

연구노트

## 방사선 저항세균 *Micrococcus roseus*의 광펄스 살균 효과

김보라 · 김애진<sup>1</sup> · 신정규<sup>2\*</sup>

(재)고창복분자연구소, <sup>1</sup>샘표식품(주), <sup>2</sup>전주대학교 한식조리학과

### Effect of Sterilization by Intense Pulsed Light on Radiation-resistant Bacterium, *Micrococcus roseus*

Bora Kim, Ae-Jin Kim<sup>1</sup>, and Jung-Kue Shin<sup>2\*</sup>

Gochang Black Raspberry Research Institute

<sup>1</sup>Sempio Foods Company

<sup>2</sup>Department of Korean Cuisine, JeonJu University

**Abstract** The purpose of this study was to investigate the inactivation effect of intense pulsed light (IPL) on *Micrococcus roseus*, an irradiation-resistant bacterium isolated from laver, and the commercial feasibility of this sterilization method on dried laver. The inactivation of *M. roseus* in cultivated plates increased with increasing light intensity and treatment time. Approximately 6.6 log CFU/mL reduction of the cell viability was achieved with IPL treatment for 3 min at 1,000 V of light intensity, tailing was not shown. In addition, the inactivation rate of *M. roseus* increased with increasing pulse number at same light intensity and treatment time. The killing efficiency for *M. roseus* increased with by decreasing the distance between the light source and the sample surface.

**Keywords:** intense pulsed light (IPL), *Micrococcus roseus*, non-thermal sterilization, irradiation-resistant bacterium

## 서 론

광펄스 살균은 자외선(ultraviolet)부터 근적외선(near infrared)부 분까지의 넓은 범위의 강하고 짧은 빛을 짧은 시간동안 식품 표면에 조사하여 미생물을 사멸시켜 보존 기간을 늘릴 수 있는 비가열 살균 기술의 하나로써(1) 채소, 과일, 분말식품, 생선, 초기 유아식품 등 고체식품이나 반고체 식품의 표면살균에 대한 연구가 진행되고 있다. 광펄스 살균의 사멸 기작은 photothermal 또는 photochemical 효과로 설명되고 있는데 둘 중 어느 하나에 의한 것이라기보다는 두 효과가 함께 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다. Photothermal 효과에 의한 사멸은 식품의 표면층이 광펄스의 에너지를 흡수하고 식품내의 미생물이 이 열에 의해 사멸된다고 하였다(2,3). 그러나 이 에너지의 양이 식품 전체를 가열시킬 정도의 열은 아니라고 하였다. Photochemical 효과를 사멸기작으로 판단하는 연구 결과에서는 광펄스의 사멸효과가 continuous wave (CW) UV에 의한 미생물의 사멸처럼 pyrimidine dimers의 형성에 의한 세포 복제의 저해(4), photoproduct의 형성에 의한 single strand와 double strand의 파괴, cyclobutane dimer의 형성 등(5)에 의한 것으로 보고하였다.

최근 식생활의 변화로 간편성을 추구하게 되면서 편의식품과 ready-to-eat (RTE) 식품 등의 인기가 증가함에 따라 김밥과 같은 복합조리식품에 의한 식중독 발생도 꾸준히 증가하고 있다(6). Lee 등 (7)은 김의 초기 균수는 8.83 log CFU/g이고, Kim 등(8)은 생김에서 일반 호기성 세균은 6-7 log CFU/g, 대장균군은 3 log CFU/g의 분포를 보여 김밥재료 중 세균에 대한 오염도가 가장 높은 것이 김이라고 보고하였다.

마른 김에는 *Bacillus*속 4종, *Pseudomonas*속 2종, *Anxinetobacter*속, *Kimigella*속, *Alcaligenes*속이 존재하며(9), 방사선 저항균주인 *Micrococcus roseus*가 존재하고 있다.

