

명세서

발명의 명칭: 유산균의 동결 보호를 위한 시스테인 또는 이의 염의 용도

기술분야

- [1] 본 출원은 유산균을 동결 보호시키기 위한 유효 성분 및 상기 유효 성분의 활용/적용에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 유산균(lactic acid bacteria)은 락트산균 또는 젖산균이라고도 하며, 포유류의 장내에 서식하면서 잡균에 의한 이상 발효를 방지하여 정장제로도 이용되는 중요한 세균이다. 그러나 세균의 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. 그러나 유산균을 분말이나 캡슐형으로 만들게 되면, 장기적인 유통 과정에서 사멸하는 유산균이 많아 유산균 본래의 생리 활성 기능을 발휘하지 못하게 되는 한계점이 있다.

- [4] 상기 생리 활성 유지를 위해 젤라틴 코팅 등의 방법 (Champagne *et al.*, Food Research International, **29**, 555-562 (1996))이 수행된 바 있으나 유산균의 생존률 및 보관 안정성을 더욱 높일 수 있는 방법의 개발이 요구되는 실정이다.

[5]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 출원은 유산균을 동결로부터 보호하는 한편, 동결 건조되어 분말화된 이후에도 유산균에 높은 안정성, 일 예로 열안정성을 부여할 수 있는 유산균 동결 보호용 조성물 또는 유산균 동결 보호용 배양 배지, 및 이를 이용한 유산균제의 제조 방법을 제공하고자 한다.
- [7] 또한, 본 출원은 유산균의 생육을 촉진하여 유산균 생산성을 우수하게 나타낼 수 있는 유산균의 생육을 촉진하는 방법, 및 유산균의 생육을 우수하게 촉진하기 위한 유산균의 배양 배지를 제공하고자 한다.

[8]

과제 해결 수단

- [9] 이를 위하여, 본 출원의 일 측면은 시스테인 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는, 유산균 동결 보호용 조성물을 제공한다.
- [10] 또한, 본 출원의 다른 측면은 유산균을 상기 유산균 동결 보호용 조성물과 혼합하고, 상기 혼합물을 분말화하는 것을 포함하는 유산균제의 제조방법을 제공한다.

- [11] 또한, 본 출원의 다른 측면은 시스템인 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는, 유산균 동결 보호용 배양 배지를 제공한다.
- [12] 또한, 본 출원의 다른 측면은 유산균을 상기 배양 배지에서 배양하고, 상기 배양된 유산균의 균체를 회수하고, 상기 회수된 유산균 균체를 분말화하는 것을 포함하는 유산균제의 제조 방법을 제공한다.
- [13] 또한, 본 출원의 다른 측면은 유산균; 및 시스템인 또는 이의 염;을 포함하는 유산균제를 제공한다.
- [14] 또한, 본 출원은 시스템인 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는, 유산균 생육 촉진용 배양 배지를 제공할 수 있다.
- [15] 또한, 본 출원은 유산균을, 본 출원의 배양 배지, 예를 들어 유산균 동결 보호용 배양 배지 및/또는 유산균 생육 촉진용 배양 배지에서 배양하는 것을 포함하는, 유산균의 생육을 촉진하는 방법을 제공할 수 있다.
- [16] 또한, 본 출원은 유산균을, 본 출원의 배양 배지, 예를 들어 유산균 동결 보호용 배양 배지 및/또는 유산균 생육 촉진용 배양 배지에서 배양하는 것을 포함하는, 유산균의 에너지 대사를 조절하는 방법을 제공할 수 있다.
- [17] 또한, 본 출원은 유산균을, 본 출원의 배양 배지, 예를 들어 유산균 동결 보호용 배양 배지 및/또는 유산균 생육 촉진용 배양 배지에서 배양하는 것을 포함하는, 유산균의 열안정성을 증가하는 방법을 제공할 수 있다.

[18]

발명의 효과

- [19] 본 출원의 활성 성분인 시스템인 또는 이의 염은 유산균을 동결로부터 보호할 뿐만 아니라, 동결 건조되어 분말화된 이후에도 유산균이 활성을 최대한 유지할 수 있도록 안정성을 향상시키는 효과가 있다. 특히, 상기 시스템인 또는 이의 염산염은 분말화됨으로 인해 살아있기는 하지만 증식이 중단된 유산균이 고온의 물리적 환경에서도 우수한 안정성을 나타낼 수 있도록 하는 효과가 있어, 살아있는 유산균의 유통이나 보관/저장이 용이해지는 장점이 있다.
- [20] 또한, 본 출원의 배양 배지, 예를 들어 유산균 동결 보호용 배양 배지 및/또는 유산균 생육 촉진용 배양 배지에서 유산균을 배양하면, 유산균의 생장 수율을 획기적으로 향상시킬 수 있으며, 또한 유산균의 열안정성을 획기적으로 향상시킬 수 있다.
- [21] 다만, 본 출원의 효과는 상기에서 언급한 효과로 제한되지 아니하며, 언급되지 않은 또 다른 효과들은 하기의 기재로부터 당업자에게 명확히 이해될 수 있을 것이다.

[22]

발명의 실시를 위한 형태

- [23] 먼저, 본 출원에서 이용된 용어를 정의한다.
- [24]

- [25] 본 출원에서 일컫는 용어 '유산균'은 당류를 발효하여 에너지를 획득하고 다량의 락트산을 생성하는 세균을 총칭하는 용어이다. 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.) 및 비셀라 속(*Weissella* sp.)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있다. 구체적으로, 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*), 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*), 락토바실러스 람노서(*Lactobacillus rhamnosus*), 락토바실러스 아시도필루스(*Lactobacillus acidophilus*), 비피도박테리움 비피덤(*Bifidobacterium bifidum*), 비피도박테리움 롱굼(*Bifidobacterium longum*), 비피도박테리움 브레브(*Bifidobacterium breve*), 스트렙토코커스 훼칼리스(*Streptococcus faecalis*), 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) 등 일 수 있고, 보다 구체적으로, 한국 등록특허공보 제1,178,217호에 개시된 락토바실러스 플란타룸 CJLP243(*Lactobacillus plantarum* CJLP243), 한국 등록특허공보 제1,486,999호에 개시된 락토바실러스 플란타룸 CJLP133(*Lactobacillus plantarum* CJLP133), 한국 등록특허공보 제1,075,558호에 개시된 락토바실러스 플란타룸 CJLP136(*Lactobacillus plantarum* CJLP136), 한국 등록특허공보 제1,255,050호에 개시된 락토바실러스 플란타룸 CJLP55(*Lactobacillus plantarum* CJLP55), 한국 등록특허공보 제1,075,557호에 개시된 락토바실러스 플란타룸 CJLP56(*Lactobacillus plantarum* CJLP56) 등 일 수 있으나, 특별히 이들로 한정되지 아니한다.
- [26] 본 출원에서 일컫는 용어 '동결 보호'는 유산균의 활성을 그대로 보존하기 위해 동결 건조하여 보관할 때 유산균 조직을 결빙으로부터 보호하는 것을 의미한다.
- [27] 본 출원에서 일컫는 용어 '동결 건조(Freeze drying)'는 용기의 온도를 급격하게 낮추어 건조시키고자 하는 재료를 얼린 다음, 용기 내부의 압력을 진공으로 만들어 재료에 포함된 고체화된 용매를 바로 수증기로 승화시켜 건조하는 방법이다. 상기 동결 건조는 열에 민감한 물질의 손상을 최소화하고 효과적으로 장기 보존할 수 있는 방법으로서, 오염 방지, 저장, 수송, 경제성 측면에서 유용하다. 하지만, 상기와 같은 동결 건조의 동결 온도는 영하의 온도, 예컨대 -40 °C 내지 -196 °C(액화질소의 비점), -50 °C 내지 -196 °C, -70 °C 내지 -196 °C일 수 있는바, 유산균을 동결 건조하는 경우 그 과정에서 유산균의 활성과 생존율이 급격하게 감소하게 되고, 동결 시 얼음 입자가 만들어지면서 유산균 세포의 막 구조를 손상시키는 문제점이 있다. 이러한 문제점을 개선하기 위해, 유산균이 손상되거나 사멸하지 않고 재수화(再水和)시 그 기능을 회복할 수 있도록 동결 건조시 함께 첨가하는 물질 또는 조성물을 '동결 보호제' 또는 '동결 보호용 조성물'이라고 지칭하며, 이는 유산균에 물리화학적 안정성을 부여하여 생존율을 높이는 역할을 한다.
- [28]

