(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년01월20일
(11) 등록번호 10-1587244
(24) 등록일자 2016년01월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 2/07 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0040617
(22) 출원일자 2014년04월04일
심사청구일자 2014년04월04일
(65) 공개번호 10-2015-0115483
(43) 공개일자 2015년10월14일
(56) 선행기술조사문헌
JP2003146313 A*
WO2005049239 A1*
JP2009544803 A*
KR100780575 B1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
서울대학교산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
(72) 발명자
강동현
서울특별시 관악구 낙성대로15길 56-39, 서울대학교 BK국제관 A동 1104호
반가희
서울특별시 관악구 관악로 1번지 서울대학교 농업생명과학대학 1040호
(74) 대리인
특허법인태동

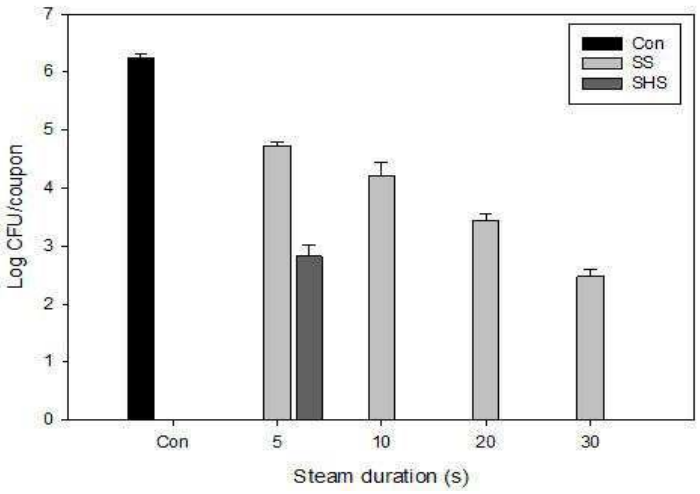
전체 청구항 수 : 총 2 항 심사관 : 홍상표

(54) 발명의 명칭 **과열수증기를 이용한 바이오필름의 제거방법**

(57) 요 약

본 발명은 과열수증기를 이용한 바이오필름 제거방법 및 이를 위해 사용될 수 있는 바이오필름 제거기에 관한 것으로, 본 발명을 이용할 경우 병원성 바이오필름 형성균 또는 이 균이 형성하는 바이오필름을 효과적으로 제어할 수 있다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 0635-2012-0014
부처명 농림축산식품부
연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원
연구사업명 농업연구센터
연구과제명 분자수준제어기반 농수산식품 안전성 확보 신기술 개발
기 여 율 1/2
주관기관 서울대학교
연구기간 2010.09.01 ~ 2017.08.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 PJ009266
부처명 농촌진흥청
연구관리전문기관 농촌진흥청
연구사업명 공동연구_친환경안전농축산물생산기술_농식품위해요소
연구과제명 초고온 증기(Superheated steam) 기술을 이용한 농산물의 식중독균 저감화 연구
기 여 율 1/2
주관기관 을지대학교
연구기간 2013.02.01 ~ 2014.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

포화수증기를 정압하에서 가열해 포화온도보다 온도를 상승시킴으로써 형성되는 과열수증기를 바이오필름 형성균이 형성시킨 바이오필름에 처리하되,

상기 과열수증기는, 포화수증기를 150~200℃의 온도로 상승시켜 형성된 과열수증기이고,

상기 처리는, 20~30초 동안 처리하며,

상기 바이오필름 형성균은, 대장균 O157:H7(*E. coli* O157:H7), 살모넬라 타이피무리움(*S. Typhimurium*) 및 리스테리아 모노사이토제니스(*L. monocytogenes*) 중 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 바이오필름의 제거방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

