0.364
Survival rate(Y_2)	0.000	0.000	0.001	0.031	0.748

RSM으로 분석한 *L. plantarum* D-12 신바이오틱스 예측 최적화 INL 농도 및 분무건조 입구 온도는 32% 및 80℃로 도출되었다(도 3 및 표 11). 예측 최적 신바이오틱스 제조 조건으로 제조하였을 때 제조된 신바이오틱스의 예측 수율(Y_1) 및 유산균 생존율(Y_2)은 71.70% 및 97.43%로 예측되었다. Bustamante 등(2020)의 연구에서 프리바이오틱스인 Inulin, chia 및 flax seed와 *L. acidophilus* La-05를 결합한 신바이오틱스 수율(Y_1) 및 유산균 생존율(Y_2)을 RSM에 적용하여 반응모형모델식을 도출하였을 때, 2차 방정식 model이 가장 적합하였으며, 프리바이오틱스의 높은 예측 농도와 낮은 예측 입구 온도는 본 연구의 예측 결과와 유사하였다. 예측 최적 INL 농도 및 입구 온도를 적용하여(표 10) *L. plantarum* D-12의 신바이오틱스화시 신바이오틱스 수율(Y_1) 및 유산균 생존율(Y_2)은 Table 5와 같다. 신바이오틱스 수율 및 유산균 생존율은 75.35% 및 98.12%로, 이는 예측 신바이오틱스 수율(Y_1) 값보다 약 3% 높게 나타났으며, 유산균 생존율(Y_2)은 약 1% 높게 나타나 신바이오틱스 *L. plantarum* D-12제조를 위한 최적모델이라 판단하였다.

표 10

Optimization spray drying condition for synbiotics of *L. plantarum* D-12

Factor	Condition
Feeding rate	100 mL/hr
Atomizer pressure	120 kPa
Inulin concentration	32%
Inlet temperature	80°C

표 11

Predicted values from CCD and measured values of yield and survival rate of synbiotics of *L. plantarum* D-12

	Predicted	Measured
Yield (%)	71.70	75.35±0.58 ¹⁾
Survival rate (%)	97.43	98.12±0.46

¹⁾Mean±SD

[0081]

[0082]

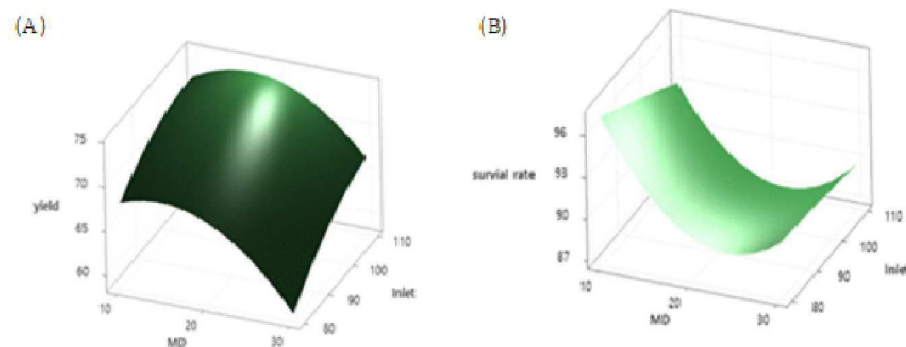
도 4는 SEM을 활용한 *L. plantarum* D-12 동결건조 분말과 예측 최적화 조건으로 제조된 *L. plantarum* D-12 신바이오틱스 구조분석 결과이다. 동결건조 분말과 신바이오틱스의 형태를 비교하였을 때, 동결건조 분말의 입자 크기가 분무건조 분말의 입자보다 약 10배 더 큰 것을 확인하였다. Park 등(2015)의 연구에서는 동결 및 분무건조 공정을 활용한 파인애플의 미세캡슐 분말에서 동결건조 분말입자의 크기는 501.57 μm , 분무건조의 경우는 42.58 ~ 53.32 μm 로 약 10배 차이를 나타내어 본 연구 결과와 비슷하였다. 형태학적으로는 신바이오틱스의 경우 구형 응집체 형성이 피복물질인 INL과 유산균의 구조적 네트워크에 기인한 것으로 전형적인 캡슐화 형태를 이루고 있으나, 동결건조 분말의 경우 구형이 없는 뭉치한 네트워크 형상을 나타내어 캡슐 형태와 차이를 나타내었다(Bustamante등, 2017). 또한, 신바이오틱스의 단일 입자 표면 구조에 있어 표면 형태의 불안정성은 분무건조시 액체 방울의 증발로 입자의 수축이 발생하여 나타나는 전형적인 형태이다(Saenz 등, 2009).

