



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0004800
(43) 공개일자 2017년01월11일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A01N 57/12</i> (2006.01) <i>A01N 59/00</i> (2006.01)
 <i>A61L 2/18</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>A01N 57/12</i> (2013.01)
 <i>A01N 59/00</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2015-0147975
 (22) 출원일자 2015년10월23일
 심사청구일자 2015년10월23일
 (30) 우선권주장 1020150094098 2015년07월01일 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
 김남희
 경기도 하남시 대성로 259, 101동 106호</p> <p>(74) 대리인
 한양특허법인</p> |
|--|--|

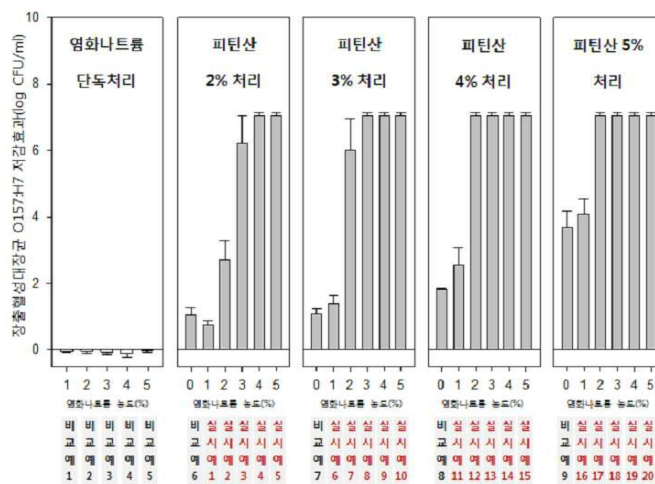
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **피틴산과 전해질을 포함하는 살균 조성물**

(57) 요약

본 발명은, 피틴산 및 전해질을 포함하는, 살균 조성물에 대한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61L 2/18 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

피틴산 및 전해질을 포함하는, 살균 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 전해질은, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘, 염화마그네슘, 황산나트륨, 황산칼륨, 황산칼슘 및 황산마그네슘 중 하나 이상인, 살균 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 조성물의 총 질량 대비,

상기 피틴산 0.2-5.0 질량% 및 전해질 1.0-5.0 질량%를 포함하는, 살균 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 살균 대상 세균은 식중독 세균인, 살균 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 살균 대상 세균은 캄필로박터 제주니(*Campylobacter jejuni*), 예시니아 엔테로콜리티카(*Yersinia enterocolitica*), 크로노박터균(*Cronobacter* spp.), 이질균(*Shigella* spp.), 비브리오균(*Vibrio* spp.) 대장균(*Escherichia coli* 0157:H7), 켄티푸스균(*Salmonella* Typhimurium), 클로스트리디움 속균(*Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*), 바실러스균(*Bacillus* spp.), 포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 및 리스테리아균(*Listeria monocytogenes*) 중 하나 이상인, 살균 조성물.

청구항 6

제 1항 내지 제 5 항 중 어느 한 항의 살균 조성물을, 살균 대상 세균에 처리하는 것을 특징으로 하는, 살균 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 피틴산과 전해질을 포함하는 살균 조성물에 대한 것이다.

배경 기술

[0002] 피틴산(또는 피트산)의 주성분은 이노시톨헥사인산(*inositol hexaphosphoric acid*)으로 옅은 노란색 또는 갈색

을 띄는 시럽상의 액체상을 띄며, 냄새가 없고 강한 신맛이 있는 것으로 알려져 있다. 구조적으로는 이노시톨(inositol)을 기본 구조체로 6개의 하이드록시기(hydroxyl group)가 모두 인산(H_2PO_4)과 에스터 결합으로 결합되어 660.03 g/mol의 비교적 높은 분자량을 갖는 물질이다.

[0003] 피틴산은 대부분의 식물체 내에서 인산 저장고로서 역할을 수행하여 콩류, 나무의 열매, 곡류의 외피 등 다양한 식물 구조체에 널리 분포한다. 때문에 정선, 탈피, 절단, 세척 등의 1차 가공을 거친 식물성 가공식품의 생산 시 발생하는 외피, 껍질 등의 폐기물을 이용하여 분리, 정제할 수 있으며, 실제로 다양한 식물체에서 그 수율을 향상시키기 위한 다양한 기술들이 개발되고 있다. 식물성 작물 중 피틴산의 분리, 정제에 사용되는 대표적 식물은 쌀, 그 중에서도 미강이다. 쌀은 아시아 지역에서 널리 소비되는 주요 작물로 전 세계적으로 연간 600만 톤의 쌀이 생산되고 있으며, 중 약 70%에 해당하는 내배유(endosperm)만을 곡물로 섭취하고 나머지 왕겨(rice husk, 약 20%), 미강(rice bran, 약 8%), 쌀눈(rice germ, 약 2%)등 이 부산물로써 필연적으로 생성된다. 쌀뿐만 아니라 콩, 호두, 잣, 땅콩과 같은 콩류 또는 견과류의 비가식 부위(겉껍질, 내피 등)에서도 1-9%의 수율로 수득할 수 있는 천연 유래 물질이기 때문에 그 경제적 활용성에 대한 연구가 요구된다. 미용, 의학, 식품 분야에서 피틴산은 주로 항산화, 항암(대장암 억제 작용), 항비만제(지방산 억제 작용), 신장 담석증 치료제(미네랄 킬레이팅 작용) 등의 용도로 사용되고 있으며, 특히 미용 분야에서 여드름이나 피부 트러블을 방지하는 용도로 다양한 농도와 비율로 상용화된 제품들이 판매되고 있다. 식품분야에서는 피틴산 함유식품을 섭취할 경우 체내에서 칼슘, 철, 아연, 칼륨 등의 필수 미네랄을 흡착하여 불용성 복합체를 형성, 체내 필수 미네랄 이용성 및 단백질 흡수 저하와 같은 비영양적 대사가 보고되어 항영양물질(antinutrient)로 판정되었다. 국내에서는 식품 첨가물(천연첨가물 91)로 등재되어 있으며, 주로 발효조성제, 금속붕쇄제로 통조림, 음료, 발효식품, 연제품, 면류에 사용되며, 수산물 통조림에는 스트루바이트(struvite) 방지제, 흑변 방지제로 사용되고 있다.

