



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0106135
(43) 공개일자 2012년09월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23C 9/16 (2006.01) A23C 3/02 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0024030
(22) 출원일자 2011년03월17일
심사청구일자 2011년03월17일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
최문정
서울특별시 노원구 노원로 62, 공릉 310동 1502
호 (공릉동, 효성 화운트빌)
이민석
경기도 성남시 분당구 내정로 152, 롯데아파트
133동 701호 (수내동, 파크타운)
(74) 대리인
한양특허법인

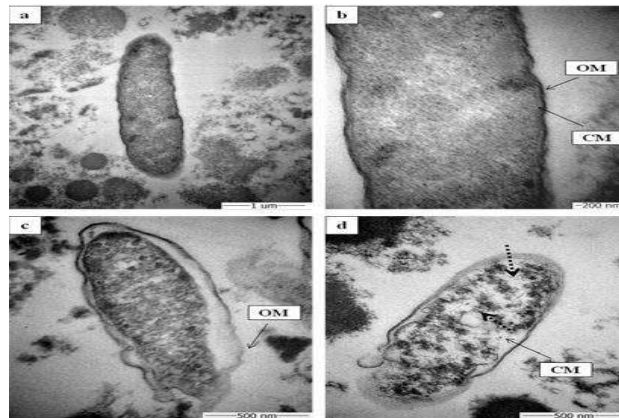
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 천연 항미생물제를 이용한 조제분유 제조방법

(57) 요약

본 발명은 카프릴산-구연산의 조합 또는 카프릴산-바닐린의 조합을 첨가하여 수유적정온도에서 분유 중 유해 미생물을 살균하는 단계를 포함하는 조제분유의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따라 제조된 조제분유는 단시간에 최소농도에서 분유 중 유해 미생물의 효과적인 살균효과를 확인할 수 있다. 또한, 본 발명에 따라 제조된 조제분유는 비교적 낮은 온도에서 살균공정을 수행하여 분유에 함유된 영양소의 파괴를 최소화 할 수 있으며, 70℃ 이상의 고온으로 가열된 물을 이용하지 않을 수 있어 제조비용을 효과적으로 절감할 수 있다.

대표도 - 도4a



특허청구의 범위

청구항 1

카프틸산; 구연산 또는 바닐린을 함유한 조제분유를 40℃ 초과 45℃ 미만에서 처리함으로써 분유 중 유해 미생물을 살균하는 단계를 포함하는 조제분유의 제조방법

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 카프틸산은 구연산 또는 바닐린과 조합으로 함유되는 것을 특징으로 하는 조제분유의 제조방법.

청구항 3

청구항 2에 있어서, 상기 카프틸산-구연산 조합은 액상분유 10 ml 당 카프틸산 10 mM 초과 20 mM 이하와 구연산 15 mM 초과 30 mM 이하의 조합이고, 상기 카프틸산-바닐린 조합은 액상분유 10 ml 당 카프틸산 10 mM 초과 20 mM 이하와 바닐린 15 mM 초과 30 mM 이하의 조합인 것을 특징으로 하는 조제분유의 제조방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 살균단계는 5 ~ 30분 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 조제분유의 제조방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 유해 미생물은 식중독균, 장내세균, 대장균, 바이러스 및 곰팡이 중 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 조제분유의 제조방법.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 식중독균은 크로노박터 속, 살모넬라 속 및 바실러스 속 중 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 조제분유의 제조방법.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 유해 미생물은 크로노박터 사카자키와 살모넬라 타이피무리움인 것을 특징으로 하는 조제분유의 제조방법.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 살균단계는 미생물의 세포막을 파괴하는 것을 특징으로 하는 조제분유의 제조방법.

청구항 9

청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 하나의 항의 방법으로 제조된 조제분유.

명세서

기술분야

본 발명은 낮은 온도에서 살균력이 우수한 조제분유의 제조방법에 관한 것이다.

보다 상세하게, 본 발명은 카프틸산, 구연산, 바닐린을 이용하여 분유 중 유해 미생물을 살균하는 단계를 포함하는 조제분유의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

양질의 식품을 위한 가공기술은 발전하고 있으며, 특히 부패미생물이나 병원성 미생물을 제어함으로써 식품의 안전성을 확보하기 위한 물리적, 화학적, 생물학적으로 다양한 첨단 살균방법이 개발되고 있다. 최근 인공화합물 및 합성첨가물에 대한 소비자의 부정적 인식은 천연재료에서 분리되는 천연첨가물에 대한 관심 증대로

연결되었고 이에 따라 천연유래 물질을 이용한 친환경 살균처리법이 각광받고 있다.

[0004] 특히 면역기능이 발달하지 않은 신생아 및 영유아에게 제공되는 식품의 안전성은 무엇보다 중요하게 여겨지고 있다. 그러나 최근 국내에서 제조된 분유에서 크로노박터 속(이전 명: 엔테로박터 사카자키) 등의 식중독균이 검출된 사례가 보고되어 영유아 식품의 미생물학적 안전성은 위협을 받고 있는 실정이다. 주로 분유의 부적절한 취급에 의해 기하급수적으로 식중독균의 수가 증가되며, 신생아가 감염되었을 경우 수막염, 패혈증, 괴사성 장염 등의 질병을 일으킨다.

[0005] 이러한 문제를 해결하기 위해 FAO/WHO(Food and Agriculture Organization-World Health Organization)에서는 식중독균 및 부패미생물이 불활성화되거나 사멸할 수 있는 70℃ 이상의 물로 분유를 조제할 것을 권장하고 있다. 그러나 이에 많은 시간과 에너지가 소비될 뿐 만 아니라, 풍부한 영양소가 들어있는 분유의 양질의 영양소를 파괴할 수 있으므로 이를 해결할 수 있는 기술이 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 낮은 온도에서 살균력이 우수한 조제분유의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 분유를 조제함에 있어서 시간과 에너지 소모를 감소시킬 수 있는 조제분유의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0008] 보다 구체적으로 현재 분말분유를 액상화하는 단계에서 요구되는 고온수를 준비하거나, 분유를 수유가능한 온도로 냉각시키는 별도의 시간적, 에너지적 소모를 하지 않아도 되는 조제분유의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 고열처리 및 별도의 품질저해 처리가 가해지지 않음으로써 영양성분이 매우 풍부한 분유의 특성을 유지할 수 있는 효율적인 조제분유의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 카프릴산-구연산의 조합 또는 카프릴산-바닐린의 조합을 첨가하여 수유적정온도인 40 ~ 45℃에서 분유 중 유해 미생물을 살균하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 조제분유의 제조방법을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 조제분유의 제조방법에 따라 제조된 분유를 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명에 따라 제조된 조제분유는 비교적 단시간에 최소농도에서 유해 미생물의 효과적인 살균효과를 확인할 수 있다. 또한, 본 발명에 따라 제조된 조제분유는 비교적 낮은 온도에서 살균공정을 수행하여 분유에 함유된 영양소의 파괴를 최소화 할 수 있으며, 70℃ 이상의 고온으로 가열된 물을 이용하지 않을 수 있어 제조비용을 효과적으로 절감할 수 있다.

