

대장균과 황색포도상구균에 대한 이산화염소의 살균소독력 평가 및 살균예측모델 개발

윤소정 · 박신영 · 김용수¹ · 하상도*

중앙대학교 식품공학과, ¹한국보건산업진흥원

Evaluation of Efficacy and Development of Predictive Reduction Models for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* on Food Contact Surfaces as a Function of Concentration and Contact Time of Chlorine Dioxide

So-Jeong Yoon, Shin Young Park, Yong-Soo Kim¹, and Sang-Do Ha*

Advanced Food Safety Research group, BrainKorea21 Plus, Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University, 4726, Seodong-daero, Nae-ri, Daedeok-myeon, Anseong-si, Korea

¹Korea Health Industry Development Institute, Osong, Korea

(Received July 18, 2017/Revised August 20, 2017/Accepted October 17, 2017)

ABSTRACT - There has been increasing concern regarding misuse of disinfectants and sanitizers such as ethanol, sodium hypochlorite, and hydrogen peroxide for food contact surfaces in the food industry. Examining the efficacy of the concentration of currently used disinfectants and sanitizers is urgently required in the Korean society. This study aimed to develop predictive reduction models for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in suspension, as a function of ClO₂ (chlorine dioxide) and contact time using response surface methodology. *E. coli* ATCC 10536 and *S. aureus* ATCC 6538 (initial inoculum, 8-9 log CFU/mL) in tryptic soy broth were treated with different concentrations of ClO₂ (5, 20, and 35 ppm) for different contact times (1, 3, and 5 min) following a central composite design. The polynomial reduction models for ClO₂ on *E. coli* and *S. aureus* were developed under the clean condition. *E. coli* reduction by 35 ppm ClO₂ for 1, 3, and 5 min was 2.49, 2.70, and 3.65 log CFU/mL, respectively. Also, *S. aureus* reduction by 35 ppm ClO₂ for 1, 3, and 5 min was 4.59, 5.25, and 5.81 log CFU/mL, respectively. The predictive response polynomial models developed were $R = 0.43231 - 0.056492 * X_1 - 0.097771 * X_2 + 9.24167E - 003 * X_1 * X_2 + 3.06333E - 003 * X_1^2$ ($R^2 = 0.98$) on *E. coli* and $R = 1.10542 - 0.20896 * X_1 - 0.046062 * X_2 + 8.30000E - 003 * X_1 * X_2 + 8.73300E - 003 * X_1^2$ ($R^2 = 0.99$) on *S. aureus*, where R was the bacterial reduction (log CFU/mL), X₁ was the concentration and X₂ was the contact time. Our predictive reduction models should be validated in developing the optimal concentration and contact time of ClO₂ for inhibiting *E. coli* and *S. aureus* on food contact surfaces.

Key words : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, Chlorine Dioxide, Predictive Reduction Model

겨울에도 빈번히 발생하는 식중독에 대한 걱정은 끊이지 않고 있다. 이러한 식중독은 식중독유발 병원균이 식품을 통해 이입되어 발생할 수 있지만 식품의 조리과정 중 조리기구 및 용기·포장 등을 통해서도 간접적으로 발생할 수 있다. 또한 병원균이 식품접촉표면에 옮겨지면 살균소독제에 대한 저항성이 증가된다고 알려져 있다¹⁻⁴⁾. 따

라서 식품과 접촉하는 기구등의 적절한 세척과 살균소독제가 효과적으로 발휘하는 사용농도 및 접촉시간은 식품의 안전을 확보할 수 있는 중요한 관리항목이다.

