pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 34, No. 6, pp. 583~590 (2019)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2019.34.6.583

**Journal of Food Hygiene and Safety**
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

Research Note

# 광유도 ROS 발생장치의 세척용수 중 식중독 세균에 대한 불활성화 효과

**최재혁[1] · 김다운[1] · 정규석[2] · 노은정[1] · 류경열[1] · 류재기[1]***
[1]국립농업과학원 농산물안전성부 유해생물팀
[2]경기도농업기술원 소득자원연구소

# Effect of Light-Induced ROS Generation Unit on Inactivation of Foodborne Pathogenic Bacteria in Water

Jaehyuk Choi[1], Dawoon Kim[1], Kyu-Seok Jung[2], Eunjung Roh[1], Kyoung-Yul Ryu[1], Jae-Gee Ryu[1]*
[1]*Microbial Safety Team, Agro-Food Safety & Crop Protection Department, National Institute of Agricultural Sciences (NIAS), Rural Development Administration (RDA), Wanju, Korea*
[2]*Agricultural Resource Research Institute, Gyeonggi-do Agricultural Research and Extension Services, Yeoncheon, Korea*

(Received October 24, 2019/Revised November 25, 2019/Accepted December 4, 2019)

**ABSTRACT -** As the consumption of fresh fruits and vegetables increases, food poisoning caused by foodborne pathogen contamination is not decreasing. To prevent the contamination of produce, a quick and easy, low-cost, environmentally-safe disinfection method that does not affect produce freshness or quality is needed. This study demonstrates a new-concept, circulating-water disinfection system that purifies water by using newly developed 'LED-PS (photosensitizer)-induced ROS generation unit'. Using various types of LED-PS induced ROS generation units, we investigated the conditions for reducing the density of various pathogenic bacteria by more than 3 log CFU / mL in 1 hour. The major operational factors affecting the density reduction of the LED-PS-induced ROS generation unit were analyzed. Depending on bacteria species, the density reduction rate was varied. The effect of the units on reducing the density of *Bacillus cereus* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* was high, but the effect on foodborne bacteria such as *Escherichia coli* was relatively low. In this circulating water disinfection system, the density reduction effect tended to increase as the flow rate increased and the initial bacterial density decreased. As the amount of PS absorbed beads increased, the density reduction effect increased exponentially in some bacteria. Model 3280, a double cylindrical unit connecting two single cylindrical units, could completely sterilize more than 3 log CFU/mL of *B. cereus* and *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* in 30 minutes of LED irradiation.

**Key words :** Reactive oxygen species, Foodborne pathogens, Photosensitizer, Disinfection, Light induced ROS generator

웰빙시대를 맞아 신선 과채류의 즉시 섭취 형태의 식문화와 관련 시장이 급격히 확대 성장하고 있다. 국내생산 채소류의 1인당 소비량은 2010년 146.1 kg 에서 2014년 178 kg으로 연평균 21.8 % 증가하였다[1]. 이와 더불어 채소와 과일에 오염된 병원성 미생물로 인한 식중독 사고도 줄지 않고 지속되고 있다. 신선 채소는 재배 및 수확과정에서 엽채류는 동물이나 재배환경으로부터 식품매개 병원균에 오염될 수 있다. 또한 신선한 채로 섭취하기 때문에 소비자들은 이러한 병원균에 직접 노출될 수 있다.

신선채소류에 오염된 식중독세균의 제어를 위하여 오존 살균법 또는 염소 소독법 등이 가장 많이 사용되고 있으나, 살균 효과의 미흡, 처리비용의 부담, 추가적 환경오염 및 상품성 저하 등의 한계점이 있다[2]. 따라서 신선 농산물의 품질 변화와 추가적 환경오염이 발생되지 않으면서 비용부담이 적은 신속 간편한 소독 기술이 요구되고 있다.

감광성 물질(감광제; Photosensitizer, PS)은 가시광선 조사하에서 일중항 산소 $^1O_2$(일중항 산소)와 같은 활성산소(ROS; Reactive Oxygen Species)를 주로 생성하며 다양한 병원성

*Correspondence to: Jae-Gee Ryu, Microbial Safety Team, Agro-Food Safety & Crop Protection Department, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Nongsaengmyeong-ro 166, Iseo-myeon, Wanju-gun, Jeollabuk-do 55365, Korea
Tel: 82-63-238-3403, Fax: 82-63-238-3840
E-mail: jgryu@korea.kr

미생물의 불활성화, 암조직 치료, 수인성 오염물질을 분해할 수 있다는 것이 잘 알려져 있다[3,4].

감광(Photosensitization) 에 의한 미생물 불활성화 방법은 미생물의 항생제 내성발현 기작과 달리 독립적인 처리 효과가 있으며, 주변환경에 악영향 없이 병원균의 밀도를 경감시킬 수 있으며, 감광에 따른 세균의 내성이나 변이원성이 없어 항생제 내성균 치료에 대한 대체수단으로써 역할이 주목받고 있으며, 비용이 적게 들고 유지관리가 용이하고 친환경적이며 효과적인 미생물 소독방법이다[5].

