J. Fd Hyg. Safety 10(1), 45-51(1995)

오존처리가 인삼분말에 오염시킨 미생물의 생육에 미치는 영향

곽이성† · 노길봉 · 장진규 · 최강주
한국인삼연초연구원, 대전시 유성구 신성동 302

Effect of Ozone Treatment on Growth of Microorganisms Contaminated Ginseng Powders

Yi Seong Kwak†, Kil Bong, No, Jin Kyu Chang, and Kang Ju Choi
Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, 302 Shinseong-dong, Taejon 305-345

ABSTRACT—Ozone treatment was applied to ginseng powder for the improving hygienic quality of ginseng powder. A bacterial strain was isolated form ginseng powder contaminated. The strain designated as GT4, was identified as *Escherichia coli* species by IMVIC test method. Ozone inhibited strongly total bacteria and coliforms in ginseng powder(initial concentration 10^3/g) at 0.35 ppm. High ozone concentration reduced death time of the total bacteria in ginseng powder. However, ozone treatment caused significant degradation in saponins of ginseng powder. Ozone treatment also caused a increase in Hunter's color L value and decrease in a and b values of ginseng powder.

Key words □ Ozone, Ginseng powder, Coliforms, *Escherichia coli*, Saponin

최근 방부제 등의 식품첨가물 규제, 소비가 기호에 의한 보존료 무첨가 상품 등 소비자의 건강 지향적 욕구가 증대됨에 따라 식품 가공공장에서의 미생물 관리는 그 중요성이 증가하고 있는 실정이다. 원료 인삼은 저장이나 장기 유통과정에서 해충, 미생물 등에 의한 생물학적 품질변화가 발생하며 인삼분말은 증기처리, 재건조, 분쇄, 포장등 제품의 제조공정에서 미생물 오염을 수반한다. 현재 우리나라의 인삼제품 검사기준[1]은 인삼분말의 경우 세균수는 5×10^4/g 이하, 대장균군은 음성이어야 하는등 그 제한 규정이 엄격하다. 현재 향신료, 분말곡류, 건조 야채, 건조 수산물, 코코아, 인삼등의 살균, 살충 목적으로 사용되어 오던 ethylene oxide(EO)훈증제 처리가 그 유해성으로 인해 1991년 금지된 이후[2,3,4] 효과적인 살균방법의 개발과 이용은 중요한 과제로 부각되고 있는 실정이다.

오존은 그 강력한 산화력으로 인해 오래전부터 살균, 탈색, 유독·유해물질의 분해 수단이며, 환경정화의 유력한 수단으로 사용되어 왔다. 미생물에 대한 오존의 작용은 오존이 미생물의 세포벽 또는 세포막에 작용하여 세포를 사멸시키거나 미생물내 효소 중의 하나인 설프하드릴 그룹을 산화시켜 미생물을 사멸시킨다고 알려져 있다.[6] 식품 저장에서 오존의 사용은 효율적인 보존효과를 보이며 일부 식품의 표면 부패 미생물의 생육을 억제하는데 효과가 있다고 알려져 왔지만, 오존의 강한 산화력으로 인해 고지질 식품등에는 바람직하지 않다고 알려져 있다.[5] 그러나 오존은 열이나 자외선처럼 식품을 변질시키는 경우가 그다지 없으며 약품이나 첨가물처럼 잔류하여 인체에 해를 나타내는 경우는 없다. 한편 우리나라에서 오존의 이용은 주로 액체식품에 사용되어 왔고 고체 및 분말 제품에 사용된 예는 전무한 실정이다.[6]

따라서, 본 연구에서는 새로운 살균방법 개발을 위한 기반실험을 실행하면서 오존이 인삼분말의 미생물학적 안정성 및 품질안정성에 미치는 영향을 조사 하였다.

재료 및 방법

실험재료

살균하지 않은 인삼을 분쇄하여 인삼분말로 만들어

† To whom correspondence should be adressed.

