



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년02월07일  
(11) 등록번호 10-2763713  
(24) 등록일자 2025년02월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 11/14 (2020.01) A23L 29/269 (2016.01)  
C12N 1/20 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
C12N 11/14 (2013.01)  
A23L 29/269 (2016.08)  
(21) 출원번호 10-2021-0157358  
(22) 출원일자 2021년11월16일  
심사청구일자 2021년11월16일  
(65) 공개번호 10-2023-0071305  
(43) 공개일자 2023년05월23일  
(56) 선행기술조사문헌  
KR1020210107435 A  
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자  
주식회사 에치와이  
서울특별시 서초구 강남대로 577 (잠원동)  
(72) 발명자  
정승희  
인천광역시 연수구 송도국제대로 261  
김용태  
경기도 화성시 병점1로 65 103동 606호  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
박혁

전체 청구항 수 : 총 7 항

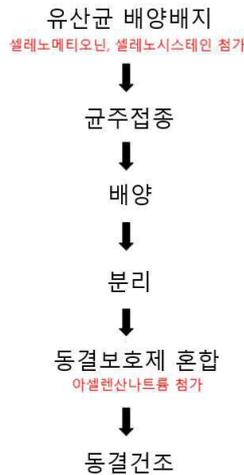
심사관 : 최성호

(54) 발명의 명칭 셀레늄을 이용한 유산균 코팅 공법

(57) 요약

본 발명은 a) 배양 배지에 셀레늄을 첨가하는 단계; b) 셀레늄을 첨가한 배지에 유산균을 접종하는 단계; c) 유산균을 접종한 후, 배양하고 유산균을 분리하는 단계; d) 분리한 유산균에 셀레늄 및 동결보호제를 혼합하는 단계; 및 e) 셀레늄 및 동결보호제와 혼합한 유산균을 동결건조하는 단계;를 포함하는 유산균 코팅 방법 및 상기 방법으로 제조된 유산균 분말에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

**C12N 1/20** (2021.05)

(72) 발명자

**방소정**

경기도 화성시 동탄대로시범길 236 931동 301호

**허건**

경기도 수원시 영통구 센트럴타운로 85

**심재중**

경기도 용인시 수지구 신봉2로 26 신봉자이 1차  
114동 1002호

**이정열**

서울특별시 서초구 반포대로 310-6 105동 2904호

(56) 선행기술조사문헌

KR1020150056107 A

KR1020130067682 A

KR102084350 B1

CN112391318 A

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

- a) 배양 배지에 셀레늄을 첨가하는 단계;
- b) 셀레늄을 첨가한 배지에 유산균을 접종하는 단계;
- c) 유산균을 접종한 후, 배양하고 유산균을 분리하는 단계;
- d) 분리한 유산균에 셀레늄 및 동결보호제를 혼합하는 단계; 및
- e) 셀레늄 및 동결보호제와 혼합한 유산균을 동결건조하는 단계;를 포함하는 유산균 생존율 및 장 부착율을 증가시키는 유산균 코팅방법.

#### 청구항 2

제 1항에 있어서,  
상기 a) 단계의 셀레늄은 유기형태의 셀레늄인 것인,  
유산균 코팅방법.

#### 청구항 3

제 1항에 있어서,  
상기 b) 단계의 균주는 락토바실러스 (Lactobacillus) 속, 비피도박테리움 (Bifidobacterium) 속, 스트렙토코커스 (Streptococcus) 속 균주인 것인,  
유산균 코팅방법.

#### 청구항 4

제 1항에 있어서,  
상기 d) 단계의 셀레늄은 무기형태의 셀레늄인 것인,  
유산균 코팅방법.

#### 청구항 5

제 1항의 코팅방법에 의해 코팅된 유산균 분말.

#### 청구항 6

제 5항의 유산균 분말을 포함하는 식품 조성물.