현재 국내 식품첨가물공전에는 기구등의 살균소독제 유효성분으로 에탄올, 차아염소산나트륨, 요오드, 과산화수소, 과산화초산 등 94종이 고시되어 있다⁵⁾. 이러한 유효성분은 크게 알코올계, 염소계, 요오드계, 과산화물계, 4급암모늄계 등으로 분류된다. 살균소독제 중 염소계가 가장 널리 사용되고 있는데 대표적인 것으로는 차아염소산나트륨, 이염화이소시아눌산나트륨 등이 있으며 이 중에서도 많이 이용되고 있는 것은 차아염소산나트륨이다. 차아염소산나

*Correspondence to: Sang-Do Ha, Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University, 4726, Seodong-daero, Nae-ri, Daedeok-myeon, Anseong-si, Gyeonggi-do 17546, Korea
Tel: 82-31-670-4831, Fax: 82-31-675-4853
E-mail: sangdoha@cau.ac.kr

트림은 사용방법이 매우 간편하고 저렴하다는 장점이 있지만 살균소독 후 유기물질과 반응하여 트리할로메탄이나 클로로포름 등과 같은 발암성 물질 생성으로 안전성이 문제되고 있다⁶⁻⁸⁾. 이러한 이유로 차아염소산나트륨의 단점을 해결할 수 있는 대체 살균소독제로 이산화염소가 주목받고 있다. 지금까지는 안전성, 경제성, 그리고 휘발성의 문제점 때문에 국내에서는 식품산업 적용이 활발히 진행되지 않아 널리 사용되지 못하였지만, 이러한 문제점을 해결하여 현재는 식품용 기구등의 살균목적으로 2012년부터 한시적 기준규격으로 인정되어 기구등의 살균소독제로 신규 지정되었다. 지정된 사용범위는 식품접객업용 기구, 집단급식소용 (1회 50인 미만 제공 급식소용 포함) 기구, 유가공용 기구, 식품의 제조 및 가공용 기구에 대하여 모두 200 ppm 이하이다.

따라서 본 연구는 대장균과 황색포도상구균에 대한 기구등의 살균소독제인 이산화염소의 농도별 접촉시간에 따른 살균소독력 평가와 살균예측모델을 개발하여 식품산업 현장의 적용을 위한 기초자료로 활용하고자 수행되었다.

Materials and Methods

시험균주

Escherichia coli ATCC 10536과 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538은 본 실험실에서 30% glycerol stock으로 -80°C에서 보관중인 균주를 사용하였다. 보존 배양된 각 시험균주는 Tryptic soy broth (TSB; BD사, NJ, USA)에 접종하여 활성화시킨 후 Tryptic soy agar (TSA; BD사, NJ, USA)에 계대하여 37°C에서 18~24시간 배양하였다. 같은 방법으로 2차 배양과 3차 배양으로 활성화된 균만을 사용하였다.

시험용액

이산화염소 (유효염소: 200 ppm)는 Life-clean사 (UDD, Sweden)로부터 제공받아 유효염소가 5, 20, 35 ppm이 되도록 경수로 희석하여 사용하였다.

살균소독력 평가방법

살균소독력 평가방법은 식품첨가물공전의 희석중화시험법을 사용하였다⁹⁾. 멸균시험관에 간섭물질 1.0 mL와 시험균 현탁액(*E. coli* 또는 *S. aureus*) 1.0 mL를 넣어 혼합하고 20±1°C에서 2분 ± 10초 동안 방치한 후, 이산화염소 8 mL를 넣어 20±1°C에서 t분 ± 10초 (t=1, 3, 5) 동안 반응시켰다. 반응이 종료되면, 이 반응혼합액 1.0 mL를 중화제 8.0 mL와 멸균증류수 1 mL가 들어있는 멸균시험관에 넣고 20±1°C에서 5분 ± 10초 동안 중화시켰다. 중화가 종료되면 희석액으로 serial dilution을 실시하고, 각 희석배수의 중

화반응혼합액 1 mL씩을 페트리접시에 각각 넣고 TSA를 가하여 잘 섞은 후 36±1°C에서 24시간 배양하였다. 페트리접시로부터 발생한 최대집락수를 세고 이산화염소의 살균소독작용에 의한 생균수 감소율을 계산하였다. 이때 생균수 감소율이 10⁵ 이상일 경우에 99.999% 이상의 살균소독력을 나타낸다고 판정하였다.

희석액(Tryptone sodium chlorine solution)의 조제

Tryptone, pancreatic digest of casein (BD사, NJ, USA) 1.0 g, NaCl 8.5 g을 증류수 1 L에 녹인 후 멸균하여 사용하였다.