대장균과 일반세균을 조사하였고 인삼분말에서 분리된 대장균을 오염시킨후 오존처리 시료로 사용하였다. Saponin 정성 및 정량에 사용된 시약류로서 TLC plate는 precoated silica gel 60F254 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 Merck회사의 HPLC용 용매류를 사용하였다. 인삼포닌 ginsenoside 표준성분은 한국인삼연초연구원에서 분리한 표준품을 TLC확인 및 HPLC 정량용 표준품으로 사용하였다.

대장균의 순수분리

살균처리하지 않은 인삼분말로부터 Lactose broth 배지 (beef extract 3.0 g, peptone 10.0 g, latose 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 실험구를 접종하여 38℃에서 24~48시간 배양한 후 colony를 생성시켰다. 생성된 colony 중에서 크기가 작고 금속광택이 있는 균을 다시 동일 배지에 도말하여 순수분리하였다.

분리균주의 생리적 성질 조사

Indole test－Indole test[8]는 tryptophan 함유배지에 순수분리균을 접종한 후 38℃, 2~4일 배양하였다. 배양액에 kovac's regent를 0.5~1.0 m*l* 가한 후 천천히 교반하여 정치시켰다. 붉은 색의 ring을 생성시킨 것을 양성으로 변화가 없으면 음성으로 하였다.

Methyl red test－Methyl red test[8]는 MR-VP 배지에 균을 접종하여 38℃에서 2~4일 동안 배양한 후 methly red 지시약을 3~4방울 떨어트려 붉은 색을 나타내는 것을 양성으로 오렌지 색을 나타내는 것을 음성으로 하였다.

Vogess-Proskauer test－Veges-Proskauer test[8]는 MR-VP 배지에 균을 접종하여 38℃에서 2~4일 동안 배양한 후 배양액에 barritt's reagent B를 10 방울 정도 넣고 20초 동안 흔들었다. 1시간 내지 2시간 동안 방치 후 배양액이 분홍색으로 변화하는 것을 양성으로 변화가 없는 것을 음성으로 표시하였다.

Citrate test－Citrate test[8]는 Simmon's citrate agar에 균을 접종하여 38℃에서 2~4일 동안 배양한 후 배지의 색이 청색이면 양성으로 녹색이면 음성으로 표시하였다.

대장균의 접종

오염 인삼분말에서 분리된 순수분리균 GT4를 Lactose broth 배지에서 38℃, 2일 동안 배양한 후 인삼분말에 접종하였다. 접종은 인삼분말에 고르게 분산되도록 균액을 분무하여 접종하였다.

오존 처리

오존처리는 ozone generator (TECC Corp., One Space Ozone V type, JAPAN)를 이용하였으며 이때의 오존 발생농도는 0.35~30.0 ppm이었다. 오존발생기의 공기압력은 0.5 kg/cm^{2}이었고 이때의 유속은 7~8 LPM (Liter Per Mlinutes)이었다. 오존처리는 분말을 연속적으로 회전시켜 오존이 분말표면에 고르게 분사되도록 조정한 후 실시하였다.

미생물 시험

호기성세균은 APHA 표준방법[14]에 따라 plate count agar (Difco Co.)를 사용하여 38℃에서 1~2일 배양한 후 집락을 계수하였다. 대장균은 lactose broth 배지를 사용하여 38℃에서 2일 배양한 후 가스 발생구를 대장균군 양성으로 표시하였다. 대장균군은 EMB agar (Difco co.)를 이용한 pour plate method[9]로 38℃에서 1~2일간 배양한 후 콜로니의 형성을 조사하였다.

