연부현상이 발생한 감귤로부터 분리한 효모에 대한 유기산의 생육 저해 효과

박은진[†]·김소연

제주대학교 식품생명공학과

Inhibitory Effects of Organic Acids against Pectinolytic Yeasts Isolated from Decayed Citrus

Eun-Jin Park† · Soyeon Kim

Department of Food Bioengineering, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

Abstract

Organic acids are known as natural sanitizers. We examined the sanitizing effects of five organic acids (acetic acid, propionic acid, citric acid, malic acid, and lactic acid) and their persistence on three pectinolytic yeast strains isolated from decayed citrus, and the persistence of their sanitizing effects was determined during storage at 4°C and 16°C. The 7~8 log CFU/mL of the mixed three yeast mixture was exposed to various concentrations of each organic acid for 1 min. The yeast mixtures decreased under detection limit(1 log CFU/mL) in 1% of acetic acid, followed by in 3% of propionic acid with the reduction of 5 log CFU/mL. The citric acid, malic acid, and lactic acid decreased the number of yeasts under detection limit at 7.5%. When treated with deionized water and 1~5% of organic acids were treated on the surfaces of citrus contaminated by yeasts, total numbers of the yeasts decreased under detection limit(3 log CFU) at 5% of acetic acid and 4 log CFU/piece at 5% propionic acid compared with deionized water. When treated with acetic acid and propionic acid on the stem ends of the contaminated citrus, total numbers of the yeasts significantly decreased 0.5 log CFU/piece at 3% of both organic acids. During storage at 4°C and 16°C for 20 days, total number of yeasts significantly decreased at 2% acetic acid compared with deionized water. This study suggested that organic acids could be used to sanitize microbial contaminants from citrus for storage and transportation.

Key words: citrus, pectinolytic yeast, organic acid, sterilization

I . 서 론

제주에서 재배되는 감귤은 전국 생산량의 대부분을 차지하고 있으며, 주로 생과 또는 주스 형태로 소비되고 있다. 최근 들어서는 껍질을 포함한 건조감귤뿐만 아니라다양한 가공식품에 부재료로 사용되고 있다. 또한 감귤의정유 성분은 방향제나 화장품 제조에도 이용하고 있다(Kim MS와 Choi YK 1997). 감귤 부패 병은 감귤 수확후 유통, 저장하는 과정에서 가장 문제가 되고 특히 감귤을 저장하는 과정 중 발생 비율이 높으며 Penicillium 속(genus)이 대표적인 원인균이다(Hyun JW 등 2001). 과거에는 병원균 방제를 위한 최선의 방안으로 합성 화학 농약이 오랫동안 사용되어 왔으나 최근 들어서는 합성 화학 농약에 대한 내성을 가진 변이균주가 발생하여 문제

가 되고 있다(Lee JH 등 2012).

감귤외피의 세포벽을 구성하는 주요 성분은 펙틴 (pectin)이다. 그러나 과일의 펙틴 성분은 과일즙의 추출, 여과, 농축, 그리고 청징(clarification)의 과정을 어렵게 만 드는 원인이 된다. 따라서 이러한 공정 중 펙틴을 제거하 기 위하여 펙틴 분해 효소(pectin-degrading enzyme)가 널 리 이용되고 있다(Nakagawa T 등 2002). 과일의 연화 (softening) 역시 세포벽 분해효소에 의한 펙틴의 분해로 인하여 발생한다. 펙틴을 분해하는 효소는 세균, 곰팡이, 효모 등의 미생물과 고등식물 등에 분포한다(Kang MJ 등 2000). 감귤류는 수확 후 저온(16°C)에서 저장하면서 유 통되고, 가정에서는 냉장고(4°C)에서 보관한다. 따라서 감귤 외피에 펙틴 분해 효소를 분비하는 미생물이 오염 되어 있고, 이들이 저온에서 증식이 활발하거나 저온에서 활성화되는 효소를 분비한다면 저장되는 과정에서 세포 벽이 분해되어 감귤에 연화가 발생하게 되고 결국 부패 하게 된다. 따라서 감귤의 연화 현상도 감귤류 품질 저하 에 주요한 원인이다.

과채류는 수확 후 저장이나 유통하는 과정 중에 호흡

†Corresponding author: Eun-Jin Park, Department of Food Bioengin-

eering, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

Tel: +82-64-754-3612 Fax: +82-64-755-3601 E-mail: ejpark@jejunu.ac.kr

과 증산 작용 등의 생리작용이 활발하며 곰팡이뿐만 아 니라 여러 미생물의 오염과 성장으로 인한 부패가 일어 난다(Park WP 등 2004). 현재의 식품 살균 공정은 대부분 가열 살균법에 의한 것이나 열에 민감한 과채류는 가열 살균법을 적용하기가 어려워 저온 저장이나 냉동을 통해 유통하거나 일부 화학적 살균법을 이용하고 있다(Park SJ 와 Park JY 2000). 하지만 이러한 저온 저장이 오랜 기간 지속될 경우 풍미변화 등의 품질 손실이 발생한다. 과채 류 표면 살균은 주로 염소계 소독 용액이나 오존 수용액 에 단순 침지하여 미생물을 제어하는 방식이 적용되고 있으며(Lee WJ 등 2011), 특히 오존 수용액으로 표면을 세척한 감귤이 시판되었으나 현재는 그 안전성에 논란이 있다. 또한 염소계 물질은 고농도로 장시간 사용할 경우 관능적 품질이 저하될 뿐만 아니라 처리 후 세척이 불충 분할 경우 잔류 염소로 인한 2차적 위해가 발생할 수 있 다(Kim SR 등 2012). 따라서 과채류를 안전하게 살균할 수 있는 연구는 계속 진행형이다(Park SJ와 Park JY 2000). 최근에는 안전한 천연물 유래 살균제를 희망하는 소비자의 요구가 증가함에 따라 글라이신(glycine), 에탄 올, 약초, 정유 성분(essential oil), 향신료 및 유기산(organic acid) 등을 이용한 병원균 생육 저해 연구가 활발하게 진 행되고 있다(Kim DH와 Hahn YS 2003).

