J. Fd Hyg. Safety
Vol. 23, No. 4, pp. 291~296 (2008)

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

표면시험법을 이용한 식품접촉표면 재질에 따른 살균소독제의 유효성 평가

김형일 · 전대훈 · 윤혜정 · 최현철 · 엄미옥 · 성준현 · 박나영 · 원선아 · 김난영 · 이영자*
식품의약품안전청 용기포장과

Evaluation of the Efficacy of Sanitizers on Food Contact Surfaces Using a Surface Test Method

Hyungil Kim, Daehoon Jeon, Haejung Yoon, Hyuncheol Choi, Miok Eom, Junhyun Sung, Nayoung Park, Sunah Won, Nanyoung Kim, and Youngja Lee*
Food Packaging Division, Korea Food and Drug Administration
(Received October 21, 2008/Revised November 1, 2008/Accepted November 20, 2008)

ABSTRACT -The study was undertaken to provide information on the efficacy of sanitizers against bacteria with and without organic road dried on to food contact surfaces using the surface test method which EU and USA are currently implementing as one of their official test methods. *Escherochia coli* ATCC 10536 or *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 was inoculated on to food contact surfaces, such as stainless steel, polypropylene, and silicon, which was then treated with benzalkonium chloride, sodium hypochlorite, or ethanol as a sanitizer for 5minutes at 20 °C. Results indicated that the type of surface had little affected the efficacy of various sanitizers. In addition, 200 ppm of benzalkonium chloride or 200 ppm of sodium hypochlorite showed no definite reduction of bacterial populations in the present of organic load, while 40% ethanol showed reduction to 4 cfu $\log_{10}$/carrier or more in viable count in the organic load.

Key words : sanitizer, surface test method, food contact surface

현재 국내에서 식품용 조리기구 등의 살균소독 목적에 사용되는 기구등의 살균소독제에 대한 유효성 평가는 현탁액시험법(Suspension test)을 중심으로 이루어지고 있으며, 여러가지 식중독세균에 대해 효과가 있음이 증명된 바 있다[1-4]. 이 현탁액시험법은 적절한 미생물에 대해 유기물질, 물의 경도, 접촉시간, 처리온도 등 실제 사용조건을 모사한 변수들의 영향을 평가하는데 유용하다. 그러나, 대장균, 황색포도상구균, 살모넬라 등이 손이나 작업복, 용기 등에 부착되면 수시간에서 수일간 살아남을 수 있으며 이러한 미생물들이 식품접촉표면에 부착될 경우 부유균에 비해 살균소독제에 대한 저항성이 증가된다고 보고[5-8]되고 있다. 이에 따라 미국, 유럽연합 등 제외국에서는 현탁액시험법외에 표면시험법(Surface test)[9-11]도 공정시험법으로 사용 가능하도록 하고 있으나 국내에서는 표면시험법 표준화에 대한 연구가 미흡한 실정이다. 특히, 접촉표면의 종류가 살균소독제의 유효성에 영향을 미친다는 연구결과도 발표[12,13]되고 있다는 점을 고려할 때, 식품가공기구에 폭넓게 사용되는 스테인리스 외에 식품용 탱크, 파이프라인 및 실링 재질로 많이 쓰이고 있는 폴리프로필렌이나 고무 등의 재질[14,15]에서 살균소독제가 실제로 어느정도의 살균소독력을 나타내는지를 연구할 필요가 있다. 따라서 본 연구에서는 미국, 유럽연합의 표면시험법을 토대로 식품접촉표면으로 많이 사용되는 스테인리스, 폴리프로필렌, 실리콘 재질을 대상으로 기구등의 살균소독제중 계통별로 제품수가 가장 많은 염소계, 4급암모늄계 및 에탄올계 살균소독제의 살균소독력을 비교 · 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 시약

*Correspondence to: Youngja Lee, Food Packaging Division, Korea Food and Drug Administration, 194 Tongilno, Eunpyunggu, Seoul, 122704, Korea
Tel: 8223801695 ; Fax: 8223580525
Email: snoopy7@kfda.go.kr

기구등의 살균소독제

차아염소산나트륨(Acros사, New Jersey, USA), 염화벤잘코늄(Sigma-Aldrich사, St. Louis, Mo, USA) 및 에탄올(Merck사, Darmstadt, Germany)을 사용하였다.

