J. Fd Hyg. Safety 12(3), 205 - 209(1997)

알콜처리가 인삼분말에 오염된 미생물의 성장에 미치는 영향

곽이성† · 장진규 · 주종재*
*한국인삼연초연구원, *군산대학교 식품영양학과*

Effect of Alcohol Treatment on Growth of Microorganisms Contaminated in Ginseng Powders

Yi Seong Kwak†, Jin Kyu Chang and Jong Jae Choo*
Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Yuseong-ku, Taejon 305-345, Korea
**Department of Foods and Nutrition, Kunsan National University, Kunsan, Cheonbuk 573-701, Korea*

ABSTRACT — Alcohol treatment was applied to ginseng powder for the improving hygienic quality of ginseng powder. A bacterial strain designated as GT5 was isolated from ginseng powder contaminated and was identified as *Escherichia coli* species by IMVIC test method. Ethanol used as alcohol, inhibited strongly the growth of coliforms in ginseng powder at the concentrations of 50 to 90%. Ethanol treatment also decreased numbers of total bacteria at the same concentrations. There was not significant changes in saponin of ginseng powder after treated with ethanol. However, ethanol treatment caused a decrease in Hunter's color L value and an increase in a and b values of ginseng powder. As a hygienic quality control of ginseng powder, ethanol treatment could be considered as an effective means for decontaminating microorganisms in ginseng powder.

Key words □ Ginseng powder, Saponin, Ethanol, IMVIC test, *Escherichia coli*, Coliforms

인삼제품을 포함한 건조식품의 살균방법으로는 ethylene oxide(EO) 등 개스훈증법이 대부분 이용되었으나 최근에는 잔류성분, 살균효과의 불충분, 품질열화, 처리용량 부족, 2차 오염가능성, 작업자의 안전, 환경공해 등이 문제점으로 지적되면서 세계적으로 사용을 금지하는 추세에 있다.[1-5] 우리나라에서도 ethylene oxide(EO) 훈증제 처리가 향신료, 분말곡류, 건조 야채, 건조 수산물, 코코아, 인삼 등의 살균, 살충을 목적으로 사용되어왔으나 그 유해성으로 인해 인삼분말 제품에서 1991년 사용이 금지된 바 있으며[6] 의료용품, 수출용품 등 용기의 멸균에는 계속 사용되고 있다.

원료 인삼은 저장이나 장기 유통과정에서 해충, 미생물 등에 의한 생물학적 품질변화가 발생되며 인삼분말은 증기처리, 재건조, 분쇄, 포장 등 제품의 제조공정에서 미생물 오염을 수반한다. 현재 국내 인삼제품 검사기준[6]은 인삼분말의 경우 세균수는 5×10^4/g 이하, 대장균군은 음성이어야 하는 등 그 제한규정이 엄격하며 특히 나날이 그 장벽이 높아지고 있는 수입국의 품질검사 기준을 고려할 때 효과적인 살균방법의 개발과 이용은 인삼제품의 수출증대와 시장확대에 필연적으로 기여하게 될 것으로 생각된다. 따라서, 본 연구는 최근까지 사용된 ethylene oxide(EO)를 대체할 수 있는 새로운 살균방법 개발의 일환으로 알콜처리가 인삼분말의 미생물학적 안정성 및 품질안정성에 미치는 영향을 조사하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

† Author to whom correspondence should be addressed.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 인삼분말은 살균하지 않은 인삼을 분쇄하여 대장균과 일반세균을 조사한 후 오염된 시료를 실험재료로 사용하였다. Saponin 정성 및 정량에 사용된 시약류로서 TLC plate는 precoated silica gel 60 F254 plate (Merck Co., Art 5554 aluminum sheet, layer thickness 0.25 mm)을 사용하였고 발색시약인 sulfuric acid는 특급시약을, 전개용매류는 일급시약을 사용하였으며, HPLC 분석에 사용한 acetonitrile, n-butanol, 증류수는 Merck 회사의 HPLC용 용매류를 사용하였다. 인삼사포닌인 ginsenoside 표준성분은 한국인삼연초연구원에서 분리한 표준품을 TLC 확인 및 HPLC 정량용 표준품으로 사용하였다.