- [29] 이하, 본 출원을 구체적으로 설명한다.
- [30]
- [31] 본 출원은 유산균 동결 보호용 조성물을 제공한다.
- [32] 상기 본 출원의 유산균 동결 보호용 조성물은 시스테인 또는 이의 염을 유효 성분으로 포함한다.
- [33] 상기 시스테인은 $\text{HS-CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{-COOH}$ 의 구조를 갖는 함 황유 α -아미노산의 일종으로서, 설프하이드릴(sulfhydryl)기를 가지고 있어 다른 시스테인과의 사이에서 이황화결합을 형성하는 특징을 가지고 있다. 상기 시스테인은 L-시스테인, D-시스테인 또는 L,D-시스테인일 수 있고, 구체적으로는 L-시스테인일 수 있다.
- [34] 상기 시스테인의 염은 상기 시스테인의 임의의 염일 수 있고, 예를 들어 염산염, 황산염 등일 수 있다.
- [35] 상기 시스테인 또는 이의 염은 유산균을 동결로부터 보호하여 동결에 의한 유산균의 손상이나 사멸을 최소화할 뿐만 아니라, 나아가 동결 건조된 이후에도 유산균이 그 고유의 활성을 유지할 수 있도록 하는 유산균의 안정성을 향상시키는 역할을 한다. 따라서 상기 시스테인 또는 이의 염은 유산균 동결 보호용 조성물의 유효 성분으로서뿐만 아니라, 다른 한편으로는 건조된, 특히 동결 건조된 유산균의 안정성 향상용 조성물의 유효 성분으로도 이용될 수 있다.
- [36] 상기 시스테인 또는 이의 염은 상기 조성물 전체 100 중량% 중, 0.01 중량% 이상, 예를 들어 0.01 중량%, 0.05 중량% 및 0.1 중량%로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나의 하한 및/또는 10 중량% 이하, 예를 들어 10 중량%, 7 중량%, 5 중량% 및 3 중량%로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나의 상한의 조합으로 구성되는 함량 범위로 포함될 수 있다. 예를 들어, 상기 시스테인 또는 이의 염은 상기 조성물 전체 100 중량% 중, 0.05 중량% 내지 10 중량%의 함량, 구체적으로 0.05 중량% 내지 7 중량%, 0.05 중량% 내지 5 중량%, 0.05 중량% 내지 3 중량%, 또는 구체적으로 0.1 중량% 내지 10 중량%, 0.1 중량% 내지 7 중량%, 0.1 중량% 내지 5 중량%, 0.1 중량% 내지 3 중량%의 함량으로 포함될 수 있고, 상기와 같은 시스테인 또는 이의 염의 함량은 유산균의 종류, 크기, 양, 동결 건조 조건, 조성물에 포함되는 다른 성분의 종류나 함량 등에 따라 통상의 기술자가 적절히 조절할 수 있다.
- [37] 본 출원의 유산균 동결 보호용 조성물은 동결 보호제, 다공성 지지체 또는 질소원 등을 더 포함할 수 있다.
- [38] 상기 동결 보호제는 상기 시스테인 또는 이의 염을 제외한, 본 출원이 속하는 기술분야에서 통상적으로 이용되는 동결 보호 효능을 가지는 물질을 의미하는 것으로서, 시판되는 것을 구입하여 이용할 수 있으며, 그 종류에는 특별히 제한되지 않는다. 구체적으로, 상기 동결 보호제로서 당류, 아미노산, 펩티드, 젤라틴, 글리세롤, 당알콜, 유청, 알긴산, 아스코르빈산, 효모 추출물, 탈지유 등일 수 있다. 예컨대, 상기 동결 보호제로 당류의 일종인

트레할로오스(trehalose)가 이용될 수 있다. 상기 트레할로오스는 식물이나 미생물등 자연계에 널리 존재하고 있는 당질로서, 동결 건조로 인해 유산균이 손상 또는 사멸하는 것을 방지하며 재수화시 그 기능을 회복할 수 있게 도와주는 동결 보호제의 역할을 하는 것으로 알려진 물질이다. 상기 트레할로오스는 상기 유산균 동결 보호용 조성물 전체 100 중량% 중, 10 중량% 내지 40 중량%, 예컨대 10 중량% 내지 30 중량%, 구체적으로 15 중량% 내지 25 중량%, 보다 구체적으로 17.5 중량% 내지 22.5 중량%의 함량으로 포함될 수 있으나, 상기 유산균 동결 보호용 조성물에 포함되는 활성 성분의 함량, 유산균의 종류, 크기, 양, 동결 건조 조건, 조성물에 포함되는 다른 성분의 종류나 함량 등에 따라 통상의 기술자가 적절히 조절할 수 있다.

- [39] 상기 다공성 지지체는 외부 수분 및 공기의 유입을 차단하고, 동결 건조된 유산균에 다공성을 부여하여 재수화 작용을 용이하게 하는 역할을 한다. 상기 다공성 지지체는 본 출원이 속하는 기술분야에서 동결 건조시 통상적으로 사용되는 다공성 지지체로서, 시판되는 것을 구입하여 이용할 수 있으며, 그 종류에는 특별히 제한되지 않는다. 구체적으로, 상기 다공성 지지체는 말토덱스트린, 알기네이트, 키토산, 전분, 폴리에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜, 트리아세틴, 아세틸트리에틸 시트레이트, 트리에틸 시트레이트, 글리세린, 또는 이들의 조합일 수 있고, 보다 구체적으로 말토덱스트린(maltodextrin)일 수 있다. 상기 말토덱스트린은 다공성 입자 기체의 백색 분말로서, 흔히 요구르트, 소스, 샐러드 드레싱 등 일반 식품에 종종 사용되는 식품 첨가물이며, 유산균의 동결 건조시 다공성 지지체로도 이용될 수 있다. 상기 말토덱스트린은 유산균 동결 보호용 조성물 전체 100 중량% 중, 0.1 중량% 내지 20 중량%일 수 있고, 예컨대 0.5 중량% 내지 15 중량%, 구체적으로 1 중량% 내지 10 중량%, 더욱 구체적으로 2.5 중량% 내지 7.5 중량%일 수 있다.

