

야채살균용제제의 대장균과 포도상구균에 대한 살균력 측정

정재욱 · 김태규 · 박정웅* · 이광근
동국대학교 식품공학과, *쥘세니젠

Antimicrobial activity of Sterilizer for the Exclusive Use of Vegetable against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*

Jae-Wook Jeong, Tae-Kyu Kim, Jeong Woong Park* and Kwang-Geun Lee

Department of Food Science and Technology, Dongguk University

*Sanigen. Ltd. Co.

Abstract

To develop new sterilizer for the exclusive use of vegetable (SEV) the optimized conditions were investigated. The SEV has chlorine as a main constituent and its antimicrobial activity was measured against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The inhibitory effect of SEV was measured at various conditions such as concentration of chlorine, pH, and bovine albumin solution (BAS). At 100 ppm of sodium dichloroisocyanurate (SDIC) the number of colony form unit (CFU) of *E. coli* and *S. aureus* was decreased by 97% and 88%, respectively. At pH 4 with 100 ppm of SDIC, the number of CFU of *E. coli* and *S. aureus* was decreased by 100% and 73%, respectively. In normal state having 0.3% of BAS the number of CFU of *E. coli* and *S. aureus* was decreased by 100% with the optimized conditions such as 100 ppm SDIC, pH 4. However, at the artificial contaminated state having 3% of BAS the sterilizer inhibited growth of *E. coli* and *S. aureus* by 79% and 75%, respectively. In pilot test using lettuce and the optimized sterilizer, the total number of CFU of *E. coli* and *S. aureus* was decreased by 77%.

Key words: Antimicrobial activity, Sterilizer, Vegetables, Optimum conditons

서 론

최근 대기업에서 생산된 전처리 포장 신선농산물 및 야채류 판매가 대형 할인마트를 중심으로 급증하고 있고, 그 편의성 때문에 많은 소비자들이 이용하고 있다. 하지만 일반적으로 신선 야채류의 내부는 무균상태이나, 표면은 여러 가지 오염원에 의하여 다양한 미생물이 오염, 부착되어 있는 실정이다 (이용욱과 박석기, 1999; 조기환 등, 1994; King et al., 1991; Monge 와 Arias, 1996). 이러한 미생물의 오염은 직접적으로 소비자의 식탁으로 전달될 우려가 매우 높으며, 섭취 시 질병을 야기하기도 한

다 (조성환, 1997). 그러므로 섭취하기 전 미생물의 살균이 반드시 필요하다. 현재 가공식품 경우 가열 살균(김석신과 이주희, 1999) 방사선살균(변명우 등 1986), 초고압처리(Farr, 1992) 고전압처리(Knorr et al., 1994), 자기장 살균법(Pothakamury et al., 1993), 초음파 처리법(Lee et al., 1989; Lillard, 1994) 등의 다양한 살균법이 시도, 연구되고 있으나 엽채류의 채소에 존재하는 미생물 경감에 대한 연구는 활발히 진행되지 않고 있다(Takeuchi와 Frank, 2000). 이와 같은 문제를 해결하기 위해서 신선 야채류를 살균하기 위한 살균제가 널리 쓰이고 있는데, 이들 야채 전용 살균제의 경우 전량 수입에 의존하고 있어 국산화가 시급한 실정이다. 또한 중소기업에서 국산화에 성공하였다 하더라도, 여러 기술적인 장애가 있는 것이 사실이다.

현재 국산 살균제의 개발에서 수반되는 애로사항으로는 세가지 정도가 있다. 그들은 첫째, 개발 살

Corresponding author: Kwang-Geun Lee, Department of Food Science and Technology, Dongguk University, Pil-dong, Chung-gu, Seoul, 100-715, Korea.
Phone: +82-2-2260-3370, Fax: +82-2-2285-3370
E-mail: kwglee@dongguk.edu

균제에 대한 테스트 시스템이 미흡하고, 둘째, 병원성 미생물의 살균효과에 대한 과학적 검증이 필요하며, 셋째, 온도 별 용해도에 대한 과학적 데이터가 절실하다는 점이다. 세부적으로는 대장균 (*Escherichia coli*), 포도상구균(*Staphylococcus aureus*)에 대한 살균력 검증 실험과 각 온도 별 용해도의 차이 측정, 그리고 살균제 상용화를 위한 물질의 효능확인 및 가공법 개발 또한 필요한 실정이다.