유기산은 FDA에서 GRAS(Generally Recognized As Safe), 즉 안전한 식품 첨가물로 인정된 물질이다(Chang SK 등 2010). 유기산은 예전부터 식품의 부패 방지와 더 불어 저장 기간을 연장하기 위한 목적으로 널리 사용되 고 있으며 이에 대한 많은 연구들이 수행되었다(Chang SK 등 2010). 주로 초산(acetic acid), 구연산(citric acid), 그리고 젖산(lactic acid) 등의 유기산의 효과가 큰 것으로 보고되었다(Kang SN 등 2002). 초산은 Escherichia coli, Yersinia enterocolitica, Listeria monocytogenes 그리고 Salmonella Typhimurium에 대한 억제 작용을 나타냈고, 구연산은 양돈 사료에 첨가되어 위, 공장 및 맹장에서 Clostridium 속을 감소시켰다. 젖산은 식육 가공공정 중 도체에서 병원성 미생물의 증식 억제뿐만 아니라 동물 사료에서의 곰팡이 증식 억제 등 식품에 오염된 유해 미 생물의 살균에 이용 가능성을 확인하였다(Park JH 등 2002). 또한 프로피온산(propionic acid)은 곰팡이와 효 모에 대한 생육 저해 효과를 가지는 것으로 보고되었다 (Razavi-Rohani SM과 Griffiths MW 1999). 유기산은 식품 표면의 pH를 낮추어 미생물이 생육하기 어려운 환경을 조성함으로써 미생물 번식을 억제, 사멸시키는 작용을 하 며 여기에 유기산 자체의 수분활성 저해작용이 더해져 항균력이 더욱 상승된다고 보고되었다(Kim DH와 Hahn YS 2003).

감귤은 불규칙한 외부구조와 복잡한 내부구조로 인하여 품질 변화를 조절하고 예측하는데 상당한 어려움이

따르기 때문에 그에 관한 연구가 미흡한 실정이다(Han GH와 Kim BY 2001). 따라서 본 연구에서는 감귤에 오염되어 냉장온도에서 저장하는 동안 증식하면서 연부현상을 유발한 효모를 분리하고, 이를 제어할 수 있는 방법을 찾고자 하였다. 이를 위하여 안전성과 미생물에 대한 살균력이 검증된 유기산을 이용하였으며, 균주 자체에 대한살균효과, 분리한 효모를 감귤과 청견의 외피 표면 및 꼭지에 인위적으로 오염시킨 후의 살균 효과, 그리고 유기산 살균 후 저장 중 그 효과 지속 여부 등을 확인하고자하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 시료 준비

본 실험에 사용한 감귤은 하우스 재배 온주밀감 (Satsuma mandarin)으로 제주시내 마트에서 구입 후 4°C에서 냉장보관하면서 실험에 사용하였다. 감귤 외피 표면의 물기를 제거하기 위하여 실험 전 무균상(Clean bench, BF-120BSC, Biofree, Seoul, Korea)에 넣고 실온에서 일정시간 건조하였다. 생육 저해 활성 시험에 사용된 유기산은 초산(acetic acid; Sigma, Germany), 구연산(citric acid), 사과산(malic acid), 젖산(lactic acid), 그리고 프로피온산(propionic acid; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)이며, 멸균 증류수(deionized water)를 이용하여 적정 농도로 희석한 후 실험에 사용하였다. 모든 실험은 상온(15~25°C)에서 수행하였다.

2. 연부현상이 발생한 감귤로부터 효모의 분리 및 배양

본 실험에 사용한 효모는 냉장고에서 몇 개월 동안 보관하는 과정에서 연부현상이 발생하여 부패한 감귤로 부터 직접 분리하였다. 부패한 감귤을 멸균 필름봉투 (Bagfilter-111410, Interscience, Saint Nom, France)에 담고 0.1% BPW(Buffered Peptone Water)을 넣은 후 균질기 (Bagmixer-400VW, Interscience, Saint Nom, France)로 균 질화 하였다. 균질화 된 감귤 시료는 1% BPW로 희석한 후 PDA(Potato Dextrose Agar, BD, Franklin Lakes, NJ, USA) 배지에 도말하고 15°C에서 7일 동안 배양하였다. 배양 후 형성된 전형적인 효모 colony 형태를 가지는 20~50개의 colony들 중에서 대표성을 보이는 6개를 선택 한 후 순수분리를 위하여 PDA 배지에 계대 배양하였다. 배양된 효모 colony는 PCR(Polymerase Chain Reaction) 방법으로 ITS(Internal Transcribed Spacer) regions 유전자를 증폭한 후 그 염기서열 분석을 통하여 동정(identification) 하였다. Colony PCR 방법은 다음과 같다. 단일 효모 colony를 1 toothpick 채취하여 primer set(각각 10 pmol의 forward와 reverse primer), 증류수, 그리고 PCR-premix