담체(Carrier)

지름 1 cm, 두께 1 mm의 stainless steel, polypropylene 및 silicon 담체(그림 1)를 실험기구 도매상으로부터 제작·구입하여 사용하였다.

표준균주

표준균주는 *Escherichia coli* ATCC 10536, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538을 질병관리본부 병원체방어연구실로부터 분양 받아 사용하였다. 각 균주를 tryptone soya broth(TSB)에 활성화시킨 후 tryptone soya agar(TSA)에 계대하여 37 ℃에서 18~24시간 배양하였다. 같은 방법으로 2차 배양과 3차 배양으로 활성 배양된 균만을 사용하였다.

시약 및 배지

모든 시약은 분석등급 이상의 시약을 사용하였으며, 배지는 Tryptone soya agar(TSA, Oxoid사, hampshire, England) 및 tryptone soya broth(TSB, Oxoid사, hampshire, England)를 각각 구입하여 사용하였다.

실험방법

살균소독력 평가방법은 stainless steel 표면에 시험균을 건조시킨 후 그 위에 살균소독제를 처리하여 유효성을 평가하는 방법으로 국제적으로 많이 사용되는 방법인 CEN EN 13697[9] 및 ASTM E 2197-02[11]의 방법을 수정 · 보완하여 수행하였으며, 살균소독력 유무에 대한 기준은 각 시험표면의 생균수(cfu/carrier)를 계산하여 생균수 감소율이 99.99% 이상일 때를 살균소독력이 있다고 판정하였다. 각 표면에서의 살균소독력에 대한 유의성 검증은 Student's t-test로 양측검증을 시행하여 p값이 0.05이하인 때를 통계적으로 유의한 것으로 결정하였다.

희석액의 조제

Tryptone, pancreatic digest of casein(Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA) 1.0 g, NaCl 8.5 g을 증류수 1 L에 녹인 후 멸균하였다.

중화제의 조제

lecithin 3 g, polysorbate80 30 g, sodium thiosulfate 5 g, L-histidine 1 g 및 saponine 30 g에 희석액을 가하여 1 L로 만든 용액을 조제한 후 멸균하였다.

경수의 조제

용액 A($MgCl_2$ 19.84 g과 $CaCl_2$ 46.24 g을 물 1 L에 용해) 3 ml와 용액 B($NaHCO_3$ 35.02 g을 물 1 L에 용해) 8 ml에 증류수를 첨가하여 1 L로 정용한 뒤 pore size 0.45 μm의 membrane filter로 여과한 후 멸균하였다.

시험균 현탁액의 조제

희석액을 넣은 멸균용기에 활성배양된 시험균을 접종하여 생균수가 1.5×10^8 cfu/ml ~ 5×10^8 cfu/ml가 되도록 하였다.

간섭물질의 조제

트립톤(Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA) 용액(50 mg/L) 35 μl, 알부민(Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA) 용액(50 mg/L) 25 μl, 뮤신(Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA) 용액(4 mg/L) 100 μl를 혼합하여 여과 멸균하여 사용하였다.

시험표면 접종액의 조제

청정조건을 위한 시험표면 접종액은 시험균주 현탁액을 그대로 사용하였으며, 오염조건을 위한 시험표면 접종액은 시험균주 현탁액 340 μl와 간섭물질 160 μl를 혼합하여 20 ℃ 항온수조에서 30분간 방치한 액을 사용하였다.

시험용액의 조제

차아염소산나트륨은 유효염소로서 50, 75, 100 150 및 200 ppm으로, 염화벤잘코늄은 50, 100 및 200 ppm으로, 에탄올은 20%, 30% 및 40%가 되도록 각각 경수로 희석하여 각 시험용액으로 사용하였다.

시험표면의 조제

세척제, 멸균증류수, 70% 에탄올 순으로 세척한 후 무균대(clean bench)에서 건조한 stainless steel, polypropylene, silicon 담체의 중앙에 청정조건 또는 오염조건의 시험표면 접종액 10 μl를 각각 접종하고 40분~60분간 건조시켜 청정조건 또는 오염조건의 stainless steel 시험표면, polypropylene 시험표면 및 silicon 시험표면으로 사용하였다.

