



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0024566
(43) 공개일자 2019년03월08일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A01N 43/78</i> (2006.01) <i>A01N 31/02</i> (2006.01)
 <i>A23L 3/3517</i> (2006.01) <i>A23L 3/3544</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>A01N 43/78</i> (2013.01)
 <i>A01N 31/02</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2018-0010111
 (22) 출원일자 2018년01월26일
 심사청구일자 2018년01월26일</p> <p>(30) 우선권주장
 1020170110628 2017년08월31일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인
 고려대학교 산학협력단
 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)</p> <p>(72) 발명자
 이민석
 경기도 성남시 분당구 내정로 152, 133동 701호(수내동, 파크타운롯데아파트)</p> <p>황지연
 서울특별시 성북구 보국문로16길 68, 302 (정릉동)</p> <p>(74) 대리인
 이명진</p> |
|--|--|

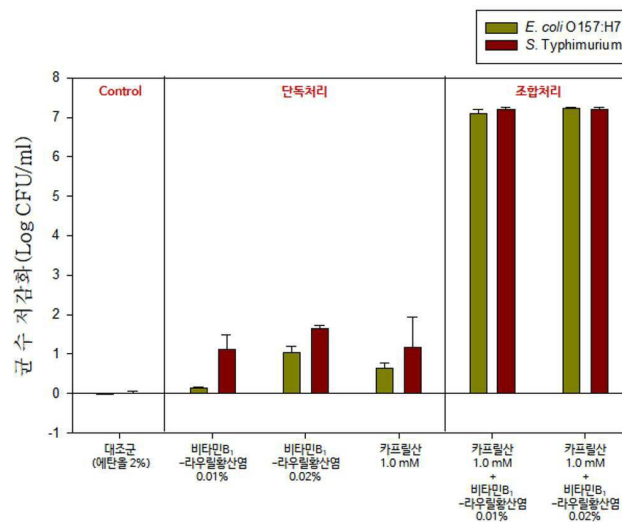
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **비타민B₁ 라우릴황산염 및 중쇄지방산의 시너지 항균효과를 이용한 살균용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 비타민B₁ 라우릴황산염 및 중쇄지방산의 조합처리에 의한 시너지 항균효과를 이용한 살균용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 살균용 조성물은 독성이 없어 인체에 무해하며, 비타민B₁ 라우릴황산염과 중쇄지방산을 단독처리하였을 때 생기는 식품의 관능특성 저하를 방지하고, 비타민B₁ 라우릴황산염과 중쇄지방산의 조합처리에 의해 항균효과가 더욱 증대되는 시너지 항균효과를 나타내 기존 사용되던 조건보다 낮은 범위에서 우수한 살균력을 확보할 수 있는 장점이 있다. 또한, 본 발명에 따른 살균용 조성물은 다양한 식품에 첨가하여 영양을 강화하는 장점이 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A23L 3/3517 (2013.01)

A23L 3/3544 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/10 (2013.01)

A23V 2250/1878 (2013.01)

A23V 2250/7042 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

비타민B₁ 라우릴황산염 및 중쇄지방산을 유효성분으로 포함하는, 살균용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 중쇄지방산은 카프릭산(capric acid) 또는 카프릴산(caprylic acid)인 것을 특징으로 하는, 살균용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 비타민B₁ 라우릴황산염은 0.005 내지 0.05 w/v%로 포함되는 것을 특징으로 하는, 살균용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 중쇄지방산은 0.00085 내지 0.02 w/v%로 포함되는 것을 특징으로 하는, 살균용 조성물.

청구항 5

제2항에 있어서,

상기 카프릭산은 0.00085 내지 0.004 w/v%로 포함되는 것을 특징으로 하는, 살균용 조성물.

청구항 6

제2항에 있어서,

상기 카프릴산은 0.005 내지 0.02 w/v%로 포함되는 것을 특징으로 하는, 살균용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 비타민B₁ 라우릴황산염 및 중쇄지방산의 조합처리에 의한 시너지 항균효과를 이용한 살균용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 살균제는 일반적으로 미생물 및 세균의 성장을 억제시키거나 또는 제거시키는 약제를 의미하고, 가습기, 식품,

의료기구, 녹조 제거 및 수영장 등과 같이 다양한 분야에 사용되고 있다. 특히 위생 및 건강에 대한 관심이 높아짐에 따라 살균제의 사용분야는 점차 확대되고 있으며, 인체에 무해한 살균제를 개발하기 위한 다양한 연구가 진행되고 있다. 살균제는 살균력 및 항균력이 매우 강하기 때문에 살균에 필요한 특정 농도로 살균제를 정제수 및 특정 용액에 혼합시킨 후 살균에 사용하는 것이 일반적이며, 예를 들어 화장실 균주를 박멸하기 위해 사용하는 락스(염소계 소독제) 같은 경우 물에 락스를 희석시켜 특정 농도로 맞춘 후 사용되고 있다.

