(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl.[7]
A23L 1/30

(11) 공개번호 10-2004-0043396
(43) 공개일자 2004년05월24일

(21) 출원번호 10-2002-0071640
(22) 출원일자 2002년11월18일

(71) 출원인 주식회사 벤스랩
경기도 화성군 봉담읍 와우리 산2-2 수원대학교 첨단과학기술연구원 내 115호

정종문
경기 용인시 풍덕천동 1014 신정마을 204-401

(72) 발명자 정종문
경기 용인시 풍덕천동 1014 신정마을 204-401

김지훈
대전광역시대덕구중리동232-5번지

정영재
경기도화성군정남면보통리664-1

(74) 대리인 신동인

심사청구 : 있음

(54) 항균활성을 갖는 키토산, 키토산올리고당 및자몽종자추출물을 함유한 기능성 식품 조성물

요약

본 발명은 키토산, 키토산올리고당 및 자몽종자 추출물을 적절하게 배합 · 가공함으로써 각각의 항균효능을 더한 것보다 우수한 항균효과를 가지는 기능성 식품조성물에 관한 것이다. 본 식품조성물은 껌이나 사탕 등에 첨가하여 충치예방 효과를 나타내며 또한, 제과 · 제빵, 김치류 등의 식품 가공 생산공정 과정이나 완제품 상에서 보존기간을 크게 연장하는 천연보존료 기능을 갖는 식품조성물에 관한 것이다. 본 발명의 기능성 식품조성물의 대량 생산공정은 유동층 공정기를 이용하여 액상의 자몽종자 추출물을 키토산올리고당과 키토산, 유당 분말에 분사하여 과립 분말화한 것으로 보관의 편의성, 안정성, 항균효능의 시너지 효과를 확보하였다.

대표도

도 1

색인어

키토산, 키토산올리고당, 자몽종자 추출물, 항균효과, 충치예방, 천연보존료, 껌, 김치, 식품조성물

명세서

도면의 간단한 설명

도 1 은 식품소재의 주원료인 옥분 또는 소맥분에 기능성 식품조성물과 자몽종자추출물(DF-100) 첨가시 항균력 변화 비교실험을 나타낸 도이고,

도 2 는 양치질을 하지 않은 상태에서 껌을 씹지 않은 군과 자일리톨껌을 씹은 군, 자일리톨껌에 본 발명의 기능성 식품조성물을 10 mg/타블렛 첨가한 껌을 씹은 군을 비교하여 구강내의 균수 변화를 나타낸 도이고,

도 3 은 양치질을 한 후 껌을 씹지 않은 군과 자일리톨껌을 씹은 군, 자일리톨 껌에 본 발명의 기능성 식품조성물을 10 mg/타블렛 첨가한 껌을 씹은 군을 비교하여 구강내의 균수 변화를 그래프로 나타낸 도이고,

도 4 는 양치질을 한 군과 자일리톨 껌에 본 발명의 기능성 식품조성물을 20 mg/타블렛 첨가한 껌을 씹은 군을 비교하여 구강 내의 균수 변화를 그래프로 나타낸 도이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 항균력을 갖는 식품조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 키토산올리고당, 키토산 및 자몽종자 추출물을 적절하게 배합, 가공함으로써 각각의 항균효능을 합한 것보다 뛰어난 항균력을 가지는 기능성 식품조성물에 관한 것이다. 본 식품조성물은 껌이나 사탕 등에 첨가하여 충치예방 효과를 나타내며 또한, 제과 · 제빵, 김치류 등의 식품 가공 생산공정 과정이나 완제품 상에서 보존기간을 연장하는 천연보존료 용도의 기능도 포함하는 식품조성물에 관한 것이다.

구강의 조직에서 나타나는 각종 구강질환은 구강내 존재하는 프라그 및 수많은 세균에 의해 발생되며, 이에 대한 임상적 병리적 중요성은 널리 연구되었다.

프라그(치면 세균막)는 치아표면에 부착된 끈적끈적한 막으로 그 조성물은 구강 세균이 포도당 중합체인 덱스트란의 그물망 속에 갇혀있는 치면 세균막으로 구성되어 있으며 제거하지 않고 방치할 경우 시간이 경과함에 따라 충치와 잇몸 질환으로 진행된다.

고대인들은 구강질환의 예방이나 치료를 위해 여러 생약제를 이용한 기록을 볼 수 있으며, 고대 중국인들은 치은염증, 치은출혈 등에 약초 인힌통(Inhin Tong)이 치료에 효과가 있다하여 사용하였으며, BC 2세기 스페인의 포에니시인들은 벌꿀 등을 사용하였다. 중세기는 아편, 장미유 등을, 14, 15세기에는 백포도주, 구운 소금 등을 동양권에서는 특히 한약제제를 구강 질환의 예방이나 치료에 사용하였다.

일본국 공개특허 소 55-120,509호 공보에서는 골취보, 측백엽, 지유, 연근, 애엽 등의 생약 추출물을, 일본국 공개특허 소 57-5641호 공보 및 소 57-85319호 공보에서는 황백 추출물을, 일본 공개특허 소 87-268613호 공보에서는 월견초 종자유를, 일본국 공개특허 소 60-75418호 공보에서는 세이지 또는 로스마리 등을 배합하여 구강 내 세균억제 효과를 얻으려 하였다.

또한 천연항균성 물질에 대한 연구는 많은 연구자들에 의해 연구되었으며 항신료, 우유 및 어류 등의 식품류, 정유, 한약재 등으로부터 많은 천연 항균성 물질이 보고되었고, 알카로이드 (alkaloid), 플라보노이드 (flavonoid), 피토알렉신 (phytoalexin), 항균펩타이드에 대한 것도 보고되었다. 유기산과 지방산 등의 항균성에 대한 것도 보고되었으며 산의 pH에 의한 효과 및 킬레이트에 의한 효과가 주 기작일 것으로 추정했다(EI-shenawy, MA 등; *J. Food Protec.* , 52(11) , pp771-778, 1989; Bizri, JN 등; *J. Food Science* , 59(1) , pp130-135, 1994).

그러나, 천연물질로서의 한계성 즉 색취, 안정성, 좁은 항균스펙트럼, 제형상의 문제 때문에 대부분이 상용화되지 못하고 그나마 상용화된 천연항균제는 편백추출물인 희노키티올(Hinokitiol), 목련추출물인 메그노놀(Megnonol), 자몽종자추출물(DF-100)등이 개발되어 있으나 대부분 경제성 및 항균스펙트럼, 사용범위의 제한성이 문제되고 있어 보다 진보된 천연항균제가 필요한 실정이다.

본 발명에 사용된 키토산은 천연유래의 염기성 다당류로서, 산업적으로 이용가능한 양은 연간 2백만톤 정도로 추정되어 셀루로즈(cellulose) 다음가는 막대한 생물자원으로, 키토산의 원료가 되는 키틴은 게, 새우와 같은 갑각류의 껍질, 곤충 의 표피 및 버섯, 균류의 세포벽에 존재하는 천연고분자물질이다. 키틴은 식용으로 할 수 있는 게 또는 새우

를 원료로 하여 묽은 수산화나트륨 용액으로 단백질을 제거시킨 후 이를 묽은 염산용액으로 칼슘을 제거시켜 얻어진 N-아세틸글루코사민의 폴리머이며 이를 다시 진한 수산화나트륨 수용액으로 탈아세틸화하여 얻어지는 것이 키토산이다. 키토산올리고당은 아세틸글루코사민 또는 디아세틸글루코사민의 단당체로 2당 내지는 100당의 중합도를 가지는 단일 중합체로서 키틴, 키토산을 가수분해 또는 효소 분해하여 생성되는 것이다. 키틴, 키토산은 공업용 재료로서 폐수처리제 혹은 중금속 흡착제, 수처리시의 응집제나 탈수제, 생물공학적 재료로서 효소고정화용 담체, 크로마토그래피용 수지 및 기능성막, 농업용 재료로서 병충해 예방제, 의료용 재료로서 인공피부 등 대부분 고분자물질로서 이용되어 왔다.