이러한 마른 김의 균수 저감을 위한 실험으로 열처리, 자외선 처리, 방사선 처리 등에 대한 연구가 보고되고 있다. Kang 등(9)은 김 표면에 직접 열처리(화입)를 한 결과 약 2-3 log의 살균 효과를 나타내었고, Lee 등(10)은 상업적 열처리를 위하여 사용되는 배소기를 사용하여 열처리를 할 경우, 약 1-3 log 정도 감소하여 김을 굽는 과정이 마른 김의 오염 세균을 효과적으로 제거하기 어렵다고 보고하였다. 특히 *M. roseus*는 그람양성의 비운동성 구균으로서 2-4개 혹은 다발모양의 형태를 이루고 있으며, 배양시 붉은 색의 색소를 갖는 smooth colony를 형성하며, 일반적으로는 비병원성이지만 면역력이 떨어질 경우 질병을 일으킬 수 있는 균이다. 이 *M. roseus*는 10 kGy의 감마선 조사에서도 1 log의 사멸만을 나타내었고, 20 kGy까지도 높은 저항성을 나타내었으며, 40 kGy의 조사선량에서도 1 log CFU/mL 이상의 생존균수를 나타내었다(11).

본 연구에서는 열은 물론 방사선 처리에도 높은 저항성을 보이는 *M. roseus*에 대해 광펄스 처리가 높은 사멸 효과를 보여 향후 김의 위생적 처리에 효과적인 방법의 하나가 될 수 있음을 보고하고자 한다.

\*Corresponding author: Jung-Kue Shin, Department of Korean Cuisine, College of Culture and Tourism, JeonJu University. Jeonju, Jeonbuk 560-759, Korea  
Tel: 82-63-220-3081  
Fax: 82-63-220-3264  
E-mail: sorilove@jj.ac.kr  
Received December 27, 2012; revised January 12, 2013;  
accepted January 24, 2013

## 재료 및 방법

### 시료 및 사용균주

실험에 사용한 김은 시중에서 유통되고 있는 다섯 종류(서해김, 진도김, 해남김, 파래김, 재래김)를 재래시장과 대형유통매장에서 구입하여 냉동보관하면서 사용하였다.

실험에 사용한 *M. roseus*는 파래김을 생리식염수로 10배 가수한 후 고르게 현탁한 다음 단계적 희석방법으로 nutrient agar (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) 평판배지에 도말하여 37°C에서 48시간 배양 한 후 평판배지에 붉은 색의 집락을 순수분리하고 계대배양하여 냉장보관하면서 사용하였다(11). 사멸실험에 사용한 *M. roseus*는 배양액으로 nutrient broth (Difco Laboratories)를 사용하여 37°C에서 24시간 전배양 한 후 50 mL의 배지에 1 mL 접종한 후 37°C에서 본배양하여 대수증식기 후반기의 균체를 수거하여 사용하였다. 수거한 배양액은 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 세포를 침전시킨 후 0.85% 멸균생리식염수로 재현탁하고 원심분리하는 과정을 2회 반복한 후 실험에 사용하였다. 균체 배양액은 매번 동일한 조건에서 새로이 배양하여 사용하였다.

### 광펄스 처리장치 및 방법

본 연구에 사용된 광펄스 처리장치는 전원 공급부, 펄스 발생기, 램프 그리고 처리용기 등으로 구성되어 있다. 전원 공급부는 일반 상용 전원을 사용할 수 있도록 구성하여 AC 220V, 50/60 Hz의 단상의 전원을 사용하였으며, 소비전력은 1.2 kW로 설계되었다. 출력부는 DC 전원으로 0-1,200 V의 상시 전압을 출력할 수 있도록 하였으며, 전류는 안전을 고려하여 1 A 미만이 되도록 하였다. 사용가능한 주파수(pulse number)는 1-50 Hz이고, 1회 작동할 수 있는 최대 시간은 60분이다. 처리용기는 광원과 처리 시료간의 거리를 조절할 수 있도록 칸을 나누어 spacer를 활용하도록 제작하였다. 사용된 광원은 Xenon XAP series의 flash 램프(NL 4006, Heraeus Noblelight, Cambridge, UK)로 무수 xenon 가스로 충전되어 있어 램프로부터 빛을 이끌어내기 위해서는 xenon 가스를 여기시켜 플라즈마를 형성시켜야한다. Xenon 가스를 여기시키기 위한 triggering 최소 전압은 16 kV이며, 상시적으로 600-1,200 V의 전압이 공급되어야 한다.