(iNtRON Biotechnology, Sungnam, Korea)와 혼합하였다. 효모의 ITS regions 유전자 증폭에 사용된 primer set은 forward primer ITS1F(5'-CTTGGTCATTTAGAGGAA-GTAA-3')와 reverse primer인 ITS4R(5'-TCCTCCGCTTAT-TGATATGC- 3')이며 PCR 조건은 다음과 같다. 94°C에 서 20초간 변성, 55°C에서 20초간 유전자 결합, 72°C에서 1분 30초간 증폭 과정을 30 cycle 실시한 다음 72°C에서 5분 반응 후 종료하였다. 6개 colony는 Sanger sequencing 을 이용하여 그 유전자 염기 서열을 분석하였다. 분리 효 모의 ITS region 유전자 염기서열은 GenBank database (National Center for Biotechnology Information)를 통하여 기존에 보고된 효모의 ITS region 염기서열과 상동성 (similarity)을 비교하였다. 염기서열 분석 결과 이들 6개 분리 효모는 다시 약간의 염기서열 차이를 가지는 3종 류의 strain으로 분류할 수 있었다. 이 3종의 효모를 각 각 YM broth(BD, Franklin Lakes, NJ, USA)에 배양한 후 10,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 각각 수집 된 균체는 0.1% BPW로 재현탁 후 하나로 합하여 생균 수를 10⁷~108 CFU/mL로 조절한 효모 혼합액(mixture)을 만들었다. 효모 혼합액은 4°C에서 냉장보관하면서 3일 이내에 실험에 사용하였다.

3. 효모 균체에 대한 유기산의 생육 저해 효과

효모 혼합액에 처리한 유기산은 최종 농도가 0.5%, 1%, 3%, 5%, 그리고 7.5%가 되도록 하였다. 효모 혼합액 300 μL에 각 실험 농도보다 2배 농축된 농도의 유기산 300 uL를 혼합하여 최종 농도를 맞춘 후 잘 섞어준 다음 실온에서 1분간 반응시켰다. 이후 2배 농축된 DEB(D/E Neutralizing Broth, BD, Franklin Lakes, NJ, USA)를 600 μL 넣어(혼합 후 최종 농도 1X) 반응을 종료시켰다. 반응 액은 0.1% BPW로 십진 희석하여 PDA배지에 도말 후 15℃에서 72시간 이상 배양하였다. 배양 후 생성된 전형적 인 효모 colony를 계수하였다. 효모 생균수는 log CFU/mL 로 나타내었다.

4. 감귤 외피에 접종한 효모에 대한 유기산의 생육 저해 효과

감귤 외피를 3×3 cm의 크기로 자른 후 효모 혼합액 100 μL를 25~30회로 나누어 spotting법으로 접종한 후 무균상에서 2시간 동안 건조하여 효모 혼합액이 감귤 외피 표면에 잘 부착되도록 하였다. 접종된 감귤 외피는 각각의 유기산 희석액 100 mL가 담긴 비커에 1분 동안 침지시켰다. 대조군으로는 유기산 희석액 대신 증류수를 사용하였다. 각각 처리된 시료는 멸균 필름봉투에 담고 30 mL의 DEB를 넣은 후 2분간 균질화 하였다. 균질화 된 시료는 0.1% BPW로 십진 희석하여 PDA배지에 도 말한 후 15°C에서 72시간 이상 배양하여 계수하였다. 효모 생균수는 log CFU/piece(접종한 외피 조각)로 나타 내었다.

5. 감귤 꼭지에 접종한 효모에 대한 유기산의 생육 저해 효과

감귤 꼭지를 중심으로 하여 외피를 3×3 cm의 크기로 자른 후 효모 혼합액 100 uL를 꼭지 부분에 접종하여 건조하였다. 이후 과정은 외피에 대한 실험방법과 동일 하다.

6. 청견 외피에 접종한 효모에 대한 유기산의 생육 저해 효과

본 연구에 사용된 하우스감귤 외피보다 더 불규칙한 표면을 가지는 청견을 대상으로 실험하였다. 청견은 감귤 품종과 오렌지 품종의 계량 품종이다. 청견 외피를 3×3 cm의 크기로 잘라 감귤에 대한 실험과 동일한 방법으로 수행하였다.

7. 유기산으로 살균 처리한 감귤의 저장 중 효모 생 균수 확인

감귤 외피에 오염된 효모를 유기산 희석액으로 살균 처리한 후 4°C와 16°C에서 각각 저장하면서 생육 저해 효과 지속 여부를 확인하였다. 4°C는 일반 가정에서 감귤 을 저장하는 온도이고 16°C는 감귤 유통 관계자를 통해 확인한 감귤의 상업적 판매를 위한 장기 저장 온도이다. 효모 혼합액을 감귤 전체 외피에 고르게 접종한 후 무균 상에서 2시간 이내로 건조하였다. 유기산은 위의 실험에 서 생육 저해 효과가 확인된 2% 초산을 사용하였다. 대 조군으로는 증류수를 사용하여 같은 방법으로 처리하였 다. 2% 초산 수용액에 1분 침지 후 꺼내서 바닥에 물기 만 제거한 후 한 개씩 플라스틱 용기에 넣고 뚜껑을 덮은 후 각각의 온도에서 20일 동안 저장하면서 0일, 3일, 5일, 10일, 15일, 그리고 20일에 표면에 잔존하는 효모를 계수 하였다. 효모 계수는 저장된 감귤의 외피 전체를 멸균된 실험용 칼로 잘 도려낸 후 멸균 필름봉투에 담고 60 mL 의 DEB를 가한 후 stomacher로 2분간 균질화 하였다. 균 질화 된 시료는 위와 같은 방법으로 그 생균수를 측정하 였다.

