

## 식품산업에서의 미생물 제어를 위한 오존처리 효과

권 오 진 · 김 수 진 · 변 명 우 \*  
그린피아기술연구소, \*한국원자력연구소

### Effects of Ozone Treatment by Microorganisms Inactivation in the Food Industry

Oh-Jin Kwon, Soo-Jin Kim, Myung-Woo Byun\*

Greenpia Technology Research Institute  
\*Korea Atomic Energy Research Institute

#### Abstract

In order to development of new sterilizing method applied to food industry, effects of ozone treatment on microorganisms, associated with food hygiene were investigated. Microorganisms were immersed in water and sparged with ozonised air(ozone concentration, 3mg liter<sup>-1</sup>) at an air flow rate of 5 liter min<sup>-1</sup>.

When organisms were treated with benzoic acid and sorbic acid of 0.4~1.0 g / ℓ , respectively, they were not dectable perfectly. Sodium benzoate had an effect on *Penicillium islandicum*. When bacteria were sparged with ozonised air, *Pseudomonas aeruginosa* completely inhibited at 60 minutes, and the other strains needs 10~20minutes. However, ozone treatment at 60minutes were not as effective in killing *Aspergillus flavus* and *Penicillium islandicum*. Also, all of bacteria were inactivated after immersed with ozonated water for 10minutes, but two fungal species were not effective.

Key words : ozone treatment, benzoic acid, sorbic acid, sodium benzoate

#### 서 론

최근 방부제 등의 식품첨가물 규제, 소비자 기호의 다변화에 의한 보존료 무첨가 등 소비자의 건강 지향적 욕구가 증대됨에 따라 식품가공 공장에서의 미생물 관리는 그 중요성이 증가하고 있는 실정이다[1-3]. 오존은 1893년 네델란드의 상수처리에서 소독을 목적으로 처음 사용되었으며 염소의 7

배 정도로 산화력이 강해 살균, 탈취, 탈색능력이 뛰어나 수처리분야 및 그외의 식품, 의료분야에서 아주 광범위하게 사용되고 있다[4,5].

또한 오존은 공기나 산소를 원료로 하여 비교적 용이하게 생성시킬 수 있으며 일정기간이 경과하면 산소로 환원되어 2차 오염물을 남기지 않은 장점이 있다[6]. 식품산업에서의 오존은 제조공정상의 미생물제어, 유통과정에서의 신선도를 유지, 곡

류·두류등의 식품원재료의 잔류농약 분해 등에 사용할 수 있으며 식품제조 용수중의 중금속 산화, 유기물의 분해 등에 적용할 수 있다[7,8]. 오존에 의한 미생물의 살균은 미생물의 세포벽을 파괴하거나 세포막에 침입하여 DNA를 파괴하는 등의 살균 메카니즘을 갖고 있어 세균의 세포막을 통과하여 흡수계 효소를 손상하여 세포의 동화작용을 정지시켜 살균하는 염소계 약제에 비해 살균속도가 매우 빠르다[9]. 식품산업에서 오존의 사용은 식품의 표면 부패미생물의 살균 및 증식억제에 따른 식품의 부패, 변패의 제어효과가 있으며 이에 관한 연구가 일부 보고[10-13]된 바 있으나 오존처리에 의한 미생물 제어의 연구는 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구는 식품산업에 적용할 새로운 살균방법의 개발을 위하여 오존처리가 식품위생관련 미생물의 증식에 미치는 영향을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 보존료

균주는 한국미생물보존센터에서 분양받은 식품위생관련 미생물로서 세균 5종(gram 양성 3종, gram 음성 5종)과 곰팡이 2종을 사용하였고(Table 1), 약품으로는 보존료인 benzoic acid, sodium benzoate, sorbic acid(일급시약)를 사용하였다.