[0013] 또한, 가정에서는 미온수를 이용하여 분유조제가 가능하므로 고온에서 별도의 냉각과정을 거치지 않고 단시간 내에 제공을 할 수 있어 시간적 효율성을 가지며 소비자에게 편리한 방법이 될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 40℃에서 크로노박터 사카자키(A)와 살모넬라 타이피무리움(B)의 항균효과와 45℃에서 크로노박터 사카자키(C)와 살모넬라 타이피무리움(D)의 항균효과를 나타낸 것이다.

도 2a 내지 도 2h는 분유에서 카프릴산, 구연산, 바닐린의 조합처리에 의한 살균효과를 나타낸 것으로, 40℃에서 카프릴산-구연산 조합에 의한 크로노박터 사카자키(도 2a)와 살모넬라 타이피무리움(도 2b) 살균, 카프릴산-바닐린 조합에 의한 크로노박터 사카자키(도 2c)와 살모넬라 타이피무리움(도 2d) 살균, 45℃에서 카프릴산-구연산 조합에 의한 크로노박터 사카자키(도 2e)와 살모넬라 타이피무리움(도 2f) 살균, 카프릴산-바닐린 조합에 의한 크로노박터 사카자키(도 2g)와 살모넬라 타이피무리움(도 2h) 살균효과의 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 카프릴산 10 mM-구연산 30 mM 조합(A, B)과 카프릴산 10 mM-바닐린 30 mM 조합(C, D)의 유세포분석 결과이다. 형광염색약인 SYTO9과 PI의 dual staining으로 R2는 손상되지 않은 온전한 세포, R1은 손상된 세포들

이 차지하는 밀도를 나타낸다.

도 4a 및 도 4b는 카프릴산-구연산 조합, 카프릴산-바닐린 조합처리에 의한 크로노박터 사카자키(4a)와 살모넬라 타이피무리움(4b)의 세포형태 변화를 주사전자현미경(transmission electron microscopy)으로 관찰한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 이하에서 본 발명을 보다 상세히 설명한다.
- [0016] 본 발명은 카프릴산, 구연산, 바닐린을 이용하여 수유적정온도에서 분유 중 유해 미생물을 살균하는 단계를 포함하는 조제분유의 제조방법에 관한 것이다.
- [0017] 본 발명에서 이용된 카프릴산, 구연산은 미국 식품의약품안전청(FDA)에서 General Recognized As Safe(GRAS)로 승인한 물질이며, 바닐린의 경우 안전한 식품 첨가물로 인정받았으며 국내에서도 모두 분유에 이용이 승인된 법적으로 인정받은 천연 첨가물이다. 본 발명자들은 이들 첨가물의 조합을 분유에 첨가한 후 일정한 온도로 가열하면 매우 적은 분량으로도 살균효과를 가지는 것을 확인하였다.
- [0018] 보다 구체적으로, 본 발명은 카프릴산-구연산의 조합 또는 카프릴산-바닐린의 조합을 첨가하여 수유적정온도에서 유해 미생물을 살균하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 조제분유의 제조방법을 제공한다.
- [0019] 상기 카프릴산-구연산 조합은 액상분유 10 ml 당 카프릴산 10~20 mM과 구연산 15~30 mM의 조합이고, 상기 카프릴산-바닐린 조합은 액상분유 10 ml 당 카프릴산 10~20 mM과 바닐린 15~30 mM의 조합으로 첨가된다.
- [0020] 본 발명에서 살균되는 분유 중 유해미생물은 식중독균, 장내세균, 대장균, 바이러스 및 곰팡이 중 어느 하나로서, 바람직하게는 식중독균이다.
- [0021] 상기 식중독균의 예로 크로노박터 속, 살모넬라 속 및 바실러스 속을 들 수 있으며, 바람직하게는 분유 내 식중독균으로 가장 문제가 되는 크로노박터 사카자키와 살모넬라 타이피무리움 중 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0022] 본 발명은 상기 조합을 분유에 첨가하여 수유적정온도에서 분유 중 유해 미생물의 세포막을 파괴하는 것을 특징으로 한다.
- [0023] 상기 수유적정온도는 40 ~ 45℃의 범위 내를 의미한다. 또한, 상기 살균단계는 5 ~ 30분의 범위 내에서 수행된다.
- [0024] 본 발명의 조제 분유의 제조방법은 수유적정온도인 40 ~ 45℃에서 상기 조합을 첨가하여 비교적 단시간 내에 시간적, 에너지적 소모를 최소화하며 분유 중 크로노박터 사카자키와 살모넬라 타이피무리움의 사멸을 극대화할 수 있다.
- [0025] 또한, 본 발명은 상기 조제분유의 제조방법에 따라 제조된 분유를 제공한다.
- [0026] 이하에서 실시예를 통해 본 발명에 대하여 상세히 설명한다.
- [0027] <실시예 1> 크로노박터 사카자키와 살모넬라 타이피무리움 사멸을 위한 카프릴산, 구연산, 바닐린 처리
- [0028] 본 발명에서는 천연 향미생물제로 카프릴산 10, 20 mM과, 구연산 또는 바닐린 각각 15, 30 mM의 조합을 사용하였다.
- [0029] 각 조합은 40℃와 45℃에서 각각 5, 10, 30분 동안 처리되었다.
- [0030] (1) 사용균주
- [0031] 본 발명에서는 크로노박터 사카자키(*Cronobacter sakazakii*) 3종(ATCC 12868, ATCC 29004, ATCC 29544)과 살모넬라 타이피무리움 (*Salmonella Typhimurium*) 3종(ATCC 19585, ATCC 43174, DT 104 killer cow)을 사용하였다.