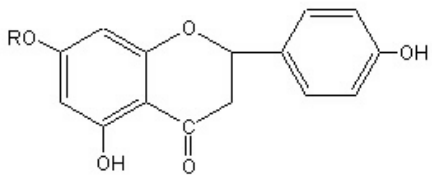
그러나 최근 키틴, 키토산 및 그 유도체가 체내 콜레스테롤 저하작용, 장내세균에 의한 부패물질 생성억제, 면역증강 및 부활작용에 의한 항암활성, 혈압강하 및 고혈압 억제작용, 간기능개선 및 혈당저하, 중금속해독작용, 항균작용 등 여러 가지 생리활성을 가지고 있다는 사실이 밝혀짐으로써 현재 생리기능성 신소재로서 연구개발이 활발히 진행되고 있으며, 그 응용범위가 확대되고 있다. 키틴과 키토산을 동물에게 경구 투여하여도 독성이 거의 없고 장내의 세균이 개선되며 염소이온이나 담즙산과 결합되어 이들을 체외로 배설시킴으로써 혈청 콜레스테롤 값을 저하시킴과 동시에 혈압강하 효과도 나타낸다. 현재 키틴 및 키토산은 식품첨가제, 토량개량제, 식물활성제, 천연물농약, 화장품소재, 의류 및 섬유소재, 인공피부, 담체로서의 개발이 시도되고 있다(김세권, 식품공업, 140 , pp7-32, 1997). 그러나 다 양한 생리기능에도 불구하고 항균제로서의 실질적 개발은 잘 되고 있지 않은데 그 이유는 항균스펙트럼의 제한성 때문이다. 즉 그람음성세균에 비해 그람양성균에 대하여 더 효과적이고 진균류에 대해서는 비교적 약한 항균력을 보이며 세포벽 내에 키토산을 함유한 속에 대해서는 미미하다는 것이다(Riccardo M 등; *Antimicrobial Society and Chemo theraphy* , 34 , pp2019-2023, 1990).

대한민국특허 공보 특1999-84659에서는 키토산을 함유한 식품 첨가물 및 그 제조방법을 개시하고 있으며, 식초에 키토산을 함유시킨 것을 식품 제조시에 가하여 식품의 향미와 보존기간을 증가시키도록 하였다.

한편, 본 발명에 사용된 자몽종자 추출물에는 45%에 상당하는 아스코르빈산이 존재하고 있으며, 이 성분은 금속 이온들의 환원제로서 산소계 특히, 수소 라디칼을 생성시켜 이것이 세포막에 분포되어 있는 효소활성을 저해하여 세포막 기능을 약화시킴으로, 미생물의 세포 호흡 작용을 저해하여 미생물의 정상 생육을 억제한다. 즉, 세포막의 약화와 세포 호흡작용을 억제함으로서 미생물의 살균을 도모할 수 있다.

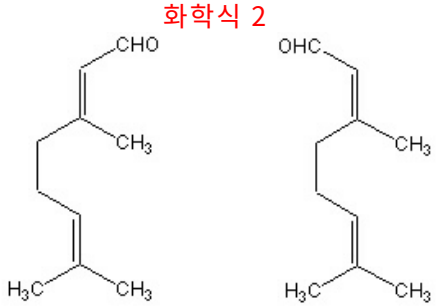
자몽종자 추출물의 주요 항균물질은 나린진과 시트랄이라는 성분이다. 나린진은 비타민 P로 알려진 후라보노이드라는 성분으로 이 물질은 주로 잘 익은 자몽의 종자, 껍질에 많이 존재한다. 나린진은 쓴맛이 있으며, 그 화학구조는 하기의 화학식 1과 같다.

화학식 1



시트랄은 감귤류에 많이 존재하며 자연적으로 게라니알(geranial, citral-alpha)과 네랄(neral, citral-beta)의 두 가지 이성질체가 존재하며 그 화학적 구조는 하기 화학식 2와 같다.

화학식 2



이에 본 발명자는 지속적인 연구로 천연물질인 키틴, 키토산 및 자몽종자추출물을 적절히 배합하여 안전하며, 기존보다 효과적이고 광범위한 항균 스펙트럼을 갖는 새로운 식품조성물을 제조함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

기존의 항균력과 안전성이 입증된 제품들을 적절하게 배합 및 가공함으로써 항균력이 탁월하게 높고, 내산성과 내열성이 우수하며 광범위한 스펙트럼을 가지는 기능성 식품원료를 개발하여 충치예방 기능성 소재와 식품 보존기간 연장을 위한 다기능성 보존료로서 품질의 안전성과 안정성을 높이고 나아가 완성된 식품의 조향에 지장을 주지 않는 기능성 식품조성물을 제조하고자 한다.

발명의 구성 및 작용

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 키토산, 키토산올리고당 및 자몽종자추출물을 필수적으로 포함하는 탁월한 항균활성이 있는 기능성 식품조성물을 제공한다.

본 발명의 상기한 필수성분 외에 추가가능한 성분으로는 포도씨 추출물, 겨자씨 추출물, 편백나무 추출물, 목련 추출물 등을 들 수 있다.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 키토산, 키토산올리고당 및 자몽종자추출물을 적절하게 배합, 가공함으로써 개개의 항균효능을 더한 것보다 상승적 효능을 갖는 우수한 항균력을 가지는 기능성 식품조성물에 관한 것이다.

본 발명의 식품조성물에 있어서 바람직하게는 분자량이 100,000 내지 1,000,000 인 키토산, 분자량이 3,000 내지 30,000인 키토산올리고당을 사용할 수 있다.

본 발명의 상기 식품조성물의 함량에 있어서, 바람직하게는 키토산 2 내지 90 중량%, 키토산올리고당 5 내지 90 중량% 및 자몽종자추출물 3 내지 40 중량%로 이루어진 조성물을 포함하며, 더욱 바람직하게는 키토산 2 내지 50 중량%, 키토산올리고당 10 내지 70 중량% 및 자몽종자추출물 3 내지 40 중량%로 이루어진 조성물을 포함한다.

상기 식품 조성물은 대장균 (*Escherichia coli*), 살모넬라 타이피뮤리움 (*Salmonella typhimurium*), 바실러스 세레우스 (*Bacillus cereus*), 스타필로코커스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*), 스트렙토코커스 뮤탄스 (*Streptococcus mutans*), 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*), 공장에서 오염 잘되는 효모 및 헬리코박터 피로리 (*Helicobacter pylori*)에 대하여 강한 항균활성을 나타낸다.

특히 본 발명의 조성물은 충치 원인균인 스트렙토코커스 뮤탄스 및 구강, 목의 점막염증 원인균인 구강내 황색 포도상 구균으로 스타필로코커스 아우레우스에 대한 강력한 항균작용을 나타낸다.

또한, 본 발명은 상기 식품조성물 0.001 내지 20 중량%를 껌이나 사탕, 과자류 및 음료에 첨가하여 충치예방효과를 나타내는 충치예방 기능성식품을 제공한다.