본 연구에서는 *E. coli*와 *S. aureus*에 대한 살균제의 효과를 유효염소농도, pH, 유기물 잔존농도의 차이에 따라 구분하여 측정하고, 그 데이터를 바탕으로 만들어진 살균제를 실제 야체에 적용하는 pilot 테스트를 실시하였다. 본 연구를 기초로 새로운 야체전용살균제가 생산될 예정이다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에서 사용한 균은 *E. coli* ATCC10536, *Staphylococcus aureus* ATCC6538을 사용하였다. 미생물 실험용 배지는 3M사(St. Paul, U.S.A)의 petrifilm을 사용하였다.

시약

Acetic acid, adipic acid는 Dae Jung사(Gyeonggi-do, Korea) 제품을 이용하였고, Bovine albumin solutions, Sodium dichloroisocyanurate(SDIC), Sodium thiosulfate는 Sigma사 (St. Louis, MO, U.S.A.) 제품을 사용하였다. Saponin은 ICN사 제품(Ohio, Germany), 그리고 Agar, Tryptone soya broth는 Oxoid사 (Hampshire, England) 제품을 구입하여 사용하였다. Lecithin, L-histidine은 Junsei사 제품(Tokyo, Japan)을, Potassium phosphate는 Kanto사 (Tokyo, Japan) 제품을, Polysorbate 80은 Yakuri사 (Kyoto, Japan) 제품을 사용하였으며, Sodium hydroxide는 Shinko(Osaka, Japan)을 사용하였다

시험균의 세균 현탁액 제조방법

시험균의 활성배양을 위하여 보존 배양된 시험균을 TSA배지에서 도말하여 36에서 18~24 시간 배양한다. 같은 방법으로 2, 3차 배양을 실시하며 2차 배양과 3차배양이 활성배양이 된다. 100 ml 삼각플라스크에 10 ml의 TSB배지를 넣고, 3차 활성배양 균주를 루프를 이용하여 첨가하였다. 희석법을 이용하여 세균현탁액의 농도를 $6 \times 10^2 - 3 \times 10^3$ cfu/ml로

결정하였다.

시험살균제, 멸균희석수, 중화제, 유기물 제조방법

시험살균제는 살균력을 가지고 있는 SDIC(Sodium dichloroisocyanurate: 유효염소 농도 64%) 52%, pH를 낮춰주는 adipic acid 19.5%, 발포력을 향상시켜주는 Sodium bicarbonate 28.5%를 혼합하여 제조하였다. 멸균희석수는 KH_2PO_4 34 g을 물 500 ml에 용해한 후, 1N 수산화나트륨을 이용하여 pH를 7.2 ± 0.2 조정하고, 증류수를 가하여 부피를 800 ml로 맞추어 제조하였다. 중화제는 레시틴(lecithin) 3 g, 폴리솔베이트 80(polysorbate 80) 30 g, 티오설파이트(sodium thiosulfate) 5 g, 히스티딘(L-histidine) 1 g, 사포닌(saponin) 30 g을 혼합한 후 1% 멸균인산완충용을 가하여 부피를 1000 ml로 맞추어 제조하였다. 일반적인 야체의 상태인 유기물 보유 상태에서의 살균력을 측정하기 위해서 유기물을 제조하였다. 청정상태는 0.3 g의 알부민(Bovine albumin solutions)을 증류수 100 ml에 녹이고 0.45 μm membrane filter로 여과하였다. 오염상태는 3 g의 알부민(Bovine albumin solutions)을 증류수 100 ml에 녹이고 0.45 μm membrane filter로 여과하였다.

