



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년09월30일
(11) 등록번호 10-2027029
(24) 등록일자 2019년09월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/127 (2006.01) A23L 3/3472 (2006.01)
A23L 33/135 (2016.01) A23P 10/30 (2016.01)
A61K 35/744 (2014.01) A61K 47/24 (2017.01)
A61K 47/36 (2017.01) A61K 9/19 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/1271 (2013.01)
A23L 3/3472 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0064792
(22) 출원일자 2017년05월25일
심사청구일자 2017년05월25일
(65) 공개번호 10-2018-0129168
(43) 공개일자 2018년12월05일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020000037040 A*
KR1020070104140 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
(주)엠앤씨생명과학
경기도 성남시 중원구 사기막골로105번길 27 ,
313, 314호(상대원동, 중앙인더스피아 제3공장)
(72) 발명자
조선도
서울특별시 강동구 고덕로 131 ,105동301호(암
사동,강동롯데캐슬퍼스트아파트)
전종경
서울특별시 서초구 서초중앙로29길 28, 306동
1010호(반포동, 반포미도아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
윤여광, 조우제, 염주석

전체 청구항 수 : 총 9 항

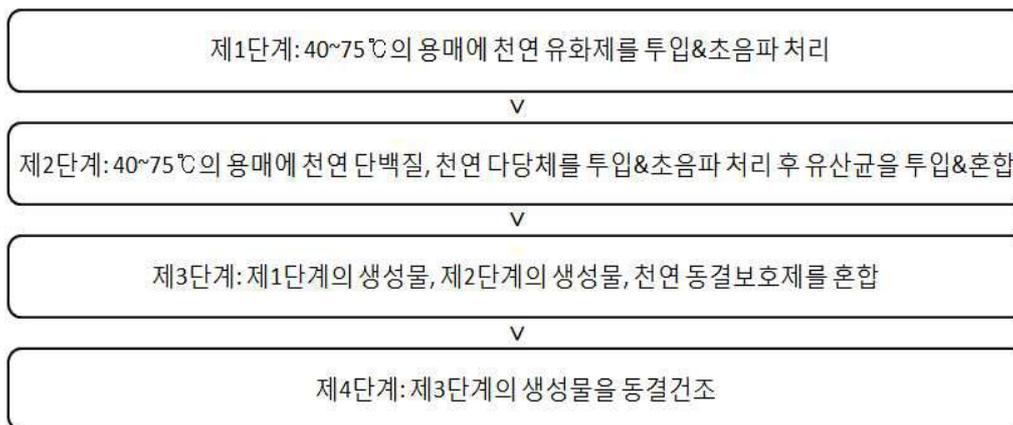
심사관 : 한정희

(54) 발명의 명칭 유산균 함유 천연 리포솜, 그 제조방법 및 이를 포함하는 식품 또는 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 (a) 코어로서 유산균; (b) 상기 코어를 둘러싸며, 천연 다당체를 포함하는 제1셸층; (c) 상기 제1셸층을 둘러싸며, 천연 유화제 및 천연 단백질을 포함하는 제2셸층; 및 (d) 상기 제2셸층을 둘러싸며, 천연 동결보호제를 포함하는 제3셸층을 포함하는 유산균 함유 천연 리포솜, 그 제조방법 및 이를 포함하는 식품 또는 약학 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23L 33/135 (2016.08)
A23P 10/30 (2016.08)
A61K 35/744 (2013.01)
A61K 47/24 (2013.01)
A61K 47/36 (2013.01)
A61K 9/1277 (2013.01)
A61K 9/19 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2300/48 (2013.01)

(72) 발명자

홍우중

경기도 광주시 태봉로 62, 503동 1102호(태전동,
태전5차성원상떼빌)

박성수

서울특별시 광진구 자양로26길 61-4, B02(구의동)

이희원

경기도 성남시 중원구 희망로320번길 4-1, 305호(
상대원동)

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 코어로서 유산균;
 - (b) 상기 코어를 둘러싸며, 천연 다당체를 포함하는 제1셸층;
 - (c) 상기 제1셸층을 둘러싸며, 천연 유화제 및 천연 단백질을 포함하는 제2셸층; 및
 - (d) 상기 제2셸층을 둘러싸며, 천연 동결보호제 및 천연 보존제를 포함하는 제3셸층
- 을 포함하는 유산균 함유 천연 리포솜으로서,

상기 천연 다당체는 아라비아검(Arabic gum), 구아검(Guar gum), 로커스트빈검(Locust bean gum), 타마린드검(Tamarind gum), 타라검(Tara gum), 잔탄검(Xanthan gum) 및 카라기난(Carrageenan)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상이고,

상기 천연 유화제는 포스파티딜콜린, 리소포스파티딜콜린, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜산, 포스파티딜세린, 포스파티딜글리세롤, 포스파티딜이노시톨 및 이들의 수소첨가 생성물로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상이며,

상기 천연 동결보호제는 탈지분유, 말토덱스트린 및 글리세린으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상이며,

상기 천연 보존제는 감귤 추출물, 고삼 추출물, 유자 추출물, 유칼립투스 추출물, 자몽 추출물, 정향 추출물 및 크랜베리 추출물로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상이며,

상기 유산균 함유 천연 리포솜은 전체 중량을 기준으로, 상기 유산균 1 내지 20 중량%, 상기 천연 다당체 0.5 내지 5 중량%, 상기 천연 유화제 5 내지 30 중량%, 상기 천연 단백질 0.5 내지 10 중량%, 상기 천연 동결보호제 40 내지 70 중량% 및 천연 보호제 5 내지 15 중량%를 포함하는 것인 유산균 함유 천연 리포솜.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 유산균은 락토바실러스 아시도필루스(Lactobacillus acidophilus), 락토바실러스 불가리쿠스(Lactobacillus bulgaricus), 락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei), 락토바실러스 퍼멘텀(Lactobacillus fermentum), 락토바실러스 가세리(Lactobacillus gasseri), 락토바실러스 헬베티쿠스(Lactobacillus helveticus), 락토바실러스 파라카제이(Lactobacillus paracasei), 락토바실러스 플란타룸(Lactobacillus plantarum), 락토바실러스 람노서스(Lactobacillus rhamnosus), 락토바실러스 루테리(Lactobacillus reuteri), 락토바실러스 살리바리우스(Lactobacillus salivarius), 락토코커스 락티스(Lactococcus lactis), 스트렙토코커스 써모필루스(Streptococcus thermophilus), 비피도박테리움 애니멀리스 락티스(Bifidobacterium animalis ssp. lactis), 비피도박테리움 비피덤(Bifidobacterium bifidum), 비피도박테리움 브레브(Bifidobacterium breve), 비피도박테리움 롱검(Bifidobacterium longum) 및 엔테로코커스 페칼리스(Enterococcus faecalis)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 유산균 함유 천연 리포솜.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 천연 단백질은 우유 유래 단백질이거나, 또는 콩 유래 단백질이거나, 또는 우유 유래 단백질과 콩 유래 단백질의 혼합물인 유산균 함유 천연 리포좀.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

- (i) 40 내지 75℃의 용매에 천연 유화제를 투입하여 초음파 처리하는 제1단계;
- (ii) 40 내지 75℃의 용매에 천연 단백질, 천연 다당체를 투입하여 초음파 처리한 후 유산균을 투입하고 혼합하는 제2단계;
- (iii) 상기 제1단계에 얻어진 생성물, 상기 제2단계에서 얻어진 생성물, 천연 동결보호제를 혼합하는 제3단계; 및
- (iv) 상기 제3단계에서 얻어진 생성물에 천연 보존제를 더 투입하여 혼합하고 이를 동결건조하는 제4단계를 포함하는 제1항, 제3항, 제6항 중 어느 한 항의 유산균 함유 천연 리포좀의 제조방법.

청구항 12

삭제

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 용매는 증류수, 천연 유래의 부틸렌글리콜, 프로판디올, 글리세린 및 발효주정으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 유산균 함유 천연 리포좀의 제조방법.

청구항 14

제11항에 있어서,

상기 제2단계는 50℃ 미만의 용매에 유산균을 투입하는 것인 유산균 함유 천연 리포좀의 제조방법.

청구항 15

- (i) 40 내지 75℃의 용매에 천연 다당체를 투입하여 초음파 처리한 후 유산균을 투입하여 혼합하는 제1단계;
- (ii) 40 내지 75℃의 용매에 천연 유화제를 투입하여 초음파 처리하는 제2단계;
- (iii) 40 내지 75℃의 용매에 천연 단백질을 투입하여 초음파 처리하는 제3단계;
- (iv) 상기 제1단계에서 얻어진 생성물, 상기 제2단계에서 얻어진 생성물, 제3단계에서 얻어진 생성물, 천연 동결보호제를 혼합하는 제4단계; 및

(v) 상기 제4단계에서 얻어진 생성물에 천연 보존제를 더 투입하여 혼합하고 이를 동결건조하는 제5단계
를 포함하는 제1항, 제3항, 제6항 중 어느 한 항의 유산균 함유 천연 리포솜의 제조방법.

청구항 16

삭제

청구항 17

제1항의 유산균 함유 천연 리포솜을 유효성분으로 포함하는 식품 조성물.

청구항 18

제1항의 유산균 함유 천연 리포솜을 유효성분으로 포함하는, 장염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 유산균 함유 천연 리포솜, 그 제조방법 및 이를 포함하는 식품 또는 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 유산균(Lactic acid bacteria)은 락트산균 또는 젖산균이라고도 하며, 산소가 적은 환경에서 자라면서 주로 당류를 영양공급원으로 사용하고 젖산을 생성하는 세균을 모두 일컫는다. 이러한 유산균은 락토바실러스(Lactobacillus), 락토코커스(Lactococcus), 류코노스톡(Leuconostoc), 페디오코커스(Pediococcus), 비피도박테리움(Bifidobacterium) 등의 균속에 해당된다. 유산균은 오래 전부터 유제품(요구르트, 치즈 등), 김치, 양조식품(청주, 된장, 간장 등) 등의 발효식품 제조에 이용되어 왔으며, 포유류의 장내에서 유익균(프로바이오틱스, Probiotics)으로서 클로스트리디움(Clostridium), 대장균(Escherichia Coli), 박테로이데스(Bacteroides), 유박테리움(Eubacterium), 펩토스트렙토커스(Peptostreptococcus) 등과 같은 유해균의 이상발효를 억제하는 정장제(Digestive)로도 알려져 있다. 특히, 유산균이 장에 정착할 경우에는 유산균에 의한 장관운동 활성화, 소화불량 개선, 배변활동 원활, 면역력 증강 등 다양한 생리효과를 기대할 수 있다. 이러한 장 기능 개선을 위해 유산균 제품을 섭취할 수 있으나, 일반적으로 섭취된 유산균은 소화기관인 위와 십이지장을 거치면서 위산, 담즙과 같은 소화효소에 의해 대부분 사멸되어 유산균에 의한 생리활성 효과를 얻지 못하게 된다.

[0003] 이러한 문제점을 해결하기 위해, 다양한 코팅 방법이 개발되었다. 한국등록특허 제0395722호에는 장에서만 녹을 수 있는 장용피막코팅 조성물이 기재되어 있다. 그러나, 장용피막코팅 조성물에는 점착방지제, 알칼리화제, 가소제 등이 함유되어 있어, 이러한 화학 물질에 대한 유해성 논란이 발생할 수 있다. 또한, 한국등록특허 제 0373104호에는 유산균을 다공성 미립담체에 흡착시켜 다당체로 코팅하는 방법이 기재되어 있다. 그러나, 미립담체로 구조도, 활성탄 및/또는 제올라이트를 사용하여 유해성 논란이 일어날 수 있으며, 이러한 유산균이 흡착된 미립담체를 다당체로 코팅할 경우에는 미립담체의 표면을 완전히 코팅할 수 없어 소화효소로부터 유산균을 보호하기 어렵다.

[0004] 이와 같이, 종래 유산균 제품은 코팅 성분으로 사용된 (화학) 물질에 의해 유해성 문제가 제기되며, 형성된 코팅층은 충분한 내산성 및 내담즙성이 보장되지 않아 유산균에 의한 생리효과를 기대하기 어렵다. 따라서, 유해한 성분을 함유하지 않으면서 유산균을 장까지 안전하게 전달할 수 있는 유산균의 코팅 기술에 대해, 여전히 많은 연구개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0005] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제0395722호
- (특허문헌 0002) 한국등록특허 제0373104호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 상기한 문제점을 해결하기 위해, 본 발명은 인체에 무해한 천연 물질을 사용하여 유산균을 장까지 안전하게 전달할 수 있는 유산균 함유 천연 리포솜, 그 제조방법 및 이를 포함하는 식품 또는 약학 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 (a) 코어로서 유산균; (b) 상기 코어를 둘러싸며, 천연 다당체를 포함하는 제1셀층; (c) 상기 제1셀층을 둘러싸며, 천연 유화제 및 천연 단백질을 포함하는 제2셀층; 및 (d) 상기 제2셀층을 둘러싸며, 천연 동결보호제를 포함하는 제3셀층을 포함하는 유산균 함유 천연 리포솜을 제공한다. 이때, 상기 제3셀층은 천연 보존제를 더 포함할 수 있다.