8. 통계처리

관찰된 모든 실험결과는 SPSS 통계분석 프로그램(SPSS 12.0K for window, SPSS Inc., USA)의 ANOVA(Duncan's multiple range test) 분산분석을 이용하여 평균값의 유의 차(*p*<0.05)를 검증하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 분리 효모의 동정 및 효모 균체에 대한 유기산의 생육 저해 효과

감귤로부터 분리한 6개의 효모 colony는 그 ITS 유전자 염기 서열 분석 결과 저온 활성 펙틴 분해능(cold-active pectinolytic activity)을 가지는 호냉성 효모(psychrophilic yeast)인 Cystofilobasidium capitatum와 99% 이상의 상동 성을 가지는 것으로 확인되었다(Nakagawa T 등 2002). 분리한 6개 중 3개 효모가 실험에 사용되었는데 미생물 은 속과 종(species)이 같아도 염기서열이 다르면 strain 단위로 분류가 되는데, 각각의 strain은 각각의 계통분류 학적, 생리적, 그리고 화학적 특성을 가진다. 따라서 3개 효모 strain을 혼합하여 실험에 사용하였다.

농도를 달리한 다섯 종류의 유기산을 효모 혼합액에 처리한 후 그 저해 효과를 확인한 결과는 Table 1과 같다. 효모 혼합액의 초기 총균수는 7.14 log CFU/mL였으며, 초산은 0.5%의 농도에서 대조구와 유의적인 차이가 없었 으나 1%, 3%, 5%에서는 검출한계(detection limit)인 1 log CFU/mL 이하로 감소하였다. 프로피온산은 0.5%와 1% 처리 시 그 생균수가 각각 약 0.4 log와 2.8 log 정도 유의적으로 감소하였다. 3% 이상의 농도에서는 검출한계 이하로 감소하였다. 구연산과 젖산은 1% 이상의 농도에 서 효모 생균수의 유의적인 감소를 나타내었으나, 5%까 지는 농도 증가에 따른 생육 저해 효과가 확인되지 않았 다. 사과산은 3%부터 유의적인 저해 효과를 나타내었다. 모든 유기산에서 공통적으로 7.5%의 농도부터는 효모 생 균수가 검출한계 이하로 감소하였다. 효모 균체에 대한 유기산의 살균 효과에서는 초산이 상대적으로 낮은 농도 에서 저해효과가 뛰어났고, 다음으로 프로피온산임을 알 수 있었다. 초산과 젖산 수용액을 30분 처리하여 가공 쌀 부패효모의 생육 저해 효과를 확인한 연구에서 초산 3% 에서는 효모 생균수가 검출한계 이하로 감소하였지만, 젖 산은 효모 종류에 따라 5%에서 검출한계 이하로 감소함

을 확인하여 유기산 종류에 따른 효모 생육 저해 효과에 차이가 있음을 보고하였다(Kim JS 등 2007). 이는 초산이 젖산보다 효모의 살균 효과가 우수하다는 본 연구 결과 와 유사함을 알 수 있다. 유기산의 미생물에 대한 생육 저해 연구는 효모와 곰팡이 보다는 세균에 대하여 활발 히 수행되었다. 많은 연구에서 유기산의 살균 효과는 사 용한 유기산의 종류와 그 대상 세균에 따라 차이가 있음 을 보고하였다. 식중독을 유발하는 Staphylococcus aureus 에 대해서는 프로피온산의 저해 효과가 가장 두드러지 게 나타났으며, 젖산은 미미한 효과를 보였다. Listeria monocytogenes는 젖산, 프로피온산, 그리고 주석산 등에 의 해 그 생육이 크게 저하되었으며, Salmonella typhimurium 은 초산에 대하여 민감하게 반응하였다. Escherichia coli O157:H7는 초산과 프로피온산에 의하여 증식이 억제되 었으나, 젖산에 대해서는 민감성이 낮았다(Ahn YS와 Shin DH 1999). 유기산의 미생물 사멸 효과는 해리되지 않은 상태로 세포 내에 이동한 유기산이 이온화되면서 세포막의 투과도를 변화시켜 기질 이동을 방해하거나 세 포 내 pH 변화, 효소의 활성 저해 작용 등을 통하여 발생 한다(Ahn YS와 Shin DH 1999). 또한 같은 미생물이라도 유기산 종류에 따라 효과가 다르게 나타나는 이유는 유 기산 종류마다 세포 내로 이동하는 정도에 차이가 있기 때문인 것으로 판단된다(Young KM과 Foegeding PM 1993).

