J. Fd Hyg. Safety 11(3), 221 - 225(1996)

신선초 분말에 오염시킨 미생물에 대한 감마선과 오존의 살균효과

권오진† · 박순연 · 김광훈 · 이현자[1] · 변명우[2]
그린피아기술연구소, [1]국립안성산업대학교, [2]한국원자력연구소

Sterilization Effects of γ-ray and Ozone on Microoganisms Contaminated in *Angelica keiskei* Powder

Oh-Jin Kwon†, Soon-Youn Park, Kwang-Hoon Kim, Hyun-Ja Lee[1], Myung-Woo Byun[2]
Greenpia Technology Research Institute, Yujoo, 409-810, Korea
[1]Department of Home Economics, Anseong National University, Anseong, 456-749, Korea
[2]Department of Food Irradiation, Korea Atomic Energy Research Institute, Taejon 305-353, Korea

ABSTRACT — For the purpose of improving hygienic quality of health-foods, sterilization effects of γ-ray and ozone on microoganisms associated with food cultured in the media and contaminated in *Angelica keiskei* powder were investigated. Ozone was immersed in water and sprayed in air, on the concentration of 3 mg liter^{-1} at an air flow rate of 5 liter min^{-1}. Test strains cultured in the media completely inhibited by γ-ray at irradiation doses of 0.25~2 kGy. In the case of ozone, test bacteria inactivated after treatment of 10~20 minutes, but test mold, *Aspergillus flavus* was not effective. Strains contaminated in *Angelica keiskei* powder completely inhibited by γ-ray at irradiation doses of 2.5~7.5 kGy. However, when the powder was sprayed with ozonized air for 10 hours, *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* among five strains were eliminated.

Key words □ γ-ray, Ozone, Microorganisms, *Angelica keiskei* Koidz

식품의 살균에 사용되는 보존제나 훈증처리는 유해성분의 생성 및 잔류로 발암성 등 건강장해를 일으킬 수 있어 그 사용이 세계적으로 점차 금지되거나 제한되는 실정이므로 위생적 품질관리가 절대적으로 요구되는 가공식품의 대량생산체재에서 현실적으로 이들 식품에 적합한 살균방법의 개발이 필요하다.[1-3] 식품조사는 현재 식품공업에 이용되고 있는 어떠한 저장, 가공방법보다도 국제적으로 50여년 동안 체계적으로 연구되고 있고[4-8] 그 결과, 식품조사 기술은 80년대 접어들면서 안전성에 대한 과학적 뒷받침과 세계적인 필요성의 인식으로 선진 여러나라의 주도에 의해 실용화되고 있는 실정으로 식품산업에서 방사선조사 기술은 그 잠재력이 크게 기대된다 하겠다.[9] 또한, 식품산업에서 오존은 식품의 표면 부패미생물의 살균 및 증식억제에 따른 식품의 부패, 변패의 제어등의 효과가 있다.[10-14] 오존에 의한 미생물의 살균은 미생물의 세포벽을 파괴하거나 세포막에 침입하여 DNA를 파괴하는 등의 살균 메카니즘을 갖고 있어 기존 염소계 약제에 비해 살균속도가 매우 빠르다.[15]

이에 본 연구는 건강보조 식품의 위생화 일환으로 감마선조사와 오존처리와의 살균효과를 위생관련 미생물 5종과 신선초(*Angelica keiskei* Koidz) 오염시킨 미생물에 대해서 조사하였다.

† Author to whom correspondence should be addressed.

재료 및 방법

재 료

삼명물산에서 시판하는 건강보조식품인 신선초(명일엽, 선삼초, 신립초)를 분말형태로 구입하여 4°C의 냉장고에서 보관하면서 시료로 사용하였다.