[0008] 또한, 본 발명은 (i) 40 내지 75℃의 용매에 천연 유화제를 투입하여 초음파 처리하는 제1단계; (ii) 40 내지 75℃의 용매에 천연 단백질을, 천연 다당체를 투입하여 초음파 처리한 후 유산균을 투입하여 혼합하는 제2단계; (iii) 상기 제1단계에 얻어진 생성물, 상기 제2단계에서 얻어진 생성물, 천연 동결보호제를 혼합하는 제3단계; 및 (iv) 상기 제3단계에서 얻어진 생성물을 동결건조하는 제4단계를 포함하는 유산균 함유 천연 리포솜의 제조방법을 제공한다. 이때, 상기 제4단계에 천연 보존제를 더 투입하여 혼합할 수 있다.

[0009] 또한, 본 발명은 (i) 40 내지 75℃의 용매에 천연 다당체를 투입하여 초음파 처리한 후 유산균을 투입하여 혼합하는 제1단계; (ii) 40 내지 75℃의 용매에 천연 유화제를 투입하여 초음파 처리하는 제2단계; (iii) 40 내지 75℃의 용매에 천연 단백질을 투입하여 초음파 처리하는 제3단계; (iv) 상기 제1단계에서 얻어진 생성물, 상기 제2단계에서 얻어진 생성물, 제3단계에서 얻어진 생성물, 천연 동결보호제를 혼합하는 제4단계; 및 (v) 상기 제4단계에서 얻어진 생성물을 동결건조하는 제5단계를 포함하는 유산균 함유 천연 리포솜의 제조방법을 제공한다. 이때, 상기 제5단계에 천연 보존제를 더 투입하여 혼합할 수 있다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 유산균 함유 천연 리포솜을 유효성분으로 포함하는 식품 조성물, 장염 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명에 따른 유산균 함유 천연 리포솜은 저장 및 유통 과정에서 유산균이 파괴되거나 유산균의 활성이 저하되는 것을 방지하고, 유산균을 위산과 담즙으로부터 보호하여 장까지 안전하게 전달할 수 있다. 이러한 유산균 함유 천연 리포솜을 포함하는 식품 또는 약학 조성물은 종래 유산균 제품에 비해 내산성 및 내담즙성이 우수하여 유산균의 장내 정착능을 향상시킨다. 상기 식품 또는 약학 조성물을 섭취할 경우에는 유산균이 장내 정착함으로써 유해균의 생장 및 증식을 저해하여 장관운동 및 배변활동을 원활하게 하고, 장내 면역세포를 증가시켜 손상된 장 세포를 빠르게 회복시킴으로써 장염, 대장암과 같은 장내 질환을 예방하고 치료하는데 도움이 될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0012] 도 1은 본 발명의 일 예에 따른 유산균 함유 천연 리포솜의 제조방법의 모식도이다.
- 도 2는 본 발명의 일 예에 따른 유산균 함유 천연 리포솜의 제조방법의 모식도이다.
- 도 3은 본 발명의 실험예 5에 따른 베타-글루쿠로니다아제의 활성을 확인한 그래프이다.
- 도 4는 본 발명의 실험예 5에 따른 베타-글루코시다아제의 활성을 확인한 그래프이다.
- 도 5는 본 발명의 실험예 6에 따른 장 상피세포의 생존율을 확인한 그래프이다.
- 도 6은 본 발명의 실험예 6에 따른 장벽형성 단백질의 발현능을 확인한 그래프이다.
- 도 7은 본 발명의 실험예 6에 따른 물리적 손상 회복능을 확인한 이미지이다.
- 도 8은 본 발명의 실험예 7에 따른 대장암 세포에 형성된 콜로니를 확인한 그래프이다.
- 도 9는 본 발명의 실험예 8에 따른 장내 유익균과 유해균의 수를 확인한 그래프이다.

- 도 10은 본 발명의 실험에 8에 따른 IL-6의 분비량을 확인한 그래프이다.
- 도 11은 본 발명의 실험에 8에 따른 TNF-a의 분비량을 확인한 그래프이다.
- 도 12는 본 발명의 실험에 8에 따른 IgA의 분비량을 확인한 그래프이다.
- 도 13은 본 발명의 실험에 8에 따른 M 세포의 분포를 확인한 이미지이다.
- 도 14는 본 발명의 실험에 8에 따른 T 세포의 분포를 확인한 이미지이다.
- 도 15는 본 발명의 실험에 8에 따른 T 세포의 분포를 확인한 이미지이다.
- 도 16은 본 발명의 실험에 8에 따른 B 세포의 분포를 확인한 이미지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명에 따른 유산균 함유 천연 리포솜, 그 제조방법 및 이를 포함하는 식품 또는 약학 조성물을 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이러한 설명은 본 발명의 이해를 돕기 위하여 예시적으로 제시된 것일 뿐 본 발명의 범위가 이러한 예시적인 설명에 의하여 제한되는 것은 아니다.
- [0015] <유산균 함유 천연 리포솜>
- [0016] 본 발명은 (a) 코어로서 유산균; (b) 상기 코어를 둘러싸며, 천연 다당체를 포함하는 제1셸층; (c) 상기 제1셸층을 둘러싸며, 천연 유화제 및 천연 단백질을 포함하는 제2셸층; 및 (d) 상기 제2셸층을 둘러싸며, 천연 동결 보호제를 포함하는 제3셸층을 포함하는 유산균 함유 천연 리포솜을 제공한다. 이때, 상기 제3셸층은 천연 보존제를 더 포함할 수 있다. 이러한 유산균 함유 천연 리포솜은 유산균을 다층으로 둘러싼 형태이기 때문에 장내 소화효소에 의해 유산균이 파괴되거나 유산균의 활성이 저하되는 것이 방지될 수 있어, 유산균을 장내로 안전하게 전달할 수 있다.
- [0017] 이하, 상기 유산균 함유 천연 리포솜을 각 층별로 나누어 설명하면 다음과 같다.
- [0019] (a) 코어: 유산균
- [0020] 3층 구조의 유산균 함유 천연 리포솜은 코어(Core)에 유산균이 위치한다.
- [0021] 상기 유산균은 일반적으로 알려진 락토바실러스(Lactobacillus), 락토코커스(Lactococcus), 류코노스톡(Leuconostoc), 페디오코커스(Pediococcus), 비피도박테리움(Bifidobacterium) 등의 균속에 해당되는 균주일 수 있다. 보다 구체적으로는, 락토바실러스 아시도필루스(Lactobacillus acidophilus), 락토바실러스 불가리쿠스(Lactobacillus bulgaricus), 락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei), 락토바실러스 퍼멘텀(Lactobacillus fermentum), 락토바실러스 가세리(Lactobacillus gasseri), 락토바실러스 헬베티쿠스(Lactobacillus helveticus), 락토바실러스 파카카제이(Lactobacillus paracasei), 락토바실러스 플란타룸(Lactobacillus plantarum), 락토바실러스 람노서스(Lactobacillus rhamnosus), 락토바실러스 루테리(Lactobacillus reuteri), 락토바실러스 살리바리우스(Lactobacillus salivarius), 락토코커스 락티스(Lactococcus lactis), 스트렙토코커스 썬모필루스(Streptococcus thermophilus), 비피도박테리움 애니멀리스 락티스(Bifidobacterium animalis ssp. lactis), 비피도박테리움 비피덤(Bifidobacterium bifidum), 비피도박테리움 브레브(Bifidobacterium breve), 비피도박테리움 롱검(Bifidobacterium longum) 및 엔테로코커스 페칼리스(Enterococcus faecalis)로 이루어진 균에서 선택되는 1종 이상일 수 있다.
- [0022] 본 발명의 일 예에 따르면, 상기 유산균은 락토바실러스 아시도필루스, 비피도박테리움 비피덤 및 비피도박테리움 롱검일 수 있다.
- [0023] 본 발명의 다른 일 예에 따르면, 상기 유산균은 락토바실러스 아시도필루스, 락토바실러스 퍼멘텀, 락토바실러스 플란타룸, 락토바실러스 람노서스, 스트렙토코커스 썬모필루스, 비피도박테리움 애니멀리스 락티스 및 비피도박테리움 롱검일 수 있다.
- [0024] 이러한 유산균을 이용하여 코어 형성시, 균질기(Homogenizer) 및/또는 교반기를 사용하는 것이 바람직하다. 제1셸층 및 제2셸층 형성시 사용되는 초음파 파쇄기(Ultrasonicator)는 열과 진동을 발생시키므로, 이로 인해 유산균이 파괴되거나 손상될 수 있기 때문이다.
- [0026] (b) 제1셸층: 천연 다당체

- [0027] 제1셀층은 상기 유산균을 둘러싼 층으로, 유산균을 위산 및 담즙으로부터 보호하기 위해 천연 다당체를 포함한다.
- [0028] 상기 천연 다당체로는 천연 물질로부터 추출 및 정제된 것으로, 아라비아검(Arabic gum), 구아검(Guar gum), 로커스트빈검(Locust bean gum), 타마린드검(Tamarind gum), 타라검(Tara gum), 잔탄검(Xanthan gum) 및 카라기난(Carrageenan)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 사용할 수 있다. 바람직하게는, 로커스트빈검, 타마린드검 및 타라검으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 사용할 수 있다.
- [0029] 상기 천연 다당체는 장에서 분해되어, 장내 정착하는 유산균의 생장 및 증식을 위한 영양공급원(프리바이오틱스, Prebiotics)으로 이용될 수 있다.
- [0030] 이러한 천연 다당체를 이용하여 제1셀층 형성시, 천연 다당체가 용매에 균일하게 분산될 수 있도록 초음파 파쇄기를 사용할 수 있다.
- [0032] (c) 제2셀층: 천연 유화제 및 천연 단백질
- [0033] 제2셀층은 상기 천연 다당체를 둘러싼 층으로, 유산균을 장에 안전하고 용이하게 전달하기 위해 천연 유화제 및 천연 단백질을 포함한다.
- [0034] 상기 천연 유화제는 수용성인 인산과 지용성인 지방산으로 구성된 인지질로, 지질 이중층을 형성한다.
- [0035] 상기 천연 유화제로는 포스파티딜콜린, 리소포스파티딜콜린, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜산, 포스파티딜세린, 포스파티딜글리세롤, 포스파티딜이노시톨 및 이들의 수소첨가 생성물로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 사용할 수 있다. 이때, 산화안정성이 우수한 포스파티딜콜린의 수소첨가 생성물(하이드로제네이티드 포스파티딜콜린, Hydrogenated phosphatidylcholine)을 사용하는 것이 바람직하다.
- [0036] 상기 천연 단백질로는 천연 물질로부터 추출 및 정제된 것을 모두 사용할 수 있다.
- [0037] 상기 천연 단백질은 장에서 분해되어, 장내 정착하는 유산균의 생장 및 증식을 위한 영양공급원으로 이용될 수 있다. 이때, 유산균의 영양공급원으로 적합한 우유 유래 단백질 및/또는 콩 유래 단백질을 사용하는 것이 바람직하며, 특히 유청단백질을 사용하는 것이 더욱 바람직하다.
- [0038] 이러한 천연 유화제 및 천연 단백질을 이용하여 제2셀층 형성시, 천연 유화제 및 천연 단백질이 용매에 균일하게 분산될 수 있도록 초음파 분쇄기를 사용할 수 있다.
- [0040] (d) 제3셀층: 천연 동결보호제
- [0041] 제3셀층은 상기 천연 유화제 및 천연 단백질을 포함하는 제2셀층을 둘러싼 최외각층으로, 동결건조시 유산균 또는 유산균을 둘러싼 다층 구조가 파괴되는 것을 방지하기 위해 천연 동결보호제를 포함한다.
- [0042] 상기 천연 동결보호제로는 탈지분유, 말토덱스트린 및 글리세린으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 사용할 수 있다. 이때, 동결보호 효과를 증대시키기 위해 2종 이상을 혼합하여 사용하는 것이 바람직하며, 탈지분유 및 글리세린 또는 말토덱스트린 및 글리세린을 사용할 수 있다.
- [0043] 이러한 제3셀층은 상기 천연 동결보호제와 함께 천연 보존제를 더 포함할 수 있다.
- [0044] 상기 천연 보존제는 제조된 유산균 함유 리포솜이 저장 및 유통 과정에서 부패되는 것을 방지할 뿐만 아니라, 장에서 분해되어 장내 정착하는 유산균의 생장 및 증식을 위한 영양공급원으로 이용될 수 있다.
- [0045] 상기 천연 보존제로는 식품에 첨가할 수 있는 천연 보존제로서, 감귤 추출물, 고삼 추출물, 유자 추출물, 유칼립투스 추출물, 자몽 추출물, 정향 추출물 및 크랜베리 추출물로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 사용할 수 있다. 이때, 보존력을 증대시키기 위해 자몽 추출물을 사용하는 것이 바람직하며, 더욱 향상된 보존력을 나타내기 위해 자몽 추출물 및 크랜베리 추출물을 사용하는 것이 더욱 바람직하다. 상기 크랜베리 추출물은 장내 유해균의 생장을 제어하면서 유산균의 생존율을 향상시킬 수 있어, 유산균에 의한 생리활성 효과를 더욱 향상시킬 수 있다.
- [0047] 이와 같은 유산균 함유 천연 리포솜은 유산균을 3층으로 둘러싼 캡슐(Capsule) 형태이다.
- [0048] 상기 유산균 함유 천연 리포솜은 전체 중량을 기준으로, 유산균 1 내지 20 중량%, 천연 다당체 0.5 내지 5 중량%, 천연 유화제 5 내지 30 중량%, 천연 단백질 0.5 내지 10 중량% 및 천연 동결보호제 45 내지 75 중량%를 포함하거나, 또는 전체 중량을 기준으로, 유산균 1 내지 20 중량%, 천연 다당체 0.5 내지 5 중량%, 천연 유화제 5

내지 30 중량%, 천연 단백질 0.5 내지 10 중량%, 천연 동결보호제 40 내지 70 중량% 및 천연 보존제 5 내지 15 중량%를 포함할 수 있다.