시험조작

시험표면의 중앙에 접종하여 건조시킨 시험균 현탁액의 건조된 표면이 위로 향하게 하여 유리병에 넣고 유리병 안의 시험표면 중앙에 시험용액 50 μl를 가하여 5분간 반

응시켰다. 멸균된 유리비드 2~3 g과 중화제 9 ml를 유리병 안에 넣고 진탕교반기에서 1분간 진탕 하였다. 진탕 후 이 액을 막여과장치(Analytical filter unit, Nalgene)에 즉시 여과하고 멸균생리식염수로 2회(40 ml+100 ml) 세척 · 여과하였다. 여과막을 TSA의 표면에 여과한 쪽이 위로 향하게 하여 밀착시킨 후 36 °C에서 24시간 배양한 후 생균수를 측정하였다. 따로 각 시험용액 대신 멸균생리식염수를 사용하여 대조시험을 수행하였다.

결과 및 고찰

식품접촉재질별 차아염소산나트륨의 유효성 평가 결과

식품제조 가공시 식품과 접촉하는 stainless steel, polypropylene, silicon재질에 부착된 *E. coli* ATCC 10536과 *S. aureus* ATCC 6538균에 대한 차아염소산나트륨의 살균소독력을 평가한 결과를 Fig. 2 및 3에 나타내었다.

기구 등이 충분히 세척되지 않은 조건을 모사하기 위하여 간섭물질을 첨가한 오염조건에서는 *E. coli* 의 경우 50 mg/L 처리시 4 CFU $\log_{10}$/carrier 감소하였으나 *S. aureus* 에 대해서는 200 mg/mL 처리시에도 효과가 없었다. 그러나 간섭물질을 첨가하지 않은 청정조건에서는 150 mg/L 처리시 *S. aureus*가 4 CFU $\log_{10}$/carrier 이상 감소하였다.

이는 현탁액시험 중 청정조건에서 *E. coli* 는 50 mg/L, *S. aureus*는 100 mg/L의 차아염소산나트륨 처리에 의하여 5 CFU $\log_{10}$/mL 이상 감소하였음을 보고한 김 등[3]의 결과와 비교하여 볼 때, 현탁액 중의 부유균보다 표면에 건조된 균들이 살균소독제에 대해 저항성을 나타내는 것으로 보인다. 이같은 결과는 Ronner와 Wong의 연구결과[12]와 일치하는 것이나, 식품접촉재질별에 따른 차아염소산나트륨의 유효성은 균의 종류에 따라 다른 결과를 보였다. *E. coli* 의 경우에는 차아염소산나트륨 50 mg/mL 처리시 silicon보다 stainless steel 및 polypropylene에서 좀 더 감소하였으나, *S. aureus*의 경우에는 차아염소산나트륨 150 mg/mL 처리시 큰 차이를 보이지 않았다. 이것은 식품접촉표면의 종류가 살균소독제 유효성에 영향을 미친다는 연구 결과[12,13]와는 다른 것으로 Fig. 1에서 보는 바와 같이 균이 접촉하는 재질표면의 상태가 유사하기 때문으로 판단된다. 다만, 차아염소산나트륨과 같은 염소계 살균소독제는 유기물과 쉽게 반응하여 항균력을 잃는 것으로 알려져 있으므로[17] 올바른 살균소독을 위해서 차아염소산나트륨 사용 전 충분한 세척과정이 있어야 할 것으로 보인다.

식품접촉재질별 염화벤잘코늄의 유효성 평가 결과

Fig. 4 및 Fig. 5에 나타낸 바와 같이 *E. coli*의 경우 염화벤잘코늄 200 mg/L에서 청정조건 및 오염조건 모두 4 CFU $\log_{10}$/carrier 이상 감소하였으나 *S. aureus*는 3 CFU $\log_{10}$/carrier 정도 감소하여 *E. coli*보다 염화벤잘코늄에 대