포화수증기를 정압하에서 가열해 포화온도보다 온도를 상승시킴으로써 형성되는 과열수증기를 바이오필름 형성균에 처리하되,

상기 과열수증기는, 포화수증기를 150~200℃의 온도로 상승시켜 형성된 과열수증기이고,

상기 처리는, 20~30초 동안 처리하며,

상기 바이오필름 형성균은, 대장균 O157:H7(*E. coli* O157:H7), 살모넬라 타이피무리움(*S. Typhimurium*) 및 리스테리아 모노사이토제니스(*L. monocytogenes*) 중 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 바이오필름 형성균의 살균방법.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 과열수증기를 이용해 병원성 바이오필름을 제어하는 방법에 관한 것으로, 더욱 구체적으로는 과열수증기를 이용한 바이오필름 제거방법 및 이를 위해 사용될 수 있는 바이오필름 제거기에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 현대 의학과 식생활의 발달로 여러가지 의료장치 및 식품공정기기의 사용이 급증하고 있으며, 이러한 장치 및 기기 중에는 세균이 정착하여 바이오필름을 형성하기 쉬운 스테인레스 스틸, 플라스틱 및 고무 등의 재료가 많아 바이오 필름 관련 감염증이 빠르게 증가하고 있다. 선진국의 경우 치료를 요하는 세균 감염증의 60% 이상이 바이오필름 형성과 관련되어 있는 것으로 보고되고 있다.

[0003] 한편, 바이오필름은 세균들이 서로 뭉쳐 하나의 점액질 막을 형성해 외부환경에 대항하는 것으로, 세균 뿐 아니라, 진균도 포함해 덩어리를 이룬다. 바이오필름에는 정상적으로는 공존할 수 없는 여러 종류의 세균이 서식하고, 영양공급이나 노폐물의 배출을 담당하는 수로까지 갖추어져 있는 것으로 알려져 있다. 바이오필름 내에 존재하는 미생물은 항균제 치료로도 제거가 어려워 큰 문제가 되고 있다.

[0004] 한편, 현재까지 바이오필름 제어를 위해, 전기장(electric fields), 초음파(ultrasound), 고압(high pressure), 자동 세척기(automatic scrubbers), 산/염기 워시액(acid/alkali wash), 염소계 소독제(chlorine), 과산화 살균제(peracid sanitizer) 등이 연구되어 왔다.

[0005] 하지만, 전기적 저항에 의한 발열을 이용하는 전기장(electric fields), 초음파 진동을 이용하여 균을 탈리시키는 초음파(ultrasound), 압력을 높여 세포막을 파괴하는 고압처리(high pressure) 기술의 경우에는 균의 살균 효과가 미미하고, 살균처리 가능 면적이 좁아 실제적 적용이 어려우며, 설치 및 처리 비용이 높은 문제점이 있다.

[0006] 또한, 화학적 방법인 산/염기 워시액(acid/alkali wash), 염소계 소독제(chlorine), 과산화 살균제(peracid sanitizer)는 금속재료에 사용할 경우 부식의 위험성을 갖고 있다. 특히 살균처리에 빈번하게 사용되고 있는 염소계 살균 소독제의 경우 트리할로메탄과 같은 발암물질의 생성이 보고되고 있다. 또한, 살균 후, 세척과정에서 대량의 세척수를 필요로 하며, 세척수를 재사용함으로써 살균 및 소독된 식품공정기기에 병원성 미생물이 재오염 되는 문제점이 생길 수 있다. 또한, 식품과 접촉하는 공정기기의 살균과정에 고농도의 화학물질을 사용하는 것에 대해 소비자들의 반감을 살 가능성이 높다는 우려와 다년간 염소계 소독제를 사용해옴으로써 병원성 미생물이 염소계 소독제에 대해 내성이 크게 증가한 문제도 있다.

[0007] 따라서, 심각한 문제인 바이오필름의 살균에 실제 적용이 용이하고, 바이오필름 형성균의 저감화 효과가 뛰어나며, 살균처리 후, 재오염의 문제가 없으며, 인체에 해를 미치지 않는 바이오필름 제어 기술의 개발 필요성이 부각되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제2010-0095272호(발명의 명칭: 인체에 무해한 의료 기기의 살균이나 곡물 야채의 살균 세척에 사용되는 살균소독액의 제조 방법)에는 살균 소독액을 사용하여 의료기기 및 곡물, 야채에 생성되는 바이오필름을 제거하는 기술이 기재되어 있으나, 과열수증기로 바이오필름을 제어하는 기술에 관한 것은 기재되어 있지 않다.

(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허 제2010-0110338호(발명의 명칭: 바이오필름의 효소적 방지 및 조절)에는 효소를 사용한 바이오필름의 제거기술이 기재되어 있으나, 과열수증기로 바이오필름을 제어하는 기술에 대한 것은 기재되어 있지 않다.