- [40] 상기 질소원(N-source)은 유산균의 질소 에너지원으로 사용되는 물질을 의미하며, 이는 후발효에 의한 균체의 손상을 방지하는 역할을 한다. 유산균을 동결 보호용 조성물과 혼합할 경우 에너지원이 없는 조건에서 살아있는 유산균은 유기산을 생성하게 되고, 이는 pH 저하를 일으켜 유산균의 사멸을 유도한다. 따라서, 질소 에너지원은 유기산 생성 및 이로 인한 pH 저하를 방지하므로, 유산균의 사멸을 예방할 수 있게 된다. 상기 질소원은 본 출원이 속하는 기술분야에서 동결 건조시 통상적으로 사용되는 질소원으로서, 시판되는 것을 구입하여 이용할 수 있으며, 그 종류에는 특별히 제한되지 않는다. 구체적으로, 상기 질소원은 탈지 분유, 유청 단백질, 효모 추출물, 맥아 추출물, 비프 추출물, 카세인 가수분해물, 맥아 추출물, 트립톤, 시스테인, 펩톤 등일 수 있고, 예를 들어 상기 펩톤은 소이펩톤, 피쉬 펩톤, 프로테오스 펩톤, 카세인 펩톤, 펩톤 No.3 등 일 수 있으며, 대표적으로 소이펩톤일 수 있다. 상기 소이펩톤은 유산균 동결 보호용 조성물 전체 100 중량% 중, 0.1 중량% 내지 20 중량%일 수 있고, 예컨대 0.5 중량% 내지 15 중량%, 구체적으로 1 중량% 내지 10

중량%, 더욱 구체적으로 2.5 중량% 내지 7.5 중량%일 수 있다.

- [41] 상기 유산균 동결 보호용 조성물은 코팅제 형태로 적용될 수 있다. 즉, 상기 유산균 동결 보호용 조성물은 유산균과 혼합되어 유산균의 표면을 코팅시킬 수 있고, 이를 통해 유산균을 외부 환경으로부터 보호하고 보관 안정성을 높이는 것일 수 있으나, 특별히 이에 한정되지 아니한다.
- [42] 상기 유산균 동결 보호용 조성물로부터 제조된 유산균제는 후술하는 바와 같다.
- [43]
- [44]
- [45] 본 출원은 유산균 동결 보호용 배양 배지를 제공한다.
- [46] 일 측면에서, 본 출원의 배양 배지는 유산균의 생육 촉진용 배양 배지일 수 있다.
- [47] 일 측면에서, 본 출원의 배양 배지는 유산균의 열안정성 증가용 배양 배지일 수 있다.
- [48] 일 측면에서, 상기 유산균 동결 보호용 배양 배지는 유산균의 생육 촉진 및 열안정성 증가용 배양 배지일 수 있다.
- [49] 상기 배양 배지는 유산균을 배양하기 위해 필요로 하는 영양물질의 혼합물을 의미하며, 유산균의 생존 및 발육에 불가결한 물을 비롯하여 영양물질 및 발육인자 등을 공급하는 것이다.
- [50] 상기 본 출원의 배양 배지는 시스테인 또는 이의 염을 유효 성분으로 포함한다.
- [51] 상기 시스테인은 $\text{HS-CH}_2\text{CH(NH}_2\text{)-COOH}$ 의 구조를 갖는 함 황유 α -아미노산의 일종으로서, 설프하이드릴(sulfhydryl)기를 가지고 있어 다른 시스테인과의 사이에서 이황화결합을 형성하는 특징을 가지고 있다. 상기 시스테인은 L-시스테인, D-시스테인 또는 L,D-시스테인일 수 있고, 구체적으로는 L-시스테인일 수 있다.
- [52] 상기 시스테인의 염은 상기 시스테인의 임의의 염일 수 있고, 예를 들어 염산염, 황산염 등일 수 있다.
- [53] 상기 시스테인 또는 이의 염은 유산균을 동결로부터 보호하여 동결에 의한 유산균의 손상이나 사멸을 최소화할 뿐만 아니라, 나아가 동결 건조된 이후에도 유산균이 그 고유의 활성을 유지할 수 있도록 하는 유산균의 안정성을 향상시키는 역할을 한다. 뿐만 아니라, 상기 시스테인 또는 이의 염은 유산균의 배양 시 유산균의 생산량을 획기적으로 증대시킬 수 있을 뿐만 아니라, 이로써 배양된 유산균이 고유의 활성을 유지할 수 있도록 하는 유산균의 안정성을 향상시키는 역할을 한다. 따라서 상기 시스테인 또는 이의 염은 유산균 동결 보호용 배양 배지의 유효 성분으로서뿐만 아니라, 다른 한편으로는 건조된, 특히 동결 건조된 유산균의 안정성 향상용 배양 배지, 유산균의 생육 촉진용 배양 배지 및 이러한 배양 배지에서 배양된 유산균의 안정성 향상용 조성물, 뿐만 아니라 유산균의 열안정성 증가용 배양 배지의 유효 성분으로도 이용될 수 있다.