[0004] 종래의 살균제는 살균 및 살조 성질이 강하여 가습기 세정제 및 슬라임(Slime) 세정제 등의 클로메틸이소티아졸린/메틸이소티아졸린(CMIT/MIT:Chloromethyliso-thiazolinone/ Methylisothiazolinone)과 범용 소독 및 살균제로 알려진 소독제(락스, 고도표백분, 이산화염소 수용액, 이소시아눌 제제) 등이 사용되었으며, 최근 가습기 세정제의 원료로 PHMG(Polyhexamethylene guanidine)와 PGH(Oligo(2-(2-ethoxy)ethoxyethyl guanidine chloride)) 등이 사용되고 있다. 그러나 PHMG (polyhexamethylene guanidine)와 PGH(Oligo(2-(2-ethoxy)ethoxyethyl guanidine chloride))는 냄새가 없을 뿐만 아니라 살균 및 항균 효과가 뛰어나다는 장점이 있으나, 사람의 흡입에 따라 사람의 폐 속에 축적될 때 시간이 경과함에 따라 독성 성분이 비약적으로 커져 폐를 손상시키는 문제점을 발생시킨다. 또한, 범용 살균제로 사용되는 염소계 소독제, 특히 차아 염소산나트륨(락스), 고도표백분인 차아염소산칼슘(칼슘 하이포클로라이트, Calcium hypochlorite), 트리클로로이소시아눌산(Trichloroisocyanuric acid, TCCA), 이염화 아이소사이아누르산 나트륨(Sodium Dichloroisocyanurate) 등은 가격대비 살균력 및 항균력이 뛰어나다는 장점으로 인해 다양한 분야에 사용되고 있으나, 함유된 염소(C1)를 비롯한 할로젠족 화학성분이 발암물질로 작용하는 트리할로메탄(Trihalomethane)을 유발시키며, 인체에 접촉될 경우 염소가 인체의 피부노폐물에 혼합되어 클로라민이라는 발암물질을 발생시키고, 기기에 접촉될 경우 산화율이 높아 기기를 부식시키며, 특유의 강한 염소취로 인해 안구 점막을 자극시키고, 불쾌감을 주는 등의 문제점을 갖게 된다.

[0005] 상기의 문제점들에 대한 소비자들의 불안이 증가하고 있어 인체에 무해한 살균제의 개발이 요구되고 있다. 이에 대한 대안으로 천연항균 물질을 이용한 살균제 개발 연구가 진행되고 있으며, 식물에서 추출한 에센셜오일, 중쇄지방산 등이 대표적인 천연항균 물질로써 이용되고 있다. 코코넛, 야자 등 천연식품에 존재하는 중쇄지방산은 8-12개의 탄소로 구성된 지방산을 의미하며 그 예시로는 카프릴산(caprylic acid, C8), 카프릭산(capric acid, C10), 라우르산(lauric acid, C12)이 있으며, 각각의 첨가물공전 등재번호는 각각 192번, 188번, 180번에 해당한다. 중쇄지방산은 항균력뿐만 아니라 체지방분해, 대사 증후군 예방 등의 다양한 기능을 가지고 있어 항균제와 영양 보충제로서 식품에 활용되고 있으며, 그 중 카프릴산(caprylic acid)은 미국 FDA에서 GRAS(Generally Recognized as Safe)로서 섭취하여도 안전한 물질로 인정받고 있다. 그러나 고유의 향으로 인해 식품에 적용할 때 식품의 관능특성에 바람직하지 못한 영향을 미칠 수 있다는 단점이 있다. 이러한 단점을 보완하기 위하여 다른 식품첨가물이나 살균기술을 병용하여 관능특성에 영향을 미치지 않는 저농도의 사용만으로도 활용이 가능한 기술의 개발이 요구된다.

[0006] 한편, 비타민B₁ 라우릴황산염(thiamine dilaurylsulfate, TDS)은 비타민B₁의 유도체로서 식품에서 비타민B₁을 강화하기 위한 용도로 개발되었다. 그러나 이후 항균력을 나타내는 것이 밝혀져 한국과 일본에서 식품 첨가제로 허가되었으며 음료, 소스 등에서 미생물의 성장을 억제하는 보존제로 널리 이용되고 있다. 비타민B₁ 라우릴황산염은 무독성으로 인체에 무해하며, 무색, 무미, 무취로 식품의 관능특성에 영향을 미치지 않는다는 장점이 있다. 그러나 물에 대한 용해도가 낮아 액상 제제로 이용하기 위해서는 고농도의 에탄올과의 병용이 필요하다. 고농도의 에탄올과 함께 사용할 경우 에탄올에 의한 식품의 관능특성 저하가 우려되며, 식품 조직에 영향을 미칠 수 있다. 이러한 단점을 극복하기 위해서는 용해도 이하의 저농도 비타민B₁ 라우릴황산염과 다른 식품 보존제를 조합하여 살균력을 극대화할 수 있는 기술의 개발이 필요하다.

[0007] 식품의 안전 및 품질관리는 기업 이미지 및 매출과 밀접한 관련이 있기 때문에 다양한 식품 기업에서는 관련 기술 개발에 많은 투자가 이루어지고 있으나, 신기술 개발 및 적용에 따른 경제적 부담이 커 식품기업에서 쉽게 적용할 수 있는 저비용 고효율 공정 개발이 필요하다. 식품 산업에서는 미생물학적 안전성 확보를 위해 다양한 물리화학적 처리를 수행하며, 이러한 처리에 의해 식품의 영양소 및 이화학적 특성이 변화될 수 있는 한편 소비자들은 식품의 본래 형태를 유지하고 있는 신선한 제품을 선호하고 있다. 따라서 식품의 변화를 최소화할 수 있는 기술의 개발이나 종전에 사용되고 있는 처리의 강도를 낮추면서 미생물을 효율적으로 사멸할 수 있는 신기술이 요구되고 있다. 따라서 식품에 처리 가능한 물질을 조합 처리하여 단독처리보다 우수한 시너지 효과를 획득한다면 경제적 절감을 기대할 수 있다(한국등록특허 KR10-1567670 참조).

