국외 살균소독제 유효성 평가방법

Standard Test Method for Determining the Efficacy of Sanitizers (Recommended) for Food-Contact Surfaces

민미희[1], 윤소정[2], 박인숙[1*]

Mihee-Min[1], So-Jeong Yoon[2], In-Sook Park[1*]

[1]한국보건산업진흥원, [2]중앙대학교 식품공학과

[1]Korea Health Industry Development Institute

[2]Advanced Food Safety Research group, BrainKorea[21] Plus, Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University

Ⅰ. 서론

식품산업현장에서는 식품위해미생물을 제어하기 위한 다양한 방법들이 도입 · 활용하고 있다. 경제적인 측면과 사용 편리성 등의 이유로 물리적, 생물학적 방법들보다 식품첨가물, 살균제 및 살균소독제를 이용하는 화학적 방법이 가장 많이 사용되고 있다.[1),2)] 화학적 방법으로 효과적으로 식품위해미생물을 제어할 때 대상 미생물의 종류, 제어 대상물의 특성 및 제어방법의 특성의 3가지 요소에 환경 적합성 등의 요인들을 충분히 고려하여야 한다. 특히 제어방법에 따른 미생물의 저항성(적응이나 손상회복 등)과 내성화(항생제 내성 등) 등의 문제점이 발견되면서 효과적인 화학적 제어기술을 활용하기 위해서는 관련된 기본적인 지식과 함께 사용하는 제품이나 장비 원리 등의 특성을 인지하고 있는 것이 중요하다.[8)] 또한, 화학적 살균소독제는 처리 후에 화학적 손상세포(injured cell)를 생성할 수 있고, 이 손상세포는 죽지 않고 살아남아 식품 내에서 생육함으로써 식중독 사고를 일으킬 수 있는 잠재적인 요소로 작용할 수 있다.[3-6)] 따라서 화학적 살균소독제의 처리 후 죽지 않은 손상세포의 수를 측정하고 평가하는 것은 살균소독제의 실질적인 효과를 평가하기 위하여 매우 중요하다. 이에 기구등의 살균소독제는 국제 공인된 시험방법으로 용법 및 용량에 따른 살균소독력이 있음을 증명하도록 하고 있으나 시험방법에 따라 상이한 결과가 나타날 수 있어 살균소독제 인정기준의 적용과 살균소독제의 제조 및 사후관리를 위해 살균효과를 평가하는 표준화된 방법이 확립될 필요가 있다.[7)] 국내 살균소독제의 살균소독력의 인정기준은 살균소독제의 사용기준으로 20±1℃에서 5분±10초 처리했을 때 *Escherichia coli* ATCC 10536(또는 ATCC 11229) 및 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 균에 대하여 초기균수(cfu/ml)를 99.999% 이상 감소시켜야 한다. 살균소독력을 시험하는 본 시험(희석중화시험법) 외에도 시험조건검증법, 중화제독성검증법, 희석중화검증법을 필요로 한다. 국외 살균소독제

* Correspondence to: In-Sook Park
Korea Health Industry Development Institute.
187, Osongsaengmyeong 2-ro, Osong-eup, Heungdeok-gu, Cheongju-si, Chungcheongbuk-do, Korea, 28159.
Tel: +82-43-713-8365 Fax: +82-43-713-8950 E-mail: isaksu@khidi.or.kr

유효성 평가는 어떻게 이행되고 있는지 비교 · 분석하여 체계적인 유효성 평가 관리체계를 확보하고 개선점을 찾고자 한다.

II. 본론

살균소독제의 유효성 평가는 배합물(Formulation)의 원료, 성분배합비 및 농도와 이들 혼합물의 실제 사용조건에 따라 유효성이 차이가 난다. 살균소독제의 유효성에 영향을 주는 요인으로는 물리적 요인, 화학적 요인, 생물학적 요인과 살균소독제 제품유형 등이 있다. 이 외에도 제품의 사용조건, 제조법과 시험방법에 따라 여러 가지 상이한 결과가 나올 수 있다. 살균소독제의 살균소독력은 살균소독제의 표시와 연관성이 있어, 대부분의 국가들은 각 제품의 표시에 따라 살균소독력의 정도를 검토하고 있다.