살균제 유효염소농도별 살균력 시험방법

TSB배지 1 ml과 세균현탁액 1 ml을 섞어 2분간 방치한 후 시험살균제를 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm의 유효염소농도 별로 8 ml 첨가하고 5분간 방치한다. 그 후 반응액 1 ml과 중화제 8 ml, 증류수 1 ml을 넣고 5분간 중화시킨 후 중화반응혼합액 1 ml에 대하여 균수를 확인하였다.

살균제 pH별 살균력 시험법

TSB배지 1 ml과 세균현탁액 1 ml을 섞어 2분간 방치한 후 농도 100 ppm의 시험살균제를 pH 별로 8 ml을 넣고 5분간 방치하였다. 살균제의 pH는 NaOH와 Acetic acid를 이용하여 각 4, 6, 8, 10으로 결정하였다. 혼합 후 반응액 1 ml과 중화제 8 ml, 증류수 1 ml을 넣고 5분간 중화시킨 후 중화반응혼합액 1 ml에 대하여 균수를 확인하였다.

유기물 농도별 살균력 시험법

위에서 제조한 유기물 1 ml과 세균현탁액 1 ml을 혼합하여 2분간 방치한 후 농도 100 ppm의 살

협살균제 8 ml을 넣고 5분간 방치하였다. 혼합 후 반응액 1 ml과 중화제 8 ml, 증류수 1 ml을 넣고 5분간 중화시킨 후 중화반응혼합액 1 ml에 대하여 균수를 확인하였다.

Pilot 실험방법

상추 1 kg을 5분간 욕조에서 수돗물로 세척하여 각각 500 g씩 나누어 놓았다. 2개의 수조에 40 L의 일반 수돗물을 채우고 *E. coli*와 *S. aureus*가 1000 cfu/ml의 농도가 되도록 세균 현탁액을 첨가하였다. 살균력을 측정하기 위해서 한 욕조에만 100 ppm의 유효염소농도를 갖는 살균제를 첨가하였다. 살균제가 다 녹은 것을 확인하고 각 욕조에 500 g의 상추를 넣어서 5분간 세척을 한 다음, 각 25 g씩을 취해서 물기 제거 후 멸균 백으로 포장하였다. 여기에 멸균 희석수 225 ml을 넣고 1분 30초 동안 stomaching을 시도 한 후 반응액 1 ml에 대하여 pour plating으로 균수를 확인하였다.

통계처리

변량 분석에서 많은 오차를 가져오는 두 집단 간의 분석결과가 통계적으로 유의한 차이를 보이고 있는지의 여부를 검증하기 위해 결과에 대해 Student t-test 통계처리를 실시하였다.

결과 및 고찰

살균제 유효염소 농도 별 살균력 시험

살균제의 최적 유효염소 농도를 결정하기 위해서

각 20, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400 ppm의 염소농도를 갖는 살균제를 첨가한 상태에서의 *E. coli*와 *S. aureus*의 살균력을 측정된 결과는 Fig. 1과 같다. 결과에 따르면 *E. coli*의 경우 생균수가 초기 39 cfu/ml에서 50 ppm에서는 29 cfu/ml, 100 ppm의 유효염소농도에서는 1 cfu/ml로 각각 감소하였다. *S. aureus*는 20 ppm의 유효염소농도에서 생균수가 51 cfu/ml에서 31 cfu/ml로 감소하였으며 50 ppm, 100 ppm에서는 각각 39 cfu/ml, 6 cfu/ml으로 생균수가 감소하였다. 두 가지 균 모두 150 ppm이상의 농도에서는 검출되지 않았다. 측정 결과 유효염소농도 100 ppm 이상에서 균이 현저하게 감소하는 것을 확인하였다.

살균제 pH 별 살균력 시험

살균제의 최적 pH를 결정하기 위해 각 pH 4, 6, 8, 10의 살균제를 첨가한 상태에서 *E. coli*와 *S. aureus*를 대상으로 살균력을 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. *E. coli*의 경우 pH 10에서 생균수가 29 cfu/ml에서 22 cfu/ml로 감소하였고, pH 8과 6에서는 각각 15 cfu/ml, 21 cfu/ml로 감소하였고, pH 4에서는 검출되지 않았다. *Staphylococcus aureus* 경우 pH 10에서 생균수가 56 cfu/ml에서 49 cfu/ml로 감소하였고, pH 8과 6에서는 각각 43 cfu/ml, 37 cfu/ml pH 4에서는 15 cfu/ml로 감소하였다. 이 결과를 바탕으로 pH 4에서 살균력이 가장 높은 것을 확인하였다.