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명자들은 비타민B₁ 라우릴황산염 및 중쇄지방산의 단독 또는 조합처리에 의해 세균에 대한 살균력을 분석하고, 식품의 관능특성을 저하시키지 않는 살균용 조성물 개발을 위해 예의 연구한 결과, 비타민B₁ 라우릴황산염 및 중쇄지방산을 단독으로 처리하는 것에 비하여 비타민B₁ 라우릴황산염 및 중쇄지방산을 조합하여 처리하는 경우 항균효과가 더욱 증대되는 시너지 항균효과가 있음을 확인하였는바, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.
- [0010] 따라서 본 발명은 살균용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0012] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0014] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 비타민B₁ 라우릴황산염(thiamine dilaurylsulfate, TDS) 및 중쇄지방산(medium chain fatty acid)을 유효성분으로 포함하는, 살균용 조성물을 제공한다.
- [0015] 본 발명의 일실시예에서, 상기 중쇄지방산은 카프릭산(capric acid) 또는 카프릴산(caprylic acid)일 수 있다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 비타민B₁ 라우릴황산염은 0.005 내지 0.05 w/v%로 포함될 수 있다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 중쇄지방산은 0.00085 내지 0.02 w/v%로 포함될 수 있다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 카프릭산(capric acid)은 0.00085 내지 0.004 w/v%로 포함될 수 있고, 바람직하게는 0.001 내지 0.004 w/v%일 수 있다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 카프릴산(caprylic acid)은 0.005 내지 0.02 w/v%로 포함될 수 있다.

발명의 효과

- [0021] 본 발명에 따른 살균용 조성물은 독성이 없어 인체에 무해하며, 비타민B₁ 라우릴황산염과 중쇄지방산을 단독처리하였을 때 생기는 식품의 관능특성 저하를 방지하고, 비타민B₁ 라우릴황산염과 중쇄지방산의 조합처리에 의해 항균효과가 더욱 증대되는 시너지 항균효과를 나타내 기존 사용되던 조건보다 낮은 범위에서 우수한 살균력을 확보할 수 있는 장점이 있다.
- [0022] 또한, 본 발명에 따른 살균용 조성물은 다양한 식품에 첨가하여 영양을 강화하는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

- [0024] 도 1은 대조군(에탄올 2%), 비타민B₁ 라우릴황산염(0.01, 0.02 w/v%), 카프릭산(0.1 mM)의 단독 또는 조합처리에 따른 균(장출혈성대장균(*E. coli* 0157:H7), 살모넬라(*Salmonella* spp.))의 저감효과를 나타낸 도면이다.
- 도 2는 대조군(에탄올 2%), 비타민B₁ 라우릴황산염(0.01, 0.02 w/v%), 카프릭산(0.2 mM)의 단독 또는 조합처리에 따른 균(장출혈성대장균(*E. coli* 0157:H7), 살모넬라(*Salmonella* spp.))의 저감효과를 나타낸 도면이다.
- 도 3은 대조군(에탄올 2%), 비타민B₁ 라우릴황산염(0.01, 0.02 w/v%), 카프릴산(0.5 mM)의 단독 또는 조합처리에 따른 균(장출혈성대장균(*E. coli* 0157:H7), 살모넬라(*Salmonella* spp.))의 저감효과를 나타낸 도면이다.
- 도 4는 대조군(에탄올 2%), 비타민B₁ 라우릴황산염(0.01, 0.02 w/v%), 카프릴산(1.0 mM)의 단독 또는 조합처리에 따른 균(장출혈성대장균(*E. coli* 0157:H7), 살모넬라(*Salmonella* spp.))의 저감효과를 나타낸 도면이다.
- 도5는 비타민B₁ 라우릴황산염(0.01, 0.02 w/v%)과 카프릭산(0.1, 0.2 mM) 또는 카프릴산(0.5, 1.0 mM) 조성물의 4가지 조합처리에 따른 대상 균 8종(*Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538,

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 33591, *Streptococcus pyogenes* ATCC 14289, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *E. coli* ATCC 11775, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Serratia marcescens* ATCC 14756)의 저감효과를 나타낸 도면이다.

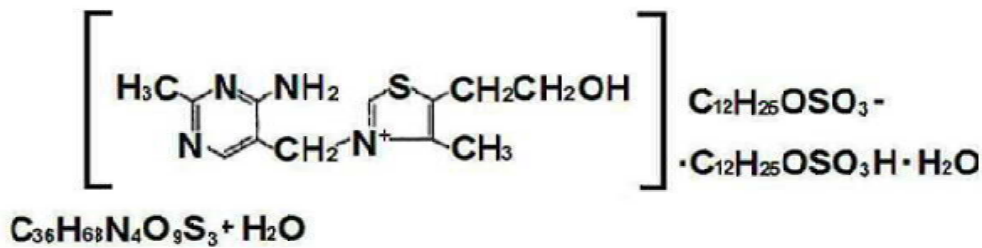
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 본 발명은 비타민B₁ 라우릴황산염 및 중쇄지방산의 조합처리에 의하여 항균효과가 더욱 증대되는 시너지 항균효과를 보이는 살균용 조성물에 대한 것이다. 또한, 본 발명에 따른 살균용 조성물은 식품 관능특성을 저하시키지 않으며, 시너지 항균효과를 통해 기존 사용되던 조건보다 낮은 범위에서 우수한 살균력을 확보하는 효과를 가지는 것을 확인한 바, 다양한 분야의 살균제로 유용하게 활용할 수 있을 것이다.