살균소독제의 유효성을 평가하는 방법에는 여러 가지가 있다. 미국의 AOAC(Association of Official Analytical Chemists International), ASTM(American Society for Testing and Materials), 유럽의 CEN(The European Committee for Standardization) 등과 같은 국제 표준화 단체에서 개발한 방법들이 있으며, 각 국가에서는 이 표준방법들을 근거로 유효성을 평가하고 있다. 대부분의 국가들이 살균소독제의 유효성을 평가하기 위하여 위와 같은 국제 표준기구에서 개발된 표준화된 시험방법을 채택하거나 권고하고 있다.

미국의 살균소독제 유효성 평가

미국의 살균소독제와 관련된 사항은 주로 미국환경청(Environmental prtection Agency, EPA)에서 FIFRA (Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act) 법령에 따라 항균제로 농약의 범주에서 관리되고 있으며, 식품접촉표면 살균제와 식품비접촉표면 살균제로 분류한다. 식품접촉표면 살균제는 *Staphylococcus aureus*와 *Escherichia coli* 등 2종의 표준미생물에 대해 25℃, 500ppm의 경도를 가진 물에서 30초 내에 99.999% 혹은 5 log의 살균효과를 가진 화학제제를 의미하며, 5분 내에 미생물 오염을 99.9% 혹은 3 log 감소시키는 물질을 식품비접촉표면 살균제라고 규정하고 있다. 이러한 살균소독제의 살균소독력의 평가는 AOAC 시험방법을 기본적인 시험방법으로 하고 있다. 별도로 살균소독제의 유효성을 평가하는데 필요한 관련지침과 표준시험방법들을 홈페이지(site)를 통하여 제공하고 있다. 식품에 직접 사용하는 살균제는 식품첨가물 규정에 따라 별도의 시험방법은 없고, 식품접촉 표면이나 비식품용에 적용되는 시험방법은 EPA의 농약관리국(Office of Pesticide Programme, OPP)의 지침에 따라 AOAC의 각 균주별 시험방법에 따르고 있다. 그러나 AOAC 시험방법에는 바이러스 제거 또는 결핵균 제거 작용의 정량적 평가가 불가능하여 일부의 변형된 현탁액(suspension) 시험방법도 수용하고 있다. 단단한 표면에 사용되는 살균 소독제(disinfectants)의 유효성을 평가하는 방법으로 가장 많이 사용하는 방법은 AOAC 희석법(AOAC Official Method 955.14, 955.15, 964.02)과 AOAC Spray 제품시험법(AOAC Germicidal spray test method 961.02)이다. 또한, AOAC 살균세정제 시험법, 유효염소비교법인 AOAC Official Method 960.09, AOAC Official Method 955.16이 있다. 염소나 요오드를 유효성분으로 하는 할로겐계 살균소독제의 경우 AOAC Official Method 955.16(표2)을 사용하여 유효염소의 살균력과 살균동등농도 평가를 통해 비교 평가한다. 청결하고 비흡습성 표면에 사용되는 소독/세척용 살균제의 살균력 비교 측정에 사용된다. 4급암모늄 등의 비할로겐계 살균소독제의 경우에는 AOAC Official Method 960.09(표1)를 사용하여 30초 내에 시험균의 생균수가 감소하는 지에 따른 유효성 평가를 한다.