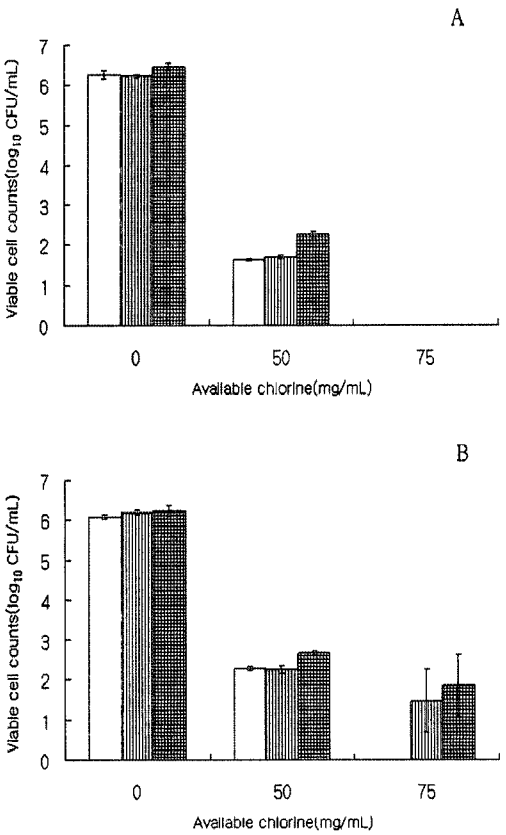

Fig. 2. Survival of *E. coli* on stainless steel(□), polypropylene(▥), and silicon(▦) surfaces(A, clean conditions; B, dirty conditions) after contact with sodium hypochlorite at 20 °C for 5min. Data were reported as means of triplicate determinations and standard deviations.

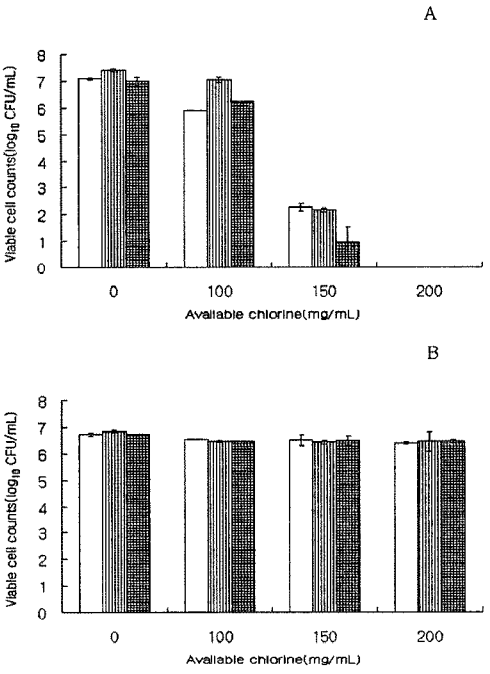

Fig. 3. Survival of *S. aureus* on stainless steel(□), polypropylene(▥), and silicon(▦) surfaces(A, clean conditions; B, dirty conditions) after contact with sodium hypochlorite at 20 °C for 5min. Data were reported as means of triplicate determinations and standard deviations.

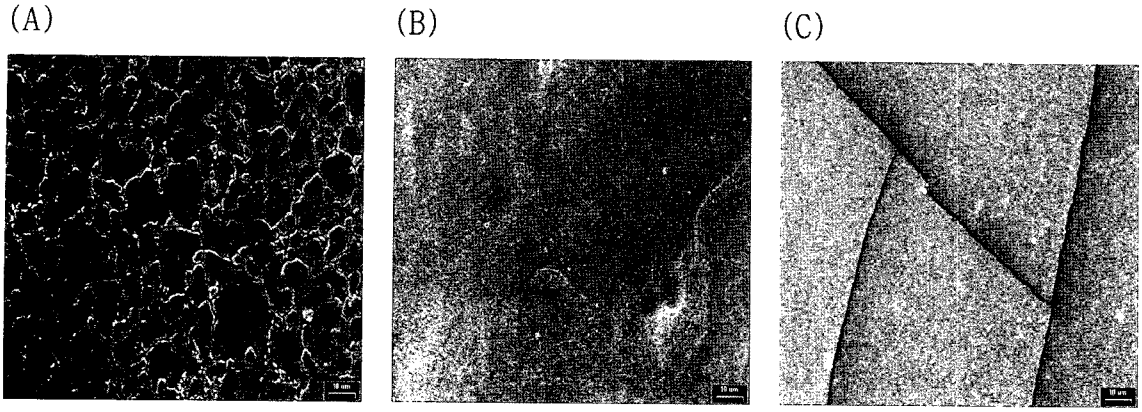

Fig. 1. Scanning electron photomicrograph of food contact surfaces. (A) stainless steel, (B) polypropylene, (C) silicon(Bar: 10 μm)