[0049] 이러한 유산균 함유 천연 리포솜을 식품 또는 의약품으로 섭취할 경우에는 침에 포함된 소화효소에 의해 제3셀층 일부가 분해되며, 그 상태로 위장 및 십이지장을 통과하게 된다. 이때, 유산균은 제1셀층, 제2셀층 및 일부 제3셀층으로 둘러싸여, 위산과 담즙으로부터 보호된다. 이후, 소장과 대장에서 유산균의 제1셀층, 제2셀층 및 제3셀층이 분해됨으로써 유산균은 외부로 노출되며, 안전하게 장에 전달될 수 있다. 이때, 유산균은 제1셀층, 제2셀층 및 제3셀층의 성분(예컨대, 천연 다당체, 천연 단백질, 천연 보존제)을 영양공급원으로 사용하여 생장 및 증식을 통해 장내 정착하면서 산성 환경을 만들어 유해균의 생장 및 증식을 저해하고, 장내 면역세포를 증가시키기 때문에 장관운동 및 배변활동을 원활하게 하고 장내 염증 발생을 억제시키는 등 다양한 생리활성 효과를 나타낼 수 있다.

[0051] <유산균 함유 천연 리포솜의 제조방법>

[0052] 본 발명은 초음파 파쇄기(Ultrasonicator), 균질기(Homogenizer) 등을 이용한 유산균 함유 천연 리포솜의 제조 방법을 제공한다. 그러나, 이러한 제조방법에 의해서만 한정되는 것은 아니며, 필요에 따라 각 공정의 단계가 변형되거나 또는 선택적으로 혼용되어 수행될 수 있다.

[0053] 본 발명의 일 예에 따른 유산균 함유 천연 리포솜의 제조방법은 도 1에 도시된 바와 같이, (i) 40 내지 75°C의 용매에 천연 유화제를 투입하여 초음파 처리하는 제1단계; (ii) 40 내지 75°C의 용매에 천연 단백질, 천연 다당체를 투입하여 초음파 처리한 후 유산균을 투입하여 혼합하는 제2단계; (iii) 상기 제1단계에 얻어진 생성물, 상기 제2단계에서 얻어진 생성물, 천연 동결보호제를 혼합하는 제3단계; 및 (iv) 상기 제3단계에서 얻어진 생성물을 동결건조하는 제4단계를 포함할 수 있다. 이때, 도 2에 도시된 바와 같이, 상기 제4단계에 천연 보존제를 더 투입하여 혼합할 수 있다.

[0054] 이하, 상기 제조방법을 각 공정 단계별로 나누어 설명하면 다음과 같다.

[0056] 제1단계: 40 내지 75°C의 용매에 천연 유화제를 투입하여 초음파 처리한다.

[0057] 상기 용매로는 증류수, 천연 유래의 부틸렌글리콜, 프로판디올, 글리세린 및 발효주정으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 사용할 수 있다.

[0058] 상기 천연 유화제로는 천연 물질에서 유래된 인지질과 지방산을 포함하는 1종 이상을 사용할 수 있다. 구체적으로는, 포스파티딜콜린, 리소포스파티딜콜린, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜산, 포스파티딜세린, 포스파티딜글리세롤, 포스파티딜이노시톨 및 이들의 수소첨가 생성물로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 사용할 수 있다.

[0059] 상기 초음파 처리는 용매에 천연 유화제를 충분히 분산시키기 위한 것으로, 일반적인 초음파 파쇄기를 사용할 수 있다. 보다 효율적으로 분산시키기 위해서는, 연속순환식 초음파분산기(Ultrasonic Liquid processor)를 사용하는 것이 바람직하다.

[0060] 이러한 용매를 40 내지 75°C로 가온한 후 천연 유화제를 투입하여 초음파 처리함으로써, 용매 내 천연 유화제가 균일하게 분산될 수 있다. 이때, 교반기도 사용할 수 있으며, 1,500 내지 4,500 rpm에서 3 내지 30분 동안 교반할 수 있다.

[0062] 제2단계: 40 내지 75°C의 용매에 천연 단백질, 천연 다당체를 투입하여 초음파 처리한 후 유산균을 투입하여 혼합한다.

[0063] 상기 용매로는 상기 제1단계에서 사용된 용매와 동일한 것을 사용할 수 있다.

[0064] 상기 천연 단백질은 천연 물질로부터 추출 및 정제된 것으로, 우유 유래 단백질 및/또는 콩 유래 단백질일 수 있다.

[0065] 상기 천연 다당체는 천연 물질로부터 추출 및 정제된 것으로, 아라비아검(Arabic gum), 구아검(Guar gum), 로커스트빈검(Locust bean gum), 타마린드검(Tamarind gum), 타라검(Tara gum), 잔탄검(Xanthan gum) 및 카라기난(Carrageenan)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 사용할 수 있다.

[0066] 상기 초음파 처리는 용매에 천연 단백질과 천연 다당체를 충분히 분산시키기 위한 것으로, 일반적인 초음파 파쇄기를 사용할 수 있다. 보다 효율적으로 분산시키기 위해서는, 연속순환식 초음파분산기(Ultrasonic Liquid

processor)를 사용하는 것이 바람직하다.

- [0067] 상기 유산균으로는 락토바실러스 아시도필루스(Lactobacillus acidophilus), 락토바실러스 불가리쿠스(Lactobacillus bulgaricus), 락토바실러스 카제이(Lactobacillus casei), 락토바실러스 퍼멘텀(Lactobacillus fermentum), 락토바실러스 가세리(Lactobacillus gasserii), 락토바실러스 헬베티쿠스(Lactobacillus helveticus), 락토바실러스 파라카제이(Lactobacillus paracasei), 락토바실러스 플란타룸(Lactobacillus plantarum), 락토바실러스 람노서스(Lactobacillus rhamnosus), 락토바실러스 루테리(Lactobacillus reuteri), 락토바실러스 살리바리우스(Lactobacillus salivarius), 락토코커스 락티스(Lactococcus lactis), 스트렙토코커스 써모필루스(Streptococcus thermophilus), 비피도박테리움 애니멀리스 락티스(Bifidobacterium animalis ssp. lactis), 비피도박테리움 비피덤(Bifidobacterium bifidum), 비피도박테리움 브레브(Bifidobacterium breve), 비피도박테리움 롱검(Bifidobacterium longum) 및 엔테로코커스 페칼리스(Enterococcus faecalis)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다.
- [0068] 이러한 용매를 40 내지 75℃로 가온한 후 천연 단백질, 천연 다당체를 투입하여 초음파 처리함으로써, 용매 내 천연 단백질과 천연 다당체가 균일하게 분산될 수 있다.
- [0069] 이후, 천연 단백질과 천연 다당체가 분산된 용매의 온도가 50℃ 미만이 되면, 유산균을 투입하여 혼합한다. 유산균은 열에 약하므로, 용매의 온도가 유산균의 활성에 영향을 미치지 않는 상태, 즉 상기와 같이 용매의 온도가 50℃ 미만일 때 유산균을 투입하는 것이 바람직하다. 또한, 유산균 혼합시 초음파와 파쇄기를 사용할 경우에는 열과 진동이 발생하여 유산균을 파괴하거나 손상시킬 수 있으므로, 균질기 및/또는 교반기를 사용하는 것이 바람직하다. 이때, 1,500 내지 4,500 rpm에서 3 내지 30분 동안 교반할 수 있다.
- [0071] 제3단계: 제1단계의 생성물, 제2단계의 생성물, 천연 동결보호제를 혼합한다.
- [0072] 상기 천연 동결보호제는 다층으로 둘러싸인 유산균을 동결건조시, 유산균 또는 유산균을 둘러싼 다층 구조가 파괴되는 것을 방지할 수 있다.
- [0073] 상기 천연 동결보호제로는 탈지분유, 말토덱스트린 및 글리세린으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 사용할 수 있으며, 동결보호제의 효과를 증대시키기 위해 2종 이상을 혼합하여 사용할 수 있다.
- [0074] 이러한 제1단계에서 얻어진 생성물과 제2단계에서 얻어진 생성물을 충분히 혼합한 후 천연 동결보호제를 투입하여 혼합한다. 이때, 균질기와 교반기를 사용할 수 있으며, 1,500 내지 4,500 rpm에서 3 내지 30분 동안 교반할 수 있다.
- [0076] 제4단계: 제3단계의 생성물을 동결건조한다.
- [0077] 제3단계에서 얻어진 생성물을 바로 동결건조하거나, 또는 천연 보존제를 더 투입한 후 동결건조한다.
- [0078] 상기 천연 보존제로는 식품에 첨가할 수 있는 천연 보존제로서, 감귤 추출물, 고삼 추출물, 유자 추출물, 유칼립투스 추출물, 자몽 추출물, 정향 추출물 및 크랜베리 추출물로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 사용할 수 있다.
- [0079] 이러한 제3단계에서 얻어진 생성물에 천연 보존제를 투입하여 혼합함으로써 최종 생성물을 제조한다. 이때, 균질기와 교반기를 사용할 수 있으며, 1,500 내지 4,500 rpm에서 3 내지 30분 동안 교반할 수 있다.
- [0080] 상기 동결건조는 당업계에 알려진 동결건조 장치를 사용할 수 있다. 이때, 최종 생성물을 -10 내지 -30℃의 저온에서 건조시켜 분말화할 수 있다.
- [0082] 본 발명의 다른 일 예에 따른 유산균 함유 천연 리포솜의 제조방법은 (i) 40 내지 75℃의 용매에 천연 다당체를 투입하여 초음파 처리한 후 유산균을 투입하여 혼합하는 제1단계; (ii) 40 내지 75℃의 용매에 천연 유화제를 투입하여 초음파 처리하는 제2단계; (iii) 40 내지 75℃의 용매에 천연 단백질을 투입하여 초음파 처리하는 제3단계; (iv) 상기 제1단계에서 얻어진 생성물, 상기 제2단계에서 얻어진 생성물, 제3단계에서 얻어진 생성물, 천연 동결보호제를 혼합하는 제4단계; 및 (v) 상기 제4단계에서 얻어진 생성물을 동결건조하는 제5단계를 포함할 수 있다. 이때, 상기 제5단계에 천연 보존제를 더 투입하여 혼합할 수 있다.
- [0083] 이러한 유산균 함유 천연 리포솜의 제조방법에서, 각 단계에서 사용되는 물질은 상기 일 예에 따른 유산균 함유 천연 리포솜의 제조방법과 동일하다.
- [0085] 이와 같은 제조방법을 통해, 3층 구조를 갖는 유산균 함유 천연 리포솜 입자를 형성할 수 있다. 이러한 유산균

함유 천연 리포솜은 분말화되어 저장 및 포장에 간편하며, 부패균의 증식이 저해되어 저온 및 상온에서도 장기간 보관할 수 있다.

[0087] <유산균 함유 천연 리포솜을 포함하는 식품 또는 약학 조성물>

[0088] 본 발명의 유산균 함유 천연 리포솜은 내산성 및 내담즙성이 우수하여 유산균을 높은 생존율로 장까지 안전하게 전달하며, 장내 정착된 유산균으로부터 다양한 생리활성 효과를 나타낼 수 있다.