유럽의 살균소독제 유효성 평가

유럽은 살균소독제를 살생물제(biocidal products, biocides)로서 관리하고 있다. 살생물제는 사람과 동물을 제외한 모든 유해한 생물제거에 사용되는 화학물질을 통칭하고 있으며, 이 범주에는 우리나라 식품위생법에

표 1. AOAC Method 960.09 Germicidal And Detergent Sanitizing Action of Disinfectants

시험균 (Test organism)	균 주 명	• *Escherichia coil* ATCC 11229 • *Staphylococcus aureus* ATCC 6538				
	보존배양	보통한천배지에 접종하여 37℃에서 48시간 배양하여 2~5℃에 보존하며 3개한 달 단위로 계대				
	활성배양	보존배양된 시험균을 보통배지에 접종하여 37℃에서 24시간 배양과정을 3회 이상 진행한 배양				
실험조작	시험온도	20℃	접촉시간	30초	배양시간/온도	48hr/37℃
기준/결과표현 (Requirement)	• 30초 내에 시험균의 생균수가 99.999% 감소 – 감소율이 검증될 수 있도록 살균시험혼합액을 위한 생균수 대조구는 75와 125×106/㎖					

실험방법(S-2)

시험균활성배양액(1㎖)+시험용액(99㎖)
↓
25℃, 30s
↓
혼합액(1㎖)+중화제(9㎖)
↓
37℃, 48hr(배양)
↓
계수

실험방법(C)

시험균활성배양액(1㎖)+PBDW(99㎖)
↓
25℃, 30s
↓
혼합액(1㎖)+중화제(9㎖)
↓
37℃, 48hr(배양)
↓
계수

시약제조 & 검증

- 경수(Hard Water)제조-500ppm
- 경구경도 검증 - 적정법
- 시험방법&경구경도 검증(Control)
  - ① C_{16} alkyl dimethylbenzyl ammonium chloride at 700 and 900 ppm
  - ② C_{16} alkyl dimethylbenzyl ammonium chloride at 450 and 550 ppm

표 2. AOAC Method 955.16 Available Chlorine in Disinfectants

시험균 (Test organism)	균 주 명	• *Salmonella typhi* ATCC 6539 • *Staphylococcus aureus* ATCC 6538				
	보존배양	보통한천배지에 접종하여 37℃에서 48시간 배양하여 2~5℃에 보존하며 한 달 단위로 계대				
	활성배양	보존배양된 시험균을 보통배지에 접종하여 37℃에서 24시간 배양과정을 3회 이상 진행한 배양				
실험조작	시험온도	20℃	접촉시간	1분	배양시간/온도	48hr/37℃
기준/결과표현 (Requirement)	• 유효염소 200ppm, 100ppm 과 50ppm과 동일한 살균력 – 표준유효염소 200ppm에서 적어도 하나의 음성이 나오고 50ppm에서 하나 이상의 양성이 나타 날때					

실험방법(C)

시험균활성배양액(1㎖)+시험용액(99㎖)
↓
25℃, 30s
↓
혼합액(1㎖)+중화제(9㎖)
↓
37℃, 48hr(배양)
↓
계수

실험방법(S)

시험균활성배양액(1㎖)+PBDW(99㎖)
↓
25℃, 30s
↓
혼합액(1㎖)+중화제(9㎖)
↓
37℃, 48hr(배양)
↓
계수

시약제조 & 검증

- 표준염소용액제조 – 5% NaOCl Soln.
- 표준염소용액검증 – 적정법(As_2O_3 적정)
- 표준유효염소용액 제조
  - 200ppm, 100ppm, 50ppm
- 시험용액 제조
  - 100%, 50%, 25%
- 정균작용검증
- 시약멸균확인

서 정의하고 있는 기구 등의 살균소독제 뿐만 아니라 비농업용으로 사용되는 살충제, 살균제, 소독제, 목재보존제, 방부제, 방오제, 항균제 등 다양한 화학물질이 포함된다.[9] 유럽에서 살생물제의 유효성 평가는 유럽표준위원회(European Committe for Standardization, CEN)의 기술위원회 216(Technical Committe 216)에서 개발한 화학살균제 및 소독제 시험방법을 유럽의 공통적인 평가방법으로 채택하고 있다. 이러한 유럽의 유효성 평가방법은 미국과 달리 단계별 접근법(Tiered approach)을 택하고 있으며, 마지막 단계인 실제적용실험(Field test)을 제외하고는 의무적으로 수행해야 한다. 유럽의 CEN 시험법에는 phase 1, phase2, 그리고 phase 3로 나뉜다.