#### 청구항 7

제 5항의 유산균 분말을 포함하는 건강기능식품 조성물.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 셀레늄을 이용한 유산균 코팅 공법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 프로바이오틱스(Probiotics)는 "장내 균총을 개선시켜 줌으로써 숙주동물에게 유익한 영향을 주는 생균제제"라 Fuller가 1989년 정의한 것으로 시작으로 2001년에 발표된 "충분한 양을 섭취하였을 때 숙주의 건강에 도움이 되는 살아있는 미생물"이라는 FAO/WHO 정의가 널리 사용되고 있다. 이에 더하여 1999년 Salminen 등은 "숙주에 유익한 작용을 갖는 미생물 제제 또는 미생물의 성분"으로 정의하여 생균에서 사균으로까지 프로바이오틱스의 범위를 확대시켰다. 이러한 프로바이오틱스를 포함한 인간의 장내 미생물이 인간의 건강에 중요한 영향을 미친다는 연구결과 및 과학성 자료가 증가함에 따라 프로바이오틱스에 대한 소비자들의 인식이 더욱 확대되었으며 그에 따라 프로바이오틱스 제품의 수요가 점차 증가하고 있다. 현재 식약처에서 등재한 유산균은 *Lactobacillus* 11종(*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. gasseri*, *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. fermentum*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. salivarius*)과 *Lactococcus* 1종(*Lc. lactis*), *Enterococcus* 2종(*E. faecium*, *E. faecalis*), *Streptococcus* 1종(*S. thermophilus*), *Bifidobacterium* 4종(*B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum*, *B. animalis* subsp. *lactis*)까지 19종의 균에 대해 프로바이오틱스로 고시하였고 많은 기업체들이 프로바이오틱스에 연구 및 제품을 판매하고 있다.

[0003] 대표적인 프로바이오틱스의 기능인 유해균 억제, 유산균 증식, 배변활동에 원활하게 도움을 주는 것 이외에도 수많은 연구와 임상결과에 따르면 정장작용, 과민성장증후군, 아토피, 변비, 여성 질환 등 다양한 질환에서 효과를 나타내고 있다. 하지만 이러한 프로바이오틱스도 균 자체가 단백질로 구성되어 있기 때문에 체내로 투입 시 위산 및 담즙산에 의해 세포막이 손상이 되면서 프로바이오틱스의 본래의 기능성을 나타내지 못하고 있다.

[0004] 따라서 이러한 문제점을 극복하기 위해 유산균의 생존율, 저장 안정성, 장내 정착성, 내산성 및 내담즙성이 향상된 프로바이오틱스를 제조할 수 있는 방법이 요구되는 실정이다.

**선행기술문헌**

**특허문헌**

[0005] (특허문헌 0001) 대한민국 등록공보 제 10-1764412호(2017.07.27)

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0006] 일 양상은 a) 배양 배지에 셀레늄을 첨가하는 단계; b) 셀레늄을 첨가한 배지에 유산균를 접종하는 단계; c) 유산균을 접종한 후, 배양하고 유산균을 분리하는 단계; d) 분리한 유산균에 셀레늄 및 동결보호제를 혼합하는 단계; 및 e) 셀레늄 및 동결보호제와 혼합한 유산균을 동결건조하는 단계;를 포함하는 유산균 코팅방법을 제공하는 것이다.

[0007] 다른 양상은 상기 유산균 코팅방법에 의해 코팅된 유산균 분말을 제공하는 것이다.

[0008] 또 다른 양상은 상기 방법에 의해 코팅된 유산균 분말을 포함하는 식품조성물을 제공하는 것이다.

**과제의 해결 수단**

[0009] 일 양상은 a) 배양 배지에 셀레늄을 첨가하는 단계; b) 셀레늄을 첨가한 배지에 유산균를 접종하는 단계; c) 유산균을 접종한 후, 배양하고 유산균을 분리하는 단계; d) 분리한 유산균에 셀레늄 및 동결보호제를 혼합하는 단계; 및 e) 셀레늄 및 동결보호제와 혼합한 유산균을 동결건조하는 단계;를 포함하는 유산균 코팅방법을 제공하는 것이다.