- [54] 상기 시스템인 또는 이의 염은 상기 배양 배지 전체 100 중량% 중, 0.05 중량% 내지 10 중량%의 함량, 구체적으로 0.05 중량% 내지 7 중량%, 0.05 중량% 내지 5 중량%, 0.05 중량% 내지 3 중량%, 또는 구체적으로 0.1 중량% 내지 10 중량%, 0.1 중량% 내지 7 중량%, 0.1 중량% 내지 5 중량%, 0.1 중량% 내지 3 중량%의 함량으로 포함될 수 있고, 상기와 같은 시스템인 또는 이의 염의 함량은 유산균의 종류, 크기, 양, 동결 건조 조건, 배양 배지에 포함되는 다른 성분의 종류나 함량 등에 따라 통상의 기술자가 적절히 조절할 수 있다.
- [55] 본 출원의 배양 배지는 상기 유효 성분 외에, 통상적으로 배양 배지에 포함되는 영양성분, 예컨대 탄소원, 질소원, 인원, 무기화합물, 아미노산 및/또는 비타민 등을 더 포함할 수 있다.
- [56] 상기 탄소원으로는 글루코오스, 프룩토오스, 수크로오스, 말토오스, 만니톨, 소르비톨 등과 같은 탄수화물; 피루브산, 락트산, 시트르산 등과 같은 유기산; 글루탐산, 메티오닌, 리신 등과 같은 아미노산 등이 포함될 수 있다. 또한, 전분 가수분해물, 당밀, 블랙스트랩 당밀, 쌀겨울, 카사버, 사탕수수 찌꺼기 및 옥수수 침지액 같은 천연의 유기 영양원을 사용할 수 있으며, 구체적으로는 글루코오스 및 살균된 전처리 당밀(즉, 환원당으로 전환된 당밀) 등과 같은 탄수화물이 사용될 수 있으며, 그 외의 적정량의 탄소원을 제한 없이 다양하게 이용할 수 있다. 이들 탄소원은 단독으로 사용되거나 2종 이상이 조합되어 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [57] 상기 질소원으로는 암모니아, 황산암모늄, 염화암모늄, 초산암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄, 질산암모늄 등과 같은 무기질소원; 글루탐산, 메티오닌, 글루타민 등과 같은 아미노산, 펩톤, NZ-아민, 육류 추출물, 효모 추출물, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 카제인 가수분해물, 어류 또는 그의 분해생성물, 탈지 대두 케이크 또는 그의 분해 생성물 등과 같은 유기 질소원이 사용될 수 있다. 이들 질소원은 단독으로 사용되거나 2종 이상이 조합되어 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [58] 상기 인원으로는 인산 제1칼륨, 인산 제2칼륨, 또는 이에 대응되는 나트륨-함유 염 등이 포함될 수 있다. 무기화합물로는 염화나트륨, 염화칼슘, 염화철, 황산마그네슘, 황산철, 황산망간, 탄산칼슘 등이 사용될 수 있으며, 그 외에 아미노산, 비타민 및/또는 적절한 전구체 등이 포함될 수 있다. 이들 구성성분 또는 전구체는 배지에 회분식 또는 연속식으로 첨가될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [59] 또한, 상기 배양 배지에는 수산화암모늄, 수산화칼륨, 암모니아, 인산, 황산 등과 같은 화합물이 첨가되어 배양 배지의 pH를 조정할 수 있고, 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포제를 사용하여 배양 중의 기포 생성을 억제할 수 있다. 또한, 배양 중의 호기 상태를 유지하기 위하여, 배양 배지 내로 산소 또는 산소 함유 기체를 주입하거나 혐기 및 미호기 상태를 유지하기 위해 기체의 주입 없이 혹은 질소, 수소 또는 이산화탄소 가스를 주입할 수 있으며, 이에

제한되지 않는다.

- [60] 상기 배양 배지는 고상 또는 액상일 수 있다.
- [61] 상기 배양 배지로부터 제조된 유산균제는 후술하는 바와 같다.
- [62]
- [63] 본 출원은 유산균제, 구체적으로 열안정성을 갖는 유산균제의 제조 방법을 제공한다.
- [64] 본 출원의 유산균제의 제조 방법은, 유산균을 시스테인 또는 이의 염을 포함하는 조성물과 혼합하여 혼합물을 준비하고, 상기 혼합물을 동결 건조하여 분말화하는 것을 포함한다.
- [65] 일 측면에서, 상기 시스테인 또는 이의 염을 포함하는 조성물은 본 출원에 따른 유산균 동결 보호용 조성물을 이용할 수 있다.
- [66] 다른 측면에서, 상기 시스테인 또는 이의 염을 포함하는 조성물은 본 출원에 따른 배양 배지, 예컨대 유산균 동결 보호용 배양 배지를 이용할 수 있다.
- [67] 이하 본 출원의 유산균제의 제조 방법에 대하여 설명한다.
- [68] 먼저, 유산균을 시스테인 또는 이의 염을 포함하는 조성물, 예컨대 상기 유산균 동결 보호용 조성물과 혼합한다.
- [69] 상기 유산균과 상기 유산균 동결 보호용 조성물은 중량 기준으로 1:0.1 내지 1:5, 구체적으로 1:0.5 내지 1:4, 더욱 구체적으로 1:1 내지 1:3의 비율로 혼합될 수 있다. 상기 혼합 비율에서 유산균을 동결로부터 효과적으로 보호하고, 분말화를 효율적으로 할 수 있다.
- [70] 상기 유산균과 상기 유산균 동결 보호용 조성물의 혼합 시기는, 구체적으로 유산균의 배양 단계에 있어 시스테인 또는 이의 염을 투여하는 시기는, 유산균제의 제조 방법의 전체 공정 중 유산균의 배양 단계 어디서나 제한 없이 투여할 수 있으며 예를 들어 유산균의 배양 전, 유산균의 생장유도기(lag phase), 대수증식기(exponential phase), 및 정지기(stationary phase) 중 적어도 어느 하나의 단계에 투여할 수 있다.
- [71] 예를 들어, 상기와 같이 유산균 동결 보호용 조성물과 혼합되기 전에, 상기 유산균은 통상의 수단과 방법으로 충분히 배양되어, 통상의 방법으로 회수될 것일 수 있다.
- [72] 상기 배양은 상기 유산균을 적당히 조절된 환경 조건에서 생육시키는 것을 의미한다. 상기 배양 과정은 본 출원이 속하는 기술분야에 알려진 적당한 배지와 배양 조건에 따라 이루어질 수 있다. 이러한 배양 과정은 선택되는 균주에 따라 통상의 기술자가 적절히 조절할 수 있다. 예컨대 상기 유산균은, 회분식, 연속식, 유가식 등의 형태로 배양될 수 있다. 상기 유산균의 배양 온도는 20°C 내지 50°C, 구체적으로는 30°C 내지 40°C의 온도일 수 있다. 상기 유산균의 배양 시간은 1시간 내지 100시간, 구체적으로는 5시간 내지 50시간 동안 배양될 수 있다.
- [73] 상기 유산균의 균체를 회수하는 단계는 상기와 같은 유산균의 배양 형태에 따라 본 출원이 속하는 기술분야에 공지된 적절한 방법을 이용하여 배지로부터

목적하는 균체를 회수할 수 있다. 예컨대 원심분리, 여과, 결정화 단백질 침전제에 의한 처리(염석법), 추출, 초음파 파쇄, 한외여과, 투석법, 분자체 크로마토그래피(겔여과), 흡착크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피 등의 각종 크로마토그래피, HPLC 및 이들의 방법을 조합하여 사용될 수 있다. 상기 회수 단계는 추가적인 정제 공정을 포함할 수 있고, 본 출원이 속하는 기술분야에 알려진 적절한 방법을 이용하여, 회수된 유산균의 균체를 더욱 정제할 수 있다.