(특허문헌 0003) 대한민국 등록특허 제10-0780575호(발명의 명칭: 과열증기발생기를 이용한 가열, 살균, 건조기구)에는 과열수증기를 이용한 일반균의 살균이 기재되어 있으나, 바이오필름을 제어하는 기술에 대한 것은 기재되어 있지 않다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 식품공정기기에 적용이 용이하고, 재오염의 문제가 없는 바이오필름의 제어방법을 제공하고자 한다.

[0010] 또한, 본 발명은 바이오필름 제어 효능이 뛰어나고, 처리시간이 짧으며, 넓은 면적에 사용 가능한 바이오필름 형성균의 제어방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0011]

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명은 제1형태로, 포화수증기를 정압하에서 가열해 포화온도보다 온도를 상승시킴으로써 형성되는 과열수증기를, 바이오필름 형성균이 형성시킨 바이오필름에 처리하는 것을 특징으로 하는 바이오필름의 제거방법을 제공한다.

[0013] 본 발명은 제2형태로, 포화수증기를 정압하에서 가열해 포화온도보다 온도를 상승시킴으로써 형성되는 과열수증기를, 바이오필름 형성균에 처리하는 것을 특징으로 하는 바이오필름 형성균의 살균방법을 제공한다.

[0014] 상기 본 발명의 제1형태 및 제2형태와 하기 제3형태 및 제4형태에서 사용하는 '과열수증기(superheated steam)'는 포화수증기(saturated steam)를 정압하에서 가열해 포화온도보다 온도를 상승시킨 증기를 말하는데, 1기압 하에서 100℃이상으로 가열시켜 형성시키는 것이 일반적이다. 본 발명에서 확인한 바에 의하면, 과열수증기를 사용할 경우, 일반적인 포화수증기를 사용하는 경우에 비해, 바이오필름 또는 바이오필름 형성균을 효과적으로 제거 또는 살균할 수 있음이 확인되었다.

[0015] 상기 본 발명의 제1형태 및 제2형태에 있어서, 과열수증기의 '처리'는 바이오필름 형성균을 포함하는 바이오필름과 과열수증기를 일정 간격 떨어뜨려 과열수증기를 분사함으로써 수행가능한데, 접촉거리를 2~10 cm 이하로 하여 수초 간 처리하는 것이 좋다. 만약, 바이오필름이 형성된 대상체가 스테인레스 스틸(stainless steel)인 경우, 접촉 시간을 최소 2~20초로 하는 것이 좋다.

[0016] 한편, 본 발명은 제3형태로 포화수증기를 정압하에서 가열해 포화온도보다 온도를 상승시킴으로써 형성되는 과열수증기를 방출하는 것을 특징으로 하는 바이오필름 제거기를 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 제4형태로 포화수증기를 정압하에서 가열해 포화온도보다 온도를 상승시킴으로써 형성되는 과열수증기를 방출하는 것을 특징으로 하는 바이오필름 형성균 살균기를 제공한다.

[0018] 상기 본 발명의 제3형태 바이오필름 제거기 또는 제4형태 바이오필름 형성균 살균기는 통상의 미생물 살균기 외관을 가질 수 있는데, 구체적으로 과열수증기 발생부와 생성된 과열수증기를 배출하는 배출부를 포함하여 구성될 수 있다. 배출부에는 분사를 위한 분사노즐 및 상기 분사노즐과 상기 과열수증기 발생부를 연결시켜 주는 탄성소재 (일 예로, 고무관, 스테인리스 스틸)의 관을 포함하여 구성될 수 있다. 과열수증기 발생부는 통상의 과열수증기 발생장치를 구비시켜 구성될 수 있다.

[0019] 한편, 상기 본 발명의 제1형태 내지 제4형태에 있어서, 바이오필름 형성균은 일 예로 대장균 O157:H7(*Escherichia coli* O157:H7), 살모넬라 타이피무리움(*Salmonella* Typhimurium) 및 리스테리아 모노사이토제니스(*Listeria monocytogenes*) 중 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있고, 바이오필름은 일 예로 대장균 O157:H7(*E. coli* O157:H7), 살모넬라 타이피무리움(*S.* Typhimurium) 및 리스테리아 모노사이토제니스(*L. monocytogenes*) 중 선택되는 어느 하나 이상의 균주가 형성시킨 것일 수 있다.