- [0010] 상기 배양 배지는 접종하는 유산균에 따라 해당하는 유산균의 식용배지일 수 있으며, 이는 통상의 기술자가 제조하는 것일 수 있고, 시중에 판매하는 것일 수 있다.
- [0011] 상기 셀레늄은 체내의 여러 가지 작용에 필수적인 미량 무기질이며 황산화 물질을 의미하는 것일 수 있다.
- [0012] 일 구체예에 따르면, 상기 a) 배양 배지에 셀레늄을 첨가하는 단계의 셀레늄은 유기형태의 셀레늄일 수 있다. 예를 들면, 셀레노메티오닌(SeMet), 셀레노시스테인(SeCys), 셀레노시스틴(SeCys2), Se-메틸셀레노메티오닌(MeSeMet), Se-알릴셀레노시스테인(Al1SeCys), Se-프로필셀레노시스테인(PrSeCys) 등 일 수 있다.
- [0013] 상기 유기형태의 셀레늄은 0.0001 mg/L 내지 100 mg/L를 첨가하는 것일 수 있다. 예를 들면, 셀레노메티오닌은 0.1 mg/L 내지 10 mg/L를 첨가하는 것일 수 있으며, 상기 셀레노시스테인은 0.1 ug/L 내지 100 ug/L를 첨가하는 것일 수 있다.
- [0014] 일 구체예에 따르면, 상기 b) 셀레늄을 첨가한 배지에 유산균을 접종하는 단계의 유산균은 락토바실러스(*Lactobacillus*) 속, 비피도박테리움(*Bifidobacterium*) 속, 스트렙토코커스(*Streptococcus*) 속 균주인 것일 수 있다. 예를 들면, 락토바실러스 아시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*), 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*), 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*), 락토바실러스 불가리쿠스(*Lactobacillus bulgaricus*), 락토바실러스 헬베티쿠스(*Lactobacillus helveticus*), 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*), 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*), 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*), 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*), 스트렙토코커스 써모필러스(*Streptococcus thermophilus*), 비피도박테리움 비피둠(*Bifidobacterium bifidum*), 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*), 비피도박테리움 애니멀리스(*Bifidobacterium animalis*) 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0015] 상기 c) 유산균을 접종한 후, 배양하고 유산균을 분리하는 단계의 유산균을 분리하는 배양액을 원심분리하여 유산균만 획득하는 것일 수 있으며, 예를 들면 배양액을 7000rpm 내지 9000rpm으로 10분 내지 20분 원심분리하여 유산균체를 얻는 것일 수 있다.
- [0016] 일 구체예에 따르면, 상기 d) 분리한 유산균에 셀레늄 및 동결보호제를 혼합하는 단계의 셀레늄은 무기형태의 셀레늄일 수 있다. 예를 들면, 아셀렌산나트륨(Na2SeO3) 또는 셀렌산나트륨(Na2SeO4) 등 일 수 있다. 상기 무기형태의 셀레늄은 0.1 ug/L 내지 100 ug/L 이 첨가되는 것일 수 있으며, 예를 들면 아셀렌산나트륨을 10 ug/L 첨가되는 것일 수 있다.
- [0017] 상기 e) 셀레늄 및 동결보호제와 혼합한 유산균을 동결건조하는 단계에서 동결보호제는 동결건조로 인해, 유산균이 손상 또는 사멸하는 것을 방지하는 역할을 한다. 예를 들면, 다당류, 단백질류, 이당류, 또는 단당류 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0018] 상기 동결보호제와 함께 프리바이오틱스를 임의로 추가 첨가할 수 있다. 상기 프리바이오틱스는 유산균의 먹이가 되는 역할을 하는 것으로, 예를 들면 프락토올리고당, 갈락토올리고당, 말티톨, 락티놀 및 이누린 중 하나일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0019] 일 실시예에 따르면 상기 코팅 방법을 통해 코팅된 균주는 동결건조 후 생존율, 가속 시험 생존율, 소화관 생존율, 및 장세포 부착율이 무처리한 균주 대비 현저히 증가하는 것을 확인하였다.
- [0020] 상기 e) 동결건조 단계는 -50℃ 내지 -30℃에서 24시간 내지 96시간을 동결 및 건조하는 단계일 수 있다.
- [0021] 다른 양상은 a) 배양 배지에 셀레늄을 첨가하는 단계; b) 셀레늄을 첨가한 배지에 유산균을 접종하는 단계; c) 유산균을 접종한 후, 배양하고 유산균을 분리하는 단계; d) 분리한 유산균에 셀레늄 및 동결보호제를 혼합하는 단계; 및 e) 셀레늄 및 동결보호제와 혼합한 유산균을 동결건조하는 단계;를 포함하는 유산균 코팅방법에 의해 코팅된 유산균 분말을 제공하는 것이다.
- [0022] 상기 배양 배지, 셀레늄, 균주, 분리, 동결보호제, 동결건조 및 유산균 코팅방법에 관한 내용은 상기 기재되어 있는 것과 동일하다.
- [0023] 또 다른 양상은 a) 배양 배지에 셀레늄을 첨가하는 단계; b) 셀레늄을 첨가한 배지에 유산균을 접종하는 단계; c) 유산균을 접종한 후, 배양하고 유산균을 분리하는 단계; d) 분리한 유산균에 셀레늄 및 동결보호제를 혼합하는 단계; 및 e) 셀레늄 및 동결보호제와 혼합한 유산균을 동결건조하는 단계;를 포함하는 유산균 코팅방법에 의