[0089] 상기 유산균 함유 천연 리포솜은 유산균을 둘러싼 코팅 물질 모두 천연 물질 유래 성분으로, 섭취하더라도 인체에 부작용을 나타내지 않는다. 이러한 유산균 함유 천연 리포솜을 섭취할 경우에는 유산균이 소장과 대장에 정착하여 유해균의 성장 및 증식을 저해하고 장관운동 및 배변활동을 원활하게 하며, 장내 면역세포를 증가시켜 장내 질환을 예방할 수 있어, 유산균 함유 천연 리포솜을 유효성분으로 포함하는 식품 또는 약학 조성물로 이용될 수 있다. 특히, 유산균 함유 천연 리포솜을 포함하는 조성물은 세포실험 및 동물실험을 통해 장내 환경을 개선하고 염증을 억제하는 효과가 우수한 것으로 확인되어, 장염 예방 또는 치료용 약학 조성물로 이용될 수 있다.

[0090] 상기 유산균 함유 천연 리포솜을 유효성분으로 포함하는 식품 조성물은 건강기능식품으로 제공될 수 있다. 상기 건강기능식품은 분말, 과립, 정제, 캡슐, 음료 등의 형태일 수 있고, 캔디, 초콜릿, 음료, 껌, 차, 비타민복합체, 건강보조식품 등으로 섭취할 수 있다. 이때, 건강기능식품은 당 업계에 알려진 식품 첨가제를 더 포함할 수 있다.

[0091] 상기 유산균 함유 천연 리포솜을 유효성분으로 포함하는 약학 조성물은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구제; 외용제; 좌제; 주사제 등의 제형일 수 있다. 이때, 상기 약학 조성물은 당 업계에 알려진 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 이때, 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 팜물유 등일 수 있다.

[0093] 이하, 본 발명을 실시예를 통해 구체적으로 설명하나, 하기 실시예는 본 발명의 한 형태를 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 범위가 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0095] [실시예 1] 유산균 함유 천연 리포솜

[0096] 하기 표 1의 구성에 따라 유산균 함유 천연 리포솜을 제조하였다.

[0097] 먼저, 반응기에서 증류수를 65℃로 가온한 후 다당체 혼합물을 투입하여 3,000 rpm에서 5분 동안 분산시키고 초음파 처리하였다. 이들의 온도가 50℃ 미만일 때까지 기다린 후 유산균 혼합물을 투입하고 혼합하였다.

[0098] 다른 반응기에서 증류수를 65℃로 가온한 후 포스파티딜콜린을 천천히 투입하여 3,000 rpm에서 5분 동안 혼합한 후 초음파 처리하여 제2혼합물을 준비하였다.

[0099] 다른 반응기에서 증류수를 65℃로 가온한 후 유청단백질을 투입하여 3,000 rpm에서 5분 동안 혼합한 후 초음파 처리하여 제3혼합물을 준비하였다.

[0100] 상기 제2혼합물이 준비된 반응기에 제3혼합물을 투입하여 혼합한 후 제1혼합물을 투입하여 3,000 rpm에서 5분 동안 혼합하였다. 이후, 탈지분유, 글리세린을 투입하여 혼합하고, 이를 동결건조한 후 분쇄하여 유산균 함유 천연 리포솜을 제조하였다.

표 1

[0101]

성분		중량%
제1혼합물	증류수	27
	다당체 혼합물 (로스트빈검, 카라기난, 타마린드검, 타라검)	0.3
	유산균 혼합물 (락토바실러스 아시도필루스, 비피도박테리움 비피덤, 비피도박테리움 롱검)	2
제2혼합물	증류수	27
	포스파티딜콜린	3

제3혼합물	증류수	28.7
	유청단백질	1
탈지분유		10
글리세린		1

[0103] [실시예 2] 유산균 함유 천연 리포솜

[0104] 하기 표 2의 구성에 따라, 유산균 함유 천연 리포솜을 제조하였다.

[0105] 먼저, 반응기에서 증류수를 65℃로 가온한 후 포스파티딜콜린을 투입하여 3,000 rpm에서 5분 동안 분산시키고, 초음파 처리하여 제1혼합물을 준비하였다.

[0106] 다른 반응기에서 증류수를 65℃로 가온한 후 유청단백질, 다당체 혼합물을 천천히 투입하여 3,000 rpm에서 5분 동안 혼합하고 초음파 처리하였다. 이후, 유청단백질과 다당체 혼합물이 혼합된 증류수의 온도가 50℃ 미만이면, 유산균 혼합물을 투입하여 혼합하여 제2혼합물을 준비하였다.

[0107] 상기 제1혼합물이 준비된 반응기에 제2혼합물을 투입한 후 말토덱스트린, 글리세린을 투입하여 3,000rpm에서 5분 동안 혼합하였다. 이후, 자몽종자 추출물을 투입하여 충분히 혼합하였고, 이를 동결건조한 후 분쇄하여 유산균 함유 천연 리포솜을 제조하였다.

표 2

성분		중량%
제1혼합물	증류수	43.8
	포스파티딜콜린	2.7
제2혼합물	증류수	40.5
	유산균 혼합물 (락토바실러스 아시도필루스, 비피도박테리움 비피덤, 비피도박테리움 롱검)	1.8
	유청단백질	0.9
	다당체 혼합물 (로스트빈검, 카라기난, 타마린드검, 타라검)	0.3
말토덱스트린		9.0
글리세린		0.9
자몽종자 추출물		0.1

[0110] [실시예 3] 유산균 함유 천연 리포솜

[0111] 하기 표 3의 구성에 따라, 유산균 함유 천연 리포솜을 제조하였다.

[0112] 먼저, 반응기에서 증류수를 65℃로 가온한 후 포스파티딜콜린을 투입하여 3,000 rpm에서 15분 동안 분산시키고, 초음파 처리하여 제1혼합물을 준비하였다.

[0113] 다른 반응기에서 증류수를 65℃로 가온한 후 유청단백질, 다당체 혼합물을 천천히 투입하여 3,000 rpm에서 20분 동안 혼합하고 초음파 처리하였다. 이후, 유청단백질과 다당체 혼합물이 혼합된 증류수의 온도가 50℃ 미만이면, 유산균 혼합물을 투입하여 혼합하여 제2혼합물을 준비하였다.

[0114] 상기 제1혼합물이 준비된 반응기에 제2혼합물을 투입한 후 말토덱스트린, 글리세린을 투입하여 3,000 rpm에서 20분 동안 혼합하였다. 이후 자몽종자 추출물, 크랜베리 추출물을 투입하여 충분히 혼합하였고, 이를 동결건조한 후 분쇄하여 유산균 함유 천연 리포솜을 제조하였다.

표 3

성분		중량%
제1혼합물	증류수	43.0
	포스파티딜콜린	2.6

제2혼합물	증류수	39.7
	유산균 혼합물 (락토바실러스 아시도필루스, 비피도박테리움 비피덤, 비피도박테리움 롱검)	1.8
	유청단백질	0.9
	다당체 혼합물 (로스트빈검, 카라기난, 타마린드검, 타라검)	0.3
말토텍스트린		8.8
글리세린		0.9
자몽종자 추출물		0.1
크랜베리 추출물		1.9

[0117] [실시예 4] 유산균 함유 천연 리포솜

[0118] 유산균 혼합물로 락토바실러스 아시도필루스, 비피도박테리움 비피덤 및 비피도박테리움 롱검 대신 락토바실러스 아시도필루스, 락토바실러스 퍼맨텀, 락토바실러스 플란타룸, 락토바실러스 람노시스, 스트렙토코커스 써모필러스, 비피도박테리움 애니멀리스 락티스 및 비피도박테리움 롱검을 사용한 것을 제외하고는, 실시예 2와 동일한 방법으로 유산균 함유 천연 리포솜을 제조하였다.

[0120] [실시예 5] 유산균 조성물

[0121] 하기 표 4의 조성에 따라, 실시예 4의 유산균 함유 천연 리포솜을 유효성분으로 함유하는 유산균 조성물을 제조하였다.

표 4

성분	중량%
실시예 4의 유산균 함유 천연 리포솜	10
알로에베라겔 세포솜	12
미애부복합유산균	5
프락토올리고당	10
갈락토올리고당	2
이눌린	24
난소화성말토텍스트린	8
자일리톨	8
아카시아식이섬유	21

[0124] [비교예 1] 유산균

[0125] 실시예 1에서 사용된 동결 건조 상태의 유산균 혼합물을 사용하였다.

[0127] [비교예 2] 유산균 함유 천연 리포솜

[0128] 유청단백질을 사용하지 않은 것을 제외하고는, 실시예 1과 동일한 방법으로 하기 표 5의 조성에 따라 유산균 함유 천연 리포솜을 제조하였다.

표 5

성분	중량%	
제1혼합물	증류수	42.0
	다당체 혼합물 (로스트빈검, 카라기난, 타마린드검, 타라검)	0.5
	유산균 혼합물 (락토바실러스 아시도필루스, 비피도박테리움 비피덤, 비피도박테리움 롱검)	2
제2혼합물	증류수	41.5
	포스파티딜콜린	3
탈지분유		10
글리세린		1

[0131] [비교예 3] 유산균 제품

[0132] 하기 표 6의 구성을 포함하는 시판중인 유산균 제품(셀바이오텍社, 듀오락 골드)을 사용하였다.

표 6

성분	
유산균	스트렙토코커스 쉐모필러스, 락토바실러스 아시도필루스, 락토바실러스 람노서스, 비피도박테리움 락티스, 비피도박테리움 롱검, 비피도박테리움 비피덤
부형제	이산화규소, 제삼인산칼슘, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨, 합성비타민 등
감미료	무수구연산, 오렌지맛분말, 밀크향혼합제제, 오렌지향혼합제제 등

[0135] [실험예 1] 유산균 함유 천연 리포좀의 내담즙성 측정

[0136] 실시예 1의 유산균 함유 천연 리포좀, 비교예 1의 유산균, 비교예 2의 유산균 함유 천연 리포좀을 각각 0.3% Oxgal 용액과 1:1로 혼합한 후 24시간 동안 반응시켰다. 이후, PBS로 10^{-8} 배까지 희석하였고, 100 u1씩 BCP 한천 배지에 도말하였다. 상기 BCP 한천 배지를 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 2일 동안 배양한 후 세포수를 세었고, 그 결과를 하기 표 7에 나타내었다.

표 7

	투입 유산균	실시예 1	비교예 1	비교예 2
CFU/g	5×10^9	4.1×10^9	0.41×10^9	0.11×10^9
생존율(%)	100	82	0.82	2.2

[0138] 상기 표 7과 같이, 실시예 1의 유산균 함유 천연 리포좀은 비교예 1의 유산균, 비교예 2의 유산균 함유 천연 리포좀에 비해 유산균의 생존율이 높은 것으로 나타났다.

[0140] 따라서, 실시예 1의 유산균 함유 천연 리포좀은 담즙으로부터 유산균을 보호할 수 있다.

[0142] [실험예 2] 천연 보존제에 따른 유산균 함유 천연 리포좀의 내저온성, 내산성 및 내담즙성 측정

[0143] (1) 내저온성 측정

[0144] 실시예 2의 유산균 함유 천연 리포좀, 실시예 3의 유산균 함유 천연 리포좀을 4℃에서 10일 동안 보관하였다. 이후, 각각 PBS로 10^{-8} 배까지 희석하였고, 이를 100 u1씩 BCP 한천 배지에 도말하였다. 상기 BCP 한천 배지를 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 2일 동안 배양한 후 세포수를 세었고, 그 결과를 하기 표 8에 나타내었다.

표 8

	투입 유산균	실시예 2	실시예 3
CFU/g	35×10^9	8.72×10^9	33.8×10^9
생존율(%)	100	24.9	96.6

[0146] 상기 표 8과 같이, 실시예 2의 유산균 함유 천연 리포좀, 실시예 3의 유산균 함유 천연 리포좀은 유산균의 생존율이 모두 우수하며, 특히 실시예 3의 유산균 함유 천연 리포좀이 높은 유산균의 생존율을 가지는 것으로 나타났다.

[0148] (2) 내산성 측정

[0149] 실시예 2의 유산균 함유 천연 리포좀, 실시예 3의 유산균 함유 천연 리포좀을 각각 NaH₂PO₄(pH 2)와 1:1로 혼합한 후 5시간 동안 반응시켰다. 이후, PBS로 10^{-8} 배까지 희석하였고, 100 u1씩 BCP 한천 배지에 도말하였다. 상기 BCP 한천 배지를 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 2일 동안 배양한 후 세포수를 세었고, 그 결과를 하기 표 9에 나타내

었다.

표 9

[0150]

	투입 유산균	실시예 2	실시예 3
CFU/g	3.5×10^9	1.52×10^9	3.12×10^9
생존율(%)	100	43.43	89.14

[0151]

상기 표 9와 같이, 실시예 2의 유산균 함유 천연 리포솜, 실시예 3의 유산균 함유 천연 리포솜은 유산균의 생존율이 모두 우수하며, 특히 실시예 3의 유산균 함유 천연 리포솜이 높은 유산균의 생존율을 가지는 것으로 나타났다.