공시균주 및 배지

미생물은 한국미생물보존센터로 부터 구입한 *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Aspergillus flavus* ATCC 9643를 사용하

였다(이하 *E. coli, S. typhimurium, S. aureus, B. subtilis, A. flavus*). 배지는 *S. aureus*가 tryptic soy broth(Difco Lab.)와 agar(Difco Lab.), *A. flavus*는 potato dextrose agar(Difco Lab.), 그 외의 세균들은 nutrient broth(Difco Lab.)와 agar (Difco Lab.)를 사용하였다.

균주의 배양과 현탁액의 조제

세균의 영양세포 — 공시균주들을 각각의 사면배지에 24시간 수회 계대배양 후 이것을 동일한 액체배지 100 m*l*에 1백금이를 접종하여 37°C에서 24시간 진탕배양(120 rpm)한 다음 현탁액 1 m*l*를 다시 새로운 액체배지에 100 m*l*에 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, 원심분리하여 최종 영양세포의 농도를 10^7~10^9 CFU/m*l*가 되도록 조절하였다.

분생포자 — *A. flavus*를 potato dextrose agar에 접종하여 25°C에서 1~2주간 사면배양하였다. 이와같이 형성된 분생포자를 냉 0.1 M phosphate buffer를 써서 수집하고 여과, 세척, 원심분리(7,000×g)하여 최종 분생포자의 농도를 10^6~10^7 CFU/m*l*가 되도록 조절하였다.

감마선 조사

공시균주들의 방사선 감수성은 영양세포 및 분생포자 현탁액 2.0 m*l*를 멸균시험관(∅1.0×10 cm)에 넣고 감마선 조사 후, 균 현탁액을 냉 0.1 M phosphate buffer로 적절히 희석하여 각 미생물에 적합한 배지가 들어 있는 petri dish에 0.2*ml*씩 접종하여 spreader로 도말하고 최적온도에서 배양한 후에 형성된 집락을 계수하였다. 신선초의 오염미생물에 대한 방사선 감수성은 시료분말에 균 현탁액을 고르게 분산되도록 분무, 접종한 후 이의 2 g을 멸균시험관(∅1.0×10 cm)에 넣고 감마선 조사하여 상기와 같은 방법으로 형성된 colony를 계수하였다. 방사선 조사는 선원 10만 Ci, ^{60}Co 감마선 조사시설을 이용하여 분당 71.5 Gy의 선량율로 공시균주는 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 kGy 및 3.0 kGy로, 시료분말은 2.5, 5, 7.5 kGy 및 10 kGy의 흡수선량을 얻도록 각각 조사하였다.

오존처리

오존처리는 ozone generator(Omrom H2E-YD, Matsuno, Corporation, Japan)를 이용하였으며 이때의 오존 발생기의 농도는 3 ppm, 공기압력은 0.5 kg/cm, 유속은 5 *l*/min 이였다. 기상에서의 오존처리는 냉 0.1 M phosphate buffer에 적절히 희석된 균 현탁액을 각 평판배지에 0.2 m*l*씩 접종하여 spreader로 도말, 건조한 다음, 오존처리 장치에서 발생되는 오존이 평판위 균주들에게 골고루 접촉되도록 하여 0, 5, 10, 20, 30분 및 60분간 처리한 후 평판을 각각의 최적온도에서 1~3일 배양하여 생존 colony를 계수하였다. 액상에서는 10 m*l*의 균 현탁액에 직접 오존을 burbbing 시키면서 10분간 처리한 후, 적절히 희석하여 상기와 같은 방법으로 계수하였다. 신선초의 오염미생물은 시료분말에 오존이 고르게 분산되도록 하여 4시간과 8시간 각각 처리한 후 생존 colony를 계수하였다.

결과 및 고찰

배양시간별 균체증식

공시균주에 대한 배양시간별 균체증식을 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. *S. aureus*는 배양 6시간, 그외의 세균들은 10~12시간까지 균체증식이 급격히 증가하였으나 이후 증식이 완만하여 *E. coli, B. subtilis, S. typhimurium*은 배양 16시간에, *S. aureus*는 배양 32시간에 각각 최고치를 나타내었다.