[0004] 한편 장출혈성대장균은 인체 소화기관으로 유입되어 배로독소를 생성하고 장관 내 출혈을 유발하여 심각한 식중독을 일으키는 대표적 식중독세균으로 감염유발량(infective dose)이 g 또는 ml 당 100 이하의 높은 독성을 보이며, 조기 치료에 실패할 용혈성요독증, 혈전성 혈소판 감소증 등의 합병증을 유발할 수 있다. 주로 동물, 그 중에서도 소의 대장에서 발견되기 때문에 덜 익힌 고기나 육류 가공제품의 섭취로 인해 감염되거나 오염된 동물성 식재료나 식품가공장 표면으로부터 교차오염된 신선식품의 섭취로 인해 장출혈성대장균 식중독이 발병한다. 특히 산에 대한 내성이 강해 사과주스, 오이피클, 머스타드 소스 등 pH 4.5 이하의 산성식품 관련 식중독의 주요 원인체로 집계되고 있으며, 산성환경에 장기 노출시키면 산 적응(acid adaptation)이 유도되어 내산성에 증가한다는 보고가 있어 이를 효과적으로 살균·제어하기 위한 신기술 개발이 필요하다.

[0006] 천연 항균제로서 피틴산의 잠재력이 충분함에도 불구하고 피틴산을 주성분으로 하는 살균제에 관한 선행 개발 사례는 거의 없는 실정이다. 대한민국 공개특허 제 1998-0013754호에는, 피틴산을 주성분으로 하는 살균 조성물에 대하여 개시되어 있으나, 이는 해수와 담수에 서식하는 조류 및 김양식 저해세균을 살균 및 살조하기 위한 것으로, 식중독세균에 적용할 경우 그 효과가 미미할 것으로 예상될 뿐 아닐, 과량의 피틴산을 사용해야 하는 한계점이 있다.

[0008] 따라서 천연항균제로서 잠재력이 뛰어난 피틴산을 주성분으로 하여 적은 양으로 내산성 장출혈성대장균 등의 세균을 효과적으로 제어할 수 있는 기술의 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제 1998-0013754호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 피틴산 또는 전해질의 과다 사용을 방지하면서 개별 물질의 살균력을 극대화할 수 있으며, 특히 내산성 장출혈성대장균 등의 세균을 효과적으로 살균, 제어할 수 있는 살균 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명은 피틴산 및 전해질을 포함하는, 살균 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따르면 피틴산을 최소량으로 사용하면서 살균력을 극대화할 수 있는 효율적 살균조성물을 이용하여 식품가공업소, 집단급식소, 외식산업 분야에서 활용할 수 있는 천연 항균제를 제조·판매할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 피틴산 또는 염화나트륨 수용액과 그 혼합조성물의 살균력 비교(1분 처리)하여 나타낸 것이다.

도 2는 피틴산 또는 염화나트륨 수용액과 그 혼합조성물의 살균력 비교(1분 처리)하여 나타낸 것이다.

도 3은 피틴산 또는 염화나트륨 수용액과 혼합조성물의 살균력 비교(5분 처리) 하여 나타낸 것이다.

도 4는 피틴산 또는 염화나트륨 수용액과 혼합조성물의 살균력 비교(5분 처리) 하여 나타낸 것이다.

도 5는 피틴산 외 유기산 대비 피틴산과 염화나트륨 혼합조성물의 살균효과를 나타낸 것이다.

도 6은 표면 형성시킨 바이오필름에 보호되고 있는 균체에 대한 피틴산 또는 염화나트륨 수용액과 그 혼합조성물 살균효과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 본 발명은 피틴산 및 전해질을 포함하는 살균 조성물 및 이를 이용한 살균 방법에 대한 것이다.

[0018] 본 발명자는, 피틴산 또는 전해질 각각의 단일 조성물로는 전혀 살균력이 나타나지 않거나 살균력이 미미한 조건에서 두 물질을 상호 혼합하면, 개별 물질의 살균력이 극대화되어 1분 이내, 5분 이내에 내산성 장출혈성대장균의 회생 불가능 수준의 사멸을 유도할 수 있음을 실험적으로 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0020] 본 발명에서, 상기 전해질은, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘, 염화마그네슘, 황산나트륨, 황산칼륨, 황산칼슘 및 황산마그네슘 중 하나 이상일 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 전해질은 피틴과 함께 상호작용을 하여, 살균효과에 대한 상승효과를 나타낸다. 이는, 본 살균조성물의 피틴산이 장출혈성대장균 세포외막을 구성하는 다가 양전하 이온과 킬레이트를 형성하면서 세포외막에 손상을 야기하여 전해질이 물에 용해되면서 생성되는 다양한 양전하(예: Na^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} 등), 음전하 이온(예: Cl^- , SO_4^{2-})의 세포 투과성을 촉진하여 세포 항상성을 저해하기 때문이다.