2. 감귤 외피에 접종한 효모에 대한 유기산의 생육 저해 효과

효모 혼합액에 오염된 감귤 외피에 유기산 용액을 처 리한 후 잔존하는 효모 생균수를 측정한 결과는 Table 2 에 나타내었다. 대조군으로 사용한 증류수 처리 시료에서 도 초기 접종 균수보다 약 1.3 log CFU/piece 감소하였음 을 확인하였는데, 이는 증류수 자체의 효모 살균 효과가 아닌 마찰에 의한 물리적 감소로 판단된다(Park EJ 등 2008; Park SJ 등 2014). 초산과 프로피온산은 2%부터 유

F able 1. Log reduction of the	yeasts by five of	organic acids at va	arious concentrations
---------------------------------------	-------------------	---------------------	-----------------------

	Inoculum	0.5%	1.0%	3.0%	5.0%	7.5%
	log CFU/mL					
Acetic acid	$7.14\pm0.09^{1)}$	6.45±0.20	N.D. ²⁾	N.D.	N.D.	N.D.
Propionic acid	7.14 ± 0.09^{c}	6.69 ± 0.12^{b3}	4.25 ± 0.05^{a}	N.D.	N.D.	N.D.
Citric acid	7.14 ± 0.09^{b}	6.34 ± 0.18^{a}	6.68 ± 0.05^{a}	6.52 ± 0.13^{a}	6.36 ± 0.19^{a}	N.D.
Malic acid	7.14 ± 0.09^{b}	6.86 ± 0.18^{ab}	6.82 ± 0.06^{ab}	6.41 ± 0.19^{a}	6.29 ± 0.30^{a}	N.D.
Lactic acid	7.14 ± 0.09^{d}	6.09 ± 0.41^{bc}	6.36 ± 0.06^{ab}	6.55 ± 0.19^{c}	6.41 ± 0.12^{a}	N.D.

¹⁾N.D.: Not Detected (detection limit: 1 log CFU/mL).

^{3)a-d}Different small letters within the same row indicate significant differences between the concentrations (p<0.05).

Table 2. Log reduction of the yeasts by five organic acids at various concentrations of on the surfaces of citrus

	Inoculum	Deionized Water	1.0%	2.0%	3.0%	4.0%	5.0%
				log CFU/piece			
Acetic acid	8.58±0.31 ^{d1)}	7.28±0.48°	7.01±0.33 ^{c4)}	5.73±0.81 ^b	4.74±0.63 ^a	4.45±0.06 ^a	N.D. ²⁾
Propionic acid	8.58 ± 0.31^{d}	7.28 ± 0.48^{c}	7.37 ± 0.32^{c}	5.35 ± 0.42^{b}	5.30 ± 0.42^{b}	5.23 ± 0.21^{b}	$3.24{\pm}0.58^a$
Citric acid	8.58 ± 0.31^{b}	7.28 ± 0.48^{a}	7.13 ± 0.31^{a}	_3)	_	_	7.17 ± 0.41^{a}
Malic acid	8.58 ± 0.31^{b}	7.28 ± 0.48^{a}	7.03 ± 0.23^{a}	_	_	_	7.02 ± 0.31^{a}
Lactic acid	8.58 ± 0.31^{b}	7.28 ± 0.48^{a}	7.45 ± 0.08^{a}	_	_	_	7.08 ± 0.68^{a}

¹⁾Means±SD

의적인 생균수 감소 효과를 보였으며, 초산은 5%에서 검 출한계(3 log CFU) 이하로 감소하였다. 그러나 구연산, 사과산, 그리고 젖산은 5% 농도에서도 유의적인 생균수 감소를 확인할 수 없었다. 효모 균체 자체에 대한 실험 결과와 마찬가지로 감귤 외피 표면에 대한 유기산의 효 모 생육 저해효과 역시 초산이 가장 우수하고, 이어서 프 로피온산임을 확인하였다. 최근 들어 냉동과일에 대한 수 요가 증가하면서 블루베리와 복분자, 그리고 오디를 수확 후 냉동하기 전에 표면 미생물을 효과적으로 제거하고자 이산화염소수, 푸마르산(fumaric acid), 그리고 구연산을 세척제로 이용하였다(Park SJ 등 2014). 유기산 수용액은 0.1%로 제조하였고 여기에 과일을 20분 동안 침지한 결 과 푸마르산과 구연산은 과일 표면의 일반세균과 진균(곰 팡이와 효모) 수를 각각 약 1 log와 0.5 log CFU/piece 감 소시키는 효과를 나타냈으며, 이는 50 ppm 이산화염소수 와 유사한 감균 효과임을 확인하였다. 또한 이산화염소와 유기산을 병용 처리했을 때 그 효과는 더 크게 나타났다. 새싹채소 역시 최근 소비가 증대되고 있으며, 세척 후 바 로 섭취하거나 세척된 상태로 소매점에서 판매된다. 새싹 채소에 초산과 구연산을 1% 수용액으로 만들어 5분 동안 처리한 결과 2 log CFU/piece의 미생물 감소를 확인하였 으며, 유기산에 에탄올을 병용 처리하였을 때 그 효과가 증대됨을 확인하였다(Cho SK와 Park JH 2012). 깻잎에 오염된 S. typhimurium, S. aureus, 그리고 Bacillus cereus 를 제거하기 위하여 전해산화수를 용매로 0.5~2%의 초산

수용액을 만들어 그 살균효과를 확인한 결과, 초산이나 전해산화수 단독으로 처리할 때보다 병용 처리했을 때 그 효과가 상승함을 확인하였다(Kim SR 등 2012). 본 연 구에서는 유기산 수용액에 감귤을 1분간 침지하여 그 살 균효과를 확인하였기 때문에 침지 시간을 증가시키면서 유기산 농도를 감소시키거나, 다른 살균방법과 병용 처리 하는 방법 등의 적용을 통하여 그 효과를 증대시킬 수 있 을 것으로 판단된다.

