

유전체장벽방전 플라즈마에 의한 주요식중독세균의 살균 효과

최만석^{1,2} · 김지윤^{1,2} · 전은비^{1,2} · 박신영^{1,2*}

¹경상대학교 해양산업연구소, ²경상대학교 해양식품생명과학과

Antibacterial Activity of Dielectric Barrier Discharge Plasma against Main Food-borne Bacteria in Suspensions

Man-Seok Choi^{1,2}, Ji Yoon Kim^{1,2}, Eun Bi Jeon^{1,2} and Shin Young Park^{1,2*}

¹Institute of Marine Industry, Gyeongsang National University, Tongyeong 53064, Korea

²Department of Seafood and Aquaculture Science, Gyeongsang National University, Tongyeong 53064, Korea

Dielectric barrier discharge (DBD) plasma is one of the promising next generation non-thermal technologies for food sterilization. The present study investigated the effects of DBD plasma on the reduction of most common food-borne pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella enterica*) and sanitary indicative bacteria (*Escherichia coli*) in the suspension (initial inoculum of approx. 9 log CFU/mL). The bacterial counts were significantly ($P < 0.05$) reduced with the increase in the treatment time (1-30 min) of DBD plasma in the suspension. The D-values (time for 90% reduction) of DBD plasma by first-order kinetics for *S. aureus*, *B. cereus*, *V. parahaemolyticus*, *S. enterica*, and *E. coli* were 17.76, 19.96, 32.89, 21.55, and 15.24 min, respectively ($R^2 > 0.90$). These results specifically showed that 30 min of DBD plasma treatment in > 90% reduction of seafood-borne pathogenic and sanitary indicative bacteria. This suspension study may provide the basic data for use in seafood processing and distribution.

Key words: Dielectric barrier discharge (DBD) plasma, Food-borne pathogenic bacteria, Sterilization, Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria

서론

식품업계는 미생물의 오염을 막고 소비자에게 안전한 식품을 farm to table까지 공급해야하는 어려운 과제에 직면해 있다. 식품에 대한 주요식중독 미생물의 침입은 식품 원료의 오염, 완제품의 불충분한 살균, 생산 및 유통과정에서의 오염 등 어느 단계에서나 일어날 수 있다. 따라서, 오염된 식중독 미생물의 살균을 위해서 가열살균법, 염소소독법, UV 자외선 조사를 포함한 다양한 물리화학적 방법이 사용되어 왔다(Arcangeli et al., 2012). 가열 살균법은 가장 흔하고 쉽게 사용되는 방법이지만, 식품의 원재료가 가지고 있는 천연의 풍미와 조직감을 잃거나 영양소 파괴와 식품의 변색이 발생할 수 있다(Luksiene et al., 2010). 차아염소산나트륨 등을 사용한 염소소독법은 항

균작용과 속효성은 탁월하지만, trihalomethanes (THM), 염화페놀 등의 유해한 독성물질이 발생된다(Park et al., 2012). UV 자외선 조사는 식품의 영양학적 문제가 없고 제품의 품질변화도 적지만 병원성 식중독균의 살균효과가 미비하다는 치명적인 단점이 있다(Song et al., 2010). 따라서, 차세대 식품의 살균방법으로는 저온처리(low-temperature treatment)가 가능해야 하며, 최소한의 영양소 파괴와 관능적 품질이 유지되어야 하며, 유해한 물질이 발생하지 않는 고효율의 특징을 지닌 기술이어야 한다(Lee et al., 2017).

최근 이러한 차세대 식품 살균방법으로 저온플라즈마(cold plasma) 기술이 주목받고 있다. 플라즈마는 기체가 보다 높은 에너지를 얻게 되었을 때 방전이 되어 형성된 이온화된 가스의 집합 상태이며 기체상태의 물질보다 높은 에너지이며 친환경적

*Corresponding author: Tel: +82. 55. 771. 9143 Fax: +82. 55. 772. 9149

E-mail address: sypark@gnu.ac.kr



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2019.0617>

Korean J Fish Aquat Sci 52(6), 617-624, December 2019

Received 22 October 2019; Revised 18 November 2019; Accepted 29 November 2019

저자 직위: 최만석(대학원생), 김지윤(대학원생), 전은비(대학원생), 박신영(교수)

인 기술이다. 저온플라즈마 기술로는 감압플라즈마와 대기압 플라즈마로 구분되는데, 감압상태에서 플라즈마를 발생시키는 감압플라즈마는 장치가 복잡하고 비용이 비싸며, 무엇보다 연속적처리가 불가능하기 때문에 대기압 하에서 연속적으로 플라즈마를 발생시킬 수 있는 대기압플라즈마가 식품산업에서 주목하고 있는 저온플라즈마 기술이다(Mok and lee, 2011).

