



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0132993
(43) 공개일자 2009년12월31일

(51) Int. Cl.

C01B 11/02 (2006.01) *C01B 11/08* (2006.01)
C02F 1/50 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0059226

(22) 출원일자 2008년06월23일

심사청구일자 2008년06월23일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자

류지훈

서울 성북구 돈암동 성일우리미 아파트 101동 902호

김희경

고려대학교 생명과학대학 녹지관 434호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이문섭

전체 청구항 수 : 총 8 항

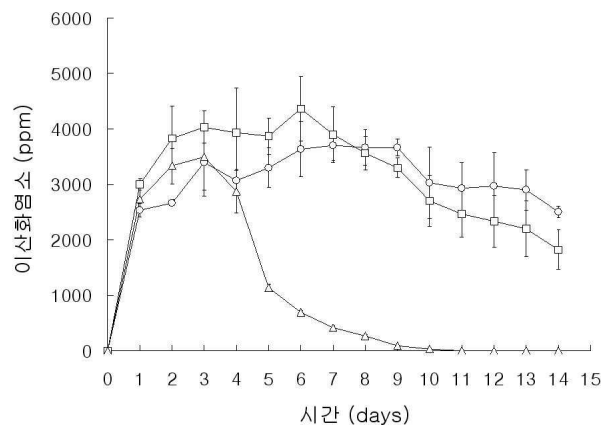
(54) 저장성과 살균 활성이 향상된 이산화염소 용액의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 유기산 용액에 수산화나트륨(NaOH)을 첨가하여 pH 4 내지 6으로 조정된 유기산 용액을 만드는 단계 및 상기 pH가 조정된 유기산 용액에 아염소산나트륨(NaClO_2)을 첨가하고 상온에서 반응시키는 단계를 포함하는, 저장성 및 살균 활성이 향상된 유기산-기반 이산화염소 용액의 제조방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 유기산과 아염소산나트륨을 이용하여 이산화염소를 제조할 때 pH를 4-6으로 조절하게 되면, 장기간 저장이 가능하고 포자에 대한 보다 강한 살균력을 가지는 이산화염소를 제조할 수 있으므로, 본 발명의 방법에 따라 제조된 유기산-기반 이산화염소는 식품안전 분야에서 살균소독제로서 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

강영지

고려대학교 생명과학대학 녹지관 434호

방지현

울산 남구 달동 583-11번지

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R0702291

부처명 농촌진흥청

연구사업명 농업특정연구

연구과제명 (1세부주관) 웰빙 새싹채소의 최소가공 및 포장과정중의미생물학적 안전성확보에 관한 연구

주관기관

연구기간 2007년3월1일 ~ 2007년12월31일

특허청구의 범위

청구항 1

유기산 용액에 수산화나트륨(NaOH)을 첨가하여 pH 4 내지 6으로 조정된 유기산 용액을 만드는 단계 및 상기 pH가 조정된 유기산 용액에 아염소산나트륨(NaClO_2)을 첨가하여 반응시키는 단계를 포함하는, 저장성 및 살균 활성이 향상된 유기산-기반 이산화염소 용액의 제조방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 유기산은 아세트산, 시트르산 또는 젖산인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 유기산 용액은 1-20 wt%로 희석된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 수산화나트륨(NaOH)은 0.1-10 N의 수산화나트륨 수용액 형태로 첨가되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 반응은 20-30℃에서 100-200rpm으로 교반하면서 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 살균 활성은 포자 형성균(endospore-forming bacteria)에 대한 살균 활성인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 포자(endospore)는 바실러스 세레우스 포자인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 1항에 따른 방법으로 제조된 유기산-기반 이산화염소 용액을 포함하는 포자 형성균의 살균용 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

<1> 본 발명은 저장성과 살균 활성이 향상된 이산화염소 용액의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 유기산 용액에 수산화나트륨(NaOH)을 첨가하여 pH 4 내지 6으로 조정된 유기산 용액을 만드는 단계 및 상기 pH가 조정된 유기산 용액에 아염소산나트륨(NaClO_2)을 첨가하고 상온에서 반응시키는 단계를 포함하는, 저장성 및 살균 활성이 향상된 유기산-기반 이산화염소 용액의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

<2> 수용성 이산화염소(chlorine dioxide, ClO_2)는 음료공장과 식품 제조, 취급 및 저장 공장에서 살균제로 사용되고 있고(U.S. Environmental Protection Agency, 2007), 식품가공 설비용 소독제로도 사용되고 있다(U.S. Food and Drug Administration, 1977). 넓은 pH 범위에서의 이산화염소의 살균력, 빠른 작용(Bernarde et al., 1965 and 1967; McGuire and Dishinger, 1984; Rav-Acha, 1984) 및 유기물과의 제한된 반응(Richardson et al., 1994 Long et al., 1999) 때문에, 이산화염소는 대장균(*Escherichia coli*) 0157:H7, 엔테로박터 사카자키(*Enterobacter sakazakii*), 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*), 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*), 그리고 바실러스 투링기엔시스(*B. thuringiensis*)를 살균하는데 효과적으로 사용되고 있다

(Han et al., 2001; Singh et al., 2002; Beuchat et al., 2004; Rodgers et al., 2004; Ryu and Beuchat, 2005; Kim et al., 2006). 그러나, 살균소독제로서 이산화염소의 단점 중 하나는 제조와 저장 시 불안정성이다. 이산화염소의 낮은 안정성 때문에, 이산화염소는 현장에서 제조되어야 하고 장기간 저장이 어렵다.