[0026] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.

[0027] 본 발명에서 비타민B₁ 라우릴황산염은 항균력이 강하면서도 인체에 무해한 성질을 갖는 비타민-B₁ 유도체로서, 본 발명의 살균용 조성물의 항균력을 증가시킬 뿐만 아니라 기 발생한 세균, 미생물, 곰팡이, 효모, 대장균 및 조류(Algae) 등을 효율적으로 제거한다. 또한, 비타민B₁ 라우릴황산염은 하기의 화학식 1로 표시된다.

화학식 1



[0028]

[0029] 표 1은 비타민B₁ 라우릴황산염의 물 용해도를 나타낸 것이다.

표 1

[0030]

온도(℃)	비타민B ₁ 라우릴황산염의 물 용해도(%)
0	0.01
10	0.01
25	0.21
30	24
40	64
50	100

[0031] 라우릴황산염은 침전이 쉽게 발생하고, 안정성이 낮은 이유로 인해 통상적으로 분말 형태로 제조되고 있으나 비타민B₁ 라우릴황산염은 상기 표 1에 도시된 바와 같이 물 용해도가 매우 낮아 일반적으로 물에 잘 용해되지 않게 된다. 이에 따라 비타민B₁ 라우릴황산염을 액체 제제로 제조하기 위해서 고농도의 초산 또는 고농도의 에틸알코올(ethyl alcohol)을 첨가하는 방법이 공지되어 사용되고 있지만 초산 및 에틸알코올은 초산 및 알코올 냄새를 발생시키기 때문에 본 발명에서는 유기산을 첨가하여 비타민B₁ 라우릴황산염이 물에 잘 용해되도록 한다.

[0032] 본 발명에서 중쇄지방산은 탄소수가 8 내지 12 개로 구성된 포화지방산으로, 장쇄지방산과 달리 인체 내 흡수가 빠르고 분해가 빨리 일어나 체지방으로 축적되지 않으면서 열효율이 높아 소화장애 환자의 식이요법에 이용된다. 또한, 최근 의료분야의 위장침투항상기술에 중쇄지방산 또는 중쇄지방산 유도물질이 사용되며, 이 기술은 최첨단 약물전달시스템 분야에 매우 중요하게 적용되고 있다.

[0033] 본 발명의 중쇄지방산은 카프릭산, 카프릴산, 로르산, 미리스트산, 팔미트산, 스테아르산, 올레산, 및 리놀레산일 수 있고, 바람직하게는 카프릭산 또는 카프릴산일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0034] 또한, 본 발명의 살균용 조성물은 장출혈성대장균(*Escherichia coli* 0157:H7, *E. coli* 0157:H7), 살모넬라균(*Salmonella* spp.), 엔테로코쿠스 페칼리스(*Enterococcus faecalis*), 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*),

메티실린 내성 황색포도상구균(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA), 화농성연쇄상구균(*Streptococcus pyogenes*), 리스테리아(*Listeria monocytogenes*), 대장균(*Escherichia coli*, *E. coli*), 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*), 또는 세라티아 마르세센스(*Serratia marcescens*) 세균을 사멸시킬 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0035] 본 발명의 일 실시예에서, 식중독 미생물인 장출혈성대장균 0157:H7 과 살모넬라균을 튜브에 담긴 3 ml 증균배지 TSB(Tryptic Soy Broth)에 30 ul 씩 분주하여 37℃에서 24시간 배양하였고, 상기 배양한 균을 50 ml 플라스틱 튜브에 모두 혼합하여 원심분리기를 이용하여 3,000 g에서 15분간 원심분리하여 상등액을 제거한 후 0.85% 멸균 생리식염수를 이용하여 미생물 펠렛을 2회 세척하고, 다시 동량의 0.85% 멸균 생리식염수를 넣고 교반하여 균액을 제조하였다(실시예 1-1 참조).

[0036] 본 발명의 다른 실시예에서, 적절한 농도의 비타민B₁ 라우릴황산염, 카프릭산, 및 카프릴산 각각을 98% 에탄올에 용해하여 표준용액을 제조하였다(실시예 1-2 참조).

[0037] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 제조한 표준용액을 멸균튜브의 멸균 증류수와 단독 또는 조합하여 첨가한 후 9 내지 10 log CFU/ml 수준의 균액 0.1 ml를 처리액 9.9 ml에 분주하여 37° C 교반항온수조에서 5분 처리 후 균액을 평판배지인 TSA(Tryptic Soy Agar)에 도말하였다(실시예 1-3 및 실시예 1-4 참조).

[0038] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 도말한 TSA를 37℃ 배양기에서 24시간 배양한 후 TSA에 형성된 콜로니수를 계수하여 균수를 산출하였고, 균 농도를 log 값으로 나타내어 초기 접종균수와 처리 후 균수를 토대로 각 조건별 균의 저감화값을 산출하여 비타민B₁ 라우릴황산염과 중쇄지방산의 항균 시너지 효과를 확인하였다. 그 결과, 비타민B₁ 라우릴황산염 및 중쇄지방산의 단독처리 시 균 저감화값을 더한 값보다 조합처리 시 장출혈성대장균 및 살모넬라의 저감화값이 현저하게 높으므로, 두 물질의 조합처리 시 항균효과가 더욱 증대되는 시너지 항균효과가 있음을 확인하였다(실시예 2 참조).