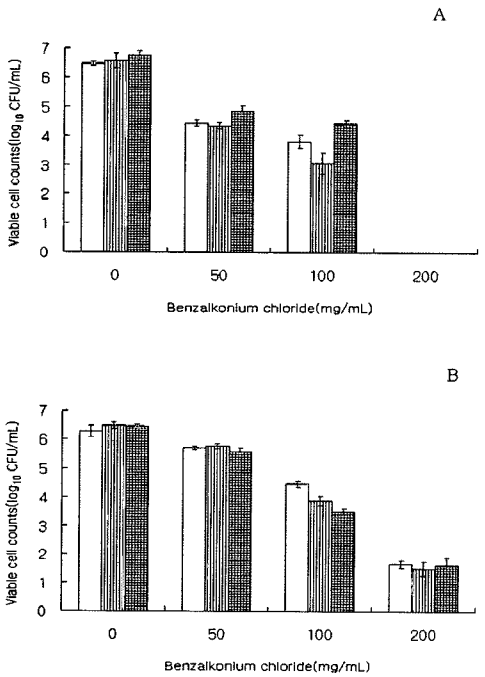

Fig. 4. Survival of *E. coli* on stainless steel(□), polypropylene(▥), and silicon(▦) surfaces(A, clean conditions; B, dirty conditions) after contact with benzalkonium chloride at 20 °C for 5min. Data were reported as means of triplicate determinations and standard deviations.

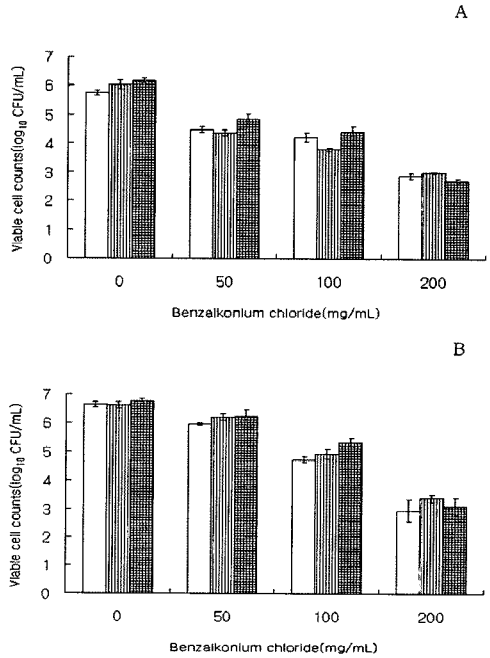

Fig. 5. Survival of *S. aureus* on stainless steel(□), polypropylene(▥), and silicon(▦) surfaces(A, clean conditions; B, dirty conditions) after contact with benzalkonium chloride at 20 °C for 5min. Data were reported as means of triplicate determinations and standard deviations.

해 다소 저항성이 강한 것으로 나타났는데, 이 결과는 Lopes의 보고[18]와 일치하는 것이었다. 또한 현탁액시험에서 상기 두 균을 5 CFU log_{10}/mL 감소시키기 위한 염화벤잘코늄의 농도가 50~100 mg/L 이었음을 보고한 김 등[3]의 결과와 비교하였을 때 차아염소산나트륨과 같이 균이 식품접촉표면에 부착되었을 때가 부유균보다 염화벤잘코늄에 대하여 저항성이 증가하는 것으로 보인다. Frank 등[13]은 4급 암모늄계 살균소독제인 N-alkyl dimethyl benzyl alkonium chloride 200 mg/L 처리시 stainless steel과 polycarbonate 재질에 부착된 *S. aureus*는 5 log_{10}/carrier 감소한 반면 mineral resin 재질에서는 2~3 CFU log_{10}/carrier 정도 감소하여 재질에 영향을 받는다고 보고하였다. 그러나, 본 연구에서는 염화벤잘코늄 200 mg/L 처리시 stainless steel, polypropylene 및 silicon 재질 사이에 염화벤잘코늄에 대한 유효성 차이는 보이지 않았다.

식품접촉재질별 에탄올의 유효성 평가 결과

에탄올에 대한 유효성 평가 결과를 Fig. 6 및 Fig. 7에 나타내었다. 에탄올 20% 처리시 두 균주 모두 큰 영향을 받지 않았으며 30% 처리시 청정조건의 *E. coli*만이 3 CFU log_{10}/carrier 정도 감소하였다. 에탄올 40% 처리시 3가지 재질 모두 4 log_{10}/carrier 이상 감소하였으며, 이 때 재질에 대한 영향은 크게 나타나지 않았다. Bloomfield 등[19]은 *Enterococcus faecium*과 *Pseudomonas aeruginosa*를 대상으로 한 살균소독제 표면시험법 재현성 평가 결과 stainless steel 및 formica 재질 사이에 차이가 없음을 보고한 바 있다.