감마선 조사의 효과

공시균주들에 대한 감마선의 살균효과를 조사한 결과 (Table 1), *E. coli*는 조사직전의 균수가 6.0×10^9 CFU/m*l* 이였으나 0.25 kGy에서 2.5×10^5 CFU/m*l*(99.99 kill)로 나타나 방사선에 대한 감수성이 매우 높았다. *B. subtilis, S.*

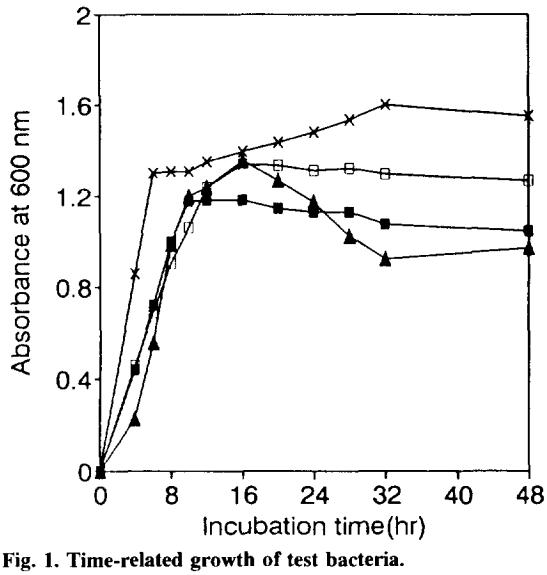

Fig. 1. Time-related growth of test bacteria.

■-■:*Escherichia coli*, ▲-▲:*Bacillus subtilis*, □-□: *Salmonella typhimurium*, ×-×:*Staphylococcus aureus*.

*typhimurium, S. aureus*는 최고선량인 3.0 kGy에서도 2.1×10^2 CFU/ml로 균주의 증식이 완전히 저해되지 않았다. 한편, 방사선 감수성이 균주들에 따라 다소 차이가 있었으나 *E. coli*는 0.25 kGy, 그 외의 균주들은 2 kGy의 조사선량으로 4~5 log cycles(99.99% kill) 이상 균수를 감소시킬 수 있을 것으로 생각된다. 일반적으로 유포자 세균이 불활성화되려면 고선량의 방사선 조사가 요구되나[16] 무포자 영양세포의 경우에는 본 실험의 결과에서와 같이 방사선 감수성이 높았다. Monk 등[1]은 *E. coli, S. typhimurium, S. aureus* 등의 D_{10} 값이 0.2~0.8 kGy로, 岡 充[17]은 *E. coli, S. typhimurium*의 D_{10} 값이 0.2 kGy로 각각 보고하였다.

오존처리의 효과

평판에 접종한 균주들에 대한 오존의 살균효과를 조사한 결과(Table 2), *E. coli*는 20분, *B. subtilis, S. typhimurium, S. aureus*는 10분 처리로서 증식이 완전히 저해되었다. Bradwater 등[18]은 오존의 농도가 일정농도 이상에 도달하면 일시에 미생물이 사멸된다는 threshold dose 현상을 보고하였는데 본 실험에서도 이와 유사한 경향을 나타내었다. *A. flavus*는 오존처리 즉시 균수가 감소하였지만 60분간 처리시에도 완전히 사멸되지 않았으며 이러한 결과로 포자를 형성하는 곰팡이에 대한 살균은 오존처리 농도를 높히거나 처리시간을 좀 더 길게하는 것이 필요하였다. 김[19]은 *Aspergillus* 속균들을 0.3~0.5 ppm의 오존으로 10~40분간 처리하여 99.99%의 사멸율을 보고하였다. 현탁액에 오존을 직접 burbbing 시키면서 10분간 처리한 결과는 Table 3과 같다. *A. flavus*는 사멸율이 7.32%로 나타나 오존처리 효과가 거의 없었고 그외의 균주들은 사멸율이 98% 이상으로 나타났다. *E. coli*는 $\approx10^4$(99.99% kill) 정도의 균수가 감소되어 현탁액에서 오존에 대한 감수성이 높게 나타났다. Nagashima[20]는 3 ppm의 농도로 10분간 처리하여 *E. coli, S. aureus, S. cerevisiae* 등의 균주들을 완전살균시켰으나 *B. subtilis*는 2.1%(97.