- [74] 다음으로, 유산균과 유산균 동결 보호용 조성물의 혼합물을 동결 건조하여 분말화한다.
- [75] 상기 유산균과 유산균 동결 보호용 조성물의 혼합물을 분말화하는 과정은 종래 식품 분야에서 일반적으로 이용되는 동결 건조를 통해 수행될 수 있다. 상기 동결 건조는 -70°C 내지 30°C, 구체적으로 -70°C 내지 -40°C의 온도에서 수행될 수 있다. 상기 동결 건조는 3시간 내지 48시간, 구체적으로 6시간 내지 36시간, 더욱 구체적으로 12시간 내지 24시간 동안 냉각되는 조건에서 동결시킨 후, 동결 건조기에서 해동하여 수분을 제거하는 과정으로 수행될 수 있다.
- [76] 상기와 같이 유산균을 본 출원의 유산균 동결 보호용 조성물과 혼합한 후 동결 건조하여 분말화 함으로써, 안정성이 향상되어 유산균의 활성이 최대한 유지되는 유산균제를 제조할 수 있다.
- [77] 일 측면에서, 상기 유산균제의 제조 방법은 유산균을, 상기 유산균 동결 보호용 조성물과 혼합하여 혼합물을 준비하고, 상기 혼합물을 동결 건조 하기 전에 혼합물을 이용하여 유산균 균체를 배양하는 것을 추가로 포함할 수 있다.
- [78] 상기 본 출원의 유산균제의 제조 방법은, 유산균을 상기 유산균 동결 보호용 조성물과 혼합하고, 그 혼합물을 이용하여 유산균의 균체를 배양하고, 상기 배양된 유산균의 균체를 회수하고, 상기 회수된 유산균 균체를 분말화하는 것을 포함할 수 있다.
- [79] 상기 배양은 상기 유산균을 적당히 조절된 환경 조건에서 생육시키는 것을 의미한다. 상기 배양 과정은 본 출원이 속하는 기술분야에 알려진 적당한 배양 조건 하에서 수행될 수 있다. 이러한 배양 과정은 선택되는 균주에 따라 통상의 기술자가 적절히 조절할 수 있다. 예컨대 상기 유산균은, 회분식, 연속식, 유가식 등의 형태로, 20°C 내지 50°C, 구체적으로는 30°C 내지 40°C의 온도에서 수행될 수 있다. 배양은 1시간 내지 100시간, 구체적으로는 5시간 내지 50시간 동안 배양될 수 있다.
- [80] 다음으로, 상기와 같이 배양된 유산균의 균체를 회수한다.
- [81] 상기 유산균의 균체를 회수하는 단계는 상기와 같은 유산균의 배양 형태에 따라 본 출원이 속하는 기술분야에 공지된 적절한 방법을 이용하여 배지로부터 목적하는 균체를 회수할 수 있다. 예컨대 원심분리, 여과, 결정화 단백질 침전제에 의한 처리(염석법), 추출, 초음파 파쇄, 한외여과, 투석법, 분자체 크로마토그래피(겔여과), 흡착크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피,

친화도 크로마토그래피 등의 각종 크로마토그래피, HPLC 및 이들의 방법을 조합하여 사용될 수 있다. 상기 회수 단계는 추가적인 정제 공정을 포함할 수 있고, 본 출원이 속하는 기술분야에 알려진 적절한 방법을 이용하여, 회수된 유산균의 균체를 더욱 정제할 수 있다.

- [82] 상기와 같이 회수된 유산균 균체는, 시스테인 또는 이의 염 없이, 동결 보호제, 다공성 지지체 또는 질소원 등을 포함하는 조성물과 혼합될 수 있다. 상기 동결 보호제, 다공성 지지체 및 질소원에 대한 설명은 상기 유산균 동결 보호용 조성물에 관하여 설명한 바와 동일하다.
- [83] 마지막으로, 상기와 같이 회수된 유산균 균체를 분말화한다.
- [84] 상기 회수된 유산균 균체를 분말화하는 과정은 종래 식품 분야에서 일반적으로 이용되는 분말화 방법을 통해 수행될 수 있고, 예컨대 상기 회수된 유산균 균체를 동결 건조하여 수행될 수 있다. 상기 동결 건조는 -70°C 내지 30°C , 구체적으로 -70°C 내지 -40°C 의 온도에서 3시간 내지 48시간, 구체적으로 6시간 내지 36시간, 더욱 구체적으로 12시간 내지 24시간 동안 냉각되는 조건에서 동결시킨 후, 동결 건조기에서 해동하여 수분을 제거하는 과정으로 수행될 수 있다.
- [85] 상기와 같이 유산균을 유산균 동결 보호용 조성물과의 혼합물에서 배양하고 이로부터 회수한 유산균 균체를 분말화 함으로써, 안정성이 향상되어 유산균의 활성이 최대한 유지되는 유산균제를 제조할 수 있다.
- [86] 상기 유산균제의 제조 방법에 있어서, 시스테인 또는 이의 염을 포함하는 조성물로서 시스테인 또는 이의 염을 포함하는 배양 배지, 예컨대 상기 유산균 동결 보호용 배양 배지를 이용하는 경우 상술한 제조 방법에 있어 '유산균 동결 보호용 조성물'을 이용한 제조 방법으로 상술한 바와 같다.
- [87] 본 출원의 유산균제의 제조 방법에 따라 제조되는 유산균제의 안정성에 관하여는 후술하기로 한다.
- [88]
- [89] 본 출원의 다른 측면은 유산균의 생육을 촉진하는 방법, 유산균의 에너지 대사를 조절하는 방법 및 유산균의 열안정성을 증가하는 방법을 제공한다.
- [90] 상기 본 출원의 유산균의 생육을 촉진하는 방법, 유산균의 에너지 대사를 조절하는 방법 및 유산균의 열안정성을 증가하는 방법은, 유산균을, 상술한 배양 배지, 예를 들어 본 출원의 유산균 생육 촉진용 배양 배지에서 배양하는 것 및/또는 상술한 유산균 동결 보호용 조성물과 혼합하고, 그 혼합물에서 배양하는 것을 포함할 수 있다. 구체적인 방법은 상술한 유산균제의 제조 방법과 동일하게 수행할 수 있다.
- [91] 이때, 시스테인 또는 이의 염을 포함하는 배양 배지, 예를 들어 유산균의 생육 촉진용 배양 배지에서 및/또는 유산균 동결 보호용 조성물을 이용하여 배양되는 상기 유산균은, 그 에너지 생산 기작이 이에 한정되는 것은 아니나, '호흡'에 의해 에너지를 생산하여 생육할 수 있다.