해 코팅된 유산균 분말을 포함하는 식품 조성물을 제공하는 것이다.

- [0024] 상기 배양 배지, 셀레늄, 균주, 분리, 동결보호제, 동결건조 및 유산균 코팅방법에 관한 내용은 상기 기재되어 있는 것과 동일하다.
- [0025] 본 발명의 조성물이 식품 조성물로 제조되는 경우, 유효성분으로써 상기 방법에 의해 코팅된 유산균 분말 외에, 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함할 수 있다. 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어, 말토오스, 수크로오스, 올리고당 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어, 텍스트린, 사이클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜일 수 있다. 향미제로서 천연 향미제[타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어, 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)] 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다.
- [0026] 예를 들어, 본 발명의 식품 조성물이 드링크제로 제조되는 경우에는 본 발명의 코팅된 유산균 분말 외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 두층 추출액, 대추 추출액 및/또는 감초 추출액 등이 추가로 포함될 수 있다.
- [0027] 또한, 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다.
- [0028] 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있으며, 이러한 첨가제의 비율은 본 발명의 식품 조성물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0029] 일 구체예에 따르면 상기 식품 조성물은 건강기능식품, 기능성 음료, 발효유일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0030] 다른 양상은 a) 배양 배지에 셀레늄을 첨가하는 단계; b) 셀레늄을 첨가한 배지에 유산균을 접종하는 단계; c) 유산균을 접종한 후, 배양하고 유산균을 분리하는 단계; d) 분리한 유산균에 셀레늄 및 동결보호제를 혼합하는 단계; 및 e) 셀레늄 및 동결보호제와 혼합한 유산균을 동결건조하는 단계;를 포함하는 유산균 코팅방법에 의해 코팅된 유산균 분말을 포함하는 건강기능 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0031] 상기 건강기능식품은 식품첨가물을 추가로 포함할 수 있으며, "식품첨가물"로서의 적합여부는 다른 규정이 없는 한 식품의약품안전청에 승인된 식품첨가물공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.
- [0032] 상기 "식품첨가물공전"에 기재된 품목으로 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산 칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성품, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고령색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨제제, 먼류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합 제제류 등을 들 수 있다.
- [0033] 이때, 건강기능식품을 제조하는 과정에서 음료를 포함한 식품에 첨가되는 본 발명에 따른 유산균 분말은 필요에 따라 그 함량을 적절히 가감할 수 있으며, 바람직하게는 식품 100 중량%에 1 내지 15 중량% 포함되도록 첨가하는 것이 바람직하다.

**발명의 효과**

- [0034] 본 발명의 유산균 코팅 방법을 이용하여 유산균을 코팅하면 동결건조 과정 중 생존율, 가속 조건의 생존율, 소화관 생존율, 및 장 부착율이 증가한다. 이는 유산균 자체의 동결건조 안정성, 저장안정성 등 외부 환경 스트레스에 대한 안정성을 증가시킬 뿐만 아니라 유산균 섭취시 장관 환경 안정성의 지표인 내산성, 내담즙성을 현저히 향상시키며 또한 장내 부착력을 증가시킬 수 있어, 장관에서 유산균 고유의 기능성을 발휘할 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0035] 도 1은 셀레늄을 이용하여 유산균을 제조하는 방법을 도식화한 것이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0036] 이하 하나 이상의 구체예를 실시예를 통해 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0038] **실험예 1. 동결건조 후 생존율 및 가속조건 생존율 측정**

[0039] 유산균의 동결건조 후 생존율은 동결건조 전 생균 수에서 동결건조 후 생균 수를 나눈 값의 백분율을 생존율(%)로 표현하였다. 동결건조된 분말시료를 40℃, 습도 70%의 가속 조건에서 1개월 보관 후 통상적인 유산균 생균수 측정방법에 따라 생균수를 분석하였으며 동결건조 직후의 생균수와 대비하여 생존율(%)로 표현하였다.