또한 본 발명은 항균효과 및 충치예방효과를 나타내는 키토산, 키토산올리고당 및 자몽추출물을 필수적으로 포함하고 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제를 포함하는 식품조성물을 제공한다.

본 발명의 유효성분을 포함하는 조성물은 항균작용 및 충치예방을 위한 약제, 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있다. 본 조성물을 첨가할 수 있는 식 품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 캔디, 과자류, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있다.

본 발명의 키토산, 키토산올리고당 및 자몽추출물은 독성 및 부작용은 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있다.

본 발명의 키토산, 키토산올리고당 및 자몽추출물을 함유하는 식품조성물은 항균 및 충치예방을 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있다. 이 때, 식품 또는 음료 중에 본 발명의 상기 식품조성물의 양은 일반적으로 전체 식품 중량의 0.01 내지 30 중량%로 가할 수 있으며, 껌 또는 캔디에 0.001 내지 20 중량%, 바람직하게는 0.01 내지 10 중량%를

함유할 수 있으며, 생산공정 과정과 제품상에 5 내지 10,000ppm 의 범위 내에서 포함되어 질 수 있다. 음료 조성물에는 100 ㎖를 기준으로 0.02 내지 30 g, 바람직하게는 0.3 내지 1 g의 비율로 본 발명의 식품조성물을 가할 수 있다.

또한, 본 발명은 상기 키토산, 키토산올리고당 및 자몽종자추출물을 필수적으로 함유하는 식품조성물이 제과 · 제빵, 면 종류, 두부, 육가공류, 김치를 포함한 발효식품 등의 식품가공 생산공정 과정이나 완제품 상에서 5 내지 50,000ppm의 농도로 첨가되어, 보존기간을 연장하고, 부패를 방지하며 유통기한을 연장시킬 수 있는 천연보존료 기능을 갖는 식품첨가물을 제공한다.

또한, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 항균활성이 우수한 기능성 식품조성물을 제조하는 방법을 제공한다.

1) 키토산, 키토산올리고당, 유당 및 스테아린산의 분말을 유동층 공정기에 넣고 유동시키는 단계;

2) 에탄올로 희석한 자몽종자추출물을 분사, 혼합공정 단계;

3) 건조, 과립 분말화하는 단계를 포함하는 제조방법을 제공한다.

상기 1단계에서, 키토산은 2 내지 90 중량%, 키토산올리고당은 5 내지 90중량%, 유당은 10 내지 50 중량%, 스테아린산은 0.1 내지 3 중량%을 함유하며, 유동층 공정기 공정의 작업조건은 유동입자 온도 25 내지 80℃, 배출압 0.1 내지 1.5 바(bar) 범위 내에서 시행하고, 2단계에서 자몽종자추출물은 3 내지 40 중량%를 사용하고, 혼합공정의 액상 분사조건은 분사압력 1.0 내지 3.0 바(bar) 범위 내에서 시행하여 제조할 수 있다.

본 발명은 이하 실시예 및 실험예로써 상세히 설명하지만, 본 발명의 기술적 범위가 이들 실시예 및 실험예에 의해 어떤 식으로든 제한되는 것은 아니다.

실시예 1. 키토산, 키토산올리고당, 자몽종자추출물을 함유한 기능성 식품조성물 제조

유동층 공정기(청진산업, Type FBG-100)에 분자량이 3,000 내지 30,000정도의 키토산올리고당(키토라이프, FACOS) 31 중량%, 100,000 내지 1,000,000 범위의 키토산(자광, JK-F 또는 JK-HFP) 12 중량%, 유당(화일) 31 중량%의 분말을 넣고 분말 유동 입자 온도는 35 내지 55℃, 배출압은 0.4 내지 0.7 바(bar) 범위에서 유동시키며 분말을 혼합하였다.

분말혼합물에 분사될 액상은 자몽종자 추출물(에프에이뱅크, DF-100) 25 중 량%를 에탄올로 희석하여 분사가 잘 될 수 있도록 하였다. 액상의 분사압력은 2.0 내지 3.0 바(bar) 범위이며, 분사량은 점도와 관련하여 적정량을 셋팅, 분사하여 분말혼합물을 과립화하였으며, 적정 수분 함유량까지 건조하였다. 용도에 따라 건조된 과립은 고속혼합기(미원중기, 20L용)로 분쇄하여 분말화하여 제조하였다.

실시예 2. 기능성식품조성물을 첨가한 자일리톨 껌 제조

자일리톨 껌 한개당 각각 10㎎, 20㎎ 첨가하여 당업계의 공지의 방법으로 제조하였다.

실시예 1의 기능성 식품조성물 0.5g 또는 1g, 껌베이스 90g, 솔비톨 200g, 연화제 1g, 자일리톨 3g, 유화제 12g을 60 내지 70℃로 예비 가열한 믹서에 넣어 혼합한 후, 믹서내부 온도를 55℃로 유지시키면서 페퍼민트 향료를 9g 첨가한 다음 30분 혼합한 다음 추출하여 압연하였다. 그 후 24-48시간 숙성시킨 후 재단하고 포장하여 본 발명의 식품조성물을 함유한 자일리톨 껌을 제조하였다.

실험예 1. 항균력 시험 1

실시예 1에서 제조된 식품조성물을 사용하여 여러 균에 대한 항균활성을 시험 분석하였다.

각각의 균주에 따라 사용한 배지는 다르며, 실험에 사용된 균주와 배지 그리고 배양온도 등은 아래 표 1과 같다. 균주 배양은 액체배지에 접종하여 OD_{600} 에서 1.0이 될 때까지 배양한 후 각각의 균주가 평판배지상에서 약 10^4 cfu/㎖이 되게 증류수로 희석을 하였다.

실시예 1의 방법으로 제조한 기능성 식품조성물과 자몽종자추출물, 키토산은 각각 증류수에 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1,000, 1,500, 2,000, 5,000, 10,000ppm의 농도로 제조하여 사용하였다

상기의 시료들 (기능성 식품조성물, 자몽종자추출물(DF-100), 키토산) 100 ㎕ 와 균주 희석액 100 ㎕를 혼합하여 2분간 반응시킨 후, 각각의 혼합액 200 ㎕를 표 1에 나열된 각 균주에 적합한 배지에 도말하였으며, 시료당 3매씩 배지

에 도말하고 각 균주의 적정배양온도에서 24시간 배양하였다. 배양 후, 평판배지 상에서 균수를 세어 최소저해농도값을 구하였으며, 결과는 표 2와 같다

[표 1]

균 주	KCTC No.	배양 온도 (℃)	그람 (+/-)	카테고리	배지
대장균 (*Escherichia coli*)	1682	37	-	세균	트립틱 소이 한천 (Tryptic Soy Agar)
살모넬라 타이피뮤리움 (*Salmonella typhimurium*)	1925	37	-	세균	영양 한천 (Nutrient Agar)
스타필로코커스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*)	1621	37	+	세균	트립틱 소이 한천 (Tryptic Soy Agar)
스트렙토코커스 뮤탄스 (*Streptococcus mutans*)	3065	37	+	세균	뇌 심장 주입 한천 (Brain Heart Infusion Agar)
칸디다 알비칸스 (*Candida albicans*)	7965	30		효모	YM 한천 (YM Agar)
공장에서 오염잘되는 효모		30		효모	YM 한천 (YM Agar)

[표 2]