[0022] 본 발명의 살균 조성물은, 조성물의 총 질량 대비, 상기 피틴산 0.2 질량% 이상 및 전해질 1.0 질량% 이상을 포함하는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 상기 피틴산 0.2-5.0 질량% 및 전해질 1.0-5.0 질량%를 포함할 수 있다. 상기 범위는 피틴산 또는 전해질을 개별적으로 적용했을 때 각 물질이 갖는 살균력에 비해 두 물질을 상호 혼합하였을 때 5분 이내에 발생하는 살균력 상승작용이 매우 극명하여 살균조성물의 생산효율성 및 효과성을 극대화할 수 있는 범위이기 때문에 바람직하다.

[0024] 본 발명에서, 상기 살균 대상 세균은 식중독 세균일 수 있으며, 바람직하게는 캄필로박터 제주니(*Campylobacter jejuni*), 예시니아 엔테로콜리티카(*Yersinia enterocolitica*), 크로노박터균(*Cronobacter* spp.), 이질균(*Shigella* spp.), 비브리오균(*Vibrio* spp.) 대장균(*Escherichia coli* O157:H7), 켄티푸스균(*Salmonella*

Typhimurium), 클로스트리디움 속균(*Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*), 바실러스균(*Bacillus* spp.), 포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 및 리스테리아균(*Listeria monocytogenes*) 중 하나 이상일 수 있으며, 바람직하게는 대장균(*Escherichia coli* 0157:H7)일 수 있고, 가장 바람직하게는 장출혈성대장균 0157:H7 (ATCC 35150, 43889, 43895)일 수 있다.

[0026] 또한, 본 발명은 상기 살균 조성물을 살균 대상 세균에 처리하는 것을 특징으로 하는, 살균 방법을 포함한다.

[0028] 이하에서, 본 발명을 실시예에 기초하여 더욱 상세하게 설명한다. 그러나, 하기에 개시되는 본 발명의 실시 형태는 본 발명의 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위는 이들의 실시 형태에 한정되지 않는다. 본 발명의 범위는 특허청구범위에 표시되었고, 더욱이 특허청구범위 기록과 균등한 의미 및 범위 내에서의 모든 변경을 포함한다.

[0030] 참조예. 제어대상 식중독세균

[0032] 피틴산의 산도가 매우 높다는 점에 착안하여 대표적인 내산성 식중독세균인 장출혈성대장균 0157:H7 (ATCC 35150, 43889, 43895)을 실험대상균으로 선정하였으며, 개발 기술의 적용 가능성을 보다 넓게 제시하기 위하여 일반적인 환경에서 배양한 균(tryptic soy broth에 분주, 37℃, 24시간: 일반배양균)과 산적응(acid adaptation) 배양(1% glucose를 첨가한 tryptic soy broth에 분주, 37℃, 24시간: 산적응배양균)에 의해 높은 내산성이 유도된 세포를 제조하여 실험에 사용하였다.

[0035] 실험예 1. 피틴산 또는 염화나트륨 수용액과 그 혼합조성물의 살균력 비교(1분 처리)

[0037] 하기 표 1에 나타난 피틴산과 염화나트륨 농도에 따라, 실시예 및 비교예의 조성물을 제조하였다. 즉, 피틴산 또는 염화나트륨 각각의 단일 조성물과 그 혼합조성물의 살균력을 비교하기 위해 50%의 피틴산수용액(Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA)과 99.5% 염화나트륨(Junsei Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan)을 멸균증류수에 수화하여 제조한 20% 염화나트륨 수용액을 원액으로 이를 적정 비율로 멸균증류수에 희석하여 피틴산 2-5% 수용액과 염화나트륨 1-5% 수용액을 제조하였으며, 피틴산 + 염화나트륨 혼합조성물의 경우 1-5% 염화나트륨 수용액을 제조한 후에 피틴산 원액을 최종농도 2-5%가 되도록 첨가하는 방식으로 제조하였다.

[0039] 이와 같이 제조된 실시예 및 비교예의 조성물을 하기 표 1에 따라, 각각 상기 참조예의 일반 배양균 및 산적응 배양균에 처리하였다.

표 1

실험균	피틴산 농도(%)	염화나트륨 농도(%)	처리시간(분)	일반배양균	산적응배양균
대조균 (단일조성물)	-	1-5	1	비교예 1-5	비교예 10-14
	2-5	-	1	비교예 6-9	비교예 15-18
실험균 (혼합조성물)	2	1-5	1	실시예 1-5	실시예 21-25
	3	1-5	1	실시예 6-10	실시예 26-30
	4	1-5	1	실시예 11-15	실시예 31-35
	5	1-5	1	실시예 16-20	실시예 36-40

[0042] 모든 실험은 3반복 수행되었으며, 실험예 1의 실험결과는 다음 도 1 및 도 2에 나타내었다.

