J. Fd Hyg. Safety
Vol. 23, No. 4, pp. 309~313 (2008)

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

식품제조 환경에서 식품위해세균의 교차오염 감소를 위한 청동합금 유기의 살균효과

이은진 · 박종현*
경원대학교 식품생물공학과

Inactivation Activity of Bronze Alloy *Yugi* for Reduction of Cross-Contamination of Food-borne Pathogen in Food Processing

Eun Jin Lee and Jong-Hyun Park*
Department of Food Science and Biotechnology, Kyungwon University
(Received November 11, 2008/Revised November 25, 2008/Accepted November 29, 2008)

ABSTRACT -To investigate the antibacterial activity of the traditional bronze alloy *Yugi*, the cultures of *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157, *Enterobacter sakazakii*, and *Bacillus cereus* were exposed to the metal coupons of bronze, copper, tin, and stainless steel, and the sterilizing activities were analyzed. Antibacterial efficacy of copper coupon toward *S.* Typhimurium*, E. coli*, and *E. sakazakii* were the highest among them and those were followed by bronze, tin, and then stainless steel in the activity order. However, there was little sterilizing activity on Gram-positive *B.cereus*. Minimal inhibitory concentrations of cupric ion were 25 ppm for *S.* Typhimurium, *E. coli*, and *E. sakazakii*, and 50 ppm for *B. cereus. Yugi* bronze alloy showed more rigidity and practicality in comparison with copper, and has been used in Korea. Therefore, the bronze alloy may be more effective to reduce the cross-contamination of *S.* Typhimurium, *E. coli*, and *E. sakazakii* than stainless steel in food processing surface.

서 론

한국인의 식생활에서 사용되어 왔던 놋그릇은 유기라고도 불리우며 구리합금인 청동(bronze)으로 제작되었으며, 스테인레스 그릇이 출현하기 이전부터 오랫동안 사용되어 왔다. 바로 얼마 전에도 제사 등 특수한 경우에 사용되었고 일부 한식 음식점등에서는 아직도 사용되고 있으나 그의 활용은 점점 더 미약한 수준이 머물고 있다. 이러한 유기는 구리와 주석의 한 합금형태인 유기합금이며 3가지 형태가 존재한다. 이들 합금은 구리와 주석이 78%과 22%의 합금으로 되어 있는데 주물후 망치질로 만드는 방짜유기, 반방짜 유기, 혹은 단지 주물만으로 만드는 형태인 주물유기의 세 종류가 현재 시장에서 유통되고 있다. 그런데 그 중 방짜유기는 매우 청명하고 큰 아름다운 소리를 낼 수 있어서 악기로도 사용되어 왔으나 식탁용 식기류로 더 많이 사용되어 왔고 이들은 숫가락 셋트로부터 다양한 큰 형태의 식기류로 사용되고 있다. 이러한 구리합금용기는 아마도 청동기 시대로부터 사용되어 온 금속이나 우리의 유기는 전 세계적으로 거의 찾아볼 수 없는 합금형태이며 최근에는 이러한 형태의 유기합금의 생물학적인 특성에 대한 연구가 외국에서도 이루어지고 있는 실정이다.

구리는 일반적으로 생체에서 필요로 하는 필수 미량원소이다. 이들은 생체내에서 많은 metalloenzyme과 단백질과 결합하여 전자전달, 산화환원 등의 중요한 반응에 관여하게 된다[1]. 산화환원반응에서의 구리의 역할은 구리가 외부 화학적 환경에 따라서 1가에서 2가로의 전이가 되기 때문에 이러한 산화환원 반응에서 역할을 하게 된다[2]. 그러나 구리에 대한 미생물의 생체내에서의 요구량은 1-10 μM로 낮은 편이다. 반면에 과량의 구리는 호기성 세균에게는 독성을 보이게 된다[3]. 구리의 독성작용은 핵산과 결합에 의하거나 효소의 촉매부위의 변형, 세포막의 산화 등에 기인한다고 보고되고 있다[4-7].

청동(bronze)의 한 성분인 구리는 스테인레스 스틸이나 플라스틱 소재와 비교하여 여러 가지 미생물에 항균 효과가 있는 것으로 보고되고 있다[8-11]. 따라서 구리와 그 구리 함유 물질은 살균제, 살조제, 곰팡이제거제, 축산첨가물, 식품첨가물, 식물항균제, 기타 보존제로 활용되어 왔다[12-13].