- <3> 수용성 이산화염소를 제조하는 전통적인 방법 중 하나는 반응물로서 아염소산나트륨(sodium chlorite, NaClO₂)과 염산(HCl)을 사용한다:
- <4> $5\text{NaClO}_2 + 4\text{HCl} \rightarrow 4\text{ClO}_2 + 5\text{NaCl} + 2\text{H}_2\text{O}$
- <5> 생성된 이산화염소의 양은 염산에 함유된 수소이온의 빠른 해리를 통해 최대 농도에 도달한다. 만약 염산을 유기산으로 대체할 경우, 유기산의 수소이온은 현저히 낮은 해리속도를 가지므로 이산화염소의 지속적인 생산이 가능하게 되고 향상된 안정성을 확보할 수 있게 된다. 염산이 이산화염소를 생산하는데 일반적으로 사용되긴 하지만, 미생물을 살균하기 위해서는 산이 해리되지 않은 상태로 존재하여야 하기 때문에 염산 그 자체는 실질적으로 살균 활성에 기여하지 못한다. 미생물의 사멸을 일으키는 산의 작용기전은 해리되지 않은 형태의 산이 세포막을 통하여 세포내부로 들어간 후, 수소이온이 해리되어 세포내부의 pH를 감소시킨다고 알려져 있다. (Bearson et al., 1997; Russel and Diez-Gonzalez, 1998). 아세트산(acetic acid), 시트르산(citric acid) 및 젖산(lactic acid)은 대장균 O157:H7과 살로넬라의 개체수를 효과적으로 감소시킨다고 보고 되고 있다(Ryu et al., 1999; Jung and Beuchat, 2000; Harris et al., 2006). 따라서, 유기산-기반 이산화염소 수용액은 이산화염소와 해리되지 않은 형태의 산을 모두 포함하기 때문에 염산-기반 이산화염소보다 더 높은 항미생물 활성을 가질 것이다.
- <6> 바실러스 세레우스는 구토와 설사를 일으키는 독소를 생산함으로써 식품매개질환을 유발할 수 있는 그람-양성의 포자 생성균이다(Granum, 2007). 세균성 포자는 열, 방사선, 건조, pH 충격, 고압 및 살균소독제와 같은 환경적 스트레스에 대한 상당한 저항성을 가지고 있다(Setlow, 2000; Atrih and Foster, 2002; Young and Setlow, 2003; Beuchat et al., 2004; Cortezzo et al., 2004; Granum, 2007). 바실러스 세레우스 포자는 염소(chlorine), 이산화염소(ClO₂) 및 과산화초산을 포함한 살균소독제들에 대하여 현저한 저항성을 가지기 때문에 (Foegeding et al., 1986; Beuchat et al., 2004; Ryu and Beuchat, 2005), 식품안전의 향상을 위하여 식품 제조공장 환경으로부터 바실러스 세레우스 포자를 사멸시키는 일은 매우 중요한 과제이다.
- <7> 이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구노력한 결과, pH가 조절된 유기산과 아염소산나트륨을 이용하여 이산화염소를 제조하면 이산화염소의 저장성 및 살균 활성을 향상시킬 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <8> 따라서, 본 발명의 주된 목적은 이산화염소의 저장성 및 살균 활성이 향상된 유기산-기반 이산화염소 용액의 제조방법을 제공하는 데 있다.
- <9> 본 발명의 다른 목적은 상기 방법으로 제조된 미생물 포자(endospore)의 살균 활성이 뛰어난 살균조성물을 제공하는 데 있다.

과제 해결수단

- <10> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 유기산 용액에 수산화나트륨(NaOH)을 첨가하여 pH 4 내지 6으로 조정된 유기산 용액을 만드는 단계 및 상기 pH가 조정된 유기산 용액에 아염소산나트륨(NaClO₂)을 첨가하고 상온에서 반응시키는 단계를 포함하는, 저장성 및 살균 활성이 향상된 유기산-기반 이산화염소 용액의 제조방법을 제공한다.
- <11> 본 발명에서, 상기 pH가 조정된 유기산 용액은 바람직하게는 pH 4-6, 더욱 바람직하게는 pH 5-6이다. 본 발명에서 제조된 이산화염소 용액은 상기 pH 범위에서 pH가 높을수록 전반적으로 이산화염소를 일정한 농도로 장기간 동안 안정적으로 발생시킬 수 있었으며, 살균 활성 또한 향상되는 것으로 확인되었다.
- <12> 본 발명에서, 상기 아염소산나트륨은 증류수에 녹여 수용액 상태로 유기산 용액에 첨가할 수도 있고, 또는 고체형의 아염소산나트륨을 직접 유기산 용액에 첨가하여 본 발명의 유기산-기반 이산화염소 용액을 제조할 수

있다.