대장균의 순수분리

오염된 인삼분말로부터 Lactose broth 배지(beef extract 3.0 g, peptone 10.0 g, lactose 5.0 g, brome thymol blue 0.024 g per liter)를 이용한 대장균군 추정실험을 행하여 양성으로 판명된 실험구에서 대장균의 분리를 시도하였다. 먼저 대장균의 선택배지로 알려진 EMB agar(Difco co.)에 양성의 시험구를 접종하여 38°C에서 24~48시간 배양한후 colony를 생성시켰다. 생성된 colony 중에서 크기가 작고 금속광택이 있는 균을 다시 동일 배지에 도말하여 순수분리하였다.

분리균주의 생화학적 성질 조사

Indole test—Indole test[10]는 tryptophan 함유배지에 순수분리균을 접종한후 38°C, 2~4일 배양하였다. 배양액에 kovac's reagent 를 0.5~1.0 m*l* 가한후 천천히 교반하여 정치시켰다. 붉은 색의 ring을 생성시킨 것을 양성으로 변화가 없으면 음성으로 하였다.

Methyl red test—Methyl red test[10]는 MR-VP 배지에 균을 접종하여 38°C에서 2~4일 동안 배양한 후 methyl red 지시약을 3~4방울 떨어뜨려 붉은 색을 나타내는 것을 양성으로 오렌지 색을 나타내는 것을 음성으로 하였다.

Voges-Proskauer test—Voges-Proskauer test[10]는 MR-VP 배지에 균을 접종하여 38°C에서 2~4일 동안 배양한 후 배양액에 barritt's reagent B를 10방울 정도 넣고 20초 동안 흔들었다. 1시간 내지 2시간동안 방치후 배양액이 분홍색으로 변화하는 것을 양성으로 변화가 없는 것을 음성으로 표시하였다.

Citrate test—Citrate test[10]는 Simmon's citrate agar에 균을 접종하여 38°C에서 2~4일 동안 배양한 후 배지의 색이 청색이면 양성으로 녹색이면 음성으로 표시하였다.

대장균의 접종

오염 인삼분말에서 분리된 순수분리균 GT5를 Lactose broth 배지에서 38°C, 2일 동안 배양한 후 인삼분말에 접종하였다. 접종은 인삼분말에 고르게 분산되도록 균액을 분무하여 접종하였다.

에탄올 처리

에탄올을 30~90% 농도범위로 인삼분말에 처리하였다. 즉, 100 g 인삼분말에 에탄올을 15%(v/w)가수하여 믹서(Food Mixer, Hanil FM-700W)로 5분 혼합한후 식품저장용 지퍼백(polyethylene, thickness 25 μm)으로 포장하여 38°C 배양기에 저장하였다. 살균효과는 저장하면서 경시적 시간경과에 따른 대장균의 유무 및 세균수를 측정함으로써 조사하였다.

미생물 시험

세균은 APHA 표준방법[7]에 따라 plate count agar(Difco Co.)를 사용하여 38°C에서 1~2일 배양한 후 발생한 콜로니를 계수하였다. 대장균군은 lactose broth 배지를 사용하여 38°C에서 2일 배양한 후 가스 발생구를 대장균군 양성으로 표시하였다. 또한 대장균은 EMB agar(Difco Co.)를 이용한 pour plate method[8]로 38°C에서 2일간 배양한 후 발생한 콜로니의 형태학적 특성을 조사하였다.

이화학적 특성시험

색도 측정—알콜처리한 시료를 standard sieve(분석용 70 mesh, 0.21 mm)로 여과한 후 color difference meter (Chromameter Minolta CR-200)를 이용하여 색도를 측정하였다. 색도는 L=97.67, a=-0.57, b=+2.70인 백색판을 표준값으로 하여 L값(명도)은 0(검정색)에서 100(흰색)까지, a값(적색도)은 -60(녹색)에서 +60(적색)까지, b값(황색도)은 -60(청색)에서 +60(황색)까지 각각의 색도를 측정하였다.