농업현장에서 광유도 감광제를 이용한 ROS 발생장치를 실용적으로 활용하기 위해서는 농업용수나 세척용수에 오염된 총 세균수, 식중독 세균의 밀도 감소효과와 살균효과 제고를 위한 유속, 살균효과가 있는 세균밀도 등 제반 조건을 구명하는 것이 필요하다. 따라서 본 연구는 5종 이상의 식중독 세균을 선발하여 세척용수에 접종된 식중독 세균을 대상으로 기 개발된 광유도 감광제 기반 ROS 발생장치의 밀도 감소 효과를 구명하고 식중독 세균의 초기 밀도, 유속 등 감소효과에 영향을 주는 요인을 검정하여 농업현장에서 세척용수 중에 오염된 미생물의 밀도 감소효과를 실증하여 간편하고 저렴하게 세척용수를 비롯한 농업용수 소독방법을 개발하고자 하였다.

## Materials and Methods

### 사용균주

실험실에 분리 동정 보관중인 식중독 세균과 식물 부패세균 중에서 신선 채소류에서 문제가 되거나 문제가 될 수 있는 식물 부패균 1종과 식중독균 6 종을 선발 하여 ROS 처리에 따른 각 균의 밀도 감소 효과를 확인하였다 (Table 1).

**Table 1.** Bacterial strains used in this study

| | Microorganisms | Strain | Source of strain |
|---|---|---|---|
| 1 | *Bacillus cereus* | B87 | Lab. isolate from perilla leaf |
| 2 | *Staphylococcus aureus* | A1 | Lab. isolate from perilla leaf |
| 3 | *Escherichia coli* | 25922 | ATCC |
| 4 | *Escherichia coli* O157:H7 | 43895 | ATCC |
| 5 | *Salmonella Enterica* | 4931 | ATCC |
| 6 | *Listeria monocytogenes* | 19113 | ATCC |
| 7 | *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* | P1 | Lab. isolate from Chinese cabbage |

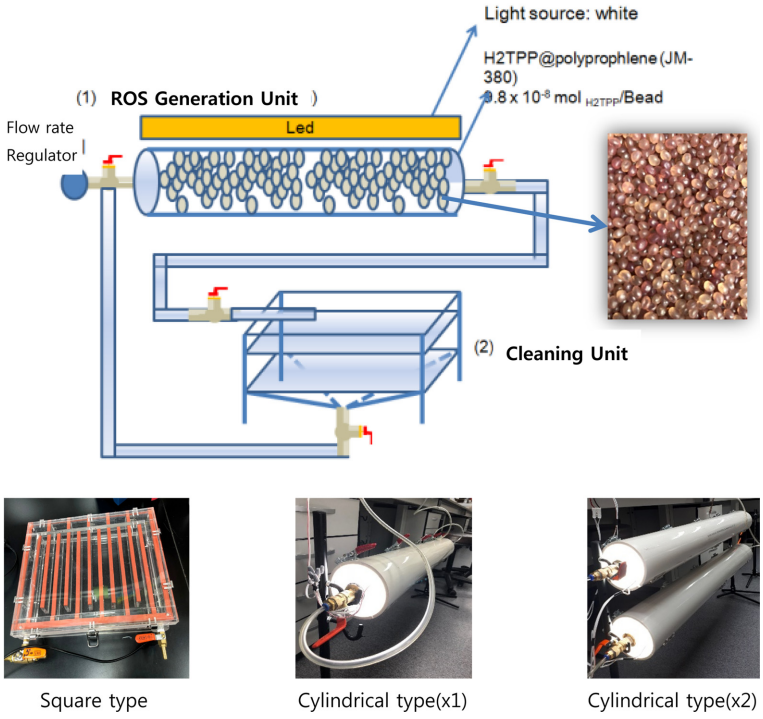


**Fig. 1.** Scheme on water disinfection device using three type of LED-PS induced ROS generation unit.

### 세균 배양

각각의 대상 세균을 TSB(Tryptic Soy Broth)에 접종하여 37°C에서 24시간 진탕 배양한 후 새로운 TSB배지에 16시간 2차 진탕 배양하였다. 배양액은 살균증류수로 1/2 희석 시리즈를 만들어 분광광도계를 이용하여 흡광도(OD600=1.0)를 측정한 후 세균 밀도를 조정하여 사용하였다.

### 감광제 (Photosensitizer; PS) 흡착 bead 제조

감광제는 410 nm의 광조사시 최대 흡광을 보이며 일중항 산소(singlet oxygen)를 가장 많이 생성하는 것으로 알려진 $H_2$tetraphenylporpyrin ($H_2$TPP; Sigma, St. Louis, MO, USA)을 사용하였다.

$1.25 \times 10^{-3}$ M의 $H_2$TPP를 (용매: dichloromethane, 총 280 mL) 220 g 의 polypropylene bead (JM-380, Lotte Chemical, Seoul, Korea)와 섞은 후 60°C에서 24시간 swelling 시켜서 흡착 시키고 최종 약 $9.8 \times 10^{-8}$ mol/bead 의 흡착율을 가지는 PS-bead를 제조하여 ROS 발생장치에 사용하였다.

### LED-PS induced ROS 발생장치

#### 사각유닛1164

유수형 ROS 발생장치로 사각형의 틀에 구조 (크기: 24 cm (w) × 35 cm (l) × 3 cm (h), 외부부피 2,520 $cm^3$, 내부부피 1,164 $cm^3$, bead 충진량 940 g) 에 PS-bead를 충진하는 방식으로, 백색광의 LED 커버를 붙여 단일방향에서 광을 조사하는 구조이다(Fig. 1). 사각유닛1164의 표면에서 측정 되는 최고 조도는 약 68.7 mW/$cm^2$ 이었으며, 모든 실험은 최고 조도에서 수행하였다. 15 L 수조에 10 L의 세척용수를 사용하였으며 유속은 목적에 따라 5-34 mL/s 에서 세균 밀도 감소효과를 조사하였다.