이화학적 특성시험

색도 측정－오존처리한 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 일정량은 둥근 플라스크에 취하고 10배량의 80% ethanol을 가하여 75~80℃의 water bath에서 5시간씩 3회 반복 추출하였다. 상기 추출액은 최 등[10]의 방법에 따라 수포화 n-butanol 추출법으로 추출분획 후 농축된 조사포닌을 5% 메

탄을 용액(v/w)이 되도록 메탄올에 용해시켜 검액으로 하였으며 silica gel TLC판에 5 μl씩 점적하여 chloroform/methanol/water(65 : 35 : 10, low phase)로 전개한 후 30% 황산시액을 분무하여 110℃에서 5분가 발색시켜 확인하였다. HPLC분석은 Lichrosorb-NH_2 column (Merch, 10 μm, ID 0.46 cm×25 cm)에 acetonitrile/water/n-butanol(80 : 20 : 0.25)을 이동상으로 하여 differential refractometerd(RI 401)검출기로 검출 정량하였다.

실험 결과

순수분리균의 배양학적 특성

살균처리하지 않은 인삼분말로부터 분리된 순수분리균 GT4는 EMB agar상에 서 37℃, 2일 동안 배양하였을때 크기가 2~3 mm이었고 금속광택성을 나타내었고 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.[8] IMViC test는 Indole 생성의 유무를 판별하는 indole test와 유기산 생성유무를 알아보는 methyl red 실험 및 2,3-butanediol의 생성여부를 조사하는 voges-proskauer test 및 citrate 이용 유무를 판별하는 citrate test 등으로 구성되어 있다. Table 1에 나타낸 바와 같이 분리균 GT4는 IMVIC test를 행한 결과 대장균과 매우 유사하다고 알려진 *Aerobacter agerogenes*와는 달리 *Escherichia coli*와 동일한 결과를 나타내어 *E. coli*의 유연균주로 생각된다.

미생물 살균효과

인삼분말에 오존을 처리한 후 잔존 세균수를 검사한 결과를 Table 2에 나타낸 바와 같다. Table 2에 나타낸 바와 같이 분말시료에 0.35 ppm 의 오존을 12시간 처리시 세균수는 초기농도 8.6×10^6/g에서 4.3×10^5/g으로 감소되었고 24시간 처리시에는 1.0×10^5/g으로 감소되었다. 0.50 ppm에서는 15시간 처리시 8.6×10^6/g에서 2.4×10^5/g으로 감소되었고 22시간 처리시에는 6.0×10^4/g으로, 31시간 처리시에는 5.5×10^3/g으로 감소되었다. 오존을 이용한 인삼분말 살균시 0.5 ppm의 오존에서는 0.3 ppm에서 보다 약 2시간 정도 사멸시간이 단축되었다. Ewell1[2] 및 Kaess and Weidmann[13]은 오존이 저장된 시품의 표면에 오염된 미생물의 성장을 억제한다고 하였는데 본 실험에서도 오존이 인삼분말 표면에 오염된 세균수를 감소시킴

Table 1. Biochemical tests of isolated strain GT4

	Indole test	Methyl red test	V-P test*	Citrate test
E. coli[8]	+	+	−	−
A. aerogenes[8]	−	−	+	+
Isolate GT4	+	+	−	−

* V-P test: Voges-Proskauer test.

Table 2. Effect of ozone on the bacterial growth in ginseng powder.

Ozone (ppm)	Hours	Total bacteria (CFU/g)
0.35	0	8.0×10^6
	12	4.3×10^5
	24	1.0×10^5
0.50	0	8.6×10^6
	15	2.4×10^5
	22	6.0×10^4
	31	5.5×10^3

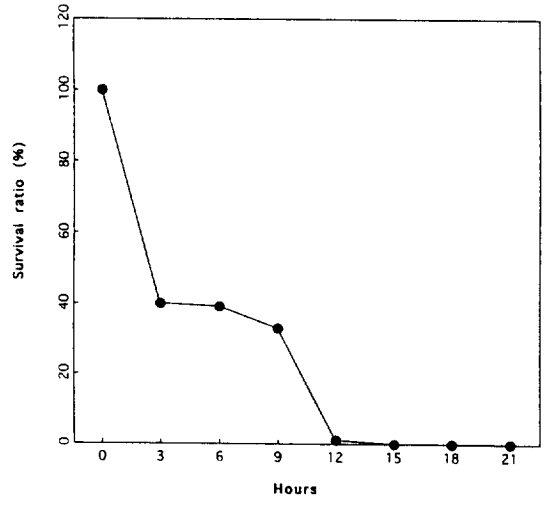

Fig. 1. Effect of ozone on the bacterial growth in ginseng powder.
* Ozone conentration is 30 ppm.

