Appl. Chem. Eng., Vol. 22, No. 5, October 2011, 453-460

총 설

초임계 유체의 미생물 불활성화 특성 및 기작

문성민 · 김정찬 · 이윤우 · 윤제용†

서울대학교 화학생물공학부
(2011년 6월 21일 접수, 2011년 7월 1일 심사, 2011년 8월 22일 채택)

Antimicrobial Activity and Mechanism of Supercritical Fluids

Sungmin Mun, Jungchan Kim, Youn-Woo Lee, and Jeyong Yoon†

World Class University (WCU) Program of Chemical Convergence for Energy & Environment (C2E2), School of Chemical and Biological Engineering, College of Engineering, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
(Received June 21, 2011; Revised July 1, 2011; Accepted August 22, 2011)

안전하고 미생물 불활성화 능력이 높은 초임계 유체(이산화탄소 및 일산화이질소)는 최근 식품 및 의료 분야 등에서 비가열 살균기술로 응용 가능성이 높아 관심이 증대되고 있다. 하지만 초임계 유체를 이용한 많은 응용 연구에도 불구하고 초임계 유체 살균기술의 살균 성능 및 기작에 대한 이해 부족으로 아직 널리 활용되고 있지 못하다. 따라서 본 글에서는 기존 연구를 중심으로 초임계 유체 특성, 미생물 불활성화 특성과 기작, 주요 영향 인자, 응용 분야 등에 대해서 정리 및 검토하여 초임계 유체 살균기술의 연구 및 상용화에 도움이 되고자 한다.

Recently, there is growing interests in the application of supercritical fluids for food and medical fields since supercritical fluids (CO_2 and N_2O) have known to be safe and effective as a non-thermal sterilization technique. Although supercritical fluids have been investigated for various kinds of products, they have not yet been used in common currency due to their lack of knowledge related to the antimicrobial activity or detailed mechanisms. In this review paper, we summarized the characteristics, antimicrobial activity and mechanisms, important factors, and applicability of supercritical fluids to help the investigation and commercialization of supercritical fluids sterilization technique.

Keywords: *supercritical fluid, non-thermal sterilization, antimicrobial activity, antimicrobial mechanism*

1. 서 론

최근 웰빙(Well-being) 바람과 함께 비가열 신선 식품에 대한 소비가 크게 증가하면서 미생물 감염 사고 및 위험성이 증가되고 있어 미생물 감염으로부터 안전한 제품을 생산하기 위해서 적절한 살균 공정이 요구된다[1]. 또한 의료계에서도 기능성 고분자 및 바이오 재료 사용이 크게 증가되고 있어 이들을 안전하게 살균할 기술이 요구되고 있다[2].

식품 및 의료 분야에서 사용되는 재료 및 제품은 인체에 직접적으로 사용되기 때문에 미생물 제거를 위한 살균처리 과정이 반드시 필요하다. 기존 살균법으로 가장 보편적이고 널리 사용되고 있는 것은 고온·고압살균(autoclave)으로 포자(spore)를 포함한 거의 모든 미생물을 완벽히 살균할 수 있는 가장 확실한 살균법이다. 그러나 높은 온도에 의해 변형될 수 있는 식품, 의약품 및 의료 도구들의 살균에는 그 사용에 제약이 따른다.

이를 대체하기 위해 몇몇 비가열살균법이 개발되었으며 식·의약품의 비가열살균법으로는 초고압, 고전압 펄스 전기장 등이 있으며, 병·의원의 비가열살균법으로는 오존, 에틸렌옥사이드, 감마선, 과산화수소 플라즈마 등이 있다. 이러한 비가열살균법들은 높은 살균 능력을 가지고 있지만 살균하고자 하는 대상물의 물성을 변화시킬 수 있는 단점을 가지고 있다. 에틸렌옥사이드는 특정 고분자를 파괴시킬 뿐만 아니라 강한 독성으로 사용에 많은 주의를 필요로 하며[3], 감마선 역시 의료용 고분자 물성을 약화시키는 단점을 가지며[4,5], 과산화수소 플라즈마는 과량의 활성라디칼(free radical)을 발생하여 합금 금속표면을 부식시킬 수 있다[6]. 한편, 초고압 살균은 수백 MPa의 고압에 견딜 수 있는 장치가 요구되어 높은 비용이 큰 단점이며[7], 고전압 펄스 전기장은 상대적으로 낮은 살균력이 단점이다[8].

기존 비가열살균법을 보완하여 식품 및 의료 분야에서 안전하게 사용될 수 있는 새로운 기술 개발이 요구되고 있으며 그 대안으로 고압 이산화탄소(CO_2)를 이용한 비가열살균법이 제안되고 연구되었다[2,5,9,10]. 이산화탄소는 상대적으로 저렴하고 비가연성으로 취급이 용이하며, 자체 독성 및 반응성이 낮고 잔류성이 없어 친환경적 용매로 활용되어 왔다. 특히, 임계 압력 및 온도 이상의 초임계 이산화탄소(supercritical CO_2)는 기체와 같은 빠른 확산력을 가지고 있으며 동시에 액체와 같은 높은 용해력을 가지고 있어 미생물 살균 효과가 기체 및 액체 보다 우수한 것으로 알려져 있으며[11,12], 이러한 초임계 이산화탄소를 다양한 식품 및 재료 살균에 적용한 응용 연구가 활발히 보고되고 있다. 액상 시료에 대한 초임계 이산화탄소 살균에서는 이

† 교신저자 (e-mail: jeyong@snu.ac.kr)

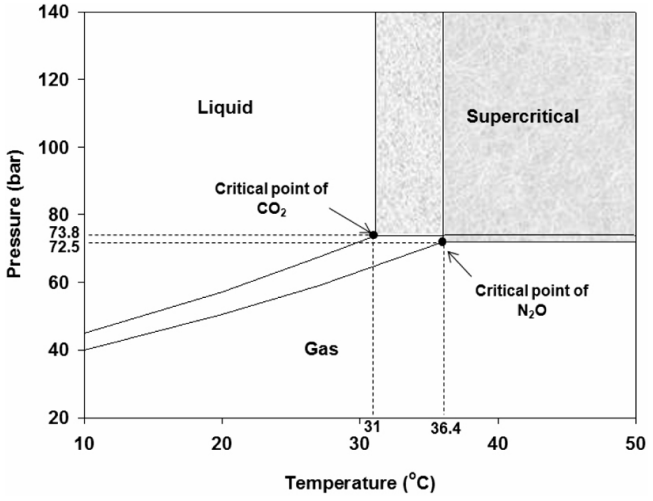


Figure 1. The state of supercritical carbon dioxide (nitrous oxide) and critical points in T-P diagram.

산화탄소 용해로 탄산이 형성되어 수용액 pH를 낮추어 살균하고자 하는 대상이 pH 변화에 민감할 경우 살균 후 대상 물질에 변형을 가져올 수 있다. 이러한 단점을 극복하고자 최근에는 초임계 일산화이질소(supercritical N_2O)를 이용한 살균 연구가 보고되고 있으며 초임계 이산화탄소와 비슷한 살균력을 가지면서 pH를 변화시키지 않아 pH에 민감한 식품 살균에 효과적으로 사용될 수 있다[13-15].