[0153]

(3) 내담즙성 측정

[0154]

실시예 2의 유산균 함유 천연 리포솜, 실시예 3의 유산균 함유 천연 리포솜에 대해 상기 실험예 1과 동일한 방법으로 실험하였고, 그 결과를 하기 표 10에 나타내었다.

표 10

[0155]

	투입 유산균	실시예 2	실시예 3
CFU/g	9×10^9	7.52×10^9	8.44×10^9
생존율(%)	100	83.56	93.78

[0156]

상기 표 10과 같이, 실시예 2의 유산균 함유 천연 리포솜, 실시예 3의 유산균 함유 천연 리포솜은 유산균의 생존율이 모두 우수하며, 특히 실시예 3의 유산균 함유 천연 리포솜이 높은 유산균의 생존율을 가지는 것으로 나타났다.

[0158]

따라서, 천연 보존제를 더 포함하는 유산균 함유 천연 리포솜은 유산균의 내저온성, 내산성 및 내담즙성이 우수한 것을 알 수 있었다.

[0160]

[실험예 3] 유산균 함유 천연 리포솜의 온도별 생존율 측정

[0161]

실시예 2의 유산균 함유 천연 리포솜을 각각 -20℃, 4℃, 24℃, 37℃, 45℃에서 0일, 5일 동안 보관하였다. 이후, 상기 실험예 2의 (1)과 동일한 방법으로 실험하였고, 그 결과를 하기 표 11에 나타내었다.

표 11

[0162]

	0일	5일
-20℃	7.7×10^7	4.9×10^7
4℃	7.5×10^7	8.0×10^6
24℃	8.0×10^7	7.3×10^7
37℃	7.4×10^7	0
45℃	8.0×10^7	0

[0163]

상기 표 11과 같이, 실시예 2의 유산균 함유 천연 리포솜은 -20 내지 24℃에서 보관하더라도 유산균의 생존율이 크게 감소하지 않는 것으로 나타났다.

[0165]

[실험예 4] 유산균의 내저온성, 내산성 및 내담즙성 측정

[0166]

(1) 내저온성 측정

[0167]

실시예 2의 유산균 함유 천연 리포솜, 비교예 1의 유산균, 비교예 3의 유산균 제품을 4℃에서 각각 0일, 10일 동안 보관하였다. 이후, 상기 실험예 2의 (1)과 동일한 방법으로 실험하였고, 그 결과를 하기 표 12에 나타내었다.

표 12

[0168]

	실시예 2	비교예 1	비교예 3
0일	8.1×10^6	2.2×10^7	2.4×10^6
10일	5.1×10^6	2.1×10^5	3.2×10^5

[0169]

상기 표 12와 같이, 보관일이 늘어날수록 실시예 2의 유산균 함유 천연 리포솜, 비교예 1의 유산균, 비교예 3의 유산균 제품은 생균수가 감소하는 것으로 나타났다. 이때, 실시예 2의 유산균 함유 천연 리포솜의 생균수는 약 1/2로 감소되는 반면, 비교예 1의 유산균의 생균수는 약 1/100, 비교예 3의 종래 유산균 제품의 생균수는 약 1/10로 감소되는 것으로 나타났다.

[0170]

보관 10일째, 실시예 2의 유산균 함유 천연 리포솜은 비교예 1의 유산균, 비교예 3의 종래 유산균 제품에 비해 생균수가 많은 것으로 나타났다.

[0172]

(2) 내산성 측정

[0173]

실시예 2의 유산균 함유 천연 리포솜, 비교예 1의 유산균, 비교예 3의 유산균 제품을 각각 NaH_2PO_4 (pH 2)와 1:1로 혼합한 후 각각 0시간, 5시간 동안 반응시켰다. 이후, 상기 실험에 2의 (2)와 동일한 방법으로 실험하였고, 그 결과를 하기 표 13에 나타내었다.

표 13

[0174]

	실시예 2	비교예 1	비교예 3
0시간	8.1×10^6	2.2×10^7	2.4×10^6
5시간	2.3×10^6	0	5.4×10^3

[0175]

상기 표 13과 같이, 산성 용액과의 반응 시간이 늘어날수록 실시예 2의 유산균 함유 천연 리포솜, 비교예 1의 유산균, 비교예 3의 유산균 제품은 생균수가 감소하는 것으로 나타났다. 이때, 실시예 2의 유산균 함유 천연 리포솜의 생균수는 약 1/4로 감소되는 반면, 비교예 3의 종래 유산균 제품의 생균수는 약 1/450로 감소되는 것으로 나타났다.

[0176]

반응 5시간째, 비교예 1의 유산균은 모두 사멸하였고, 실시예 2의 유산균 함유 천연 리포솜은 비교예 3의 종래 유산균 제품에 비해 생균수가 많은 것으로 나타났다.

[0178]

(3) 내담즙성 측정

[0179]

실시예 2의 유산균 함유 천연 리포솜, 비교예 1의 유산균, 비교예 3의 유산균 제품을 각각 0.3% Oxgal 용액과 1:1로 혼합한 후 각각 0시간, 24시간 동안 반응시켰다. 이후, 상기 실험에 1과 동일한 방법으로 실험하였고, 그 결과를 하기 표 14에 나타내었다.

표 14

[0180]

	실시예 2	비교예 1	비교예 3
0시간	8.1×10^6	2.2×10^7	2.4×10^6
24시간	1.0×10^8	7.0×10^1	3.0×10^3

[0181]

상기 표 14와 같이, 담즙과의 반응 시간이 늘어날수록 비교예 1의 유산균, 비교예 3의 유산균 제품은 생균수가 감소하는 반면, 실시예 2의 유산균 함유 천연 리포솜은 오히려 생균수가 증가하는 것으로 나타났다.

[0182]

반응 24시간째, 실시예 2의 유산균 함유 천연 리포솜의 생균수는 약 12배가 증가되는 반면, 비교예 1의 유산균의 생균수는 약 1/300,000, 비교예 3의 종래 유산균 제품의 생균수는 약 1/1,000로 감소되는 것으로 나타났다.

[0184]

따라서, 유산균 함유 천연 리포솜은 코팅되지 않은 유산균, 종래 유산균 제품에 비해 유산균의 내저온성, 내산

성 및 내담즙성이 우수한 것을 알 수 있었다.

[0186] [실험예 5] 장내 유해균 활성의 측정

[0187] 장에는 유해균과 유익균이 공존하며, 유산균과 같은 유익균에 비해 유해균의 군수가 많거나 활성이 높을 경우, 장 건강이 좋지 않을 수 있다. 장내 베타-글루쿠로니다아제와 베타-글루코시다아제의 활성을 측정하여 유해균의 활성 정도를 확인할 수 있다.

[0189] (1) 베타-글루쿠로니다아제(β -glucuronidase)

[0190] 베타-글루쿠로니다아제는 장내 세균에 의해 생성되는 효소로, 장내 지용성 유독 물질과 결합된 글루쿠론산의 결합을 끊어 장세포에 독성 물질을 제공하게 된다. 이러한 베타-글루쿠로니다아제의 활성에 의해 장내 염증 및 암이 발생하는 것으로 알려져 있다. 베타-글루쿠로니다아제의 활성은 주로 가스괴저균(*Clostridium perfringens*), 대장균, 박테로이데스, 유박테리움, 펩토스트렙토커스 등의 장내 유해균에 의해 생성되는 것으로 알려져 있다.

[0191] 먼저, GAM(General anaerobic medium) 배지 5 ml에 음성대조균으로 아무것도 처리하지 않고, 실시예 2의 유산균 함유 천연 리포솜, 비교예 1의 유산균, 비교예 3의 유산균 제품을 농도 0.5, 1%로 각각 처리한 후 pH 7.2로 맞춘 후 멸균하여 배지를 준비하였다.

[0192] 건강한 한국인의 신선한 분변을 GAM 배지로 10배 희석한 후 5 ul를 준비된 GAM 배지에 접종하였다. 이후, 37°C, 혐기적 배양기에서 12시간 이상 배양하여 효소액 시료로 사용하였다.

[0193] 효소 반응액으로 0.1 M 칼륨인산염 완충액(KH_2PO_4 , pH 7.0) 380 ul에 10 mM 니트로페닐 β -D-글루쿠로니드(nitrophenyl β -D-glucuronide) 20 ul를 첨가하였고, 여기에 효소액 시료를 100 ul씩 첨가하였다. 이후, 37°C에서 10~60분 동안 반응시킨 후 0.5 N NaOH 500 ul를 첨가하여 반응을 종결시켰다. 이를 3,000 rpm에서 10분 동안 원심분리한 후 상층액을 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였고, 그 결과를 도 3에 나타내었다. 이때, 흡광도로 유리된 페놀프탈레인의 양을 측정하며, 측정된 페놀프탈레인의 양이 많을수록 베타-글루쿠로니다아제의 활성이 높은 것을 의미한다.

[0194] 도 3과 같이, 실시예 2의 유산균 함유 천연 리포솜, 비교예 1의 유산균을 처리한 경우에는 처리 농도가 증가할수록 페놀프탈레인 양이 감소된 반면, 비교예 3의 유산균 제품을 처리한 경우는 처리 농도가 증가할수록 페놀프탈레인 양이 오히려 증가된 것으로 나타났다.

[0195] 또한, 실시예 2의 유산균 함유 천연 리포솜을 처리한 경우에는 페놀프탈레인 양이 비교예 1의 유산균, 비교예 3의 유산균 제품을 처리한 경우에 비해 적은 것으로 나타났다.

[0197] (2) 베타-글루코시다아제(β -glucosidase)

[0198] 베타-글루코시다아제는 주로 미생물과 동물의 소장점막에 분포하는 효소로, 배당체(Glycoside)의 베타-글루코시드 결합을 가수분해하여 글루코스(Glucose)와 비배당체를 생성한다. 식품으로 섭취된 배당체 중 청산 배당체, 쿠마린 배당체 및 페놀성 배당체는 체내에서 분해되어 이들의 독성기가 유리되는데, 이러한 독성기가 많이 생성되면 장 건강에 좋지 않은 것으로 알려져 있다.

[0199] 배지와 효소액 시료는 상기 실험예 5의 (1)과 동일한 방법으로 준비하였다.

[0200] 효소 반응액으로 0.1 M 인산 완충액(phosphate, pH 6.0) 300 ul에 2 mM p-니트로페닐 β -D-글루코시드(p-nitrophenyl β -D-glucoside) 200 ul를 첨가하였고, 여기에 상기 효소액 시료를 100 ul씩 첨가하였다. 이후, 37°C에서 10~60분 동안 반응한 후 0.5 N NaOH 400 ul를 첨가하여 반응을 종결시키고, 증류수 1 ml를 첨가하였다. 이를 3,000 rpm에서 20분 동안 원심분리한 후 상층액을 이용하여 405 nm에서 흡광도(optical density)를 측정하였고, 그 결과를 도 4에 나타내었다. 이때, 흡광도로 유리된 p-니트로페닐의 양을 측정하며, 측정된 p-니트로페닐의 양이 많을수록 베타-글루코시다아제의 활성이 높은 것을 의미한다.

[0201] 도 4와 같이, 비교예 1의 유산균을 처리한 경우에는 처리 농도가 증가할수록 p-니트로페닐 양이 감소된 반면, 실시예 2의 유산균 함유 천연 리포솜, 비교예 3의 유산균 제품을 처리한 경우에는 처리 농도가 증가하더라도 p-니트로페닐 양이 큰 변화 없는 것으로 나타났다.

[0202] 또한, 실시예 2의 유산균 함유 천연 리포솜한 경우에는 p-니트로페닐 양이 비교예 1의 유산균, 비교예 3의 유산균 제품을 처리한 경우에 비해 적은 것으로 나타났다.

[0204] 따라서, 유산균 함유 천연 리포솜은 코팅되지 않은 유산균, 종래 유산균 제품에 비해 장내 유해균의 활성을 억

제하여 독성 물질의 생성을 저해하는 효과가 우수한 것을 알 수 있었다.

[0206] [실험예 6] 장 상피세포를 이용한 실험(in vitro)

[0207] 인간 유래 장 상피세포(Caco-2)를 이용하여 유산균에 대한 세포 생존율, 장벽 형성 단백질의 발현능, 물리적 손상 회복능, 유산균과 유해균의 부착능을 측정하였다.

[0209] (1) 세포 생존율

[0210] 혈청배지(EMEM + 10% FBS + 1% Pen/strep)를 이용하여 마이크로플레이트(96 well)에 Caco-2 세포를 10^5 cells/well씩 분주한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다.