- <13> 본 발명에서, ‘유기산-기반 이산화염소’란 염산, 황산, 인산과 같은 무기산과 아염소산나트륨을 반응시켜 이산화염소를 생성시키는 반응 즉, 무기산-기반 이산화염소 제조방법과 대비되는 용어로서, 유기산과 아염소산나트륨을 반응시켜 이산화염소를 생성시키는 반응으로 제조된 이산화염소 즉, organic acid-based chlorine dioxide를 의미한다.
- <14> 본 발명의 방법에서, 상기 유기산은 수용성으로서 아염소산나트륨과 반응시켜 이산화염소를 발생시킬 수 있는 어떤 유기산일 수 있으나, 바람직하게는 아세트산(acetic acid), 시트르산(citric acid) 또는 젖산(lactic acid)이 적당하다.
- <15> 상기 유기산들을 이용하여 생성되는 이산화염소는 본 발명에서 각각 ‘아세트산-기반 이산화염소’, ‘시트르산-기반 이산화염소’ 및 ‘젖산-기반 이산화염소’로 표기하였으며, 이와 대조되는 의미로서 염산을 이용하여 제조된 이산화염소를 ‘염산-기반 이산화염소’로 표기하였다.
- <16> 본 발명에서, 상기 용어 ‘저장성’은 이산화염소의 발생량을 조절하여 보다 안정적으로 이산화염소의 농도를 유지하는 것을 의미한다. 또한, 상기 용어 ‘저장성이 향상된’은 이산화염소 용액을 제조하고 이 때 발생하는 이산화염소가 용액의 pH 조절을 통하여 발생량이 조절되어 이산화염소 제조 후 14일 이상 1000 ppm 이상의 농도를 유지하는 것을 의미한다.
- <17> 일반적으로, 이산화염소의 단점은 쉽게 기화되기 때문에 적절한 농도를 유지하기 어려워 항상 사용직전에 현장에서 제조되어야 하고 장기간 보존이 어렵다는 것이다. 그러나 본 발명에서는 제조 후 14일 이상 1000 ppm 이상의 농도를 유지할 수 있는 이산화염소 용액의 제조방법을 제시하고 있으며, 구체적으로 실시예에서 그 효과를 확인하였다(실시예 2 및 도 1-4 참조).
- <18> 또한, 본 발명에서 상기 ‘살균 활성’은 일반적인 미생물뿐만 아니라 미생물의 포자(endospore)까지 포함하여 살미생물 활성을 갖는 것을 의미한다.
- <19> 본 발명의 방법에서, 상기 유기산 용액은 바람직하게는 증류수를 이용하여 1-20% (w/v), 더욱 바람직하게는 1-10 % (w/v)로 희석된 것이 적당하다. 여기서, 유기산 용액의 농도가 높아지면 이산화염소의 농도도 비례하여 높아지나 아염소산나트륨을 빠르게 소모하여 저장성은 오히려 낮아질 수 있다. 따라서, 일반적으로 사용되는 이산화염소의 농도가 200 ppm임을 감안하면 1-10%의 유기산을 이용하는 것이 발생하는 이산화염소 농도를 일정하게 유지하는 데에 가장 적합하였다.
- <20> 본 발명의 방법에서, 상기 수산화나트륨(NaOH)은 수산화나트륨 수용액의 형태로 첨가되는데, 제조 공정에서 제조 수율 및 시간을 고려하여 적절한 농도의 수산화나트륨을 선택하여 사용할 수 있으나, 바람직하게는 본 발명에 이용되는 유기산의 buffering capacity가 매우 낮기 때문에 수산화나트륨을 첨가할 때 pH가 급변하지 않도록 0.1-10 N, 더욱 바람직하게는 1N의 수산화나트륨을 사용하는 것이 좋다.
- <21> 상기 수산화나트륨은 본 발명에 사용되는 유기산 용액의 pH를 조절하기 위해 사용되는 것으로, 일반적인 이산화염소 제조 공정에서는 강산성 pH 3 이하에서 수행되고 이 때 다량의 이산화염소가 짧은 시간 내에 생성되는데, 본 발명의 제조방법에서는 유기산의 pH를 수산화나트륨을 이용하여 강산성보다 중성에 가까운 pH 4-6으로 조정함으로써 이산화염소의 발생속도를 지체시키는 효과를 얻을 수 있다. 구체적으로, 상기 유기산에서 수소이온이 해리되면서 지속적으로 이산화염소를 발생시키게 되는데, 지속적으로 생성된 이산화염소는 기화되어 소모되는 이산화염소와 평형을 이루어 전체 이산화염소 수용액의 농도가 일정하게 유지되는 효과가 있다.
- <22> 본 발명의 방법에서, 상기 반응은 20-30℃에서 100-200rpm으로 교반하면서 수행되는 것이 적당하고, 바람직하게는 20-25℃에서 150rpm으로 수행되는 것을 특징으로 한다. 여기서, 교반을 위한 rpm이 상기 범위보다 높아지면 이산화염소의 발생속도가 빨라지고 동시에 기화속도도 빨라지게 되므로, 반응용량 및 제조공정의 용이성을 고려하여 상기 범위에서 적절하게 선택함으로써 일정한 이산화염소의 발생량을 유지할 수 있다.
- <23> 본 발명의 방법에서, 상기 살균 활성은 앞에서 언급한 바와 같이 일반적인 미생물뿐만 아니라 포자형성 미생물의 포자(endospore)까지 포함하여 살미생물 활성을 갖는 것을 의미하는 것으로, 구체적으로는 포자 형성균(endospore-forming bacteria) 및 그 포자에 대한 살균 활성을 갖는 것을 특징으로 한다.
- <24> 본 발명에서, 상기 포자는 바실러스 세레우스 포자인 것을 특징으로 한다. 바실러스 세레우스 포자는 일반적인 살균소독제에 강한 저항성을 가진다. 예를 들어 염소, 이산화염소 및 과산화초산을 포함한 소독제들에 대하여 현저한 저항성을 가진다(Beuchat et al., 2004; Ryu and Beuchat, 2005)고 알려져 있으며, 식품 제조 공장에서