Phase 1은 기본적인 유효성을 현탁액 시험을 통하여 측정하는 시험방법으로 이 시험조건을 만족하면 기본적인 유효성을 가지고 있는 것으로 증명되지만, 이 단계만을 만족하면 제품에 표시를 할 수 없다(No claim). Phase 2는 다시 phase 2-step 1, phase2-step2의 세부단계로 나누어지는데 phase2-step 1은 일반적인 사용용도의 제품을 정량적으로 평가하는 현탁액 시험법으로 이 단계의 조건을 만족하는 제품은 일반적인 살균제(disinfectants)로 표시할 수 있다. phase2-step 2는 표면에 사용하는 제품의 유효성을 정량적인 방법으로 측정하는 표면시험법으로 이 조건에서 살균소독력을 나타내는 제품은 표면살균제(disinfects surface 또는 surface disinfectants)로 표시할 수 있다. Phase 3은 실제 사용현장에서 제품의 유효성을 평가하는 실제시험으로 아직까지 확정된 평가방법이 개발되지 않고 적용 가이드가 개발되어 있다.

유럽의 살균소독력 유효성 평가기준은 미국의 유효성 평가 기준과는 달리 유럽 CEN 시험법 CEN 1275(표 4), CEN 1276(표 5, 그림 5) 현탁액 시험법의 결과로 시험균이 5 $\log_{10}$ 이상의 생균수 감소를 보이면 살균소독력이 있다고 판단한다.