- [92] 일반적으로 통성 혐기성 유산균 배양을 위해 배양 조건을 산소 노출을 최소화하기 위한 조건, 예컨대 통성 혐기성 조건으로 변경하는 것, 예를 들어 발효조의 산소/질소 치환 등을 수행하였으나, 상기 본 출원의 시스테인 또는 이의 염을 포함하는 배지를 이용하면 별도의 배양 조건의 변경 없이 상기 배양 배지를 통해 유산균이 활성 산소를 제거할 수 있는 환경을 부여함으로써 유산균의 생육을 우수하게 촉진할 수 있다.
- [93] 뿐만 아니라, 배양조에 적절히 공기, 예를 들어 멸균 공기를 유입하여 유산균의 생육 촉진을 조절할 수 있다.
- [94] 본 출원에 따라 생육이 촉진된 유산균은 안정성이 향상되어 장기간 동안 유산균의 수가 높은 수준으로 유지되는 효과가 있다.
- [95] 본 출원의 유산균제의 제조 방법에 따라 제조되는 유산균제의 안정성에 관하여는 후술하기로 한다.
- [96]
- [97]
- [98] 본 출원은 유산균제, 구체적으로 열안정성을 갖는 유산균제를 제공한다.
- [99] 본 출원의 상기 유산균제는 유산균; 및 시스테인 또는 이의 염을 포함한다.
- [100] 상기 시스테인은 $\text{HS-CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{-COOH}$ 의 구조를 갖는 함 황유 α -아미노산의 일종으로서, 설프하이드릴(sulfhydryl)기를 가지고 있어 다른 시스테인과의 사이에서 이황화결합을 형성하는 특징을 가지고 있다. 상기 시스테인은 L-시스테인, D-시스테인 또는 L,D-시스테인일 수 있고, 구체적으로는 L-시스테인일 수 있다.
- [101] 상기 시스테인의 염은 상기 시스테인의 임의의 염일 수 있고, 구체적으로 염산염, 황산염 등일 수 있다.
- [102] 상기 유산균제는 그레놀, 분말, 산제, 과립제, 침제, 유제, 유동제, 정제, 환제, 캡셀제, 과립제, 연고, 좌제, 주사액, 흡입제, 에어로졸, 현탁제, 시럽제, 에멀전, 연질 캡슐, 경질 캡슐, 엘릭시르제(elixirs), 트로치제(troches), 로젠제(lozenge) 등의 형태일 수 있고, 구체적으로 동결 건조된 분말의 형태일 수 있다.
- [103] 상기 시스테인 또는 이의 염에 의해, 유산균이 동결로부터 보호되어 유산균의 손상이나 사멸이 최소화될 뿐만 아니라, 나아가 분말 형태로 제조된 이후에도 유산균이 그 고유의 활성을 그대로 유지할 수 있다.
- [104] 예컨대, 본 출원의 상기 유산균제가 40°C에서 4주간 보관한 후, 보관 초기 대비 45% 이상, 구체적으로는 50% 이상, 50.5% 이상, 51% 이상, 55% 이상, 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상 또는 77% 이상의 유산균 생존률을 나타낼 수 있다. 일 측면에서, 40°C에서 3주간 보관한 후, 보관 초기 대비 45% 이상, 구체적으로는 50% 이상, 51% 이상, 52% 이상, 55% 이상, 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 또는 81% 이상의 유산균 생존률을 나타낼 수 있다. 일 측면에서, 40°C에서 2주간 보관한 후, 초기 대비 55% 이상, 구체적으로는 60% 이상, 62% 이상, 64% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상,

80% 이상, 85% 이상, 90% 이상 또는 91% 이상의 유산균 생존률을 나타낼 수 있다.

[105] 상기 보관 초기는 보관 0일차 또는 보관 직전일 수 있다.

[106] 또한, 상기 시스템인 또는 이의 염에 의해, 유산균의 배양 시 유산균의 생육이 촉진될 수 있다.

[107] 예컨대, 상기 유산균을 시스템인 또는 이의 염의 존재 하에서 37°C에서 배양하고, 배양액을 20배 희석하였을 때 분광 광도계를 이용하여 측정한 O.D(Optical density) 값은 7시간 후 0.5 이상, 구체적으로 0.7 이상, 0.9 이상, 1.0 이상 또는 1.2 이상을 나타낼 수 있다. 일 측면에서, 8시간 후 0.6 이상, 0.8 이상, 1.0 이상, 1.2 이상 또는 1.3 이상을 나타낼 수 있다. 일 측면에서, 9시간 후 0.7 이상, 0.8 이상, 0.9 이상, 1.0 이상, 1.2 이상, 1.3 이상 또는 1.4 이상을 나타낼 수 있다. 일 측면에서, 10시간 후 0.8 이상, 1.0 이상, 1.2 이상, 1.4 이상 또는 1.5 이상을 나타낼 수 있다. 일 측면에서, 11시간 후 1.0 이상, 1.1 이상, 1.2 이상, 1.3 이상, 1.4 이상 또는 1.5 이상을 나타낼 수 있다.

[108] 예컨대, 상기 유산균을 시스템인 또는 이의 염의 존재 하에서 37°C에서 배양하였을 때 생균수(CFU/ml)는 이에 제한되는 것은 아니나, 7시간 후 1.5×10^9 이상, 2.0×10^9 이상, 2.5×10^9 이상, 3.0×10^9 이상, 3.5×10^9 이상, 4.0×10^9 이상, 5.0×10^9 이상, 또는 5.5×10^9 이상일 수 있다. 일 측면에서, 8시간 후 2.5×10^9 이상, 3.0×10^9 이상, 3.5×10^9 이상, 4.0×10^9 이상, 5.0×10^9 이상, 5.5×10^9 이상, 6.0×10^9 이상, 6.5×10^9 이상, 7.0×10^9 이상, 7.5×10^9 이상, 8.0×10^9 이상, 8.5×10^9 이상 또는 9.0×10^9 이상일 수 있다. 일 측면에서, 9시간 후 3.0×10^9 이상, 5.0×10^9 이상, 7.0×10^9 이상, 9.0×10^9 이상 또는 9.5×10^9 이상일 수 있다. 일 측면에서, 10시간 후 4.0×10^9 이상, 5.0×10^9 이상, 7.0×10^9 이상, 9.0×10^9 이상, 9.5×10^9 이상, 1.0×10^{10} 이상 또는 1.2×10^{10} 이상일 수 있다. 일 측면에서, 11시간 후 5.0×10^9 이상, 7.0×10^9 이상, 9.0×10^9 이상, 9.5×10^9 이상, 1.0×10^{10} 이상 또는 1.2×10^{10} 이상일 수 있다.

[109]

[110] 이하, 본 출원을 실시예에 의하여 상세히 설명한다.

[111] 단, 하기 실시예는 본 출원을 구체적으로 예시하는 것이며, 본 출원의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되지 아니한다.

[112]

[113] **[실시예 1]**

[114] 락토바실러스 플란타룸 CJLP133 균주를 MRS 액체 배지(Difco, USA)를 이용하여, 37°C에서 18 내지 24시간 동안 배양한 다음, 원심 분리기를 이용하여 상등액은 버리고 유산균만을 회수하였다.

[115] 상기와 같이 회수된 유산균 균체를, 하기 표 1과 같은 함량으로 시스템인염산염, 트레할로오스, 말토덱스트린, 소이펩톤 및 물이 혼합 및 멸균하여 제조된 유산균 동결 보호용 조성물과 1:2의 중량 비율로 혼합하였다.

[116] [표1]

성분	함량(중량%)			
	실시예 1-1	실시예 1-2	실시예 1-3	실시예 1-4
시스테인염산염	0.1	0.5	1	5
트레할로오스	20	20	20	20
말토덱스트린	5	5	5	5
소이펍톤	5	5	5	5
물	잔부	잔부	잔부	잔부
총합	100	100	100	100

[117] 상기 혼합물을 현탁한 후, 동결 건조 트레이에 옮겨 담아, 급속 동결 조건(-40°C 이하)에서 12 내지 24시간 전후로 유지한 후, 동결 건조기에서 해동하면서 수분을 제거하여 상기 표 1의 조성물로 코팅된 유산균 분말을 수득하였다.