#### 원통유닛1640

1개의 유수형 원통유닛이며 5 L 이상의 용량의 농업용수를 살균할 수 있고 원통형 투명 용기 (크기: 115 cm (l) × 4.5 cm (d), 전체 부피 1,828 mL, bead 사용 부피 1640 mL, bead 무게 940 g)에 들어 있는 bead를 방사형으로 조사하도록 6개의 백색광의 LED가 부착된 커버로 구성하였다(Fig. 1). 원통유닛1640은 비교적 손쉽게 bead의 배치와 수거가 용이하고 구조상 변형 없는 안정적 구조이고, 손쉽게 여러 개의 유닛을 연속적으로 연결하기 용이하여 효율적으로 대용량의 세척용수를 처리할 수 있도록 제작하였다. 밀도감소 효과시험은 총 볼륨 5 L를 세척용수를 사용하였으며 16-33 mL/s 유속으로 처리하였다.

#### 더블원통유닛3280

유수형 원통유닛 (크기: 115 cm (l) × 4.5 cm (d), 전체 부피 1,828 mL, bead 사용 부피 1640 mL) 2개를 직렬로 연결한 것으로 전체 부피 3656 mL, bead 사용 부피 3280 mL)이며 실제로는 2870 mL 의 PS-bead를 충진하여 실험하였다. 실험조건은 5 L의 세척용수를 사용하였으며 유속은 25 mL/sec 으로 처리하였다.

### ROS의 측정

일중항 산소(singlet oxygen)의 발생량 측정법으로 ROS의 생성량을 측정하였다[6]. 1,3-Diphenyliosobensofuran (DPBF)는 연노랑색을 띠고 있으며 일중항 산소에 의해 분해가 되며 탈색된다. 일중항 산소의 생성은 spectrophotometer (410 nm)에서 초기 흡광도(OD)대비 시간경과에 따른 흡광도 감소와 비례하는 원리를 이용하여 ROS의 생성량을 측정하였다. DPBF 용액은 에탄올 500 mL에 DPBF 11 mg을 녹여 0.08 mM 용액을 제조하여 $OD_{410nm} = 0.8$임을 확인한 다음, 작은 그린 고정 유닛을 이용하며, 50 mL conical tube에 15 mL working solution과 감광제를 코팅한 bead (50개)를 넣은 후 불을 키고 10 min, 30 min에서 각각 $OD_{410\,nm}$를 측정하여 ROS 생성 여부를 확인하였다.

### 살균 효과 검정

광유도 ROS 발생장치의 식중독 세균의 살균 효과는 식중독 세균 5종과 신선 채소 부패세균 1종, 그리고 위생지표세균인 대장균을 수중에 log 3-4 CFU/mL 밀도로 접종하여 수중모터를 이용하여 ROS 발생장치를 통과하도록 순환시켰다. 시간경과에 따른 15분 간격으로 120분까지 시간경과에 따른 물 1 mL당 세균 수를 조사하였다. 세균 계수는 식품공전 방법에 의해 실시하였다[9]. 대상세균만을 검출할 수 있는 선택배지에 도말하여 24시간 배양한 후 전형적인 집

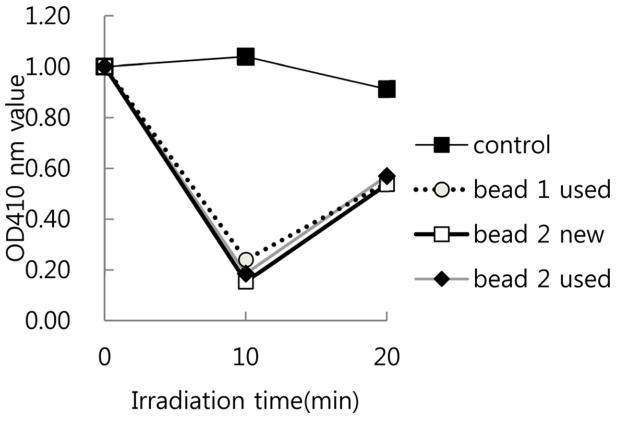


**Fig. 2.** Optical Density change of 1,3-Diphenyliosobensofuran (DPBF) in ethanol vs. LED irradiation time. Quenching of singlet oxygen by photosensitizer($H_2$TPP) in bead under 410 nm light excitation convert DPBF(green) into 1,2-dibenzoybenen(transparent). The control without light irradiation was a little change in Optical Density.

락 (*Bacillus cereus*; MYP Agar, 분홍색 집락, *Staphylococcus aureus*; Baird-Parker Agar, 볼록한 흑색집락, *Salmonella* spp.; XLD agar, 흑색 중심의 적색집락, *E. coli*; Eosin Methylene Blue Agar, 녹색 금속광택, *Listeria monocytogenes*; Oxford Agar, 흑색 집락, *Pectobacterium* spp.; Tryptic Soy Agar, 크림색 집락)을 계수하였다.