*M. roseus*의 사멸처리는 균체가 도말된 평판배지를 전압 500-1,000 V, 평판배지와 램프사이의 거리 6.0-9.7 cm, 펄스수 3-10 Hz의 범위에서 광펄스 처리를 하였으며, 처리시간은 1-10분 사이에서 임의의 시간을 선택하여 처리하였다.

### 생균수의 측정

Nutrient broth 배지에서 배양한 *M. roseus*를 평판배지에 도말하고 균주가 도말된 평판배지를 광펄스 처리한 후 37°C에서 48-72 시간 배양하여 평판배지에 형성된 집락수를 계수하였다. 균락수는 30-300개 사이의 것을 계수하였으며 CFU/mL로 나타내었다. 광펄스 처리에 따른 균체의 생존율은 초기균수( $N_0$ )에 대한 처리 후 생존균수( $N$ )의 비율로 표시하였으며, 모든 실험은 각 시료당 3

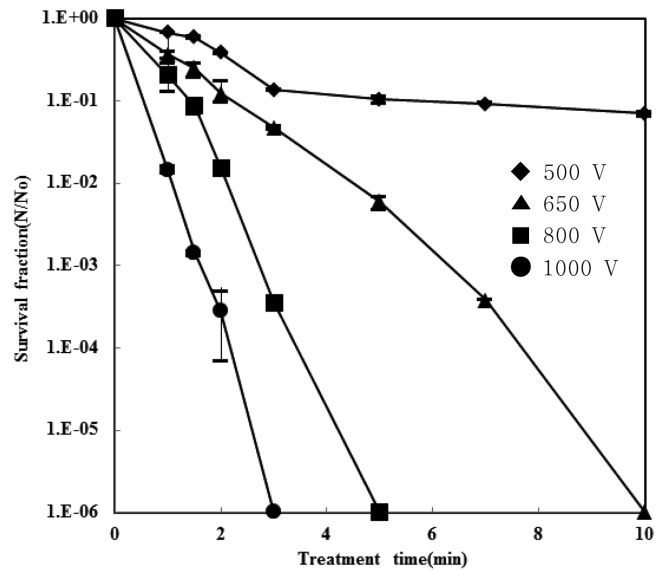


Fig. 1. Inactivation of *M. roseus* as a function of light intensity by intense pulsed light treatment. Intense pulsed light treatments were carried out at 5 pps and 7.9 cm.

회 반복 실험하여 측정하였다.

### 사멸 속도 및 D값

광펄스 처리에 따른 *M. roseus*의 빛의 세기, 펄스수, 거리에 따른 사멸 속도( $k$ )와 D값은 각 변수에서 시간에 따른 사멸곡선에서 직선부분을 선택하여 회귀분석을 통해 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 빛의 세기(voltage)에 따른 사멸효과

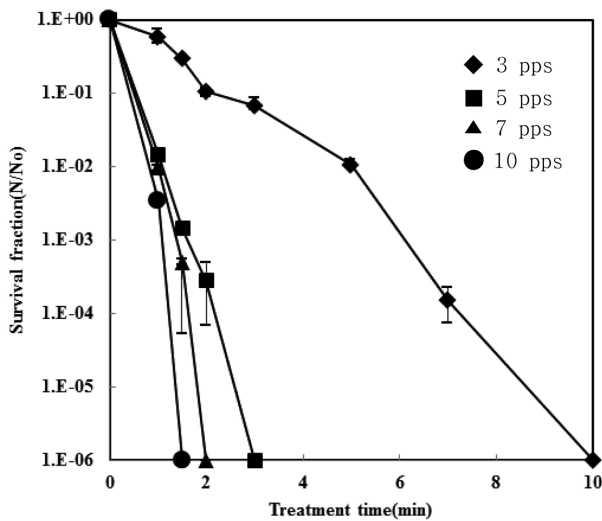
광펄스 살균에 있어서 빛의 세기는 미생물의 사멸에 가장 큰 영향을 미치는 요인으로 이는 높은 펄스 전압을 사용함으로써 발생하는 빛 에너지의 밀도가 높아짐에 따라 조사되는 빛의 양도 많아지게 되어 미생물의 사멸에 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(12).