3. 감귤 꼭지에 접종한 효모에 대한 유기산의 생육 저해 효과

감귤 표면은 외피와 꼭지 부분으로 구분할 수 있는데, 꼭지는 외피보다 구조가 복잡하여 살균제가 접촉하기 어 려울 것으로 추측되는 부위이다. 따라서 감귤 꼭지에 오 염된 효모에 대한 유기산의 생육 저해 효과를 확인하였 다(Table 3). 유기산은 위의 실험에서 효모 생균수 감소 효과가 상대적으로 우수한 것으로 확인된 초산과 프로피 온산을 사용하였다. 감귤 꼭지의 효모 생균수는 외피와 마찬가지로 증류수로 세척했을 때 약 1.2 log CFU/piece 정도의 물리적 감소를 확인하였으며, 유기산 수용액은 2% 농도 이상에서 처리하였을 때 유의적인 감소를 확인 하였다. 초산은 2%와 3%를 처리했을 때 각각 0.9와 0.6 log CFU/piece의 감소를, 프로피온산은 2%와 3%에서 각 각 0.5와 0.6 log CFU/piece의 감소를 나타내어 외피에 처 리했을 때와 비교했을 때 그 저해 효과가 크지 않았음을

Table 3. Log reduction of the yeasts by acetic acid and propionic acid on the stem ends of citrus

	Inoculum	Deionized Water	1%	2%	3%	
	log CFU/piece					
Acetic acid	8.29±0.28 ^{c1)}	7.08±0.12 ^{b2)}	7.31±0.02 ^b	6.32±0.12 ^a	6.34±0.20 ^a	
Propionic acid	8.29±0.28°	7.08 ± 0.12^{b}	7.37±0.16 ^b	6.60 ± 0.13^{a}	6.46 ± 0.08^{a}	

¹⁾Means±SD

²⁾N.D.: Not Detected (detection limit: 3 log CFU).

³⁾-: Not experiment.

^{4)a-c}Different small letters within the same row indicate significant differences between the concentrations (p<0.05).

^{2)a-c}Different letters within the same row indicate significant differences (p<0.05).

확인하였다. 이는 위에서 언급한 바와 같이 외피에 비하여 꼭지부분이 더 불규칙한 구조를 가지고 있기 때문으로 생각되며 감귤마다 그 모양과 형태가 일정하지 않아연구에 어려움이 따른다(Han GH와 Kim BY 2001). 그러나 감귤 꼭지 부분이 이처럼 복잡한 구조를 가졌기 때문에 미생물의 오염도 어려울 것으로 추측되며, 오염이 되었다 하더라도 본 연구 결과처럼 물로 세척하는 과정을 통하여 일정 부분 물리적인 제거가 가능할 것으로 판단된다.

4. 청견 외피에 접종한 효모에 대한 유기산의 생육 저해 효과

실험에 사용한 감귤과 표면 구조가 다른 청견을 대상 으로 효모에 대한 유기산의 살균효과를 확인하였다(Table 4). 유기산은 초산을 3%와 5%로 만들어서 처리하였으며, 그 결과 모두 유의적인 감소효과를 나타내었다. 그러나 그 감소의 정도는 3%에서 0.6 log CFU/mL, 5%에서 0.8 log CFU/piece를 나타내어 감귤 외피와 비교했을 때 효모 저해 효과가 미미하였다. 청견은 감귤과 오렌지를 이용한 신품종으로 그 표면 구조가 감귤과 오렌지의 중간 정도 이며, 본 연구에서 사용한 감귤은 하우스에서 재배되었기 때문에 노지 재배 감귤보다 표면이 매끄럽다. 따라서 본 실험에 사용한 감귤 보다 청견의 외피 구조가 조금 더 복 잡할 것으로 생각되고, 이는 유기산의 효모 생육 저해 효 과 차이에서도 확인할 수 있었다. 따라서 같은 감귤류라 고 할지라도 그 품종과 재배 방식에 따라 세척제 적용에 따른 효과에 차이가 있을 것으로 판단되며, 이에 대한 연 구도 앞으로 수행되어야 할 것으로 판단된다.

5. 유기산으로 살균 처리한 감귤의 저장 중 효모 생 균수 확인

감귤 외피와 꼭지에서 유의적인 효모 생균수 감소 효과를 확인한 2% 초산 수용액을 이용하여 효모로 오염된 감귤을 세척하고 4°C와 16°C의 저장온도에서 저장하는 동안 그 저해효과의 지속성을 확인하여 그 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 효모 접종량은 8.5 log CFU/piece였으며, 증류수에 1분 침지 후 7.56 log CFU/piece로, 1% 초산 수용액에 1분 침지 후 7.03 log CFU/piece로 감소하였다. 이두 시료에 잔존하는 효모의 생균수는 저장 3일 후 감소

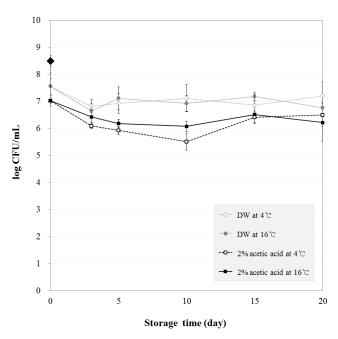


Fig. 1. Total viable counts of yeasts on the surfaces of citrus after the treatment of 2.0% acetic acid during storage at 4°C and 16°C for 20 days