*Correspondence to: Jong-Hyun Park, Department of Food Science and Biotechnology, Kyungwon University, Sujeong-Gu, Seongnam-Si, Kyunggi-Do 461-701, Korea
Tel : 82-31-750-5523, Fax : 82-31-750-5273
E-mail : p5062@kyungwon.ac.kr

아울러 이들 물질은 박테리오파지의 저감화에도 효능이 있는 것으로 보고되었다[14]. 유기의 살균효과에 대한 Jung 등[15], Noyce 등[16], Wilks 등[17]의 보고에 의하면 구리합금은 스테인레스 스틸보다는 더 높은 병원균의 비활성화에 관여한다고 했다. 병원에서 기회감염을 줄이기 위하여 초기에는 청동을 문고리로의 사용이 권장되었다. 그러나 현재의 병원의 작업공간 환경과 기기등에서의 스테인레스 스틸의 적용은 권장되고 있지 않은 상태이다[18]. 그러나 병원공간 내에서의 구리합금의 사용은 *Clostridium difficile*의 감염을 줄일 수도 있을 것으로 제안되었다. 더구나 식품제조가공 공간에서의 호기성 세균에 대한 연구에서 세포사멸을 보여 주기도 하였다[16,19-20].

식중독은 그 원인물질에 따라 생물학적 식중독, 화학적 식중독, 자연독 식중독으로 분류한다. 이러한 식중독 가운데 약 90%는 생물학적 식중독이 차지하고 있기 때문에 이러한 식중독을 제어하는 것이 전체 식중독 환자를 줄일 수 있는 방법이 될 수 있다. 이러한 생물학적 특히, 세균성 식중독을 일으키는 인자들은 우리나라에서는 병원성 *E. coli, Salmonella* spp.이 제일 큰 문제가 되고 있으며 최근에는 식품기준규격에 *B. cereus*의 정량기준이 설정되었고 유아용식품에서 *E. sakazakii* 오염이 사회적인 이슈로 떠오르고 있다.

따라서 본 연구에서는 세계적으로는 거의 사용하지 않고 국내에서만 주로 사용되고 있는 구리합금 청동 놋그릇 유기소재의 표면에서 *Salmonella* spp., *E. coli* O157, *E. sakazakii, B. cereus* 식중독 세균이 노출되었을 때 이들의 사멸율을 비교하여 이 합금을 식품제조 환경에서 활용하여 교차오염을 줄일 수 있는지에 대한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 시약

본 실험에 사용된 균주는 *Salmonella enterica* subsp. Typhimurium ATCC 12023, *S.* Typhimurium ATCC 14028, *E. coli* O157:H7 NCTC 12079, *E. coli* O157:H7 505B, *E. sakazakii* ATCC 51329, *E. sakazakii* NCTC 2949, *B. cereus* KCCM 1094, *B. cereus* KCCM 40935등이 사용되었다. 냉동건조된 균주를 brain heart infusion broth (Difco, Becton, Dickinson and Company Sparks, MD, USA)에서 37 °C로 활성화하여 사용하였다. Tryptic soy broth (TSB, BD, New Jersey, USA)에서 배양된 배양액을 각각의 금속표면에 떨어뜨려 일정시간이 지난 후에 다시 회수하여 선택배지에서 생균수를 측정하였다. 선택 및 선별배지로는 SS agar (Difco), EMB agar (Difco), MYP agar (Difco)와 DFI agar (Oxoid Ltd., Hampshire, England)가 사용되었다. 이때 사용된 시약은 모두 특급시약을 사용하였다.

금속쿠폰

4가지의 금속쿠폰을 사용하였다. 스테인레스 스틸, 주석, 구리, 청동 구리합금을 일정크기(7cm × 7cm)로 만들어 사용하였다. 스테인레스 스틸은 74% Fe, 18% Cr, 8% Sn로 이루어져 있고 놋쇠는 78% Cu와 22% Sn로 구성되어 있으며, 주석과 구리쿠폰은 각각 100% 주석과 구리로 만들어져 있다. 이 때 사용한 청동합금으로 방짜유기를 사용하였으며 정확히 계량된 구리와 주석을 불에 달구어 메질(망치질)을 되풀이해서 얇게 늘여가며 형태를 잡아가는 기법으로 제작되었다.