대기압플라즈마 생성을 위해 유전체장벽방전(dielectric barrier discharge, DBD), 코로나방전(corona discharge), 아크방전(arc discharge) 등이 사용되고 있다(Tendero et al., 2006). 이 중에서 유전체장벽방전 플라즈마는 두 개의 전극을 덮는 유전체를 사용하여 전류를 제한하여 두 전극 사이에 전압을 걸어 대기압 상에서 방전시켜 플라즈마를 생성한다(Kim et al., 2018). 플라즈마가 발생될 때 이온과 전자는 분리되며 하전된 입자 뿐만 아니라 화학적 반응성이 큰 활성 라디칼, 과산화 수소(H_2O_2), 오존(O_3) 등의 활성종들(reactive species)을 발생한다. 플라즈마가 발생하는 활성종들 중에서 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)으로 superoxide ($\cdot O_2$)와 hydroxy radical ($\cdot OH$) 등이 있으며, 활성 질소종(reactive nitrogen species, RNS)으로 nitric oxide ($\cdot NO$) 등이 있다(Kim et al., 2018). 이 활성종들은 식중독세균의 세포막의 지질과 단백질 등을 손상시켜 세포내로 확산되어 식중독균의 물리·화학적 살균처리를 가능하게 하여, 곰팡이(Ryu et al., 2013), 식중독세균(Lunov et al., 2016), 노로바이러스와 간염바이러스(Park and Ha, 2018) 등의 항미생물 효과를 입증하였다.

CDC (centers for disease control and prevention)의 연간 식중독 발생보고에 따르면 수산식품의 주요 식중독 위험요인은 생물학적 요인(병원성 세균, 바이러스, 기생충 등)이 전체 식중독의 약 62% 수준이었다. 특히, 세균성 식중독이 50%로 높은 비중을 차지하였다. 수산식품은 날 것이나 덜 익은 채로 섭취하는 경우가 많아 다음과 같은 세균성 식중독의 발생률이 특히 높았다(CDC, 2017). *Vibrio parahaemolyticus*는 호흡성균으로 대표적인 수산식품 식중독 세균으로 횡감용 수산물(e.g. 굴, 멧게, 해삼, 회 등)에 높은 오염률을 보였다(Choi et al., 2012). *S. aureus*와 *B. cereus*는 대표적인 그람 양성 식중독균이며, 건포류의 주요 관리대상 식중독균이다(Park, 2019). 특히, *S. aureus* 손을 통한 감염 및 증식이 많아 초밥 등의 수작업으로 가공되는 수산식품에서 높은 오염률을 보였다(Choi et al., 2012). *E. coli*와 *Salmonella* spp.은 대표적인 분변오염으로 감염되는 그람음성 식중독 세균이다(Choi et al., 2019). *E. coli*는 일반적으로는 비병원성인 정상균(normal flora)으로 사람의 장내에 존재하지만, 면역기능이 약한 노약자와 어린이 등에게는 드물게 일부가 기회감염균으로 작용한다(Chun and Hong, 2009; Choi et al., 2019). CDC의 보고서에 의하면 *Salmonella* spp.은 노로바이러스 다음으로 가장 많은 식중독을 일으키는 원인 미생물(34%)로 보고되었으며, 대부분 원인 증명은 *Salmonella enteritidis*였다(CDC, 2017).

이와 같은 미생물중에 따른 항미생물 효과를 구체적으로 탐색하고 실용적인 식품의 현장 적용을 위해서는 식품 및 pilot 규모에서의 다양한 연구가 수행되어야 한다. 따라서, 본 연구는 이와 관련한 기초연구로서 식품산업의 차세대 친환경적 살균 기술로 주목받고 있는 비열 유전체장벽방전 형태의 대기압플라즈마를 사용하여 처리시간에 따른 주요식중독세균에 대한 살균효과를 조사하였다. 아울러 수학적 모델링을 활용하여 본 유전체장벽플라즈마 사용시의 식중독균의 불활성화를 나타내는 사멸값(D-value)을 분석하였다.

재료 및 방법

살균 대상 미생물

본 연구에서 사용한 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 27967, *Salmonella enterica* ATCC 14028 및 *Escherichia coli* KCTC 1682는 glycerol stock으로 $-80^\circ C$ 에서 보관중인 균주를 사용하였다. 보존 배양된 각 시험 균주는 tryptic soy broth (TSB; BD/Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)에 접종하여 $37^\circ C$ 의 배양기에서 18-24시간 동안 2차래 전배양시킨 후 본 실험에 사용하였다.

대기압 유전체장벽방전 플라즈마 장비

본 연구에서 사용한 DBD plasma 발생장치(μ -DBD Surface Plasma Generator, Model; Micro DBD Plasma)는 Plasma Biomedicine Institute (Plasma Bioscience Research Center, Seoul, Korea)에서 공급받았고 이 장치에 대하여 Ryu et al. (2013)에 의해서 기술되었다.

본 연구에서 사용한 DBD plasma는 지름 80 mm, 두께 18 mm인 원형의 soda 유리를 유전체로 하여 플라즈마 발생을 위한 metal 전극으로 그 윗면은 은(silver) 전극으로 덮여 하나의 전극으로 삼고 아랫면은 사각형 그물구조를 가지는 스테인레스 재질의 그물망(mesh)을 유리의 후면에 부착하여 반대 전극으로 사용하였다. 플라즈마 발생을 위한 질소 가스는 가스 주입 구멍을 통해 PLA (poly lactic acid) 커버에 의해 1.5 lpm (liter per minute)씩 유입되었으며, 유리와 그물망 사이의 후면 유리 표면에 플라즈마를 생성했다(Fig 1). 플라즈마 발생장치의 파워는 사인파 교류전원을 사용하였으며, 주행 주파수 43 kHz에서 낮은 1 kV의 방전 전압이며, cycle의 전기 방전 에너지는 $7.7 \mu J$ 로 측정되었고 초당 에너지는 0.12 J/s로 측정되었다.