중화제(기본중화혼합제)의 조제

Lecithin 3 g, polysorbate80 30 g, sodium thiosulfate 5 g, L-histidine 1 g 및 saponine 30 g에 희석액(TSCS)을 가하여 1 L로 만든 용액을 멸균하여 사용하였다.

경수의 조제

용액 A (MgCl₂ 19.84 g와 CaCl₂ 46.24 g을 증류수에 용해하여 1 L로 맞춘 용액) 6.0 mL와 용액 B (NaHCO₃ 35.02 g을 증류수에 용해하여 1 L로 맞춘 용액) 8.0 mL에 증류수를 첨가하여 1 L로 만든 뒤 pore size가 0.45 μm 이하인 여과막으로 제균하여 사용하였다.

간섭물질의 조제

청정조건의 모사를 위하여 Albumin, from bovine serum (Sigma-Aldrich사, MO, USA) 0.3 g을 증류수 100 mL에 녹인 뒤 여과막으로 제균하여 사용하였다.

실험 조건 및 분석

이산화염소의 사용농도와 접촉시간에 따른 *E. coli*와 *S. aureus*의 감소 추이를 살펴보고 살균예측모델을 개발하기 위하여 Design-Expert (Version 10, Stat-Ease, Inc., MN, USA)에 의한 반응표면분석법(Response surface methodology, RSM)을 사용하였다(Table 1). 또한 각 조건별 유의성 검증 및 예측식의 적합성을 확인하기 위해 분산분석(Analysis of variance, ANOVA)을 실시하였다.

Table 1. CCD within the given range of concentration and contact time of ClO₂

Factors	Actual			Coded		
	Low	Middle	High	Low	Middle	High
ClO ₂ (ppm)	5	20	35	-1	0	1
Time (min)	1	3	5	-1	0	1

Results and Discussion

식중독유발 병원균을 대상으로 살균소독제 유효성을 평가한 연구들이 다수 보고되고 있다. 이 중 *E. coli*는 그람 음성, *S. aureus*는 그람양성을 대표하는 균주로써 가장 오랫동안 광범위하게 연구에 사용되었다. 조작이 비교적 쉬워 살균소독력 평가시 가장 많이 사용되고 있기 때문에 유럽 표준화위원회(Comité Européen de Normalisation, CEN)의 표준분석법, 미국 공인분석화학회(Association of Official Analytical Chemists, AOAC)의 표준분석법 등 국제표준기구와 일부 선진국 시험법에서도 *E. coli* ATCC

10536과 *S. aureus* ATCC 6538은 살균소독제에 대한 유효성을 평가하는 지표미생물로 명시되고 있다. 따라서 본 연구에서 살균소독력 평가를 위한 시험균주로 *E. coli* ATCC 10536과 *S. aureus* ATCC 6538을 선택하였다.

이산화염소의 사용농도와 접촉시간에 따른 살균소독력 평가 및 살균예측모델 개발

살균소독력은 살균소독제의 유효성을 판단하는 가장 중요한 항목이다. 식품의약품안전처에서 고시한 ‘식품등의 한시적 기준 및 규격 인정 기준’에 의하면¹⁰⁾ (식약처 고시 제 2017-36호) 살균소독력 시험에서는 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 5분

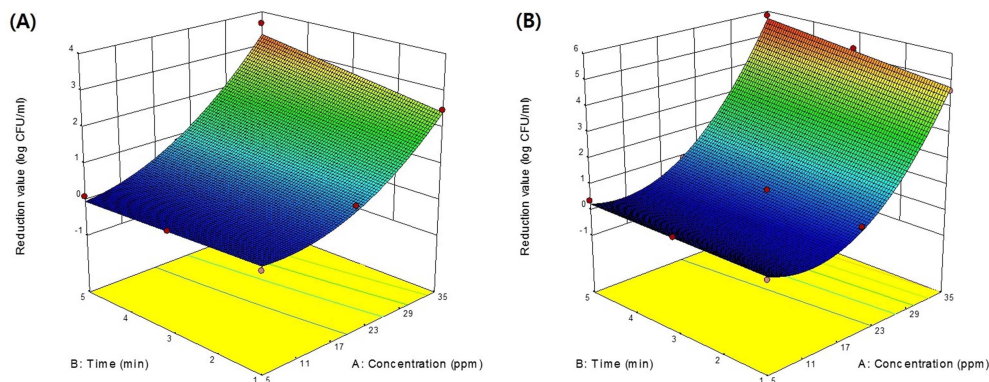


Fig. 1. Response surface plots showing the interaction between concentration of ClO_2 and contact time for reduction value of (A) *E. coli* and (B) *S. aureus*.