금속쿠폰상에서의 노출 생존율 측정

10 mL의 TSB에서 37 °C 24시간동안 전 배양시킨 각 균주를 8 log CFU/mL의 수준으로 초기균수를 조정하여 각각의 금속쿠폰에 20 μl씩을 떨어뜨렸다. 0시간부터 72시간까지 상온에서 방치하여 24시간별로 각각 50 μl 멸균증류수로 20회씩 pippeting 하여 건조된 세균을 2회 회수하여 TSA에 도말한 후 37 °C에서 24시간 동안 회복 및 배양을 하여 형성된 집락을 계수하였다. 각 대상균주를 3반복 실험하여 그 평균과 표준 오차를 계산하였다.

구리이온(Cu^{2+}) 농도별 살균력 측정

구리이온의 미생물 저해농도를 측정하기 위한 시험으로 대상 균주는 *S.* Typhimurium ATCC 14028, *B. cereus* KCCM 40935, *E. coli* O157: H7 505B, *E. sakazakii* ATCC 51329와 *E. sakazakii* NCTC 2949 를 사용하였다.

$CuSO_4$를 0, 100, 250, 500 ppm이 되도록 멸균 증류수에 녹이고 0.45 μm membrane filter (Sartorius, Hannover, Germary)에 여과시켰다. 그 여과액을 최종 농도가 0, 10, 25, 50 ppm이 되도록 $CuSO_4$ 수용액 1 mL을 7 log CFU/mL 수준의 9 mL의 0.85% NaCl에 혼합하여 시험 용액을 만들었다. 시험 용액은 상온에서 0, 0.5, 1, 2, 6, 24, 72시간 방치하였으며 후에 각각 100 μl씩 회수하여 TSA에 도말한 후 37 °C에서 24시간동안 회복 및 배양을 하여 형성된 집락을 계수 하였다. 희석이 필요한 경우 10진 희석법을 이용하였다.

결과 및 고찰

놋그릇 유기 청동합금의 살균력

유기는 78%의 구리(copper)와 22%의 주석(tin)이 섞여 있는 합금이다[15]. 따라서 본 실험에는 유기 항균 성분을 알기 위해 대조구 금속으로 스테인레스 스틸, 방짜유기, 100% 주석, 100% 구리쿠폰($7\times7cm^2$) 상에서 노출시간에 따른 생균수를 측정하였다. 대상 균주로는 총 8개의 균주이며 각각 두 종의 *S.* Typhimurium, *E. coli* O157:H7, *B. cereus*, *E. sakazakii* 공시균주를 3반복 실험하였다. *S.*

Typhimurium의 경우 100% 구리에서 24시간에 8 log CFU/mL 모두 사멸하는 것으로 나타났고 유기는 24시간째에 4 log CFU/mL의 생균수를 보이다가 그 후 시간이 지날수록 약간 증가하는 것으로 나타났다. 스테인레스 스틸과 주석 쿠폰에서는 완만한 기울기로 72시간이 지난 후에도 6 log CFU/mL의 생균수를 유지해 약간만 사멸이 일어난 것으로 보이는데 이는 금속의 영향보다는 건조에 의한 사멸이 있는 것으로 사료되었다(Fig. 1). *E. coli* O157:H7 은 전반적으로 급격한 기울기를 보이며 생균수의 감소를 나타내었는데 구리와 유기에서 모두 48시간 이내에 사멸하는 것으로 나타났으며 스테인레스 스틸과 주석 쿠폰에서는 72시간까지 1~2 log CFU/mL의 생균이 측정되었다(Fig. 2). *E. sakazakii*의 경우에는 *S.* Typhimurium과 유사한 결과를 나타내었다(Fig. 3). 결과를 종합해 볼 때 Gram(-) 세균인 *S.* Typhimurium과 *E. coli, E. sakazakii*는 100% 구리 >> 방짜유기> 100%주석 > 스테인레스 스틸 순으로 항균성이 높은 것으로 나타났다. Wan등[21]의 결과에 의하면 구리를 의료 기구에 ion implantation 시켰을 때 99%이상의 항균 효과가 나타났다고 보고하여 본 연구와 일치하는 결과를 나타내었다. 그러나 Gram(+) 세균인 *B. cereus*는 24시간째 이후로 3~4 log CFU/mL로 생균수를 유지하고 있어 금속의 종류와 관계없이 생균수를 유지하는 것으로 보인다(Fig. 4). Jung 등[15]은 방짜유기의 항균성 측정에서 *E. coli* 와 *S.* Typhimurium이 25 °C에서 16시간 배양됐을 때 10^7-10^8 CFU/mL에서 10^1 CFU/mL 의 생균수를 보였다고 보고하였다. 또한 Gram(-) 균주인 *E. coli* 와 *S.* Typhimurium이 Gram(+) 균주인 *B. cereus*와 *S. aureus*보다 항균 효과가 높다고 보고하여 동일한 결과를 보임을 알 수 있었다.

