J. Fd Hyg. Safety 11(3), 197 - 201(1996)

감마선 조사에 의한 유포자 세균의 불활성화

변명우† · 권오진 · 육홍선
한국원자력연구소 방사선 식품공학연구실

Inactivation of Spore-Forming Bacteria by Gamma Irradiation

Myung-Woo Byun†, Oh-Jin Kwon, Hong-Sun Yook
Department of Food Irradiation, Korea Atomic Energy Research Institute, Yusung P.O. Box 105, Taejon 305-353, Korea

ABSTRACT — D_{10} values obtained for radiation alone in *Bacillus subtilis* and *Clostridium perfrigenes* were 0.35~0.48 kGy in vegetative cells, and 2~2.08 kGy in spores, respectively. Irradiation dose of 24 kGy completely inhibited spores. In the case of heat treatment, $D_{50,60}$ values ranged from 10 to 14 minutes in vegetative cells, and $D_{70,80,90}$ values ranged from 10 to 140 minutes in spores. In the case of combined treatment with heat and radiation, D_{10} values ranged from 1 to 1.25 kGy in vegetative cells, and from 3.42 to 3.61 kGy in spores. Thus, resistance of cells to gamma radiation did not seem to be influenced by pre-heating.

Key words □ Gamma irradiation, Heat, Combination, D_{10} value, Spore, *Bacillus subtilis, Clostridium perfrigenes*

식품에 대한 방사선조사, 즉 식품조사는 현재 식품공업에 이용되고 있는 어떠한 저장, 가공방법보다도 국제적으로 50여년 동안 체계적으로 연구되고 있고[1-6] 그 결과 식품조사 기술은 80년대 접어들면서 국제기구(FAO/IAEA/WHO), 보건기관(US FDA) 및 Codex 식품규격위원회 등의 안전성에 대한 과학적 뒷받침과 세계적인 필요성의 인식으로 선진 여러나라의 주도에 의해 실용화되고 있다.[7-10] 국내에서도 87년 이후 13개 식품품목군에 대한 방사선조사 허가를 보건복지부로부터 취득하여 현재 식품류의 상업적 방사선조사가 행해지고 있다.[10,11] 최근 식품의 살균에 사용되는 보존제나 훈증처리는 유해성분의 생성 및 잔류로 발암성 등 건강장해를 일으킬 수 있기 때문에 그 사용이 세계적으로 점차 금지되거나 제한되는 실정이므로 위생적 품질관리가 절대적으로 요구되는 가공식품의 대량생산체재에서 현실적으로 이들 식품에 적합한 살균방법이 미비한 상황이므로 식품산업에서 방사선조사 기술의 실용화 잠재력은 크게 기대된다 하겠다.[12,13] 식품저장에 중요한 미생물의 방사선 저항성은 식품과 미생물의 종류 및 조사조건에 따라 다르므로 살균목적에 따라 방사선 조사선량을 조절하여야 한다. 특히 유포자 세균의 완전살균은 무포자세균의 살균보다 고선량의 방사선을 조사시켜야 하므로 실제 식품에서는 낮은 조사선량으로 살균할 수 있는 효과적인 방법, 즉 유포자 세균의 방사선 감수성을 증가시키는 방법을 모색하게 되었다.[14-18]

따라서 본 연구에서는 방사성 저항성이 매우 큰 유포자 세균에 감마선을 조사하여 그들의 방사선 감수성을 조사하고 감마선 조사에 가열처리를 병용하여 방사선 감수성에 미치는 효과를 시험하였다.

재료 및 방법

공시균주 및 배지

본 시험에 사용한 균주는 한국미생물보존센터에서 분양받은 유포자 세균인 *Bacillus subtilis*(ATCC 6633)와 *Clostridium perfringenes*(ATCC 13124)를 사용하였으며 배지는 Nutrient broth(NB, Difco)와 여기에 1.5%의 Bacto-agar(NA, Difco)를 첨가하여 사면 및 평판배지로 하였다.

균주의 배양과 현탁액의 조제

영양세포 — *B. subtilis*와 *C. perfringenes*를 NA 사면배지에서 24시간 수회 계대배양한 후, 이것을 NB 100 m*l*에 1 백

† Author to whom correspondence should be addressed.