초임계 이산화탄소 및 초임계 일산화이질소를 이용한 미생물 살균 연구는 주로 회분식(batch) 반응기를 이용한 연구실 규모 연구가 대부분이었으며, 실제 상업적으로 활용된 예는 매우 적다. 이는 새로운 살균법에 대한 시장의 높은 진입장벽에 기인하기도 하지만 초임계 유체(supercritical fluids) 살균법에 대한 이해 및 인식 부족도 매우 큰 이유 중의 하나로 초임계 유체를 이용한 미생물 살균법에 대한 소개가 매우 필요한 시점이다. 특히 초임계 유체의 미생물 불활성화 특성에 있어서 온도, 압력, 교반, 매질, pH, 감압 및 가압 속도, 반응기, 시스템 구성 등 매우 다양한 인자들에 의해 영향을 받기 때문에 이에 대한 정확한 이해가 요구된다[1,2].

본 글에서는 초임계 유체 살균에 가장 많이 활용되고 있는 초임계 이산화탄소와 초임계 일산화이질소에 의한 미생물 불활성화 특성 및 기작에 대해서 소개하고 미생물 불활성화에 미치는 영향 인자들에 대해 정리하였다. 또한 초임계 유체 살균 기술의 연구동향 및 응용 분야에 대해서 정리하여 연구 및 상용화에 도움이 되고자 한다.

2. 초임계 유체(Supercritical Fluid)

초임계 유체란 "임계온도(critical temperature : T_c)와 임계압력(critical pressure : P_c) 이상에 있는 유체"로 정의되며 기존 용매와 차별되는 독특한 특성을 갖고 있다. 일반적으로 용매 물성은 분자의 종류와 분자 간 상호작용에 따라 결정되기 때문에 비압축성인 액체용매는 분자간 거리가 거의 변화하지 않아 단일 용매로서는 커다란 물성의 변화를 기대하기 어렵지만, 초임계 상태에 놓이게 되면 물질은 그 임계점 부근에서 압력을 변화시킬 때 그의 밀도, 점도, 확산계수와 극성 등 많은 물성에서 기체에 가까운 상태로부터 액체에 가까운 상태에까지 연속적으로 매우 큰 변화가 생긴다. Figure 1은 이산화탄소와 일산화이질소의 온도 및 압력에 따른 상변화를 보여주는 것으로 이산화탄소의 임계점은 T_c = 31.1 ℃, P_c = 73.8 bar이며 일산화이질소의 임계점은 T_c = 36.4 ℃, P_c = 72.5 bar이다. 고압 반응기 속 액체 이산화탄소를 가열 및 가압하면 기-액체 계면에서 온도, 압력 증가에 따라 점점 그 경계가 사라지는 것을 볼 수 있으며, 임계점 이상에서는 완전히 하나의 상으로 존재하는 것을 확인 할 수 있다(Figure 1).

전형적인 기체, 액체, 초임계 유체의 물리적 성질을 비교했을 때 초임계 유체는 기체와 유사한 낮은 점도를 가지면서 기체와 액체 중간의 확산성을 가지는 것으로 보고되어 있다[16]. 초임계 유체는 기체처럼 밀폐된 공간을 가득 채우는 묵직한 유체라고 할 수 있으며 높은 용해력, 물질이동과 열 이동이 빠르고, 낮은 점도, 높은 확산계수 그리고 낮은 표면장력으로 인해 미세공으로의 빠른 침투성과 같은 장점을 가지고 있어 추출, 세정, 합성 등에 친환경 용매로써 널리 활용되고 있다.

3. 초임계 이산화탄소(Supercritical CO_2)

초임계 유체 중 이산화탄소는 그 자체에 독성이 없으며 비교적 저렴하기 때문에 친환경 용매로 다양한 분야에 걸쳐 가장 널리 사용되어 왔으며, 초임계 유체 살균 기술에도 가장 많이 활용 연구되어 왔다. 초임계 이산화탄소 살균 기술은 살균하고자 하는 대상이 액상인지 고상인지에 따라 크게 차이가 있으며, 식품 분야에서는 주로 액상의 과일 및 야채 주스 살균에 활용되어 왔고, 의료분야에서는 고체 재료의 표면 살균에 활용되어 왔다. 최근 이들 분야에서 수요가 크게 증가되고 있어 안전하게 살균할 수 있는 비가열 초임계 이산화탄소 살균기술이 크게 부각되고 있다.

3.1. 초임계 이산화탄소의 미생물 불활성화 특성

상온 상압 이산화탄소는 미생물 불활성화 효과가 거의 없으나 7 bar로 가압된 조건에서는 미생물 성장을 저해할 수 있으며[17], 가압된 이산화탄소가 미생물을 불활성화 시킬 수 있다는 사실은 1951년 Fraser 연구팀에 의해 최초로 보고되었으며, 대표적 지표미생물인 *Escherichia coli* (대장균)을 가압된 이산화탄소(35 bar, 37 ℃)로 약 3 min의 접촉 시간을 통해 약 96% 불활성화를 얻었다[18]. Fraser 연구팀의 연구는 가압된 이산화탄소 유체에 의한 불활성화가 아닌 급격한 감압에 의한 불활성화로 순수한 초임계 이산화탄소에 의한 미생물 불활성화는 Kamihira 연구팀에 의해 처음으로 보고되었다[19]. 대장균 및 *Saccharomyces cerevisiae* (효모균)을 초임계 이산화탄소(200 bar, 35 ℃)로 약 30 min의 접촉 시간을 통해 각각 99.99% (4 log)와 99.9999% (6 log) 불활성화 시킬 수 있음을 보고하였다. 그 이후 많은 연구자들에 의해 초임계 이산화탄소가 다양한 세균, 곰팡이, 효모, 바이러스 등을 효과적으로 불활성화 시킬 수 있음이 보고되었다[1]. 가압된 이산화탄소에 의한 미생물 불활성화는 이산화탄소가 물에 용해되어 탄산이 형성되고 탄산에 의해 pH가 낮아지는 것과 초임계 이산화탄소 유체 특성에 기인한 것으로 이해되고 있다.