[0084]

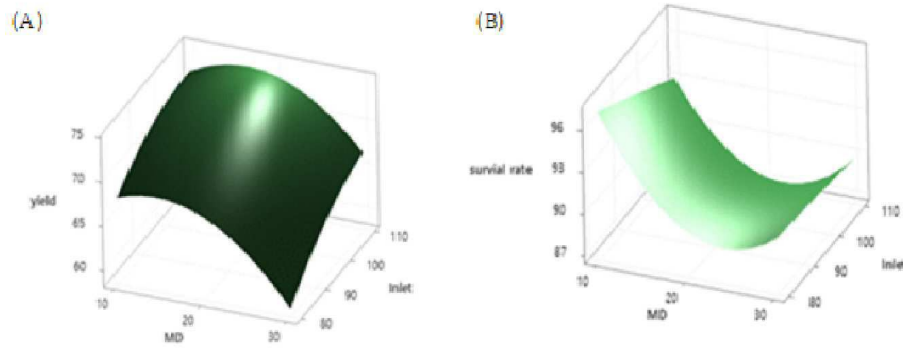
이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

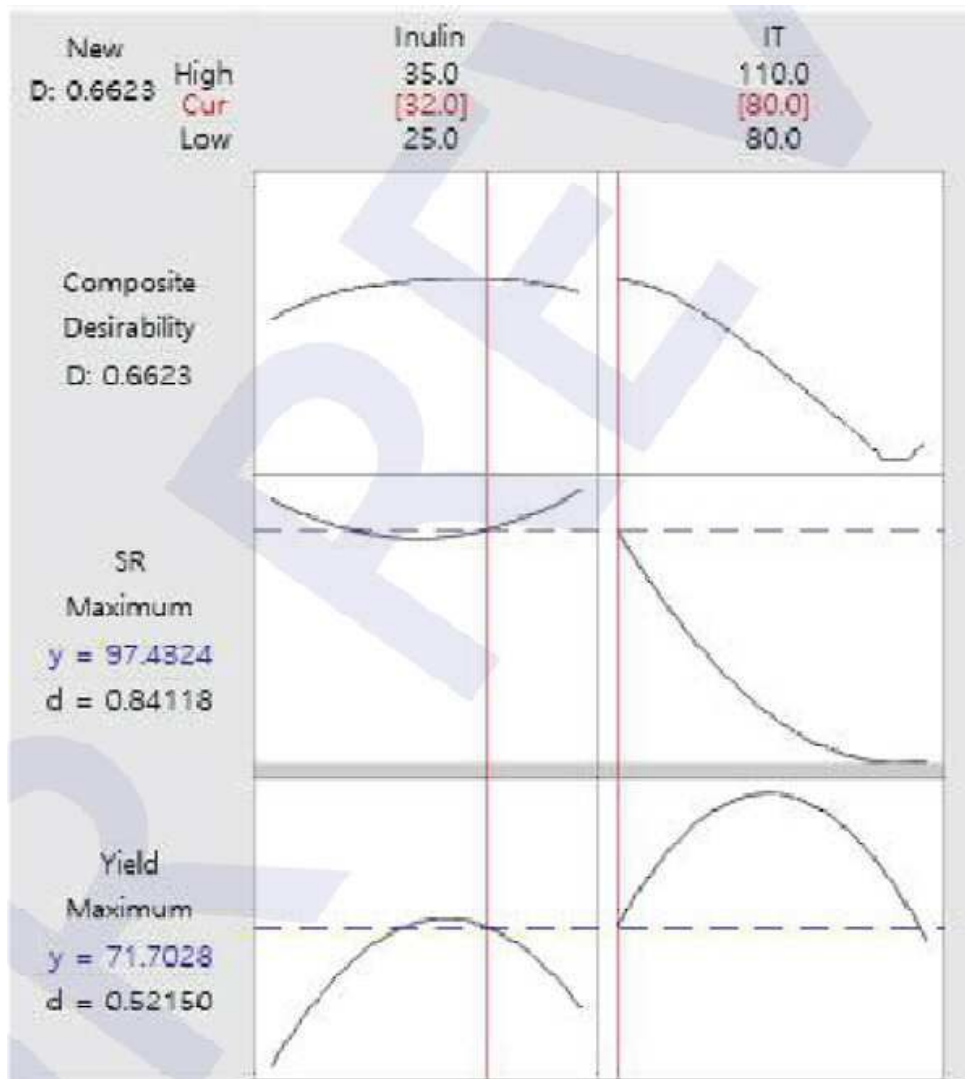
도면1



도면2



도면3



도면4