금이를 접종하여 *B. subtilis*는 30°C에서, *C. perfringenes*는 37°C에서 각각 24시간 진탕배양(120 rpm)한 다음 이 현탁액 1 m*l*를 다시 새로운 100 m*l*의 액체배지에 접종하고 8시간 진탕배양시켜 대수기의 영양세포를 얻었다. 이 영양세포 현탁액을 4°C에서 10분간 원심분리(9,000×g)하여 얻은 균체를 냉 0.1 M phosphate buffer(pH 6.5)로 2회 세척, 재원심분리하여 최종 영양세포의 농도가 완충액 1 m*l* 당 10^7~10^9 개가 되도록 조절하였다. 이때 *C. perfringenes*은 gaspak jar에서 혐기배양하였다.

휴면포자—공시균주를 NB 100 m*l*에서 24시간 진탕배양하여 얻은 현탁액 3 m*l*를 100 m*l*의 동일배지에 각각 접종하여 30°C와 37°C에서 1~2주간 정치배양하였다. 이와같이 형성된 포자를 냉 0.1 M phosphate buffer를 써서 수집하고 10분간 원심분리(9,000×g)한 다음 세척하고 lysozyme(1 mg/m*l*)을 넣어 각각의 온도에서 배양하고 다시 최종농도가 1% 되게 SDS를 첨가하여 30분간 배양, 원심분리하여 정제된 포자를 얻었다. 정제된 포자는 냉 0.1 M phosphate buffer에 현탁시켜 포자의 농도가 1 m*l*당 10^6~10^7개가 되도록 조절하였다.

방사선 조사

공시균주의 영양세포 및 포자 현탁액 2.0 m*l*를 멸균시험관(1.0×10 cm)에 넣고 감마선 처리 후 균 현탁액을 냉 0.1 M phosphate buffer로 적절히 희석하여 NA 배지가 들어 있는 petri dish에 0.2 m*l*씩 접종하여 spreader로 도말하여 각각의 온도에서 배양한 후에 형성된 집락을 계수하였다. 방사선 조사는 선원 10만 Ci, ^{60}Co 감마선 조사시설을 이용하여 분당 71.5 Gy의 선량율로 영양세포는 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 kGy를 조사하였고 포자는 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 kGy를 각각 조사하였다.

가열처리

가열처리는 균 현탁액 2 m*l*를 멸균시험관(∅1.0×10 cm)에 넣어 영양세포는 50°C, 60±0.2°C의 항온수조에서 5분, 10분, 20분, 30분간 처리하였고 포자는 70°C, 80°C, 90±0.2°C의 항온수조에서 10분, 20분, 30분간 처리하여 상기와 같은 방법으로 형성된 집락을 계수하였다.

가열과 방사선의 병용처리

가열과 방사선의 병용처리 효과를 조사하기 위하여 각각의 영양세포 혹은 포자 현탁액 2.0 m*l*를 멸균시험관(∅1.0×10 cm)에 넣고 영양세포는 50°C에서, 포자는 70°C에서 각각 10분간 열처리한 다음 각각의 선량율로 감마선을 조사하고 동일한 방법으로 형성된 집락을 계수하였다.

결과 및 고찰

방사선 조사의 효과

*B. subtilis*와 *C. perfringenes*의 영양세포 및 포자의 방사선 감수성은 Fig. 1의 생존곡선과 이들 생존 곡선으로 부터 D_{10} 값, 12 D_{10} 값과 3 kGy, 5 kGy 및 7 kGy에서의 불활성화 계수(n)를 계산하여 Table 1과 같은 결과를 얻었다. *B. subtilis*와 *C. perfringenes*의 유도선량(I)은 Fig. 1에서 보는 바와 같이 무시될 정도였으며 D_{10} 값으로 나타낸 방사선 감수성은 영양세포가 *B. subtilis*는 0.35 kGy, *C. perfringenes*는 0.48 kGy 이였으며, 포자의 경우는 2.00 kGy와 2.08 kGy로 각각 나타났으며 포자를 완전살균하는데 24 kGy 내외의 높은 선량이 요구되었다. 그러나 이 균주들의 영양세

Table 1. Radiosensitivity of the selected spore-forming bacteria

Strain	Growth phase	D_{10} value (kGy)	$12D_{10}$ (kGy)	Inactivation factor 3 kGy	5 kGy	7 kGy
Bacillus subtilis	Log. phase cell	0.48	5.76	6.25	10.42	14.58
	Spore	2.00	24.00	1.50	2.50	3.50
Clostridium perfringenes	Log. phase cell	0.35	4.20	8.57	14.28	20.00
	Spore	2.08	24.96	1.44	2.40	3.36