유기물 농도별 살균력 테스트

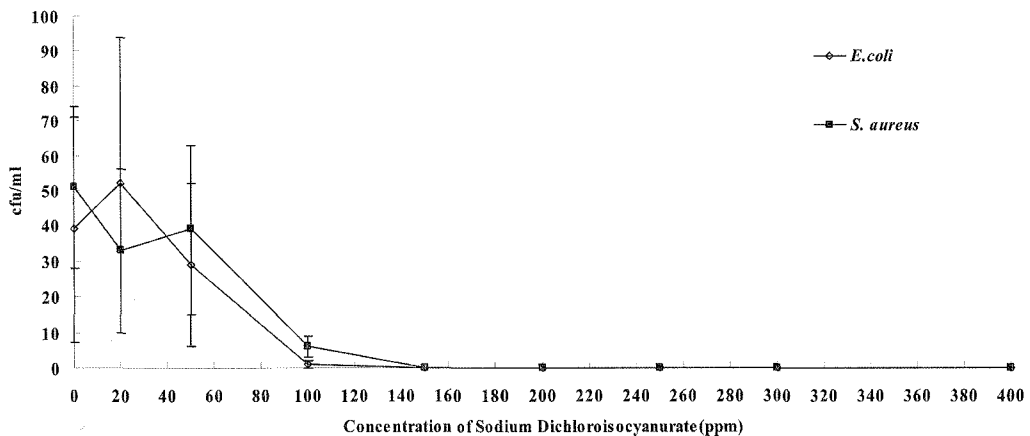


Fig. 1. Antimicrobial activity of the sterilizer according to various concentrations of SDIC (Sodium Dichloroisocyanurate) against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.

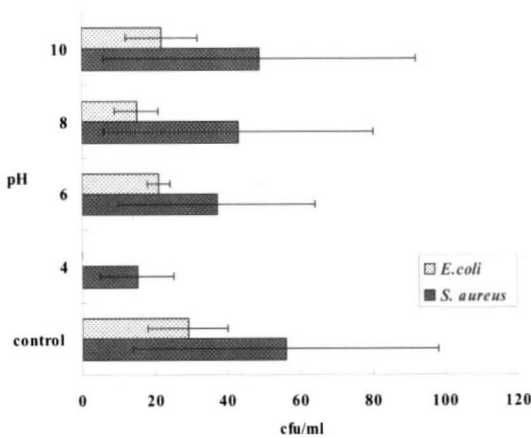


Fig. 2. Antimicrobial activity of the sterilizer (100 ppm SDIC) according to various pH against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.

*E. coli*와 *Staphylococcus aureus*를 대상으로 청정상태(0.3%), 오염상태(3%)에서의 생균수와 살균제의 살균력을 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. 측정 결과에 따르면 살균제를 전혀 첨가하지 않은 청정상태와 오염상태에서 *E. coli*의 경우 각각 20 cfu/ml, 15 cfu/ml로 생균수가 측정되었고 *S. aureus* 경우 각각, 22 cfu/ml, 13 cfu/ml로 측정되었다. 청정상태(0.3%), 오염상태(3%)에서 각각 살균제를 첨가한 경우 *E. coli*는 청정상태(0.3%)에서 생균수가 38 cfu/ml에서 0으로 감소했으며 오염상태(3%)의 경우 38 cfu/ml에서 8 cfu/ml로 감소하였다. *S. aureus*

의 경우 청정상태(0.3%)에서 생균수가 53 cfu/ml에서 검출되지 않았으며 오염상태(3%)의 경우 53 cfu/ml에서 4 cfu/ml로 감소하였다. *E. coli*의 경우 청정상태에서 살균제를 첨가했을 때 살균제를 첨가하지 않은 것과 비교하여 유의적 차이($P < 0.05$)를 보였으며, *S. aureus*의 경우 오염상태에서 살균제를 첨가했을 때 비살균 상태와 비교하여 유의적 차이($P < 0.05$)를 나타내었다. 이 결과를 통해 살균제는 청정상태(0.3%)와 오염상태(3%) 모두에서 살균력을 갖는 것으로 확인되었다.