[0043] 실험결과 비교예 1-9에 비해 실시예 1-20의 저감효과가 현저히 높아진다는 것을 알 수 있으며, 특히 3% 이하 피틴산에 3% 이상의 염화나트륨을 첨가한 실시예 3-5, 8-10과 4% 이상 피틴산에 2% 이상의 염화나트륨을 첨가한 실시예 12-25, 17-20의 저감효과가 현저히 증가하여 접종한 제어대상 식중독세균을 회생불가능한 수준까지 제어함을 확인하였다.

[0044] 상대적으로 내산성이 강한 산적응배양균의 경우 비교예 10-18의 저감효과가 일반배양균에 비해 현저히 낮아 비교예 대비 실시예 21-40에서 나타난 저감효과 증가 패턴이 더욱 극명한 것을 확인할 수 있다. 저감효과의 경우 일반배양균에 대한 결과와 마찬가지로 3% 이상 피틴산에 3% 이상의 염화나트륨을 첨가한 실시예 23-25, 28-30에서, 4% 이상 피틴산에 2% 이상 염화나트륨을 첨가한 실시예 32-35, 37-40에서 저감효과가 현저히 증가하여 접종한 제어대상 식중독세균을 회생불가능한 수준까지 제어함을 확인하였다.

[0046] 실험예 2. 피틴산 또는 염화나트륨 수용액과 혼합조성물의 살균력 비교(5분 처리)

[0048] 실험예 1에서 기술한 바와 같은 방법으로, 하기 표 2에 나타난 피틴산과 염화나트륨 농도에 따라, 실시예 및 비교예의 조성물을 제조하였다. 즉, 피틴산 수용액, 염화나트륨 수용액, 피틴산 + 염화나트륨 혼합조성물을 제조하되, 피틴산 최종농도는 0.2-1.0%가 되도록 제조하였다.

[0050] 이와 같이 제조된 실시예 및 비교예의 조성물을 하기 표 2에 따라, 각각 상기 참조예의 일반 배양균 및 산적응 배양균에 처리하였다.

표 2

실험군	피틴산 농도(%)	염화나트륨 농도(%)	처리시간(분)	일반배양균	산적응배양균
대조군	-	1-4	5	비교예 19-22	비교예 28-31
(단일조성물)	0.2-1.0	-	5	비교예 23-27	비교예 32-36
실험군 (혼합조성물)	0.2	1-4	5	실시예 41-44	실시예 61-64
	0.4	1-4	5	실시예 45-48	실시예 65-68
	0.6	1-4	5	실시예 49-52	실시예 69-72
	0.8	1-4	5	실시예 53-56	실시예 73-76
	1.0	1-4	5	실시예 57-60	실시예 77-80

[0053] 마찬가지로 모든 실험은 3반복 수행되었으며, 실험예 2의 실험결과는 다음 도 3 및 4에 나타내었다. 실험결과 비교예 19-27에 비해 실시예 41-60의 저감효과가 현저히 높아진다는 것을 알 수 있으며, 특히 0.4% 피틴산에 3% 이상의 염화나트륨을 첨가한 실시예 47-48에서 저감효과가 현저히 증가한 것을 확인하였다.

[0054] 상대적으로 내산성이 강한 산적응배양균의 경우 비교예 28-36의 저감효과가 일반배양균에 비해 현저히 낮아 비교예 대비 실시예 61-80에서 나타난 저감효과 증가 패턴이 더욱 극명한 것을 확인할 수 있다. 저감효과의 경우 0.6-0.8%의 피틴산에 3% 이상의 염화나트륨을 첨가한 실시예 71-72, 75-76에서 저감효과 증가폭이 크게 증가함을 확인하였다.

[0056] 실험예 3. 피틴산과 염화나트륨 외 전해질 혼합조성물의 살균효과 확인

[0058] 염화나트륨 첨가에 의해 피틴산의 살균효과가 증가하는 현상이 염화나트륨 이외의 다른 전해질을 사용했을 때에도 유지되는지를 확인하기 위하여 염화나트륨 첨가에 의한 피틴산의 살균효과 증가폭이 극명하여 접종균을 회생불가능 수준까지 사멸시켰던 최소조건인 실시예 4, 28, 29, 47, 72를 선정하여 같은 농도의 염화칼륨, 염화칼슘, 염화마그네슘을 첨가하여 처리하였으며, 그 조건은 다음 표 3과 같다.

표 3

비교대상	피틴산 농도(%)	전해질 농도(%)	처리시간(분)	전해질 혼합조성물 실험군
실시예 4	2	4	1	비교예 37-39
실시예 28	3	3	1	비교예 40-42
실시예 47	0.4	3	5	비교예 43-45
실시예 72	0.6	4	5	비교예 46-48

그 결과 다음 표 4와 같이 비교예 37-48에서 혼합조성물에 접종한 일반배양균(비교예 37-39, 43-45)과 산적응배양균(비교예 40-42, 46-48)이 모두 사멸하여 본 발명기술의 주요한 시너지 살균효과가 염화나트륨 외 다른 전해질을 적용해도 유지되는 것을 확인하였다.