[118] [실시예 2]

[119] 한국 등록특허공보 제1,486,999호에 개시된 락토바실러스 플란타룸 CJLP133 균주를, 0.1 중량%의 시스테인염산염이 포함된 MRS 액체 배지(Difco, USA)를 이용하여, 37°C에서 18 내지 24시간 동안 배양한 다음, 원심 분리기를 이용하여 상등액은 버리고 유산균만을 회수하였다.

[120] 상기와 같이 회수된 유산균 균체를, 하기 표 2와 같은 함량으로 트레할로오스, 말토덱스트린, 소이펍톤 및 물이 혼합 및 멸균하여 제조된 유산균 동결 보호용 조성물과 1:2의 중량 비율로 혼합하였다.

[121] [표2]

성분	함량(중량%)
트레할로오스	20
말토덱스트린	5
소이펍톤	5
물	잔부
총합	100

[122] 상기 혼합물을 현탁한 후, 동결 건조 트레이에 옮겨 담아, 급속 동결 조건(-40°C 이하)에서 12 내지 24시간 전후로 유지한 후, 동결 건조기에서 해동하면서 수분을 제거하여 상기 표 2의 조성물로 코팅된 유산균 분말을 수득하였다.

[123] [실시예 3]

[124] 락토바실러스 플란타룸 CJLP133 균주를 0.1%의 시스테인염산염이 포함된 MRS 액체 배지(Difco, USA)에, 37 °C에서 11시간 동안 배양하였다.

시스테인염산염이 포함된 MRS 배지 성분은 표 3과 같으며, 배양 도중 저하되는 pH는 암모니아수 자동 급여 시스템을 통해 pH 5.95로 중화되도록 설정하였다.

[125] [표3]

성분	함량
L-Cysteine Monohydrochloride	1 g
Proteose Peptone	10 g
Beef Extract	10 g
Yeast Extract	5 g
Dextrose	20 g
Polysorbate80	1 g
Ammonium Citrate	2 g
Sodium Acetate	5 g
Magnesium Sulfate	0.1 g
Manganese Sulfate	0.05 g
Dipotassium Phosphate	2 g
물	1,000 mL

[126] [비교예 1]

[127] 락토바실러스 플란타룸 CJLP133 균주를 MRS 액체 배지(Difco, USA)를 이용하여, 37°C에서 18 내지 24시간 동안 배양한 다음, 원심 분리기를 이용하여 상등액은 버리고 유산균만을 회수하였다.

[128] 상기와 같이 회수된 유산균 균체를, 상기 표 2와 같은 함량으로 트레할로오스, 말토덱스트린, 소이펩톤 및 물이 혼합 및 멸균하여 제조된 유산균 동결 보호용 조성물과 1:2의 중량 비율로 혼합하였다.

[129] 상기 혼합물을 현탁한 후, 동결 건조 트레이에 옮겨 담아, 급속 동결 조건(-40°C 이하)에서 12 내지 24시간 전후로 유지한 후, 동결 건조기에서 해동하면서 수분을 제거하여 상기 표 2의 조성물로 코팅된 유산균 분말을 수득하였다.

[130] [비교예 2]

[131] 락토바실러스 플란타룸 CJLP133 균주를 0.1%의 시스테인염산염이 포함되지 않은 MRS 액체 배지(Difco, USA)에, 37 °C에서 11시간 동안 배양하였다. MRS 배지 성분은 표 4와 같으며, 배양 도중 저하되는 pH는 암모니아수 자동 급여 시스템을 통해 pH 5.95로 중화되도록 설정하였다.

[132] [표4]

성분	함량
Proteose Peptone	10 g
Beef Extract	10 g
Yeast Extract	5 g
Dextrose	20 g
Polysorbate80	1 g
Ammonium Citrate	2 g
Sodium Acetate	5 g
Magnesium Sulfate	0.1 g
Manganese Sulfate	0.05 g
Dipotassium Phosphate	2 g
물	1,000 mL

[133] [실험예 1]

[134] 시스테인염산염의 유무에 따른 유산균 분말의 고온 안정성 평가

[135] 시스테인염산염을 적용한 유산균 분말의 고온안정성을 평가하기 위해 상기 실시예 1-1, 실시예 2, 및 비교예 1의 가혹 조건에서의 생존율을 분석하였다. 동결 건조화된 유산균 분말은 저장 온도 및 저장 기간에 따라 점차 활성이 감소한다. 일반적으로 활성에 영향을 주는 요인으로서는 온도, 산소, 수분 등이 꼽힌다. 동결 건조화된 유산균 분말은 흡습성이 매우 강하여 저장 초기에 많은 함량 감소가 일어나게 된다. 유통 저장성을 향상하기 위하여 포장재에 탈산소제를 적용하거나, 제습을 위한 여러 가지 방법들이 있지만, 궁극적으로는 유산균 분말 자체의 안정성 정도에 따라 저장 기간에 많은 차이를 보이게 된다. 따라서 원료 특성에 기인한 흡습성을 완화하기 위해 각 시료를 알루미늄 파우치에 개별 포장하여 보관하였으며, 40 °C에서 4주간 보관하여 가혹 조건에서의 생존율을 분석하였다.

[136] 구체적으로, 상기 실시예 1-1, 실시예 2, 및 비교예 1에서 제조한 유산균 분말의 시료를 알루미늄 파우치 포장에 일정량을 담아 개별 포장하여 밀봉하고, 각각의 시료를 40°C의 인큐베이터에서 4주간 보관하였다. 소정의 시간이 지난 후 실험군 시료를 식염완충용액(saline buffer)에 1:100의 비율로 희석하여 멸균백에 담은 후 균질화하였다. 식염완충용액으로 연속적인 희석을 진행한 샘플을 MRS 아가 플레이트(Agar Plate)에 도말하였다. 플레이트를 수거하고 37°C의 호기 조건 하에서 24시간 정치 배양한 후 계수하여, 그 결과를 아래 표 5에 나타내었다. 하기 표 5에 기재한 숫자는 초기 유산균 대비 생존율(%)을 나타낸다.

[137] [표5]

시점	생존률(%)		
	비교예 1	실시예 1-1	실시예 2
초기	100.0	100.0	100.0
1주	54.7	72.7	89.0
2주	35.9	64.9	91.5
3주	40.9	52.2	81.8
4주	38.0	51.0	77.4

[138] 가혹 조건을 적용하여 시간의 경과에 따른 유산균의 활성을 측정한 결과, 시스템인염산염이 포함된 동결 보호용 조성물을 이용한 실시예 1-1이나 시스템인염산염이 포함된 배양 배지를 이용한 실시예 2의 경우에, 시스템인염산염이 포함되지 않은 비교예 1에 비해, 훨씬 높은 유산균 생존율을 나타내는 것으로 확인되었다.