[0020] 대장균 O157:H7(*E. coli* O157:H7)은 그람음성간균의 대표적인 균으로, 경구감염되면 설사 및 출혈성 대장염을 일으키며, 용혈성 요독증증후군(HUS)이나 뇌증을 일으켜 사망하는 경우도 있다. 배양 최적온도는 37℃이고 보통 LB(Lactose Broth) 또는 NA(Nutrient Agar) 배지에서 잘 자란다.

[0021] 살모넬라 타이피무리움(*S.* Typhimurium)은 그람음성간균의 하나로, 감염되면 식중독을 유발시키며, 급성위장염, 두통, 식욕감소, 구토, 복통, 설사 등의 여러 증상이 나타난다. 배양 최적온도는 37℃이고 보통 TSB(Tryptic Soy Broth) 또는 NA(Nutrient agar) 배지에서 잘 자란다.

[0022] 리스테리아 모노사이토제니스(*L. monocytogenes*)는 그람양성균 중의 하나로, 7가지 종의 리스테리아 균 중 사람과 동물에 모두 감염을 일으키는 유일한 균종이며, 감염되면 1~7일의 잠복기를 거쳐 가벼운 열과 복통, 설사, 구토 등을 일으킨다. 그러나 면역력이 약한 어린이나 노약자, 임산부, 신생아의 경우 패혈증, 뇌수막염, 유산 등을 유발할 수 있으며, 심한 경우에는 사망에까지 이르게 된다. 배양 최적온도는 37℃이나, 냉장온도에서도 자랄 수 있다.

발명의 효과

[0023] 본 발명에서는 과열수증기를 사용함으로써 병원성 바이오필름 형성균 또는 이 균이 형성하는 바이오필름을 효과적으로 제어할 수 있음이 확인되었다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 200℃에서 스테인레스 스틸 시편(stainless steel coupon) 위에 형성된 대장균 O157:H7(*E. coli* O157:H7) 바이오필름에 포화수증기(SS)와 과열수증기(SHS)를 처리했을 경우, 저감화 양상을 보여주는 그래프이다.

도 2는 200℃에서 스테인레스 스틸 시편(stainless steel coupon) 위에 형성된 살모넬라 타이피무리움(*S.* Typhimurium) 바이오필름에 포화수증기(SS)와 과열수증기(SHS)를 처리했을 경우, 저감화 양상을 보여주는 그래프이다.

도 3은 200℃에서 스테인레스 스틸 시편(stainless steel coupon) 위에 형성된 리스테리아 모노사이토제니스(*L. monocytogenes*) 바이오필름에 포화수증기(SS)와 과열수증기(SHS)를 처리했을 경우, 저감화 양상을 보여주는 그래프이다.

도 4는 스테인레스 스틸 시편(stainless steel coupon) 위의 형성된 대장균 O157:H7(*E. coli* O157:H7) 바이오필름에 대표적 살균제인 차아염소산 나트륨을 처리했을 경우, 저감화 양상을 보여주는 그래프이다.

도 5은 스테인레스 스틸 시편(stainless steel coupon) 위의 형성된 대장균 O157:H7(*E. coli* O157:H7) 바이오필름에 포화수증기 또는 과열수증기를 처리한 후, 백라이트 라이브/데드 박테리알 바이어빌리티 키트(baclight live/dead bacterial viability kit)의 사이토9(SYTO9)과 프로피디움 요오드화물(propidium iodide, PI)로 염색하여 공초점 레이저 현미경(confocal laser scanning microscope)으로 관찰한 사진인데, 대장균 O157:H7(*E. coli* O157:H7)의 사멸 양상을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 이하, 본 발명의 내용을 하기 실시예를 들어 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니고, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.

[0026] **[제조예 1: 바이오필름 형성균을 이용한 바이오필름 배양]**

[0027] 대장균 O157:H7(*E. coli* O157:H7), 살모넬라 타이피무리움(*S.* Typhimurium) 또는 리스테리아 모노사이토제니스(*L. monocytogenes*)를 10 ml TSB배지 (tryptic soy broth)에서 37℃에서 24시간 동안 각각 배양한 후, 배양액을 4℃에서 5,000×g의 조건으로 15분간 원심 분리하여, 균체(cell pellet)만을 수거하였다.

[0028] 상기 수거한 각각의 균체를 PBS 완충용액 (phosphate-buffered saline, pH 7.4; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4, 1.8 mM KH_2PO_4) 에 넣어, 대략 10^7~10^8 CFU/ml이 되도록 각각의 현탁액을 만들었다.