하였는데, 증류수 처리 시료는 6.83(4°C)와 6.66(16°C) log CFU/piece, 초산 처리 시료는 6.10(4°C)와 6.43(16°C) log CFU/piece로 각각 감소하였다. 이후 5일부터는 증류수 처 리 시료에서 약간의 생균수 증가를 보이다가 20일의 저 장기간 내내 그 수준을 유지하였다. 2% 초산 처리 시료 는 16℃에서 저장하였을 때 5일부터 20일까지 생균수에 큰 변화가 발생하지 않았지만, 4°C에서 저장한 시료의 경 우 저장 10일 째 5.51 log CFU/piece로 감소한 이후 증가 하였다. 온도에 따른 영향은 4°C가 16°C보다 생균수 감 소의 폭이 크게 나타났는데, 이는 분리한 효모의 최적 생 육 온도가 15°C이기 때문에 4°C에서 감소 효과가 더 나 타난 것으로 판단된다. 그러나 본 연구에 사용된 효모는 15°C에서 2~3일 배양에서도 집락이 확인될 정도로 생육 이 활발하지만, 초산 처리 후 16°C에서 저장하는 내내 뚜 렷한 증식이 확인되지 않았던 것은 초산 처리로 pH가 낮 게 유지된 표면의 환경 때문인 것으로 판단된다. 1% 초 산과 1% 구연산으로 만들어진 수용액에 양상추를 1분 침 지한 후 4일 동안 10°C에서 저장하면서 그 생균수를 확

Table 4. Log reduction of the yeasts by acetic acid on the surfaces of Cheonggyeon

	Inoculum	Deionized Water	3.0%	5.0%		
	log CFU/piece					
Acetic acid	8.37 ± 0.09^{c1}	$7.22\pm0.06^{b2)}$	6.61 ± 0.14^{a}	6.42 ± 0.06^{a}		

¹⁾Means \pm SD with different letters indicate significant differences (p<0.05).

^{2)a-b}Different letters within the same row indicate significant differences (p<0.05).

인한 연구에서 초기 3 log CFU/g으로 존재하던 미생물이 유기산 처리 후 검출한계 이하로 감소하고 2일 동안 유 지되다가 4일 후부터 다시 3 log CFU/g 증식하는 것으로 확인되어 유기산의 살균 효과가 2일 정도 유지됨을 알 수 있었다(Cha HS 등 2004). 따라서 유기산으로 과채류 표 면을 살균처리하면 이후 일정 시간 동안 그 효과가 지속 됨을 알 수 있고, 지속 정도는 과채류와 오염 미생물 종 류에 따라 차이가 있을 것으로 추측된다. 본 연구에서처 럼 과채류에 대한 살균효과를 확인하고자 할 때 개체마 다, 그리고 한 개체에서도 부위마다 그 미세구조와 수분 함량, 그리고 이물질 유무 등에 차이가 있기 때문에 일 관된 결과를 얻기 어렵다는 제한점이 있다. 감귤은 수확 후 바로 소비가 되기도 하지만 대부분 저장고에서 수일 에서 수개월 동안 저장하면서 유통·판매되기 때문에 수 확 후 즉시 살균처리를 하기 보다는 유통 직전에 살균제 로 세척 후 판매하는 것이 더 효과적이라고 판단된다. 또한 각 가정에서도 감귤 구입 후 낮은 농도의 식초 희 석액 등에 세척 후 저장 또는 소비하는 것이 바람직하다. 세척처리 후 저장이 필요한 이유는 감귤류 등에 오염되 어 펙틴 분해 효소를 만드는 저온성 미생물이 감귤에만 영향을 주는 것이 아니라 보관하는 냉장고 내부 또는 다 른 과채류에 2차 오염을 발생시킬 수 있기 때문이다.

₩. 결론

본 연구에서는 천연 살균제인 유기산을 이용하였다. 연 부현상으로 부패한 감귤로부터 3 strain의 효모를 분리하 고 이에 대한 5 종류 유기산(초산, 프로피온산, 구연산, 젖산, 초산)의 살균 효과를 확인하였다. 또한 살균 처리 후 4°C와 16°C에서 저장하는 동안 그 효과의 지속 여부 를 관찰하였다. 배양 후 약 7~8 log CFU/mL의 효모 혼합 액을 만들어서 다양한 농도의 유기산 용액과 혼합한 후 1 분간 반응시켰다. 효모 혼합액의 생균수는 1% 초산과 3% 프로피온산에서 각각 검출한계(1 log CFU/mL) 이하 로 감소하였고, 나머지 유기산은 7.5% 농도에서 검출한 계 이하로 감소하였다. 감귤 표면에 대해서는 1~5%의 유 기산과 증류수를 처리하여 그 효과를 비교하였다. 1분 처 리 후, 유기산 5% 초산에서 검출 한계(3 log CFU/piece) 이하로 감소하였고, 5% 프로피온산에서는 증류수 처리 시료에 비하여 4 log CFU/piece 생균수가 감소함을 확인 하였다. 초산과 프로피온산을 감귤 꼭지에 처리하였을 때는 3%에서 모두 0.5 log CFU/piece의 감소를 나타내 었다. 2% 초산을 처리한 후 4°C와 16°C에서 저장하는 동안 총 효모 수는 증류수 처리 시료에 비하여 유의적 으로 낮은 수준을 유지하였다. 따라서 본 연구에서는 유 기산 중에서도 특히 초산과 프로피온산이 감귤류에 오 염된 효모에 대하여 살균효과가 우수함을 확인하였고,

이 살균력은 저장하는 과정에서도 일정기간 유지함을 확인하였다.