사포닌 분석—시료 일정량을 둥근 플라스크에 취하고 10배량의 80% ethanol을 가하여 75~80°C의 water bath에서 5시간씩 3회 반복 추출하였다. 상기 추출액은 곽 등[9]의 방법에 따라 수포화 n-butanol 추출법으로 추출분획 후 농축된 조사포닌을 5% 메탄올 용액(v/w)이 되도록 메탄올에 용해시켜 검액으로 하였으며 silica gel TLC 판에 5 μ*l*씩 점적하여 chloroform/methanol/water(65 : 35 : 10, lower phase)로 전개한 후 30% 황산시액을 분무하여 110°C에서 5분간 발색시켜 확인 하였다. HPLC분석은 Lichrosorb-NH_2 column(Merck, 10 μm, ID 0.46 cm×25 cm)에 acetonitrile/water/n-butanol(80 : 20 : 0.25)을 이동상으로 하여 differential refractometer(RI 401) 검출기로 검출 정량하였다.

결과 및 고찰

순수분리균의 배양학적 특성

오염된 인삼분말로 부터 분리된 순수분리균 GT5는 EMB agar상에서 38°C, 2일 동안 배양하였을때 크기가 2~3 mm 이었고 금속광택성(green metallic sheen)을 나타내었으며 중심부는 dark green 색을 나타내었다(Figure not shown).

순수분리균의 생화학적 실험

IMViC test는 대장균 및 그와 관련이 있는 몇 종류의 세균들을 판별하는데 이용되고 있는 생화학적 실험이다.[10] IMViC test는 Indole 생성의 유무를 판별하는 indole test와 유기산 생성유무를 알아보는 methyl red 실험 및 2,3-butanediol의 생성여부를 조사하는 voges-proskauer test 및 ci-

Table 1. Biochemical tests of isolated strain GT5

	Indole test	Methyl red test	V-P test*	Citrate test
E. coli[10]	+	+	-	-
A. aerogenes[10]	-	-	+	+
Isolate GT5	+	+	-	-

*V-P test: voges-proskauer test

trate 이용 유무를 판별하는 citrate test 등으로 구성되어있다. Table 1에 나타낸바와 같이 분리균 GT5는 IMViC test를 행한 결과 대장균과 매우 유사하다고 알려진 *Aerobacter aerogenes*와는 달리 *Escherichia coli*와 동일한 결과를 나타내어 *E. coli*의 유연균주로 생각된다.

알콜 첨가량 결정

인삼분말 제품은 제조공정에서 높은 미생물 오염이 문제점으로 지적되고 있어 미생물학적 품질관리가 무엇보다도 중요한 요소가 되고 있다. 오염된 인삼분말의 살균에 적당한 알콜첨가량을 결정하기 위하여 인삼분말에 5~30%(v/w) 범위의 에탄올을 인삼분말과 혼합하여 그 특성을 살펴보았다. 에탄올을 5~10%(v/w)로 소량 첨가하였을 때에는 분말과 에탄올의 혼합이 불량하였다. 또한 25~30%(v/w)로 비교적 과량의 에탄올을 첨가하였을 때에도 분말이 죽 상태로 변하는 등 분말의 혼합적성이 열악하였다. 그러나 에탄올은 15~20%(v/w) 첨가하였을 때에는 덩어리가 형성되거나 분말이 죽 상태로 변하는 등의 물성변화 없이 분말과 알콜이 잘 혼합되어 인삼분말의 혼합적성이 가장 양호한 것으로 생각된다.