- [0032] (2) 배양조건 및 방법
- [0033] 본 발명에서는 두 균주의 활성을 최대화하고자 tryptic soy broth (TSB))에 보관균주를 접종한 후 37℃에서 24시간 동안 배양하였다. 배양액은 원심분리(3,000 g x 15분)하여 0.85% 생리식염수로 수세작업을 2회 반복하였다.
- [0034] (3) 시료준비 및 균 접종
- [0035] 본 발명에서 이용된 시료로는 시중에 유통되고 있는 영유아용 조제분유를 이용하였으며, 멸균증류수 180ml에 분말분유 25.5g을 첨가한 후 63℃에서 30분간 저온 살균하여 시료를 준비하였다. 살균 후 무균상태가 된 분유 시료는 지속적으로 교반을 해주면서 크로노박터 사카자키와 살모넬라 타이피무리움을 각각 10^7 CFU/ml이 되도록 접종하였다.
- [0036] (4) 카프릴산, 구연산, 바닐린 저장용액의 준비
- [0037] 순수한 카프릴산과 바닐린을 99% 에탄올에 각각 용해시켜 저장용액을 제조하였다. 순수한 구연산을 멸균증류수에 용해시켜 저장용액을 제조하였다. 위와 같이 제조된 저장용액은 각각 1분간 균일하게 섞어준 후 상온에서 보관하였다.
- [0038] (5) 크로노박터 사카자키와 살모넬라 타이피무리움 살균을 위한 조합처리 조건
- [0039] 크로노박터 사카자키와 살모넬라 타이피무리움이 접종된 분유 시료를 50ml 멸균튜브에 일정량 분주한 후 카프릴산의 최종농도가 10, 20 mM, 구연산 또는 바닐린의 최종농도가 15, 30 mM이 되도록 첨가하여 총 부피 10ml이 되도록 하였다. 처리된 시료는 진탕 항온수조(shaking water bath)에서 40℃와 45℃에서 5, 10, 30분간 처리하며 살균효과를 관찰하였다.
- [0040] <실시예 2> 분유에서의 카프릴산, 구연산, 바닐린의 항균 스펙트럼 관찰
- [0041] 카프릴산, 구연산, 바닐린의 항균효과를 관찰하기 위해 10, 20, 30, 40, 60, 80 mM을 각각 5, 10, 30분간 40℃와 45℃에서 처리하였다. 처리 후 균의 정량분석을 위해 처리 후 시료를 0.85% 생리식염수에 침전희석하여 tryptic soy agar (TSA)에 도말하였다. 도말한 배지는 37℃에서 24시간 동안 배양하였고 20~200개의 범위 내에서 생성된 집락 수를 계수하였다.
- [0042] 도 1에서 보는 바와 같이, 농도가 증가함에 따라 살균효과도 증가하였으며 추후 조합처리에서 사용될 카프릴산 10, 20 mM, 구연산과 바닐린 각각 15, 30 mM에서는 살균효과가 거의 없는 것으로 관찰되었다. 45℃에서는 40℃보다 살균효과가 증가하였으며 농도가 증가함에 따라 살균효과가 증가하였다. 추후 조합처리에 사용될 카프릴산 20 mM은 살모넬라 타이피무리움에서 효과가 크게 나타났으며 구연산과 바닐린은 15, 30 mM에서 살균효과가 거의 관찰되지 않았다.
- [0043] <실시예 3> 분유에서의 크로노박터 사카자키와 살모넬라 타이피무리움 살균을 위한 카프릴산과 구연산, 카프릴산과 바닐린의 조합처리 효과
- [0044] 실시예 2를 통해 물질 별 항균효과를 확인하였으며 선택된 카프릴산 10, 20 mM, 구연산과 바닐린 각 15, 30 mM을 카프릴산과 구연산, 카프릴산과 바닐린의 조합으로 각각 40℃와 45℃에서 5, 10, 30분간 각각 처리하였다. 처리 후 균의 정량분석을 위해 0.85% 생리식염수에 침전희석하여 TSA에 도말하고 37℃에서 24시간 배양한 후 계수하였다.
- [0045] 결과는 도 2a 내지 도 2h에 나타내었다. 대조군으로 이용한 멸균증류수와 1% 에탄올에서는 40, 45℃에서 오히려 균이 성장하거나 초기농도 수준을 유지하였으나 각 조합처리는 살균효과를 나타내었다. 40℃에서 카프릴산 10 mM과 구연산, 바닐린 15 mM의 조합은 각각 매우 적은 살균효과를 보인 반면 이를 제외한 모든 처리조건에서는 시너지효과를 동반하며 크로노박터 사카자키와(도 2a, 도 2c) 살모넬라 타이피무리움(도 2b, 도 2d)를

사멸하였다. 특히 카프릴산 20 mM과 구연산, 바닐린 30 mM 조합 시 크로노박터는 10분, 살모넬라 타이피무리움은 5분 이내에 불검출 되었다. 45℃ 처리시 조합 살균효과는 증가하였으며 모든 조건에서 불검출 수준에 소요되는 시간이 단축되었다.

[0046] <실시예 4> 살균효과 검증실험(validation test)

[0047] (1) 저농도 접종 분유 시료 준비

[0048] 크로노박터 사카자키와 살모넬라 타이피무리움이 분유 제조공정과 유사한 환경에 노출되도록 하기 위해 균을 각각 저농도(약 10^4 CFU/ml)로 분유에 접종하여 21℃에서 30일 간 보관하여 사용하였다.

[0049] (2) 조합처리 및 손상세포 회복실험

[0050] 실시예 3과 동일한 조합처리 조건을 이용하여 저농도(약 10^4 CFU/ml)로 분유에 접종된 크로노박터 사카자키와 살모넬라 타이피무리움의 살균효과를 관찰하였다. 처리 직후의 분유 샘플과 처리샘플을 TSB에 접종한 후 37℃에서 24시간 배양한 배양액을 각각 VRBGA배지와 XLD배지에 도말하고 배양한 후 균의 유무를 양성, 음성으로 판정하여 손상세포의 회복 여부를 관찰하였다.

[0051] (3) 조합처리 검증실험 결과

[0052] 하기 표 1에서 볼 수 있듯이 40℃ 처리시 실험에서 이용한 조건에서 손상세포의 비회복이 관찰되었다.