## Results and Discussion

### 광유도 ROS 발생장치의 일중항 산소 (singlet oxygen) 생성

황녹색의 1,3-Diphenyliosobensofuran(DPBF) 용액에 제조한 감광제를 흡착시킨 bead를 넣은 후 녹색광을 내는 소형 사각 LED 광원장치(조도 23.44 mW/cm$^2$)로 조사한 후 시간경과에 따라 spectrophotometer (410 nm)로 흡광도를 측정함으로써 실제 ROS를 생성하는지 확인하였다. 조사시간에 따른 흡광도는 광 조사후 10분까지 흡광도가 감소함을 알 수 있었다(Fig. 2). 흡광도의 감소는 DPBF (0.08 mM)은 감광제 bead에서 생성된 ROS의 일종인 singlet oxygen에 의해 그 구조가 깨지면서 황녹색의 색깔을 잃어 투명해지기 때문이다. 광 조사 10 분 후부터 흡광도가 증가하는 것은 DPBF용액의 용매로 사용한 에탄올이 bead에 흡착된 감광제(H2TPP)를 용출시켜 감광 효과가 저하되었기 때문으로 시간경과에 따른 ROS의 정량분석을 할 수mL 없었다.

여러 번 제작한 감광제 흡착 bead를 조사한 결과 1년전에 제조한 bead 1과 최근에 새로 만든 bead 2 모두 비슷한 양의 ROS를 생성함을 확인할 수 있었다.

### 광유도 ROS발생장치의 식중독 세균에 대한 살균 효과

수중에 접종된 식중독병원세균에 대한 LED-PS에 의해 유도된 ROS 발생장치 (더블 원통유닛 3280)의 살균효과를 조사한 결과, 세균 종류별 시간경과에 따른 밀도 감소 정도가 다양하였다(Fig. 3). *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* P1과 *B. cereus* B87은 ROS 발생장치 작동 후 30분에, *Staphylococcus aureus* A1 은 90분에 사멸하였으며 이외의 나머지 세균은 120분안에 모두 사멸하였다.

### 광유도 ROS발생장치의 세균 밀도 감소에 미치는 요인

유속에 따른 세균 밀도감소 영향

광유도 ROS 발생장치를 이용할 경우 수중에 오염된 식중독세균의 불활성화에 미치는 유속의 영향을 구명하기 위하여 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*과 *B. cereus* 를 대상으로 유속의 변화에 따른 세균의 밀도감소효과를 조사하였다(Table 2).

두 세균 모두 유속이 증가함에 따라 밀도감소율 (log CFU/mL/min)이 증가하였다. *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* 의 경우, 완전히 살균되기 까지 소요시간은 유속 5 mL/sec 에서 120분, 10 mL/sec 에서 90분, 20 mL/sec 에서 75분, 25 mL/sec 에서 30분으로 단축되었으며, 유속이 증가함에 따라 밀도 감소율(log CFU/mL/min)은 증가하였다. 이러한 결과는 유속이 증가함에 따라 수중에 존재하는 세균이 ROS 발생장치에 머무는 시간이 줄어들어 세균 세포가 완전히 불활성화되지 않았기 때문으로 판단되었다. 광유도 감광제에서 발생한 ROS은 약 22.5 kcal/mol 높은 에너지를 가지며 불안정한 상태이다. 수용액에서의 수명은 3-4 μs 이며, 확산 거리는 약 200 nm이다[8]. *B. cereus*의 경우, 20 mL/sec 이상의 유속에서만 완전히 살균되었다. 하지만 밀도 감소율 (log CFU/mL/min)은 20 mL/

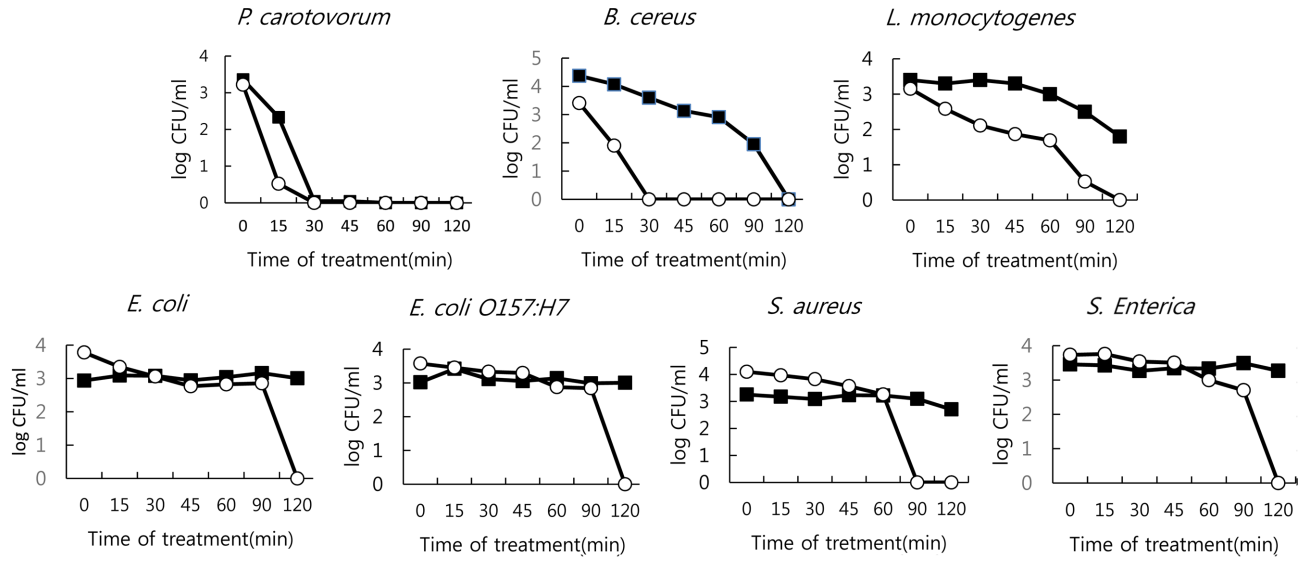


**Fig. 3.** Density reduction effect of various pathogenic bacteria over time in water treated with square type of LED-PS induced ROS generation unit 1164 (■) and cylindrical type of LED-PS induced ROS generation unit 3280(○) *S. Enterica*