표 4

피틴산 농도(%)	전해질 농도(%)	처리시간(분)	저감효과(log CFU/ml)			
			염화나트륨 (실시예 4, 28, 47, 72)	염화칼륨 (비교예 37, 40, 43, 46)	염화칼슘 (비교예 38, 41, 44, 47)	염화마그네슘 (비교예 39, 42, 45, 48)
2	4	1	7.42 ± 0.03	7.42 ± 0.03	7.42 ± 0.03	7.42 ± 0.03
3	3	1	7.10 ± 0.11	7.10 ± 0.11	7.10 ± 0.11	7.10 ± 0.11
0.4	3	5	7.42 ± 0.03	7.42 ± 0.03	7.42 ± 0.03	7.42 ± 0.03
0.6	4	5	7.10 ± 0.11	7.10 ± 0.11	7.10 ± 0.11	7.10 ± 0.11

실험예 4. 피틴산 외 유기산과 염화나트륨 혼합조성물의 살균효과 확인

염화나트륨 첨가에 의해 피틴산의 살균효과가 증가하는 현상이 피틴산에 특이적으로 나타난다는 점을 증명하기 위하여 피틴산 이외의 다른 유기산을 사용했을 때 살균효과를 비교하고자 하였다. 염화나트륨 첨가에 의한 피틴산의 살균효과 증가폭이 극명하여 접종균을 회생불가능 수준까지 사멸시켰던 최소조건인 실시예 4, 28, 29, 47, 72를 선정하여 같은 농도의 초산(비교예 49, 53, 57, 61), 구연산(비교예 50, 54, 58, 62), 유산(비교예 51, 55, 59, 63), 사과산(52, 56, 60, 64)을 첨가하여 처리하였으며, 그 조건은 다음 표 5와 같다.

표 5

비교대상	유기산 농도(%)	염화나트륨 농도(%)	처리시간(분)	타 유기산 혼합조성물 실험군
실시예 4	2	4	1	비교예 49-52
실시예 28	3	3	1	비교예 53-56
실시예 47	0.4	3	5	비교예 57-60
실시예 72	0.6	4	5	비교예 61-64

그 결과 다음 도 5와 같이 실시예 4, 28, 47, 72에서는 접종한 모든 일반배양균(실시예 4, 실시예 47)과 산적응배양균(실시예 28, 72)이 모두 사멸한 반면 비교예에서의 저감효과는 대부분 1 log CFU/ml 미만, 유산의 경우에도 2 log CFU/ml 미만으로 나타나 본 발명기술의 주요한 시너지 살균효과가 다른 유기산이 아닌 피틴산에 의해서 더욱 극명하게 나타나는 것을 확인하였다.

실험예 5. 표면 형성시킨 바이오필름에 보호되고 있는 균체에 대한 피틴산 또는 염화나트륨 수용액과 그 혼합조성물 살균효과

[0073] 염화나트륨 첨가에 의해 피틴산의 살균효과가 증가하는 현상이 표면 형성시킨 바이오필름에 의해 보호되고 있는 균체에 대해서도 나타나는지를 확인하기 위하여 다양한 산업분야에서 주로 사용되는 스테인리스 스틸(type 304) 쿠폰($2 \times 5 \text{ cm}^2$)을 제작하여 바이오필름을 형성시킨 후 실험을 진행하였다.

[0074] 먼저 멸균상태의 스테인리스 스틸 쿠폰을 만들기 위하여 70% 에탄올에 10분간 담갔다가 멸균 증류수로 2회 세척하여 무균 작업대에서 2시간 동안 건조하였다. 건조된 쿠폰을 다시 121°C 에서 15분간 가압 살균하여 실험에 사용하였다. 바이오필름의 형성에는 실험예 1-4에서 사용한 대표적 내산성 식중독세균인 장출혈성대장균 0157:H7(ATCC 35150, 43889, 43895)을 그대로 사용하였으며, 균생장에 필요한 최소 영양배지로 더욱 내성이 강한 바이오필름을 형성시킬 수 있는 것으로 알려져 있는 M9 medium 배지로 사용하였다. 각 균주의 일반 배양균을 인산 완충액에 희석하여 초기농도 10^7 - 10^8 CFU/ml의 균액을 제조한 후에 멸균한 쿠폰을 넣고 냉장 환경(4°C)에서 24시간 동안 균체가 쿠폰 표면에 부착되도록 하였다.

[0075] 표면에 균을 부착시킨 쿠폰을 다시 멸균 증류수로 5초간 행균 후 멸균 M9 medium 배지에 옮겨 6일간 상온(22°C)배양하여 바이오필름을 형성시켰다. 바이오필름이 형성된 쿠폰을 멸균 집게를 이용하여 배지에서 꺼낸 후에 멸균 증류수로 5초간 행귀내어 쿠폰 표면과 바이오필름에 제대로 부착되지 않고 남아있는 균체들을 제거한 후 실험에 사용하였다.

[0076] 바이오필름에 의해 보호되고 있는 균체에 대한 개발 조성물의 살균력을 검증하기 위하여 하기 표 6에 나타난 피탄산과 염화나트륨 농도에 따라, 실시예 및 비교예의 조성물을 제조하였으며, 이를 상기 제조한 표면 형성시킨 바이오필름에 5분간 처리하였다.