Table 1. List of strains for ozone treatment

<i>Escherichia coli</i>	ATCC	25922
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC	6633
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC	27853
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC	14028
<i>Clostridium perfringenes</i>	ATCC	13124
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC	13048
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC	17802
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC	25923
<i>Aspergillus flavus</i>	ATCC	9643
<i>Penicillium islandicum</i>	ATCC	10127

### 배지 및 배양조건

배지는 세균이 nutrient broth(NB)와 agar(NA)를, *V. parahaemolyticus*는 3% NaCl이 첨가된 NB와 NA를, *S. aureus*는 tryptic soy broth(TSB)와 agar(TSA)를 각각 사용하였고 곰팡이는 potato dextrose broth(PDB)와 agar(PDA)를 사용하였다. 균주의 배양은 *B. subtilis*, *E. aerogenes*, *V. parahaemolyticus*는 30°C, 그외의 균주들은 37°C에서 진탕배양(120 rpm)하였고 *A. flavus*와 *P. islandicum*의 곰팡이는 각각 25°C와 37°C에서 정치배양하였다. 이때, *C. perfringenes*는 *gaspak jar*에서 혐기배양하였으며 모든 균주들은 50% glycerol에 냉동보관하면서 실험시 마다 액체배지에서 활성화시켜 사용하였다.

### 현탁액의 조제

세균은 각각의 사면배지에 계대배양한 것을 동일한 액체배지 100ml에 1 백금이를 접종하여 최적 온도에서 24시간 배양한 다음, 배양액 1ml를 새로운 액체배지 100ml에 접종하고 8시간 재배양시켜 대수기의 영양세포를 얻었다. 이 영양세포 현탁액을 원심분리(9,000×g)하여 얻은 균체를 냉 0.1M phosphate buffer(pH 6.5)로 2회 세척, 원심분리하여 최종 영양세포의 농도가 107~109 CFU/ml가 되도록 조절하였다. *A. flavus*와 *P. islandicum*의 곰팡이는 1~2주간 사면배양하여 형성된 분생포자를 냉 0.1M phosphate buffer를 써서 수집하고 세척, 원심분리(7,000×g)하여 얻은 분생포자를 106~107 CFU/ml가 되도록 농도를 조절하였다.

### 약품처리 효과

세균의 영양세포 현탁액 0.1ml(105~107CFU/ml)를 3종의 보존료가 농도별로 첨가된 10ml의 액체배지에서 증식시킨 후 균체의 증식을 660nm의 흡광도로 측정하여 최소발육 저해농도(Minimum inhibitory concentration, MIC)를 조사하였고 곰팡이는 보존료가 함유된 PDA 평판에 1 백금이를 spot 한 다음, 각각의 온도에서 3일간 배양하여 생성된 집락의 크기(mm)로 조사하였다. 이때 첨가한 보존료의 농도는 sorbic acid는 0~3.0 g/l로,

sodium benzoate와 benzoic acid는 0~1.0 g/ℓ 로 조정하여 사용하였다.

**오존처리 효과**

오존처리는 ozone generator(Omrom H2E-YD, Matsuno, Corporation, Japan)를 이용하였으며 이때의 오존 발생기의 농도는 3ppm, 공기압력은 0.5 kg/cm, 유속은 5 ℓ/min 이었다. 평판상의 오존처리 효과는 냉 0.1 M phosphate buffer에 적절히 희석된 균현탁액을 각 평판배지에 0.2ml씩 접종하여 spreader로 도말, 건조한 다음, 오존처리 장치에서 발생하는 오존이 평판위 균주들에게 골고루 분사 되도록 0~60분간 처리하였다. 각각의 처리된 평판은 최적온도에서 1~3일 배양한 다음, 생존 colony를 계수하여 조사하였다.

현탁액속에서의 오존처리 효과는 10ml의 균현탁액에 오존을 직접 burbbing 시키면서 10분간 처리한 후, 적절히 희석하여 상기와 같은 방법으로 조사하였다.