시료와 전극 사이의 거리는 조정이 가능하나 본 연구에서는 시료와 전극 사이의 거리를 3 mm로 유지하였으며, 플라즈마를 연속적으로 발생시켰을 때의 에너지의 집속으로 인한 열을 방지하기 위해 유전체 위에 공냉쿨러(COOLERTEC Ice Bridge-1, COOLERTEC, Seoul, Korea)를 부착해 지속적으로 동작 시켰다. 최대 30분까지 플라즈마 발생시 온도를 측정할 결

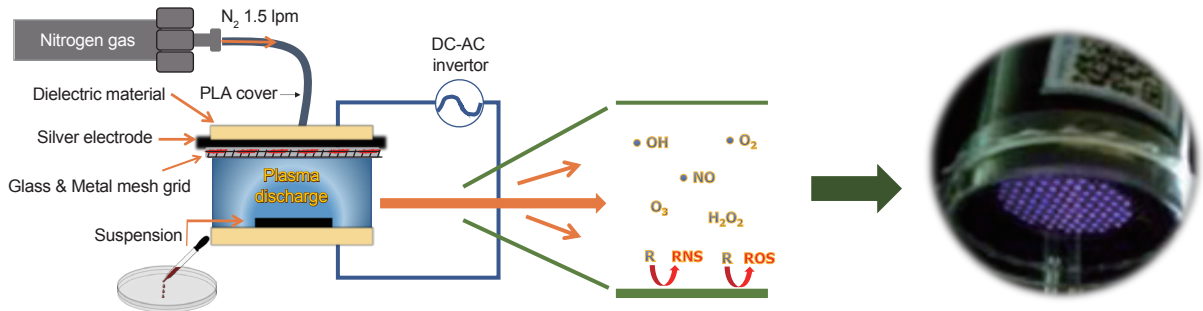


Fig. 1 Schematic view of μ -DBD plasma experimental setup.

과, 18.5-35°C 범위 이내임을 확인하였다.

미생물 시료준비 및 플라즈마 처리

배양된 시험 균주는 10,000 g에서 10분 동안 원심 분리한 후 침강된 펠릿(pellet)을 10 mL의 펩톤수에 현탁하였다. 연구에 사용된 *S. aureus* ATCC 6538, *B. cereus* ATCC 11778, *V. parahaemolyticus* ATCC 27967, *S. enterica* ATCC 14028 및 *E. coli* KCTC 1682는 약 9 log CFU/mL의 농도를 사용하였다. 시험 균주의 DBD plasma 처리를 위하여 실험 시작 10분 전에 플라즈마 장치를 켜며, 10⁻¹으로 희석된 현탁액은 biological safety cabinet (CHC Lab Co., Daejeon, Korea) 내에서 멸균된 petri dish (35 × 15 mm)에 유전체장벽 플라즈마 처리 최적 용량인 각 0.5 mL씩 분주하였다. DBD plasma 처리를 전극과 균주 사이에 3 mm 간격을 두고 각각 1, 3, 5, 10, 20분 및 30분간 처리하였다. 그 후 균주를 회수하여, 각각 10진 희석법으로 희석하여 미생물 측정의 정량 실험에 사용하였다.

미생물의 정량적 측정

플라즈마 처리 전·후 각 미생물의 농도는 각각 10진 희석법으로 희석한 희석액 1 mL을 petri dish (90 × 15 mm)에 분주하고 45-50°C 정도로 식힌 tryptic soy agar (TSA; BD/Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)를 petri dish에 주입 평판 법(pour plate method)으로 혼합해준다. 미생물의 증식은 표준 한천평판 균수측정법으로 37°C에서 24-48시간 배양한 후 15-300개의 집락을 형성한 배지만 계수하여 log CFU/mL으로 나타냈다.

미생물의 D-Value

주요식중독세균의 DBD plasma 처리에 따른 살균효과는 다음과 같이 First-order kinetics model을 사용하여 D-value (decimal reduction time)을 측정하였다.

$$\log \frac{N}{N_0} = \frac{k \cdot t}{2.303} = -\frac{1}{D} t$$

· N_0 , 초기세균 농도(colony forming unit, CFU)

- N , DBD plasma를 t 시간 처리한 후의 세균 집락수(colony forming unit, CFU)
- t , DBDk plasma 처리시간(min)
- k , 사멸속도상수(min⁻¹)
- D-value, 세균의 수를 1/10, 즉 log 주기로 1만큼 감소시키는 데 소요되는 플라즈마 처리시간(min)

통계분석

모든 실험은 3반복으로 수행되었으며 관찰된 실험 결과는 SPSS 25 (IBM SPSS Statistics, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) program을 이용하여 분석하였다. 각각의 실험군이 통계적으로 유의적으로 나타나는 경우에($P < 0.05$) 각각의 3반복 실험에 의한 평균값을 다중위검정법(Duncan multiple-range test)을 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

DBD Plasma 노출시간에 따른 주요수산식품 식중독 세균의 살균효과

플라즈마의 세균의 불활성화 작용 원리는 DBD plasma에 노출되는 시간이 증가함에 따라 활성종의 농도는 일정하더라도 미생물 혹은 세균의 외막의 파열을 유발하여 손상 정도를 증가시켜, 이에 따른 살균 효과가 증가하는 것으로 알려져 있다 (Jo et al., 2014). 또한, 선행된 연구에 의하면 그람양성세균의 lipopolysaccharide막과 두꺼운 펩티도글리칸의 두께의 차이 때문에 그람음성세균이 그람양성세균보다 플라즈마 처리에 민감하여 더 살균효과가 높다고 보고하였다. 이는 그람양성세균의 lipopolysaccharide막과 두꺼운 펩티도글리칸의 두께의 차이 때문이다. 그러나, 아직까지 일부 세균만을 대상으로 연구가 진행되었기 때문에 식중독 세균의 살균 패턴이 완전히 규명되지 않았고, 수산식품관련 주요식중독세균의 살균 효과 연구가 부족한 실정이다(Laroussi et al., 2003; Yong et al., 2015; Lunov et al., 2016). 따라서 이러한 배경하에 본 연구에서는 DBD plasma의 수산물 관련 주요식중독세균에 대한 살균력을 추가적으로 조사해보았다.