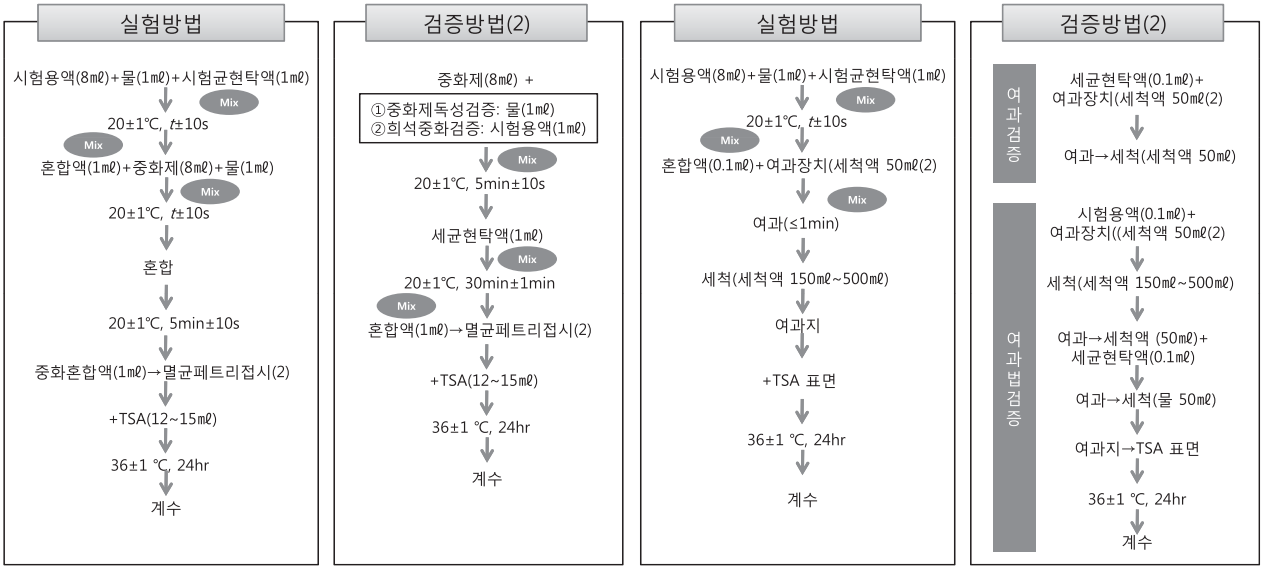
표 3. CEN 살균소독제 유효성 평가방법

살균소독제 유효성 평가방법 시험방법	살균소독력 시험균	시험종류	단계
CEN 1275	*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538	현탁액시험법	Phase 1
CEN 1276	*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Enterococcus hirae* ATCC 10541	현탁액 시험법	Phase 2-step 1
	Samonella Typhimuriumi ATCC 13311[1], *Lactobacillus brevis* DSM 6235[1], *Enterobacter cloacae* DSM 6234[1]		
CEN 13697	*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Enterococcus hirae* ATCC 8043, *Escherichia coli* ATCC 10536	표면시험법	Phase 2-step 2
	Samonella Typhimuriumi ATCC 13311[1], *Lactobacillus brevis* DSM 6235[1], *Enterobacter cloacae* DSM 6234[1], *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 6763[1], DSM 1333[2], *Saccharomyces cerevisiae* DSM 70487[2]		

주 1) 특정한 경우, 시험균을 선택하여 추가사용 할 수 있음
2) 양조분야의 경우 시험균 선택하여 사용

표 4. 유럽 CEN 1275 시험방법

시험균 (Test Organism)	균 주 명	• *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 • *Staphylococcus aureus* ATCC 6538				
	활성배양	보존배양된 시험균을 TSA배지에 접종하여 37℃에서 18~24시간 배양과정을 3회 이상 진행한 배양				
실험조작	시험온도	20℃±1℃	접촉시간	5분±10초	배양시간/온도	24hr/36℃±1℃
기준/결과표현 (Requirement)	• 가장 높은 농도에서 10^5 이상의 생균수를 감소해야 함 • 두 번째 농도에서 10^5 이상 또는 이하 생균수 감소를 해야 함					



중국의 살균소독제 유효성 평가

중국 소독제품품의 유효성평가는 국가위생계획출산위원회(国家卫生计生委)의 「소독제품 위생안전관리 평가규정」에 따른다. 이 규정에 따르면 중국은 국제 공인 유효성 평가방법을 사용하지 않고 자체적으로 소독기술규범(消毒技范)에 의하여 살균소독제 유효성 평가를 한다. 중국은 소독대상 별로 살균소독제의 유효성평가를 진행하는 미생물의 종류와 필수 미생물 종류가 다르다(표 6).

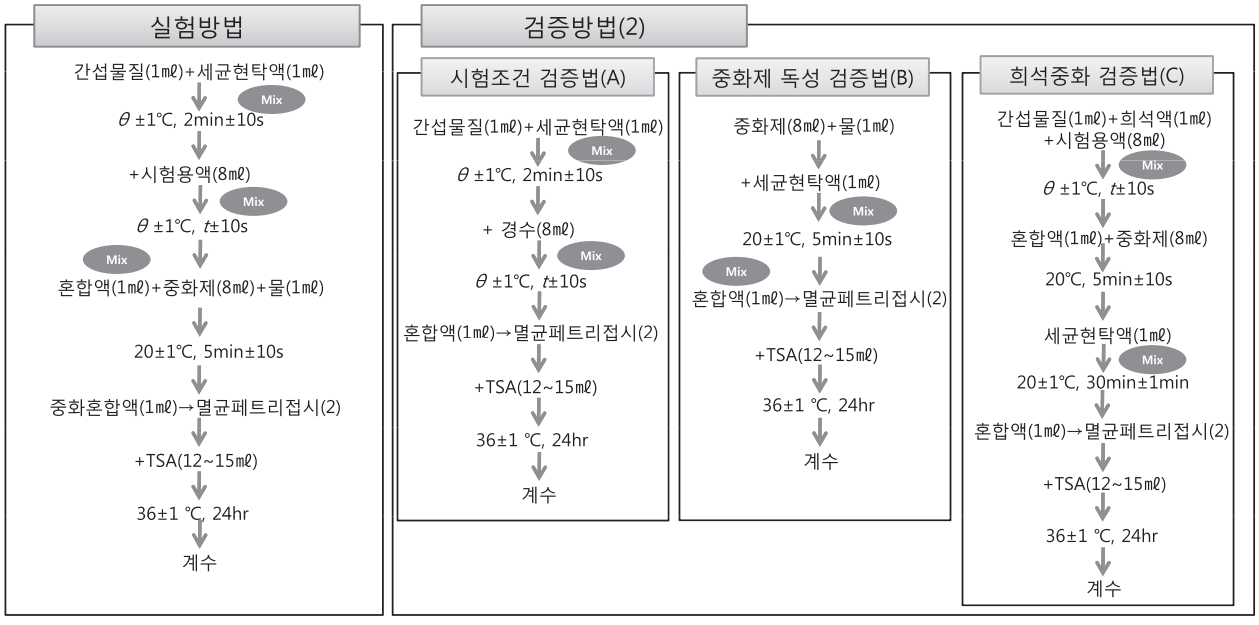
중국의 소독제품 소독력 유효성 평가는 소독제의 미생물 사멸시험을 사용하여 평가한다. 미국, 유럽과 마찬가지로 현탁액 시험법을 사용하고 정량적 현탁액 시험법을 사용한다.