[0039] 본 발명의 또 다른 실시예에서, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 33591, *Streptococcus pyogenes* ATCC 14289, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *E. coli* ATCC 11775, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, 및 *Serratia marcescens* ATCC 14756의 8종 균을 대상으로 하여 실험을 하였으며(실시예 3-1 참조), 비타민B₁ 라우릴황산염과 중쇄지방산 표준용액의 준비와 조성물의 단독 및 조합처리는 상기 식중독 세균을 대상으로 한 실험에서 실시한 방법과 동일하게 실시하였다(실시예 3-2 참조).

[0040] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 식중독 세균을 대상으로 한 실험에서 살균 시너지 효과를 크게 나타낸 조합인 ‘조합 ①: 카프릭산 0.1 mM + 비타민B₁라우릴황산염 0.02%’, ‘조합 ②: 카프릭산 0.2 mM + 비타민B₁라우릴황산염 0.02%’, ‘조합 ③: 카프릴산 0.5 mM + 비타민B₁라우릴황산염 0.02%’, ‘조합 ④: 카프릴산 1.0 mM + 비타민B₁라우릴황산염 0.02%’ 총 4가지의 조합을 선정하여 상기 8종의 균에 대한 살균 효과 검증을 실시한 결과, 8종의 대상 균에 대하여 4가지 조합에서 모두 최소 4 log 이상의 높은 저감효과를 나타내었다(실시예 4 참조).

[0041] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0043] 실시예 1. 조성물의 식중독 세균에 대한 효과 검증을 위한 실험의 준비

[0044] 1-1. 사용균주 및 배양

[0045] 식품에 오염될 경우 심각한 식중독을 일으킬 수 있는 식중독 미생물인 장출혈성대장균대장균 0157:H7 (*Escherichia coli* 0157:H7, *E. coli* 0157:H7)과 살모넬라균(*Salmonella* spp.)을 대상 식중독 세균으로 선정하였으며, *E. coli* 0157:H7 (ATCC 35150, 43890, 43895) 및 *S. Typhimurium* (ATCC 14028, 19585, DT104 KillerCow)의 각 3가지 균주를 실험에 사용하였다. 각 균주를 튜브에 담긴 3 ml 증균배지 Tryptic Soy Broth (Difco, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA)에 30 ul 씩 분주하여 37℃에서 24시간 배양하였으며, 상기 배양한 균을 50 ml 플라스틱 튜브(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)에 모두 혼합하여 원심분리기(Centra-CL2, Needham Heights, MA, USA)를 이용하여 3,000 g에서 15분간 원심분리하여 상등액을 제거한 후 0.85% 멸균 생리식염수를 이용하여 미생물 펠렛을 2회 세척하고, 다시 동량의 0.85% 멸균 생리식염수를 넣고 교반하여 균액을 제조하였다.

[0047]

1-2. 비타민B₁ 라우릴황산염, 중쇄지방산 표준용액 준비

[0048]

비타민B₁ 라우릴황산염(Daepyeong, Korea)을 98% 에탄올에 용해하여 1, 2 w/v%의 표준용액을 제조하였다. 카프릭산(Sigma Chemical co., St. Louis, MO, USA)을 98% 에탄올에 용해하여 10, 20 mM의 표준용액을 제조하였다. 카프릴산(Sigma Chemical co., St. Louis, MO, USA)을 98% 에탄올에 용해하여 50, 100 mM의 표준용액을 제조하였다.

[0050]

1-3. 비타민B₁ 라우릴황산염 및 중쇄지방산 단독처리 방법

[0051]

멸균튜브에 9.8 ml의 멸균 증류수와 비타민B₁ 라우릴황산염 표준용액 0.1 ml 또는 중쇄지방산 표준용액 0.1 ml를 첨가한 후(총량 = 9.9 ml) 9 내지 10 log CFU/ml 수준의 균액 0.1 ml를 처리액 9.9 ml에 분주(최종 농도: 7 내지 8 log CFU/ml)하여 37° C 교반항온수조에서 5분 처리 후 균액을 평판배지인 Tryptic Soy Agar (Difco, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA)에 도말하였다(검출 한계: 1 CFU/ml).

[0053]

1-4. 비타민B₁ 라우릴황산염 및 중쇄지방산 조합처리 방법

[0054]

멸균튜브에 9.7 ml의 멸균 증류수와 비타민B₁ 라우릴황산염 표준용액 0.1 ml와 중쇄지방산 표준용액 0.1 ml를 첨가한 후(총량 = 9.9 ml) 9 내지 10 log CFU/ml 수준의 균액 0.1 ml를 처리액 9.9 ml에 분주(최종 농도: 7 내지 8 log CFU/ml)하여 37° C 교반항온수조에서 5분 처리 후 균액을 평판배지인 Tryptic Soy Agar (Difco, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA)에 도말하였다(검출 한계: 1 CFU/ml). 하기 표 2는 중쇄지방산의 처리용액 내 w/v% 함량을 나타낸 것이다.