빛의 세기에 따른 *M. roseus*의 사멸효과는 Fig. 1에 나타내었다. *M. roseus*는 500 V에서 10분 처리 후 약 1.1 log, 1,000 V에서 3분 처리 후에는 6.4 log의 감소를 보였으며, 그 이상의 처리 시간에서는 모든 균이 사멸하는 것을 관찰할 수 있었으며, 빛의 세기가 증가함에 따라 생존 균수는 shoulder line이나 tailing 없이 지수적으로 감소하였다. 이는 일반적으로 UV살균이 균체 분포의 불균일성이나 multi-hit 현상 등으로 tailing 현상(13)을 나타내지만 광펄스 살균의 경우에는 tailing 현상이 없는 것을 특징으로 한다는 보고(14-16)와 일치하였다.

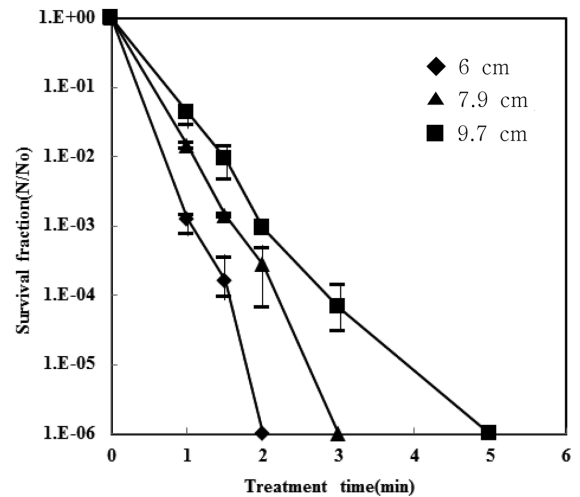
빛의 세기에 따른 균의 사멸속도( $k$ )와 D값을 보면 500 V에서

Table 1. Inactivation rate constants and decimal reduction times of *M. roseus* as a function of light intensity, pulse number and distance between light source and samples by intense pulsed light treatments

	Light intensity (V)				Pulse number (pps)				Distance (cm)		
	500	650	800	1000	3	5	7	10	6	7.9	9.7
Inactivation rate constant ( $k$ , $\text{min}^{-1}$ )	0.28	1.11	2.64	4.16	1.21	4.16	5.01	5.70	5.94	4.16	3.27
D value (min)	8.35	2.07	0.87	0.55	1.90	0.55	0.46	0.40	0.39	0.55	0.70



**Fig. 2. Inactivation of *M. roseus* as frequency by intense pulsed light.** Intense pulsed light treatments were carried out at 1000 V and 7.9 cm.



**Fig. 3. Inactivation of *M. roseus* as a function of distance by intense pulsed light.** Intense pulsed light treatments were carried out at 1000 V and 5 pps.

0.28 min<sup>-1</sup>, 8.35분, 1000 V에서 4.16 min<sup>-1</sup>, 0.55분으로 나타났다 (Table 1). 즉 빛의 세기가 증가함에 따라 D 값이 감소하여 미생물의 사멸효과가 커지는 것을 알 수 있었다.