		기능성 식품조성물 (실시예 1)		자몽종자추출물 (DF-100)		키토산	
		옥분첨가 (10분반응)	옥분 무첨가 (2분반응)	옥분 첨가 (10분반응)	옥분 무첨가 (2분반응)	옥분 첨가 (10분반응)	옥분 무첨가 (2분반응)
그람음성 박테리아	대장균 (*Escherichia coli*)	3,000	1,000	5,000	1,500	항균력 없음	항균력 없음
	살모넬라 타이피뮤리움 (*Salmonella typhimurium*)	3,000	1,000	5,000	1,000	항균력 없음	항균력 없음
그람양성 박테리아	스타필로코커스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*)	800	400	2,000	1,000	항균력 없음	항균력 없음
	스트렙토코커스 뮤탄스 (*Streptococcus mutans*)	500	200	3,000	1,000	10,000	10,000
효모	칸디다 알비칸스 (*Candida albicans*)	200	25	10,000	200	500	50
	공장에서 오염 잘되는 효모	200	25	10,000	1,000	5,000	2,000

[표 3]

		기능성 식품조성물 (실시예 1)	자몽종자추출물 (DF-100)	키토산
옥분 첨가	2분 반응	2,000	5,000	항균력 없음
	5분 반응	1,000	2,000	항균력 없음
옥분 무첨가	2분 반응	400	1,000	항균력 없음
	5분 반응	200	500	항균력 없음

이상의 결과에서 보듯이, 본 기능성 식품조성물은 기존의 천연항균제인 자몽종자추출물의 항균력에 비해 그람 음성균에서 옥분을 첨가한 경우, 약 2배 정도의 항균력을 지닌다. 그러나, 옥분을 첨가하지 않은 경우에는 비슷한 항균력을 가진다. 그러나, 그람 양성균에서 옥분을 첨가한 경우에는 자몽종자추출물에 비해 2.5배 내지 6배 정도의 항균력을 가지며 옥분을 첨가하지 않는 경우에 약 2.5배 내지 4배 정도의 증가된 항균력을 보여준다. 특히, 효모균인 경우 본 기능성 식품조성물의 항균력은 자몽종자추출물에 비해 약 50 내지 100배 정도의 매우 높은 항균력을 보인다. 이는 기존의 효모균에 대한 천연항균제로 사용돼 오던 키토산에 비해서도 약 2배 내지 80배에 해당하는 증가된 항균력을 지닌다. 본 결과로 미루어 보면 본 기능성 식품조성물은 상당히 광범위한 미생물에 대해 높은 항균력을 지니며 외부에서 첨가된 타 식품 즉, 옥분이나 소맥분의 영향을 적게 받으면서 소기의 미생물 제거효과를 나타낼 수 있음을 보여준다. 특히, 본 조성물에 첨가된 키토산이나 자몽종자추출물의 양에 비해 본 기능성 식품조성물이 월등한 항균력을 보유하고 있음은 이들의 적절한 배합과 공정과정으로 인해 항균력의 상승효과가 발생하였음을 예상할 수 있다. 더구나, 본 기능성 식품조성물은 기존의 자몽종자추출물이나 키토산의 강한 쓴맛이나 떫은 맛에 비해 상당히 부드러운 맛을 지니기 때문에 식품에 첨가하였을 때 전체 조향에 거의 영향을 주지 않는다.

실험예 2. 항균력 시험 2

본 발명의 항균력이 우수한 기능성 식품조성물에 대한 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 및 헬리코박터 피로리(*Helicobacter pylori*) 균의 억제효능을 알아보기 위하여 서울여대 항생제 내성균주 센터에 두 균에 대한 항균 력을 의뢰하였다. 시료 4가지 중에 SC1과 SC3는 대조군으로 각각 키토산올리고당과 키토산 분말이며, SC2와 SC4는 본 발명의 실시예 1 조성물을 사용하였다.

2-1. 1차 항균력 검색 실험

4가지 시료를 각각 멸균 증류수로 녹였다. 여과지(Whatman AA disc filter, 와트만사)에 4개의 시료 각각을 200, 100, 50, 25 μg이 되게 점적하였다. 스타필로코커스 아우레우스균주로 ATCC 29212 및 CCARM 3091을 사용하고, 헬리코박터 피로리균주로 ATCC 43504 및 임상분리균주를 배양하여 신선한 배양액을 준비한 후, 뮬러 힌톤 한천 배지(Muller hinton agar plate) 와 스키로우 한천배지(Skirrow's agar plate)에 각각의 배양액을 도말하였다. 각각의 배지 위에 시료를 점적한 여과지를 올려놓고 각각 24 시간 및 72시간 배양 후 여과지 주변에 스타필로코커스 아우레우스균의 성장이 억제된 억제대의 지름(㎜)을 측정하였으며, 결과는 표 4 에 나타내었다.

[표 4]

농도	200μg				100μg				50μg				25μg			
시료 균주	SC1	SC2	SC3	SC4	SC1	SC2	SC3	SC4	SC1	SC2	SC3	SC4	SC1	SC2	SC3	SC4
ATCC 29212	0	12	0	12	0	10	0	10	0	8	0	8	0	0	0	0
CCARM 3091	0	10	0	9	0	7	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0

ATCC 43504	0	27	0	23	0	24	0	19	0	20	0	16	0	15	0	12
임상 분리주	0	20	0	19	0	18	0	18	0	15	0	16	0	12	0	13

2-2. 2차 항균력 검색 실험

1차 실험에서 얻은 항균력 실험의 결과로부터 항균력의 정도에 따라 농도를 달리하여 각 시료의 스타필로코커스 아우레우스균 및 헬리코박터 피로리균에 대한 최소억제농도(㎍/㎖)를 측정하였다. 이때 NCCLS(National Committee of Clinical Laboratory Standard, 2000)의 방법에 따라 수행하였다. 그리고 사용 균주는 상기 1차 실험에서와 동일하였다. 표 5의 결과에서 보면 알 수 있듯이 SC2와 SC4인 본 기능성 식품조성물은 항생제 감수성 스타필로코커스 아우레우스인 경우 128 ㎍/㎖, 항생제 내성 스타필로코커스 아우레우스의 경우 256 ㎍/㎖, 헬리코박터 피로리균의 경우 32 ㎍/㎖ 에서 90%의 억제력을 보이는 것으로 나타났다. 반면에, 키토산올리고당(SC1)과 키토산(SC3)의 경우, 단독으로 사용되었을 때 항균력이 매우 저조함을 보였다.

[표 5]

시료 균주	SC1	SC2	SC3	SC4
ATCC 29212	≥2048	128	??2048	128
CCARM 3091	≥2048	256	??2048	256
ATCC43504	≥2048	32	??2048	32

실험 예 3. 옥분 첨가시 시료의 항균력에 미치는 영향 비교

기존의 자몽종자 추출물(DF-100)은 시험관내 실험(*in vitro*)상에서 균주와 직접 접촉하였을 때 광범위한 스펙트럼에서 상당히 좋은 항균력을 가진다는 것은 여러 데이터에 의해 잘 알려져 있으며, 많은 식품회사 등에서 생산공정 상에서 폭넓게 사용되어지고 있다. 하지만, 제과 · 제빵 등의 공정상에 직접 첨가되어 현장에 적용되어질 때는 기존에 시험관내 실험상에서 보여준 결과에 비하여 상당히 저하된 항균력을 나타내며, 자몽종자추출물(DF-100) 자체의 맛과 색이 너무 강하기 때문에 공정 상에 투입되는 농도에도 한계를 보여준다.