표 1

40℃에서의 크로노박터 사카자키와 살모넬라 타이피무리움의 손상세포 회복실험 결과

온도 (°C)	처리농도	C. sakazakii			S. Typhimurium		
		Time (분)			Time (분)		
		5	10	30	5	10	30
40	CA 10 + CIA 15	+++ ^a (+++) ^b	+++ (+++)	+++ (+++)	+++ (+++)	+++ (+++)	++ (++)
	CA 10 + CIA 30	++ (++)	++ (++)	++ (++)	++ (++)	++ (++)	++ (++)
	CA 20 + CIA 15	+++ (+++)	+++ (+++)	+++ (+++)	+++ (+++)	+++ (+++)	+++ (+++)
	CA 20 + CIA 30	+++ (+++)	+++ (+++)	+++ (+++)	+++ (+++)	+++ (+++)	+++ (+++)
	CA 10 + VNL 15	+++ (+++)	+++ (+++)	+++ (+++)	+++ (+++)	+++ (+++)	+++ (+++)
	CA 10 + VNL 30	+++ (+++)	+++ (+++)	+++ (+++)	+++ (+++)	+++ (+++)	+++ (+++)
	CA 20 + VNL 15	+++ (+++)	+++ (+++)	+++ (+++)	+++ (+++)	+++ (+++)	+++ (+++)
	CA 20 + VNL 30	+++ (+++)	+++ (+++)	+++ (+++)	+++ (+++)	+++ (+++)	+++ (+++)

^a 조합처리 직후 균의 검출결과 (3 반복)

^b 조합처리 후 TSB에 시료접종 후 37℃에서 24시간 증균한 배양액에서의 검출결과 (3반복)

[0054] 또한, 하기 표2에서 볼 수 있듯이 45℃ 처리 시 살균효과는 증대되어 실험에서 이용한 조건에서 손상세포의 비회복이 관찰되며 모든 균이 처리조건 내에 사멸하는 것으로 나타났다.

표 2

45℃에서의 크로노박터 사카자키와 살모넬라 타이피무리움의 손상세포 회복실험

결과

온도 (°C)	처리농도	<i>C. sakazakii</i>			<i>S. Typhimurium</i>		
		Time (분)			Time (분)		
		5	10	30	5	10	30
45	CA 10+CTA 15	$\begin{pmatrix} + & + & + \\ + & + & + \end{pmatrix}^b$	$\begin{pmatrix} + & + & + \\ + & + & + \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} - & + & + \\ - & + & + \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} - & - & - \\ - & - & - \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} - & - & - \\ - & - & - \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} - & - & - \\ - & - & - \end{pmatrix}$
	CA 10+CTA 30	$\begin{pmatrix} - & - & - \\ - & - & - \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} - & - & - \\ - & - & - \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} - & - & - \\ - & - & - \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} - & - & - \\ - & - & - \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} - & - & - \\ - & - & - \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} - & - & - \\ - & - & - \end{pmatrix}$
	CA 20+CTA 15	$\begin{pmatrix} - & - & - \\ - & - & - \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} - & - & - \\ - & - & - \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} - & - & - \\ - & - & - \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} - & - & - \\ - & - & - \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} - & - & - \\ - & - & - \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} - & - & - \\ - & - & - \end{pmatrix}$
	CA 20+CTA 30	$\begin{pmatrix} - & - & - \\ - & - & - \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} - & - & - \\ - & - & - \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} - & - & - \\ - & - & - \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} - & - & - \\ - & - & - \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} - & - & - \\ - & - & - \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} - & - & - \\ - & - & - \end{pmatrix}$
	CA 10+VNL 15	$\begin{pmatrix} - & + & + \\ + & + & + \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} - & - & - \\ - & - & - \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} - & - & - \\ - & - & - \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} - & - & + \\ - & - & - \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} - & - & - \\ - & - & - \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} - & - & - \\ - & - & - \end{pmatrix}$
	CA 10+VNL 30	$\begin{pmatrix} - & + & + \\ - & + & + \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} - & - & - \\ - & - & - \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} - & - & - \\ - & - & - \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} - & - & - \\ - & - & - \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} - & - & - \\ - & - & - \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} - & - & - \\ - & - & - \end{pmatrix}$
	CA 20+VNL 15	$\begin{pmatrix} - & - & - \\ - & - & - \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} - & - & - \\ - & - & - \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} - & - & - \\ - & - & - \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} - & - & - \\ - & - & - \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} - & - & - \\ - & - & - \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} - & - & - \\ - & - & - \end{pmatrix}$
	CA 20+VNL 30	$\begin{pmatrix} - & - & - \\ - & - & - \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} - & - & - \\ - & - & - \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} - & - & - \\ - & - & - \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} - & - & - \\ - & - & - \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} - & - & - \\ - & - & - \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} - & - & - \\ - & - & - \end{pmatrix}$

^a 조합처리 직후 균의 검출결과 (3 반복)

^b 조합처리 후 TSB에 시료집중 후 37℃에서 24시간 증균한 배양액에서의 검출결과 (3반복)

실험 결과 카프릴산-구연산 조합, 카프릴산-바닐린 조합을 분유의 보조제로 첨가 시 효과적인 살균작용을 일으킴을 알 수 있었다.

<실시예 5> 카프릴산과 구연산, 바닐린 조합에 의한 살균기작 확인

본 발명에서 확인한 카프릴산과 구연산, 카프릴산과 바닐린 조합에 의한 살균효과를 시각적으로 관찰하기 위해 살균기작 연구에 널리 사용되는 유세포 분석과 현미경 분석을 기반으로 살균기작을 확인하였다.

<실시예 5-1> 유세포 분석을 통한 살균기작 확인

유세포 분석은 형광을 띠는 염색시약이 세포특성에 따라 달리 염색되는 원리를 이용한 것으로 본 발명에서는 SYTO9과 PI(propidium iodide)의 염색시약을 이용하였다. SYTO9은 살아있는 온전한 세포를 염색하며 PI는 손상된 세포를 염색하는 특성을 가지며 각각 FL1 채널(> 530 ± 150 nm)와 FL3 채널(>670 nm)에서 검출된다. 실시예 3과 동일하게 시료를 준비하였으며 유세포 분석을 위해 40℃ 카프릴산 10 mM과 구연산, 바닐린 각 30 mM 조합처리를 하여 시간에 따른 변화를 관찰하였다.

도 3에서 볼 수 있듯이 2차원의 밀도그래프에서 나타나는 세포집단을 R1과 R2로 구분하였다. 형광염색약인 SYTO9과 PI의 dual staining으로 R2는 손상되지 않은 온전한 세포, R1은 세포막이 붕괴되어 손상된 세포들이 차지하는 밀도를 나타내며, 시간 경과(0~30분)에 따라 크로노박터 사카자키(A, C)와 살모넬라 타이피무리움(B, D)의 손상된 세포가 나타나는 R1의 밀도가 지속적으로 증가하는 경향을 보인다.