는 식중독에 대한 우려로 인하여 집중 관리되고 있다. 따라서 본 발명에서는 기존의 방법으로 제조된 이산화염소에 비해, 본 발명의 방법으로 제조된 이산화염소가 바실러스 세레우스 포자에 대한 살균력이 현저하게 뛰어난 것을 확인하였고, 따라서 본 발명이 산업상 매우 유용한 기술임을 입증하였다.

<25> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 방법으로 제조된 이산화염소 용액을 포함하는 포자 형성균의 살균용 조성물을 제공한다.

<26> 본 발명에서는, 아세트산, 시트르산, 젖산과 같은 유기산을 함유하는 이산화염소가 pH 조절을 통하여 포자에 대한 살균력을 증대시킬 수 있음을 확인하였다. 유기산들은 이산화염소와 다른 살균 메카니즘으로 미생물을 사멸시키므로 유기산을 포함한 이산화염소는 미생물에 대한 두 종류의 살균 메카니즘을 동시에 가지게 된다. 또한 pH가 중성에 가깝게 조절되면, 이산화염소의 세포투과력이 좋아져서 보다 상승된 살균력을 가지게 된다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<27> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

<28> 실시예 1. 유기산을 이용한 이산화염소(ClO_2) 수용액의 제조

<29> 아세트산(acetic acid; 99.7%, 바이오세상, 한국), 시트르산(citric acid; 98%, Wako, 일본), 젖산(lactic acid; 79-81%, fluka, 일본)을 증류수에 첨가하여 각각 10%의 아세트산 용액, 시트르산 용액, 젖산 용액을 제조하였다. 상기 제조된 산 용액의 pH는 1N 수산화나트륨(NaOH)을 이용하여 3, 4, 5, 6으로 조정하였다. 적정량의 아염소산나트륨(NaClO_2 ; 80%, Sigma-Aldrich, St.louis, 미국)을 상기 산 용액에 첨가하여 10,000, 50,000 $\mu\text{g/ml}$ 의 아염소산나트륨 농도를 만든 후 셰이커에 고정시켜서 상온(21°C)에서 14일 동안 150 rpm의 속도로 지속적으로 용해시켰다.

<30> 실시예 2. 이산화염소의 농도 측정

<31> 실시예 1에서 제조된 유기산-기반 이산화염소 수용액에서, 14일의 저장기간 동안 형성된 이산화염소의 양을 염소측정기(chlorine colorimeter; model Dr/820, Hatch, Loveland, CO)를 이용하여 24시간 간격으로 측정하였다.

<32> 도 1은, 유기산(10%)과 NaClO_2 (10,000 ppm) 수용액의 pH를 3으로 조절한 용액에서 생성된 이산화염소의 농도 변화를 나타낸다: (아세트산 ○, 시트르산 □, 젖산 △). 유기산-기반 이산화염소 수용액의 pH가 낮아서 급격한 이산화염소의 발생을 보였다. 특히, 유기산 중 아세트산과 시트르산을 이용하여 이산화염소를 발생시킨 경우 48시간 이내 이산화염소의 농도가 3000-4000 ppm에 도달했으며, 14일 동안 2000 ppm 이상을 유지하였다.