[0029] 한편, 70% 에탄올로 소독한 스테인레스 스틸 시편(stainless steel coupon, 5 cm×2 cm)을 바이오세이프티 후드(biosafety hood, 22±2℃)에서 3시간 동안 건조시키고, 고압증기멸균기(autoclave)에서 멸균하여 준비한 후, 상기에서 제조한 균 현탁액 30 ml가 담긴 50 ml 원심분리기용 튜브(conical centrifuge tube)에 담근 후, 균주의 부착을 위해 4℃에서 24시간 동안 배양하였다.

[0030] 그 후, 살균된 포셉을 이용하여 스테인레스 스틸 시편을 꺼내어 300 ml의 살균 증류수(22±2℃)에 5초 동안 휘저어주고, 30 ml TSB 배지가 담긴 원심분리기용 튜브(conical centrifuge tube)에 넣어준 후, 25℃에서 6일 동안 각각의 형성균으로 바이오필름을 배양하였다.

[0031] **[실시예 1: 바이오필름에 대한 과열수증기의 살균력 분석]**

[0032] 본 실시예에서는 과열수증기가 상기 제조예 1에서 배양된 바이오필름에 미치는 살균력을 알아보고자 하였다.

[0033] 우선 상기 바이오필름이 형성된 스테인레스 스틸 시편을 튜브에서 꺼내 살균된 증류수에 넣고, 부유물질들을 제거하였다. 이후, 상기 부유물질이 제거된 스테인레스 스틸 시편을 과열수증기 상태인 1atm 125, 150, 175, 200℃의 과열수증기로 각각 5, 10, 20, 30초 처리하였다. 이때, 비교실험군으로 상기 부유물질이 제거된 스테인레스 스틸 시편에 포화수증기 상태인 1atm 100℃의 포화수증기를 5, 10, 20, 30초 처리하였다.

[0034] 상기 과열수증기(SHS)와 포화수증기(SS)를 각각 처리한 스테인레스 스틸 시편들을 30 ml의 PBS 완충용액과 3 g의 살균된 글라스 비드(glass beads, 425~600㎛)가 들어있는 튜브(tube)에 넣고, 벤치탑 볼텍스 믹서(benchtop vortex mixer)에 올려 최대 속도로 1분 동안 구동시켜, 스테인레스 스틸 시편에 붙어 있는 바이오필름 균주를 떨어뜨렸다. 이후, 멸균한 9 ml 버퍼 펩톤 워터(buffered pepton water, BPW)를 사용하여 10배씩 희석하여 각각의 선택배지에 분주하여 계수하였다.

[0035] 각각의 병원균 계수를 위해 대장균 O157:H7(*E. coli* O157:H7)은 솔비톨 매컨키 배지(sorbitol macConkey agar, SMAC)에 배양하고, 살모넬라 타이피무리움(*S.* Typhimurium)은 자일로스 데스옥시콜레이트 배지(xylose desoxycholate agar, XLD)에 배양하고, 리스테리아 모노사이토제니스(*L. monocytogenes*)는 안티마이크로빅 서플리먼트(antimicrobic supplement)를 첨가한 옥스포드 배지(oxford agar base, OAB)에 배양하였다.

[0036] 상기 3종의 배지는 모두 37℃에서 24~48시간 동안 배양하였으며, 생성된 콜로니(colony)중 선택배지에서 전형적인 콜로니(colony) 수를 측정하였으며, 대장균 O157:H7(*E. coli* O157:H7), 살모넬라 타이피무리움(*S.* Typhimurium) 또는 리스테리아 모노사이토제니스(*L. monocytogenes*)에 대한 상기 실시예 1의 결과는 각각 하기 표 1, 표 2, 표 3에 제시하였다.