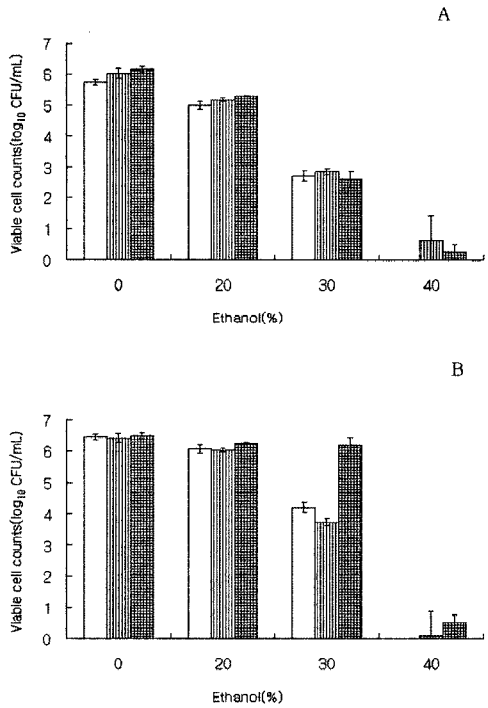

Fig. 6. Survival of *E. coli* on stainless steel(□), polypropylene(▥), and silicon(▦) surfaces(A, clean conditions; B, dirty conditions) after contact with ethanol at 20 °C for 5min. Data were reported as means of triplicate determinations and standard deviations.

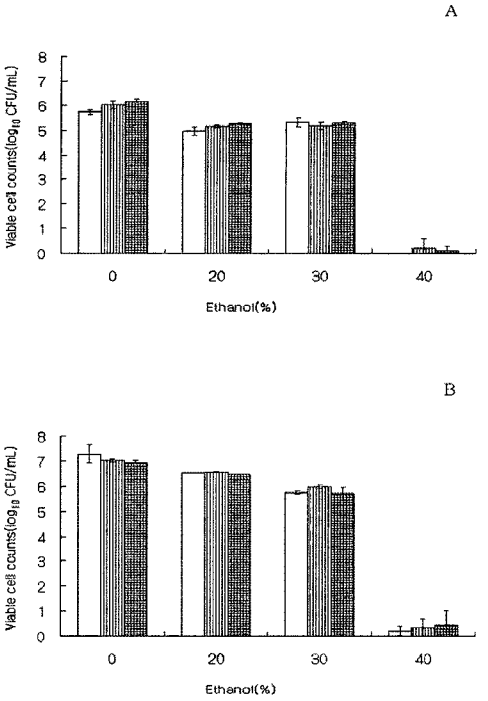

Fig. 7. Survival of S. aureus on stainless steel(□), polypropylene(▥), and silicon(▦) surfaces(A, clean conditions; B, dirty conditions) after contact with ethanol at 20 °C for 5min. Data were reported as means of triplicate determinations and standard deviations.

요 약

현재 미국 및 유럽에서 공정시험법중 하나로 인정되고 있는 표면시험법을 사용하여 유기물과 함께 또는 유기물 없이 세균만 건조된 식품접촉 표면에 서의 살균소독제 유효성에 대한 정보를 제공하고자 식품접촉표면으로 사용되는 스테인리스, 폴리프로필렌 및 실리콘에 *Escherochia coli* ATCC 10536 또는 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538을 접종하고 살균소독제로서 염화벤잘코늄, 차아염소산나트륨 또는 에탄올을 20 °C에서 5분간 처리하였다. 그 결과, 각 표면의 종류는 살균소독제의 유효성에 큰 영향을 미치지 않았으며, 200 ppm 농도의 염화벤잘코늄 및 차아염소산나트륨은 유기물질이 존재할 경우 생균수를 4 cfu log_{10}/carrier 이상 감소시키지 못하였으나, 40% 에탄올은 생균수를 4 cfu log_{10}/carrier 이상 감소시키는 것으로 나타났다.