플라즈마 처리시간에 따른 그람양성세균의 살균효과는 Table 1에 나타냈다. DBD plasma 처리 시간(1-30분)에 따른 *S. aureus*와 *B. cereus*는 유의적으로 감소하였다($P < 0.05$). 대조구의 *S. aureus*의 population은 평균 9.28 log CFU/mL이었으며, DBD plasma를 5분처리 이상하였을 때부터 유의적인 감소를 보였다($P < 0.05$). 또한, log 감소는 DBD plasma 1분, 5분, 10분 처리시 유의적인 차이를 보이지 않았으나($P > 0.05$), 20분(1.04 log 감소, 90.90% 감소)과 30분 처리(1.92 log 감소, 98.79% 감소)시 유의적인 감소를 보였다($P < 0.05$).

이는 본 연구의 방법과 유사한 Kim et al. (2018)의 DBD plasma를 2시간 처리하였을 때 *S. aureus*가 약 2 log 감소(90% 감소)하였던 연구 결과보다 높은 살균력을 보였다. 그 이유로는 Kim 외 연구진도 언급했듯이, DBD plasma의 살균작용은 샘플과의 노출거리가 짧아질수록 증가하기 때문이다. Kim et al. (2018)의 챔버형 DBD plasma는 공기 살균을 통해 DBD plasma 중에서도 비교적 넓은 처리를 할 수 있었지만, 노출거리가 30.4 cm 이내에서 실시하였으므로 노출거리가 3 mm 이내인 μ -mesh (그물망)을 통하여 직접적으로 샘플 표면에 있는 세균을 살균하는 본 연구의 DBD plasma의 살균작용이 더 탁월하였다. 또한, Kim et al. (2018)은 메티실린내성 *S. aureus* (KCCM12103, ATCC 12600)과 같은 균종을 사용하였기 때문에, DBD plasma에 대한 내성이 더 있을 수도 있다.

본 연구의 DBD plasma 처리에 대한 *B. cereus*균은 *S. aureus* 보다는 약간 낮은 살균효과를 보였다. 대조구의 *B. cereus*의 population은 평균 9.36 log CFU/mL이었으며, DBD plasma를 5분 이상 처리하였을 때부터 유의적인 감소를 보였다($P < 0.05$). 또한, log 감소는 플라즈마 처리시간 (1-30분)에 따라 최소 0.27

log 감소(45.80% 감소)-최대 1.75 log 감소(98.24%)의 유의적인 차이를 보였다($P < 0.05$). Mok et al. (2015)의 연구결과에 따르면, *S. aureus*를 코로나방전 대기압플라즈마 ACDAP (afterglow corona discharge air plasma)에 24시간 동안 노출시켰을 때 약 2.0 log 감소를 보인 반면 *B. cereus*는 1.5 log 감소가 관찰되었다. 이는 우리의 DBD plasma 살균 연구에서도 *S. aureus*가 *B. cereus*보다 살균효과가 좋다는 결과와 동일하였다.

한편, 플라즈마 처리시간에 따른 그람음성세균의 살균효과는 Table 2와 같다. 대조구 샘플과 비교하였을 때 *E. coli*는 DBD plasma를 10분 이상 처리하였을 때 유의적인 감소를 보였으며($P < 0.05$), DBD plasma를 30분 처리시 최대 2.57 log의 감소를 보였다. 이는 플라즈마 처리된 세균 중에서 가장 우수한 살균 효과였다. 또한, 대장균의 log 감소는 DBD plasma를 20분(1.40 log 감소, 96.06% 감소)과 30분 처리(2.03 log 감소, 99.06% 감소)시 다른 식중독균에 비해 가장 큰 유의적인 감소를 보였다($P < 0.05$). 이를 통해 기존대부분 연구와 동일하게 그람음성세균인 *E. coli*가 그람양성세균인 *S. aureus*와 *B. cereus*에 비해 높은 살균 효과를 보인 것으로 확인되었다. 반면, *S. enterica*와 *V. parahaemolyticus*는 플라즈마 처리 시간(1-30분)에 따라 각각 0.29 log (49.00% 감소)-1.53 log 감소(97.03% 감소), 0.18 log (34.24% 감소)-최대 1.04 log 감소(90.90% 감소)의 유의적인 살균효과는 보였으며($P < 0.05$), 이는 그람음성세균이 그람양성세균보다 플라즈마 살균효과에 민감하다는 기존의 연구 결과와는 상반되었다(Laroussi et al., 2003; Yong et al., 2015; Lunov et al., 2016). 그러나, 본 연구 결과는 Mok et al. (2015)의 결과와 비슷하였는데 ACDAP (afterglow corona discharge air plasma)처리를 사용한 Mok et al. (2015)의 연구결과에서

Table 1. Effect of DBD plasma treatment on the reduction of Gram-positive bacteria in the suspension