위의 결과를 볼 때 유기는 스테인레스 스틸보다는 오염된 세균을 사멸하는 효과가 클 것으로 보이며 식품제조가공 공간에서의 활용으로 교차오염을 줄일 수 있을 것으로 보인다.

세균별 구리이온 농도별 살균력 분석

구리이온에 대한 각각의 세균 저해농도를 알기위해 증류수에 용해한 CuSO4 수용액 1 mL을 9 mL의 세균 함유액과 혼합하여 저해농도를 최종 농도가 0, 10, 25, 50 ppm이 되도록 조정하였다. 대상 균주는 *S.* Typhimurium ATCC 14028, *B. cereus* KCCM 40935, *E. coli* O157:H7 505B,

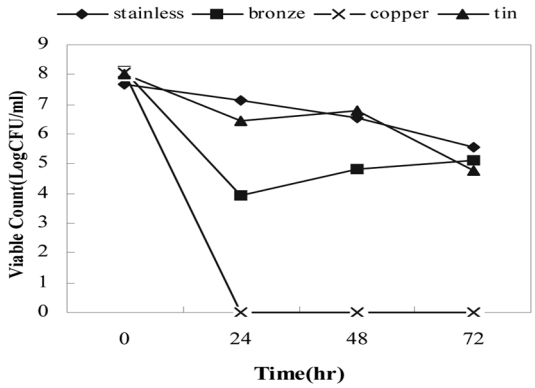

Fig. 1. Survial profile of *Salmonella* Typhimurium exposed on the stainless steel, bronze, copper, and tin copouns at different times. *S.* Typhimurium ATCC 12023 and *S.* Typhimurium ATCC 14028 were used.

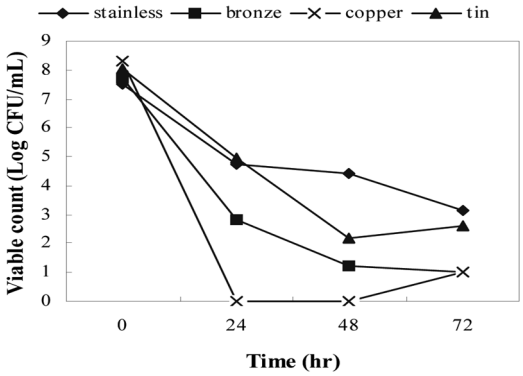

Fig. 3. Survial profile of *E. sakazakii* exposed on the stainless steel, bronze, copper, and tin coupons at different times. *E. sakazakii* ATCC 51329 and *E. sakazakii* NCTC 2949 were used.

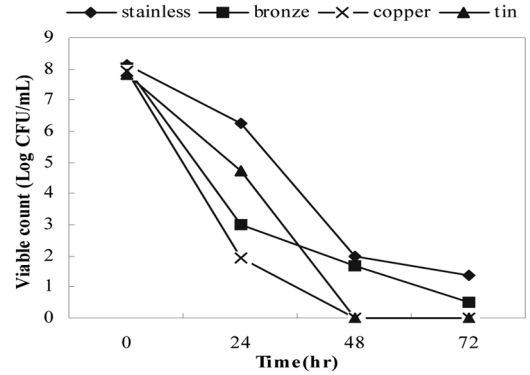

Fig. 2. Survial profile of *E. coli* O157 exposed on the stainless steel, bronze, copper, and tin coupons at different times. *E. coli* O157:H7 NCTC 12079 and *E. coli* O157 : H7 505B were used.

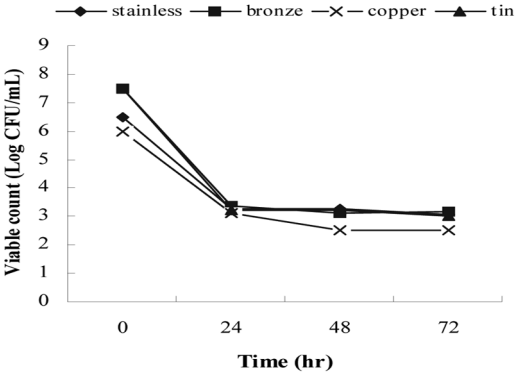

Fig. 4. Survial profile of *B. cereus* exposed on the stainless steel, bronze, copper, and tin coupons at different times. *B. cereus* KCCM 1094 and *B. cereus* KCCM 40935 were used.