**결과 및 고찰**

**약품처리 효과**

식품의 보존제로 사용되는 sorbic acid, sodium benzoate 및 benzoic acid 등은 식품에 따라 그 첨가농도가 다르나 많이 쓰는 경우, sorbic acid는 어육이나 식육제품에서 2 g/kg까지, sodium benzoate와 benzoic acid는 간장에서 0.6 g/kg까지 사용되고 있어 본 실험에서도 이를 고려하였다[14]. Table 2는 세균에 대한 약품처리의 효과로서 benzoic acid는 MIC 값이 0.4~0.7로, sorbic acid는 MIC 값이 0.5~1.0으로 각각 나타났으며 sodium benzoate의 경우에는 첨가한 1.0 g/ℓ의 농도까지 생육하여 균주들에 대한 저해효과가 나타나지 않았다. 조 등[14]은 E.coli는 0.6 g/ℓ의 sodium benzoate와 1.0 g/ℓ의 potassium sorbate에서, S. typhimurium은 2.0 g/ℓ의 potassium sorbate에서 각각 정균작용이 나타났다고 보고하였다. A. flavus와 P. islandicum의 곰팡이에 대한 이들 보존

제의 효과는 Table 3.과 같이 A. flavus는 benzoic acid 0.8 g/ℓ, sorbic acid 1.0 g/ℓ의 첨가로서 증식이 완전히 저해되었으며 sodium benzoate는 1.0 g/ℓ의 농도에서도 증식하였다. P. islandicum는 benzoic acid와 sodium benzoate는 0.4~0.6 g/ℓ에서, sorbic acid는 첨가한 최소농도인 0.5 g/ℓ에서 각각 증식이 저해되었다.

이상의 결과로 볼때 benzoic acid와 sorbic acid는 0.4~1.0 g/ℓ 정도의 첨가로서 모든 미생물을 완전히 저해할 수 있었으며 sodium benzoate는 단지 P. islandicum에 대해서만 효과가 있었다.

**Table 2. Minimum inhibitory concentration(MIC)<sup>1)</sup> of chemicals on the bacterial growth**

Chemicals	MIC (g/ℓ)							
	Strains <sup>2)</sup>							
	E	V	C	B	St	P	E	S
Benzoic acid	0.7	0.6	0.7	0.4	0.4	0.7	0.6	0.6
Sodium benzoate	>1.0 <sup>3)</sup>	>1.0	>1.0	>1.0	>1.0	>1.0	>1.0	>1.0
Sorbic acid	1.0	0.5	0.5	0.5	0.5	1.0	0.5	0.5

- 1) MIC means the each fractions extract concentration level of no growth after cultured at optimum condition for 24 hours
- 2) E, *Enterobacter aerogenes*; V, *Vibrio parahaemolyticus*; C, *Clostridium perfringenes*; B, *Bacillus subtilis*; St, *Staphylococcus aureus*; P, *Pseudomonas aeruginosa*; E, *Escherichia coli*; S, *Salmonella typhimurium*
- 3) Means that the tested bacteria were not inhibited with those concentrations

**오존처리 효과**

평판상에 오존을 분사하여 그 효과를 조사한 결과(Table 4), P. aeruginosa는 30분 처리시에도 균주의 증식이 완전히 저해되지 않았으며 그외의 세균은 10~20분의 처리로서 완전히 저해되었다.

Bradwater 등[15]은 오존의 농도가 일정농도에 이상에 도달하면 일시에 미생물이 사멸된다는 threshold dose 현상을 보고하였는데 본 실험에서도 이와 유사한 경향을 나타내었고, 팍 등[16]은 30ppm의 오존을 인삼분말에 12시간 이상 처리하여 완전히 균주의 생육을 저해시켰다. *A. flavus*와

**Table 3. Inhibitory effect of chemicals against *Aspergillus flavus* and *Penicillium islandicum***

Unit : Colony diameter(mm)

Chemicals	Conc. (g/l)	Strains	
		<i>A. flavus</i>	<i>P. islandicum</i>
Control	0.0	29	9
Benzoic acid	0.2	21	3
	0.4	19	— <sup>1)</sup>
	0.6	6	—
	0.8	—	—
	1.0	—	—
Sodium benzoate	0.2	27	5
	0.4	24	4
	0.6	21	—
	0.8	19	—
	1.0	18	—
Sorbic acid	0.5	3	—
	1.0	—	—
	1.5	—	—
	2.0	—	—
	2.5	—	—
	3.0	—	—

