

ATP-Bioluminescence를 이용한 인삼분말의 미생물 신속검사법

곽이성[#] · 김천석 · 송용범 · 고성룡

한국인삼연초연구원
(2001년 7월 27일 접수)

Rapid Microbiological Assessment Method by using ATP-Bioluminescence in Ginseng Powder

Yi-Seong Kwak[#], Cheon-Suk Kim, Yong-Bum Song and Sung-Ryong Ko

Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejeon 305-345, Korea

(Received July 27, 2001)

Abstract : Bioluminescence technique was applied to ginseng powders. ATP bioluminescence can be used as a rapid method that can be implemented for microbiological monitoring of contaminated ginseng powders. The RLU (relative light units) of ATP was proportion to bacterial CFU (colony forming units) when in high contaminated ginseng powders (\geq about 1.0×10^4 CFU/g). However, when in low contaminated ginseng powders ($<$ about 1.0×10^4 CFU/g), the RLU was not proportion to CFU, respectively.

Key words : ATP-bioluminescence technique, microorganism, ginseng powder

인삼은 저장이나 장기 유통과정에서 해충, 미생물 등에 의한 생물학적 품질변화가 발생하며 인삼분말은 분쇄, 포장 등 제품의 제조과정에서 미생물 오염을 수반한다. 우리나라의 인삼제품 검사기준¹⁾은 인삼분말의 경우 세균수는 5×10^4 /g 이하, 대장균군은 음성이어야 하는 등 그 제한 규정이 엄격하다. 현재 분말곡류, 향신료, 인삼등의 살균, 살충 목적으로 사용되어오던 ethylene oxide(E.O.) 훈증제 처리가 그 유해성으로 인해 1991년 금지된 이후²⁻⁴⁾ 인삼분말에서 미생물 오염도 검사는 그 중요성이 증가되고 있는 실정이다.

최근에 식품공장에서는 QC(quality control) 대신에 HACCP(Hazard Analysis and Critical Points)가 중요시되고 있는데 이는 위해요소 중점관리제도로서 소비자의 건강을 위태롭게 할 수 있는 생물학적, 화학적, 물리학적 위해요소를 찾아 분석, 평가하고 대책을 수립하여 위해를 중점관리하는 사전예방 관리제도 이다.⁵⁾ 이러한 건강상의 위험요소가 발생할 수 있는 것을 빨리 검출분석하여 제거할 필요가 있는데 일반적으로 미생물수 측정에 사용되는 방법은 장시간을 요하는 경우가 많

다. 원료 및 생산과정 중 시료를 채취하여 측정하고 그 결과가 나올 때 까지 장기간 다음 단계로 들어가지 못하거나 시간의 차이로 인하여 제품의 출하 또는 유통된 후에 측정결과를 알게 된다는 것은 시간을 생명으로 여기는 현대의 식품제조업 체제에서는 대단히 불합리한 일이다. 더구나 시간의 지연으로 인해 제품의 저장에 따른 비용의 증가 및 제품의 수명을 단축시키게 되어 품질관리에 막대한 지장을 초래하게 된다. 이러한 문제점을 제거하여 보다 신속하고 정확하게 미생물을 측정하기 위한 여러방법들이 연구되어 왔으나 대체로 유의성이 낮고 재현성이 좋지 않기 때문에 Standard plate count 방법에 의존하고 있는 실정이다. Standard plate count(SPC) 방법⁶⁾은 일반적으로 식품의 세균수를 측정하는 표준적인 방법으로 비교적 정확한 균수 측정성 때문에 광범위하게 사용되고 있으나 검사시간이 2일 이상 소요되는 등 제한된 시간에 대량의 시료를 검사해야 하는 공장적 품질관리 측면에 있어서는 많은 어려움이 있어 왔다. 따라서 최근에 오염된 식품의 미생물에 함유되어 있는 ATP(adenosine 5'-triphosphate)를 신속하게 측정하여 위생검사 및 품질검사에 이용하려는 시도가 있어 왔다.^{5,7,8)} 이러한 연구의 일환으로 저자들은 인삼분말 제품에 이러한 미생물 오염도검사 방법인 ATP-bioluminescence 방법을 적용하여 기존에 사용된 SPC

[#]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 042-866-5535; (팩스) 042-861-1949
(E-mail) yskwak@gtr.kgtri.re.kr

방법과 그 결과를 비교하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 인삼분말

백삼(4년근)을 대전시내 한약방에서 구입한 후 조분쇄(100 mesh)하여 인삼분말로 하였다. 인삼분말은 인위적으로 대장균을 오염시켜 인삼분말의 세균수를 조정한 후 시료로 사용하였다.