<33> 도 2는, 유기산(10%)과 NaClO_2 (10,000 ppm) 수용액의 pH를 4로 조절한 용액에서 생성된 이산화염소의 농도 변화를 나타낸다: (아세트산 ○, 시트르산 □, 젖산 △). 아세트산과 시트르산을 이용하여 이산화염소를 발생시킨 경우 이산화염소의 발생 속도는 조금 둔화되었지만 14일까지 효과적으로 이산화염소의 농도가 2000 ppm 이상으로 유지되었다. 또한, 젖산을 이용하여 발생시킨 이산화염소는 1000ppm 정도의 농도를 10일간 유지하였다.

<34> 도 3은, 유기산(10%)과 NaClO_2 (50,000 ppm) 수용액의 pH를 5로 조절한 용액에서 생성된 이산화염소의 농도 변화를 나타낸다: (아세트산 ○, 시트르산 □, 젖산 △). 아세트산과 시트르산을 이용하여 이산화염소를 발생시킨 경우 4000-5000 ppm의 이산화염소 농도를 14일간 일정하게 유지할 수 있었으며, 젖산을 이용한 경우 14일간 1000ppm 이상의 농도를 유지하였다.

<35> 도 4는, 유기산(10%)과 NaClO_2 (50,000 ppm) 수용액의 pH를 6으로 조절한 용액에서 생성된 이산화염소의 농도 변화를 나타낸다: (아세트산 ○, 시트르산 □, 젖산 △). 이산화염소의 발생속도는 둔화되었지만 이산화염소의 농도유지 효과는 향상되었다. 또한, 처음 반응시킨 후 14일이 지난 시점에서도 이산화염소의 농도는 1000-2000 ppm으로 유지가 잘 되었다.

<36> 도 5는 종래 알려진, 염산(10%)과 NaClO_2 (10,000 ppm) 수용액의 반응으로 생성된 이산화염소의 농도 변화를 나타낸다. 그래프에서 볼 수 있듯이, 반응 초기에 급격한 이산화염소의 발생을 보였으며, 특히 주목할 것은 48시간이내 이산화염소의 농도가 2500-2800 ppm에 도달한 후, 8일째에는 발생량이 0 ppm으로 나타났다. 이는 기존의 염산-기반 이산화염소는 본 발명에서와 같이 2주 이상 충분한 이산화염소를 발생시킬 수 없음을 보여주는 것이

다.

<37> 이상에서와 같이 도 1 내지 도 5의 결과로 볼 때, 본 발명의 유기산-기반 이산화염소 수용액은 기존의 염산-기반 이산화염소 용액과 비교하면, pH 조절을 통하여 이산화염소의 발생량을 조절할 수 있고 보다 안정적으로 이산화염소의 농도를 유지할 수 있다.

<38> **실시예 3. 바실러스 세레우스(*B. cereus*) 포자액의 조제**

<39> 영아용 씨리얼에서 분리된 설사 및 구토형 균주, *B. cereus* 038-2(Center for food safety, The University of Georgia에서 균주 제공; 유아식에서 분리)를 Tryptic soy broth(TSB, BBL/Difco, Sparks, MD, 미국)에 접종시킨 후 30℃에서 24시간 배양시켰다. 상기 배양액은 24시간 간격으로 세 번 계대 배양시킨 후, Tryptic soy agar(TSA, BBL/Difco)에 도말하였다. 배양액이 도말된 배지를 30℃에서 72시간 배양시킨 후, 광학현미경을 이용하여 배지 위의 집락이 99% 이상 포자를 형성하였는지를 확인하였다. 유리막대를 이용하여 집락을 모아서 50 ml의 튜브에 옮긴 후, 30 ml의 멸균된 증류수를 첨가하여 21℃에서 10분간 원심분리(800 x g)시켰다. 원심분리 후에 상층액을 제거하고, 펠릿(pellet)을 30ml의 멸균된 증류수와 다시 혼합시켰다. 이렇게 조제된 포자액의 농도는 대략 8.7 log cfu/ml 이며, 사용하기 전까지 4℃에 보관하였다.

<40> **실시예 4. 살균처리액의 조제**

<41> 증류수에 아염소산나트륨(NaClO_2 ; sodium chlorite, 80%, Sigma)을 첨가하여 50,000 $\mu\text{g/ml}$ 의 NaClO_2 용액을 만들었다. pH가 3, 4, 5, 6으로 조정된 10%의 아세트산, 시트르산, 젖산 용액은 실시예 1에서 언급된 방법에 의하여 조제하였다.