1) No growth

The mold was incubated on potato dextrose agar medium for 3 days

**Table 4. Effects of gaseous ozone<sup>1)</sup> treatment on microorganisms in plate**

Strains	Duration of ozone treatment(min)					
	0	5	10	20	30	60
<i>Escherichia coli</i>	359 <sup>2)</sup>	29(8.08)	8(2.23)	0	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	258	15(5.81)	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,640	814(30.83)	68(2.58)	15(0.57)	4(0.15)	0
<i>Salmonella typhimurium</i>	308	21(6.82)	0	0	0	0
<i>Clostridium perfringens</i>	680	9(1.32)	0	0	0	0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	323	32(9.91)	0	0	0	0
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	135	13(9.63)	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	250	21(8.40)	0	0	0	0
<i>Aspergillus flavus</i>	850	248(29.18)	164(19.29)	47(5.53)	26(3.06)	21(2.47)
<i>Penicillium islandicum</i>	256	228(89.06)	160(62.50)	141(55.08)	55(21.48)	14(5.47)

1) Ozonised air with an ozone concentration of 3 mg liter<sup>-1</sup> was sparged into the microbial plates at an air flow rate of 5 liter min<sup>-1</sup>

2) Total cells(CFU/plate)

( ), Survival percent

*P. islandicum*의 곰팡이는 오존처리 즉시 균수가 감소하여 점차 처리시간이 길어질수록 더욱 더 생존균수가 감소되었지만 60분간 처리시에도 완전히 저해되지 않았고 특히, *P. islandicum*는 20분 처리까지 생존율이 55.08%로 나타나 오존에 대한 저항성이 높았다. 이러한 결과로 포자를 형성하는 미생물에 대한 살균은 오존처리 농도를 높히거나 처리시간을 좀 더 길게하는 것이 필요함을 알 수 있었고 Nagashima[17]도 *B. subtilis*를 10분간 처리하여 2.1%의 생존율을 보고한 바 있다.

현탁액속에서 오존을 직접 bubbling 시키면서 10분간 처리한 결과는 Table 5와 같다. *P. aeruginosa*, *A. flavus*, *P. islandicum*을 제외한 모든 균주들은 생존율이 1% 이내로 나타났고 *E. coli*는 104(99.99% kill) 정도의 균수가 감소되어 현탁액에서 오존에 대한 감수성이 높게 나타났다. *A. flavus*와 *P. islandicum*의 곰팡이는 생존율이 90% 이상으로 나타나 오존처리 효과가 거의 없었다. Zhao와 Cranston[18]은 black peppercorns에 오염된 미생물을 수용액에서 6.7ppm의 농도로 10분간 오존처리하여 103~104 cfu/ml의 균수를 감소시켰고 Nagashima[17]는 3ppm의 농도로 10분간 처리하여 *E. coli*, *S. aureus*, *S. cerevisiae* 등의 균주를 완전살균시켰다.

이상의 본 실험의 결과로 3ppm, 10분 이상의 오존처리는 대부분의 세균을 불활성화 하였으며 *A. flavus*와 *P. islandicum*는 60분간의 처리로도 완전 살균은 불충분하였다.

하였다. 현탁액속에서 10분간의 오존처리는 대부분의 세균을 불활성화 하였으나 곰팡이에는 효과가 없었다.

참 고 문 헌

1. Sofos, J. N. and F. F. Busta(1981) Antimicrobial activity of sorbate, *J. Food Prot.*, 44, 614-622.
2. Shin, A. L. and N. D. Harris(1977) Antimicrobial activity of selected antioxidants, *J. Food Prot.*, 40, 520-522.
3. Mackey, B. M. and D. A. Seymour(1989) The bactericidal effect of isoascorbic acid combined with mild heat, *J. Appl. Bacteriol.*, 67, 629-638.
4. Singer P. C. (1990) Assessing ozonation research needs in water treatment, *J. Am. Water Works Assoc.*, 82, 78-88.
5. Ewell, A. W. (1950) Ozone and its application in food preservation, *Refring. Eng.*, 58, 873-975.
6. Naito S., Okada Y., Sakai T. (1988) 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.
7. 김광연(1993) 식품산업에의 오존이용(II), *식품기술*, 6, 84-94.
8. 장대자(1993) 식품산업에 있어서 오존의 이용(III), *식품기술*, 6, 84-92.
9. 김광연(1993) 식품산업에의 오존이용(I), *식품기술*, 6, 85-91.
10. 박이성, 최강주, 김나미(1996) 오존처리가 인삼분말의 지방산과 유기산 함량 및 향미특성에 미치는 영향, *한국식품위생·안전성학회*, 11, 51-55.
11. 김미정, 오영애, 김미향, 김미경, 김순동(1993) 오존처리 청정재료와 *L. acidophilus*를 이용한 배추김치의 숙성, *한국영양식량학회지*, 22, 165-174.
12. 김일두, 김순동(1991) 신선계육의 유통을 위한