2. 대장균의 접종

한국인삼연초연구원에서 보관중인 대장균(*Escherichia coli* AB1157)을 nutrient broth 배지에서 38°C, 2일 동안 배양한 후 인삼분말에 접종하였다. 접종은 인삼분말에 고르게 분산되도록 균액을 스프레이로 분무하여 접종하였다.⁹⁾

3. ATP 측정

인삼분말에 오염된 세균의 ATP 측정은 Rapid Microbiological Kit(Lumac, A Perstorp Analytical Co., Landgraaf, Netherland)와 Biocounter M1500(Lumac, A Perstorp Analytical Co., Landgraaf, Netherland)를 사용하였다. 방법은 분말시료를 멸균된 증류수에 넣고 vortex 하여 잘 혼합한 후 이 상등액에 NRM(nucleotide releasing reagent for microbial cells)를 처리하여 오염된 인삼분말의 세균세포에서 ATP를 추출하였다. 추출한 ATP에 반딧불 유래의 luciferin-luciferase 효소를 처리하여 발산된 빛을 Biocounter M1500의 photomultimeter로 측정하였다. 측정된 빛의 단위는 분말 g당 RLU(relative light units)로 표시하였다.

4. 세균수 측정

오염된 인삼분말에 함유된 세균수는 Marth⁶⁾의 SPC(standard plate count) 방법에 준하여 측정하였다. 또한 bioluminescence 방법에 의해 측정된 RLU와 SPC 방법에 의해 측정된 미생물수를 서로 도식함으로써 미생물수와 ATP 함량과의 관계를 비교하였다. 미생물수와 ATP 함량과의 관계는 표준곡선을 그린 후 상관계수 R 값이 0.95 이상일 때만 상관성이 있는 것으로 나타내었다.

결과 및 고찰

미생물 오염도 검사방법인 ATP-bioluminescence techniques을 인삼분말제품에 적용하여 기존의 미생물 검사방법인 SPC(standard plate count)방법과 비교한 결과(Fig. 1), 인삼분말에 오염된 세균이 약 10,000 CFU/g(약 45 RLU/g)에 해

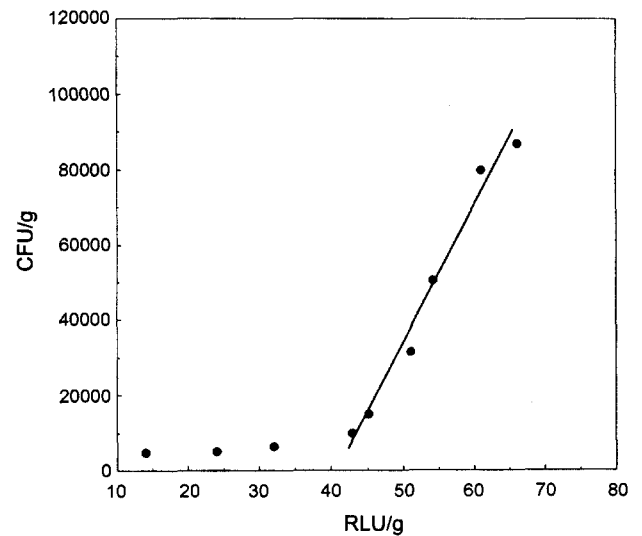


Fig. 1. Comparison of microbiological contamination when measured by ATP-bioluminescence and standard plate method Note: The values are means of three experiments. RLU; relative light units, CFU; colony forming units. When bacterial numbers of ginseng powder are only above 10,000 CFU/g, bacterial number (CFU) and ATP content (RLU) of the powder are correlative with $R=0.98$.