**Table 2.** Effect of water flow rate on density reduction of bacteria in water treated with light irradiation using LED-PS induced ROS generation unit

| Bacterial strain tested | Flow rate (mL/sec) | Initial Conc. (log CFU/mL) | Final Conc. (log CFU/mL) | Time of treatment (min) | Reduction (log CFU/mL) | Reduction Rate (log CFU/min) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *Bacillus cereus* B87 | 5 | 3.4±0.1 | 2.6±0.1 | 120 | 0.8±0.2 | 0.007±0.001 a* |
| | 10 | 4.3±0.2 | 1.1±0.2 | 120 | 3.2±0.2 | 0.029±0.004 b |
| | 20 | 4.4±0.2 | 0.0 | 120 | 4.4±0.2 | 0.037±0.002 c |
| | 29 | 3.6±0.3 | 0.0 | 120 | 3.6±0.2 | 0.030±0.004 bc |
| *P. carotovorum* subsp. *carotovorum P1* | 5 | 3.6±0.2 | 0.0 | 120 | 3.6±0.2 | 0.030±0.002 a |
| | 10 | 4.3±0.3 | 0.0 | 90 | 4.3±0.4 | 0.048±0.003 b |
| | 20 | 3.3±0.3 | 0.0 | 75 | 3.3±0.3 | 0.044±0.002 b |
| | 25 | 3.2±0.4 | 0.0 | 30 | 3.2±0.3 | 0.107±c |

*The data are obtained at the mean±standard deviation of three individual experiments. Different letters indicate significantly differences ($P < 0.05$) among the treatments for flow rate.

**Table 3.** Effect of initial density of bacteria on density reduction of bacteria in water treated with light irradiation using LED-PS induced ROS generation unit at 20 mL/s in flow rate

| Bacterial strain tested | Initial Density (log CFU/mL) | Final Density (log CFU/mL) | Time of treatment (min) | Reduction (log CFU/mL) | Reduction Rate (log CFU/mL/min) |
|---|---|---|---|---|---|
| *B. cereus* B87 | 3.5±0.3 | 0.0 | 90 | 3.5±0.3 | 0.039±0.009 a* |
| | 3.9±0.3 | 0.7±0.2 | 120 | 3.2±0.1 | 0.027±0.001 ab |
| | 5.6±0.2 | 2.8±0.3 | 120 | 2.8±0.2 | 0.023±0.002 bc |
| *P. carotovorum* subsp. *carotovorum P1* | 3.1±0.4 | 0.0 | 45 | 3.1±0.2 | 0.069±0.002 a |
| | 4.3±0.4 | 0.0 | 90 | 4.3±0.3 | 0.048±0.003 ab |
| | 4.9±0.3 | 0.0 | 120 | 4.9±0.3 | 0.041±0.003 b |
| | 5.2±0.2 | 2.9±0.4 | 120 | 2.3±0.4 | 0.019±0.004 c |

*The data are obtained at the mean±standard deviation of three individual experiments. Different letters indicate significantly differences ($P < 0.05$) among the treatments for initial density.

sec의 유속에서, 1회 순환 시의 밀도 감소율 (log CFU/mL/cycle)은 10 mL/sec 의 유속에서 각각 가장 높았다. 이러한 결과는 세균의 종류에 따라 ROS에 대한 반응이 달라질 수 있다는 것을 의미한다. 시험에 사용한 *Pectobacterium* 속 세균은 그람 음성균으로 Enterobacteriaceae (장내세균과)에 속한다. 또한 *B. cereus* 균은 그람 양성 세균에 속한 식중독 세균을 대표한다고 할 수 있다. 그러므로 시험에 사용한 두 세균의 ROS에 대한 불활성화 특성을 종합적으로 고려하여 적정 유속을 20 mL/sec 로 정하여 다른 식중독 세균에 대한 밀도 감소 효과 시험에 적용하였다.

### 초기 세균 밀도에 따른 세균 밀도 감소 영향

ROS 발생장치의 유속을 10 mL/s으로 고정하고 밀도를 달리하여 세균을 물 (10 L)에 접종한 후 세균에 대한 살균 효과에 미치는 영향을 완전 살균에 소요된 시간, 시간당 밀도 감소율을 조사하였다(Table 3).

두 세균 모두 ROS 발생장치의 밀도감소효과는 초기 세균 밀도가 증가함에 따라 완전히 살균하는데 소요된 시간이 길어지고 분 (min) 당 밀도감소율이 낮아지는 경향을 보였다. *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*의 경우 초기 세균 밀도가 5.2 log CFU/mL 에서는 시간(min) 당 밀도감소율이 0.019로 4.9 log CFU/mL 에서의 0.041에 비해 현저하게 낮아졌다. B. cereus의 경우, 초기 밀도 5.5 log/mL 에서 약 1.4 log CFU/mL의 밀도 감소 효과를 보였고, 초기 밀도 3.9 log/mL 에서 log 3.2/mL, 초기 밀도 3.5 log CFU/mL 에서 3.5 log CFU/mL의 밀도 감소를 보였다. 초기 밀도가 3.9 log CFU/mL 이상에서는 120 분 처리시 완전 사멸되지 않았지만 3.5 log CFU/mL 에서는 90 분 만에 완전 사멸이 가능했다.