표 6

[0077]

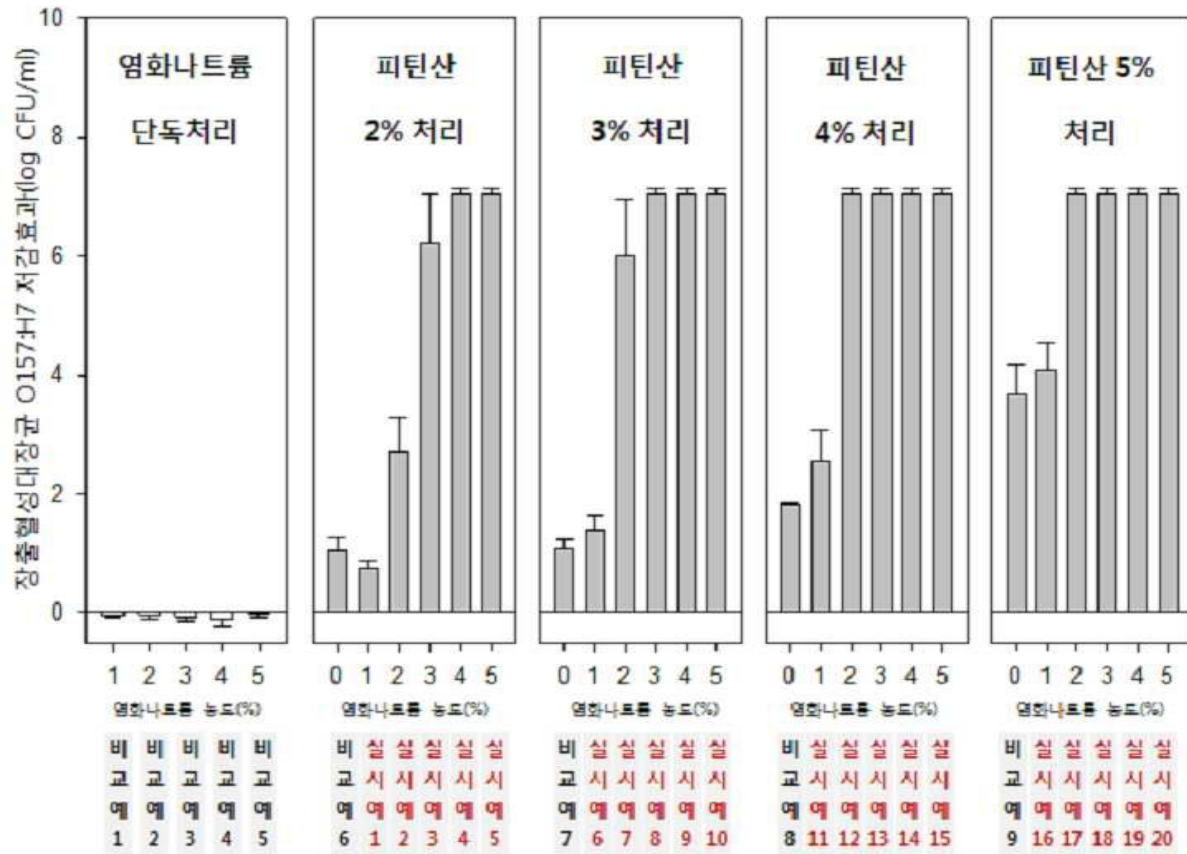
실험군	피탄산 농도(%)	염화나트륨 농도(%)	처리시간(분)	바이오필름
대조군 (단일조성물)	0-0.4	-	5	비교예 65-68
	-	1-4	5	비교예 69-72
실험군 (혼합조성물)	0.1	1-4	5	실시예 81-84
	0.2	1-4	5	실시예 85-88
	0.4	1-4	5	실시예 89-92

[0079] 모든 실험은 3반복 수행되었으며, 실험예5의 실험결과는 다음 도 6에 나타내었다.