살균에 미치는 최적 알콜농도

Table 2는 30~90% 농도의 에탄올을 인삼분말에 처리하여 그 살균효과를 조사한 결과이다. Table 2에 나타낸 바와 같이 50~90% 농도의 에탄올 처리시 대장균군은 양성에서 모두 음성으로 변화하였다. 또한 50~90%의 에탄올 처리시에는 세균수에도 영향을 미치어 분말의 초기 세균수 2900/g은 50% 에탄올 처리시 1600/g으로 감소하였으며 70% 이상의 농도에서는 1100/g 이하로 감소하였다. 따라서 50~90%의 에탄올은 인삼분말에 오염된 대장균군의 생육을 뚜렷이 억제시키는 것으로 생각되며 낮은 정도이지만 세균의 생육에도 영향을 미치는 것으로 생각된다. 따라서 인삼분말에 오염된 미생물의 살균에 유효한 에탄올 농도는 50~90%로 생각된다. 이 농도들 중에서 미생물의 살균에 유효한 농도는 에탄올 농도는 80 및 90%이었지만 인삼분말에 처리시의 경제적인 측면 등을 고려할 때 최적인 알콜농도는 80%로 설정하여 실험을 진행하였다.

Table 2. Effect of ethanol on the microbial growth in ginseng powders (unit: CFU/g)

Ethanol (%)[1]	Coliforms[2]	Total bacteria
None	+	2900
30	+	2800
40	+	2500
50	-	1600
60	-	1300
70	-	1100
80	-	1020
90	-	1010

[1] Ethanol amount is 15% (v/w)
[2] +: positive, -: negative

미생물의 경시적 변화

알콜로 처리한 오염된 인삼분말 시료를 식품포장용 지퍼백으로 포장하여 38°C에 저장하면서 대장균군 및 세균의 경시적 변화를 조사하였다(Table 3). Table 3에 나타낸 바와 같이 80% 에탄올을 처리하였을 때 대장균군은 음성으로 대장균은 사멸된 것으로 생각된다. 또한 알콜로 처리된 시료를 대장균 및 세균의 생육 적온인 38°C에서 1일, 2일, 30일간 각각 저장한 후 조사한 결과도 대장균은 음성으로 나타나서 인삼분말에 오염된 대장균은 알콜처리로 완전히 사멸된 것으로 생각된다. 그러나 저장시간 경과에 따라 총 세균수는 처리직후의 1000/g에서 2000/g으로 약간 증가하는 경향을 나타내었다.

알콜이 인삼분말의 색도에 미치는 영향

인삼제품의 색도는 제품의 품질을 결정하는 중요한 요소이다. 일반적으로 ethylene oxide, 감마선 조사 및 microwave 처리시 식품의 외관적 품질에 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다.[2]

Table 4는 에탄올을 처리한 인삼분말의 색도 변화를 나타낸 것이다. Table 4에 나타낸 바와 같이 L값(명도)은 무처

Table 3. Effects of ethanol on the microbial growth in ginseng powders stored at 38°C

(unit: CFU/g)

Ethanol (%)	Microorganism	Storage periods (days)			
		0	1	2	30
None	Coliforms[1]	+	+	+	+
	Total bacteria	3000	3200	3500	5700
80	Coliforms[1]	-	-	-	-
	Total bacteria	1000	1200	1600	2000

[1] +: positive, -: negative

Table 4. Hunter color value of ginseng powders treated with ethanol

Ethanol (%)	Color value		
	L[1)]	a[1)]	b[1)]
None	84.25	+2.32	+21.70
50	71.59	+6.91	+33.53
60	72.59	+6.10	+33.05
70	75.75	+5.75	+32.33
80	77.70	+5.15	+31.06
90	79.90	+4.22	+28.23

[1)]Each value is the average of triplicate determinations.

리구의 84.25에서 80% 에탄올 처리시 77.70으로 감소하였지만 a값(적색도)은 무처리구 +2.32에서 80% 에탄올 처리시 +5.15로 증가하였고 b값(황색도)도 무처리구의 +21.70에서 80% 에탄올 처리시 +31.06으로 감소하였다. 또한 색도의 변화는 에탄올 처리농도가 증가할수록 L값은 증가하지만 a값 및 b값은 감소하는 경향을 나타내었다.