기체의 용액에 대한 용해도는 Henry의 법칙을 따르며 온도에 크게 의존하지만, 가압된 이산화탄소 조건에서는 압력에 크게 영향을 받기 때문에 가압된 조건에서 이산화탄소 용해도를 구하기 위해서는 보정된 열역학 모델식이 필요하며 Equation-of-State approach를 활용하여 가압된 온도 압력에서 이산화탄소 용해도를 구할 수 있고 이를 통해 pH를 예측할 수 있다[20]. 압력이 증가함에 따라서 물 속에 해리되는 이산화탄소 양이 증가되어 대기압에서 보다 pH는 낮아지게 되며, 초임계 영역에서 압력 증가에 따른 pH 강하에 관한 실험 및 이론적인

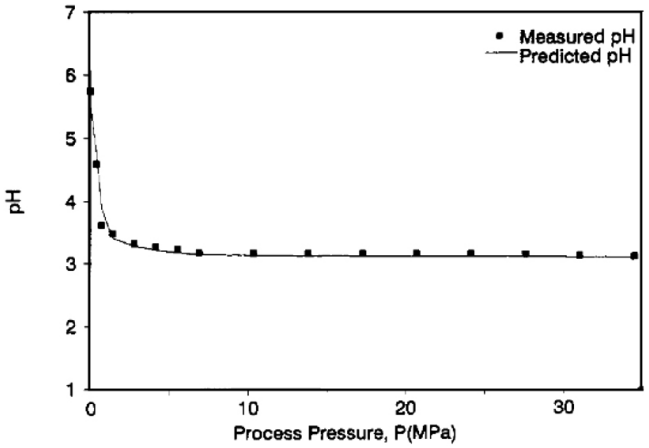


Figure 2. Measured and predicted pH of pure water-CO_2 simulation system at pressure up to 34 MPa at 32 ℃ (Reprinted with permission from [20]).

결과가 보고되어 있다. Figure 2에서 보이는 바와 같이 상온 상압(1 bar, 32 ℃) 이산화탄소가 물에 용해될 때 pH는 약 5.7이며 350 bar까지 가압됨에 따라 pH는 3.2로 낮아지는 것을 보여준다[20]. 그러나 일정 온도 압력 조건 이상에서는 지속적인 압력 증가에도 불구하고 수용액 pH는 3.1~3.2 사이에서 일정하게 되며 이는 이산화탄소가 포화되었기 때문이다.

많은 선행 연구들은 새로운 미생물 및 살균 대상에 대한 온도 및 압력 증가에 따른 불활성화에 초점을 맞추어 보고되어 왔다. 그러나 유사한 온도 압력 조건에서 수행된 결과임에도 연구자 상호간 불활성화에 큰 편차를 보이는 경우가 있으며 이는 초임계 이산화탄소에 의한 미생물 불활성화에서는 동일한 온도 압력 조건일지라도 살균 시스템(회분식, 연속식), 교반 유무, 시료의 종류 및 부피, 반응기 디자인 등에 따라 크게 달라질 수 있기 때문이다. 초임계 유체 살균 효율은 초임계 유체가 미생물이 포함된 액상에 보다 효과적으로 전달되는 작용과 큰 관련이 있으며, 일반적으로 연속식, 교반 유, 지방 함량이 낮고 부피가 작은 시료일수록 미생물 불활성화는 높아진다. 초임계 이산화탄소는 다양한 미생물에 대해서 불활성화 효과가 잘 알려져 있으나 세균 포자(spore)에 대한 불활성화 효과는 매우 낮은 것으로 알려져 있다[19,21].

3.2. 초임계 이산화탄소의 미생물 불활성화 기작

초임계 이산화탄소에 의한 미생물 불활성화 기작은 아직 명확하게 밝혀져 있지는 않지만 이산화탄소 용해에 따른 수용액 pH 강하와 용해된 이산화탄소의 미생물 세포내 확산으로 인한 세포 내부 pH 강하에 따른 불활성화 기작이 가장 잘 알려져 있으며 Figure 3에서와 같이 7 단계로 설명되고 있다[1]. 단계 1 : 가압된 이산화탄소의 수용액 용해, 단계 2 : 세포막 변형, 단계 3 : 세포내부 pH 강하, 단계 4 : 대사저해 및 중요 효소 불활성화, 단계 5 : CO_2와 HCO_3^-에 의한 직접적인 대사저해, 단계 6 : CO_2와 HCO_3^-에 의한 생체 전해균형 저해, 단계 7 : 세포막 및 세포 내부로부터 주요 구성성분 유출이다. 이상에서 살펴본 바와 같이 초임계 이산화탄소에 의한 미생물 불활성화 기작은 어느 한가지로 설명하기보다는 이산화탄소가 물에 용해되어 pH 강하가 일어나는 산성화(acidification)와 초임계 이산화탄소 유체 특성과 상호작용에 의한 상승된 복합적인 효과에 의한 것으로 이해될 수 있다.

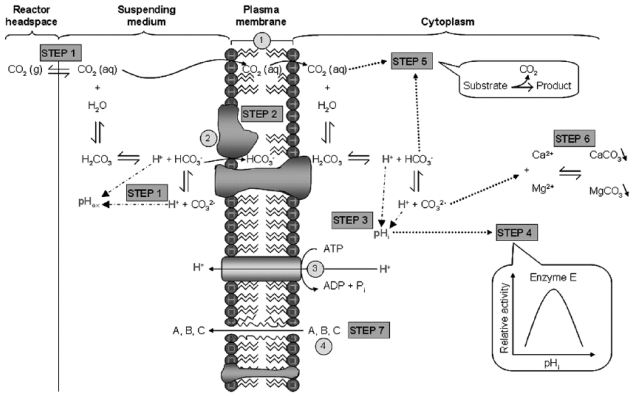
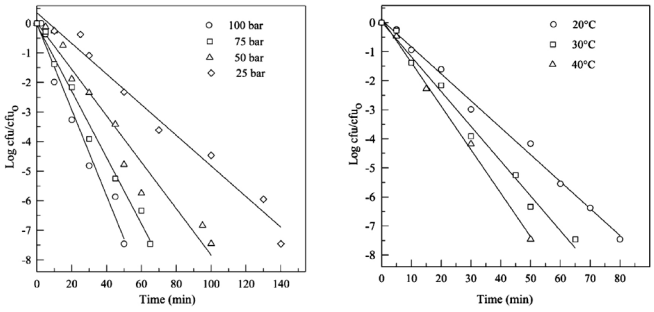


Figure 3. A schematic diagram of how pressurized CO_2 may exert its lethal action on bacteria. Also shown-besides the different steps of the inactivation mechanism are (1) a phospholipid, (2) integral membrane proteins, (3) a plasma membrane H+-ATPase, and (4) intracellular substances (Reprinted with permission from [1]).



(a) (b)

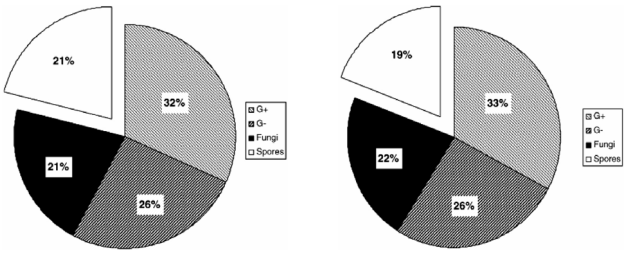
Figure 4. Effect of CO_2 on *E. coli* as a function of pressure at 30 ℃ (a) and temperature at 75 bar and (b) (Reprinted with permission from [22]).