Table 2. Observed and predicted reduction value of *E. coli* and *S. aureus* after treatment with ClO_2

Concentration (ppm)	Contact time (min)	Reduction ¹⁾ (%)		Confirmation (95% PI ²⁾ low - 95% PI high)	
		Observed mean	Predicted mean		
<i>E. coli</i>	5	1	0.04(8.798) ³⁾	0.17(32.391)	-0.36~0.71
		3	0.07(14.886)	0.07(14.886)	-0.40~0.54
		5	0.10(20.567)	-0.03(-7.151)	-0.56~0.50
	20	1	0.74(81.802)	0.61(75.452)	0.13~1.10
		3	0.79(83.781)	0.79(83.781)	0.33~1.25
		5	0.84(85.545)	0.96(89.035)	0.48~1.44
	35	1	2.49(99.676)	2.43(99.628)	1.90~2.97
		3	2.70(99.800)	2.88(99.868)	2.42~3.35
		5	3.65(99.977)	3.34(99.954)	2.80~3.87
<i>S. aureus</i>	5	1	0.14(27.556)	0.27(46.296)	-0.09~0.64
		3	0.28(47.519)	0.27(46.296)	-0.05~0.58
		5	0.36(56.348)	0.26(45.045)	-0.11~0.62
	20	1	0.66(78.122)	0.54(71.159)	0.21~0.87
		3	0.79(83.781)	0.78(83.404)	0.47~1.09
		5	0.90(87.410)	1.02(90.450)	0.69~1.35
	35	1	4.59(99.997)	4.73(99.998)	4.37~5.10
		3	5.25(99.999)	5.22(99.999)	4.91~5.54
		5	5.81(99.999)	5.71(99.999)	5.35~6.07

¹⁾ Reduction, log CFU/mL

²⁾ PI, prediction interval

³⁾ % of reduction value

Table 3. Response surface quadratic polynomial equation for reduction of *E. coli* and *S. aureus* based on concentration and contact time of ClO₂

	Equations ¹⁾	R ²
<i>E. coli</i>	$R = + 0.43231 - 0.056492 * X_1 - 0.097771 * X_2 + 9.24167E - 003 * X_1 * X_2 + 3.06333E - 003 * X_1^2$	0.98
<i>S. aureus</i>	$R = + 1.10542 - 0.20896 * X_1 - 0.046062 * X_2 + 8.30000E - 003 * X_1 * X_2 + 8.73300E - 003 * X_1^2$	0.99

¹⁾R, reduction; X₁, ClO₂ concentration; X₂, contact time

± 10초 동안 처리하였을 때, 2종의 지표균주(*E. coli*와 *S. aureus*)를 5 log(생균수 감소율 99.999%) 이상 감소시켜야 살균소독제로 인정한다.

*E. coli*와 *S. aureus*에 대한 중심합성계획법(Central Composite Design, CCD)으로 디자인 된 이산화염소의 사용농도와 접촉시간별 처리효과를 Fig. 1와 Table 2에 나타내었다. 이산화염소의 농도와 접촉시간이 증가할수록 *E. coli*와 *S. aureus*에 대한 살균소독력이 증가하였다. 세척을 충분히 수행한 조건을 모사하기 위하여 간접물질을 첨가한 청정조건에서 *E. coli*의 경우, 초기균수가 9.13 log CFU/mL이었으나 5 ppm의 이산화염소 처리 1분, 3분, 5분 후에는 각각 0.04, 0.07, 0.10 log CFU/mL 감소하였고, 20 ppm에서는 각각 0.74, 0.79, 0.84 log CFU/mL 감소하였다. CCD에 의한 최대농도 35 ppm에서는 2.49, 2.70, 3.65 log CFU/mL 감소하였으며, 40 ppm 처리 5분 후에는 5 log 이상 감소하여 생균수 감소기준을 만족하였다. *S. aureus*의 경우 초기균수가 8.70 log CFU/mL이었으나, 5 ppm의 이산화염소 처리 1분, 3분, 5분 후에는 각각 0.14, 0.28, 0.36 log CFU/mL 감소하였고, 20 ppm에서는 각각 0.66, 0.79, 0.90 log CFU/mL 감소하였다. CCD에 의한 최대농도 35 ppm에서는 4.59, 5.25, 5.81 log CFU/mL 감소하였으며, 40 ppm 처리 5분 후에는 5 log 이상 감소하여 생균수 감소기준을 만족하였다. 따라서 *E. coli*와 *S. aureus*에 대한 이산화염소의 살균소독력을 평가한 결과 두 균주 모두 허용되는 최대농도(200 ppm) 보다 훨씬 낮은 40 ppm에서 식품의약품안전처 살균소독력 기준에 만족하는 것으로 나타났다.