위의 시험균을 사용하여 살균력 유효성 평가는 정량적 수치의 결과로 확인한다. 사멸대수치는 대조군의 평균 살균농도(cfu/ml)의 대수치(N_0)값에 시험군살균 농도대수치(N_x)값을 뺀 것을 의미한다.

현탁액 시험법 사용 시 매회 사멸대수치가 평균≥5.00이면 살균소독력이 유효성이 있다고 판단한다.

표 5. 유럽 CEN 1276 시험방법

시험균 (Test Organism)	균 주 명	• *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 • *Escherichia coli* ATCC 10536 • *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 • *Enterococcus hirae* ATCC 10541 특정한 경우, 다음과 같은 시험균을 선택하여 추가할 수 있다. • *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 • *Lactobacillus brevis* DSM 6235 • *Enterobacter cloacae* DSM 6234				
	활성배양	보존배양된 시험균을 TSA배지에 접종하여 37℃에서 18~24시간 배양과정을 3회 이상 진행한 배양				
실험조작	시험온도	20℃±1℃	접촉시간	5분±10초	배양시간/온도	24hr/36℃±1℃
기준/ 결과표현 (Requirement)	• 일반용도로 사용되는 제품의 살균력은 시험대상이 되는 제품의 농도에 의해서 좌우 • 제품의 농도에 대한 기준은 요구된 시험 조건인 20℃±1℃에서 5분±10초 동안에 청정 또는 오염조건에서 *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus hirae*에 대하여 10^5이상의 생균수 감소를 보임					