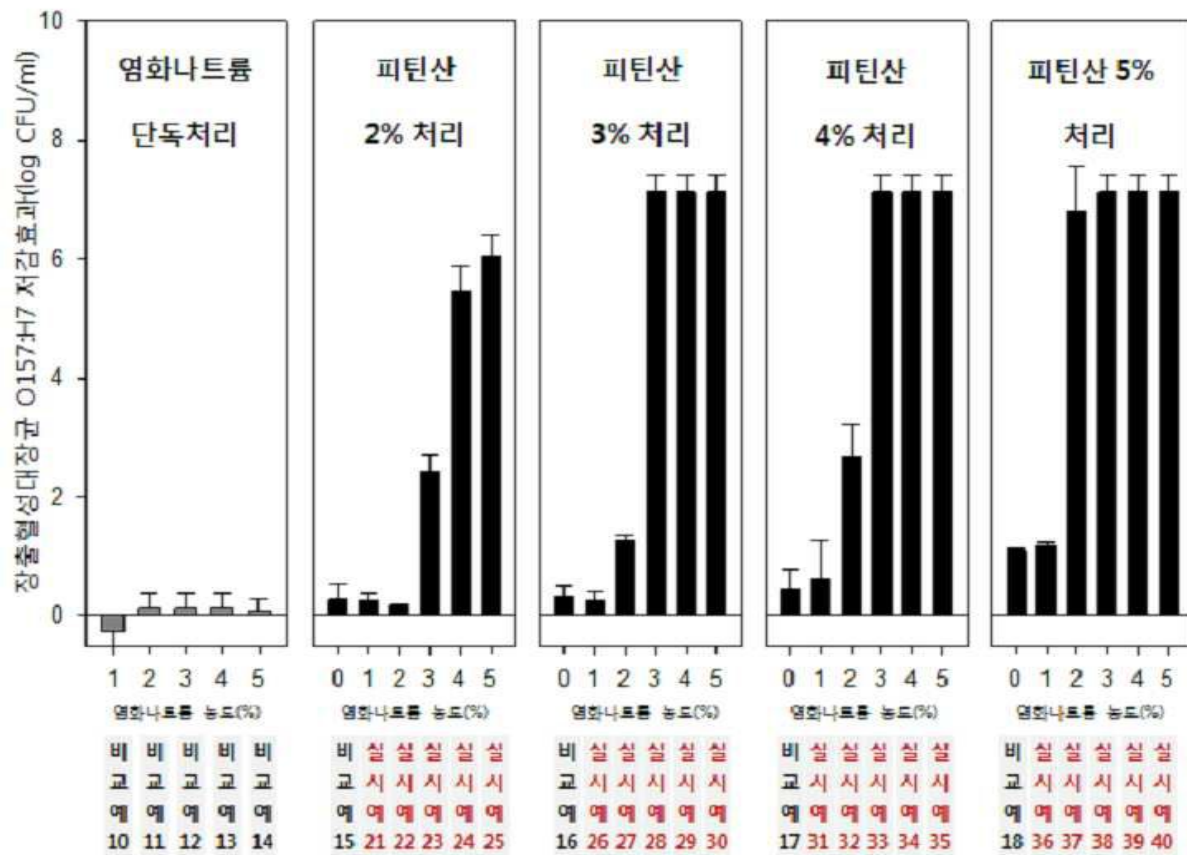
[0080] 실험결과 비교예 65-72에 비해 실시예 81-92의 저감효과가 높아진 것을 알 수 있으며, 특히 0.4% 이상의 피탄산에 2% 이상의 염화나트륨을 첨가한 실시예 90-92의 저감효과가 현저히 증가하였으며, 실시예 92의 경우에는 집중한 제어대상 식중독세균을 회생 불가능한 수준까지 제어함을 확인하였다.