[139] [실험예 2]

[140] 시스템인염산염의 함량에 따른 유산균 분말의 고온 안정성 평가

[141] 시스템인염산염을 적용한 유산균 분말의 시스템인염산염 함량에 따른 고온안정성을 평가하기 위하여 상기 실시예 1-1 내지 실시예 1-4에서 제조한 유산균 분말의 가혹 조건에서의 생존율을 분석하였다. 상기 실험예 1과 동일한 방법으로 가혹 조건을 적용하여 시간의 경과에 따른 유산균의 활성을 측정하여 그 결과를 아래 표 6에 나타내었다. 하기 표 6에 기재한 숫자 역시 초기 유산균 대비 생존율(%)을 나타낸다.

[142] [표6]

시점	생존률(%)			
	실시예 1-1	실시예 1-2	실시예 1-3	실시예 1-4
초기	100.0	100.0	100.0	100.0
1주	72.7	93.0	89.2	91.7
2주	64.9	75.2	82.3	88.5
3주	52.2	74.3	78.7	81.1
4주	51.0	73.4	77.5	75.5

[143] [실험예 3]

[144] 유산균의 배양 배지 내 시스템인염산염의 유무에 따른 고농도 배양 평가 (O.D. value)

[145] 유산균 배양 평가는 식품첨가물공전의 O.D. value (Optical density) 측정법에

따라 분광 광도계(Spectrophotometer, NanoPhotometer, IMPLEN)를 이용하여 600 nm에서 유산균 배양액을 20배로 희석하여 측정하였다.

[146] [표7]

O.D.	비교예 2	실시예 3
0 hr	0	0
7 hr	0.446	1.282
8 hr	0.536	1.396
9 hr	0.664	1.457
10 hr	0.792	1.528
11 hr	0.937	1.510

[147] 위의 표 7에서 확인할 수 있는 바와 같이, 시스테인염산염이 포함된 배양 배지에서 배양되는 실시예 3에서 시스테인염산염이 포함되지 않은 배양 배지에서 배양되는 비교예 2과 비교하여 유산균의 배양 속도가 현저히 높은 것을 확인하였다. 이와 같은 결과로부터 시스테인염산염에 의한 유산균 생육 촉진능이 우수함을 확인하였다.

[148] [실험예 4]

[149] 유산균의 배양 배지 내 시스테인염산염의 유무에 따른 고농도 배양 평가 (생균수 측정)

[150] MRS 한천평판배지에 30 내지 300개의 집락이 형성되도록 유산균 배양액을 멸균 생리수로 희석하고 도말한 후 37°C 에서 24시간 배양하였다. 배양 후 나타난 집락수를 세어 mL 당 생균수로 계산하였다.

[151] [표8]

CFU/ml	비교예 2	실시예 3
0hr	0	0
7hr	1.2×10^9	5.9×10^9
8hr	2.0×10^9	9.2×10^9
9hr	2.8×10^9	1.0×10^{10}
10hr	3.3×10^9	1.2×10^{10}
11hr	4.2×10^9	1.2×10^{10}

[152] 시스테인염산염을 포함하는 배양 배지에서 배양되는 실시예 1에서 시스테인염산염을 포함하지 않는 배양 배지에서 배양되는 비교예 1과 비교하여 유산균의 생균수가 현저히 높은 것을 확인하였다. 이와 같은 결과로부터 시스테인염산염에 의한 유산균 생육 촉진능이 우수함을 확인하였다.상기에서는

본 출원의 바람직한 실시예를 예시적으로 설명하였으나, 본 출원의 범위는
상기와 같은 특정 실시예에만 한정되지 아니하며, 해당 분야에서 통상의 지식을
가진 자라면 본 출원의 청구범위에 기재된 범주 내에서 적절하게 변경이 가능할
것이다.

[153]

[154]

청구범위

- [청구항 1] 시스테인 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는, 유산균 동결 보호용 조성물.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서,
상기 시스테인염의 염은 염산염인, 유산균 동결 보호용 조성물.
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서,
상기 시스테인 또는 이의 염은 0.01 중량% 내지 10 중량%의 함량으로 포함되는, 유산균 동결 보호용 조성물.
- [청구항 4] 청구항 1에 있어서,
트레할로오스, 말토덱스트린 및 소이펙톤으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나를 더 포함하는, 유산균 동결 보호용 조성물.
- [청구항 5] 청구항 1 내지 4 중 어느 한 항에 있어서,
유산균의 열안정성을 갖는 것인, 유산균 동결 보호용 조성물.
- [청구항 6] 시스테인 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는, 유산균 동결 보호용 배양 배지.
- [청구항 7] 청구항 6에 있어서,
상기 시스테인 또는 이의 염은 0.01 중량% 내지 10 중량%의 함량으로 포함되는, 유산균 동결 보호용 배양 배지.
- [청구항 8] 청구항 6에 있어서,
코엔자임 Q10, 비타민 C, 비타민 E 및 비타민 B2로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나를 더 포함하는, 유산균 동결 보호용 배양 배지.
- [청구항 9] 청구항 6에 있어서,
유산균의 생육 촉진 및 열안정성 증가 중 적어도 하나의 효능을 더 갖는 것인, 유산균 동결 보호용 배양 배지.
- [청구항 10] 유산균을,
시스테인 또는 이의 염을 포함하는 조성물과 혼합하여 혼합물을 준비하고, 상기 혼합물을 동결 건조하여 분말화하는 것을 포함하는, 유산균제의 제조 방법.
- [청구항 11] 청구항 10에 있어서,
상기 혼합물을 동결건조 하기 전 혼합물을 이용하여 유산균 균체를 배양하는 것을 추가로 포함하는 것인 유산균제의 제조 방법.
- [청구항 12] 유산균; 및 시스테인 또는 이의 염;을 포함하는 열안정성을 갖는 유산균제.
- [청구항 13] 청구항 12에 있어서,
상기 유산균제는 그래놀, 분말, 산제, 과립제, 침제, 유제, 유동제, 정제, 환제, 캡슐제, 과립제, 연고, 좌제, 주사액, 흡입제, 에어로졸, 현탁제,

- 시럽제, 에멀전, 연질 캡슐, 경질 캡슐, 엘릭시르제(elixirs), 트로치제(troches) 또는 로젠제(lozenge) 형태인 유산균제.
- [청구항 14] 청구항 12에 있어서,
상기 유산균제는 동결 건조된 분말의 형태인 유산균제.
- [청구항 15] 청구항 12 내지 청구항 14 중 어느 한 항에 있어서,
상기 유산균제는 40°C에서 4주간 보관한 후의 유산균 생존률이 45% 이상인 유산균제.
- [청구항 16] 유산균을, 청구항 6 내지 청구항 9 중 어느 한 항의 배양 배지에서 배양하는 것을 포함하는, 유산균의 생육을 촉진하는 방법.
- [청구항 17] 유산균을, 청구항 6 내지 청구항 9 중 어느 한 항의 배양 배지에서 배양하는 것을 포함하는, 유산균의 열안정성을 증가하는 방법.