Bacterium	DBD plasma (min)	Mean \pm SD of bacterium (log CFU/mL)	log reduction (% reduction)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Control	9.28 \pm 0.11 ^a	-
	1	8.97 \pm 0.14 ^{ab}	0.31 \pm 0.16 ^C (50.59%)
	5	8.83 \pm 0.31 ^{bc}	0.45 \pm 0.30 ^C (64.39%)
	10	8.58 \pm 0.13 ^c	0.69 \pm 0.15 ^{BC} (79.66%)
	20	8.23 \pm 0.19 ^d	1.04 \pm 0.20 ^B (90.90%)
	30	7.36 \pm 0.21 ^e	1.92 \pm 0.22 ^A (98.79%)
<i>Bacillus cereus</i>	Control	9.36 \pm 0.08 ^a	-
	1	9.09 \pm 0.08 ^{ab}	0.27 \pm 0.08 ^E (45.80%)
	5	8.96 \pm 0.07 ^b	0.39 \pm 0.03 ^D (59.51%)
	10	8.83 \pm 0.09 ^{bc}	0.53 \pm 0.04 ^C (70.19%)
	20	8.55 \pm 0.15 ^c	0.80 \pm 0.02 ^B (84.27%)
	30	7.60 \pm 0.34 ^d	1.75 \pm 0.02 ^A (98.24%)

DBD, dielectric barrier discharge. The data presents means of three samples with standard deviations (three samples/treatment). Within the same column, bacterium log counts means with different letters (a-e for *S. aureus* or a-d for *B. cereus*) differ significantly ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test at 5% level of probability. Within the same column, bacterium log reduction means with different letters (A-C for *S. aureus* or A-E for *B. cereus*) differ significantly ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test at 5% level of probability.

도 *E. coli*는 약 3.5 log의 저감화로 가장 큰 살균효과를 보인 반면 *V. parahaemolyticus*는 약 1.0 log의 저감화로 그람양성세균보다 훨씬 낮은 살균효과를 보였다. 또한, Mok et al. (2015)의 *S. typhimurium*은 ACDAP를 최대 24시간 처리시에 *S. aureus*와 비슷한 약 2.0-2.5 log의 살균효과를 보였다. 또한, 그람양성세균인 *B. cereus* 1.5 log 저감화보다는 더 큰 살균력을 보였다. 이와 관련하여 Lunov et al. (2016)의 주사전자현미경을 통한 그람양성세균과 그람음성세균의 박테리아 손상을 관측한 결과 그람음성세균이 일반적으로 더 높은 손상을 보이지만, 각 세균

의 팽압(turgor pressure)이 달라 살균 효과 패턴에 관해서는 불일치하였다. 또한, Pompl et al. (2009)은 원자력 현미경을 통한 플라즈마의 살균효과 확인 시, 그람양성세균과 그람음성세균에 대한 살균효과의 일관된 패턴은 보이지 않았다. 따라서, 플라즈마 살균효과의 세부사항은 플라즈마 반응성의 디자인(ROS와 RNS의 밀도, 온도 및 조성 등), 세균의 세포벽 특징 등의 전체적인 물리적 메커니즘이 각기 다르기 때문에 다양한 세균에 대한 개별적 연구가 필요하다. 한편, 플라즈마의 세균의 살균효과는 플라즈마 작동의 사용되는 전력(전류세기, 방출전압)에 비

Table 2. Effect of DBD plasma treatment on the reduction of Gram-negative bacteria in the suspension

Bacterium	DBD plasma (min)	Mean±SD of bacterium (log CFU/mL)	log reduction (% reudction)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Control	9.00±0.01 ^a	-
	1	8.82±0.08 ^b	0.18±0.07 ^D (34.24%)
	5	8.61±0.07 ^c	0.39±0.06 ^C (59.63%)
	10	8.55±0.17 ^c	0.46±0.16 ^C (65.00%)
	20	8.32±0.07 ^d	0.68±0.07 ^B (79.21%)
	30	7.96±0.03 ^e	1.04±0.03 ^A (90.90%)
	<i>Salmonella enterica</i>	Control	9.83±0.27 ^a
1		9.54±0.14 ^b	0.29±0.20 ^D (49.00%)
5		9.41±0.06 ^b	0.42±0.06 ^D (62.21%)
10		9.15±0.06 ^c	0.68±0.18 ^C (79.03%)
20		8.77±0.07 ^d	1.06±0.07 ^B (91.27%)
30		8.30±0.04 ^e	1.53±0.09 ^A (97.03%)
<i>Escherichia coli</i>		Control	9.66±0.26 ^a
	1	9.44±0.18 ^a	0.22±0.18 ^C (39.18%)
	5	9.26±0.31 ^{ab}	0.40±0.30 ^C (59.88%)
	10	8.89±0.30 ^b	0.77±0.09 ^C (83.03%)
	20	8.25±0.20 ^c	1.40±0.19 ^B (96.06%)
	30	7.63±0.34 ^d	2.03±0.54 ^A (99.06%)

DBD, dielectric barrier discharge. The data presents means of three samples with standard deviations (three samples/treatment). Within the same column, bacterium log counts means with different letters (a-e for *V. parahaemolyticus* and *S. enterica* or a-d for *E. coli*) differ significantly ($P<0.05$) by Duncan's multiple range test at 5% level of probability. Within the same column, bacterium log reduction means with different letters (A-D for *V. parahaemolyticus* and *S. enterica* or A-C for *E. coli*) differ significantly ($P<0.05$) by Duncan's multiple range test at 5% level of probability.