본 발명의 항균력이 우수한 기능성 식품조성물은 자몽종자추출물의 이러한 단점을 극복하여 개발되어졌다. 본 실험은 제과 · 제빵 등에 가장 많은 원료로 첨가되는 옥분이나 소맥분 첨가시 자몽종자추출물과의 항균력에 미치는 영향을 비교하였다. 사용되어진 균주는 제과공장에서 가장 잘 오염되는 효모 균주를 동정하여 실험을 수행하였다.

실험 방법은 옥분 2.8%에 실시예 1의 조성물 또는 자몽종자추출물(DF-100)이 1000 ppm 되게 첨가한 용액을 제조하였다. 여기에 공장에서 잘 오염되는 효모 배양액을 적정 희석하여 2×10^{4} cfu/㎖이 되게 만든 후, 위에서 제조한 용액과 1:1 비율로 섞은 후 실온에서 2분, 5분, 10분 반응시켰다. 반응한 용액을 배지에 도말하여 30℃에서 24시간 배양하였으며, 소맥분 1.8%도 옥분과 동일한 방법으로 실험을 수행하였다.

상기 실험결과는 도 1에서 알 수 있듯이 자몽종자추출물은 옥분 2.8%와 소맥분 1.8%를 첨가하였을 때, 항균력이 전혀 나타나지 않았으며, 실시예 1의 조성물은 거의 99% 이상의 항균력을 나타내었다. 이는 본 발명의 조성물이 자몽종자추출물과 키토산, 키토산올리고당의 적절한 배합에 의해 항균효과가 상승작용을 크게 나타내었음을 알 수 있다. 그람양성세균인 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)인 경우에도 옥분이나 소맥분이 첨가되는 경우, 자몽종자추출물의 항균력은 대부분 사라지는 반면, 실시예 1의 조성물은 이런 식품 재료들이 첨가되어도 항균력에는 거의 영향을 미치지 않았다(실험결과 표시안함).

실험예 4. 껌에 첨가시 충치예방 효능시험 (임상실험)

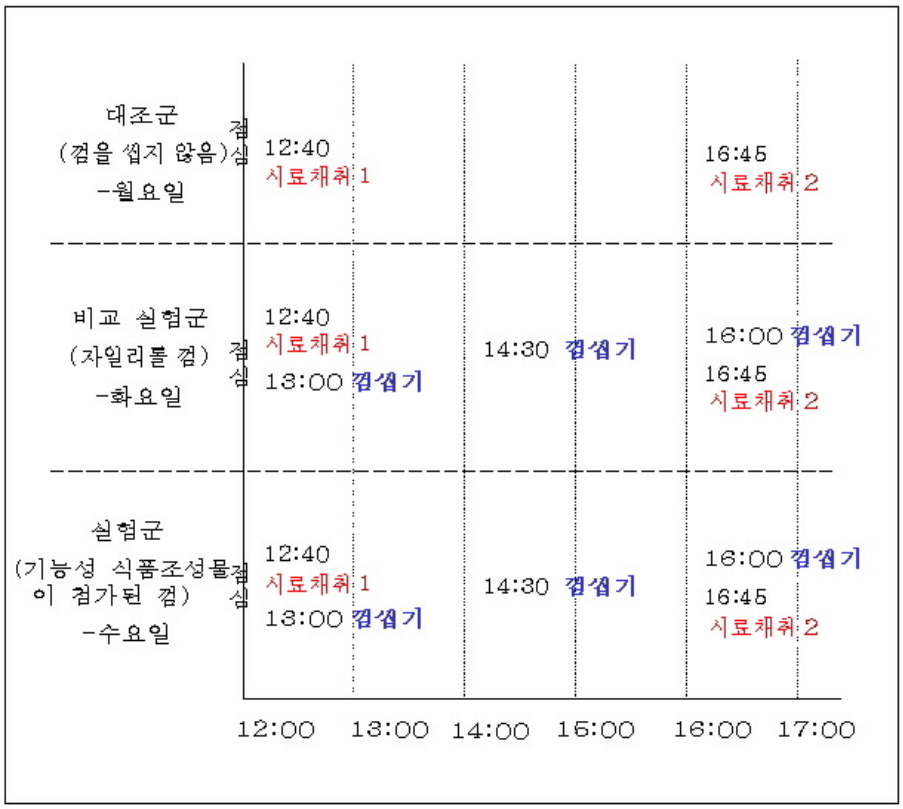
본 발명의 항균력이 우수한 기능성 식품조성물을 자일리톨 껌 한개당 각각 10 mg, 20 mg 첨가한 실시예 2의 조성물로 구강내 세균의 억제효능시험을 임상실험으로 수행하였다. 임상실험한 사람의 평균연령은 22.5세였으며 남녀비율은 50%, 사람 수는 24명이였다. 임상실험은 세가지 방법으로 수행하였으며, 각각의 임상실험 방법은 다음과 같다.

임상실험 예 1 .

아래 표 6과 같은 방법으로 임상실험을 수행하였으며, 점심을 먹고 양치질을 하지 않은 상태에서, 물 20㎖로 30초간 입안을 잘 헹군 후 뱉어내는 방법으로 시료를 채취하였다. 1시간 30분 간격으로 본 실시예 1의 조성물이 껌 한 개당 10 mg 들어있는 껌을 한번에 3알 씹고 15분간 씹은 후 뱉어낸 다음, 4시간 만에 다시 상기와 같은 방법으로 2차 시료를 채취하여, 채취한 시료를 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} 희석하여 각각의 희석액을 100 ㎕씩 BHI(brain heart infusion) 평판배지에 3매씩 도말하여 콜로니수를 측정하였다.

[표 6]

1차 임상실험 모식도



시료채취 : 물 20ml로 30초간 입안을 잘 헹군 후 뱉음
껌 씹기 : 나누어 준 껌 3알을 한번에 15분간 씹고 뱉음

상기 결과는 도 2에서 알 수 있듯이 양치질을 하지 않은 경우 구강 내 세균의 개체수는 약 4시간 만에 2.9배 증가하였다. 또한, 양치질을 하지 않고 자일리톨 껌을 씹은 그룹은 4시간동안 구강 내 세균의 개체수가 1.7배 증가하였으며, 양치질을 하지 않고, 실시예 1의 기능성 식품조성물이 첨가된 껌을 씹은 그룹은 4시간 동 안 구강 내 세균의 개체수가 오히려 27% 감소하였다. 본 발명의 기능성 식품조성물이 첨가된 껌은 대조군에 비해 구강 내 세균의 수를 약 1/4로 감소시키고 자일리톨 껌군에 비해서는 1/2.3로 감소시켰다.

구강세균 억제효능의 계산방법은 개인 각각의 시료 1 구강세균 균수를 100%로 보았을 때, 시료 2에 대한 구강세균 증감율로 계산하였으며, 각 개인 증감율을 평균하여 그래프로 나타낸 것이다.