Table 1. Effects of gamma irradiation on microorganisms in buffer[a] (CFU/ml buffer)

Strains	Irradiation dose (kGy)							
	0	0.25	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
Escherichia coli	6.0×10^9	2.5×10^5 (99.99)	2.4×10^2 (99.99	3.0×10^1 (99.99)	-[b] (100)	- (100)	- (100)	- (100)
Bacillus subtillis	7.5×10^7	5.0×10^7 (33.33)	1.8×10^7 (76.00)	4.1×10^5 (99.45)	4.7×10^4 (99.94)	4.8×10^3 (99.99)	1.2×10^3 (99.99)	8.5×10^2 (99.99)
Salmonella typhimurium	5.0×10^9	7.5×10^7 (98.50)	4.2×10^7 (99.16)	1.0×10^6 (99.98)	2.4×10^5 (99.99)	1.6×10^4 (99.99)	2.5×10^3 (99.99)	1.4×10^2 (99.99)
Staphylococcus aureus	2.6×10^8	1.7×10^8 (34.62)	7.0×10^7 (73.08)	8.0×10^6 (96.92)	9.8×10^5 (99.62)	2.1×10^4 (99.99)	2.8×10^3 (99.99)	2.1×10^2 (99.99)
Aspergillus flavus	5.0×10^6	1.8×10^6 (64.00)	3.4×10^5 (93.20)	2.9×10^3 (99.94)	1.2×10^2 (99.99)	1.0×10^1 (99.99)	- (100)	- (100)

[a]0.1 M phosphate buffer(pH 6.5)

[b]Not detected

( ), Death rates(%)

Table 2. Effects of gaseous ozone[a] treatment on microorganisms in plate (CFU/plate)

Strains	Treating time(min)					
	0	5	10	20	30	60
Escherichia coli	359	29(91.92)	8(97.77)	0(100)	0(100)	0(100)
Bacillus subtilis	258	15(94.19)	0(100)	0(100)	0(100)	0(100)
Salmonella typhimurium	308	21(93.18)	0(100)	0(100)	0(100)	0(100)
Staphylococcus aureus	250	21(91.60)	0(100)	0(100)	0(100)	0(100)
Aspergillus flavus	850	248(70.82)	164(80.70)	47(94.47)	26(96.94)	21(97.53)

[a]Ozonized air with an ozone concentration of 3 mg liter^{-1} was sprayed into the microbial plates at an air flow rate of 5 liter min^{-1}

( ), Death rates(%)

9% kill)의 생존율을 보고하였다.