Huang¹¹⁾ 등의 연구에서는 *E. coli*의 경우 1.4 ppm 이산화염소 처리 20분 후에는 99%, 3.0 ppm 처리 20분 후에는 99.9%가 감소되었다고 보고하였고, *S. aureus*의 경우 1.5 ppm 처리 20분 후에는 98%가 감소되었다고 보고하였다. 이러한 결과는 본 연구의 결과와 비교시 살균소독제의 처리시간이 본 연구의 이산화염소 최대 5분 처리 보다 4배의 처리시간을 사용했기 때문이라고 사료된다. 또한 Foschino¹²⁾ 등의 연구에서는 0.7 ppm 이산화염소를 처리하였을 때 *E. coli*의 90%가 사멸될 수 있는 접촉시간은 약 2분, 1.4 ppm을 처리하였을 때는 약 20초, 3.5 ppm을 처리하였을 때는 약 7초라고 보고하였다. 이는 본 연구와 다른 1:100 (시험균 현탁액 : 이산화염소)으로 매우 높은 이산화염소 비율을 사용했기 때문에 단시간 처리 및 낮은 농도 사용에도 효과가 우수하게 나타났다고 사료된다. 이와

대조적으로 5 ppm 이산화염소로 1, 5, 10분간 처리한 후의 *E. coli*는 각각 0.09, 0.18, 0.21 log CFU/mL, 10 ppm으로 1, 5, 10분간 처리한 후에는 각각 0.31, 0.46, 0.60 log CFU/mL, 20 ppm으로 1, 5, 10분간 처리한 후에는 각각 0.71, 0.84, 1.05 log CFU/mL 감소되었음을 보고한 Ryu¹³⁾ 등의 연구와 비슷한 결과를 보였다. 또한 Youm¹⁴⁾ 등의 연구에서도 pure cell culture의 조건에서 이산화염소 5 ppm은 완전한 살균효과를 보이지 않음을 확인하였다고 보고하였다.

그 동안 기구등의 살균소독제는 사용 후 행구는 제품과 행구지 않는 제품으로 관리돼 왔다. 사용 후 행구는 제품은 유효성분을 과량 사용해 제조해도 안전성 평가를 면제 받을 수 있어서 많은 제조업자들이 고농도의 살균소독제를 제조해 왔으며, 이로 인해 환경오염과 안전성에 문제가 되어 왔다. Ölmez¹⁵⁾ 등도 지금까지 주로 사용되고 있는 염소계 살균소독제는 차아염소산나트륨 제품으로 환경오염 및 건강상의 위험 때문에 일부 유럽국가에서 사용을 금지하였다고 보고하였다. 또한 Kim¹⁶⁾ 등도 과도한 살균소독제 사용이 독성학적, 환경오염 등의 문제를 야기할 수 있으므로 살균소독제의 실제 사용 환경에 따라 적절하게 사용되는지를 확인하기 위한 연구가 필요하다고 제안하고 있다. 본 연구에서 이산화염소는 허용되는 최대농도 200 ppm과 최대접촉시간 5분까지 처리하지 않아도 생균수 감소기준인 5 log 이상의 감소값을 나타내었다. 따라서 본 연구에서 제시한 살균예측모델을 통해 *E. coli*와 *S. aureus*를 제어할 수 있는 이산화염소의 적절한 사용농도와 접촉시간을 얻을 수 있다. 이에 따른 반응표면분석법을 활용하여 얻어진 2차 살균예측식은 Table 3에 나타내었다. R² 값이 *E. coli*는 0.98, *S. aureus*는 0.99로 모두 1에 근접하는 높은 적합성을 보였다.