[0041] **실험예 2. 프로바이오틱스의 소화관 생존율 확인**

[0042] **실험예 2-1. 프로바이오틱스 시료 제조**

[0043] 유산균의 동결건조 분말을 최종 농도가  $1 \times 10^9$  cfu/ml가 되도록 PBS 완충용액에 용해하였다.

[0045] **실험예 2-2. 전해질 용액의 제조**

[0046] (M. Minekus et al. Food Funct. 2014 (5): 1113-1124) 등의 논문에서 사용된 실험법을 참고하여 소화모델에 사용되는 전해질용액을 하기 표 1과 같이 제조하였다.

**표 1**

[0047]

구분	Simulated Salivary Fluid(SSF, mmol/L)	Simulated Gastric Fluid (SGF, mmol/L)	Simulated Intestinal Fluid (SIF, mmol/L)
KCl	15.1	6.9	6.8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.7	0.9	0.8
NaHCO <sub>3</sub>	13.6	25	85
NaCl	—	47.2	38.4
MgCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub>	0.15	0.1	0.33
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.06	0.5	—
CaCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub>	1.5(0.75)	0.15(0.075)	0.6(0.3)

[0049] **실험예 2-3. 소화관 생존율의 측정**

[0050] 구강 단계에서는 제조한 유산균 시료에 SSF 전해질 용액, 인체유래 타액의 α-amylase를 첨가하여 37℃에서 2분간 반응시켰다. 위 단계에서는 앞서 소화된 시료에 SGF 전해질 용액과 돼지유래 펩신을 첨가하고 pH3.0으로 조절하여 37℃에서 2시간 동안 반응시켰다. 소장단계에서는 앞서 소화된 시료에 돼지유래 판크레아틴, 담즙산을 첨가하여 pH7.0으로 조절한 뒤 37℃에서 2시간 동안 반응시켰다. 마지막 흡수 단계에서는 앞서 소화된 시료에 자연막소포(Brush Border Membrane Vesicles)를 첨가하고 pH7.0으로 조절한 뒤 37℃에서 4시간 동안 반응시켰다. 모든 소화흡수과정을 거친 후에 잔존하는 유산균수는 통상적인 유산균 생균수 측정방법에 따라 생균수를 분석하였으며 균주의 소화관 생존율은 소화흡수 전의 초기 균수와 대비하여 생존율(%)로 표현하였다.

[0052] **실험예 3. 장세포 부착율 측정**

[0053] 장세포(HT-29)를  $1.0 \times 10^4$  세포 / 웰로 6-well 플레이트에 분배하고 각 샘플을 PBS에서  $1.0 \times 10^8$  CFU / mL로 희석하여 각 웰에 접종하고 5% CO<sub>2</sub>, 37℃에서 2시간 동안 배양하였다. HT-29 세포에 유산균의 부착율을 확인하기 위하여 세포를 PBS로 3회 세척하고 0.05% 트립신-EDTA로 10분간 처리하여 세포를 분리하였다. 분리된 세포를 멸균 펩톤 수로 단계적으로 희석하고 MRS 한천 플레이트에 접종하였다. 플레이트를 37℃에서 72시간 동안 배양하여 콜로니(A1, CFU / mL)를 계수하였다. 샘플의 처리 균수를 분석하였다(A0, CFU / mL). 부착율은 다음과 같이 계산하였다.