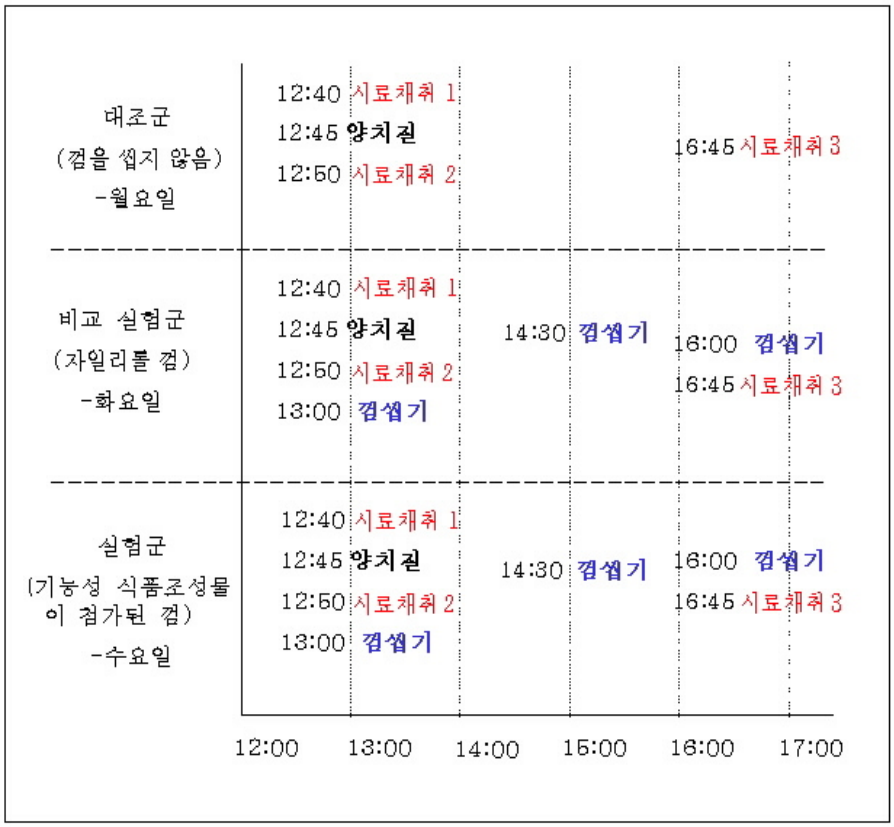
임상실험 예 2 .

아래 표 7과 같은 방법으로 임상실험을 수행하였으며, 점심을 먹고 양치질을 한 후에 시료를 채취하고 1시간 30분 간격으로 본 식품조성물이 껌 한 개당 10 mg 들어있는 껌을 한번에 3알 씹고 4시간 만에 2차 시료를 채취하여 채취한 시료를 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} 희석하여 각각의 희석액을 100 ㎕씩 BHI 평판배지에 3매씩 도말하여 콜로니

수를 측정하였다.

[표 7]

2차 임상실험 모식도



시료채취 : 물 20ml로 30초간 입안을 잘 헹군 후 뱉음

껌 씹기 : 나누어 준 껌 3알을 한번에 15분간 씹고 뱉음

상기 2차 임상실험 결과는 도 3에서 알 수 있듯이 양치질을 하고 난 후 약 4시간 후에는 구강 내 세균의 개체수가 11.7배로 증가하였다. 양치질을 하고 난 후 자일리톨 껌을 씹은 그룹에서는 4시간 후의 구강 내 세균의 개체수가 3.6배 증가하였으며, 양치질을 하고 난 후 본 발명의 기능성 식품조성물이 첨가된 껌을 씹은 그룹에서는 구강 내 세균의 개체수가 1.8배 증가하였다. 양치질을 하면 양치질하기 전에 비해 구강 내 세균의 수가 약 1/4로 감소하지만 대조구에서처럼 약 4시간 후에는 급격하게 개체수가 증가하여 양치질하기 전의 세균수에 비해 약 3배 정도 증가하였다. 양치질을 하고 본 발명의 기능성 식품조성물이 첨가된 껌을 씹으면 껌을 전혀 씹지 않은 대조구에 비해 구강 내 세균의 수를 1/6정도로 감소시킴으로써 양치질 후의 청결상태에는 미치지 못하나 양치질 한 직후의 세균 수에 비해 단지 1.8배 세균 수가 증가함에 그쳤다.

구강세균 억제효능의 계산방법은 양치질 후 개인 각각의 시료 1 구강세균 균수를 100%로 놓았을 때, 시료 2에 대한 구강세균 증감율로 계산하였으며, 각 개인 증감율을 평균하여 그래프로 나타낸 것이다.

<u>임상실험 예 3.</u>

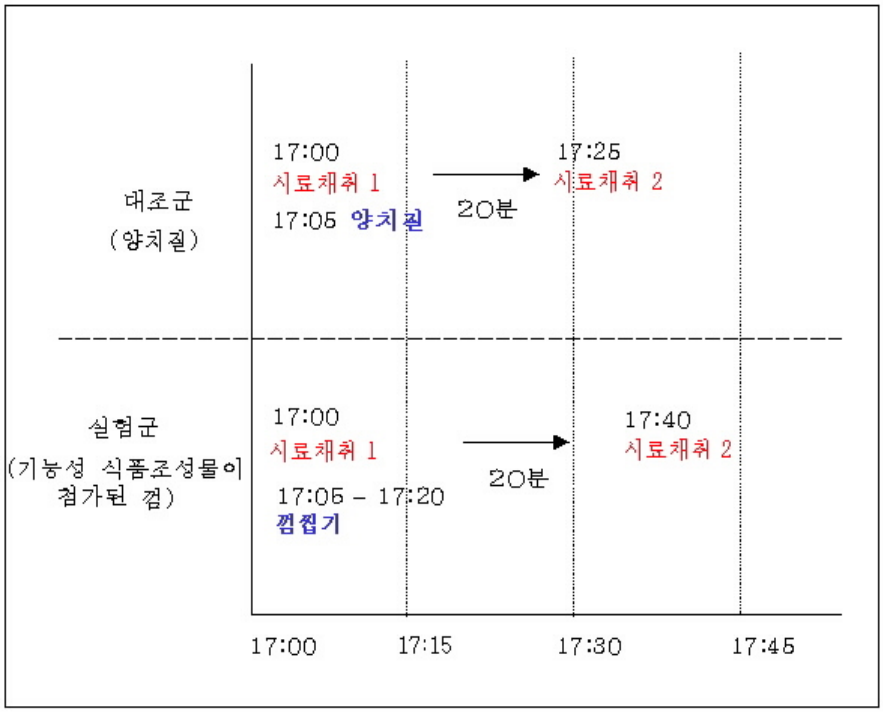
아래 표 8과 같은 방법으로 임상실험을 수행하였으며, 3차 임상실험에서는 단지 양치질과의 비교실험으로써 양치질 전과 후, 기능성 식품조성물이 첨가된 껌(20 mg/타블렛) 2알을 씹기 전과 후에 시료를 채취하여 채취한 시료를 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} 희석하여 각각의 희석액을 100 ㎕씩 BHI 평판배지에 도말하여 콜로니수를 측정하였다.

3차 임상실험 결과는 도 4에서 알 수 있듯이 양치질 전, 후와 기능성 식품조성물이 첨가된 껌(20 mg/타블렛) 2알을 씹은 전, 후의 구강 내 균의 변화를 비교한 결과 양치질 후의 구강내 균은 양치질 전과 비교했을 때 약 65% 감소하였으며, 기 능성 식품조성물이 첨가된 껌을 씹은 후에는 전과 비교했을 때 약 36% 감소하였다. 결국, 양치질 한 효과와 기능성 식품조성물이 첨가된 껌을 씹은 효과를 비교하면 기능성 식품조성물이 첨가된 껌을 씹은 효과는 양치질로 인한 구강내 균 제거효과의 약 절반에 해당하는 균 제거효능을 보였다.

구강세균 억제효능의 계산방법은 개인 각각의 시료 1의 구강세균 균체수를 100%로 놓았을 때, 시료 2에 존재하는 구강세균에 대한 균체수 증감율로 계산하였으며, 이들 각 개인들의 증감율을 평균하여 그래프로 나타낸 것이다.