상추를 이용한 Pilot Test

최종적으로 유효염소농도와 pH가 결정된 살균제의 실제 야채에 대한 살균력을 측정하기 위해서 상추에 1000 cfu/ml 수준의 *E. coli*와 *S. aureus*를 접종한 후 살균제를 첨가해 pilot test를 실시한 결과는 Fig. 4와 같다. 실험결과 생균수가 585 cfu/ml에서 137 cfu/ml로 감소하였으며, 살균된 상태는 비살균 상태와 비교하여 유의적 차이($P < 0.01$)를 보였다. 결과를 바탕으로 살균제가 실제 야채에 대한 살균력을 갖는 것으로 확인되었다.

본 연구를 진행한 결과 살균제의 유효염소 농도가 100 ppm이상에서 높은 살균력을 갖는 것으로 확인되었고, 살균제의 pH는 낮을수록 살균 효과가 더 높은 것으로 확인되었다. 또한 살균제는 유기물 농도가 0.3%인 청정상태와 3%인 오염상태에서도 살균력이 있으며, pilot 테스트를 통하여 실제 야채에 대해서도 살균력이 있는 것으로 확인되었다. 이러한

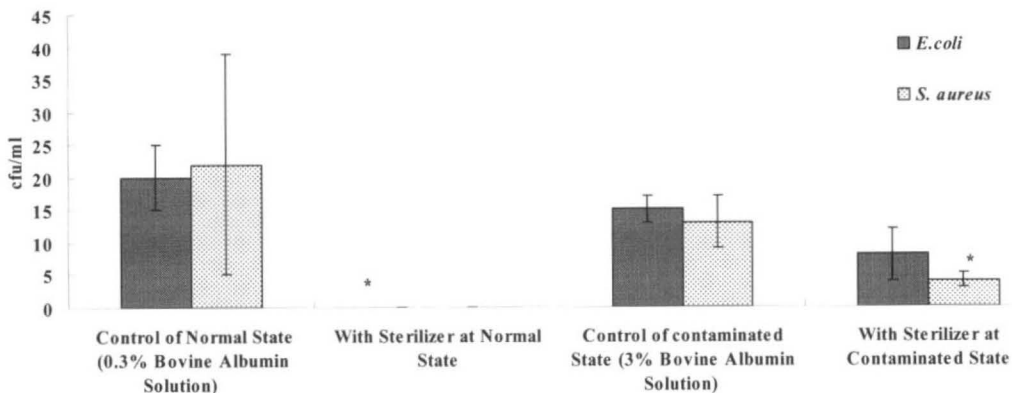


Fig. 3. Antimicrobial activity of the sterilizer (100 ppm SDIC) according to various concentrations of BAS (Bovine albumin solution) against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *: Significant different compared with control ($P < 0.05$).

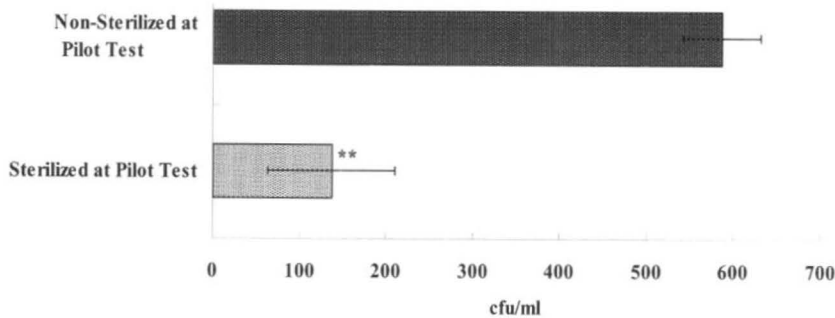


Fig. 4. Result of pilot test using lettuce and the optimized sterilizer. **: Significant Different Compared with Sterilized State (P<0.01)