알콜이 인삼분말의 사포닌 및 물성변화에 미치는 영향

에탄올 농도별로 처리된 인삼분말에서 인삼의 유효성분중의 하나인 사포닌 성분의 조성패턴을 Fig. 1에 나타내었다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 에탄올농도에 따른 사포닌성분의 변화는 관찰되지 않았다. 또한 에탄올 농도별 수분함량 및 사포닌 성분의 변화를 Table 5에 나타내었다. Table 5에 나타낸 바와같이 수분함량은 무처리구의 2.75%에서 50~90% 에탄올 처리시 13.01~17.09%로 현행 수분함량 규정(9% 이하)[6]보다 증가하였다. 그러나 조사포닌 함량(n-butanol ext.)은 에탄올 처리시 5.09~6.10%로 무처리구 5.09%와 비교해서 큰 차이가 없었고 주종사포닌 성분인 ginsenoside -Rg1, -Re, -Rd, -Rc, -Rb2, -Rb1 함량도 거의 변화가 없었다. 이러한 사실로 부터 에탄올을 50~90% 농도로 단시간(5분) 처리할 때에는 인삼분말의 사포닌은 알콜에 의한 영향을 거의 받지 않고 안정한 것으로 생각된다.

한편 15%(v/w)로 80% 에탄올을 처리하면 인삼분말의 수분은 13.7%로 현행 수분함량 기준(9% 이하)보다 증가하였고 38°C에서 1개월 저장하는 동안에 분말이 조금씩 단단해지는 등 물성변화가 관찰되었다. 따라서 알콜 살균방법은 완제품 인삼분말 보다는 인삼분말을 중간원료로 사용하는 타브렛(tablet) 등의 제품에 적용하면 가능성이 충분 할 것으로 생각된다. 그러나 알콜을 이용한 이러한 살균방법은 인삼분말 내의 알콜의 잔존 유무 조사 및 저장 기간 연장시의 분말의 물성변화 등 부가적인 실험이 필요할 것으로 생각된다.

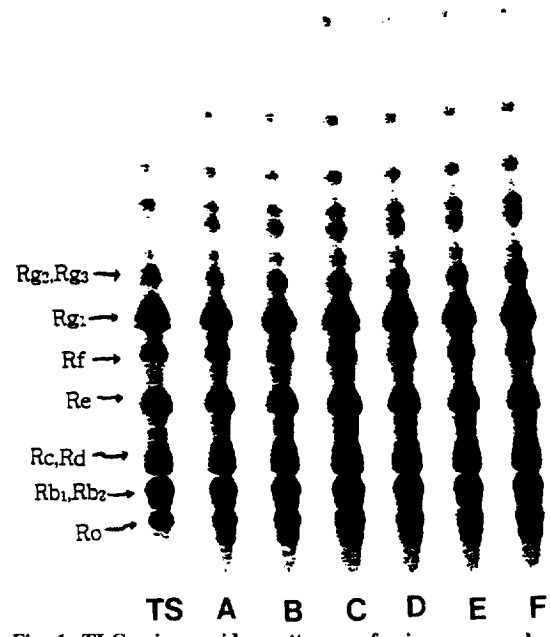

Fig. 1. TLC ginsenoside patterns of ginseng powders treated with ethanol.
*TS : Total saponin, A : Control, B : Ginseng powder treated with 50% ethanol, C : Ginseng powder treated with 60% ethanol, D : Ginseng powder treated with 70% ethanol, E : Ginseng powder treated with 80% ethanol, F : Ginseng powder treated with 90% ethanol

Table 5. Changes in contents of moisture, crude saponin and major ginsenosides in ginseng powders treated ethanol