[표 8]

3차 임상실험 모식도



시료채취 : 물 20ml로 30초간 입안을 잘 헹군 후 뱉음

껌 씹기 : 나누어 준 껌 2알을 한번에 15분간 씹고 뱉음

실험예 5. 급성독성 단회 투여 실험

본 발명의 항균력이 우수한 기능성 식품조성물에 대한 안전성 실험을 위하여 급성독성 실험을 수행하였다. 실험동물은 6주령의 웅성 ICR 마우스를 사용하였으며, 평균체중은 26 - 30 g 범위이며, 급성독성 실험 전 24시간 전에 금식을 시켰으며, 본 기능성 식품조성물을 50 mg/㎖, 10 mg/㎖, 1 mg/㎖의 농도로 2 ㎖씩 경구투여 후 9일간 관찰하였다. 아래 표 9의 결과와 같이, 모두에서 사망한 예가 한 마리 도 없었고 외견상 대조군과 별다른 증상을 찾아볼 수 없었다.

[표 9]

구분	기능성 식품조성물 농도 (2 ㎖/마우스)		
	50 mg/㎖	10 mg/㎖	1 mg/㎖
증상	없음	없음	없음
사망수 / 실험수	0/10	0/10	0/10

실험 예 6. 기능성 식품조성물의 내산성 실험

본 발명의 항균력이 우수한 기능성 식품조성물에 대한 내산성 실험은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 본 발명의 기능성 식품조성물을 2% 농도로 증류수에 녹인 후 (pH 7.0) 염산으로 pH를 2, 4, 6이 되게 각각 조정하여 실온에서 1시간 동안 방치하였다. 1시간 후에 수산화나트륨으로 다시 pH가 7이 되게 조정하고, 각각의 pH에서 1시간 동안 방

치한 기능성 식품조성물을 1/100 희석하여 0.02% (200ppm)가 되게 하였다. 세균배양액(*Staphylococcus aureus*)을 희석하여 약 2×10 ⁴ cfu/㎖이 되게 하였다. 각각의 기능성 식품조성물(200ppm) 100㎕를 세균배양액 100㎕와 섞은 후 실온에서 2분간 방치한 후 TSA(Tryptic Soy Agar) 평판배지에 도말한 후 37℃에서 24시간 배양하여 균수를 세어 pH 변화에 의한 항균력 변화를 알아보았다.

아래 표 10은 기능성 식품조성물의 내산성 실험결과이며, 이러한 결과에서 알 수 있듯이 강산성에서도 전혀 항균력의 변화가 없음을 알 수 있었다. 이러한 결과는 강산성 환경이 항균효능에 어떠한 영향도 미칠 수 없음을 알 수 있었다.

[표 10]

	대조군	pH 2	pH 4	pH 6	pH 7
균 수	2668 2681 2723	247 267 274	204 216 234	194 208 223	198 201 211
생존율(%)	100	9.5	8.1	7.7	7.6
항균효능(%)	0	90.5	91.9	92.3	92.4

실험예 7. 기능성 식품조성물의 내열성 실험

본 발명의 항균력이 우수한 기능성 식품조성물에 대한 내열성 실험은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 본 발명의 기능성 식품조성물을 2% 농도로 녹인 후 항온 수조기를 각각 40, 60, 80, 100℃로 맞추어 1시간 동안 반응시켰으며, 121℃에서의 내열성 실험은 멸균기로 15분간 가열하였다. 각 온도별로 가열시킨 기능성 식품조성물을 적정 희석한 용액 100㎕와 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*) 희석액 100㎕를 상온에서 10분간 혼합한 후 YPD 평판배지(1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose, 1.5% agar)에 도말하여 배양하였다.

결과는 아래 표 11과 같으며, 이러한 결과에서 알 수 있듯이 121℃의 높은 온도에서도 전혀 항균력의 변화가 없음을 알 수 있었다. 이러한 결과는 식품의 가공 공정상의 높은 온도에서도 본 발명의 항균효능에 거의 영향을 미칠 수 없음을 나타낸다.

[표 11]

	대조군 (0ppm)	대조군 (100ppm)	40℃ (100ppm)	60℃ (100ppm)	80℃ (100ppm)	100℃ (100ppm)	121℃ (100ppm)
균 수	2450 2601 2235	37 41 27	33 45 28	36 39 31	45 76 54	65 81 53	74 56 46
항균효능(%)	0	98.6	98.6	98.6	97.6	97.3	97.6

본 발명의 식품조성물은 아래와 같은 제조예로 이용될 수 있으며, 아래의 제조 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 이에 의해 본 발명의 내용이 제한되는 것은 아니다.

제조예 1. 캔디의 제조

말티톨 55g

환원물엿 44.5g

키토산 0.1g

키토산올리고당 0.2g

자몽종자추출물 0.1g

천연허브향 0.1g

상기한 원료를 배합하여 보통의 캔디 제조방법으로 캔디를 제조하면 충치 예방에 효과적인 캔디를 얻을 수 있다.

제조예 2. 음료의 제조

실시예 1의 식품조성물 1000 ㎎

구연산 1000 ㎎

올리고당 100 g

매실농축액 2 g

타우린 1 g

정제수를 가하여 전체 900 ㎖

통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간동안 85 에서 교반 가열한후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 음료 조성물 제조에 사용한다.

상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 수요계층, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

발명의 효과

본 발명으로부터 제조한 키토산올리고당과 키토산 및 자몽종자추출물을 이용한 항균력이 우수한 광범위한 기능성 식품 조성물은 충치예방 효능을 나타내고, 제과 · 제빵, 김치류 등을 포함한 다양한 식품류에 첨가되는 원료물질과 섞어도 기존의 천연항균제와 확연히 구별되는 항균력을 유지하고 있으며, 광범위한 스펙트럼의 균에 대한 항균효능이 있고 내산성 및 내열성이 우수하여 식품 가공 생산 공정 개선의 용도로도 사용되어 질 수 있는 등 폭 넓은 응용이 가능하다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.
키토산, 키토산 올리고당 및 자몽종자 추출물을 필수적으로 포함하는 항균활성을 갖는 기능성 식품조성물.

청구항 2.
제 1항에 있어서, 추가적으로 포도씨 추출물, 겨자씨 추출물, 편백나무 추출물, 목련 추출물로부터 선택된 하나이상의 성분을 포함하는 식품조성물.

청구항 3.
제 1항에 있어서, 키토산은 2 내지 50 중량%, 키토올리고당은 10 내지 70 중량%, 자몽종자추출물은 3 내지 40 중량% 인 식품조성물.

청구항 4.
제 1항에 있어서, 키토산은 분자량이 100,000 내지 1,000,000 범위이고, 키토산올리고당은 분자량이 3,000 내지 30,000 범위인 식품조성물.

청구항 5.
항균 활성을 가진 제 1항의 식품조성물을 전체 식품중량에 대하여 0.001 내지 20 중량%를 함유하는 충치예방을 위한 과자류.

청구항 6.
제 5항에 있어서, 과자류는 츄잉껌, 캔디, 정과인 과자류.

청구항 7.
항균활성을 갖는 제 1항의 식품조성물을 5 내지 50,000 ppm의 농도로 식품 대량생산 공정 상이나 완제품 상에 첨가하여 보존기간을 연장시키거나, 부패를 방지하는 천연보존료의 기능을 갖는 식품첨가물.

청구항 8.
제 7항에 있어서, 식품은 제과, 제빵, 면류, 발효식품, 육가공식품, 두부, 김치인 식품첨가물.