Table 3. Effect of ozone on the coliforms anf bacterial growth in ginseng powder

Ozone (ppm)	Hours	Total bacteria (CFU/g)	Death rates (%)	Coliforms[1)]
0.35	0	2.8×10^3	0	+
	16	3.0×10^2	89	+
	24	0	100	−
	42	0	100	−

[1)] +: Positive, −: Negative.

Table 4. Effect of air pressure on the bacteria contaminated in ginseng powder.

Ozone (ppm)	Hour	Air pressure (kg/cm^2)	Total bacteria (CFU/g)
0	0	0	8.6×10^6
0.35	24	0.5	1.0×10^5
0.35	24	1.2	3.0×10^4

* Flow rate of ozone generator was 7-8 LPM (liter per mintes).

으로써 살균효과를 나타내었다.

Fig. 1은 30 ppm의 오존을 인삼분말에 처리한 후 세균의 경시적 변화를 관찰한 결과이다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 30 ppm의 오존을 3시간 처리시 세균의 생존률은 40%로 나타나서 급격하게 세균수가 감소되는 경향이었다. 그 이후 9시간 처리 때까지는 생존률이 33~40% 수준을 유지하였으나 12시간 이후부터 생존률이 0% 수준으로 완전히 균의 생육이 감소되었다. Bradwater 등[7]은 오존의 농도가 적으면 균이 별다른 영향이 없다가 일정농도에 도달하면 일시에 미생물이 사멸된다는 threshold dose 현상이 오존에 대해서도 적용된다고 주장하였는데 본 실험에서도 이와 유사한 유형을 나타내었다.

또한 Table 3에 나타낸 바와 같이 비교적 오염이 안된 시료(2.8×10^3/g)에 0.5 ppm 오존을 16기간 처리시 89%의 세균 사멸율을 나타내었고 24시간 처리시에는 100%의 사멸효과를 나타내었다. 식품의 품질검사에서 오염의 지표미생물인 대장균군도 24시간 처리시 양성에서 음성으로 변하여 오존은 일반 세균뿐만 아니라 대장균에 대해서도 살균효과를 나타내었다.

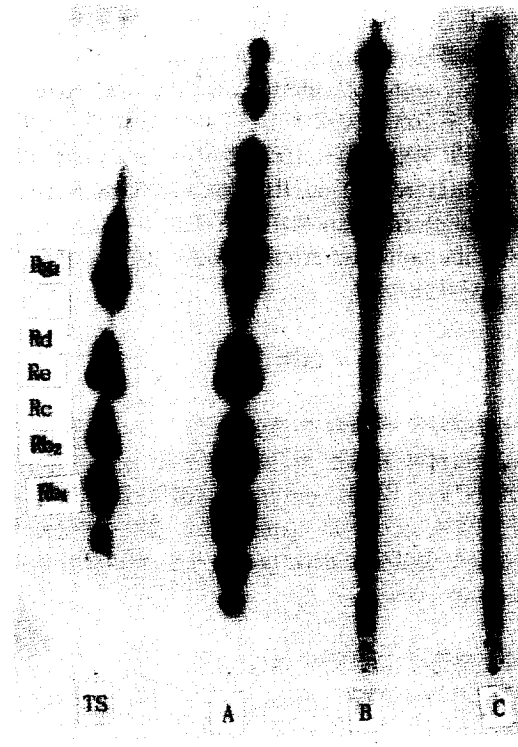

Fig. 2. TLC ginsenoside pattern of ginseng powder treated with ozone.
TS: total saponin, A; control, B: ginseng powder treated with 0.35 ppm ozone for 24 hours, C: ginseng powder treated with 0.50 ppm ozone for 24 hours.