신선초에서의 감마선과 오존의 살균효과

신선초는 미나리과에 속하는 다년생초로 옛부터 각종 성인병의 민간요법으로 사용되어 왔으며 생리활성 물질인 flavonoid, coumarin, saponin 등이 들어있는 자연 건강식품으로 생채, 분말, 엑스트렉트, 생즙의 형태로 많이 이용되고 있다. 그러나 신선초는 오염미생물로 인해 위생적 품질관리가 어려운 실정이다.[21] 이에 본 실험에서는 신선초 분말에 균주들을 오염시켜 감마선과 오존의 살균효과를 조사하였다(Table 4). *B. subtilis*와 *S. aureus*는 2.5 kGy 조사로서 균주의 증식이 완전히 저해되었으며 이는 현탁액에서 본 균주들이 3.0 kGy에서 생존한 것과 비교해 볼 때 시료분말에서는 방사선 감수성이 더 높게 나타났다. *A. flavus*는 5 kGy, *E. coli*와 *S. typhimurium*는 7.5 kGy에서 각각 증식이 저해되었다. FAO/WHO/IAEA의 식품조사 공동전문위원회는 10 kGy 이내의 조사식품의 식용은 인체에 안전하다고 한 바 있어[9] 본 실험의 결과로 볼 때 시료분말에 오염된 미생물은 저선량으로 안전하게 살균할 수 있을 것으로 생각된다. 신선초 분말에 오염시킨 균주들에 대한 오존의 살균효과를 조사한 결과(Table 5), 4시간 처리로서 *E. coli, B. subtilis, S. aureus*의 균수를 처리전 보다 10^3~10^6 CFU/m*l* (99.9% kill) 정도를 감소시켰으며 *A. flavus*는 67.69%의 사멸율을 나타내었다. 그러나 시료분말에 10시간 처리는 평판에서 10분 처리시와 균주들의 사멸율이 비슷하여 그 처리효율이 떨어짐을 알 수 있었다. Zhao와 Cranston[22]은 black peppercorns에 오염된 미생물을 수용액에서 6.7 ppm의 농도로 10분간 오존처리하여 10^3~10^4 CFU/m*l*의 균수를 감소시켰고 곽 등[23]은 30 ppm의 오존을 인삼분말에 12시간 이상 처리하여 균주의 생육을 완전히 저해시켰다.

Table 3. Effects of gaseous ozone[a] treatment on microorganisms in buffer (CFU/m*l* buffer)

Strains	Treating time(min)	
	0	10
Escherichia coli	1.8×10^9	2.4×10^5(99.99)
Bacillus subtilis	1.3×10^8	8.2×10^5(99.37)
Salmonella typhimurium	1.5×10^9	6.4×10^6(99.93)
Staphylococcus aureus	1.2×10^7	1.9×10^5(98.42)
Aspergillus flavus	4.1×10^6	3.8×10^6(7.32)

[a]Ozonized air with an ozone concentration of 3 mg liter^{-1} was bubbled into the 0.1 M phosphate buffer (pH 6.5) at an air flow rate of 5 liter min^{-1}

( ), Death rates(%)

Table 5. Effects of gaseous ozone[a] treatment on microorganisms contaminated in *Angelica keiskei* powder (CFU/g sample)

Strains	Treating time(hours)		
	0	4	10
Escherichia coli	3.0×10^9	7.8×10^4 (99.99)	1.6×10^2 (99.99)
Bacillus subtilis	5.2×10^5	2.0×10^2 (99.96)	-[b] (100)
Salmonella typhimurium	2.6×10^7	3.0×10^6 (88.46)	5.0×10^4 (99.81)
Staphylococcus aureus	6.9×10^8	8.0×10^2 (99.99)	- (100)
Aspergillus flavus	1.3×10^6	4.2×10^5 (67.69)	1.6×10^5 (87.69)

[a]Ozonized air with an ozone concentration of 3 mg liter^{-1} was sprayed into the sample powder at an air flow rate of 5 liter min^{-1}

[b]Not detected(detection limit 10 CFU/g)

( ), Death rates(%)

Table 4. Effects of gamma irradiation on microorganisms contaminated in *Angelica keiskei* powder (CFU/g sample)

Strains	Irradiation dose(kGy)				
	0	2.5	5	7.5	10
Escherichia coli	3.0×10^9	-[a] (100)	- (100)	- (100)	- (100)
Bacillus subtilis	5.2×10^5	- (100)	- (100)	- (100)	- (100)
Salmonella typhimurium	2.6×10^7	3.6×10^3(99.99)	1.8×10^1(99.99)	- (100)	- (100)
Staphylococcus aureus	6.9×10^8	- (100)	- (100)	- (100)	- (100)
Aspergillus flavus	1.3×10^6	4.7×10^2(99.96)	- (100)	- (100)	- (100)