도 3에서 (A)는 카프릴산과 구연산을 조합처리에 대한 크로노박터 사카자키의 유세포 분석 결과로, 0분 경과 시 손상된 세포집단 밀도는 5.4%, 5분 경과시 39.7%, 10분 경과 시 63.9%, 30분 경과 시 73.5%로 R1의 비율이 증가하였다. 살모넬라 타이피무리움(B)의 카프릴산과 구연산 조합처리에 의한 손상된 세포집단 밀도는 최초 9.8%에서 49.3%, 68.4%, 70.3%로 확인되었다. 카프릴산과 바닐린 조합처리 시 크로노박터 사카자키(C)의 R1영역 밀도는 0분 9.0%, 5분 39.3%, 10분 47.2%, 30분 62.4%를 나타내었으며 살모넬라 타이피무리움(D)의 R1영역 밀도 역시 0분 4.7%, 5분 51.6%, 10분 72.2%, 30분 79.6%로 증가하는 결과가 도출 되었다.

이러한 결과는 카프릴산, 구연산, 바닐린 조합에 의해 크로노박터 사카자키와 살모넬라 타이피무리움의 세포

막이 붕괴되면서 균이 시간 경과에 따라 점진적으로 사멸된다는 것을 증명할 수 있게 하였다.

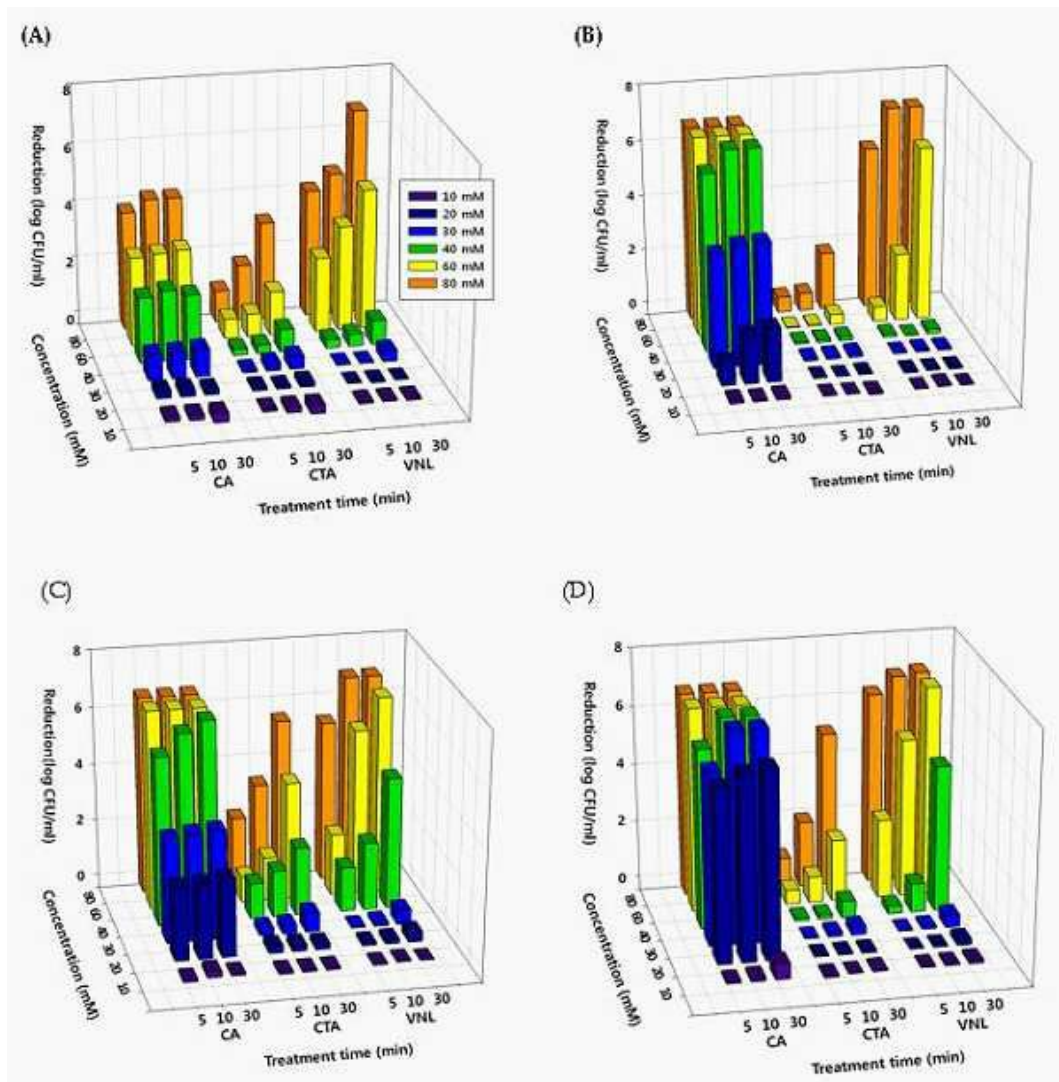
[0066] <실시예 5-2> 주사전자현미경을 통한 살균기작 확인

[0067] 주사전자현미경(transmission electron microscopy) 촬영은 세포막을 비롯하여 세포 내부의 상태를 관찰할 수 있는 방법으로 본 발명에서는 조합처리가 세포막 및 세포내부 변화에 미치는 영향을 관찰하기 위해 사용되었다. 시료는 40℃에서 처리된 카프릴산 10 mM과 구연산과 바닐린 각 30 mM이 조합처리된 분유를 사용하였다.