오존발생시의 공기압이 살균에 미치는 영향

오존발생시의 공기압이 살균에 미치는 효과를 조사한 결과는 Table 4과 같다. Table 4에 나타낸 바와 같이 오염 홍삼분말 (8.6×10^6/g)을 오존을 이용하여 살균할 때 공기압이 1.2 kg/cm^2인 경우에는 세균수가 3.0×10^4/g이었고 공기압이 0.5 kg/cm^2일 때는 세균수가 1.0×10^5/g으로 오존발생시의 공기압이 클 경우가 더 큰 세균 감소경향을 나타내었다. 따라서 이러한 결과는 오존살균은 분말표면에 오염된 세균을 사멸시키므로 오존을 분사할 때의 공기압이 큰 경우가 효과적임을 암시한다 하겠다.

오존이 인삼분말의 사포닌에 미치는 영향

오존처리시 인삼분말의 사포닌 포화 패턴을 Fig.

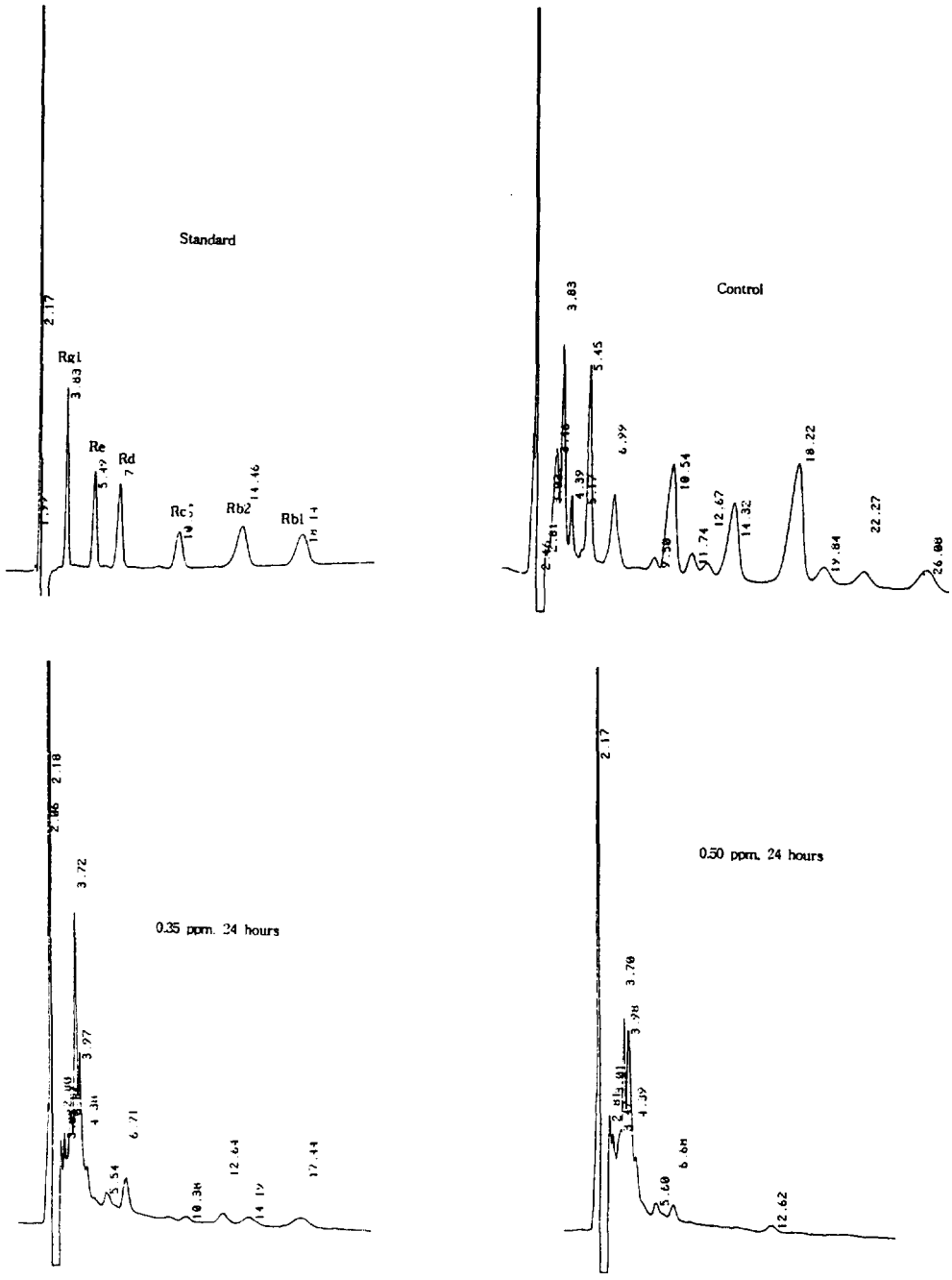

Fig. 3. HPLC ginsenoside pattern of ginseng powder treated with ozone.

Table 5. Changes incontents of crude saponin and major ginsenosides in ginseng powder treated with ozone.

Sample	Crude saponin (%)	Ginsenoside[1]						
		Rgl	Re	Rd	Rc	Rb2	Rb1	Total
A	6.50	0.40	0.67	0.30	0.42	0.62	1.23	3.64
B	6.53	0.66	0.13	0.22	0.10	0.10	0.14	1.35
C	6.55	0.39	0.10	0.11	0	0.10	0	0.70

A: Contro, B: Ginseng powder treated with 0.35 ppm ozone for 24 hours, C: Ginseng powder treated with 0.50 ozone for 24 hours, [1] Content is calculated by dry base weight of ginseng powders.

2에 나타내었다. Fig. 2의 TLC chromatogram에서 보는 바와 같이 오존 0.35 ppm 및 0.50 ppm을 인삼분말에 24시간 처리 후 사포닌 패턴을 조사한 결과 오존처리 시료에서는 주종 사포닌인 Diol계 사포닌 즉, ginsenoside-Re, -Rd, -Rc, -Rb2 및 -Rb1이 분해되었다.