E. sakazakii ATCC 51329를 사용하였다. 결과를 보면 각각 구리(Cu^{2+}) 이온의 최소생육저해농도는 *S.* Typhimurium의 경우 25 ppm, *B. cereus*는 50 ppm, *E. coli* O157: H7과 *E. sakazakii* ATCC 51329는 25 ppm으로 나타났다. Jung 등[15]은 구리이온이 *E. coli*에서는 15 ppm, *S. aureus*는 25 ppm이 가해지면 최소생육저해농도로 작용한다고 보고하였다. 본 실험결과가 다소 높은 농도에서 저해되는 것으로 보이나 10~25 ppm 사이에 15 ppm 간격이 있어 유사한 결과를 얻은 것으로 사료된다. 각 세균별로 생육저해농도가 다른 이유로 세균마다 다른 구리 독성의 극복 기작이 있다고 보고하였다. Carlos와 Felix[22]는 구리농도에 따른 저항에 관여하는 세포의 기작 기능은 하나이상일 것으로 예상하였다. Gram(+) 균인 *B.cereus*와 *S.aureus*는 비교적 생육저해농도가 높아 구리이온에 저항성이 큰 것으로 나타났다.

구리(100%)금속의 경우 사멸률을 뛰어났으나 변형이 쉽고 부식과 심한 변색을 야기하기 때문에 실제 산업적 정용을 힘들 것으로 사료된다. 따라서 강한 경도를 갖고 있으며 변색이 적고 사용할수록 광이 나는 방짜유기를 산업환경에 적용시킬 경우 *E. sakazakii*를 포함한 Gram(-) 세균의 효과적인 제어를 도모할 수 있을 것으로 사료된다. 전통 식기인 유기 소재로 항 미생물 특성을 연구하기 위해 7~8 log CFU/mL의 초기균수로 이들 합금표면에서의 건조한 후 생존력 측정결과 Gram(+) 세균인 *B. cereus*는 24시간째 이후로 3~4 log CFU/mL로 생균수를 유지하고 있어 금속의 종류와 관계없이 높은 생존율을 보여 주었다.

그러나 Gram(-) 세균인 *S.* Typhimurium, *E. coli*, *E. sakazakii*는 구리표면 >> 방짜유기표면 > 주석표면> 스텐인레스 스틸 표면 순으로 항균성이 높은 것으로 나타났다.

그러므로 전통적으로 우리가 사용해 왔던 청동 놋그릇 유기소재에 *S.*Typhimurium, *E.coli* O157, *E.sakazakii*,등의 식중독 세균이 노출시 스테인레스 스틸보다는 사멸이 잘 일어나기 때문에 이 합금을 식품제조 환경에서의 활용하여 교차오염을 줄일 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

청동합금인 우리 전통 식기 놋그릇 유기 소재의 항미생물 특성을 연구하기 위해 주요한 식중독 세균인 *Salmonella* spp., *E. coli* O157, *E. sakazakii*, *B. cereus*의 배양액을 유기, 구리, 주석, 스테인레스 스틸 쿠폰에 노출 건조 후 생균정도를 분석하였다. 이들 금속표면에서의 살균력 측정결과 Gram(-) 세균인 *S.* Typhimurium, *E. coli*와 *E. sakazakii*는 구리가 가장 높았고 유기, 주석표면, 스테인레스 스틸 금속표면 순으로 항균성이 높은 것으로 나타났다.