3.3. 초임계 이산화탄소 살균에서 주요 영향 인자

3.3.1. 온도 및 압력

Figure 4는 이산화탄소 온도 및 압력 증가에 따른 대장균 불활성화를 보여주는 그래프로 동일한 온도 및 압력조건에서 이산화탄소 압력 및 온도 증가에 따라 미생물 불활성화 효과가 증대되는 것을 보여준다[22]. 이산화탄소는 일정 온도에서 압력이 증가하면 수용액상에 해리되는 이산화탄소 양이 증가되어 수용액 pH를 더욱 낮추고 이산화탄소 밀도가 증가하여 수용액상으로 용해된 용액상 이산화탄소 분자의 용매력을 증가시킨다. 특히, 초임계 이산화탄소 조건에서는 초임계 유체 고유 특성인 높은 확산력과 유체 파워에 의해 액체 및 기체 이산화탄소 보다 높은 살균력을 얻을 수 있다[23-25].

임계 온도(31.1 ℃) 이상에서 압력증가는 살균력을 높일 수 있지만 지나친 고압 사용은 에너지 소모가 높으므로 경제성을 고려한 최적 압력 선택이 매우 중요하다. 한편, 임계 압력(73.8 bar) 이상에서 온도 증가는 이산화탄소 밀도를 감소시켜 초임계 이산화탄소 용매력을 감소시킬 수 있지만 대부분의 연구보고에서 온도 상승은 미생물 불활성화 증가를 보여준다. 이는 온도 증가가 밀도를 감소시켜 상대적으로 초임계 이산화탄소의 용매력을 감소시키지만 온도 증가는 인지질로 구성된 미생물 세포막 유동성을 증가시킬 수 있기 때문에 불활성화 측면에서는 상쇄되는 결과로 나타나는 것으로 보인다[25,26]. 이산화탄소



(a) species (b) publications

Figure 5. Distribution of the number of species (Gram-positive and Gram-negative bacteria, bacterial spores, and fungi) and the number of publications by species (Reprinted with permission from [2]).

임계온도는 31.1 ℃로 비교적 낮기 때문에 비 가열 멸균이 요구되는 식품 및 의료기구 살균에 매우 적합하며 적용 대상에 따라 선택할 수 있다.

3.3.2. 살균 대상

초임계 이산화탄소 살균에서 식품과 관련하여 우유 및 포도, 사과, 오렌지, 배, 당근 주스 등 액상 음료와 쇠고기, 닭고기, 계란, 새우, 밀가루 등 고형 식품에 대한 살균 연구가 보고되었다[1]. 액상 음료에서는 지방성분과 같이 비극성 이산화탄소 분자와 결합할 수 있는 성분이 많이 함유 될수록 미생물 불활성화가 저해되었으며 우유 살균에 가장 많은 시간이 소요되었다[22]. 반면 대부분의 과일 및 야채주스에 대한 살균력은 영양배지 및 증류수 결과와 비슷하거나 조금 낮다. 식품 살균법에 있어서 살균 처리 후 식품의 색, 풍미 및 영양분 등에 영향을 주는지 여부는 매우 중요하며 초임계 이산화탄소 처리 후 일부 주스류의 색과 밝기가 조금 낮아지는 경향이 있으나 매우 미미한 차이로 보고하고 있다. 살균대상이 의료기구 및 고체표면인 경우 주로 미생물이 부착되어 있는 실험용 시편을 이용하여 연구되었으며, 인공장기 및 혈액을 대상으로 한 살균 연구도 보고되었다[27,28]. 최근 인삼가루를 대상으로 초임계 이산화탄소를 활용한 살균 연구가 보고되었으며 초임계 유체만으로는 인삼 가루 속의 미생물 불활성화가 낮으며 첨가물로 소량의 물, 알코올 및 과산화수소 등을 첨가할 경우 높은 불활성화를 얻을 수 있음을 보고하였다[29].

3.3.3. 미생물의 종류

기존 연구에서는 그람 양성 및 음성 세균, 효모(곰팡이), 포자 등 다양한 미생물에 대해 불활성화 연구가 수행되었다. Figure 5는 초임계 살균 연구에 사용된 미생물 분포를 보여주는 것으로 식품과 관련하여 세균 및 효모가 주로 사용되었으며, 의료 분야 살균과 관련하여 포자가 주로 사용되었다[2]. 대부분의 세균 및 효모는 초임계 이산화탄소에 의해 효과적으로 불활성화 시킬 수 있음이 보고되었다. 그러나 세균 포자의 경우 포자 내에 수분 양이 매우 적고 단단한 단백질 층으로 둘러싸여 있어 일반적인 초임계 이산화탄소 조건에서는 불활성화가 거의 되지 않는다. 이러한 포자의 불활성화를 위해서는 임계압력 하에서 60 ℃ 이상 고온과 수 시간 이상의 접촉시간이 요구된다. 보다 빠른 불활성화를 위해서는 75 ℃ 이상 고온이 요구되는 것으로 알려져 있다. 초임계 이산화탄소에 대한 미생물 저항성은 일반적으로 세균, 효모, 포자 순으로 알려져 있다. 초임계 이산화탄소를 이용한 미생물 불활성화에서는 미생물 종류에 따라서 소독 효과의 차이가 크므로 소독 대상이 되는 미생물에 대한 초임계 이산화탄소 불활성화 특성에 대한 이해가 매우 중요하다.

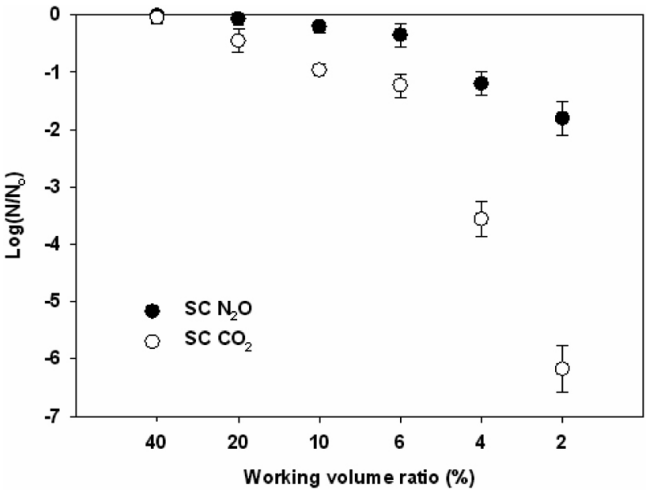


Figure 6. Effect of the working volume ratio on the inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* during SC N_2O and SC CO_2 treatment (100 bar, 37 ℃, for 5 min) (Reprinted with permission from [15]).

3.3.4. 초기 pH

초임계 이산화탄소 살균 시 수용액의 초기 pH는 매우 중요하며 일반적으로 초기 pH가 4~5로 낮은 경우 미생물 불활성화가 중성 및 높은 pH에서 보다 더욱 빨라지며 고농도의 중성 및 높은 pH 조건에서는 미생물 불활성화가 매우 미미하였다[1]. 이는 높은 완충작용에 의해 비록 가압된 이산화탄소가 수용액상에 용해되더라도 pH가 낮아지지 않아 미생물 불활성화 효과가 저해되는 것으로 이해되고 있다.