[0054] [식 1]

[0055] % 부착율 = (A1/A0) x 100

[0057] **실시예 1. 배양단계에서 셀레늄 첨가에 따른 생존율 및 부착율 확인**

[0058] 락토바실러스 카제이 HY2782를 셀레늄으로 코팅하였다. 구체적으로, 락토바실러스 카제이를 배양에 사용되는 효

모추출물, 소이펄톤, 함수결정포도당, 제2인산칼륨, 비타민C 및 폴리소르베이트 등을 혼합하여 식용배지를 제조하고 유기형태의 셀레늄인 셀레노메티오닌, 셀레노시스테인 또는 무기형태의 셀레늄이 아셀렌산나트륨을 첨가하여 락토바실러스 카제이 HY2782 균주를 배양하였다. 균주를 8000rpm에서 15분간 원심분리 후, 유산균만 획득하였다. 그 후 동결보호제를 혼합한 후, -40℃에서 72시간동안 동결건조를 하여 유산균 분말을 제조하였다. 동결보호제는 다당류, 단백질류, 이당류, 단당류를 사용하여 유산균을 제조하였다. 제조한 유산균을 상기 실험예의 방법을 통하여 생존율 및 부착율을 확인하였다.

[0059] 그 결과, 하기 표 2에서 보이는 것과 같이, 유기형태의 셀레늄인 셀레노메티오닌, 셀레노시스테인을 첨가하여 배양한 경우 동결건조 후 생존율이 90% 이상이었으나, 무기형태의 셀레늄을 처리한 유산균의 경우 87%로 무처리한 유산균과 생존율이 비슷한 것을 확인하였다. 또한, 가속 실험 생존율 및 소화관 생존율에서도 유기형태의 셀레늄을 처리한 유산균은 가속 실험 생존율에서 70%이상, 소화관 생존율에서 50% 이상의 생존율이 확인되었으나, 무기형태의 셀레늄을 처리한 유산균은 무처리한 유산균과 생존율에서 큰 차이가 없는 것을 확인하였다. 마지막 단계인 장세포 부착율의 경우도 유기형태의 셀레늄을 첨가한 유산균은 20%이상의 부착율을 보였으나, 무기형태의 셀레늄을 첨가한 유산균은 무처리한 유산균과 유사하게 15%의 부착율을 확인하였다. 이를 통하여, 배지에 유기형태의 셀레늄을 포함하여 배양하는 것이 유산균의 생존율 및 장세포 부착율을 현저히 증가시킨다는 것을 확인하였다.

표 2

[0060]

시험 균주명	동결건조 후 생존율 (%)	가속 시험 생존율 (%) (40℃, 습도 70%)	소화관생존율 (%)	장세포 부착율 (%)
무처리	86	61	46	15.8
셀레노메티오닌	95	79	58	22.1
셀레노시스테인	92	72	57	20.4
아셀렌산나트륨	87	60	47	15.5

[0062] 실시예 2. 동결보호제 혼합단계에서 셀레늄 첨가에 따른 생존율 및 부착율 확인

[0063] 락토바실러스 카제이 HY2782 배지에 유기형태의 셀레늄을 첨가하여 락토바실러스 카제이 HY2782를 배양하였으며, 배양한 락토바실러스 카제이 HY2782를 분리하여 동결보호제와 혼합하는 단계에서 유기형태의 셀레늄인 셀레노메티오닌 또는 셀레노시스테인을 첨가하거나, 무기형태의 셀레늄인 아셀렌산나트륨을 첨가하였고, 그 외 다른 조건은 실시예 1의 유산균 제조방법과 동일하게 락토바실러스 카제이 HY2782를 코팅하여 제조하였다. 제조한 유산균을 상기 실험예의 방법을 통하여 생존율 및 부착율을 확인하였다.

[0064] 그 결과 하기 표 3과 같은 결과를 확인하였다. 동결보호제 혼합단계에서 셀레늄을 첨가한 유산균의 경우, 무기형태의 셀레늄인 아셀렌산나트륨을 첨가한 경우가 유기형태의 셀레늄을 첨가한 경우보다 현저히 생존율 및 부착율이 증가하는 것을 확인하였다.