표 1

[0037]

Steam temperature (℃)	Stainless steel coupon			
	Steam duration (sec)			
	5	10	20	30
100	4.730.07 Aa	4.200.25 Aa	3.440.12 Ab	2.480.11 Ac
125	4.400.01 ABa	3.580.06 Bb	3.350.01 Ab	2.110.09 Ac
150	4.210.08 Ba	3.310.77 Bb	< 1.48 Bc	< 1.48 Bc
175	3.420.18 Ca	2.210.26 Cb	< 1.48 Bc	< 1.48 Bc
200	2.820.19 Da	< 1.48 Db	< 1.48 Bb	< 1.48 Bb

표 2

[0038]

Steam temperature (℃)	Stainless steel coupon			
	Steam duration (sec)			
	5	10	20	30
100	4.790.28 Aa	3.960.23 Ab	2.900.77 Abc	2.390.74 Ac
125	3.820.32 Aa	2.560.49 Bb	2.460.72 Ab	1.700.21 Bc
150	3.240.31 Ba	2.380.25 Bb	< 1.48 Bc	< 1.48 Cc
175	3.210.23 Ba	2.030.22 Cb	< 1.48 Bc	< 1.48 Cc
200	2.750.48 Ba	< 1.48 Db	< 1.48 Bb	< 1.48 Cb

표 3

[0039]

Steam temperature (℃)	Stainless steel coupon			
	Steam duration (sec)			
	5	10	20	30
100	4.790.10 Aa	4.470.26 Aab	3.740.19 Ab	3.160.37 Ac
125	3.730.18 Aa	3.260.13 Ab	2.710.50 Bc	2.140.53 Ad
150	3.560.35 Aa	2.530.24 Bb	< 1.48 Bc	< 1.48 Bc
175	2.450.25 Ba	1.940.49 Bc	< 1.48 Bc	< 1.48 Bc
200	2.220.33 Ba	< 1.48 Bb	< 1.48 Bb	< 1.48 Bb

[0040] 실험 결과, 과열수증기의 온도가 높을수록 스테인레스 스틸 시편 위에 형성된 대장균 O157:H7(*E. coli* O157:H7), 살모넬라 타이피무리움(*S.* Typhimurium) 및 리스테리아 모노사이토제니스(*L. monocytogenes*)의 바이오필름이 줄어드는 것으로 나타났는데, 과열수증기 (125, 150, 175, 200℃)의 바이오필름 살균력은 포화수증기 (100℃)의 바이오필름 살균력보다 높은 것으로 나타났다 (표 1, 표 2, 표 3).

[0041] 한편, 도 1, 도 2, 도 3은 각각 상기 표 1, 표 2, 표 3에 기재된 실험 결과 중, '100℃ 포화수증기 처리군', '200℃ 과열수증기 처리군'에 대한 실험 결과를 그래프로 보여준다. 도 1, 도 2, 도 3에서 'Con'은 살균 처리를 하지 않은 무처리 대조군이고, 'SS'는 100℃ 포화수증기 처리군이고, 'SHS'는 200℃ 과열수증기 처리군이다.

[0042] **[실시예 2: 바이오필름에 대한 과열수증기와 차아염소산 나트륨의 살균력 비교]**

[0043] 본 실시예에서는 살균제로 널리 알려진 차아염소산 나트륨과 본 발명의 과열수증기의 살균을 비교해 보고자 하였다.

[0044] 실험을 위해 차아염소산 나트륨의 농도를 20, 50, 100, 200 ppm으로 설정하고, 상기 부유물질이 제거된 시편에 각각 처리하였다.

[0045] 실험 결과, 20, 50, 100 ppm의 차아염소산 나트륨은 30초 동안 바이오필름 제어효과가 미비하였고, 식품 제조기기 살균 허용치인 200 ppm 으로 30초 처리했을 경우 3.2 log CFU/coupon 저감화 효과를 나타냈다(도 4). 도 4는 스테인레스 스틸 시편(stainless steel coupon) 위의 형성된 대장균 O157:H7(*E. coli* O157:H7) 바이오필름에 대표적 살균제인 차아염소산 나트륨을 처리했을 경우, 저감화 양상을 보여주는 그래프이다.

[0046] 한편, 상기 실시예 1과 실시예 2를 비교한 결과, 과열수증기를 처리한 경우에는 10초 처리시 검출 한계(1.48 log CFU/coupon) 이하로 측정되었으나, 차아염소산 나트륨을 처리한 경우에는 검출 한계(1.48 log CFU/coupon) 이상의 수치가 측정되었다.

[0047] 이상의 것으로 판단해볼 때, 본 발명의 과열수증기가 차아염소산 나트륨에 비해 바이오필름의 살균에 매우 효과적이라고 판단할 수 있었다.