Table 3. D-values (time) of Gram-positive bacteria in the suspension treated by the duration time of DBD plasma

Bacterium	Equation of first-order kinetic model	
	$y=ax+b$	$y= -0.0563x+9.1613$
<i>Staphylococcus aureus</i>	Correlation coefficient (R^2)	0.96
	D-values of DBD plasma treatment (min)	17.76
	$y=ax+b$	$y= -0.0501x+9.2832$
<i>Bacillus cereus</i>	Correlation coefficient (R^2)	0.93
	D-values of DBD plasma treatment (min)	19.96

DBD, dielectric barrier discharge.

레하여 미생물의 사멸율을 증가시킬 수 있다. 즉, 전력의 증가에 따라 기체 이온화, 해리, 라디칼 발생 등이 더욱 자주 일어날 수밖에 없기 때문에 활성종의 농도가 증가하여 세균을 더 많이 불활성화시킬 수 있다(Laroussi et al., 2003; Yong et al., 2015; Lunov et al., 2016). 즉, 대기압플라즈마에 의한 식중독 세균의 살균 효과는 플라즈마 발생 전력의 세기, 노출시간, 박테리아 균주의 특성 등에 따라 달라질 수 있으므로 이에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 사료된다.

DBD Plasma 노출시간에 따른 수산식품 식중독 세균의 D-Value

수산식품은 각종 미생물, 그 중에서도 증온성 및 저온성 식중독 세균이 생육하기에 알맞은 여러가지 영양분을 갖고 있기 때문에 그대로 방치하여 이를 섭취할 경우 식중독을 일으킬 수 있다. 따라서, 식품을 장기간 보존하고 안전하게 섭취하기 위해서는 오염된 미생물을 죽이는 살균과정이 필요하다(Choi et al., 2012; Berk, 2013).

본 연구에서는 DBD플라즈마 처리 시간에 따른 수산식품 식중독 세균 5종(*S. aureus*, *B. cereus*, *V. parahaemolyticus*, *S. enterica* & *E. coli*)의 suspension상의 D-value를 First-order kinetics model에 의해 측정하여 그람양성세균(Table 3)과 그람 음성세균 (Table 4)으로 구분하여 표시하였다.

플라즈마 처리에 관한 미생물의 불활성화는 일반적으로 시간에 의존하여 지수 붕괴(exponential decay)가 나타난다. 따라서, 미생물의 불활성화를 반대수 좌표(semi-logarithmic graph)에 그리면 CFU (colony forming unit)을 선형 곡선으로 나타낼 수 있다. 이 때, 미생물의 수를 90% 감소시키는 시간인 D-value를 기울기를 통하여 구할 수 있다(Butscher, 2016; Choi et al., 2017).

1에 가까운 correlation coefficients (R^2)는 모델 적용에 따른 D-value값의 사멸패턴의 정확성을 보여주는데, *B. cereus*균을 제외하고는 모든 균이 0.95이상을 나타냈다. 하지만, *B. cereus* 균도 R^2 가 0.93이므로 이 또한 신뢰할 수 있는 값이라고 여겨진

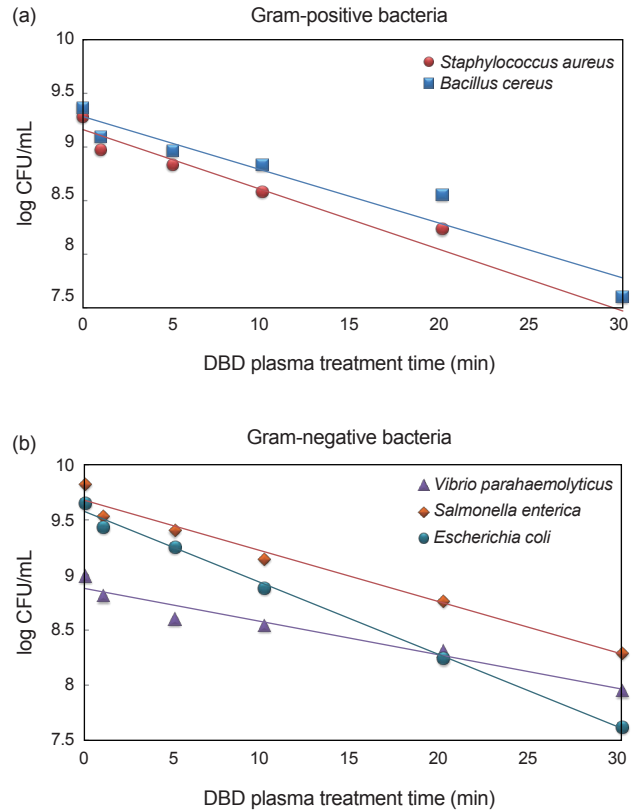


Fig. 2 Fitted survival curves of Gram-positive (a) and Gram-negative (b) bacteria in the suspension treated by the duration time of DBD plasma; R^2 , correlation coefficient.