표 3

[0065]

	동결건조 후 생존율 (%)	가속 시험 생존율 (%) (40℃, 습도 70%)	소화관생존율 (%)	장세포 부착율 (%)
무처리	87	60	46	15.2
셀레노메티오닌	86	61	47	15.4
셀레노시스테인	88	63	44	15.1
아셀렌산나트륨	92	68	52	18.4

[0067] 실시예 3. 셀레늄을 이용한 다양한 유산균 제조

[0068] 상기 실시예 1 내지 2의 결과를 통하여 균주 배양단계 및 동결건조 혼합 단계에서 셀레늄을 첨가하는 것이 유산균의 생존율 및 장 부착능을 향상시킨다는 것을 확인하였다. 따라서 락토바실러스 카제이 HY2782 균주 외 다른 균주에도 같은 효과가 나타나는지 확인하기 위하여, 하기 표 4와 같은 균주들로 유산균을 제조하였다. 구체적으로 도 1과 같은 단계를 거쳐 제조하였으며, 유산균 배양배지에 첨가하는 셀레늄은 셀레노메티오닌 10 mg/L과 셀

레노시스테인 100 ug/L을 첨가하였으며, 동결보호제에 혼합하는 아셀렌나트륨은 10 ug/L를 첨가하였다.

표 4

No.	Species
1	<i>L. acidophilus</i> HY7036
2	<i>L. casei</i> HY2782
3	<i>L. gasseri</i> HY7023
4	<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> HY7901
5	<i>L. helveticus</i> HY7801
6	<i>L. fermentum</i> HY7301
7	<i>L. paracasei</i> HP7
8	<i>L. plantarum</i> HY7715
9	<i>L. reuteri</i> HY7501
10	<i>L. rhamnosus</i> HY1213
11	<i>S. thermophilus</i> HY9012
12	<i>B. bifidum</i> HY8308
13	<i>B. breve</i> HY8201
14	<i>B. longum</i> HY8001
15	<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> HY8002

[0069]

[0071]

그 결과, 하기 표 5 및 표 6에서 보이는 바와 같이, 배양 단계 및 동결보호제 혼합 단계에서 셀레늄을 적용한 균주는 셀레늄을 적용하지 않은 균주보다 동결건조 후 생존율, 가속 시험 생존율, 소화관 생존율, 및 장 부착율이 현저하다는 것을 확인하였다.

표 5

시험 균주명	무처리		셀레늄	
	동결건조 후 생존율 (%)	가속 시험 생존율 (%)	동결건조 후 생존율 (%)	가속 시험 생존율 (%)
<i>L. acidophilus</i> HY7036	88	61	92	72
<i>L. casei</i> HY2782	89	65	94	81
<i>L. gasseri</i> HY7023	89	67	91	73
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> HY7901	87	60	93	79
<i>L. helveticus</i> HY7801	80	62	89	83
<i>L. fermentum</i> HY7301	86	66	91	73
<i>L. paracasei</i> HP7	87	60	94	70
<i>L. plantarum</i> HY7715	80	60	91	79
<i>L. reuteri</i> HY7501	90	57	93	74
<i>L. rhamnosus</i> HY1213	81	60	88	79
<i>S. thermophilus</i> HY9012	78	54	89	76
<i>B. bifidum</i> HY8308	88	60	92	84
<i>B. breve</i> HY8201	80	65	85	76
<i>B. longum</i> HY8001	78	59	90	83
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> HY8002	83	68	91	85

[0072]

표 6

시험 균주명	무처리		셀레늄	
	소화관 생존율 (%)	장 부착율 (%)	소화관 생존율 (%)	장 부착율 (%)
<i>L. acidophilus</i> HY7036	54	6	59	9
<i>L. casei</i> HY2782	50	16	60	22
<i>L. gasseri</i> HY7023	48	9	61	13
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> HY7901	45	10	58	15

[0074]

<i>L. helveticus</i> HY7801	38	8	53	10
<i>L. fermentum</i> HY7301	40	5	56	9
<i>L. paracasei</i> HP7	37	18	48	26
<i>L. plantarum</i> HY7715	50	21	63	31
<i>L. reuteri</i> HY7501	44	5	58	7
<i>L. rhamnosus</i> HY1213	43	11	60	13
<i>S. thermophilus</i> HY9012	26	7	39	9
<i>B. bifidum</i> HY8308	38	6	55	11
<i>B. breve</i> HY8201	34	9	49	15
<i>B. longum</i> HY8001	20	12	33	17
<i>B. animalis ssp. lactis</i> HY8002	48	26	62	34

도면

도면1