[0048] **[실시예 3: 과열수증기 처리 바이오필름에서의 미생물 상태 관찰]**

[0049] 본 실시예는 바이오필름에 대한 과열수증기의 살균력을 시각적으로 관찰하고자 하였다. 실험을 위해 100℃ 포화수증기, 150℃ 과열수증기 및 200℃ 과열수증기를 각각 20초 동안 대장균 O157:H7(*E. coli* O157:H7)으로 형성된 바이오필름에 처리하였다. 이후, 백라이트 라이브/데드 박테리알 바이어빌리티 키트(baclight live/dead bacterial viability kit)의 사이토9(SYTO9)과 프로피디움 요오드화물(propidium iodide, PI)로 염색하여 공초점 레이저 현미경(confocal laser scanning microscope)으로 세포막을 관찰하였다. 관찰 시, 살아있는 바이오필름 형성균은 녹색으로, 죽은 바이오필름 형성균은 붉은색으로 나타났다.

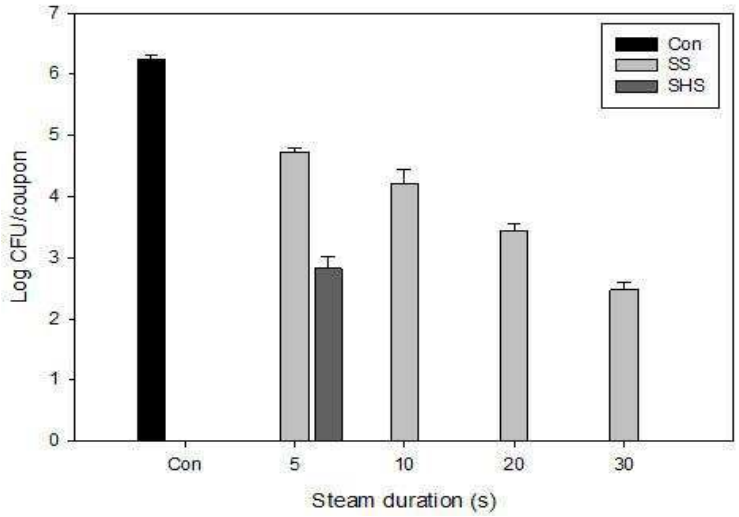
[0050] 실험 결과, 무처리 샘플의 경우에는 바이오필름 형성균이 대부분 온전한 것으로 확인되었고{도 5의 (a)}, 100℃ 포화수증기 처리군에서는 절반 가량이 손상된 것으로 확인되었다{도 5의 (b)}. 하지만, 150℃ 과열수증기 처리

군과 200℃ 과열수증기 처리군의 경우, 세포막의 손상 정도가 심하게 나타났다{도 5의 (c), (d)}. 특히, 200℃의 경우에는 바이오필름 형성균이 모두 사멸한 것으로 확인되었다{도 5의 (d)}. 도 5는 스테인레스 스틸 시편(stainless steel coupon) 위의 형성된 대장균 O157:H7(*E. coli* O157:H7) 바이오필름에 포화수증기 또는 과열수증기를 처리한 후, 백라이트 라이브/데드 박테리알 바이어빌리티 키트(baclight live/dead bacterial viability kit)의 사이토9(SYTO9)과 프로피디움 요오드화물(propidium iodide, PI)로 염색하여 공초점 레이저 현미경(confocal laser scanning microscope)으로 관찰한 사진이다.

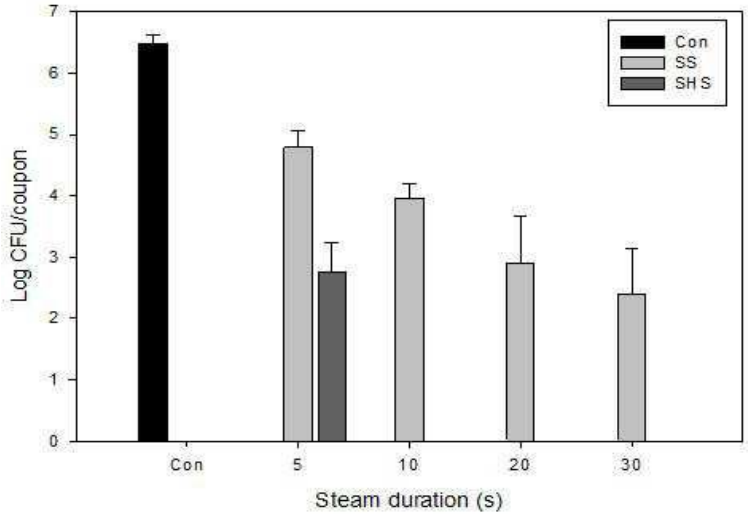
[0051] 이상의 결과로부터, 본 발명의 과열수증기가 바이오필름의 살균에 명확히 효과가 있는 것으로 재차 확인할 수 있었다.