Alves 등[9]은 수중에 존재하는 세균의 종류와 밀도가 높은 경우, 발생된 일중항 산소 (singlet oxygen)와 같은 ROS가 세균 유래 유기물과 반응하여 살균효과가 감소한다고 보고하였다. 본 연구에서 초기 세균 밀도가 log 3 CFU/mL 수준으로 접종을 했을 때 광 조사 후 약 45분에 멸균이 가능하다는 것을 알 수 있었다.

**Table 4.** Bactericidal effects on pathogenic bacteria by using different type of LED-PS induced ROS generation unit

| Bacterial strain | Type of ROS generation Unit | Volume of PS-bead used (mL) | Initial density (log CFU/mL) | Reduction rate (log CFU/mL/min) | Time to reduction of 3 log CFU/mL (min) |
|---|---|---|---|---|---|
| *P. carotovorum* subsp. | Square | 1640 | 3.9±0.7 | 0.040±0.003 a* | 22.0±15.2 |
| | Cylindrical ( x 1) | 1640 | 4.0±0.1 | 0.015±0.002 b | 9.7±2.0 |
| carotovorum P1 | Cylindrical ( x 2) | 2872 | 5.3±0.5 | 0.058±0.022 a | 0.6±0.3 |
| *B. cereus* B87 | Square | 1640 | 3.8±0.3 | 0.028±0.002 a | 25.1±16.6 |
| | Cylindrical ( x 1) | 1640 | 3.5±0.9 | 0.038±0.006 a | 77.9±3.8 |
| | Cylindrical ( x 2) | 2872 | 3.4±0.3 | 0.128±0.082 b | 15.7±10.2 |
| *E. coli* | Square | 1640 | 4.0±0.2 | 0.004±0.003 a | 21.0±12.2 |
| ATCC25922 | Cylindrical ( x 1) | 1640 | 3.6±0.2 | 0.006±0.002 ab | 37.7±3.4 |
| | Cylindrical ( x 2) | 2872 | 3.8±0.3 | 0.045±0.013 b | 16.3±7.3 |
| *E. coli* O157:H7 | Square | 1640 | 4.2±2.0 | 0.004±0.004 - | 12.0±7.9 |
| | Cylindrical ( x 2) | 2872 | 3.6±0.0 | 0.029±0.001 ** | 34.9±4.3 |
| *L. monocytogens* | Square | 1640 | 3.6±0.2 | 0.011±0.002 - | 36.7±12.3 |
| ATCC19113 | Cylindrical ( x 2) | 2872 | 3.5±0.4 | 0.027±0.008 - | 36.8±26.6 |
| *S. aureus* A1 | Square | 1640 | 4.3±0.8 | 0.010±0.009 - | 33.8±44.6 |
| | Cylindrical ( x 2) | 2872 | 4.1±0.0 | 0.037±0.003 ** | 17.5±6.4 |
| *S. Enterica* | Square | 1640 | 3.6±0.2 | 0.005±0.006 - | 36.7±12.3 |
| ATCC4931 | Cylindrical ( x 2) | 2872 | 3.7±0.0 | 0.018±0.013 - | 23.0±0.8 |

*The data are obtained at the mean±standard deviation of three individual experiments. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) among the three type of ROS generation units by Duncan's multiple comparison test. ** indicate significant differences between the two type of ROS generation units by T-test.

### ROS 발생 장치의 종류에 따른 밀도 감소효과

본 연구에 사용한 3가지 유닛의 살균효과를 '시간(min) 당 밀도 감소'효과와 함께 '3 log CFU/mL 의 밀도 감소에 걸리는 시간'을 지표로 사용하여 비교하였다.

'3 log CFU/mL 밀도 감소에 걸리는 시간'은 '시간(min) 당 밀도 감소' 효과와 반대로 초기 접종 밀도가 높을수록 짧아지는 경향이었으며, 초기 접종 밀도를 균일하게 하는 것이 필요하였으나 실제 실험에서는 초기 접종 밀도를 항상 일정하게 조정할 수 없어 두 가지 지표를 종합적으로 비교하여 살균효과를 보다 객관적으로 판단하였다.

Table 4에서 보는 바와 같이, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*는 사각유닛1164에서 3 log CFU/mL 밀도가 감소하는데 약 22분이 걸렸으나 더블원통유닛3280에서는 약 0.6분 소요되었다. 이러한 정도의 시간(min) 당 밀도 감소 효과라면 저장된 농업용수의 살균 뿐만 아니라 지하수를 끌어 올리는 배관에 ROS 발생장치를 직접 연결하여 오염된 미생물의 살균에 실용적으로 이용할 수 있을 것으로 판단되었다.

*B. cereus* B87는 더블원통유닛3280에서 가장 높은 시간(min) 당 약 0.128 log CFU/mL 밀도 감소 효과를 보였으며, 원통유닛1640, 사각유닛1164 순으로 밀도 감소 효과가 높았다. 이러한 효과는 원통유닛1640에 비해 시간(min) 당 밀도감소효과가 약 3.4 배 증가한 것이다. 3 log CFU/mL 밀도 감소에 걸리는 시간(min)은 더블원통유닛3280, 사각유닛1164, 원통유닛1640 순으로 짧게 소요되었다.