측정 결과들은 최적화된 국산 야채 전용 살균제를 개발하는 것에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

야채용살균제 개발을 위한 최적조건에 대한 연구를 수행하였다. 야채전용살균제는 염소를 주성분으로 제조되었으며, 살균 대상 미생물은 *Escherichia coli*와 *Staphylococcus aureus*였다. *E. coli*와 *S. aureus*의 세균 현탁액에 여러 가지 조건 즉, 유효염소농도, pH, 그리고 유기물 잔존농도를 변화시켜 살균력을 측정하였다. 유효염소농도 결정 실험에서는 100 ppm의 유효 염소농도에서 *E. coli*와 *S. aureus*의 생균수가 각각 97%, 88% 감소하였다. pH의 경우 pH 4에서 *E. coli*와 *S. aureus* 각각 100%, 73% 감소하였다. 유기물의 잔존여부에 따른 살균력 측정결과 *E. coli*와 *S. aureus* 모두 청정상태(0.3%)에서 생균수가 100% 감소하였고, 오염상태(3%)의 경우 각각 79%, 75% 감소하였다. 최적화 조건으로 제조된 야채전용살균제를 실제 상추에 대해 파이로트 테스트 해 본 결과 일반세균수가 77% 감소한 것을 확인하였다.

감사의 글

본 논문은 2005년 중소기업청 산학연 공동기술개발 컨소시엄사업(과제번호 2005-0100-0)의 지원으로 이루어졌으며 이에 감사 드립니다.

참고문헌

김석신, 이주희. 1999. 두유의 마이크로파 고온단시간

살균 시 살균효과 및 이화학적 성분 변화. 한국식품과학회지 **31(5)**: 1196-1202.

변명우, 권중오, 조한옥. 1984. 방사선에 의한 양파분말의 살균 및 저장. 한국식품과학회지 **18(4)**: 283-287

이용욱, 박석기. 1999. 시판 식물성 식품의 오염 지표 세균 분포 및 저장온도, 기간별 오염지표 세균의 변화. 한국식품위생안전성학회지 **14(1)**: 1-8.

조기환, 김기욱, 정진환, 류충호. 1994. 농축수산물 및 그 가공 식품에 대한 *Listeria* 균주의 오염 실태조사와 Listeriosis 발생억제방법. 한국식품위생학회지 **9(4)**: 191.

조성환. 1997. 천연식물성 항균제처리에 의한 과채류의 선도 유지 및 병해 방지. 한국농산물저장유통학회지 **4**: 87-99.

King, A.D., Magnuson, J.A, Torok, T and Goodman, N. 1991. Microbial flora and storage quality of partially processed lettuce. *J. Food. Sci.* **56**: 459-461.

Monge, R and Arias, ML. 1996. Presence of various pathogenic microorganisms in fresh vegetables in Costa Rica. *Arch. Latinoam. Nutr.* **46**: 292-294

Farr, D. 1992. High pressure technology in food industry. *Trend Food Sci.* **1**: 14-16

Knorr, D., Geulen, M, Grahl, T and Sitzmann, W. 1994. Food application of high electric field pulses. *Trends in Food Sci. Technol.* **5**: 71

Pothakamury, UR., Barbosa-Canovas, GV and Swanson, BG. 1989. Magnetic-field inactivation of microorganisms and generation of biological changes. *Food Technol.* **47(12)**: 85-93

Lee, BH., Kermasha, S and Baker, BE. 1989. Thermal ultrasonic and ultraviolet inactivation of *Salmonella* in thin films of aqueous media and cholate. *Food Microbiol.* **6**: 143-152

Lillard, HS. 1994. Decontamination of poultry skin by sonication. *Food Technol.* **48(12)**: 72-73

Takeuchi, K and Frank, JF. 2000. Penetration of *E. coli* O157:H7 into lettuce tissue as affected by inoculum size and temperature and the effect of chlorine treatment on cell viability. *J. Food Protection.* **63**: 434-440