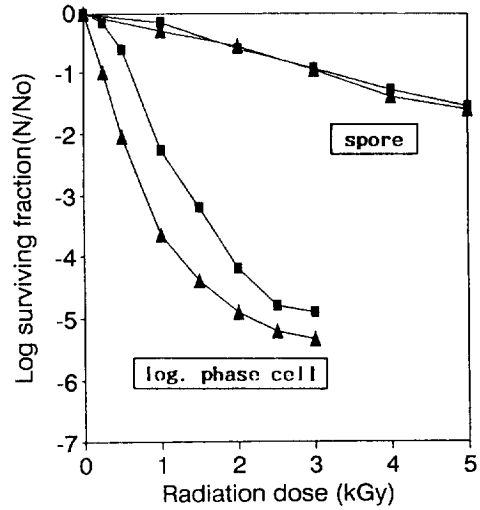

Fig. 1. Radiation survival curves of the selected spore-forming bacteria.
■-■: *B. subtilis* ▲-▲: *C. perfringenes*

포는 4~5 kGy의 조사선량으로 대부분이 살균가능 하였다. 岡[9]은 *C. botulinum* 포자의 D_{10} 값이 3.3 kGy, *B. subtilis*가 2~2.5 kGy으로, Monk 등[13]은 *B. cereus* 포자의 D_{10} 값이 2.5~4.0 kGy로 각각 보고하여 본 실험의 결과와 유사하였다. 불활성화 계수에 있어서 포자는 7 kGy의 선량으로 3 log cycles 정도로 균수를 감소시켰으나 영양세포는 3 kGy의 조사로서도 6~8 log cycles 정도의 균수가 감소될 것으로 생각된다. 이러한 결과는 국제적으로 건전성이 공인된 10 kGy 이내의 조사선량에서의 포자형성 세균의 완전살균은 불가능함으로서 낮은 조사선량으로 살균할 수 있는 효과적인 방법, 즉 미생물의 방사선 감수성을 증가시키는 방법의 모색이 필요하다고 하겠다.

가열처리 효과

Fig. 2는 *B. subtilis*와 *C. perfringenes*를 가열처리 후 생존곡선을 나타낸 것으로 이들 곡선으로부터 얻어진 $D_{(min)}$ 값은 Table 2와 같다. 공시균주의 영양세포의 $D_{50\cdot C}$ 값은 14분, 60°C에서 10분 정도로 *B. subtilis*와 *C. perfringenes*가 비슷하게 나타났으며 포자는 90°C까지 처리한 온도에서 D 값은 *B. subtilis*가 58.8~88.97분으로, *C. perfringenes*가 93.50~138.74분으로 각각 나타나 포자의 열저항성이 매우 높았다. Fernandez 등[19]은 *B. stearothermophilus*의 포자의 D_{115} 값이 22.4분, D_{121} 값이 3.1분으로 보고하였다.

가열과 방사선 조사의 병용처리 효과

방사선의 살균작용에 대한 상승효과, 즉 가열처리와 방사선 조사를 병용하면 비교적 낮은 온도, 저선량의 방사선 조사로서 목적하는 바 살균효과를 기대할 수 있으므로 방사선 조사전 가열처리 방법을 이용하였다. Fig. 3과 Table 3은 유포자 세균을 불활성화 하기 위한 가열과 방사선 조사와의 병용처리 효과를 나타낸 것이다. D_{10} 값으로 본 방사선 감수

Table 2. Heat sensitivity of the selected spore-forming bacteria

Temperature (°C)	D value (min)			
	Bacillus subtilis		*Clostridium perfringenes*	
	Log. phase cell	Spore	Log. phase cell	Spore
50	14.06		14.32	
60	11.10		10.73	
70		88.97		138.74
80		76.15		108.58
90		58.81		93.50

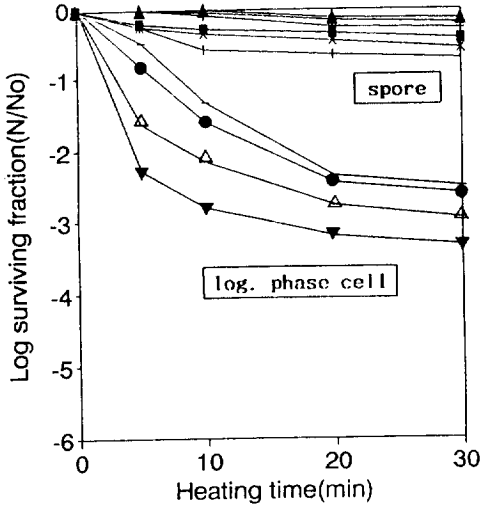

Fig. 2. Heat survival curves of the selected spore-forming bacteria.