*E. coli* O:157:H7 은 다른 *E. coli* 균주나 다른 균에 비해 ROS에 대해 비교적 감수성이 낮았다. 사각유닛1164를 이용한 4회의 실험에서 2회는 균의 밀도 감소가 없었으며 위의 결과는 밀도 감소 효과를 보인 2회의 실험결과를 종합하였다. 사각유닛1164에서 밀도 감소효과가 비교적 낮았으나 더블원통유닛3280에서는 시간(min) 당 0.030 log CFU/mL의 밀도 감소효과를 보였다.

*L. monocytogenes* ATCC19113은 그램 양성균으로 다른 그램 양성균에 비해 상대적으로 낮은 ROS에 대한 민감도를 보였다. PS-bead의 양이 1.75배 많은 더블원통유닛3280의 시간(min) 당 밀도감소효과는 사각유닛1164에 비해 약 2.5배 증가하였으나 3 log CFU의 밀도 감소에 소요되는 시간(min)은 차이가 없었다.

*S. aureus* A1은 그람 양성균으로 사각유닛1164와 더블원통유닛3280의 시간(min) 당 밀도 감소와 3 log CFU/mL 밀도 감소에 소요되는 시간(min)은 각각 0.01과 0.034 log CFU/mL/min, 33.8과 9.6 분으로 더블원통유닛3280의 시간(min) 당 밀도감소효과가 사각유닛1164에 비해 약 3.4 배 증가하였으며, 3 log CFU/mL 밀도 감소에 소요되는

시간(min) 또한 크게 단축되었다.

*S. enterica* ATCC4931은 그람 음성균으로 ROS에 대한 감수성이 매우 낮았다. 더블원통유닛3280의 시간(min) 당 밀도 감소와 3 log CFU/mL 밀도 감소에 소요된 시간(min)은 각각 0.018 log CFU/mL/min, 23분(min)으로 사각유닛1164에 비해 큰 차이가 없었다.

ROS (일중항 산소)에 대한 감수성이 균에 따라 다르지만 기본적으로 bead의 양을 늘리거나 접촉 시간을 늘려주는 방법에 의해 대부분 살균 효과의 제고가 가능함을 알 수 있었다.

본 연구에서 그람 양성균은 감광제를 이용한 ROS에 대해 그람 음성균에 비해 효과적으로 불활성화 됨을 알 수 있었다. 그람 양성균은 세포막 외부에 두꺼운 펩티도그리칸 층이 있으나 상대적으로 다공질이어서 투과장벽으로서의 역할을 하지 못하여 광유도 감광제에 의해 생성된 활성산소를 쉽게 흡수하여 세포막과 상호작용을 통해 막으로서의 기능을 상실하는 것으로 알려져 있다. 그람 음성균은 복잡한 다층구조의 세포벽과 강한 음전하를 가진 outer membrane이 감광제에서 생성된 ROS를 가로채서 세포막과의 상호작용하기 어렵기 때문이다[3].

### 더블원통유닛3280의 밀도 감소 효율

사각유닛1164과 원통유닛1640을 충진하는데 필요한 PS-bead는 940 g으로 동일하였다. 더블원통유닛3280에 사용한 Ps-bead의 양은 원통유닛1640에 사용한 PS-bead (940 g)에 706 g 의 PS-bead(약 0.75배)를 추가하여 총 1.75배의 양으로 실험하였다.

*P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, *B. cereus*, 그리고 *E. coli* 각각 단일균을 대상으로 사각유닛1164와 원통유닛1640의 밀도 감소 효과를 비교하였다. 광 조사 시간(min)당 밀도 감소 효과는 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* 을 제외하고 *B. cereus*와 *E. coli* 에 대한 원통유닛1640의 밀도 감소효과가 사각유닛1164보다 다소 증가하였으나 유의적인 차이를 보이지 않았다(Table 4).

원통유닛1640과 더블원통유닛3280에서 민감한 밀도감소를 보인 *B. cereus, P. carotovorum* subsp. *carotovorum* P1, 그리고 *E. coli* ATCC 25922에 대한 시간(min) 당 밀도 감소율(log CFU/mL/min)을 비교하였다.

물이 흐르는 유수형 디자인 중에서 원통유닛1640의 경우 *B. cereus*와 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, 그리고 *E. coli* ATCC 25922에 대한 시간(min) 당 평균 밀도 감소율은 각각 0.038, 0.015, 0.006 log CFU/mL/min 이었다. 반면에 원통유닛1640을 두 개 연결한 더블원통유닛3280은 물이 흐르는 유수형임에도 불구하고 *B. cereus*와 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, 그리고 *E. coli* ATCC 25922 에 대한 시간(min) 당 평균 밀도 감소율이 각각 0.128, 0.058, 0.045 log CFU/mL/min 로 밀도 감소 효과가 월등히 높았다. 원통유닛1640의 시간(min) 당 평균 밀도 감소율을 1로 보았을 때, 싱글유닛 두 개가 합쳐진 더블원통유닛3280에 의한 살균 효율은 각각 3.4배, 3.9배, 8.1배 증가하였다.