표 2

[0055]

	0.1 mM	0.2 mM	0.5 mM	1.0 mM
카프릭산(capric acid)	0.0017 w/v%	0.0034 w/v%	-	-
카프릴산(caprylic acid)	-	-	0.0072 w/v%	0.0144 w/v%

[0057]

실시예 2. 비타민B₁ 라우릴황산염과 중쇄지방산의 대장균0157:H7과 살모넬라에 대한 항균 시너지 효과 확인

[0058]

비타민B₁ 라우릴황산염과 중쇄지방산(카프릭산, 카프릴산)의 항균 시너지 효과를 확인하기 위해 상기 실시예 1-3 및 실시예 1-4에서 도말한 TSA를 37℃ 배양기에서 24시간 배양하였다. 균수는 TSA에 형성된 콜로니수를 계수하여 산출하였고, 균 농도를 log 값으로 나타내었다. 초기 접종균수를 측정하기 위하여 멸균 0.85% 생리식염수 9.9 ml에 상기의 균액 0.1 ml를 접종하여 같은 실험을 수행하였다. 초기 접종균수(N_0)와 처리 후 균수(N_t)를 토대로 각 조건별 균의 저감하율(N_0/N_t)을 산출하였다. 비타민B₁ 라우릴황산염과 중쇄지방산의 용매로 사용된 에탄올 2%를 대조군으로서 사용하였다. 모든 실험은 3회 이상 반복 수행하였다.

[0059]

그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 비타민B₁ 라우릴황산염(0.01, 0.02 w/v%)을 단독처리하였을 때는 2 log 이상의 장출혈성대장균(*E. coli* 0157:H7) 및 살모넬라(*Salmonella* spp.)가 저감효과를 보이지 않았으며, 대조군인 2%의 에탄올 및 중쇄지방산 중 0.1 mM의 카프릭산을 단독처리하였을 때 장출혈성대장균 및 살모넬라의 저감효과가 나타나지 않았다. 하지만, 비타민B₁ 라우릴황산염과 0.1 mM의 카프릭산과 조합처리한 경우 장출혈성대장균 및 살모넬라의 저감효과가 7 log 수준으로 현저히 증대되는 것으로 나타났다. 특히 카프릭산 0.1 mM과 비타민B₁ 라우릴황산염 0.02%를 조합처리한 경우 장출혈성대장균이 5 log 이상 저감되는 효과가 나타났고, 살모넬라를 대상으로 처리하였을 때에는 6 log 이상 저감되는 효과를 확인하였다.

[0060]

또한, 도 2에 나타난 바와 같이, 0.2 mM의 카프릭산을 단독처리하였을 때 4 log 이상의 장출혈성대장균 및 살모넬라 저감효과를 보이지 않았으나, 0.2 mM의 카프릭산과 비타민B₁ 라우릴황산염 0.02%를 조합처리한 경우에는 장출혈성대장균과 살모넬라 모두 사멸되는 효과를 확인하였다.

[0061]

더불어, 도 3에 나타난 바와 같이, 0.5 mM의 카프릴산을 단독처리하였을 때 장출혈성대장균 및 살모넬라의 저감

효과가 나타나지 않았고, 0.5 mM의 카프릴산과 0.01 w/v%의 비타민B₁ 라우릴황산염을 조합처리하였을 때 4 log 이상의 장출혈성대장균 및 살모넬라의 저감효과를 보이지 않았으나, 0.5 mM의 카프릴산과 0.02 w/v%의 비타민B₁ 라우릴황산염을 조합한 경우 살모넬라에 대해 6 log 이상 저감되는 효과를 확인하였다.

[0062] 마지막으로, 도 4에 나타난 바와 같이, 1.0 mM의 카프릴산을 단독처리하였을 때 2 log 이상의 장출혈성대장균 및 살모넬라 저감효과를 보이지 않았으나, 1.0 mM의 카프릴산과 비타민B₁ 라우릴황산염을 조합처리한 경우 장출혈성대장균과 살모넬라가 5분 내에 7 log 이상 사멸되는 효과를 확인하였다.

[0063] 상기와 같은 결과는 비타민B₁ 라우릴황산염 및 중쇄지방산의 단독처리 시 균 저감화율을 더한 값보다 조합처리 시 균 저감화율이 현저하게 높음을 나타내므로, 두 물질의 조합처리 시 항균효과가 더욱 증대되는 시너지 항균 효과가 있음을 알 수 있다.

[0065] 실시예 3. 조성물의 다양한 균에 대한 효과 검증을 위한 실험 준비

[0066] 3-1. 사용균주 및 배양

[0067] 본 발명의 조성물 중 상기 실시예 2에서 살균효과를 나타낸 조합의 조성물의 다양한 균에 대한 효과를 확인하기 위하여 *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 33591, *Streptococcus pyogenes* ATCC 14289, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *E. coli* ATCC 11775, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, 및 *Serratia marcescens* ATCC 14756의 총 8종의 균을 대상으로 실험을 하였으며, 상기 균들의 배양 및 균액의 제조는 상기 실시예 1-1과 동일한 방법으로 실시하였다.

[0069] 3-2. 비타민B₁ 라우릴황산염, 중쇄지방산 표준용액 준비 및 처리

[0070] 표준용액의 준비와 조성물의 단독 및 조합처리는 상기 실시예 1-2, 1-3, 1-4와 동일하게 실시하였다.

[0072] 실시예 4. 조성물에 포함된 비타민B₁ 라우릴황산염과 중쇄지방산의 다양한 균에 대한 항균 시너지 효과 검증

[0073] 상기 실시예 2를 통해 개발된 조성물의 살균효과를 확인하였으며, 이 중 살균 시너지 효과를 크게 나타낸 조합인 ‘조합 ①: 카프릭산 0.1 mM + 비타민B₁라우릴황산염 0.02%’, ‘조합 ②: 카프릭산 0.2 mM + 비타민B₁라우릴황산염 0.02%’, ‘조합 ③: 카프릴산 0.5 mM + 비타민B₁라우릴황산염 0.02%’, ‘조합 ④: 카프릴산 1.0 mM + 비타민B₁라우릴황산염 0.02%’ 총 4개의 조합을 선정하여 다양한 균에 대한 효과 검증을 실시하였다. 균수의 측정과 저감효과 산출은 상기 실시예 2와 마찬가지로 수행하였다.