[0211] 각 세포의 배지를 제거한 후 정상균으로 혈청배지를 처리하고, 음성대조군, 양성대조군, 실험군으로 장염 유발 물질인 텍스트란설페이트소듐(Dextran sulfate sodium; DSS)을 처리하였다. 이때, 양성대조군에 장염치료제인 설파진(sulfazine)을 처리하고, 실험군에 각각 실시예 2의 유산균 함유 천연 리포솜, 실시예 4의 유산균 함유 천연 리포솜, 실시예 5의 유산균 조성물, 비교예 3의 유산균 제품을 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. MTT 분석을 하기 위해, 기존 배지를 제거한 후 PBS에 5 mg/ml의 농도로 용해한 MTT 용액을 배지의 10%가 되도록 희석하여 분주하고 4시간 배양하였다. 이후, 배지를 제거한 후 DMSO 1 ml을 넣고 10분 동안 혼합하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였고, 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0212] 도 5와 같이, 실시예 2의 유산균 함유 천연 리포솜, 실시예 4의 유산균 함유 천연 리포솜, 실시예 5의 유산균 조성물을 처리한 경우에는 비교예 3의 종래 유산균 제품을 처리한 경우에 비해 세포 생존율이 높고, 종래 장염 치료제를 처리한 경우(양성대조군)와 유사한 세포 생존율을 가지는 것으로 나타났다.

[0214] (2) 장벽형성 단백질의 발현능

[0215] 장내 세포는 접착 단백질을 통해 세포간의 기계적 결합을 형성하고 있다. 이러한 접착 단백질로는 오클루딘(Occludin)이 있다.

[0216] 먼저, 혈청배지(EMEM + 10% FBS + 1% Pen/strep)를 이용하여 마이크로플레이트(24 well)에 Caco-2 세포를 5×10^5 cells/well씩 분주한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다.

[0217] 각 세포의 배지를 제거한 후 정상균으로 혈청배지를 처리하고, 음성대조군, 양성대조군, 실험군으로 장염 유발 물질인 텍스트란설페이트소듐을 처리하였다. 이때, 양성대조군에 장염치료제인 설파진을 처리하고, 실험군에 각각 실시예 2의 유산균 함유 천연 리포솜, 실시예 4의 유산균 함유 천연 리포솜, 실시예 5의 유산균 조성물, 비교예 3의 유산균 제품을 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 각 배지를 제거한 후 세포 용해액(Lysis buffer)을 이용하여 세포액을 모았다. 세포액 내 단백질을 정량하기 위해, 세포액을 5분 동안 끓인 후 15분 동안 얼음에서 냉각하여 정량 시료를 준비하였다. 상기 정량 시료를 10% SDS-PAGE 겔에 로딩한 후 NC 막(membrane)으로 옮겼다(transfer). 상기 NC 막을 5% 스킵 밀크-TBST 용액에 2시간 반응시킨 후 5% 스킵 밀크-TBST 용액에 희석된 오클루딘 항체에 4 하루밤 동안 반응시켰다. TBST 용액에 30분 동안 흔들어서 세척한 후 2차 항원을 붙여주었다. 암실에서 2차 항원과 ECL 용액을 반응시켜 웨스턴 블롯 필름(western blot film)을 이용하여 오클루딘의 발현을 확인하였고, 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0218] 도 6과 같이, 실시예 2의 유산균 함유 천연 리포솜, 실시예 4의 유산균 함유 천연 리포솜, 실시예 5의 유산균 조성물을 처리한 경우에는 종래 장염치료제를 처리한 경우(양성대조군)에 비해 오클루딘의 발현량이 많은 것으로 나타났다.

[0219] 특히, 실시예 5의 유산균 조성물을 처리한 경우가 오클루딘의 발현량이 가장 많은 것으로 나타났다.

[0221] (3) 물리적 손상 회복능

[0222] 혈청배지(EMEM + 10% FBS + 1% Pen/strep)를 이용하여 배양접시(35 mm dish)에 Caco-2 세포를 10^6 cells/well씩 분주한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다.

[0223] 각 세포에 팁(tip)을 이용하여 십자 모양으로 긁어 상처를 낸 후 PBS로 2회 세척하였다.

[0224] 이후, 정상균으로 혈청배지를 처리하고, 음성대조군, 양성대조군, 실험군으로 장염 유발 물질인 텍스트란설페이트소듐을 처리하였다. 이때, 양성대조군에 장염치료제인 설파진을 처리하고, 실험군에 각각 실시예 2의 유산균

함유 천연 리포솜, 실시예 4의 유산균 함유 천연 리포솜, 실시예 5의 유산균 조성물을 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 세포의 회복 정도를 현미경을 관찰하였고, 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0225] 도 7과 같이, 실시예 2의 유산균 함유 천연 리포솜, 실시예 4의 유산균 함유 천연 리포솜, 실시예 5의 유산균 조성물을 처리한 경우에는 종래 장염치료제를 처리한 경우(양성대조군), 비교예 3의 유산균 제품을 처리한 경우에 비해 상처난 부위의 세포수가 증가한 것으로 나타났다.

[0226] 특히, 실시예 5의 유산균 조성물을 처리한 경우에는 상처난 부위의 세포수가 가장 많이 증가한 것으로 나타났다.

[0228] (4) 유산균 및 대장균의 부착능

[0229] 혈청배지(EMEM + 10% FBS + 1% Pen/strep)를 이용하여 마이크로플레이트(24 well)에 Caco-2 세포를 10^5 cells/well씩 분주한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 세포가 단층(monolayer)을 형성할 때까지 배양하였다.

[0230] 락토바실러스 퍼멘텀(Lactobacillus fermentum) Miev L1106(KCTC 12082BP)은 유산균으로, MRS 배지를 사용하여 3회 계대 배양하여 준비하였다.

[0231] 대장균(Escherichia coli, KCTC 1041)은 유해균으로, TSB(Trypticase soy broth) 배지를 사용하여 3회 계대 배양하여 준비하였다.

[0232] 각 세포의 배지를 제거한 후 PBS 500 ul로 4회 세척하였다. 각 세포에 음성대조군으로 무항생제배지(EMEM + 10% FBS)를 처리하였고, 실험군으로 각각 실시예 2의 유산균 함유 천연 리포솜, 실시예 4의 유산균 함유 천연 리포솜, 실시예 5의 유산균 조성물, 비교예 3의 유산균 제품을 무항생제배지(EMEM + 10% FBS)에 희석하여 처리하였다. 이후, 각 세포에 락토바실러스 퍼멘텀을 1×10^9 cfu/ml로 혈청배지에 희석하거나, 또는 대장균을 1×10^9 cfu/ml로 PBS에 희석하여 처리하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 2시간 동안 배양하였다. 각 세포의 배지를 제거한 후 PBS로 3분씩 3회 세척하였다. 각 세포를 0.2% 트립신-EDTA로 떼어내고 펩톤수를 이용하여 연속희석법으로 MRS 한천 배지(락토바실러스 퍼멘텀 처리시) 또는 Mac Conkey 한천 배지(대장균 처리시)에 도말을 하였다. 이를 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양한 후 균수를 측정하였고, 그 결과를 하기 표 15에 나타내었다.

표 15

[0233]

	음성대조군	실시예 2	실시예 4	실시예 5	비교예 3
유산균 (cfu/ml)	0.73×10^5	2.36×10^5	3.8×10^5	15.5×10^5	0.82×10^5
대장균 (cfu/ml)	24.5×10^5	7.2×10^5	0.48×10^5	7.1×10^5	36×10^5

[0234] 상기 표 15와 같이, 실시예 2의 유산균 함유 천연 리포솜, 실시예 4의 유산균 함유 천연 리포솜, 실시예 5의 유산균 조성물을 처리한 경우에는 비교예 3의 종래 유산균 제품을 처리한 경우에 비해 세포에 부착된 유산균 수가 많고, 대장균 수가 적은 것으로 나타났다.

[0235] 특히, 실시예 5의 유산균 조성물을 처리한 경우에는 부착된 유산균 수가 가장 많고, 실시예 4의 유산균 함유 천연 리포솜을 처리한 경우에는 부착된 대장균 수가 가장 적은 것으로 나타났다.

[0237] [실험예 7] 대장암 세포를 이용한 실험(in vitro)

[0238] 인간 유래 대장 선암(Colorectal adenocarcinoma) 세포인 HT-29 세포를 이용하여 유산균의 대장암 발생 억제 효과를 측정하였다.

[0239] 혈청배지(EMEM + 10% FBS + 1% Pen/strep)를 이용하여 마이크로플레이트(24 well)에 HT-29 세포를 0.8×10^4 cells/well씩 분주한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 동안 배양하였다. 각 세포에 음성대조군으로 무혈청배지를 처리하고, 양성대조군으로 대장암 치료제인 5-플루오로우라실(5-Fluorouracil)을 처리하고, 실험군으로 각각 실시예 2의 유산균 함유 천연 리포솜, 실시예 4의 유산균 함유 천연 리포솜, 실시예 5의 유산균 조성물, 비교예 3의 유산균 제품을 처리하였고, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 7일 동안 배양하였다. 이후, 각 세포에 6% 글루

타르알데히드, 0.1% 크리스탈 바이올렛을 첨가하여 15분 동안 혼합한 후 PBS로 세척하였다. 각 세포를 현미경으로 관찰하였고, 그 결과를 도 8에 나타내었다.

[0240] 도 8과 같이, 실시예 2의 유산균 함유 천연 리포솜, 실시예 4의 유산균 함유 천연 리포솜, 실시예 5의 유산균 조성물을 처리한 경우에는 비교예 3의 종래 유산균 제품을 처리한 경우에 비해 콜로니가 적게 형성되며, 이는 종래 대장암 치료제를 처리한 경우(양성 대조군)와 유사한 것으로 나타났다.

[0241] 특히, 실시예 4의 유산균 함유 천연 리포솜을 처리한 경우에는 콜로니가 가장 적게 형성된 것으로 나타났다.

[0243] **[실험예 8] 랫트(Rat)를 이용한 동물실험(in vivo)**

[0244] 5주령 SD 랫트를 정상군, 음성대조군, 양성대조군, 실험군으로 나누어 실험하였다.

[0245] 정상군과 음성대조군에는 일반사료를 30일 동안 제공하고, 양성대조군에는 일반사료와 장염치료제인 설파진을 30일 동안 제공하고, 실험군에는 일반사료와 각각 실시예 2의 유산균 함유 천연 리포솜, 실시예 4의 유산균 함유 천연 리포솜, 실시예 5의 유산균 조성물, 비교예 3의 유산균 제품을 30일 동안 제공하였다. 이후, 정상군에는 별도로 제공하지 않고, 음성대조군, 양성대조군, 실험군에는 텍스트란셀레이트소듐을 5-7일 동안 음용수의 3-5%로 제공하여 장염을 유발시켰다.

[0247] (1) 장내 유익균과 유해균의 증식

[0248] 각 랫트를 희생하여 즉시 장 내용물을 채취한 후 멸균된 0.1% 펩톤수(Peptide water)에 균질화하여 10배 희석하였다. 이를 PBS로 10^8 배까지 희석하여 분석 시료를 준비하였다.

[0249] 상기 분석 시료를 BS 한천 배지, Mac Conkey 한천 배지에 도말하였다. BS 한천 배지는 37°C, CO₂ 배양기에서 2일 동안 배양하고, Mac Conkey 한천 배지는 37°C, 혐기적 배양기(10% H₂, 10% CO₂, 80% N₂)에서 2일 동안 배양한 후 세포수를 세었고, 그 결과를 도 9에 나타내었다. 이때, BS 한천 배지에서는 유익균으로 비피도박테리움을 확인할 수 있고, Mac Conkey 한천 배지에서는 유해균으로 대장균을 확인할 수 있다.

[0250] 도 9와 같이, 장염이 유발될 경우(음성대조군)에는 장내 유익균에 비해 유해균이 증가하는 것으로 나타났다. 이때, 장염치료제(양성대조군), 실시예 2의 유산균 함유 천연 리포솜, 실시예 4의 유산균 함유 천연 리포솜, 실시예 5의 유산균 조성물, 비교예 3의 유산균 제품을 제공할 경우에는 유익균이 증가하고, 유해균이 감소하는 것으로 나타났다.

[0251] 특히, 실시예 2의 유산균 함유 천연 리포솜을 제공한 경우에는 유해균이 현저하게 감소하고, 실시예 5의 유산균 조성물을 제공한 경우에는 유익균이 가장 많이 증가하는 것으로 나타났다.

[0253] (2) 장내 염증인자 측정

[0254] 각 랫트를 희생한 후 대장 말단 부위를 적출하여 PBS로 세척하였다. 이를 균질기(homogenizer)로 균질화한 후 20,000 xg, 4에서 30분 동안 원심분리하여 상층액을 분석 시료로 사용하였다.

[0255] 상기 분석 시료를 이용하여 염증인자 IL-6, TNF- α 를 측정하기 위해, IL-6 ELISA 키트(고마바이오텍社, Rat IL-6), TNF- α ELISA 키트(고마바이오텍社, Rat TNF- α)를 사용하였고, 그 결과를 도 10 및 도 11에 나타내었다.