도면

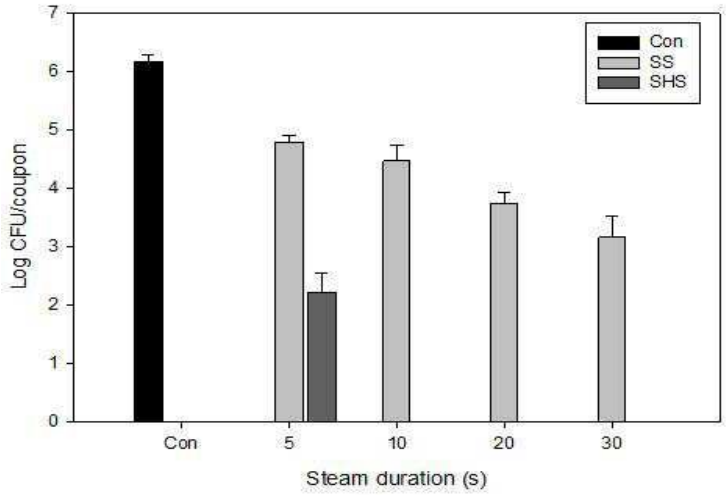
도면1



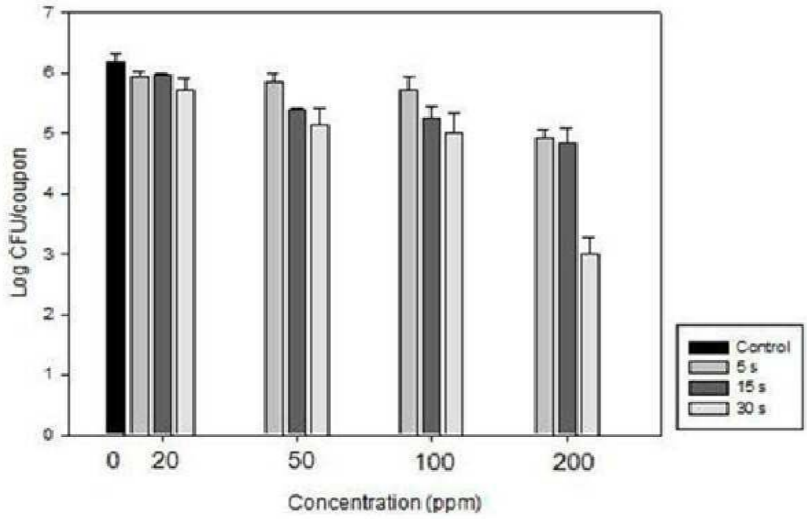
도면2



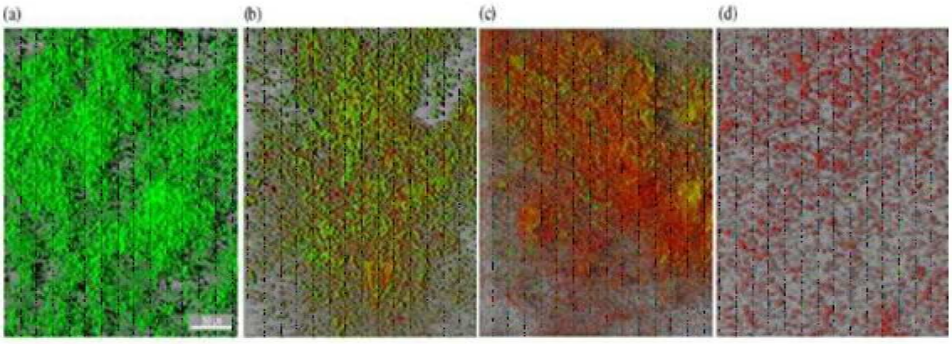
도면3



도면4



도면5



(a)처리하지 않은 것 (b)100℃ 포화수증기 처리 (c) 150℃ 과열수증기 처리 (d) 200℃ 과열수증기 처리