감사의 글

이 논문은 2014년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(NRF-2014R1A1A1003104).

References

- Ahn YS, Shin DH. 1999. Antimicrobial Effects of organic acids and ethanol on several foodbome microorganisms. Korean J Food Sci Technol 31(5):1315-1323
- Chang SK, Lee HH, Hong SI, Han YS. 2010. Effect of organic acid treatment on the quality attributes of buckwheat sprout during storage. Korean J Food Sci Technol 42(2):190-197
- Cha HS, Kim SI, Kim BS, Kim SH. 2004. Effect of inhibition on browning and microbial growth of minimally processed lettuce. Korean J Food Preserv 11(3):331-335
- Cho SK, Park JH. 2012. Bacterial biocontrol of sprouts through ethanol and organic Acids. Korean J Food Nutr 25(1):149-155
- Han GH, Kim BY. 2001. The correlation between quality changes and skin. Korean J Food Sci Nutr 30(2):273-276
- Hyun JW, Lee SC, Ihm YB, Kim DH, Ko SW, Kim KS. 2001. Protective effect of iminoctadine tris (albesilate) and kresoximmethyl fungicides to citrus postharvest diseases caused by Penicillium spp. Korean J Pesticide Sci 5(2):37-44
- Kang MJ, Kim JY, Koh JS. 2000. Changes in pectin-degrading enzymes activity during storage of Satsuma mandarin. J Korean Soc Agric Chem Biotechnol 43(3):179-183
- Kang SN, Jung A, Lee SO, Min JS, Lee M. 2002. Effect of organic acid on value of VBN, TBARS, color and sensory property of pork meat. Korean J Anim Sci Technol 44(4): 443-452
- Kim DH, Hahn YS. 2003. Effect of addition of ethanol and organic acids on the quality of Mul-kimchi. J East Asian Soc Dietary Life 13(4):305-311
- Kim JS, Lee HJ, Lee YT, Chang HG, Park JH. 2007. Growth inhibition of yeast isolated from processed rice cake with ethanol and organic acids. J Food Hyg Safety 22(2):99-104
- Kim MS, Choi YK, 1997. Profiles of hydrolytic enzyme production of Penicillium sp.-L4, a causative fungus of rot in citrus fruits. Korean J Appl Microbiol Biotechnol 25(2):115-120
- Kim SR, Oh KW, Lee MH, Jung CS, Lee SH, Park SJ, Park JH, Ryu KY, Kim BS, Kim DH, Yun JC, Chung DW. 2012. Effect of electrolyzed water combined with ultrasound and organic acids to reduce Salmonella typhimurium, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus on perilla leaves. J Food Hyg Safety 27(3):264-270

- Lee JH, Seo MW, Kim HG. 2012. Isolation and Characterization of an antagonistic endophytic bacterium *Bacillus velezensis*CB3 the control of citrus green mold pathogen *Penicillium digitatum*. Korean J Mycol 40(2):118-123
- Lee WJ, Lee CH, Yoo JY, Kim KY, Jang KI. 2011. Sterilization efficacy of washing method using based on microbubbles and electrolyzed water on various vegetables. J Korean Soc Food Sci Nutr 40(6):912-917
- Nakagawa T, Yamada K, Miyaji T, Tomizuka N. 2002. Coldactive pectinolytic activity of psychrophilic-basidiomycetous yeast cystofilobasidium capitatum strain PPY-1. J Biosci Bioeng 94(2):175-177
- Park EJ, Alexander E, Taylor GA, Costa R, Kang DH. 2008. Fate of foodborne pathogens on green onions and tomatoes by electrolysed water. Lett Appl Microbiol 46(5):519-525
- Park JH, Park GH, Ryu KS. 2002. Effect of Feeding organic acid mixture and yeast culture on performance and egg quality of laying hens. Korean J Poult Sci 29(2):109-115

- Park SJ, Park JY. 2000. Application of ozone in the food industry. Food Sci Indus 33(2):50-57
- Park SJ, Jung SH, Park JT, Kim HY, Song KB. 2014. Prefreezing treatment of blueberry, Korean raspberry, and mulberry. J Appl Biol Chem 57(2):161-164
- Park WP, Jung JH, Cho SH, Kim CH. 2004. Quality characteristics of Unshiu orange and pear packaged with paper incorporated with antimicrobial agents. Korean J Soc Food Sci Nutr 33(10):1715-1719
- Razavi-Rohani SM, Griffiths MW. 1999. Antifungal effects of sorbic acid and propionic acid at different pH and NaCl conditions. J Food Safety 19(2):109-120
- Young KM, Foegeding PM. 1993. Acetic, lactic, citric acids and pH inhibition of Listeria monocytogenes Scott A and the effect on intracellular pH. J Appl Bacteriol 74(5):515-520

Received on Oct.10, 2014/ Revised on Nov.25, 2014/ Accepted on Nov.37, 2014