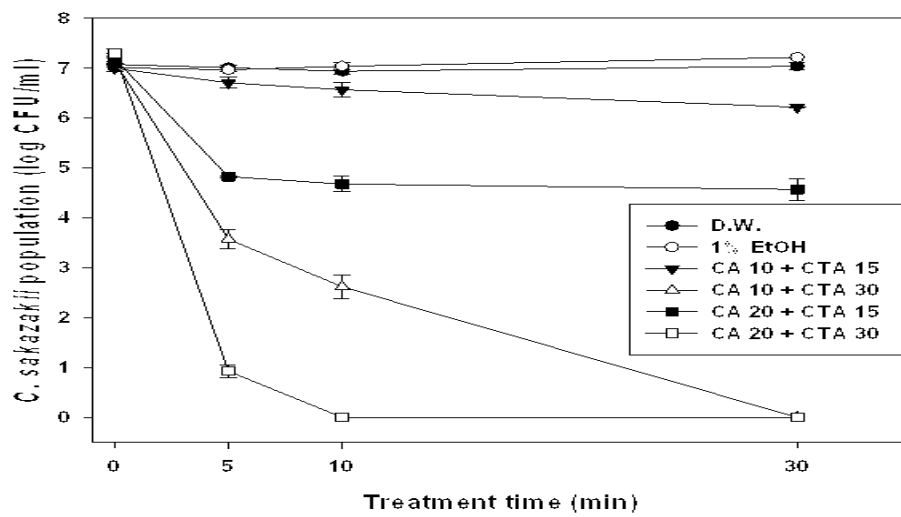
[0068] 도 4a 및 도 4b에서 나타내듯이 조합처리 전의 세포형태와 조합처리 후의 세포형태가 현저하게 차이나는 것을 볼 수 있다. 도4a는 크로노박터 사카자키에 관한 결과로, 온전한 형태의 세포(a, b)가 카프릴산과 구연산 조합처리 시(c) 세포외막이 붕괴되고 원형질 분리현상이 일어났으며, 카프릴산과 바닐린 조합처리 시(d) 세포 내부에 빈 공간이 관찰되어(점선화살표) 세포내 물질이 외부로 유출되었다는 것을 알 수 있다. 도4b는 살모넬라 타이피무리움에 관한 결과로 세포외막과 세포내막의 경계가 분명했던 손상되지 않았던 세포(a)가 카프릴산과 구연산 조합처리에 의해 세포막이 붕괴되고 세포내 물질이 손실되며(b), 카프릴산과 바닐린 조합에 의해 세포막과 세포내 형태가 손상되었다는 것을 관찰할 수 있다(c, d).