당)이상이었을 경우에는 세균수가 증가함에 따라 ATP의 양이 증가하여 비례함을 알 수 있었다. 즉, 세균수가 10,000 CFU/g 이상일 경우 세균수와 ATP 함량과의 관계를 표준곡선으로 도식한 후 그래프($y=3591.1x-146260$)의 R 값을 계산한 결과 $R=0.98$ 으로 상관성($R \geq 0.95$)이 있는 것으로 나타났다(Figure not shown). 그러나 분말에 함유된 세균의 수가 10,000 CFU/g 이하의 경우에는 세균수와 ATP 함량과의 상관성이 관찰되지 않았다. 따라서 낮은 세균수($\leq 10,000$ CFU/g)에서는 세균수 증가에 따른 ATP 증가가 비례하지 않는 것으로 관찰되어 인삼분말의 미생물오염도 측정방법으로 ATP 측정방법을 이용하기는 곤란할 것으로 생각된다. Harrison 등²⁾은 양조 공업에 이 미생물 측정방법을 이용하였을 경우 미생물 오염도가 낮은 경우 즉, ATP의 양이 50 RLU/g 인 경우에는 재현성 및 상관성이 없다고 하였다. 본 인삼분말의 경우에도 10,000 CFU/g(45 RLU/g에 해당)에서는 이와 유사한 결과를 나타내었다. 이는 분말제품 자체의 ATP 및 색도 그리고 분말의 미세한 입자등이 방해인자로 작용하여 이러한 결과를 나타낸 것으로 추론된다. 따라서 인삼분말에 오염된 세균수가 10,000 CFU/g 이하의 경우에는 이 방법의 사용은 재고되어야 할 것으로 생각되나 미생물수가 10,000 CFU/g 이상으로 오염도가 높은 제품에는 신속하고 재현성이 높은 방법으로 생각된다.

한편, ATP는 모든 생물의 에너지 저장물질이므로 시료의 세균뿐만 아니라 free ATP, 미생물의 ATP, 체세포의 ATP, 비

미생물의 ATP 등이 모두 측정된다. 위생상태는 미생물의 수도 중요하지만 추가적으로 흙, 부스러기, 생산물의 찌꺼기 등도 크게 영향을 미친다. 기존의 방법이 세균수를 위생의 척도로 하는 반면, 이 방법은 세균 뿐만 아니라 비미생물, 생산물의 찌꺼기도 검색이 가능하므로^{7,8)} 세균의 성장을 미리 막을 수 있다는 장점이 있다. 아울러 신속하게(30분 이내) 측정이 가능하므로 공장적 품질관리 측면에 있어서 매우 유용한 방법이 될 것으로 생각된다. Richard⁵⁾는 ATP bioluminescence 방법을 이용하여 가공공장 중의 원료에 함유된 미생물수를 신속하게 측정하였다고 보고한 바 있다. 따라서 이 방법은 미생물 오염도가 낮은 인삼분말에는 적용할 수 없다는 단점은 있으나 산업적인 생산공장에서 하나 하나의 공정을 미생물 위해도 판정기준으로 검사하고자 할 때 신속하게 어느 한도의 미생물수를 판정할 수 있는 level check를 할 수 있다는 관점에서는 적합한 방법으로 생각된다. 이것은 최근 미생물 위해도를 미리 판정하여 미생물수를 감소시키고 위해도를 줄이자는 취지의 HACCP⁹⁾와도 일맥 상통하여 산업적으로 유용할 것으로 생각된다.

요 약

새로운 미생물 오염도 검사방법인 ATP-bioluminescence 방법을 인삼분말에 적용한 결과 인삼분말에 오염된 세균수가 약 10,000 CFU/g 이상인 경우에는 세균수가 증가함에 따라 ATP의 양이 비례적으로 증가하였다. 그러나 세균수가 10,000 CFU/g 이하일 때는 ATP의 증가 및 결과의 상관성이 인정되지 않았다. 따라서 이 방법은 세균의 오염도가 높은 인삼

분말($\geq 10,000$ CFU/g)에서 신속하게 미생물을 측정하여 제품의 품질을 관리하는데 유용한 방법이 될 수 있을 것으로 생각된다.

인용문헌

1. 식품의약품안전청 : 식품공전, p.399 (2000).
2. WHO : Ethylene oxide, Environmental Health Criteria, 55 (1985).
3. Wesley, F., Rourke, B., and Darbishire, O. : *J. Food. Sci.*, **30**, 1037 (1965).
4. Rajendran, S., and Muthu, M. : *Bull Environm. Contam. Toxicol.*, **27**, 426 (1981).
5. Richard, F. S. : *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, **2**, 17 (1993).
6. Marth, E. H. : Standard methods for the examination of dairy products, 14th ed., American public health association, Washington, DC (1978).
7. Harrison, M., Theaker, P. D. and Archibald, H. W. : Experience with ATP-bioluminescence for rapid microbiological assessment in the brewery. proc. 21st convention of the institute of brewing Australia and New Zealand Section, Auckland, 168-173 (1990).
8. Tebbutt, G. M., and Midwood, C. A. : *Environ. Health*, **98**, 235 (1990).
9. 짝이성, 장진규, 주종재 : 알콜처리가 인삼분말에 오염된 미생물의 성장에 미치는 영향. 한국식품위생안전성학회지, **12**, 205 (1997).