*E. coli*와 *S. aureus*의 사멸예측모델의 적합성을 평가하기 위해서 표준화 잔차의 정규확률을 구하였다(Fig. 2). 오차의 분포가 정규분포를 따를 때 정규성을 가진다고 하는데 표준화 잔차의 정규확률 그림에서 잔차들이 직선모형을 따를수록 오차의 정규성을 가정할 수 있다. 따라서, *E. coli*와 *S. aureus*를 제어하기 위한 이산화염소 처리 결과에 대한 살균예측모델이 적절함을 확인하였다.

본 연구에서 개발된 이산화염소의 살균예측모델을 식품산업에서 활용함으로써 *E. coli*와 *S. aureus*를 최적의 살균소독제 농도와 접촉시간으로 제어할 수 있을 것으로 사료된다.

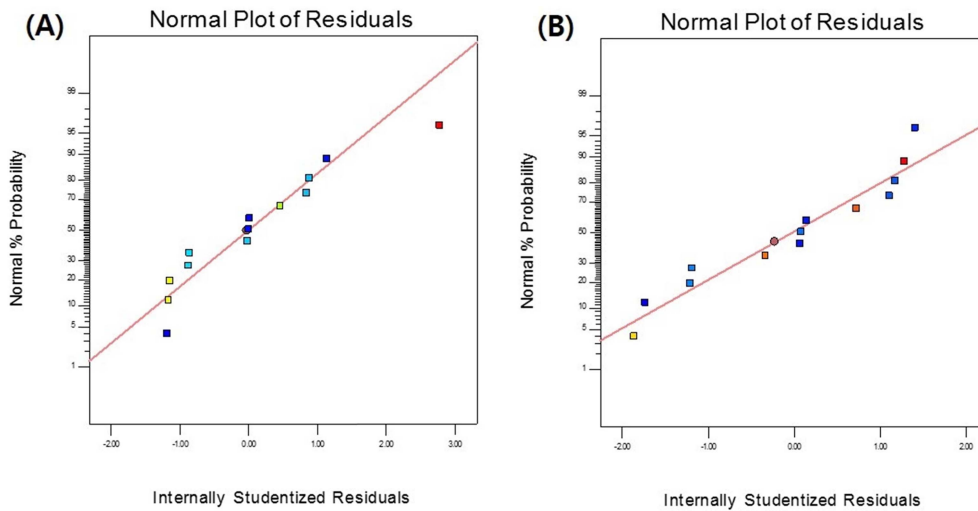


Fig. 2. Normal plots of residuals for predictive model to reduce (A) *E. coli* and (B) *S. aureus* by ClO_2 .

Acknowledgement

본 연구는 2017년도 식품의약품안전처의 연구개발비 (16162위생안014)로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