다. D-value는 가장 살균이 많이 된 *E. coli*가 15.56분으로 가장 작았으며, 이는 DBD plasma를 30분 처리했을때 2 log 감소된 실험결과(Table 1)와 일치했다. 그람양성균인 *S. aureus*와 *B. cereus*는 각각 17.76분, 19.96분이었다. 반면, 그람음성세균인 *V. parahaemolyticus*와 *S. enterica*는 각각 32.89분, 21.55분

Table 4. D-values (time) of Gram-negative bacteria in the suspension treated by the duration time of DBD plasma

Bacterium	Equation of first-order kinetic model	
	$y=ax+b$	$y= -0.0304x+8.8779$
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Correlation coefficient (R^2)	0.95
	D-values of DBD plasma treatment (min)	32.89
<i>Salmonella enterica</i>	$y=ax+b$	$y= -0.0464x+9.6775$
	Correlation coefficient (R^2)	0.98
	D-values of DBD plasma treatment (min)	21.55
<i>Escherichia coli</i>	$y=ax+b$	$y= -0.0656x+9.5761$
	Correlation coefficient (R^2)	0.99
	D-values of DBD plasma treatment (min)	15.24

DBD, dielectric barrier discharge.

이었다. Fig 2의 식중독균의 사멸 기울기의 패턴은 *E. coli*>*S. aureus*>*B. cereus*>*S. enterica*>*V. parahaemolyticus* 순으로 완만하게 감소하고 있으며, 이러한 경향은 표면 살균에 효과적인 자외선(Lee et al., 2016), 고전장펄스(Oshima and Tato, 2004) 등 비열 살균에서 관찰되는 현상과 같았다. 따라서, DBD plasma는 단시간만으로 *E. coli*와 같이 식중독균의 표면에 존재하는 미생물의 살균에는 효과적이지만, *V. parahaemolyticus* 처럼 내독소(e.g. 내열성 용혈 독소)를 가진 미생물의 살균에는 상대적으로 장시간의 처리가 요구되는 것임을 알 수 있었다(Mok and Song, 2010; Li et al., 2011). Mok et al. (2015)에 따르면, ACDAP (afterglow corona discharge air plasma) 처리를 식중독균에 하였을 때의 D-value는 *E. coli* O157:H7 (3.64 시간)<*S. aureus* (4.78시간)<*S. typhimurium* (7.79시간)<*B. cereus* (11.01시간)<*V. parahaemolyticus* (12.79시간) 순으로 나타났다. 각 균주의 유전체를 포함한 다양한 생물학적 특성은 다르지만 기존의 연구와 비교하였을 때, 본 연구결과와 전체적인 식중독균의 감소패턴은 유사하였다(Mok et al., 2015). 다만, DBD plasma의 경우에는 *S. aureus*가 *B. cereus*보다 살균 효과가 좋았다는 차이점이 있었다. 한편, 본 연구에서는 주요수산식품 식중독균 5종(*S. aureus*, *B. cereus*, *V. parahaemolyticus*, *S. enterica*, *E. coli*)에 대한 DBD 플라즈마 처리를 통한 살균연구가 수행되었지만, 식품공전에서 신선수산식품과 관련하여 기준 및 규격을 제시하고 있는 *L. monocytogenes*과 *E. coli* O157:H7에 관해서도 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다(MFDS, 2019). 한편, Park 과 Ha의 연구에 의하면 COP (cold oxygen plasma)의 처리가 각각 굴과 조개 등의 이매패류의 원인 바이러스인 노로바이러스(D=43.77초)와 간염A 바이러스(D=10분)의 살균에도 효과적임을 입증하였다(Park and Ha, 2018).

따라서, 본 연구의 의의는 주요식중독세균의 DBD plasma 처리 가능성을 알아보기 위한 Suspension상의 기초연구이자, DBD plasma 처리의 식품의 현장적용을 위해서 상업적 살균에서 발생할 수 있는 공중 위생상 안전한 수준에서의 식중독균을 컨트롤 할 수 있는 기초 자료를 제공하는 것이다. 또한, 본 연구자료를 바탕으로 수산식품상에 오염된 식중독세균과 식중독바이러스에 관한 추가적인 연구의 확대가 필요할 것으로 사료된다.

사 사

이 논문은 2018년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업(NRF-2018R1D1A3B07047673)이며 이에 감사드립니다. 아울러 본 연구에 사용한 유전체장벽방전 플라즈마 장비를 대여해주시고 관련 학문적·기술적 자문을 해주신 광운대학교 플라즈마 바이오과학 연구센터에 감사드립니다.