[0256] 도 10 및 도 11과 같이, 장염이 유발될 경우(음성대조군)에는 정상군에 비해 IL-6, TNF- α 의 분비량이 증가하는 것으로 나타났다. 이때, 실시예 2의 유산균 함유 천연 리포솜, 실시예 4의 유산균 함유 천연 리포솜, 실시예 5의 유산균 조성물을 제공한 경우에는 종래 장염치료제를 제공한 경우(양성대조군)와 IL-6의 분비량이 유사한 반면, TNF- α 의 분비량이 감소하는 것으로 나타났다. 그러나, 비교예 3의 종래 유산균 제품을 제공한 경우에는 IL-6, TNF- α 의 분비량이 감소하지 않는 것으로 나타났다.

[0258] (3) 항체 농도 측정

[0259] 소장 면역기관인 페이에르판(peyer's patch)에는 면역세포인 T 세포, B 세포, M 세포가 많이 분포하며, 이러한 면역세포에서 분비된 IgA는 장내 점막면역에서 중요한 역할을 한다.

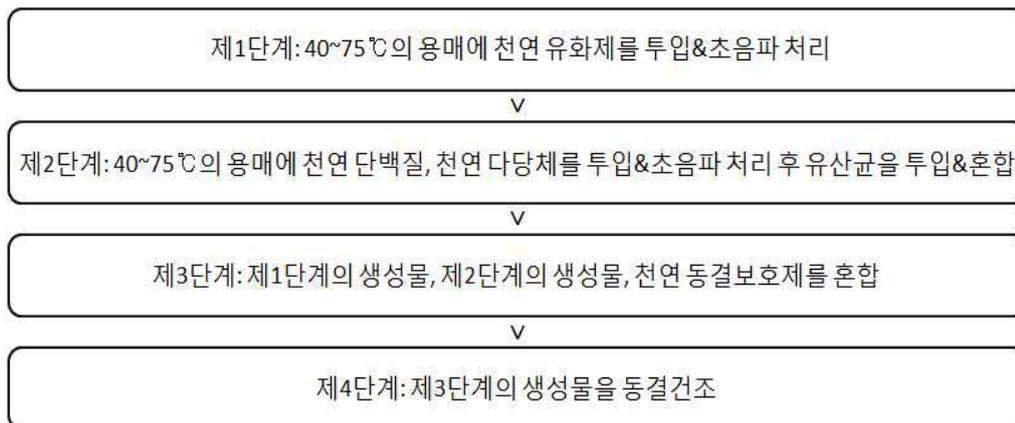
[0260] 먼저, 상기 실험예 8의 (2)와 동일한 방법으로 분석 시료를 준비하였다.

[0261] 상기 분석 시료를 이용하여 IgA를 측정하기 위해, IgA ELISA 키트(고마바이오텍社, Rat IgA)를 사용하였고, 그 결과를 도 12에 나타내었다.

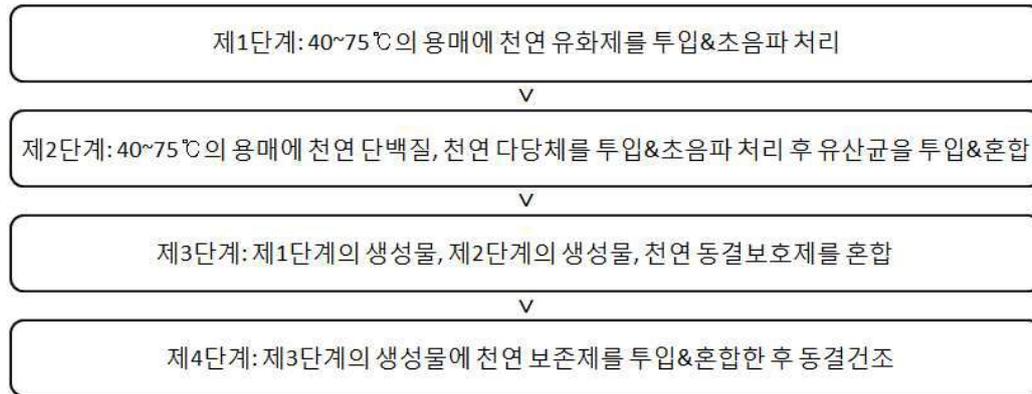
- [0262] 도 12와 같이, 장염이 유발될 경우(음성대조군)에는 정상군에 비해 IgA의 분비량이 감소하는 것으로 나타났다. 이때, 실시예 2의 유산균 함유 천연 리포솜, 실시예 4의 유산균 함유 천연 리포솜, 실시예 5의 유산균 조성물을 제공한 경우에는 종래 장염치료제를 제공한 경우(양성대조군)에 비해 IgA의 분비량이 증가하는 것으로 나타났다. 특히, 실시예 5의 유산균 조성물을 제공한 경우에는 IgA의 분비량이 가장 많은 것으로 나타났다.
- [0264] (4) 면역세포 관찰
- [0265] 소장 면역기관인 페이에르판(peyer's patch)에 존재하는 T 세포, B 세포, M 세포를 면역조직화학법(Immunohistochemistry)을 이용하여 관찰하였다. 이때, T 세포의 마커(Marker)로는 CD3와 CD68, B 세포의 마커로는 CD79a, M 세포의 마커로는 CK8을 이용하였다.
- [0266] 먼저, 각 랫트를 희생한 후 소장에서 페이에르판이 함유된 조직을 적출하여 10% 포르말데히드에 담근 후 파라핀으로 고정시켜 조직을 높이 70 mm로 절단하였다. 절단된 조직을 슬라이드 위에 올려놓고 자일렌(Xylene)으로 20분 동안 3회 세척한다. 이후, 100% 에탄올에서 5분 동안, 90% 에탄올에서 5분 동안, 80% 에탄올에서 5분 동안 순차적으로 세척한 후 증류수로 세척한다. 상기 조직을 항원 노출 버퍼(Antigen retrieval buffer, 10 mM 시트르산나트륨+0.05% 트윈-20, pH 6.0)에 10분 동안 담가 끓인 후 증류수를 이용하여 식혀주었다. 상기 조직에 각 1차 항체(CK8, CD3, CD68, CD79a)를 처리하여 4℃에서 하룻밤 동안 반응시킨 후 2차 항체를 처리하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이후, 100% 에탄올에서 5분 동안, 90% 에탄올에서 5분 동안, 80% 에탄올에서 5분 동안 순차적으로 세척한 후 자일렌으로 20분 동안 세척하였다. 각 조직에 DAPI가 첨가된 봉입제(Vector Laboratories社, Vectashield)를 올려 현미경으로 관찰하였고, 그 결과를 도 13 내지 도 16에 나타내었다.
- [0267] 도 13 내지 도 16과 같이, 장염이 유발될 경우(음성대조군)에는 정상군에 비해 페이에르판 주변에 면역세포의 분포가 감소하는 것으로 나타났다. 이때, 실시예 2의 유산균 함유 천연 리포솜, 실시예 4의 유산균 함유 천연 리포솜, 실시예 5의 유산균 조성물을 제공한 경우에는 종래 장염치료제를 제공한 경우(양성대조군), 비교예 3의 종래 유산균 제품을 제공한 경우에 비해 T 세포, B 세포, M 세포의 분포가 증가하는 것으로 나타났다.
- [0269] 따라서, 본 발명의 유산균 함유 천연 리포솜 및 이를 유효성분으로 함유하는 유산균 조성물은 장내 유익균과 유해균의 균총을 조절하여 장내 환경을 개선시켜 면역세포 증식과 항체 생성을 유도함으로써 장을 건강하게 유지하는데 도움을 줄 수 있다.