[0074] 실험 결과 중 8종의 균들의 초기균수는 표 3에 나타내었으며, 상기 균 수 저감화 정도는 도 5에 나타내었다. *E. faecalis* ATCC 19433, *S. aureus* ATCC 6538, *S. pyogenes* ATCC 14289, 및 *P. aeruginosa* ATCC 15442에 대한 처리 결과, 4가지 조합에 대해 모두 7 log 수준의 완전 사멸(ND; Not Detected)을 보였다. MRSA ATCC 33591, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *E. coli* ATCC 11775, 및 *S. marcescens* ATCC 14756에 대한 처리 결과 2가지 또는 3가지 조합에서 7 log 수준의 완전사멸(ND)를 보였으며, 완전 사멸되지 않은 처리군에서도 최소 4 log 이상의 높은 저감효과를 나타내었다. 따라서 본 발명의 조성물은 상기 8종의 대상 균에 대하여 모두 뛰어난 살균효과를 보임을 알 수 있다.

표 3

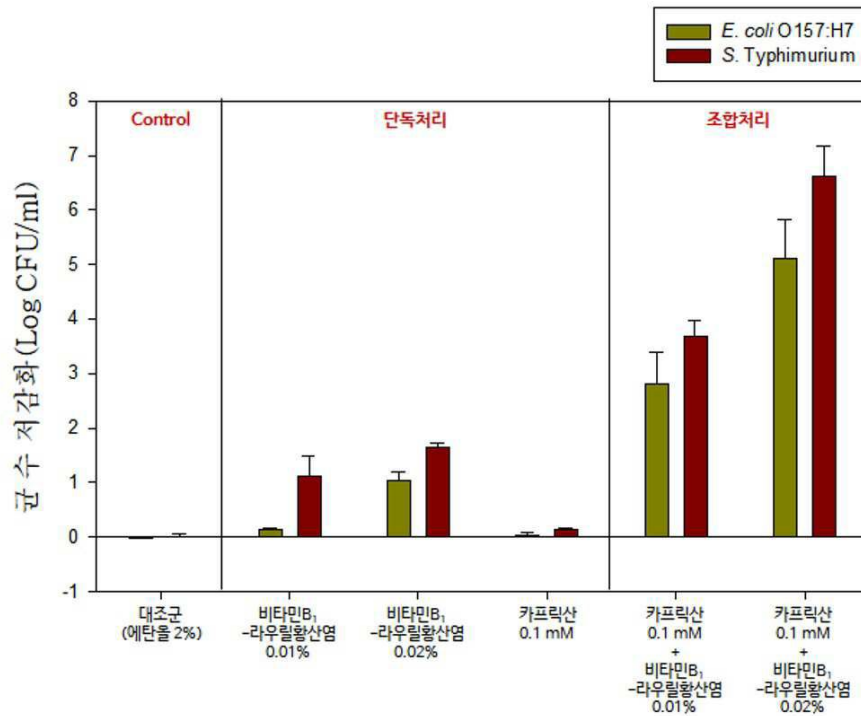
균종	초기균수 (log CFU/ml)	균종	초기균수 (log CFU/ml)
<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	7.2	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	6.7
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	6.7	<i>E. coli</i> ATCC 11775	7.2
MRSA ATCC 33591	6.9	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	7.2
<i>S. pyogenes</i> ATCC 14289	6.9	<i>S. marcescens</i> ATCC 14756	7.7

[0076] 상기 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본

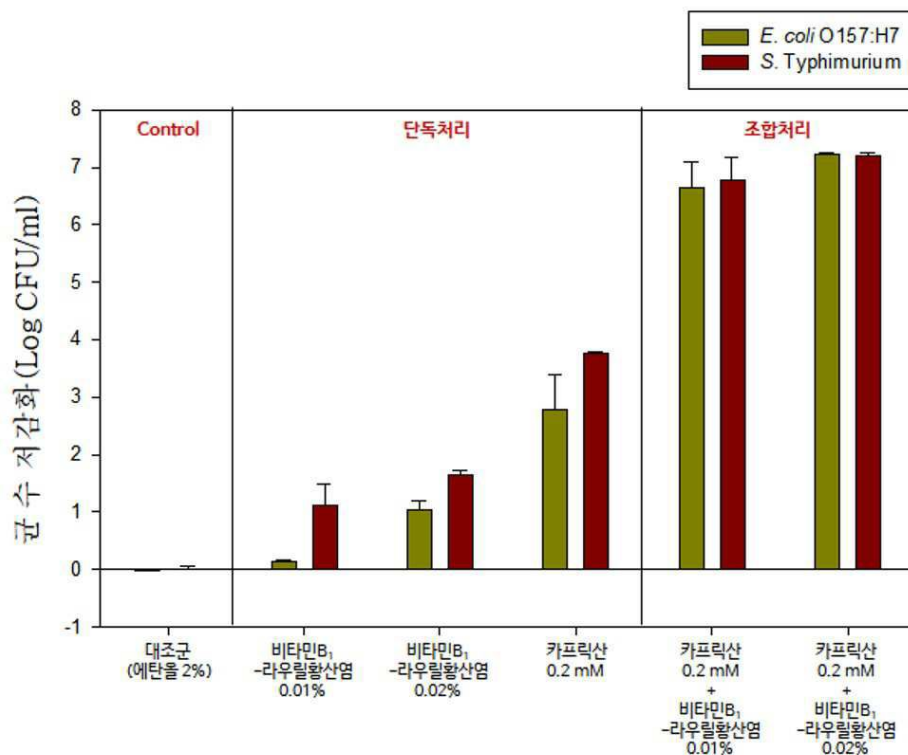
발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