<42> 1 N의 염산 3 ml를 200 ml의 NaClO_2 용액에 첨가하여 염산-기반 이산화염소 용액 50,000 $\mu\text{g/ml}$ 을 조제하였다. 또한, 10%의 아세트산, 시트르산, 젖산 용액에 NaClO_2 를 첨가하여 상온에서 3일 동안 150rpm으로 용해시키는 방법에 의하여 유기산-기반 이산화염소 용액 50,000 $\mu\text{g/ml}$ 을 조제하였다. 상기 염산 또는 유기산을 이용하여 조제된 이산화염소를 멸균된 유기산 또는 증류수에 첨가하여 이산화염소의 농도가 200 $\mu\text{g/ml}$ 이 되도록 조정하였다. 이렇게 만들어진 이산화염소 용액을 사용하여 즉시 이산화염소 용액에 의한 바실러스 포자 저감화를 시험하였다.

<43> **실시예 5. 바실러스 포자의 살균 처리**

<44> 실시예 4에서 제조된 염산-기반 이산화염소 용액(200 $\mu\text{g/ml}$), 유기산-기반 이산화염소 용액(200 $\mu\text{g/ml}$) 6 ml을 각각 멸균된 시험관에 넣고, 동량(6 ml)의 포자액(대략 3.2×10^6 cfu/ml)을 가한 후에 잘 섞었다. 처리 후 각각 1, 3, 5분 후에 2 ml의 혼합액을 꺼내어 동량(2 ml)의 2배 농도로 만들어진 DE(2 x Dey-Engley, Difco) 중화 액체배지와 혼합시켰다. 중화배지와 혼합된 샘플을 TSA 배지에 도말한 후, 30℃에 24시간 배양하였다. 24시간 배양 후에 집락을 세어서 생존 개체수를 측정하였으며, 그 결과는 하기 표 1에 나타내었다.

<45> [표 1]. 염산-기반 이산화염소(100 ppm) 또는 유기산-기반 이산화염소(100 ppm)에 5분간 처리된 바실러스 세레우스 포자의 생존 개체수 변화

Treatment	pH	Population of <i>B. cereus</i> spores(CFU/ml) ^a			
		0 min	1 min	3 min	5 min
HCl-based ClO ₂	3.8	3.2 × 10 ⁶	4.0 × 10 ⁶	2.0×10 ⁴	7.9×10 ²
Acetic acid-based ClO ₂	3.0	3.2 × 10 ⁶	3.9×10 ⁵	7.9×10 ³	1.3×10 ²
	4.0	3.2 × 10 ⁶	1.0×10 ⁶	2.0×10 ³	4.0×10 ⁰
	5.0	3.2 × 10 ⁶	1.6×10 ⁶	7.9×10 ²	5.0×10 ⁰
	6.0	3.2 × 10 ⁶	3.2×10 ⁶	2.0×10 ²	2.0×10 ⁰
Citric acid-based ClO ₂	3.0	3.2 × 10 ⁶	3.2×10 ⁶	6.3×10 ⁴	1.3×10 ³
	4.0	3.2 × 10 ⁶	3.2×10 ⁶	6.3×10 ³	1.6×10 ¹
	5.0	3.2 × 10 ⁶	3.2×10 ⁶	2.5×10 ³	5.0×10 ⁰
	6.0	3.2 × 10 ⁶	3.2×10 ⁶	2.5×10 ²	<2.0×10 ⁰
Lactic acid-based ClO ₂	3.0	3.2 × 10 ⁶	1.0×10 ⁶	1.3×10 ³	1.3×10 ¹
	4.0	3.2 × 10 ⁶	3.2×10 ⁶	3.1×10 ³	8.0×10 ⁰
	5.0	3.2 × 10 ⁶	3.2×10 ⁶	1.7×10 ¹	<2.0×10 ⁰
	6.0	3.2 × 10 ⁶	4.0×10 ⁶	8.0×10 ⁰	<2.0×10 ⁰

<46>

<47>

^a검출한계는 0.3 log CFU/ml(2 CFU/ml)임.

<48>

표 1에서, 염산-기반 이산화염소(유기산을 함유하지 않음)를 3.2×10^6 cfu/ml의 바실러스 세레우스 포자에 처리 5분 후, 7.9×10^2 cfu/ml로 감소시켰다. 그러나 유기산-기반 이산화염소(유기산을 함유함)는 pH가 4 이상으로 조정된 경우 약 50 배 이상의 살균력이 증가되었으며, pH가 5 또는 6으로 조절된 경우에는 5.0×10^0 cfu/ml 이하로 감소시켰으며, 이는 100배 이상의 살균력이 증가되었음을 의미한다. 특히, 젖산-기반 이산화염소는 pH를 6으로 조절하였을 때 가장 탁월한 포자살균력을 보였다($< 2.0 \times 10^0$ CFU/ml).