도면

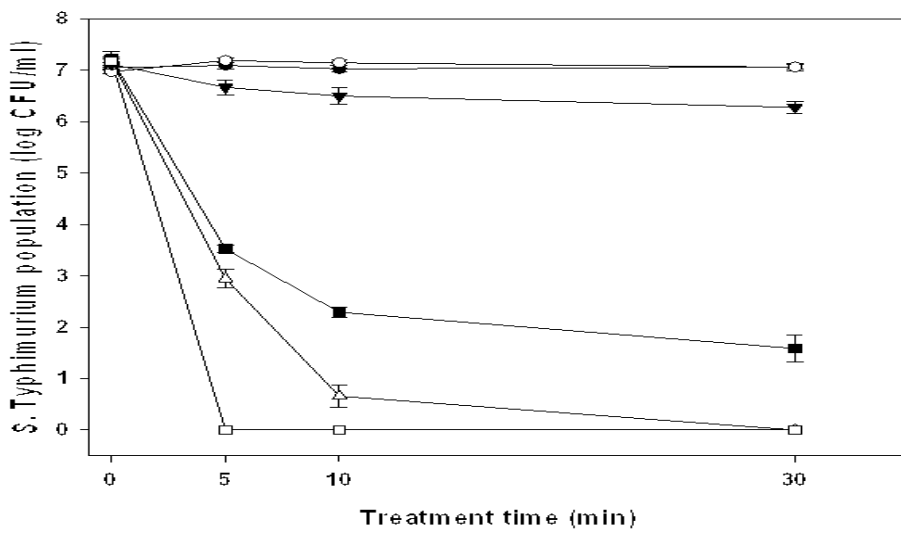
도면1



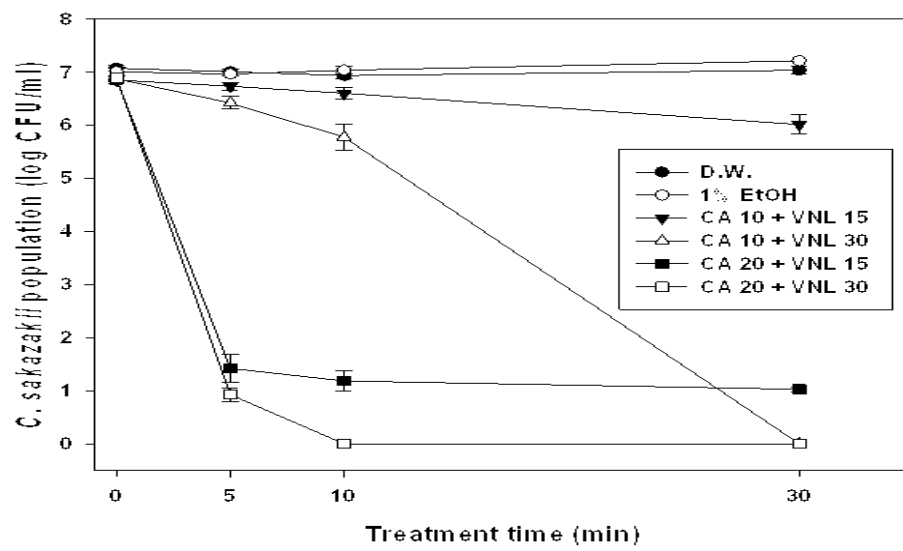
도면2a



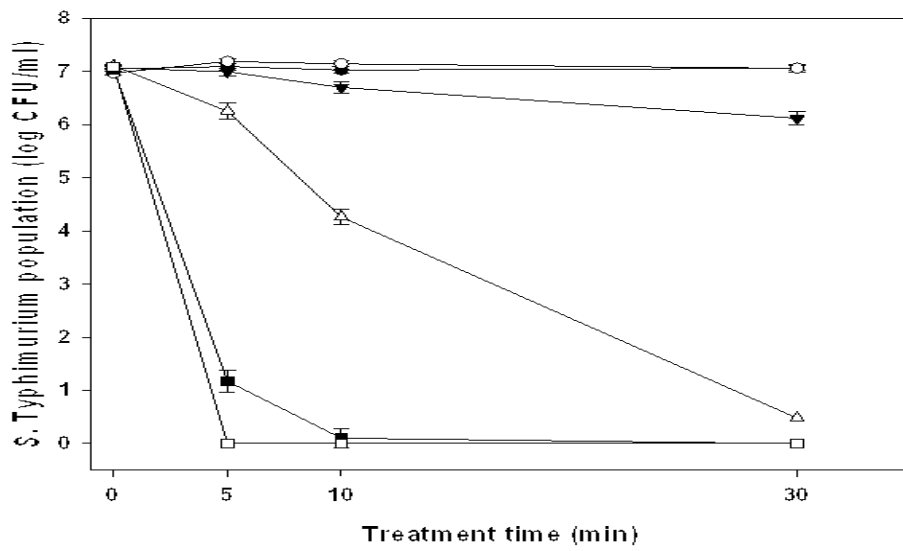
도면2b



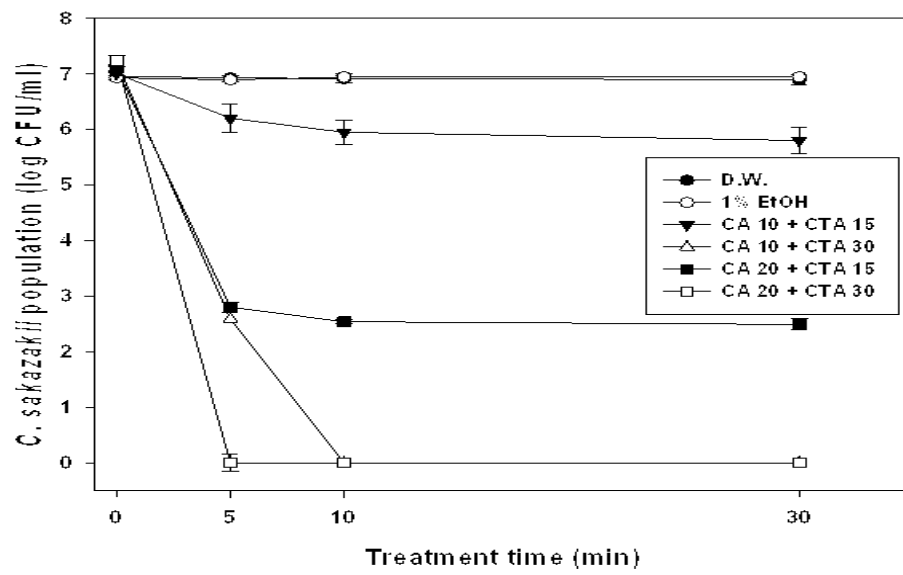
도면2c



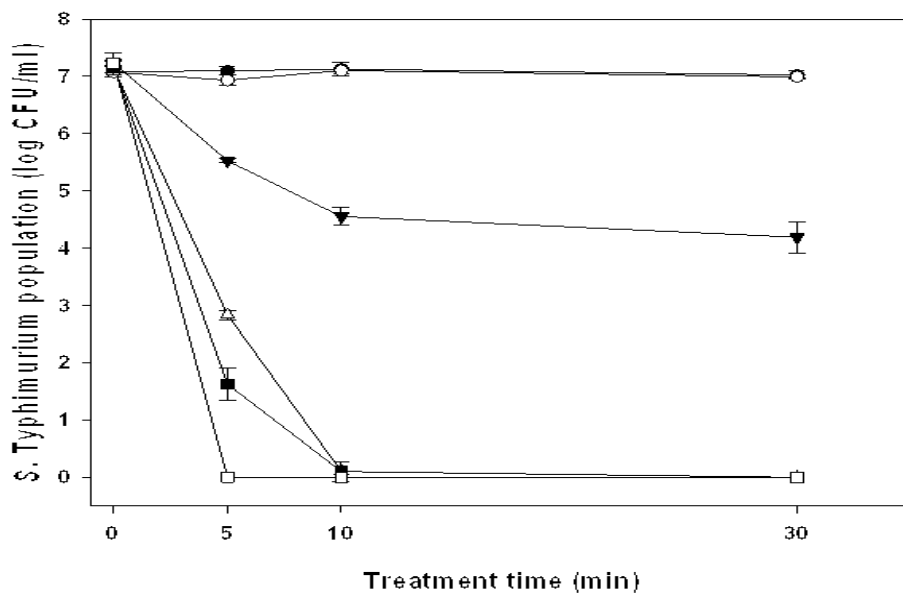