싱글유닛과 더블유닛의 세균 밀도 감소효과가 월등히 차이 나는 이유는 정확하게 알 수 없으나, 일중항 산소 (ROS)가 각각의 세균을 사멸시키기 위해서는 최소한의 시간과 ROS 생성량이 필요하다. 싱글유닛의 경우 PS-bead의 표면적과 ROS 발생량이 필요한 임계점 이하 이므로 여러 번의 순환을 거쳐야 하고 순환과정으로 인해 밀도 감소효율이 고정형에 비해 낮아지지만 더블 유닛의 경우는 ROS의 생산 PS-bead의 전개 면적과 ROS 생산량이 늘어나고 이들이 지수적으로 상승효과를 나타내어 결국 세균의 불활성화 임계점에 접근 하여 ROS발생장치에 1회 통과하여 죽거나 상처 받은 세포가 증가할 것이다.

원통유닛1640과 더블 유닛의 bead량의 증가 비율은 1.75배이며, 살균 효율이 산술적으로 증가 된다고 봤을 때 살균 효율은 1.75 배 증가 하여야 하나 실제는 3.4-8.1배 증가하였다. 이러한 결과는 bead의 양이 증가함에 따라 밀도 감소 효과는 일부 대상세균에서 지수적으로 증가함을 알 수 있었다.

싱글유닛을 여러 개 직열로 연결하면 밀도 감소 효율이 높아져서 1회 순환으로 완전 살균이 가능한 유닛을 디자인 할 수 있을 것이다. 실제 유닛 수의 증가에 따른 밀도 감소 효과는 지수적으로 증가한다는 결과로 볼 때, 실제 더 적은 수의 멀티 유닛이 필요할 수 있을 것이다. 지금까지의 결과를 종합하면 적정 파장의 LED 사용, 적정 유속, 2-4개의 다중 유닛을 조합이면 '1회 순환'로 다양한 균에 대한 충분한 밀도 감소효과를 얻을 수 있을 것이다.

## 국문요약

본 연구는 기존 기초 연구를 통해 효과가 확인된 '광에너지유도 활성산소'를 이용하여 세척용수를 소독할 수 있는 신개념의 순환형 물 소독 시스템에 대해 실증하는 것이다. 다양한 형태의 감광제 이용 광유도 ROS 발생장치를 이용하여 여러 종류의 병원성 세균을 1시간안에 3 log CFU/mL 이상의 밀도를 감소시키는 조건을 탐구하였다.

PS-bead이용 광유도 ROS 발생장치의 밀도 감소 효과에 미치는 주요 요인을 분석한 결과, 세균의 종류에 따라 ROS에 대한 밀도 감소효과가 서로 상이 하였다. *B. cereus*와 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*에 대한 밀도 감소효과는 높았으나 대장균 등 식중독 세균들에 대한 밀도 감소효과는 상대적으로 낮았다. 순환형 물 소독시스템에서 유속은 유속이 빨라질 수록, 초기 세균밀도가 낮을수록 밀도 감소효과가 증가하는 경향을 보였다. bead의 양이 증가함에 따라 밀도 감소 효과는 일부 대상세균에서 지수적

으로 증가함을 알 수 있었다. 싱글 유닛 두 개를 연결한 더블원통유닛3280은 *B. cereus* 나 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*에 대한 실험에서 30 분 안에 약 3 log CFU/mL 이상의 균을 완전히 살균할 수 있었다.

## Acknowledgement

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(과제: PJ0126762019)의 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## Reference

1. Food Information Statistics System, (2019, Sep. 29). Domestic Food Supply(Consumption) by year. Retrieved from: http://www.atfis.or.kr/statistics/M003000000/main.do?category=organization#
2. Murray, K., Wu, F., Shi, J., Xue, S.J., Warriner, K., Challenges in the microbiological food safety of fresh produce: Limitations of post-harvest washing and the need for alternative interventions. *Food Qual. and Saf.*, **1**, 289-301 (2017).
3. Durantini, E.N., Photodynamic Inactivation of Bacteria. *Current Bioactive Compound 2*, 127-142 (2006).
4. Bechec, M.L., Pigot, T., Lacombe, S., Chemical quenching of singlet oxygen and other reactive oxygen species in water: A reliable method for the determination of quantum yields in photochemical processes? *Chem. PhotoChem.* **2**, 622-631 (2018).
5. Luksiene, Z., Zukauskas, A., Prospects of photosensitization in control of pathogenic and harmful microorganisms. *J. of Appl. Microbiol.*, **107**, 1415-1424 (2009).
6. Racine, P., Auffray, B., Quenching of singlet molecular oxygen by *Commiphora myrrha* extracts and menthofuran. *Fitoterapia*, **76**, 316-323 (2005).
7. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), 2019, November 29). Food Code. Retrieved from: https://www.mfds.go.kr/eng/brd/m_15/view.do?seq=69982&srchFr=&srchTo=&srchWord=&srchTp=&itm_seq_1=0&itm_seq_2=0&multi_itm_seq=0&company_cd=&company_nm=&page=3
8. Foote, C.S., Clennan, E.L., 1995. Properties and reactions of singlet dioxygen. In: Foote C.S., Valentine J.S., Greenberg A., Liebman J.F. (Ed), Active oxygen in chemistry. Structure Energetics and Reactivity in Chemistry Series (SEARCH series), vol 2. Springer, Dordrecht, pp. 105-106.
9. Alves, E.A., Rodrigues, J.M.M., Faustino, M.A.F., Neves, M.G.P.M.S., Cavaleiro, J.A.S., Lin, Z., Cunha, A., Nadais M.H., Tome, J.P.C., Almeida, A., A new insight on nanomagneteporphyrin hybrids for photodynamic inactivation of microorganisms. *Dyes and Pigments*, **110**, 80-88 (2014).