[a]Not detected(detection limit 10 CFU/g)

( ), Death rates(%)

국문요약

건강보조 식품의 위생화 일환으로 감마선과 오존의 살균효과를 식품관련 미생물과 이들을 신선초(*Angelica keiskei* Koidz) 분말에 오염시켜 살펴보았다. 미생물들은 0.25~2 kGy의 조사선량으로 완전살균이 가능하였다. 오존의 경우, 세균들은 10~20분 처리로 불활성화 시켰으나 곰팡이인 *Aspergillus flavus*에는 효과가 없었다. 한편, 시료분말에 오염시킨 미생물들은 2.5~7.5 kGy의 조사선량으로 완전히 저해되었으며 오존은 *Bacillus subtilis*와 *Staphylococcus aureus*만을 10시간 처리로서 불활성화 시켰다.

참고문헌

1. Monk, J. D., L. R. Beuchat, and M. P. Doyle: Irradiation inactivation of food-borne microorganism, *J. Food Prot.*, **58**, 197-208(1995).
2. 伊藤 均: 食品保藏, 殺菌への 放射線利用, *New Food Industry*, **28**, 17-22(1986).
3. Belitz, H. D. and Grosch, W. : Food Chemistry, Springer-Verlag, Berlin, pp. 175(1987).
4. 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).
5. 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).
6. Thayer, D. W., and G. Boyd: Radiation sensitivity of *Listeria monocytogenes* on beef as affected by temperature, *J. Food Sci.*, **60**, 237-240(1995).
7. 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).
8. 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).
9. 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).
10. Ewell, A. W.: Ozone and its application in food preservation, Refring. Eng., **58**, 873-975(1950).
11. Naito S., Okada Y., Sakai T.: Studies on utilisation of ozone in food preservation. V. Changes in microflora of ozone-treated cereals, grains, peas, beans and spices during storage, *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.*, **35**, 69-77(1988).
12. 김미정, 오영애, 김미향, 김미경, 김순동: 오존처리 청정재료와 *L. acidophilu*를 이용한 배추김치의 숙성, 한국영양식량학회지, **22**, 165-174(1993).
13. 김일두, 김순동: 신선계육의 유통을 위한 Ozone 처리 효과, 한국영양식량학회지, **20**, 483-487(1991).
14. Kaess, G. and Weidemann, J. F.: Ozone treatment of chilled beef, *J. Food Technol.*, **3**, 325-334(1968).
15. 김광연: 식품산업에의 오존이용(I), 식품기술, **6**, 85-91(1993).
16. Hadden, C. T.: Postirradiation recovery dependent on the *uvr*-1 locus in *Bacillus subtilis, J. Bacteriol.*, **128**, 317-324(1976).
17. 岡 充: 食品 の 放射線 殺菌, 食衛誌, **11**, 229-237(1970).
18. Broadwater, W. T., Hoehn, R. C. and King, P. H.: Sensitivity of three selected bacterial species to ozone, *Appl. Microbiol.*, **26**, 391-393(1973).
19. 김광연: 식품산업에의 오존이용(II), 식품기술, **6**, 84-94(1993).
20. Nagashima T.: Study on preservation of vegetables by ozone treatment, *Korean J. Post-Harvest Sci. Technol. Agri. Products*, **2**, 209-223(1995).
21. 김옥경, 궁성실, 박원봉, 이명환, 함승시: 명일엽 전초 및 생즙의 영양성분 분석, 한국식품과학회지, **24**, 592-596(1992).
22. Zhao J. and P. M. Cranston: Microbial decontamination of black pepper by ozone and the effect of the treatment on volatile oil constituents of the spice, *J. Sci. Food Agric*, **68**, 11-18(1995).
23. 곽이성, 노봉길, 장진규, 최강주: 오존처리가 인삼분말에 오염시킨 미생물의 생육에 미치는 영향, 한국식품위생·안전성학회, **10**, 45-51(1995).