●-●: *B. subtilis*(50°C) - - -: *C. perfringenes*(50°C)
△-△: *B. subtilis*(60°C) ▼-▼: *C. perfringenes*(60°C)
▲-▲: *B. subtilis*(70°C) ■-■: *C. perfringenes*(70°C)
+-+: *B. subtilis*(80°C) ×-×: *C. perfringenes*(80°C)
-: *B. subtilis*(90°C) □-□: *C. perfringenes*(90°C)

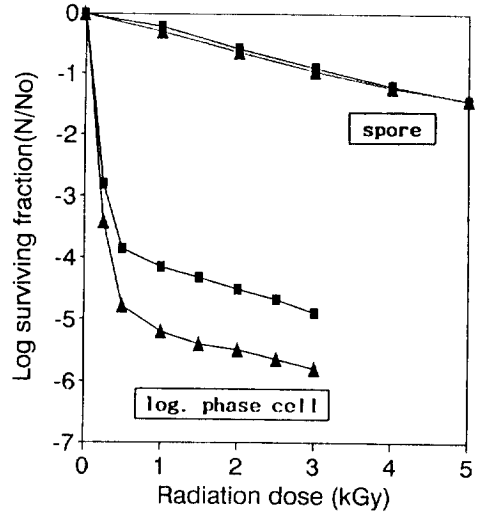

Fig. 3. Survival curves of the selected spore-forming bacteria by the combined treatment of heat and radiation.

■ - ■: *B. subtilis* ▲ - ▲: *C. perfringenes*
Heat treatment: vegetative cells; 10 minutes at 50°C, spores; 10 minutes at 70°C.

Table 3. Combined effect of heat and radiation on the inactivation of the selected spore-forming bacteria

Strain	Growth phase	D_{10} value (kGy)	$12D_{10}$ (kGy)	Inactivation factor		
				3 kGy	5 kGy	7 kGy
Bacillus subtilis	Log. phase cell	1.00	12.00	3.00	5.00	7.00
	Spore	3.42	41.04	0.88	1.46	2.05
Clostridium perfringenes	Log. phase cell	1.25	15.00	2.40	4.00	5.60
	Spore	3.61	43.32	0.83	1.38	1.94

Heat treatment: Log. phase cell; 10 min at 50°C, Spore; 10 min at 70°C.

성은 영양세포가 1.00~1.25 kGy, 포자가 3.42~3.61 kGy로 나타났으며 이는 단독처리시의 각각 0.35~0.48 kGy, 2.00~2.08 kGy인 것과 비교해 볼때 D_{10} 값이 오히려 증가하여 가열이 방사선의 살균작용을 저해하는 효과를 가져 왔다. 불활성화 계수에 있어서도 7 kGy의 조사로서 영양세포를 5~7 log cycles 정도 감소시켜 단독처리시의 3 kGy에서의 조사시의 6~8 log cycles과 유사하게 나타났다. 이와같은 결과는 최[20]의 *B. megaterium*의 영양세포와 포자가 가열후 조사로서 상승효과가 전혀 없었다고 보고한 결과와 유사하였으며, 저자 등[21]의 김치발효관련 젖산균에서는 가열과 방사선 조사 병용처리가 상승효과를 가져왔고, ***Salmonella*** sp.를 비롯한 식품위생관련 무포자 세균의 경우에도 병용처리가 살균작용의 상승효과를 나타내었다.