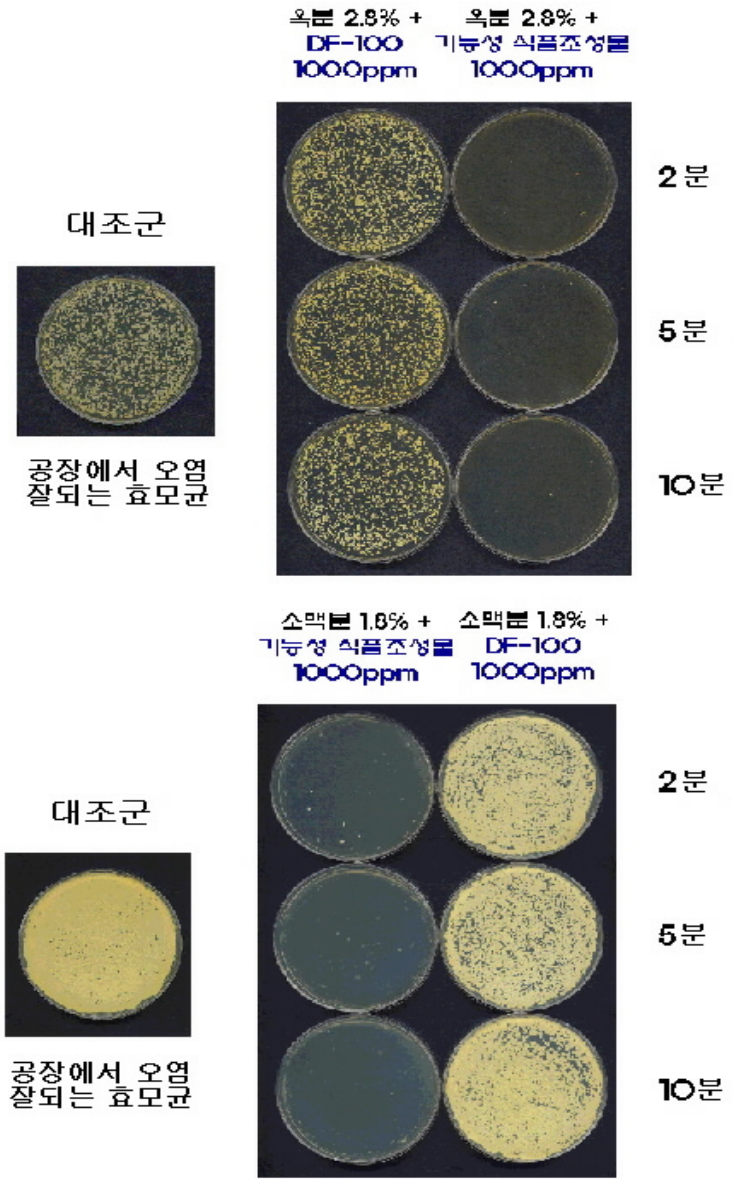
청구항 9.
1) 키토산 2 내지 90중량%, 키토산올리고당 5 내지 90중량%, 유당 10 내지 50 중량% 및 스테아린산 0.1 내지 3 중량% 의 분말을 유동층 공정기에 넣고 유동입자 온도 25 내지 80℃, 배출압 0.1 내지 1.5 바 범위 내에서 유동시키는 단계;

2) 에탄올로 희석한 자몽종자 추출물을 액상분사조건인 분사압력 1.0 내지 3.0 바 범위 내에서 분사 및 혼합하는 공정 단계;

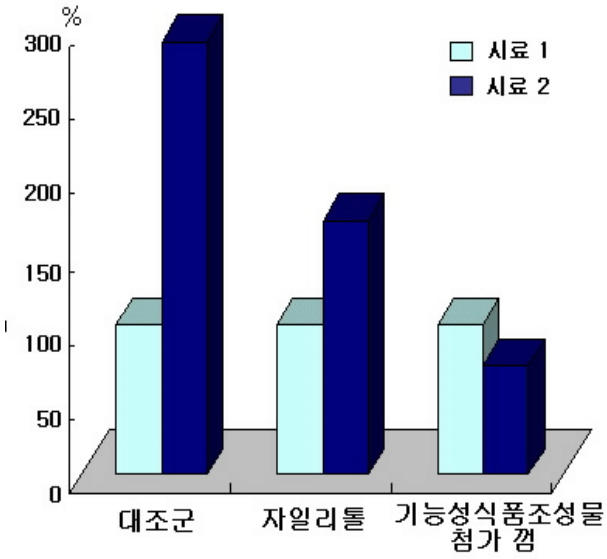
3) 건조, 과립 분말화하는 단계를 포함하는 제 1항의 식품조성물의 제조방법.

도면

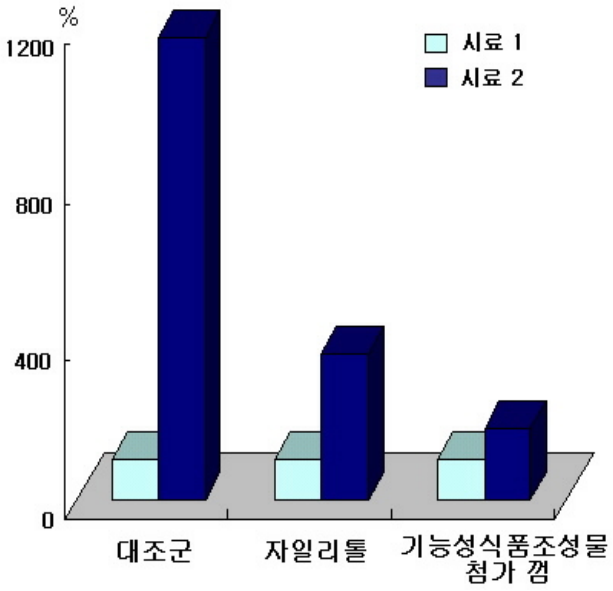
도면1


옥분 2.8% + DF-100 1000ppm
옥분 2.8% + 기능성 식품조성물 1000ppm
2분
5분
10분
대조군
공장에서 오염 잘되는 효모균
소맥분 1.8% + 기능성 식품조성물 1000ppm
소맥분 1.8% + DF-100 1000ppm
2분
5분
10분
대조군
공장에서 오염 잘되는 효모균

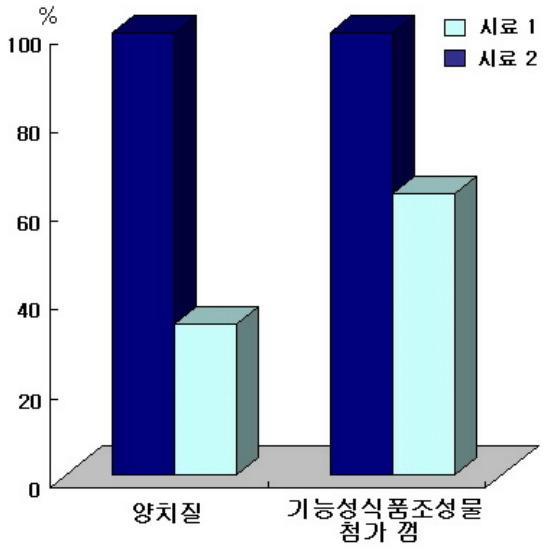
도면2


%
300
250
200
150
100
50
0
시료 1
시료 2
대조군
자일리톨
기능성식품조성물 첨가 껌

도면3


%
1200
800
400
0
시료 1
시료 2
대조군
자일리톨
기능성식품조성물
첨가 껌

도면4


%
100
80
60
40
20
0
시료 1
시료 2
양치질
기능성식품조성물
첨가 껌