국문요약

본 연구는 기구등에 오염된 *E. coli*와 *S. aureus*를 제어하기 위해 이산화염소의 농도별 접촉시간에 따른 살균소독력을 평가하여 살균예측모델을 개발하였다. *E. coli*의 경우 초기균수가 9.13 log CFU/mL이었고, 청정조건에서 5 ppm으로 1분, 3분, 5분 처리한 결과 각각 0.04, 0.07, 0.10 log CFU/mL의 감소값을 나타내었다. 20 ppm을 처리한 결과 각각 0.74, 0.79, 0.84 log CFU/mL의 감소값을 나타내었다. 또한 CCD에 의한 최대농도 35 ppm으로 처리한 결과 각각 2.49, 2.70, 3.65 log CFU/mL의 감소값을 나타내었다. *S. aureus*의 경우 초기균수가 8.70 log CFU/mL이었고, 청정조건에서 5 ppm으로 1분, 3분, 5분 처리한 결과 각각 0.14, 0.28, 0.36 log CFU/mL의 감소값을 나타내었다. 20 ppm을 처리한 결과 각각 0.66, 0.79, 0.90 log CFU/mL의 감소값을 나타내었다. 또한 CCD에 의한 최대농도 35 ppm으로 처리한 결과 각각 4.59, 5.25, 5.81 log CFU/mL의 감소값을 나타내었다. 따라서 이산화염소의 살균소독력 평가결과는 *E. coli*와 *S. aureus*에 대하여 식품의약품안전처 살균소독력 기준에 모두 만족하는 것으로 나타났다. 살균예측모델의 경우, R^2 값이 모두 0.98 이상으로 두 균주에 대해 모두 높은 적합성을 보였다. 본 연구에서 개발된 이산화염소의 살균예측모델을 식품산업 적용을 위한 기초자료로 활용함으로써 *E. coli*와 *S. aureus*를 적절한 농도와 접촉시간으로 제어할 수 있을 것으로 사료된다.

References

1. Fuster-Valls, N., Hernández-Herrero, M., Marin-de-Mateo, M., and Rodríguez-Jerez, J.J.: Effect of different environmental conditions on the bacteria survival on stainless steel surfaces. *Food Control*, **19**, 308-314 (2008).
2. Kim, H.I., Jeon, D.H., Yoon, H.J., Choi, H.C., Eom, M.O., Sung, J.H., Park, N.Y., Won, S.A., Kim, N.Y., and Lee, Y.J.: Evaluation of the efficacy of sanitizers on food contact surfaces using a surface test method. *J. Food Hyg. Saf.*, **23**, 291-296 (2008).
3. 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).
4. Lee, Y. S., Ha, S. D., Kim, D. H., and Park, J. H.: Evaluation of efficacy and development of predictive model of sanitizers and disinfectants on reduction of microorganisms on food contact surfaces. *J. Food Hyg. Saf.*, **26**, 203-208 (2011).
5. KFDA (Korea Food and Drug Administration). Standards and specification of food contact surface sanitizing solutions (2016).
6. Kim, J. M.: Use of chlorine dioxide as a biocide in the food industry. *Food Ind. Nutr.*, **6**, 33-39 (2001).
7. Kim, Y. S., Park, I. S., and Ha, S. D.: Application sanitizer for the control of microorganisms in food. *Food Science and Industry*, **42**, 26-51 (2009).
8. Lykins Jr, B. W., and Griese, M. H.: Using chlorine dioxide for trihalomethane control. *J. Am. Water Works Assoc.*, **78**, 88-93 (1986).
9. KFDA (Korea Food and Drug Administration). Korea Food Additives Code, V. General test methods, 37. Test method of bactericidal activity.
10. KFDA (Korea Food and Drug Administration). Available from: <http://www.mfds.go.kr> Accessed May 8, 2017.
11. Huang, J., Wang, L., Ren, N., and Ma, F.: Disinfection effect

- of chlorine dioxide on bacteria in water. *Water Res.*, **31**, 607-613 (1997).
12. Foschino, R., Nervegna, I., Motta, A., and Galli, A.: Bactericidal activity of chlorine dioxide against *Escherichia coli* in water and on hard surfaces. *J. Food Prot.*, **61**, 668-672 (1998).
 13. Ryu, S. H.: Effects of aqueous chlorine dioxide against *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes* on broccoli served in foodservice institutions. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **36**, 1622-1627 (2007).
 14. Youm, H. J., Ko, J. K., Kim, M. R., and Song, K. B.: Inhibitory effect of aqueous chlorine dioxide on survival of *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* in pure cell culture. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **36**, 514-517 (2004).
 15. Ölmez, H., and Kretzschmar, U.: Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact. *LWT-Food Science and Technology*, **42**, 686-693 (2009).
 16. Kim, H.I., Lee, K.H., Kwak, I.S., Eom, M.O., Jeon, D.H., Sung, J.H., Choi, J.M., Kang, H.S., Kim, Y.S., and Kang, K.J.: The establishing test method of bactericidal activity and the evaluating of Korean disinfectants/sanitizers efficacy. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **37**, 838-843 (2005).