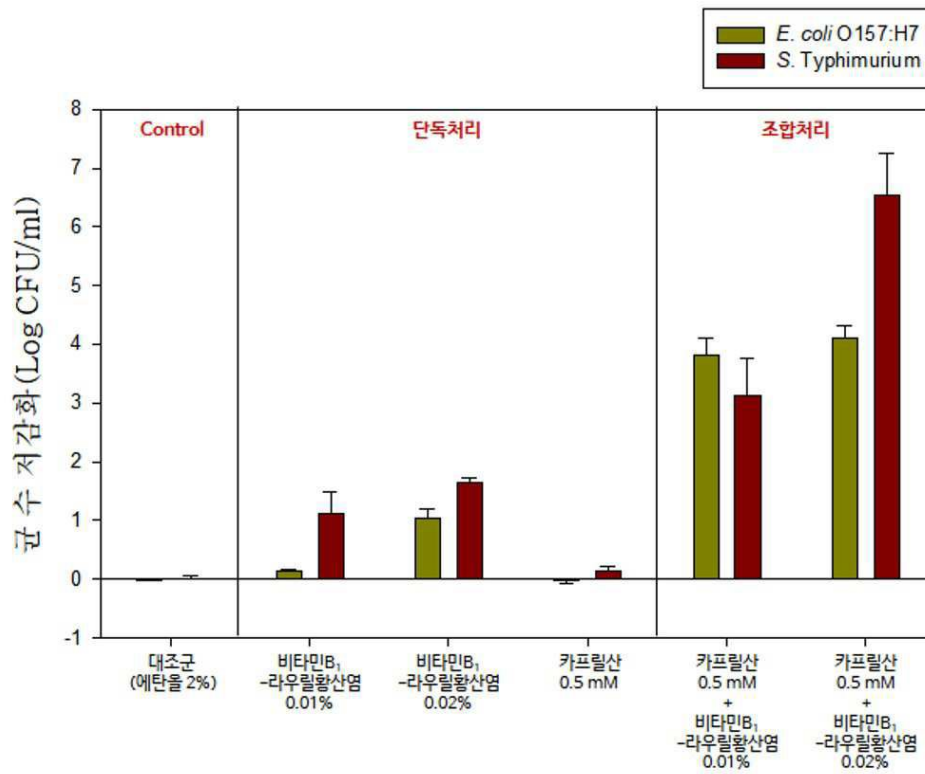
도면1



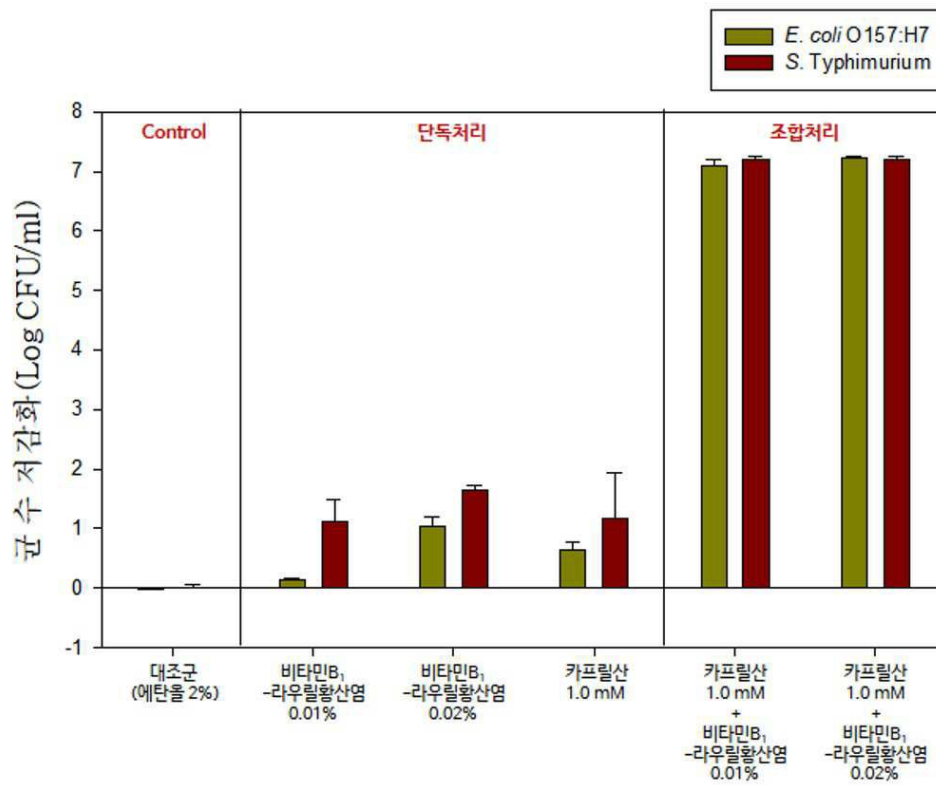
도면2



도면3



도면4



도면5