Ethanol Conc. (%)	Moisture Content (%)	Crude[1)] Saponin (%)	Ginsenoside[1)]						
			Rg1	Re	Rd	Rc	Rb2	Rb1	Total
None	2.75	5.90	0.29	0.23	0.08	0.36	0.21	0.40	1.57
50	17.09	6.10	0.30	0.23	0.09	0.39	0.24	0.41	1.66
60	14.16	5.90	0.30	0.23	0.12	0.39	0.22	0.40	1.66
70	14.02	6.00	0.28	0.23	0.08	0.34	0.21	0.39	1.53
80	13.17	5.90	0.27	0.21	0.08	0.30	0.19	0.36	1.41
90	13.01	6.00	0.29	0.23	0.08	0.19	0.15	0.40	1.34

[1)]Content is calculated by dry base weight of ginseng powders

국문 요약

오염된 인삼분말로 부터 분리된 세균 GT5는 IMVIC test 방법에 의해 동정한 결과 *Escherichia coli* 유연 균주로 확인되었다. 알콜이 인삼분말에 오염된 대장균군의 생육에 미치는 영향을 조사하기 위하여 GT5 균주의 배양액을 인삼분말에 접종한 후 각각의 농도별로 알콜을 처리한 결과 50~90% 농도의 에탄올은 대장균군의 생육을 완전히 억제하였고 세균의 생육도 약간 저해하였다. 미생물에 오염된 인삼분말 시료에 80% 에탄올을 15%(v/w) 첨가하여 10분간 혼합한 후 미생물학적 품질안정성을 조사한 결과 대장균의 생육은 완전히 억제되었고 세균수도 2900/g에서 1020/g으로 감소되었다. 에탄올을 처리한 인삼분말 시료를 38°C에서 30일 동안 저장하면서 미생물을 조사한 결과 대장균군의 생육은 인정되지 않아서 대장균은 완전히 사멸된 것으로 생각되나 세균수는 처리직후의 1000/g에서 2000/g으로 약간 증가하는 경향이었다. 80% 에탄올 처리시 수분함량은 13.17%로 현행 분말의 수분함량 규정(9% 이하)보다 높았고 분말의 색도도 변화하였다. 즉, L값(명도)은 비처리구의 84.25에서 77.70으로 감소하였지만 a값(적색도)은 +2.32 에서 +5.15로 증가하였고 b값(황색도)도 +21.70에서 +31.06으로 증가하였다. 그러나 에탄올 농도에 따른 사포닌 성분의 조성 패턴은 변화가 없었고 주종 사포닌인 ginsenoside -Rg1, -Re, -Rd, -Rc, -Rb2, -Rb1 함량도 거의 변화가 없었다.

참고문헌

1. Wesley, F., Rourke, B. and Darbishire, O.: The formation of persistent toxic chlorohydrins in foodstuffs by fumigation with ethylene oxide and with propylene oxide, *J. Food Sci.*, **30**, 1037 (1965).
2. Vajdi, M. and Pereira, R.R.: Comparative effects of ethylene oxide, γ-irradiation and microwave treatments on selected spices, *J. Food Sci.*, **38**, 893 (1973).
3. WHO: Ethylene oxide, Environmental Health Criteria, 55 (1985).
4. Rajendran, S. and Muthu, M.: Detection of acrylonitrile and ethylene oxide in air and fumigated foodstuffs, *Bull Environm. Contam. Toxicol.*, **27**, 426 (1981).
5. Anon: Position paper. FAO/IAEA/WHO/ITC-UNC-TAD/GATT International Conference on the Acceptance, Control of and Trade in Irradiated Food. *Food Irradiation Newsletter*, **11**(2), 34 (1987).
6. 한국식품공업협회: 식품공전, p.511 (1994).
7. APHA: Compendium of methods for the microbiological examination of foods, M. specks (ed.), American Public Health Association, Washington, D.C. (1976).
8. Harrigan, W.F. and McCance, M.C.: Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology, Academic Press, London (1976).
9. 곽이성, 노길봉, 장진규, 최강주: 오존처리가 인삼분말에 오염시킨 미생물의 생육에 미치는 영향, 한국식품위생·안전성학회지, **10**, 45 (1995).
10. Collins, C.H. and Lyne, P.M.: Microbiological Methods (Fifth edition), Butterworth and Co Ltd., pp. 281-286 (1984).