3.3.5. 물의 함량

초임계 유체에 의한 미생물 불활성화는 수분이 전혀 없는 조건에서는 효과가 매우 미미하다. 이는 초임계 유체가 수용액 내에 용해되고 용해된 초임계 유체 특성에 의해 불활성화가 일어나므로 건조된 미생물에 대해서는 소독능이 현저히 낮아진다. 선행연구에서 사용된 수용액 양은 수~수십 mL로 매우 다양하며, 고압 용기의 부피가 같다면 넣어주는 수용액 양이 증가할수록 미생물 불활성화에 걸리는 시간이 길어지게 된다.

Figure 6은 교반을 동반하지 않은 조건에서 동일한 온도 압력 초임계 유체의 불활성화 효율이 수용액 양(working volume)의 증가에 따라 낮아지는 것을 보여주고 있다[15]. 수용액 양이 증가되면 용액 속에 존재하는 미생물과 초임계 유체 상호작용에 보다 많은 시간이 필요하기 때문으로 교반을 동반하여 초임계 유체와 미생물 상호작용을 높여주는 경우 불활성화 시간이 크게 줄어든다.

3.3.6. 교반 효과

액상 및 고상의 대상체를 살균할 때 교반은 초임계 이산화탄소 살균 시간을 단축할 수 있는 매우 중요한 인자이다. 일반적으로 교반을 동반한 조건에서 초임계 이산화탄소에 의한 미생물 불활성화가 증가되며 교반이 없는 조건에서는 상대적으로 미생물 불활성화에 걸리는 시간이 길어진다[15,30]. 이는 교반을 통해 Figure 5의 1, 2단계가 보다 효과적으로 촉진되어 짧은 시간에 pH 강하와 세포 내부로의 유입이 이루어지는 것으로 이해되고 있다. 또한 교반은 수용액상 미생물이 초임계 유체와 직접 접촉할 수 있는 빈도를 높여주는 역할도 하기 때문에 미생물 불활성화가 증가되는 것으로 생각된다. Figure 7은 초임계 유체 살균에서 동일한 온도 조건에서 교반 속도에 따른 미생물 불

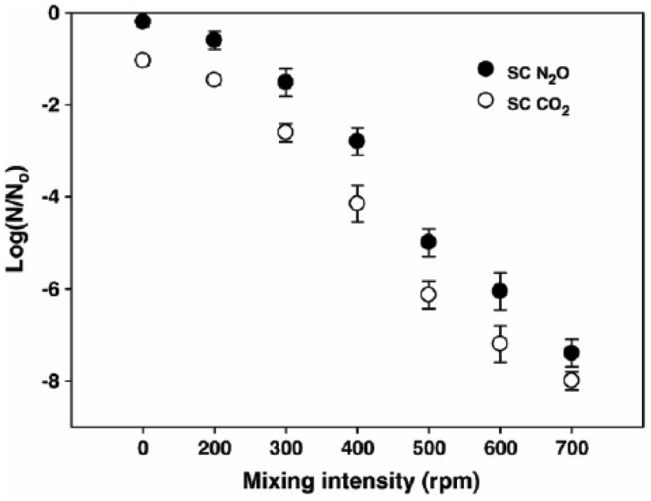


Figure 7. Effect of the mixing intensity on the inactivation of *P. aeruginosa* during SC N_2O and SC CO_2 treatment (100 bar, 37 ℃, and 10% working volume for 5 min) (Reprinted with permission from [15]).

활성화에 큰 차이가 있음을 보여주는 결과로, 높은 불활성화를 위해서는 빠른 교반이 매우 중요하며 연구자 상호간 불활성화 차이가 서로 다른 교반 속도에서 수행된 결과임을 보였다[15].

3.3.7. 첨가물의 영향

의료 분야에서 사용되는 살균법은 다양한 종류의 세균 포자에 대해 효과적으로 6 log 이상 불활성화 시킬 수 있어야 한다는 미국 FDA의 규정이 있어 초임계 이산화탄소 살균법 연구에 있어서도 포자를 6 log 이상 불활성화 시킬 수 있는 방법에 대해서 연구가 진행되었다. *Bacillus* 포자의 경우 일반적인 임계 온도와 압력 조건에서 불활성화가 전혀 일어나지 않는다. 이러한 문제점을 해결하기 위해서 과산화수소(H_2O_2), 에탄올(C_2H_5OH) 및 아세트산(CH_3COOH)을 포함한 다양한 산성용액 첨가가 *Bacillus* 포자의 불활성화에 미치는 영향에 대해 연구가 되었다[31,32]. 첨가물로 사용되는 물질은 독성 및 잔류성이 없고 초임계 이산화탄소에 잘 용해될 수 있는 물질이 선택되었으며 초임계 이산화탄소 내에 미량 고농도 과산화수소 및 과초산(CH_3COOOH) 첨가가 포자의 불활성화에 가장 효과적인 것으로 보고되었다(Table 1).

과산화수소와 과초산과 같은 첨가물은 초임계 이산화탄소에 높은 용해도를 가져 초임계 이산화탄소가 미생물 내로 침투될 때 다른 첨가물 보다 효과적으로 물질 전달이 이루어져 포자 불활성화를 증대시키는 것으로 보고하고 있다. 그러나 과초산과 같이 특정 산성용액에서 높은 불활성화 효과가 나타나는 원인에 대해서는 아직 명확히 알려져 있지 않다. 한편, Spilimbergo 등은 과산화수소 및 산성용액의 첨가 없이 물리적인 고전압 펄스를 초임계 이산화탄소와 함께 사용하여 높은 포자 불활성화를 얻을 수 있음을 보고하였다[33]. 초임계 이산화탄소와 고전압 펄스를 이용한 시너지 효과는 관찰되었지만 이 역시 높은 포자 불활성화를 위해서는 15 h 이상 오랜 접촉시간이 요구되어 보다 효과적인 포자 불활성화 방법이 연구되어야 한다.

3.3.8. 초임계 시스템

초임계 이산화탄소를 이용한 미생물 불활성화를 위해서는 이산화탄소를 임계 압력과 온도로 올려야 한다. 이를 위해서는 고압 펌프 및 항온 챔버가 필수적이며, 살균 대상물을 넣고 실제로 초임계 이산화탄소와 접촉하여 살균이 이루어지는 고압용기 등이 필요하다. 대부분의 경우 회분식 시스템을 이용한 연구가 수행되었으며, 일부 연구자에 의해 연속식 시스템을 이용한 연구도 수행되었다(Figure 8)[34,35].

회분식 시스템을 이용한 연구에서 교반을 수반한 경우와 수반하지 않는 경우 미생물 불활성화가 크게 차이가 나며 교반을 수반하는 것이 크게 효과적이다. 이는 초임계 이산화탄소와 미생물과의 접촉을 보다 용이하게 해주어 살균력을 높여주기 때문이다. 대부분의 경우 수용액상에 자석 막대를 넣고 교반하는 것이 일반적이며 교반 효율을 높이기 위해서 임펠러(impeller)를 이용할 수도 있다. 임펠러의 위치 또한 교반 효율에 매우 중요한 영향을 미치므로 최적 위치를 선정하는 것 또한 중요한 요소이다. 초임계 이산화탄소를 액상 대상체에 주입하는데 있어서 마이크로 필터 등을 활용하는 경우 초임계 이산화탄소와 대상체의 접촉을 보다 효과적으로 할 수 있어 살균력을 높일 수 있다[36,37]. 이처럼 초임계 이산화탄소 살균법은 시스템의 디자인이 미생물 불활성화에 큰 영향을 미치므로 효과적인 시스템 설계가 매우 중요하다.