**펄스 수(pulse number)에 따른 사멸효과**

펄스수(pps, pulse/sec)는 초당 점멸되는 빛의 수로 이에 대한 사멸효과를 Fig. 2에 나타내었다. Fig. 2에서 보듯이 3, 5, 7 pps에서 각각 2분 처리를 했을 경우 1.0, 3.6, 6.4 log의 사멸효과를 나타냈었으며, 모든 균이 사멸하기 위해 필요한 처리시간은 각각 10, 3, 2분이었고, 10 pps에서는 2분이 되기 전에 모든 균이 사멸하였다. 펄스 수에 따른 사멸속도 상수와 D값(Table 1)을 보면 펄스의 수가 증가함에 따라서 같은 시간을 처리하였을 때 사멸효과가 증가함을 알 수 있는데 광펄스 처리에서 펄스수에 따른 사멸효과의 영향을 보고한 논문은 없었으나 고전압 펄스 전기장 처리시 펄스수에 따른 사멸 효과를 보면 처리시간을 같이 하였을 경우 펄스수가 증가함에 따라 사멸효과가 증가한다는 보고와 일치(17)하였으며, 펄스수가 증가함에 따라 사멸효과가 증가하는 것은 펄스수가 높을 경우 짧은 시간 안에 살균매체에 전달되는 에너지가 많아지면서 미생물의 세포막 지질 이중층에 전달된 에너지가 유동성에 영향을 주어 사멸효과가 증가될 수 있는 것(18,19)으로 보인다.

**광원과 시료사이의 거리에 따른 사멸효과**

광원과 시료사이의 거리는 광펄스 처리에 있어서 미생물 살균에 영향을 미치는 중요한 인자 중 하나이다. 광원의 거리에 따른 *M. roseus*의 사멸효과는 Fig. 3에 나타내었다. Fig. 3에서 보듯이 시료와 광원사이의 거리가 가까울수록 사멸율이 증가하는 경향을 보였으며, 균 전체가 사멸하는데 필요한 시간은 6, 7.9, 9.7 cm의 거리에서 각각 2, 3, 5분으로 나타났으며, 사멸속도상수는 5.94, 4.16, 3.27 min<sup>-1</sup>, 그리고 D값은 0.39, 0.55, 0.70분이었다 (Table 1). 광원과 시료사이의 거리에 따른 사멸효과의 차이는 광원에서 발생하는 에너지가 시료 표면에 전달되는 양의 차이로 거리가 가까워짐에 따라 표면에 도달하는 에너지의 밀도가 커지면서 photothermal에 의한 효과가 커지기 때문(12,20)인 것으로 보인다.

**요 약**

김에 존재하는 *M. roseus*는 비병원성 세균이나 사람이 면역력이 떨어지게되면 질병을 일으킬 수 있는 균주로서 열처리를 통해서도 쉽게 사멸되지 않고 특히 10 kGy의 감마선 조사에서도 1 log, 40 kGy의 조사선량에서 1 log CFU/mL 이상의 생존율을 나타내는 방사선 저항 세균이다. 이러한 방사선 저항 세균인 *M. roseus*를 광펄스 살균을 통해 살균 가능성을 알아보았다. *M. roseus*는 빛의 세기가 증가함에 따라 사멸율이 증가하는 경향을 나타냈으며, 1,000 V의 빛의 세기에서 3분 처리 후에 6.4 log의 감소효과를 보였고 tailing 현상을 보이지 않았다. 빛의 세기와 처리시간을 같이 한 조건에서는 단위 시간동안 펄스 수가 높을수록 살균율이 높아졌으며, 10 pps에서는 2분의 처리로 모든 균이 사멸하였다. 또한 광원과 시료사이의 거리는 가까울수록 사멸율이 증가하는 경향을 보였다. 이러한 연구 결과로 볼 때 광펄스 살균이 향후 김의 위생적 처리의 방법의 하나로 가능성이 있을 것으로 예측된다.