Table 5. Effects of gaseous ozone(1) treatment on microorganisms in phosphate buffer

Strainss	Total cells(CFU/ml)	
	0min	10min
<i>Escherichia coli</i>	1.8 × 10 <sup>9</sup>	2.4 × 10 <sup>5</sup> ( 0.01)
<i>Bacillus subtilis</i>	1.3 × 10 <sup>8</sup>	8.2 × 10 <sup>5</sup> ( 0.63)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.3 × 10 <sup>9</sup>	1.0 × 10 <sup>8</sup> ( 7.69)
<i>Salmonella typhimurium</i>	1.5 × 10 <sup>9</sup>	6.4 × 10 <sup>6</sup> ( 0.43)
<i>Clostridium perfringenes</i>	3.4 × 10 <sup>7</sup>	2.4 × 10 <sup>4</sup> ( 0.07)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1.6 × 10 <sup>9</sup>	1.0 × 10 <sup>7</sup> ( 0.62)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	6.8 × 10 <sup>6</sup>	1.0 × 10 <sup>5</sup> ( 1.47)
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.2 × 10 <sup>7</sup>	1.9 × 10 <sup>5</sup> ( 1.58)
<i>Aspergillus flavus</i>	4.1 × 10 <sup>6</sup>	3.8 × 10 <sup>6</sup> (92.68)

1) Ozonised air with an ozone concentration of 3 mg liter<sup>-1</sup> was bubbled into the microbial phosphate buffer solution at an air flow rate of 5 liter min<sup>-1</sup>

( ), Survival percent

요 약

본 연구는 식품산업에 적용할 새로운 살균방법을 개발하기 위하여 오존처리가 식품위생관련 미생물의 증식에 미치는 영향을 조사하였다.

0.4~1.0g/ℓ의 benzoic acid와 sorbic acid를 각각 첨가시에는 모든 미생물의 증식이 완전히 저해되었으며 sodium benzoate는 *Penicillium islandicum*에 대해서만 효과가 있었다. 평판상에 오존처리한 결과, *Pseudomonas aeruginosa*는 60분, 그외의 세균은 10~20분의 처리시에 균주의 증식이 완전히 저해되었고 *Aspergillus flavus*와 *Penicillium islandicum*은 60분간 처리시에도 생존

- Ozone 처리 효과, 한국영양식량학회지, 20, 483-487.
13. Kaess, G. and Weidemann, J. F. (1968) Ozone treatment of chilled beef, J. Food Technol., 3, 325-334.
  14. 조남숙, 양여영, 최연호 (1986) *Escherichia coli* 와 *Salmonella typhimurium*의 생육억제에 미치는 식염과 Potassium Sorbate, Sodium Benzoate의 병용효과, 한국식품과학회지, 18, 249-254.
  15. Broadwater, W. T., Hoehn, R. C. and King, P. H. (1973) Sensitivity of three selected bacterial species to ozone, Appl. Microbiol., 26, 391-393.
  16. 광이성, 노봉길, 장진규, 최강주 (1995) 오존처리가 인삼분말에 오염시킨 미생물의 생육에 미치는 영향, 한국식품위생·안전성학회, 10, 45-51.
  17. Nagashima T. (1995) Study on preservation of vegetables by ozone Treatment, Korean J. Post-Harvest Sci. Technol. Agri. Products, 2, 209-223.
  18. Zhao J. and P. M. Cranston (1995) 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.