Table 1. List of Selected Additives Screened for Enhancement of *Bacillus stearothermophilus* Spore Inactivation in Combination with Supercritical CO_2 (Reprinted with Permission from [32])

Additive	Temperature (℃)	Time (h)	Log reduction
Ethanol	60～50	3	1.2～4.0
50% Citric acid	60	2	0.03～0.62
Succinic acid	50	2	0.25～0.29
Phosphoric acid	50	2	0.18～0.25
50% H_2O_2	50	1	0.13～1.57
Formic acid	50	2	0
Acetic acid	50	2	0.12～0.85
Malonic acid	50	2	0～0.12
TFA	60	1	> 6.4
5% PAA	60	1	> 6.4

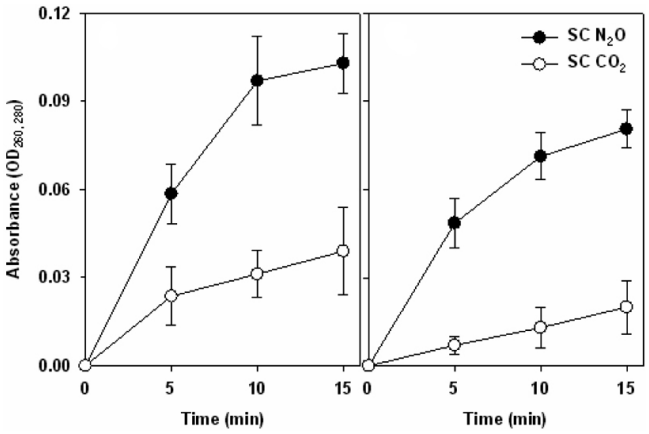


Figure 8. The absorbance of the supernatants of the *P. aeruginosa* cell suspensions at 260 nm (A) and 280 nm (B) after both SC N_2O and SC CO_2 treatment (100 bar, 37 ℃) (Reprinted with permission from [15]).

Table 2. Summary of the Physical Properties of CO_2 and N_2O (Reprinted with Permission from [15])

	M.W. (g/mol)	T_C (℃)	P_C (bar)	Solubility[a]	Diffusivity[b] (cm^2/s)	Density[c] (g/mL)	pH[d]
N_2O	44.01	36.6	72.4	3.35×10^{-4}	4.89×10^{-5}	0.732	7.2
CO_2	44.01	31.1	73.8	4.80×10^{-4}	2.47×10^{-5}	0.683	3.5

[a] The mole fraction solubility in water [46].
[b] The diffusivity achieved in the reference [13].
[c] Density at 100 bar and 37 ℃ achieved in http://webbook.nist.gov/chemistry/.
[d] The pH was measured in the suspension samples before and after SC N_2O or SC CO_2 treatments at 37 ℃ and 100 bar for 5 min.

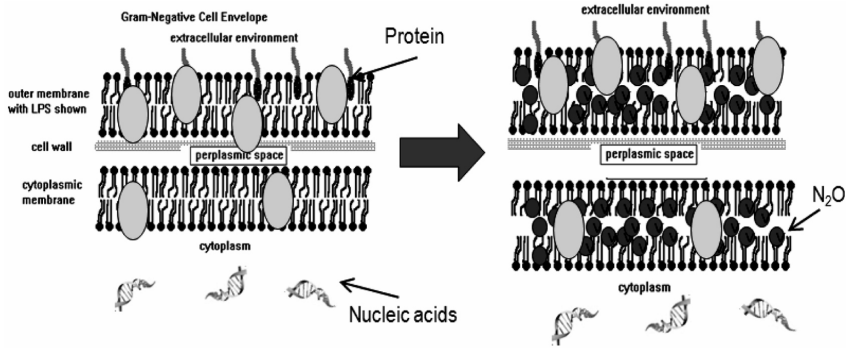


Figure 9. The concept of lipid-based theories of anesthesia with N_2O. Cell membrane before (left) and after (right) N_2O exposure.

4. 초임계 일산화이질소

일산화이질소는 이산화탄소와 분자량, 임계점 등 물리적 특성이 비슷하며 그 자체에 독성이 없어 식품 산업에서 추진제(propellant)로, 병원에서는 수술용 마취가스로 사용되고 있다. 최근 초임계 이산화탄소를 대체할 유체로 연구가 진행되고 있다.

4.1. 초임계 일산화이질소의 미생물 불활성화 특성

가압된 일산화이질소가 미생물을 불활성화 시킬 수 있다는 사실은 Enomoto 연구팀에 의해 처음으로 보고되었으며, 가압된 일산화이질소(40 bar, 40 ℃)로 약 4 h의 접촉 시간을 통해 효모균을 5 log 불활성화 시켰다[38]. 초임계 일산화이질소에 의해 미생물 불활성화는 Spilimbergo 팀에 의해 처음으로 보고되었고, 200 bar, 36 ℃ 조건에서 30 min을 접촉 시켜 4.5 log 불활성화를 얻었으며 동일한 조건의 초임계 이산화탄소에 의한 불활성화와 유사함을 보고하였다[13]. Gasperi 연구팀은 사과 주스를 대상으로 초임계 일산화이질소와 초임계 이산화탄소의 살균력 및 주스에 미치는 영향을 조사하였으며 두 유체에 의한 사과 주스의 물리·화학적 변화는 미미하며 살균력도 우수함을 보고하였다[14]. 그러나 많은 수의 초임계 이산화탄소 살균연구와 비교하여 초임계 일산화이질소 연구는 상대적으로 근래에 수행되고 있으며 초임계 이산화탄소와의 미생물 불활성화를 비교 보고하는 수준에 머물러 있다.

최근 본 연구진은 초임계 일산화이질소에 의한 미생물 불활성화 특성을 초임계 이산화탄소와 비교하여 그 차이점을 보고하였다[15]. 초임계 일산화이질소 살균의 가장 큰 특징은 초임계 이산화탄소 살균과 비교하여 처리 전후 pH 변화가 없다는 것이며, 산성화 없이 초임계 일산화이질소 자체의 높은 소수성 특성에 기인한 것으로 생각되고 있다. Table 2은 일산화이질소와 이산화탄소의 물리적 특성을 정리한 것으로 두 기체 및 초임계 유체의 물리적 성질은 매우 유사하지만 초임계 일산화이질소는 수용액 pH에 영향을 주지 않는다[15]. 그러므로 초임계 일산화이질소는 pH 변화에 민감한 식품 및 의료 재료 살균에 매우 적합하다고 할 수 있다.