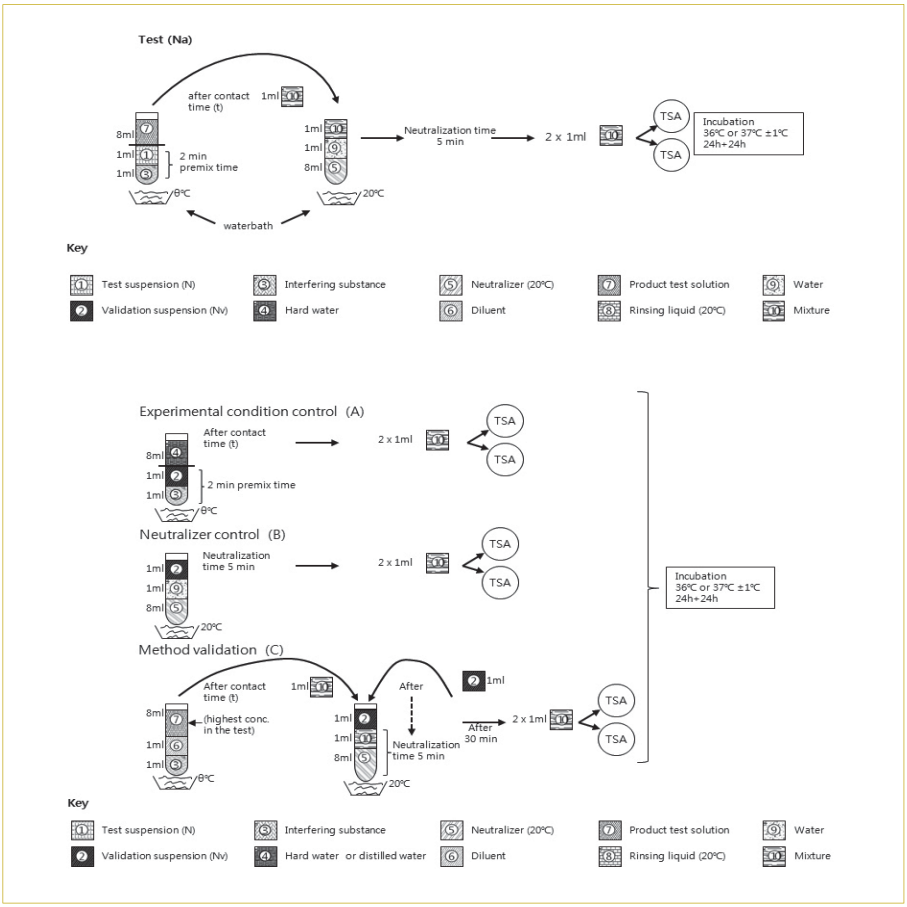


그림 5. 유럽 CEN 1276 시험방법

표 6. 중국의 미생물 사멸시험용 대표 미생물

소독대상 / 미생물의 종류	손	피부, 점막	발	공기	의료기기 용품 (멸균)	의료기기용품 (중간 소독)	의료기기용품 (저소독)	일반 물품 및 표면	식기	음용수	과일, 야채
Staphylococcus aureus	○	○	○			○	○	○			
Pseudomonas aeruginosa		○				○	○				
Escherichia coli	○							○	○	○	○
Candida albicans	○	○	○				○				
Aspergillus niger			○								
Staphylococcus albus				○							
Mycobacterium chelonae sub sp. *abscessus*						○					
Bacillus subtilis var. *niger*					○						
Poliovirus-I						○			○		

주) 단, ○ 표시는 반드시 시험을 진행해야 하는 미생물이며, 이 외에도 별도의 미생물 사멸시험을 진행해야 함

표 14. 중국의 소독기술규범에 따른 살균소독력 시험방법

소독기술규범	살균소독력 시험균	시험종류
소독제품 위생안전관리 평가규정	*Staphylococcus aureus* ATCC 6538 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 *Escherichia coli* 8099 *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 *Staphylococcus albus* 8032 *Candida albicans* ATCC 10231 *Aspergillus niger* ATCC 16404	정량적 현탁액 시험법