도면2d



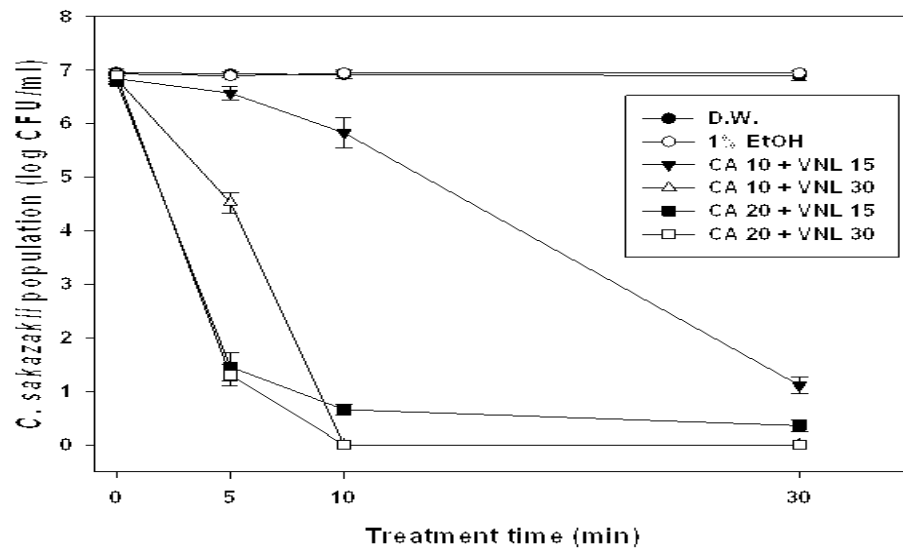
도면2e



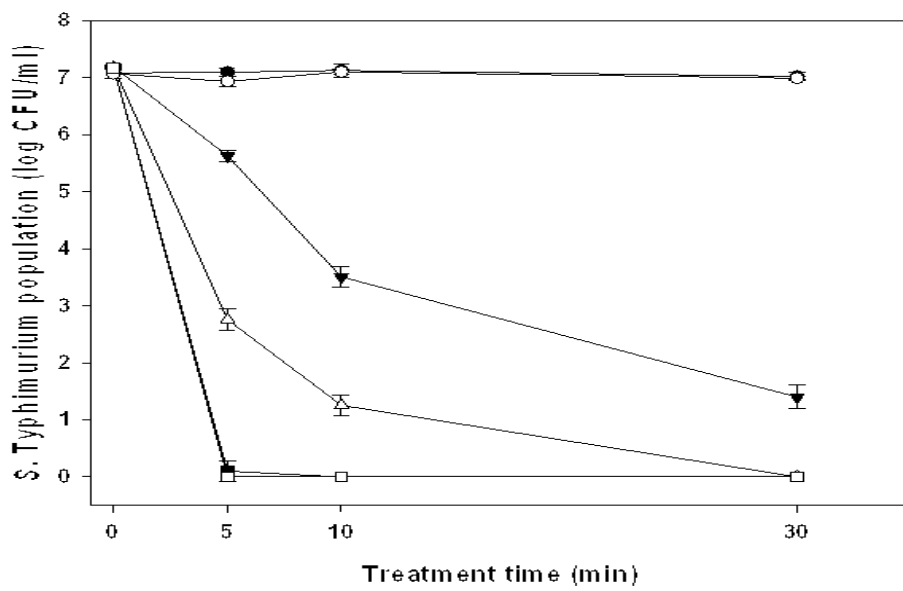
도면2f



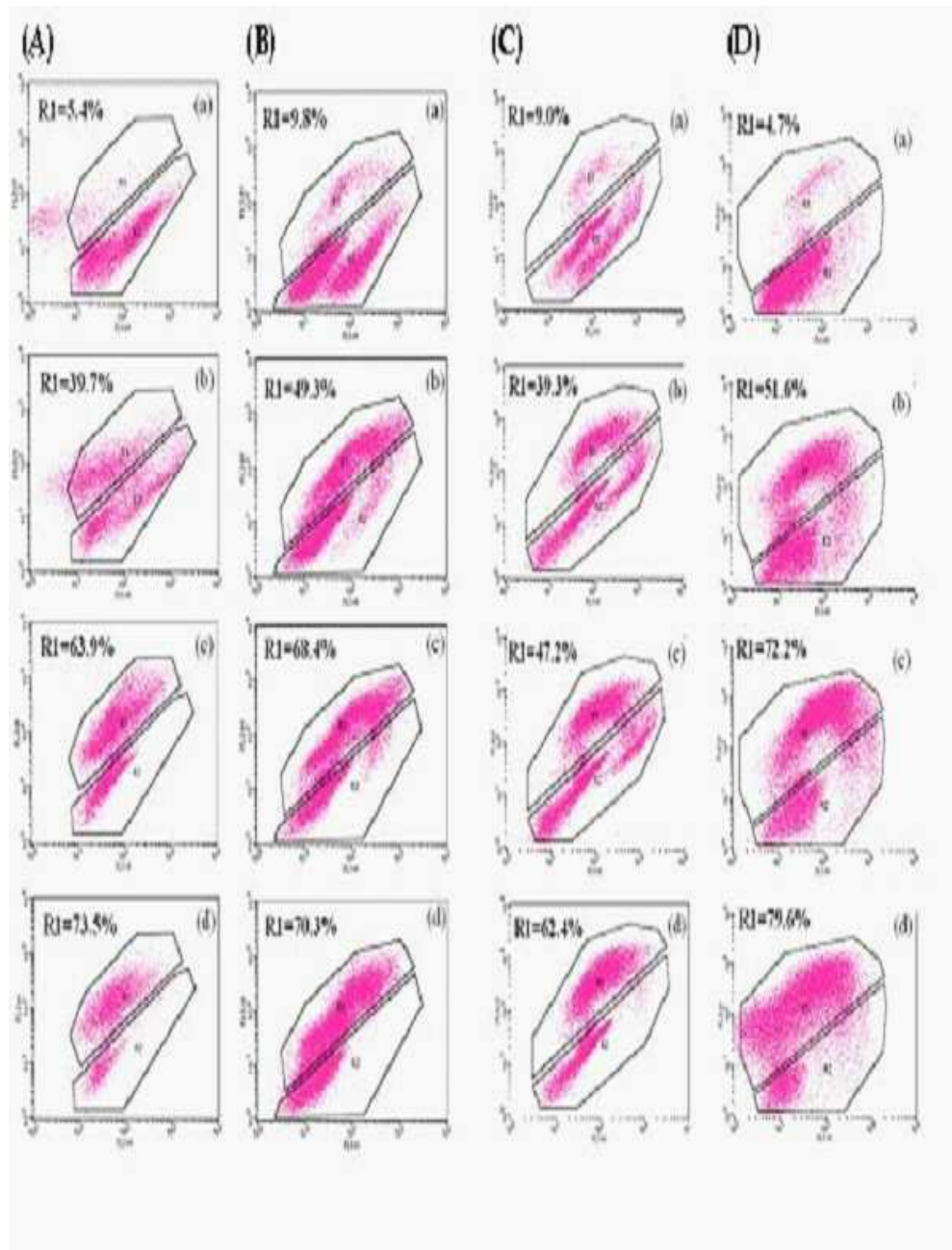
도면2g



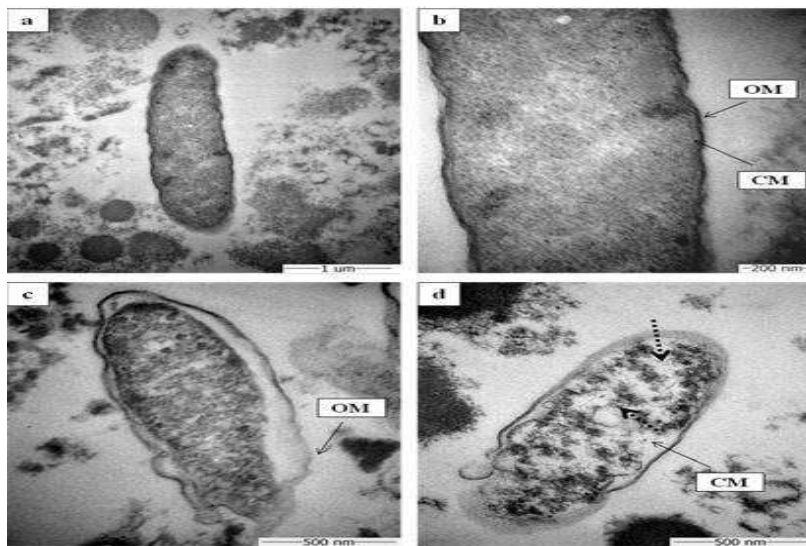
도면2h



도면3



도면4a



도면4b