4.2. 초임계 일산화이질소의 미생물 불활성화 기작

초임계 일산화이질소에 의한 미생물 불활성화 기작 연구는 거의 보고되지 않았으며 최근 *P. aeruginosa* (녹농균)을 이용한 초임계 일산화이질소 불활성화 기작 연구가 보고되었다[15]. Figure 9는 녹농균을 초임계 일산화이질소와 초임계 이산화탄소 처리 후 셀(cell) 밖으로 용출된 단백질과 핵산을 자외-가시선 분광광도계(UV-vis spectrophotometer)를 이용하여 260과 280 nm에서 측정한 결과이다. 산성화를 야기하지 않는 초임계 일산화이질소는 녹농균 불활성화 후 단백질과 핵산 등의 세균 속 구성물질이 다량 유출되는 것을 확인하였으며, 구성물질 유출이 중요한 불활성화 기작의 하나로 보고하였다. Table 3은 녹농균를 초임계 일산화이질소와 초임계 이산화탄소 처리 후 세포 속 효소 활성 변화를 API ZYM kit를 이용하여 측정한 결과이다[15]. 초임계 일산화이질소 처리 후 세균 속 중요 효소 활성도를 확인한 결과 크게 영향을 끼치지 않는 것으로 확인되었으며, 이는 기존의 초임계 이산화탄소가 급속한 산성화와 세균 속 효소 활성 저해에 의해 불활성화 되는 기작과 매우 큰 차이를 보인다.

초임계 일산화이질소에 의한 미생물 불활성화는 일산화이질소의 표준상태에서 신경세포 마취 기작을 통해 유추해 볼 수 있다. 일산화이질소에 의한 신경세포 마취 기작에 관해서 일산화이질소와 신경세포 지질층과 상호작용 이론이 잘 알려져 있다[39-41].

Figure 10은 일산화이질소에 의한 세포막 부피 팽창으로 인한 마취 기작을 보여주는 개념도이다. 소수성의 일산화이질소는 인지질로 구성된 신경 세포막과 강한 인력이 작용하여 세포막 주변으로 많이 위치하게 되고 세포막 유동성을 증가시켜 일시적 변형을 유발시킬 수 있다. 세포막 변형은 막 표면에서 이루어지는 신호전달 체계에 영향을 주어 마취 현상을 유발하는 것으로 알려져 있다. 표준상태 일산화이질소는 동물 세포 및 미생물 불활성화에 영향을 주지 않지만 2~7 bar로 가압된 조건에서는 효모 성장을 저해하며 7.5 bar 이상 압력에서는 불활성화가 일어남이 보고되었다[42]. 가압된 일산화이질소에 의한 미생물 불활성화는 표준상태에서 나타나는 일산화이질소의 세포 마취 기작이 가압된 조건에서 더욱 증대될 것으로 생각되며 특히 높은

Table 3. Activities of Various Intracellular Enzymes of *P. aeruginosa* Treated by SC N_2O and SC CO_2 (100 bar, 37 ℃). The Enzymatic Activities were Evaluated Using the API ZYM Kit (Reprinted with Permission from [15])

Enzyme	Enzymatic activity[a]					
	Control	SC N_2O			SC CO_2	
		5 min	10	15	5 min	10	15
Alkaline phosphatase	2	2	2	2	1	1	1
Esterase (C4)	4	4	4	4	4	4	4
Esterase lipase (C8)	5	4	4	4	3	3	3
Lipase	5	1	1	1	0	0	0
Leucine arylamidase	5	5	5	5	0	0	0
Valine arylamidase	2	2	2	2	0	0	0
Trypsin	2	2	1	1	0	0	0
Acid phosphatase	5	4	3	3	0	0	0
Naphthol phosphohydrolase[a]	4	3	3	3	3	3	3

[a] Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase

확산력과 용매력을 가지는 초임계 일산화이질소 조건에서 그 효과가 극대화되어 미생물 불활성화가 빠르게 이루어지는 것으로 추측되고 있다. 그러나 보다 명확한 불활성화 기작을 밝히기 위해서는 추가적인 연구가 요구된다.

5. 초임계 유체 살균기술 응용분야

초임계 유체를 이용한 미생물의 불활성화 연구는 살균 대상에 따라서 매우 다양한 분야에서 연구되어 왔다. 식품 분야에서 가장 처음 사용되었으며 지금까지 연구된 대상물로는 우유 및 포도, 사과, 오렌지, 배, 당근과 같은 주스류, 딸기 쨈, 닭고기, 쇠고기, 계란 노른자, 새우 등 매우 다양한 식품이 있으며[1], 의료분야에서는 금속 시편, 수술의복, 임플란트, 인공장기, 혈액 등에 대해서 연구되었다[2,28,43,44]. 대부분 초임계 이산화탄소를 이용한 회분식 시스템에서 수행된 사례들로 효과적으로 미생물을 살균 할 수 있음을 보여주고 있다. 반면 일본 및 유럽 일부 국가에서 쨈 생산 공정에서 초임계 이산화탄소를 이용한 상용화 사례가 있으며, 최근에는 연속식 초임계 이산화탄소 공정을 이용한 우유 살균 연구가 보고되었고 상용화를 위한 설계 연구까지 수행되었다[35].

부유세균 및 표면에 부착된 미생물 불활성화를 위해 활용된 대부분 선행연구와 달리 최근 본 연구 팀에서는 초임계 이산화탄소를 이용하여 생물막(biofilm : 미생물이 표면에 부착되고 일정농도에 도달하면 적정밀도인식을 통해 군집을 이룬 형태)을 효과적으로 제어 및 제거할 수 있음을 보고하였으며[45], 초임계 유체에 의한 생물막 제어 가능성은 더 나아가 생물막 제어가 필요한 식품, 의료 분야뿐만 아니라 막여과(membrane filtration)기술에서 가장 문제가 되고 있는 바이오파울링(bio-fouling) 문제 해결에도 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

6. 결 론

본 총설에서는 식품 및 의료 분야에서 비가열 살균기술로 활용되고 있는 초임계 유체 살균 기술에 대한 미생물 불활성화 특성 및 주요 영향 인자들에 대해서 기존 연구들을 중심으로 정리하였다. 이산화탄소와 일산화이질소를 이용한 초임계 살균 기술은 매우 우수한 미생물 불활성화 성능을 가지고 있으며, 독성 및 처리 후 잔류물질이 없는 친환경 비가열 살균기술임을 알 수 있다. 두 초임계 유체의 미생물 불활성화 특성 및 기작에는 큰 차이가 있어 살균 적용 대상체에 따라 선택적으로 사용될 수 있다. 초임계 유체의 미생물 불활성화 성능은 온도, 압력, 살균 대상, 미생물, 시스템 구성 등 매우 다양한 인자에 의해 영향을 받기 때문에 최적 살균 효과를 얻기 위해서는 이에 대한 정확한 이해가 매우 중요하다. 한편, 초임계 유체는 식품 및 의료 재료의 살균뿐만 아니라 미생물이 일으키는 생물막에 대한 불활성화 및 제거에도 매우 효과적으로 활용될 수 있다. 앞으로 다양한 분야에서 비가열 살균기술의 수요는 크게 증가될 것으로 예상되며, 초임계 유체 살균기술이 최적 기술로 널리 활용 될 것으로 기대된다. 따라서, 초임계 유체 살균기술에 대한 정확한 이해를 바탕으로 체계적인 연구가 지속되어야 할 것이다.