도면

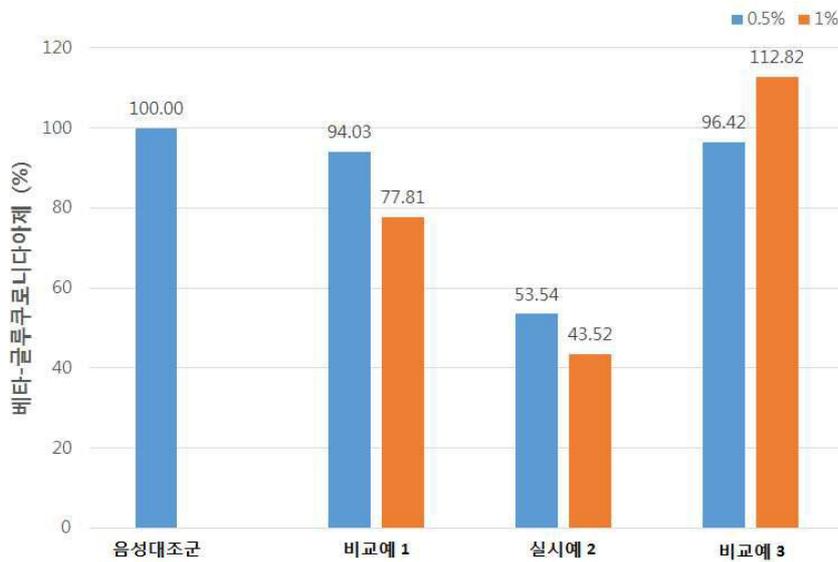
도면1



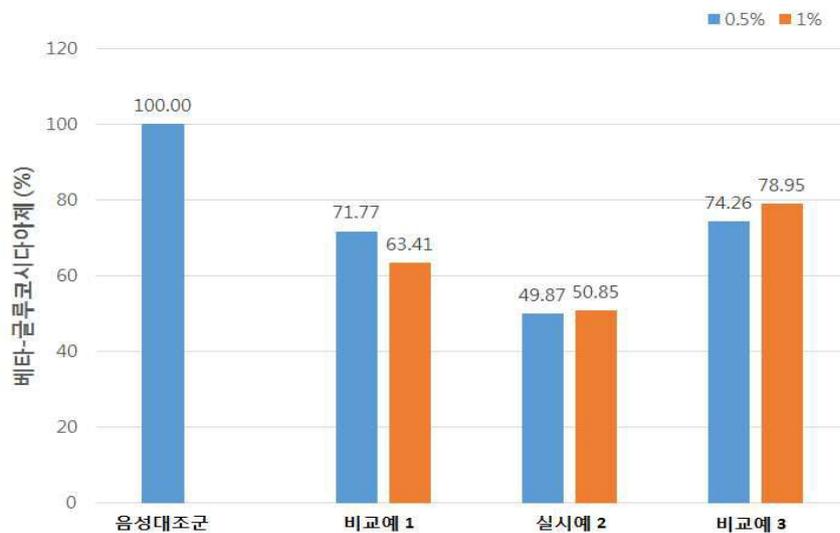
도면2



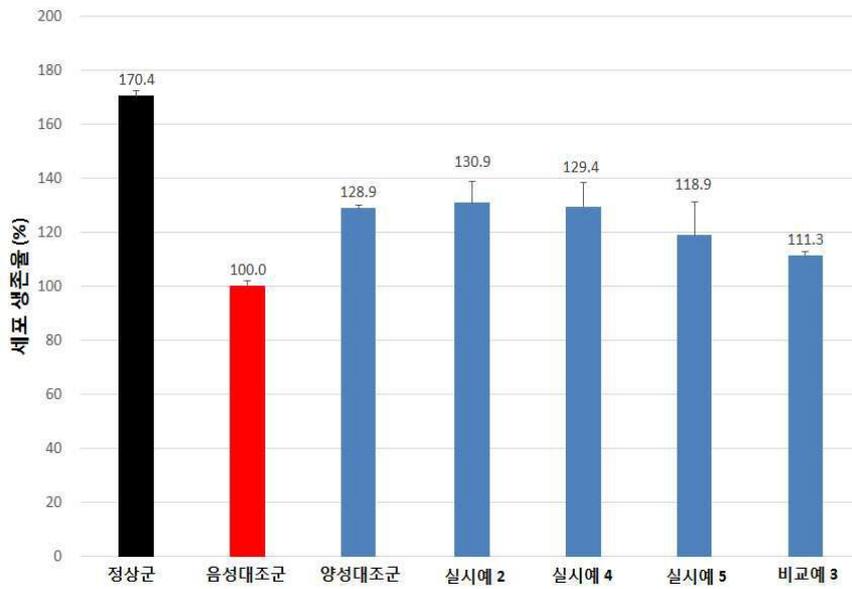
도면3



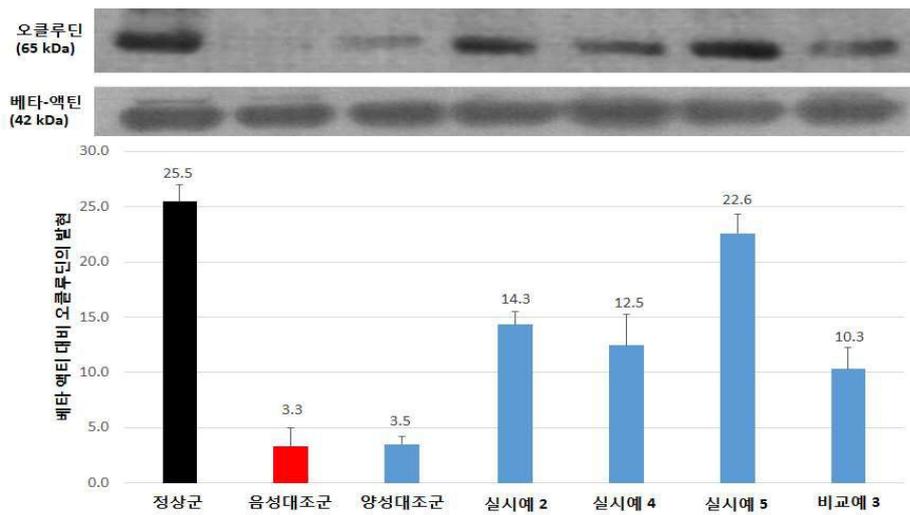
도면4



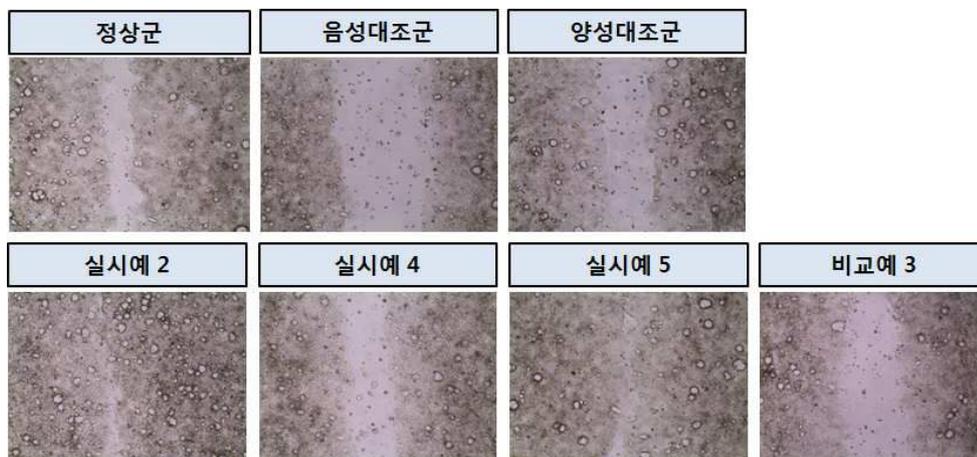
도면5



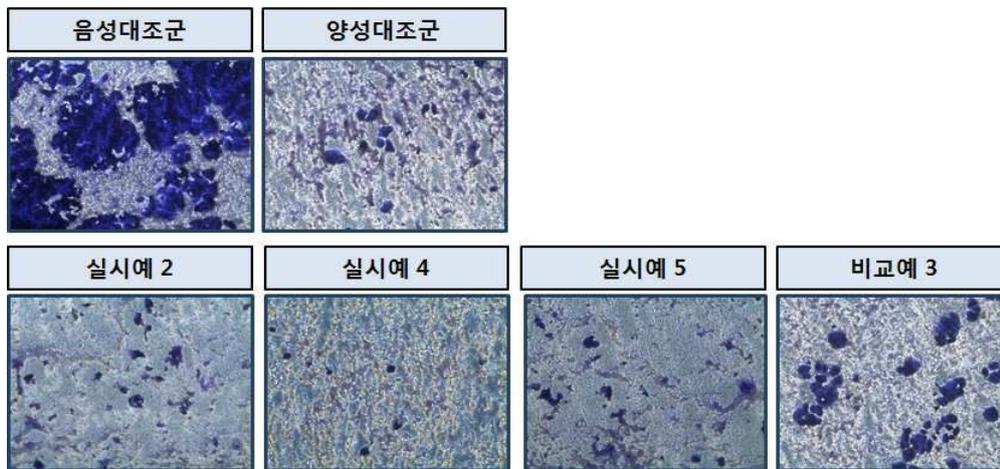
도면6



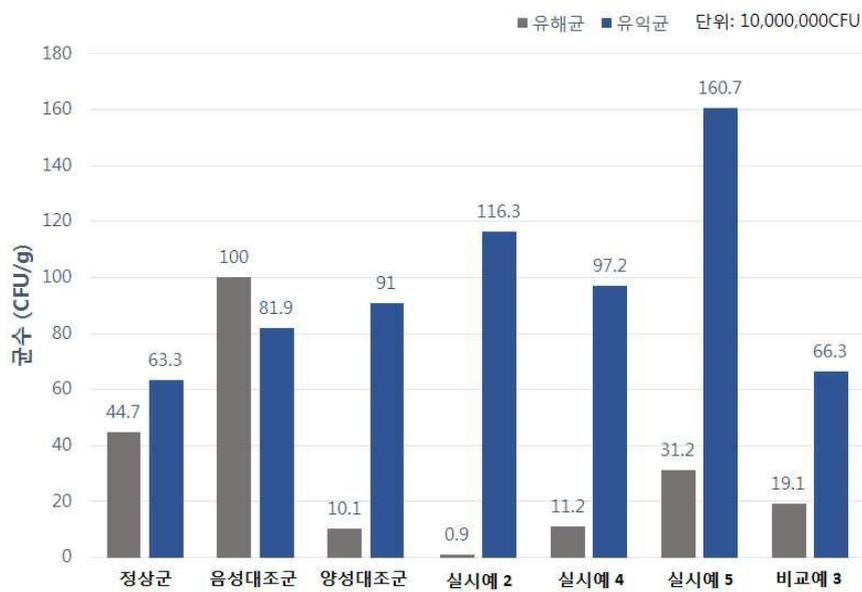
도면7



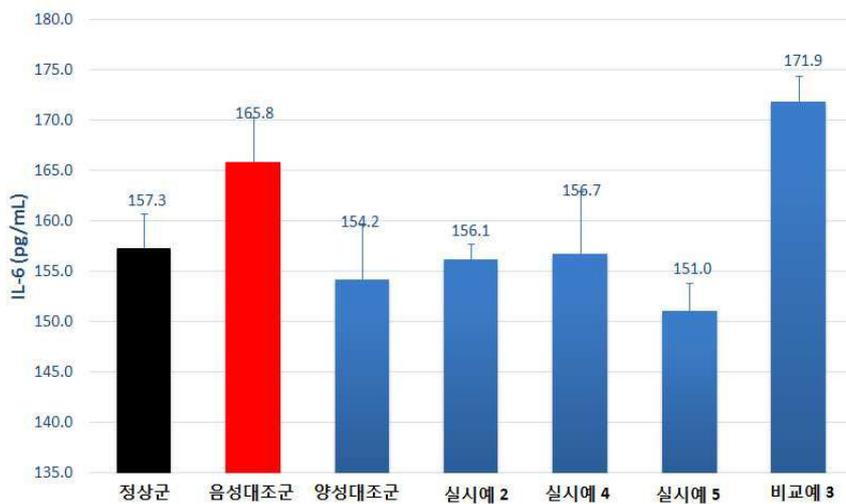
도면8



도면9



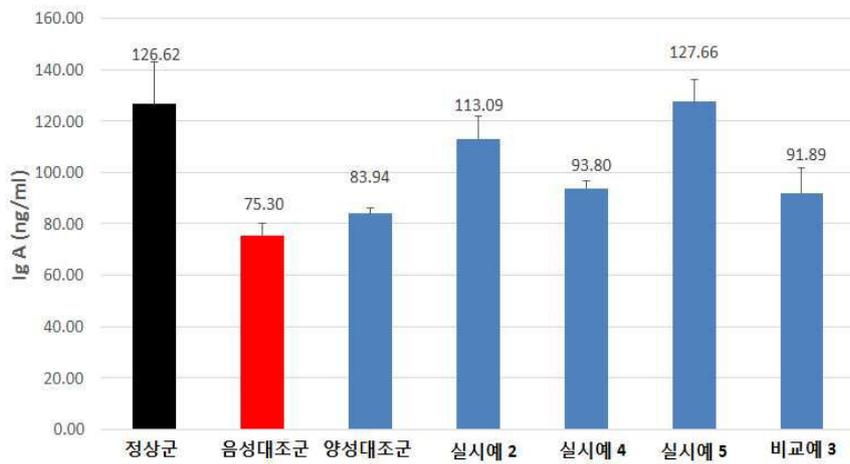
도면10



도면11

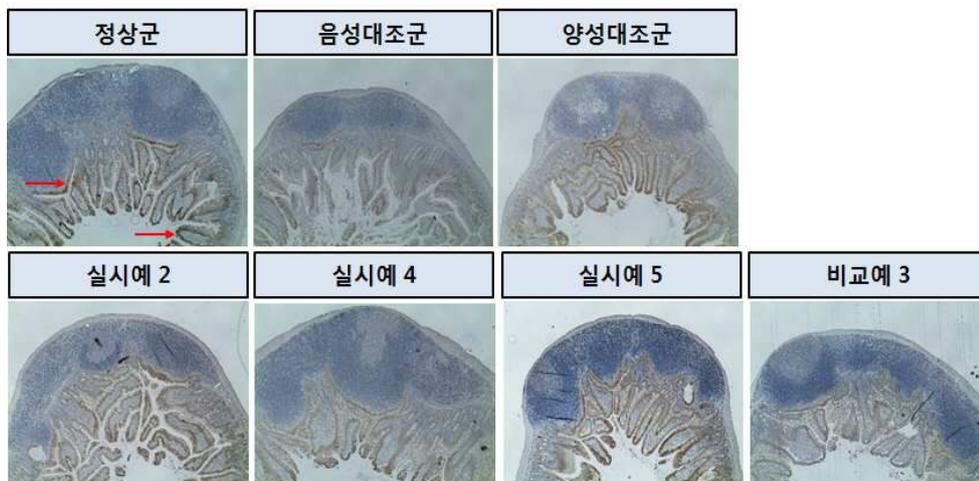


도면12



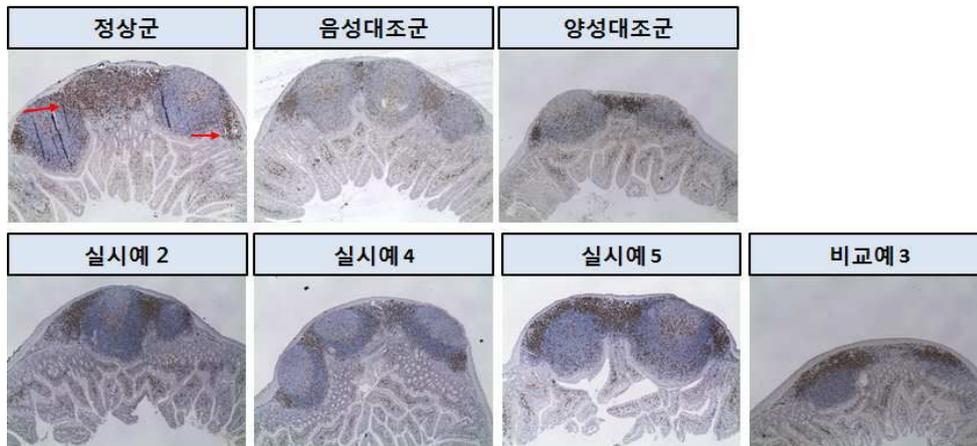
도면13

M 세포 (CK8 염색)



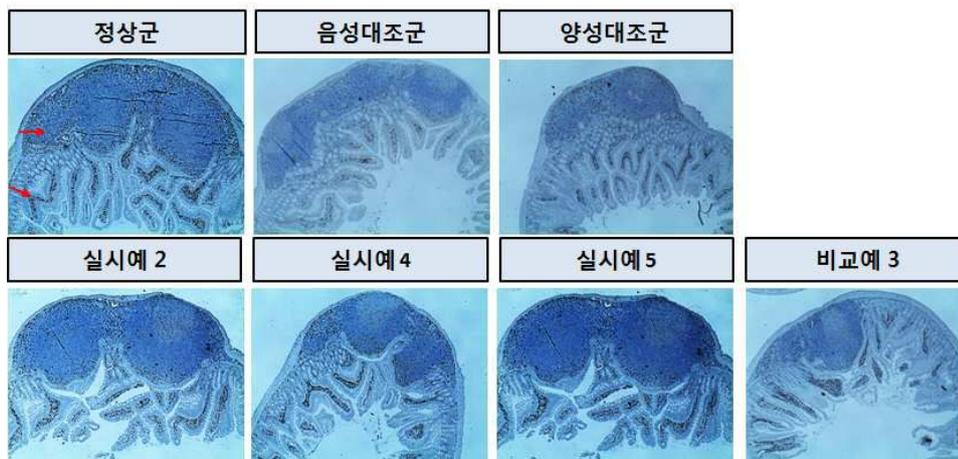
도면14

T 세포 (CD3 염색)



도면15

T 세포 (CD68 염색)



도면16

B 세포 (CD79a 염색)