도면

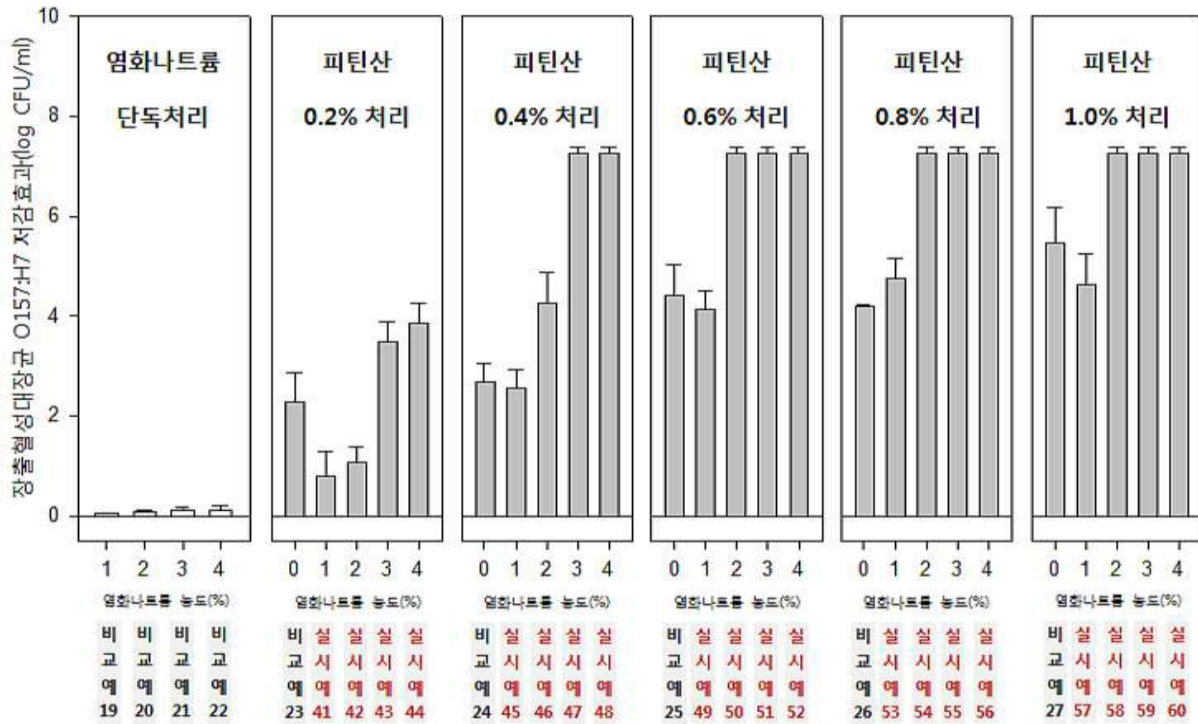
도면1



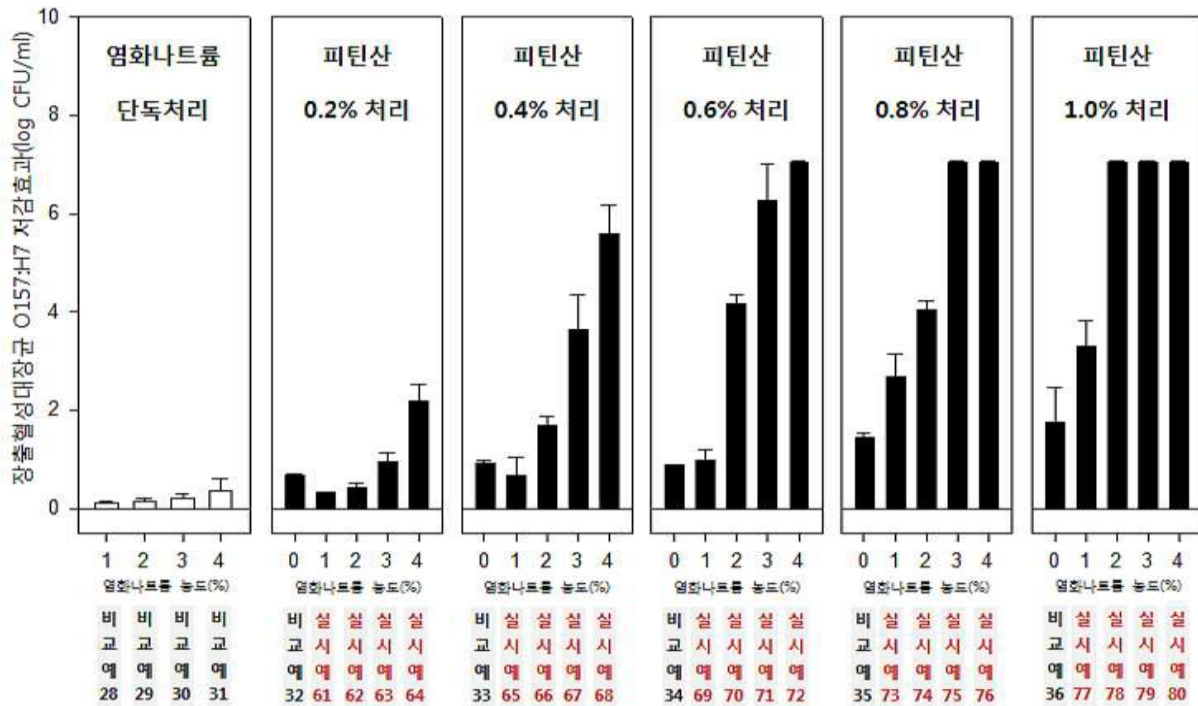
도면2



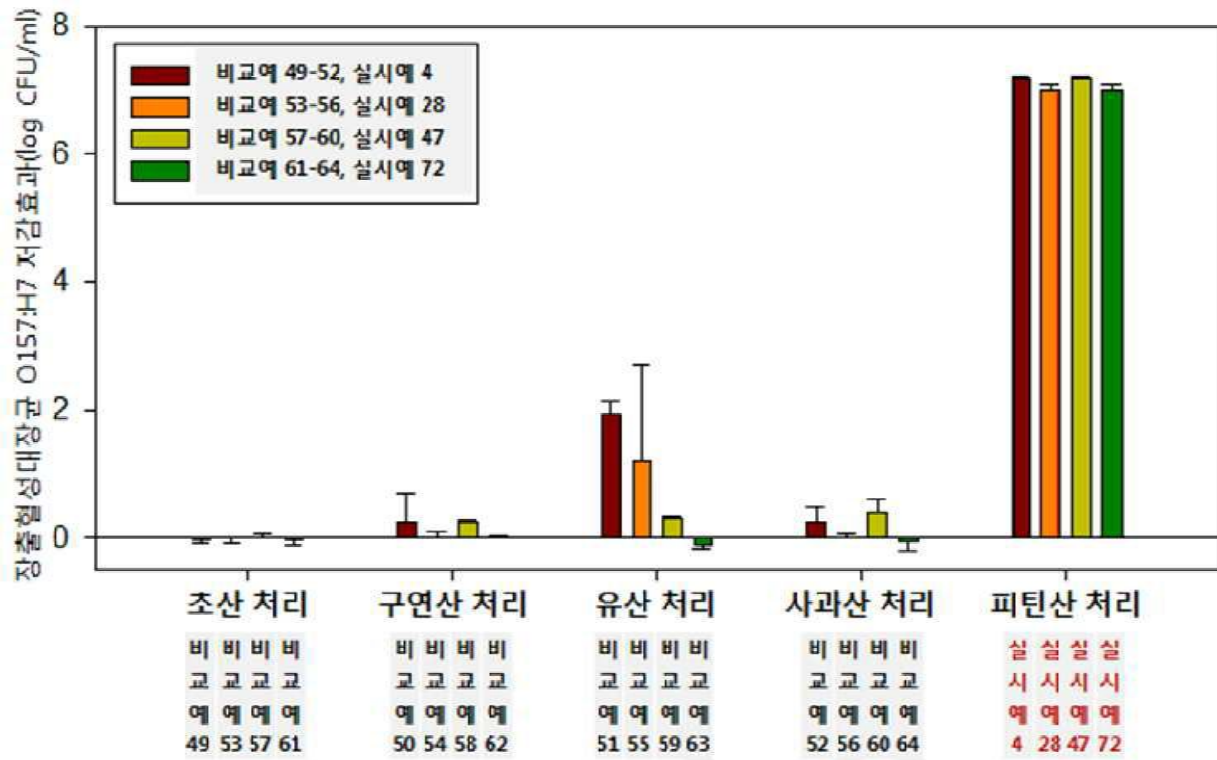
도면3



도면4



도면5



도면6