감 사

본 연구는 교육과학기술부가 후원하는 한국과학재단의 세계수준의 연구중심대학육성사업(WCU)으로부터 지원받아 수행되었습니다(R31-10013).

참 고 문 헌

1. L. Garcia-Gonzalez, A. H. Geeraerd, S. Spilimbergo, K. Elst, L. V. Ginneken, J. Debevere, F. Van Impe, and F. Devlieghere, *Int. J. Food Microbiol.*, **117**, 1 (2007).
2. J. Zhang, T. Davis, M. A. Matthews, M. J. Drews, M. LaBerge, and Y. H. An, *J. Supercrit. Fluids*, **38**, 354 (2006).
3. D. J. Dempsey and R. R. Thirucote, *J. Biomater. Appl.*, **3**, 454 (1989).
4. V. Premnath, W. H. Harris, M. Jasty, and E. W. Merrill, *Biomaterials*, **17**, 1741 (1996).
5. A. K. Dillow, F. Dehghani, J. S. Hrkach, N. R. Foster, and R. Langer, *Proc. Natl. Acad. Scoi.*, **96**, 10344 (1999).
6. P. A. Clapp and M. J. Davies, *Free Radic. Res.*, **21**, 147 (1994).
7. F. Devlieghere, L. Vermeiren, and J. Debevere, *Int. Dairy J.*, **14**, 273 (2004).
8. V. K. Juneja and D. W. Thayer, Irradiation and other physically based control strategies for foodborne pathogens, ed. C. L. Wilson

and S. Droby, 171, CRC Press, Boca Raton (2000).
9. S. Hong, W. Park, and Y. Pyun, *Int. J. Food Sci. Technol.*, **34**, 125 (1999).
10. S. Spilimbergo, N. Elvassore, and A. Bertucco, *J. Supercrit. Fluids*, **22**, 55 (2002).
11. F. P. Lucien and N. R. Foster, Phase behavior and solubility, ed. P. G. Jessop, W. Leitner, 37, Wiley-VCH, Weinheim (1999).
12. G. Gunes, L. K. Blum, and J. H. Hotchkiss, *J. Sci. Food Agric.,* **85**, 2362 (2005).
13. S. Spilimbergo, D. Mantoan, and A. Dalser, *J Supercrit. Fluids*, **40**, 485 (2007).
14. F. Gasperi, E. Aprea, F. Biasioli, S. Carlin, I. Endrizzi, G. Pirretti, and S. Spilimbergo, *Food Chem.*, **115**, 129 (2009).
15. S. Mun, J. S. Hahn, Y. W. Lee, and J. Yoon, *J. Int. Food Microbiol.*, **144**, 372 (2011).
16. J. Mchardy and S. P. Sawan, Supercritical fluid cleaning: Fundamentals, Technology and Applications, 5, Noyes publications, New Jersey (1998).
17. N. M. Dixon and D. B. Kell, *J. Appl. Bacteriol.*, **67**, 109 (1989).
18. D. Fraser, *Nature*, **167**, 33 (1951).
19. M. Kamihira, M. Taniguchi, and T. Kobayashi, *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 407 (1987).
20. B. Meyssami, M. O. Balaban, and A. A. Teixeira, *Biotechnol. Prog.*, **8**, 149 (1992).
21. P. Ballestra, A. A. Dasilva, and J. L. Cuq, *J. Food Sci.*, **61**, 829 (1996).
22. O. Erkmen, *Int. J. Food Microbiol.*, **65**, 131 (2001).
23. H. Lin, N. J. Cao, and L. Chen, *J. Food Sci.*, **59**, 657 (1994).
24. S. R. Kim, M. S. Rhee, B. C. Kim, H. Lee, and K. H. Kim, *J. Microbiol. Meth.*, **70**, 132 (2007).
25. S. Hong and Y. R. Pyun, *J. Food Sci.*, **64**, 728 (1999).
26. H. Lin, Z. Yang, and L. Chen, *Chem. Eng. J.*, **52**, B29 (1993).
27. J. Fages and A. Marty, *Biomaterials*, **15**, 650 (1994).
28. T. P. Castor and A. D. Lander, *Viral inactivation method*, WO Patent 93/17724 (1993).
29. F. Dehghani, N. Annabi, M. Titus, P. Valtchev, and A. Tumilar, *Biotechnol. Bioeng.*, **102**, 569 (2009).
30. H. Lin, Z. Yang, and L. Chen, *Biotechnol. Prog.*, **8**, 458 (1992).
31. J. Zhang, S. Burrows, C. Gleason, M. A. Matthews, M. J. Drews, M. LaBerge, and Y. H. H. An, *J. Microbiol. Meth.*, **66**, 479 (2006).
32. A. White, D. Burns, and T. W. Christensen, *J. Biotechnol.*, **123**, 504 (2006).
33. S. Spilimbergo and A. Bertucco, *Biotechnol. Bioeng.*, **84**, 627 (2003).
34. M. Shimoda, J. Cocunubo-Castellanos, H. Kago, M. Miyake, and Y. Osajima, *J. Appl. Microbiol.*, **91**, 306 (2001).
35. B. G. Werner and J. H. Hotchkiss, *J. Dairy Sci.*, **89**, 872 (2006).
36. M. Shimoda, Y. Yamamoto, J. Cocunubo-Castellanos, T. Kawano, H. Ishikawa, and Y. Osajima, *J. Food Sci.*, **63**, 709 (1998).
37. H. Ishikawa, M. Shimoda, H. Shiratsuchi, and Y. Osahima, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 1949 (1995).
38. A. Enomoto, K. Nakamura, K. Nagai, T. Hashimoto, and M. Hakoda, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 1133 (1997).
39. L. Udea and H. Kamaya, *Anesth. Anoalg.*, **63**, 929 (1984).
40. J. C. Gorga, J. H. Hazzard, and W. W. Caughey, *Arch. Biochem. Biophys.*, **240**, 734 (1985).
41. J. H. Hazzard, J. C. Gorga, and W. S. Caughey, *Arch. Biochem. Biophys.*, **240**, 747 (1985).
42. T. Arao, Y. Hara, Y. Suzuki, and K. Tamura, *Biosci. Biotech. Bioch.*, **69**, 1365 (2005).
43. J. Fages, B. Poirier, Y. Barbier, P. Frayssinet, M. Joffret, W. Majewski, G. Bonel, and D. Larzul, *ASAIO J.*, **44**, 289 (1998).
44. C. Cinquemani, C. Boyle, E. Bach, and E. Schollmeyer, *J. Supercrit. Fluids*, **42**, 392 (2007).
45. S. Mun, J. Jeong, J. Kim, Y. Lee, and J. Yoon, *Biofouling*, **25**, 473 (2009).
46. R. L. David, Handbook of chemical and physic, 84, 6-201, CRC Press (2003).