Fig. 3은 오존처리 사포닌 성분변화를 나타낸 HPLC 패턴이다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 ginsenosides의 성분중 에서 Diol계 사포닌인 ginsenoside-Re, -Rd, -Rc, -Rb2, 및 -Rb1은 큰 감소를 나타내었다. 이것을 정리하면 Table 5와 같다. Table 5에서 보는 바와 같이 주종 사포닌인 ginsenosid-Re, -Rd, -Rc, Rb2, 및 -Rbl의 함량은 크게 감소하였고 오존의 농도가 높을수록 그 감소 정도가 심하였다.

오존이 인삼분말의 색도변화에 미치는 영향

Table 6. Hunter color value of ginseng powder treated with ozone.

Ozone treatment		Color value		
(ppm)	(Hours)	L[1]	a[2]	b[3]
0		99.47	−0.63	+1.41
0.5	15	101.20	−1.50	+1.03
	24	101.66	−1.52	+0.97
	31	101.82	−1.44	+0.25
30.0	3	101.40	−1.53	+3.07
	6	102.68	−1.52	+3.18
	12	102.60	−1.53	+3.81

[1] L: 100(white)~0(black), [2] a: −60(green)~+60(red), [3] b: −60(blue)~+60(yellow).

제품의 색도는 제품의 품질을 결정하는 중요한 요소이다. 일반적으로 ethyleneoxide 처리, 감마선 조사 및 microwave 처리시 식품의 외관적 품질에 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다.[11] Table 6은 오존을 처리한 인삼분말의 색도 변화를 나타낸 것이다. Table 6에 나타낸 바와 같이 오존 0.5 ppm을 15시간 처리시 L값 (명도)은 오존 무처리구의 99.47에서 100.20으로 증가하였고 a값 (적색도)는 −0.63에서 1.50로 감소하였다. b값 (황색도)도 +1.41 에서 +1.03으로 감소하엿다. L 값 (명도)은 처리시간이 증가할 수록 증가하는 경향을 나타냈으며 이는 오존이 강한 산화력을 가지기 때문인 것으로 생각된다. b값 (황색도)는 처리시간이 증가할수록 감소하는 경향을 보였으나 a값(적색도)는 처리시간에 따른 유의적 변화는 관찰되지 않았다.