References

- Arcangeli G, Terregino C, De Benedictis P, Zecchi B, Manfrin A, Rossetti E, Magnabosco C, Mancin M and Brutti A. 2012. Effect of high hydrostatic pressure on murine norovirus in Manila clams. *Lett Appl Microbiol* 54, 325-329. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03211.x>.
- Berk Zeki. 2013. Thermal processing. In: *Food process engineering and technology 2nd*. Taylor SL, ed. Elsevier Academic Press, London, U.K., 399-420.
- Butscher. 2016. Non-thermal plasma inactivation of microorganisms on granular food products. Ph.D. Dissertation, University of ETH Zurich, Zurich, Switzerland.
- CDC (Centers for disease control and prevention). 2017. Surveillance for foodborne disease outbreaks United States. CDC 2017 Annual report, 1-10.
- Choi ES, Kim NH, Lee SH and Rhee MS. 2012. Seafood and bacteria. *Safe Food* 7, 3-13.
- Choi MS, Jun EB, Choi S, Bang HJ and Park SY. 2019. Investigation of microbial contamination in *Semisulcospira libertine* and evaluation of its reduction effects by sediment removal treatment. *J Food Hyg Saf* 34, 361-366. <https://doi.org/10.13103/JFHS.2019.34.4.361>.
- Choi S, Puligundla P and Mok C. 2017. Effect of corona discharge plasma on microbial decontamination of dried squid shreds including physico-chemical and sensory evaluation. *LWT* 75, 323-328. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.08.063>.
- Chun MS and Hong SH. 2009. Identification of microorganisms from eggs in hypermarket in the northern Gyeonggi area. *Korean J Food Nutr* 22, 396-401.
- Jo JO, Lee HW and Mok YS. 2014. Sterilization of scoria powder by corona discharge plasma. *Appl Chem Eng* 25, 386-391. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.08.063>.
- Kim K, Paik N, Kim Y and Yoo K. 2018. Bactericidal efficacy of non-thermal DBD plasma on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J Korean Soc Occup Environ Hyg* 28, 61-79. <https://doi.org/10.15269/JKSOEH.2018.28.1.61>.
- Laroussi M, Mendix DA and Rosenberg M. 2003. Plasma interaction with microbes. *New J Phys* 5, 41-41. <https://doi.org/10.1088/1367-2630/5/1/341>.
- Lee ES, Park SY and Ha SD. 2016. Effect of UV-C light on the microbial and sensory quality of seasoned dried seafood. *Food Sci Technol Int* 22, 213-220. <https://doi.org/10.1177/1082013215586293>.
- Lee SJ, Song YS, Park YR, Ryu SM, Jeon HW and Eom SH. 2017. Sterilization of food-borne pathogenic bacteria by atmospheric pressure dielectric barrier discharge plasma. *J Food Hyg Saf* 32, 222-227. <https://doi.org/10.13103/JFHS.2017.32.3.222>.
- Li L, Wilbur CL and Mintz KL. 2011. Kinetics of hydrothermal inactivation of endotoxins. *Appl Environ Microbiol* 77,

- 2640-2647. <https://doi.org/10.1128/AEM.01460-10>.
- Luksiene Z, Buchovec I and Paskeviciute E. 2010. Inactivation of several strains of *Listeria monocytogenes* attached to the surface of packaging material by Na-chlorophyllin-based photosensitization. *J Photochem Photobiol B* 101, 326-331. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2010.08.002>.
- Lunov O, Zablotskii V, Churpita O, Jager A, Polivka L, Sykova E, Dejnek A and Kubinova S. 2016. The interplay between biological and physical scenarios of bacterial death induced by non-thermal plasma. *Biomaterials* 82, 71-83. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.12.027>.
- MFDS (Korea Ministry of Food and Drug Safety). 2019. Food code regulations in Korea. Retrieved from https://www.mfds.go.kr/eng/brd/m_15/view.do?seq=69982 on Aug 26, 2019.
- Mok C and Lee T. 2011. Operational properties and microbial inactivation performance of dielectric barrier discharge plasma treatment system. *Food Eng Prog* 15, 398-403. <https://doi.org/10.13050/foodengprog.2013.17.3.266>.
- Mok C, Lee T and Puligundla P. 2015. Afterglow corona discharge air plasma (ACDAP) for inactivation of common food-borne pathogens. *Food Res Int* 69, 418-423. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.034>.
- Mok C and Song DM. 2010. Low-pressure plasma inactivation of *Escherichia coli*. *Food Eng Prog* 14, 202-207.
- Oshima T and Tato M. 2004. Bacterial sterilization and intracellular protein release by a pulsed electric field. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 90, 11-133. <https://doi.org/10.1007/b94194>.
- Park SY. 2019. Antibacterial effects of atmospheric plasma against main foodborne bacteria on the surface of dried filefish (*Stephanolepis cirrhifer*) fillets. *J Food Hyg Saf.* 34, 178-182. <https://doi.org/10.13103/JFHS.2019.34.2.178>.
- Park SY and Ha SD. 2018. Assessment of cold oxygen plasma technology for the inactivation of major foodborne viruses on stainless steel. *J Food Eng* 223, 42-45. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.11.041>.
- Park SS, Sung JM, Jeong JW, Park KJ and Lim JH. 2012. Efficacy of electrolyzed water and aqueous chlorine dioxide for reducing pathogenic microorganism on Chinese cabbage. *Korean J Food Sci Technol* 44, 240-246. <https://doi.org/10.9721/KJFST.2012.44.2.240>.
- Pompl R, Jamitzky F, Shimizu T, Streffes B, Bunk W, Schmidt HU, Georgi M, Ramrath K, Stolz W and Stark RW. 2009. The effect of low-temperature plasma on bacteria as observed by repeated AFM imaging. *New J Phys* 11, 115023. <https://doi.org/10.1088/1367-2630/11/11/115023>.
- Ryu YH, Uhm HS, Park GS and Choi EH. 2013. Sterilization of *Neurospora crassa* by noncontacted low temperature atmospheric pressure surface discharged plasma with dielectric barrier structure. *J Korean Vac Soc* 22, 55-65. <https://doi.org/10.5757/JKVS.2013.22.2.55>.
- Song HP, Kim B, Choe JH, Jung S, Moon SY, Choe WH and Jo CR. 2010. Evaluation of atmospheric pressure plasma to improve the safety of sliced cheese and ham inoculated by 3-strain cocktail *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol* 26, 432-436. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.02.010>.
- Tendero C, Tixier C, Tristant P, Demasion J and Leprince P. 2006. Atmospheric pressure plasma : A review. *Spectrochim Acta B* 61, 2-30. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2005.10.003>.
- Yong HI, Kim HJ, Park S, Alahakoon AU, Kim K, Choe W and Jo C. 2015. Evaluation of pathogen inactivation on sliced cheese induced by encapsulated atmospheric pressure dielectric barrier discharge plasma. *Food Microbiol* 46, 46-50. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.07.010>.