<49>

또한, 염산-기반 이산화염소(유기산을 함유하지 않음)로 3분간 처리된 바실러스 세레우스 포자는 2.0×10^4 CFU/ml의 생존개체수를 나타냈지만, pH 6인 젖산-기반 이산화염소로 처리된 바실러스 세레우스 포자는 8.0×10^0 CFU/ml의 생존개체수를 나타냈으며, 이는 약 2500배의 포자 살균력이 증가되었음을 의미한다. 그리고 시트르산- 또는 아세트산-기반 이산화염소도 pH가 6으로 조절되었을 때 가장 좋은 살균효과를 보였다.

<50>

통계학적 분석

<51>

모든 실험은 3번 반복하였다. 데이터는 통계학적 분석 시스템(SAS; SAS Institute, Cary, NC)을 이용하여 분석하였다. 바실러스 포자의 개체수가 처리 형태, 염산-기반 및 유기산-기반 용액의 pH, 및 처리 시간에 의해 영향을 받는 지를 결정하기 위하여 Fisher's least significant difference (LSD) test를 사용하였다. 유의차는 95% 신뢰 수준을 인정하였다($p < 0.05$).

산업이용 가능성

<52>

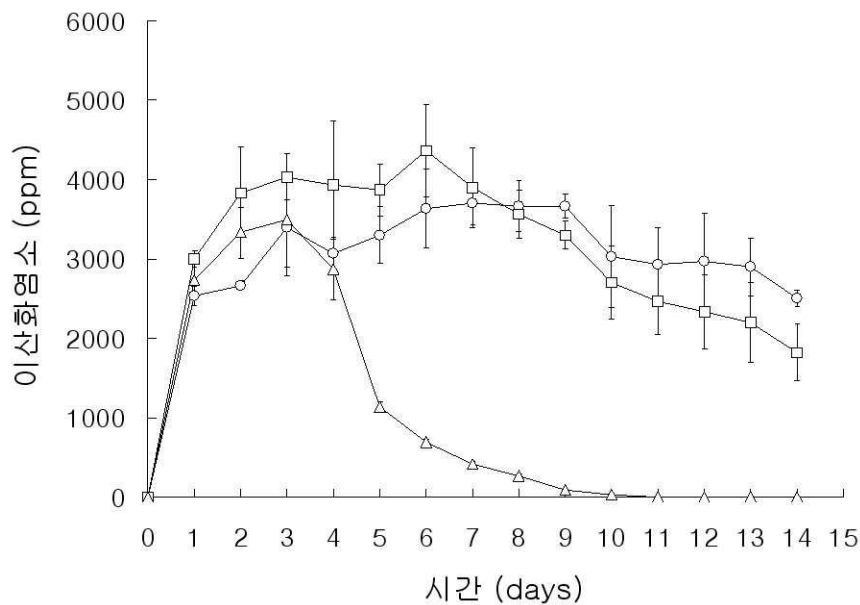
이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 유기산-기반 이산화염소 용액은 장기간 저장이 가능하고 포자에 대한 보다 강한 살균력을 가진다. 따라서 본 발명의 방법에 따라 제조된 유기산-기반 이산화염소는 식품공장의 제조환경의 살균소독제, 식품 저장 용기의 살균소독제, 급식소 환경의 살균소독제 등 여러 식품안전 분야에서 유용하게 사용될 것으로 판단된다.

도면의 간단한 설명

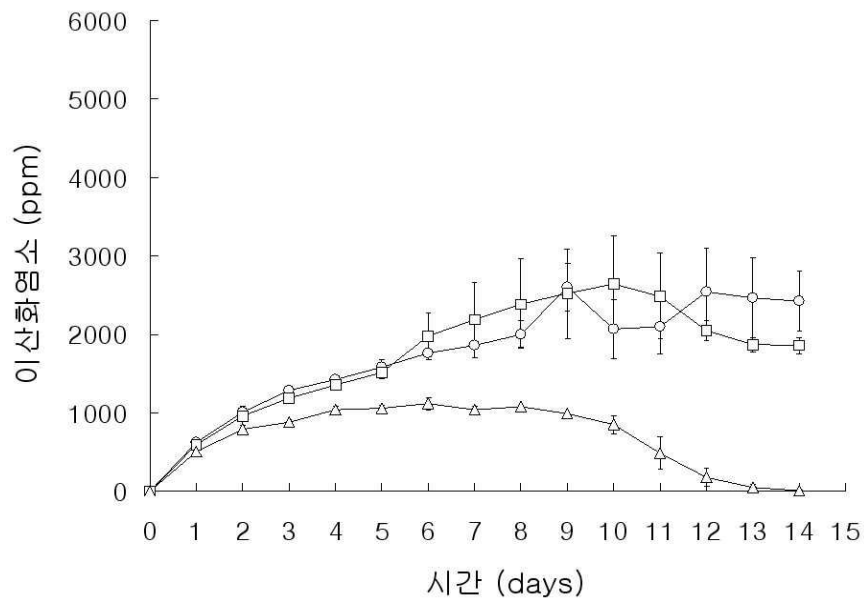
- <53> 도 1은 유기산(10%)과 NaClO_2 (10,000 ppm) 수용액의 pH를 3으로 조절한 용액에서 생성된 이산화염소의 농도 변화를 나타낸다: (아세트산 ○, 시트르산 □, 젖산 △).
- <54> 도 2는 유기산(10%)과 NaClO_2 (10,000 ppm) 수용액의 pH를 4로 조절한 용액에서 생성된 이산화염소의 농도 변화를 나타낸다: (아세트산 ○, 시트르산 □, 젖산 △).
- <55> 도 3은 유기산(10%)과 NaClO_2 (50,000 ppm) 수용액의 pH를 5로 조절한 용액에서 생성된 이산화염소의 농도 변화를 나타낸다: (아세트산 ○, 시트르산 □, 젖산 △).
- <56> 도 4는 유기산(10%)과 NaClO_2 (50,000 ppm) 수용액의 pH를 6으로 조절한 용액에서 생성된 이산화염소의 농도 변화를 나타낸다: (아세트산 ○, 시트르산 □, 젖산 △).
- <57> 도 5는 염산(10%)과 NaClO_2 (10,000 ppm) 수용액의 반응으로 생성된 이산화염소의 농도 변화를 나타낸다.