주) 위의 균주의 기초하에 소독제의 특정용도 또는 특수 요구사항에 따라 기타균주를 추가 선택하여 사용할 수 있음

표 15. 국가 공인 표면시험법 비교

구분	EN13697:2015	ASTM E2111-12	ASTM E2197-11	OCED
특징	정량적 표면시험법 · Carrier:SS Disk (Ø2cm ANSI 304) · Elution: Rotation on Beads	정량적 표면시험법 · Carrier:Vials (Ø2.8cm×5.8cm Glass) · Elution: Votex/Sonication	정량적 표면시험법 · Carrier:SS Disk (Ø1cm×0.7cm ANSI 430) · Elution: Votex/Sonication	정량적 표면시험법 · Carrier:SS Disk (Ø1cm×0.7cm ANSI 430) · Elution: Votex/Sonication
시험균	*E. coli* ATCC 10536 *S. aureus* ATCC 6538 *P. aeruginosa* ATCC 15442 *En. hirea* ATCC 10541 *Ca. albicans* ATCC 10231 *As. Brasiliensis* ATCC 16404 +ADD strain(5)	*S. aureus* ATCC 6538 *P. aeruginosa* ATCC 15442 & *T. mentagrophytes* ATCC 9533 *Ca. albicans* ATCC 10231 *A. niger* ATCC 64958 *B. subtilis* ACTT 19659 *Cl. sporogenes* ATCC 7955	ASTM E2111-12 +*My. Terrae* ATCC 15755 Human Adenovirus 5 ATCC VR-1518 Hepatitis A Virus Strain HM-175 ATCC VR-1402 Canine Parvovirus ATCC VR 2017	*S. aureus* ATCC 6538 *P. aeruginosa* ATCC 15442 *En. hirea* ATCC 10541 *My. terrae* ATCC 15755 *AS. brasiliensis* ATCC 16404 Adenovirus Type 5 ATCC VR-1516
시험 조건	· Inoculum: 50㎕ · Test agent: 100㎕ · Replicates:-	· Inoculum: 10㎕ · Test agent: 50㎕ · Replicates:5-10 Test &3 control		· Inoculum: 10㎕ · Test agent: 50㎕ · Replicates:20 Test(+control)
간섭 물질	BSA Alone T Two Level	Tripartite Mix One Level		
중화	Neutralization(17)	Membrane filtration		
기준	$4\log_{10}$	$4\log_{10}$-$6\log_{10}$		

Ⅲ. 결론

최근 살균소독제 유효성을 평가하는 표준시험방법이 현탁액 시험방법에서 표면시험방법으로 전환되고 있는 추세이다. 유럽의 CEN, 미국의 AOAC 등 국제표준기구에서 등록된 정량적 표면시험법은 CEN EN 13697, AOAC Use-Dilution, AOAC Hard Surface Carrier Test이다. 표 15는 국제 공인 정량적 표면시험법을 비교 정리한 내용이다.

현탁액 시험법은 실제 현장을 반영하는데 있어 재현성

이 떨어지는 어려움이 있다. 표면시험법을 반영하여 살균소독력의 유효성 평가를 하는 것이 바람직하다고 생각된다.

감사의 글

본 연구는 2016년도 식품의약품안전처의 연구개발비(16162위생안014)로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. Kim, Il Jin, et al. "Evaluation for efficacies of commercial sanitizers and disinfectants against *Bacillus cereus* strains." Food Science and Biotechnology 18.2 (2009): 537-540.

2. Kim, Il-Jin, et al. "Assessment of both standard and isolated *Vibrio parahaemolyticus* on efficacy of commercial sanitizers and disinfectants." Journal of Food Hygiene and Safety (2007).

3. Kang, Dong-Hyun, and Daniel YC Fung. "Thin agar layer method for recovery of heat-injured Listeria monocytogenes." Journal of Food Protection 62.11 (1999): 1346-1349.

4. Kang, D. H., and G. R. Siragusa. "Agar underlay method for recovery of sublethally heat-injured bacteria." Applied and environmental microbiology 65.12 (1999): 5334-5337.

5. Lee, Sun-Young, and Dong-Hyun Kang. "Suitability of overlay method for recovery of heat-injured Listeria monocytogenes and *Salmonella Typhimurium*." Food Science and Biotechnology 10.3 (2001): 323-326.

6. McCARTHY, SUSAN A., MILES L. MOTES, and R. MERRILL McPHEARSON. "Recovery of heat-stressed *Listeria monocytogenes* from experimentally and naturally contaminated shrimp." Journal of food protection 53.1 (1990): 22-25.

7. Kim, Hyung-Il, et al. "The establishing test method of bactericidal activity and the evaluating of Korean disinfectants/sanitizers efficacy." Korean Journal of Food Science and Technology 37.5 (2005): 838-843.

8. 김용수, 박인숙, 하상도. "식품위해미생물 제어를 위한 살균소독제의 활용." 식품과학과 산업 42.2 (2009): 26-51.

9. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL, 19th Edition (2012)

10. United States Environmental Protection Agency (US, EPA)

11. ASTM International, Standards & Publications

12. European Committee for Standardization(CEN) Standard Methods

13. OECD, OECD Guidance Document on Quantitative Methods for Evaluating the Activity of Microbicides used on Hard Non-porous Surfaces.