국문요약

*Bacillus subtilis*와 *Clostridium perfringenes*의 D_{10} 값으로 나타낸 방사선 감수성은 영양세포가 0.35~0.48 kGy, 휴면포자가 2.00~2.08 kGy로 나타났으며 포자를 완전살균하는데 24 kGy 내외의 높은 선량이 필요하였다. 가열 단독처리시의 D_{min} 값은 영양세포($D_{50,60}$)가 10~14분, 포자($D_{70,80,90}$)가 60~140분 정도로 각각 나타났다. 가열과 방사선과의 병용처리시의 D_{10} 값은 영양세포가 1.00~1.25 kGy, 포자가 3.42~3.61 kGy로 나타났으며 단독처리시와 비교해 볼때 D_{10} 값이 오히려 증가하여 가열처리는 방사선의 살균작용에 영향을 주지 못하였다.

참고문헌

1. Welch, A. B., and R. B. Maxcy: Characterization of radiation-resistant vegetative bacteria in beef, *Appl. Microbiol.*, **30**, 242-250(1975).
2. Katusin-Razem, B., D. Razem, S. Matic, V. Mihokovic, N. Kostromin-Soons, and N. Milanovic: Chemical and organoleptic properties of irradiated dried whole egg and egg yolk, *J. Food Prot.*, **52**, 781-786(1989).
3. Ahmed, N. M., D. E. Conner, and D. L. Huffman: Heat-resistance of *Escherichia coli* O157:H7 in meat and poultry as affected by product composition, *J. Food Sci.*, **60**, 606-610(1995).
4. Poole, S. E., G. E. Mitchell, and J. L. Mayze: Low dose irradiation affects microbiological and sensory quality of sub-tropical seafood, *J. Food Sci.*, **59**, 85-87(1994).
5. Thayer, D. W., and G. Boyd: Radiation sensitivity of *Listeria monocytogenes* on beef as affected by temperature, *J. Food Sci.*, **60**, 237-240(1995).
6. Howard, L. R., G. H. Miller, JR., and A. B. Wagner: Microbiological, and Chemical, and sensory changes in irradiated *pico de Gallo*, *J. Food Sci.*, **60**, 461-464(1995).
7. Singh, H., I. George, and K. Mehta: ***Salmonella*** and spoilage bacteria in chicken parts: Irradiation with low energy electrons, Isotopes and Radiation Technology in Industry, pp. 153-168(1994).
8. WHO: Wholesomeness of irradiated food. Report of a joint FAO/IAEA/WHO export committee on the wholesomeness of irradiated food. Technical Report Series-659, 34(1981).
9. 岡 充: 食品 の 放射線 殺菌, 食衛誌, **11**, 229-237(1970).
10. 변명우: 식품의 방사선조사 연구 및 실용화, 원자력산업, **15**, 66-73 (1995).
11. 변명우: 식품산업에서의 원자력 기술의 이용, 동위원소회보, **9**, 32-37(1994).
12. 伊藤 均: 食品保藏, 殺菌への 放射線利用, *New Food Industry*, **28**, 17-22(1986).
13. Monk, J. D., L. R. Beuchat, and M. P. Doyle: Irradiation inactivation of food-borne microorganism, *J. Food Prot.*, **58**, 197-208(1995).
14. Hadden, C. T.: Postirradiation recovery dependent on the *uvr-1* locus in *Bacillus subtilis*, *J. Bacteriol.*, **128**, 317-

324(1976).

15. Adams, D. M.: Heat injury of bacterial spores, *Adv. Appl. Microbiol.*, **23**, 245-261(1978).
16. Condon, S., and F. J. Sala: Heat resistance of *Bacillus subtilis* in buffer and foods of different pH, *J. Food Prot.*, **55**, 605~608(1992).
17. Kim, J., and H. B. Naylor: Spore production by *Bacillus stearothermophilus*, *Appl. Microbiol.*, **14**, 690~691(1966).
18. Bergere, J. L.: Spore formation and germination of *Bacillus cereus*; The spore cycle, *Bulletin of the international Dairy Federation*, **275**, 9-14(1992).
19. Fernandez, P. S., F. J. Gomez, M. J. Ocio, M. Rodrigo, T. Sanchez, and A. Martinez: D values of *Bacillus stearothermophilus* spores as a function of pH and recovery medium acidulant, *J. Food Prot.*, **58**, 628~632(1995).
20. 최언호: 미생물의 방사선감수성과 DNA 손상에 관한 연구, 서울대학교 대학원 박사학위논문(1980).
21. 변명우, 차보숙, 권중호, 조한옥, 김우정: 김치의 숙성관련 주요 젖산균 살균에 대한 가열처리와 방사선 조사의 병용효과, 한국식품과학회지, **21**, 185-191(1989).