도면

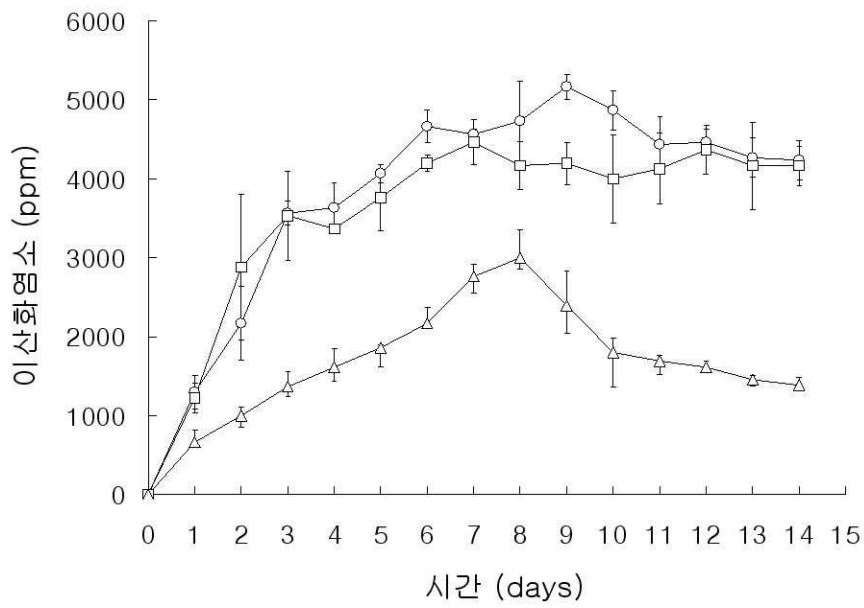
도면1



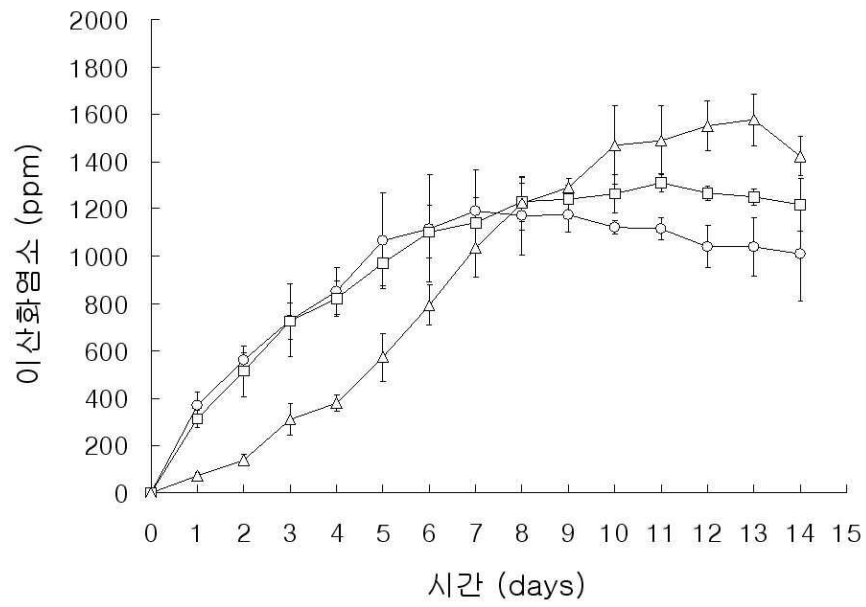
도면2



도면3



도면4



도면5