그러나 Gram(+)인 *B.cereus*의 살균효과는 어느 금속표면에서도 살균효과가 거의 나타나지 않았다. *S.* Typhimurium, *E. coli*와 *E. sakazakii*의 구리이온(Cu^{+2}) 최소생육저해 농도는 25 ppm이었지만 *B. cereus*의 경우는 50 ppm으로 높은 것으로 나타났다. 따라서 구리와는 다르게 강한 경도를 갖고 있는 유기 소재를 식품제조 환경에 적용시킬 경우 *Salmonella* spp.를 포함한 주요한 Gram(-) 세균의 교차오염을 효과적으로 저감화할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2007년도 경원대학교 학술연구비 지원에 의하여 수행되었고 실험에서 사용한 금속쿠폰은 방짜유기 무형문화재 77호인 이봉주님께서 제공해 주셨으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Lontie R.: Copper proteins and copper enzymes. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. pp.208-216 (1984).
2. Cotton F.A., Wilkinson G.: Advanced inorganic chemistry, 5th. ed. Wiley, New York, NY, USA. pp1334-1338 (1988).
3. Nies D.H.: Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol*., **51**, 730-750 (1999).
4. Rodriguez M., Farias R.N., Massa E.M.: Membrane-associated redox cycling of copper mediates hydroperoxide toxicity in *Escherichia coli. Biochim. Biophys. Acta*, **1144**, 77-84 (1993).
5. Domek M.J., Lechavallier M.W., Cameron S.C., Mcfeters G.A.: Evidence for the role of copper in the inkury process of coliform bacteria in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol*., **48**, 289-293 (1984).
6. Simpson J.A., Cheeseman K.H., Smith S.E., Dean R.T.: Free-radical generation by copper ions and hydrogen peroxide. *Biochem. J*., **254**, 519-523 (1988).
7. Kobayashi S., Ueda K., Komano T.: The effects of metal ions on the DNA damage induced by hydrogen peroxide. *Agric. Biol. Chem*., **54**, 69-76 (1990).
8. De Veer I., Wilke K., Ruden H.: Bacteria-reducing properties of copper-containing and non-copper-containing materials, II. Relationship between microbiocide effect of copper-containing materials and copper ion concentration after contamination with moist and dry hands. *Zentralbl. Hyg. Umweltmed*., **195**, 516-528 (1994)
9. Faundez G., Troncoso M., Navarrete P., Figueroa G.: Antimicrobial activity of copper surfaces against suspensions of *Salmonella enterica* and *Campylobacter jejuni. BMC Microbiol*., **4**, 19-23 (2004).
10. Rogers J, Dowsett A.B. , Ennis P.J., Lee J.V., Keevil C.W.: The influence of plumbing materials on biofilm formation and growth of *Legionela pneumophila* in potable water systems containing complex microbial flora. *Appl. Environ. Microbiol*., **60**, 1842-1851 (1994).

11. Schoenen D., Schlomer G.: Microbial contamination of ater by pipe and tube materials: 3. Behaviour of *Escherchiacoli, Citrobacter freundii* and *Klebsiella pneumoniae. Zentralbl. Hyg. Umweltmed*., **188**, 475-480 (1989).
12. Cooksey D.A.: Genetics of bactericide resistance in plant pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol*., **28**, 201-219 (1990).
13. Foye W.O.: Antimicrobial activities of mineral elements. Marcel Cycels, 2nd. New York, NY, USA. pp.387-419 (1977).
14. Balogh B, Jones JB, Momol M.T., Olson S.M.: Persistence of bacteriophages as biocontrol agents in the tomato canopy, p.299-302. In: Momol M.T. Ji P., Jones J.B.(ed.), Proc. 1st Int. Symp. Tomato Dis., 2005 International Society for Horticultural Science, Acta Hortic. 695 (2005).
15. Jung M.K., Lee M.Y., Park J.H.: Inhbitory effect of cupric ion diffused from brass ware on the growth of *E.coli* O157:H7, *S.typhimurum, S.aureus*, and *B.cereus*. Food Sci. Biotechnol., 13, 680-683 (2004).
16. Noyce J.O., Michels H., Keevil C.W.: Use of copper cast alloys to control *Escherichia coli* O157 cross-contamination during food processing. *Appl. Environ. Microbiol*., **72**, 4239-4244 (2006).
17. Wilks S.A., Michels H., Keevil C.W.: The survival of *Escherichia coli* O157 on a range of metal surfaces. *Int. J .Food Microbiol*., **105**, 445-454 (2005).
18. Noyce J.O., Michels H., Keevil C.W.: Potential use of copper surfaces to reduce survival of epidemic meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the health care environment. *J. Hosp. Infect*., **63**, 289-297 (2006).
19. Weaver L., Michels H.T., Keevil C.W.: Survival of *Clostridium difficile* on copper and steel: futuristic options for hospital hygiene. *J. Hosp. Infect*,. **68**, 145-151 (2008).
20. Wilks S.A., Michels H.T., Keevil C.W.: Survival of *Listeria monocytogenes* ScottA on metal surfaces: implications for cross contamination. *Int. J. Food Microbiol*., **111**, 93-98 (2006).
21. Wan Y.Z., Xiong G.Y., Liang H., Raman S., He F., Huang Y.: Modification of medical metals by ion implantation of copper. *Appl. Surface Sci*., **253**, 9426-9429 (2007)
22. Carlos C., Felix G.C.: Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. *FEMS Microbiol. Rev*., **14**, 121-137 (1994).