**감사의 글**

본 연구는 농립수산기술개발사업(고부가가치 식품개발사업)의 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

**문 헌**

1. Shin JK, Kim BR, Kim AJ. Nonthermal food processing technology using electric power. Food Sci. Ind. 43: 21-34 (2010)
2. Hiramoto T. Method of sterilization, US Patent 4,464,336 (1984)
3. Dunn JE, Clark RW, Asmus JF, Pearlman JS, Boyerr K, Painchaud F. Methods for preservation of foodstuffs. US Patent 4,871,559 (1989)
4. Bolton JR, Linden KG. Sterilization of methods for fluence (UV dose) determination in bench-scale UV experiments. J. Environ. Eng. 129: 209-215 (2003)
5. Slieman TA, Nicholson WL. Artificial and solar UV radiation induces strand breaks and cyclobutane dimer in *Bacillus subtilis* spore DNA. Appl. Environ. Microbiol. 62: 1977-1983 (2000)
6. Park SY, Choi JW, Yeon J, Lee MJ, Oh DH, Hong CH, Bahk GJ, Woo GJ, Park JS, Ha DS. Assessment of contamination level

- of foodborne pathogens in the main ingredients of Kimbab during the preparing process. Korean J. Food Sci. Technol. 37: 122-128 (2005)
7. Lee NY, Jo CU, Chung HJ, Kang HJ, Kim JK, Kim HJ, Byun MW. The prediction of the origin of microbial contamination in Kimbab and improvement of microbiological safety by gamma irradiation. Korean J. Food Sci. Technol. 37: 279-286 (2005)
  8. Kim DH, Song HP, Kim JK, Kim JO, Lee HJ, Byun MW. Determination of microbial contamination in the process of rice rolled in dried laver and improvement of shelf-life by gamma irradiation. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 32: 991-996 (2003)
  9. Kang SG, Park SH, Ki HJ, Ham KS. Chitosan treatment during the preparation of dried laver affects microbial growth and quality. J. Chitin Chitosan 6: 150-154 (2001)
  10. Lee HJ, Byun HS, Kim JH, Park HY, Jung KJ, Lee TS. Bacterial contamination of dried laver products. Bull. Nat. Fish. Res. Devel. Ins. 57: 221-226 (1999)
  11. Ahn HJ, Yook HS, Kim DH, Kim S, Byun MW. Identification of radiation-resistant bacterium isolated from dried laver(*Porphyra tenera*). J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 30: 193-195 (2001)
  12. Cho HY, Shin JK, Song YA, Yoon SJ, Kim JM, Pyun YR. Non-thermal pasteurization of lactic acid bacteria by high intensity light pulse. Korean J. Food Sci. Technol. 34: 631-636 (2002)
  13. Yaun BR, Summer SS, Eifert JD, Marcy JE. Response of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 to UV energy. J. Food Prot. 66: 1071-1073 (2003)
  14. Krishnamurthy K, Demirci, A, Irudayaraj J. Inactivation of *Staphylococcus aureus* by pulsed UV-light sterilization. J. Food Prot. 67: 1027-1030 (2004)
  15. Otaki M, Okuda A, Tajiman K, Iwasaki T, Kinoshita S, Ohgaki S. Inactivation differences of microorganisms by low pressure UV and pulsed xenon lamps. Water Sci. Tech. 47: 185-190 (2003)
  16. Wang T, MacGregor SJ, Anderson JG, Woolsey GA. Pulsed ultraviolet inactivation spectrum of *Escherichia coli*. Water Res. 39: 2921-2925 (2005)
  17. Jonathan MM, Rose MRM, Olag MB. Influence of treatment time and pulsed frequency on *Salmonella enteridis*, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* populations inoculated in melon and watermelon juices treated by pulsed electric field, Intl. J. Food Microbiol. 117: 192-200 (2007)
  18. Jeyamkondan S, Jayas DS, Holley RA. Kinetics of sterilization of *Lactobacillus brevis* cells by the application of high voltage pulses. Biotech. Bioeng. 40: 1412-1420 (1999)
  19. Korolczuk J, Mckeag JR, Fernandez JC, Baron F, Grosset N, Jeantet R. Effect of pulsed electric field processing parameters on *Salmonella enteritidis* inactivation. J. Food Eng. 75: 11-20 (2006)
  20. Gomez-Lopez VM, Devlieghere F, Bonduelle V, Debevere J. Factors affecting the inactivation of microorganisms by intense light pulses. J. App. Microbiol. 99: 460-470 (2005)