국문요약

오염된 임삼분말로 부터 분리된 세균 GT4는 IMVIC test 방법에 의해 동정한 결과 *Escherichia coli* 유연 균주로 확인되었다. 오존이 인삼분말에 오염된 대장균군의 생육에 미치는 영향을 조사하기 위하여 GT4 균주의 배양액을 인삼분말에 접종한 후 오존을 처리하였다. 오존을 이용한 분말의 살균방법은 분말에 오염된 세균의 초기농도가 10^3/g 수준이면 0.35 ppm오존을 24시간 처리함으로써 세균 및 대장균군의 생육을 완전히 억제하였다. 그러나 분말의 초기균수가 10^5/g 이상이면 오존 30 ppm 농도로 48시간 처리해야 세균이 완전히 사멸되었다. 오존 처리는 또한 사포닌 성분중 Diol계 사포닌인 ginsenoside -Re, -Rd, -Rc, Rb2 및 -Rbl 함량을 크게 감소시켰다. 오존처리는 또한 색도의 변화를 야기시켜 L값(명도)은 증가되었지만 a값(적색도)및 b값(황색도)은 감소되었다.

참고문헌

1. 한국식품공업협회: 식품공전, p. 511 (1994).
2. WHO: Ethylene oxide, Enbironmental Health Criteria, 55 (1985).
3. Wesley, F., Rourke, B. and Darbishire, O.: The formation of persistent toxic chlorohydrins in foodstuffs by fumigation with ethylene oxid and with ethylene oxid and with propylene oxide. *J. Food Sci.*, **30**, 1037 (1965).
4. Rajendran, S. and Muthu, M.: Detection of acrylonitrile and ethylene oxide in air and fumigated foodstuffs. *Bull Enuironm. Contam. Toxicol.*, **27**, 426 (1981).
5. 石谷 孝佑: 最近の 殺菌. 靜菌 技術. p. 46-56, 食品工業 (1990).
6. Clark, D.S. and Takacs, J.: Gases as preservatives, pp. 189-192. In Siliker, J.H., Elliott, R.P., Baird-Parker, A.C., Bryan, F.L., Christian, J.H.B., Clark, D.S., Olson, J.C., and Roberts, T.A. (eds.), *Microbial ecology of foods.* Vol. 1, Academic Press, New York (1980).
7. Broadwater, W.T., Hoehn, R.C. and King, P.H.: Sensitivity of three selected vacterial species to ozone. *Appl. Microbiol.* **26**, 391-393 (1973).
8. Cololins. C.H. and Lyne, P.M.: Microbiological Methods (Fifth edition) Butterworth and Co Ltd., p. 281-286, 1984.
9. Harrigan, W.F. and McCance, M.C.: Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology. Academic Press, London (1976).
10. 최진호, 김우정, 양재원, 성현순: 열처리에 의한 홍삼엑기스의 성분변화, 한국농화학회지, **24**, 50(1981).
11. Vajdi, M. and Pereira, R.R.: Comparative effects of ethylene oxide, r-irradiation and microwave treatments on selected spices. *J. Food Sci.*, **38**, 893 (1973).
12. Ewell, A.W.: Ozone and its application in food preservation, *Refring. Eng.* **58**, 873-975 (1950).
13. Kaess, G. and Weidemann, J.F: Ozone treatment of chilled beef. *J. Food Technol.* **3**, 325-334 (1968).
14. APHA: Compendium of methods for the microbiological examination of foods, M. speks(ed.), Akmerican Public Health Association, Washinton, D. C. (1976).