참고문헌

1. 김형일, 이광호, 곽인신, 엄미옥, 전대훈, 성준현, 최정미, 강한샘, 김용수, 강길진: 살균소독력 시험법 확립 및 살균소독력 평가, 한국식품과학회지, **37**(5), 838-843 (2005)
2. 김형일, 전대훈, 강길진, 엄미옥, 성준현, 강한샘, 곽효선, 권기성, 이영자: 유통식품에서 분리한 *Staphylococcus aureus* 및 *Escherichia coli*의 살균소독제 감수성, 한국식품과학회지, **39**(1), 104-107 (2007)
3. 김형일, 윤혜정, 최현철, 전대훈, 엄미옥, 성준현, 박나영, 원선아, 김남희, 성덕화, 곽효선, 권기성, 이영자: Listeria monocytogenes와 Salmonella spp.에 대한 Sodium Hypochlorite 및 Benzalkonium Chloride의 유효성 평가, 한국식품위생안전성학회지, **22**(2), 132-136 (2007)
4. 김일진, 김용수, 김형일, 최현철, 전대훈, 이영자, 하상도: *Vibrio parahaemolyticus* 표준 및 식품분리주에 대한 살균소독제 유효성분별 감수성 평가, 한국식품위생안전성학회지, **22**(2), 127-131 (2007)
5. Kusumaningrum, H.D., Riboldi, G., Hazeleger, W.C., and Beumer, R.R.: Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *Int. J. Food Microbiol.*, **85**, 227-236 (2003)
6. Fuster-Valls, N., Hernandez-Herrero, M., Marin-de-Mateo, M., and Rodriguez-Jerez, J.J.: Effect of different environmental condotion on the bacteria survival on stainless steel surfaces. *Food Control*, **19**, 308-314 (2008)
7. Gibson, H., Elton, R., Peters, W., and Holah, J. T.: Surface and suspension testing: Conflict or complementary. *Int. Biodeter Biodegr*, 36, 375-384 (1995)
8. Peng, J.S., Tsai, W.C., and Chou, C.C.: Inactivation and removal of Bacillus cereus by sanitizer and detergent. *Int. J. Food Microbiol.*, **77**, 11-18 (2002)
9. Chemical disinfectants and antiseptics-Quantitative nonporous surface test of bactericidal and/or fungicidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic and institutional areas-Test method and requirements(phase 2/step 2). *European committee for stan-*

dardization, EN 13697, British standards institution(2001)
10. American Society for Testing and Materials : Standard quantitative carrier test method to evaluate the bactericidal, fungicidal, mycobactericidal and sporicidal potencies of liquid chemical germicides(Designation : E 2111-00), *ASTM International*, West conshohocken, PA, USA (2001)
11. American Society for Testing and Materials : Standard quantitative disk carrier test method for determining the bactericidal, virucidal, fungicidal, mycobactericidal and sporicidal activities of liquid chemical germicides(Designation : E 2197-02), *ASTM International*, West conshohocken, PA, USA (2002)
12. Ronner, A.B. and Wong, A.C.L.: Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and Buna-n rubber. *J. Food Prot*, **56**(9), 750-758 (1993)
13. Frank, J.F. and Chmielewski, R.A.N.: Effectiveness of sanitation with quaternary ammonium compound or chlorine on stainless steel and other domestic food-preparation surfaces. *J. Food Prot*, **60**(1), 43-47 (1997)
14. Mafu, A.A., Roy, D., Goulet, J., and Magny, P.: Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene, and rubber surfaces after short contact times. *J. Food Prot*, **53**(9), 742-746 (1990)
15. Oulahal, N., Brice, W., Martial, A., and Degraeve, P.: Quantitative analysis of survival of *Staphylococcus aureus* or *Listeria innocua* on two types of surfaces: Polypropylene and stainless steel in contact with three different dairy products. *Food Control*, **19**, 178-185 (2008)
16. Klingeren, B.V.: Disinfectant testing on surfaces. *J. Hosp. Infect.*, **30**(Supplement), 397-408 (1995)
17. Bloomfield, S.: Chlorine and iodine formulations. In Handbook of disinfectants and antiseptics. (Joseph A. ed) Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 133-158 (1996)
18. Lopes, J.A.: Evaluation of dairy and food plant sanitizers against *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes. J. Dairy Sci.*, 69, 2791-2796 (1986)
19. Bloomfield, S.F., Arthur, M., Klingeren B.V., Pullen, W., Holah, J.T., and Eltom, R.: An evaluation of the repeatability and reproducibility of a surface test for the activity of disinfectants. *J. Appl. Bactriol.*, **76**, 86-94 (1994)