

Identification of electron beam-resistant bacteria in the microbial reduction of dried laver (*Porphyra tenera*) subjected to electron beam treatment

You Jin Kim¹, Hui Su Oh², Min Ji Kim¹, Jeong Hoon Kim², Jae Baek Goh²,
In Young Choi¹, Mi-Kyung Park^{1*}

¹School of Food Science and Biotechnology, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

²School of Applied Biosciences, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

전자선 처리에 따른 마른 김(*Porphyra tenera*)의 미생물 저감화 효과와 저항성 세균의 동정

김유진¹ · 오희수² · 김민지¹ · 김정훈² · 고재백² · 최인영¹ · 박미경^{1*}

¹경북대학교 식품공학부, ²경북대학교 응용생명과학부

Abstract

This study investigated the effect of electron beam (EB) treatment on the microbial reduction of dried laver (*Porphyra tenera*) and identified EB-resistant bacteria from the treated dried laver. After EB treatments of 4 kGy and 7 kGy, the numbers of total bacteria and EB-resistant bacteria were measured using tryptic soy agar and mannitol salt agar, respectively. The morphological and biochemical characteristics of each isolated EB-resistant bacteria were investigated and these bacteria were identified. Compared to the control $(1.5 \pm 0.2) \times 10^6$ CFU/g, the total bacterial number was significantly decreased to $(5.4 \pm 0.5) \times 10^4$ CFU/g and $(1.1 \pm 0.6) \times 10^4$ CFU/g after EB treatments of 4 kGy and 7 kGy, respectively. With a higher EB dosage, the number of red colonies was almost same, whereas the number of yellow colonies was significantly decreased to $(3.3 \pm 1.2) \times 10^3$ CFU/g and 0 CFU/g for 4 kGy and 7 kGy, respectively. All red and yellow colonies were gram-positive cocci, catalase-positive, and resistant to 3% and 5% NaCl media. From the 16S rDNA sequence analysis, yellow and red colonies were identified as either *Micrococcus flavus* or *M. luteus*, with 99% similarity for the yellow colonies, and *Deinococcus proteolyticus* and *D. piscis*, with 99% and 97% similarity for the red colonies, respectively.

Key words : dried laver, electron beam, resistant bacteria, identification

서 론

김(*Porphyra tenera*)은 우리나라의 중요한 해조류 중 하나로 미역, 다시마 다음으로 많이 생산되고 있으며, 30% 이상의 단백질과 1% 이하의 지방함량을 가지는 비타민과 무기질이 풍부한 알칼리 식품으로 필수아미노산, 비타민,

식이섬유, 타우린 등이 다량 함유된 식품이다(1-3). 국내 김 생산량은 236천톤으로 가정(33%), 식당 및 외식업체(39%), 급식(11%), 김밥 전문점(11%) 등에서 소비되고 있으며 특히 외식산업의 발달로 인해 그 국내소비가 증가하고 있는 추세이다(4,5). 또한 건강지향적인 소비자의 요구에 발맞추어 일본, 중국, 대만, 태국 등의 아시아를 비롯하여 서구권으로의 수출도 증가하는 추세이다(4). 마른 김은 세척 및 이물질 제거, 선별, 그리고 건조 등 비교적 단순한 제조공정을 거치면서 해수 및 공기 등에 의해 1차 오염되기도 하고 비위생적인 작업환경 및 제조공정에 의해 2차 오염이 되기도 한다(6). 실제로 시중에 시판되는 김을 수거하여 검사 한 결과 6 log CFU/g 내외의 미생물이 보고되었으며

*Corresponding author. E-mail : parkmik@knu.ac.kr
Phone : 82-53-950-5776, Fax : 82-53-950-6772
Received 24 December 2015; Revised 8 January 2016;
Accepted 12 January 2016.
Copyright © The Korean Society of Food Preservation. All rights reserved.

(5), 마른 김에서 보고된 위해미생물로는 *Bacillus*속 4종, *Pseudomonas*속 2종, *Alcaligenes*속 등과 방사선 저항균인 *Micrococcus roseus* 등이 보고되고 있다(7).

최근 들어 선진국에서는 김을 포함한 수산물이나 수산 가공 식품의 안전성에 대한 수입규제를 강화하면서 김의 균수 저감화를 위해서 열처리에 관한 연구가 진행되어 왔다. Kang 등(8)은 김 표면에 직접적인 열처리를 통해 2~3 log CFU/g 정도의 저감화 효과를 보았으며, Lee 등(9)은 배소기를 활용한 열처리를 통해 1~3 log CFU/g 정도의 저감화 효과를 보고하기도 하였으나 이들 열처리 과정만으로 마른 김에 존재하는 위해 미생물을 효과적으로 제거 할 수는 없었다. 따라서 마른 김의 미생물 수 저감화를 위한 방법으로 방사선 및 전자선 처리방법이 논의되고 있는 실정이다(7).

조사기술은 1981년 “Golden rule(10 kGy 이하의 선량으로 조사된 식품은 인체에 무해하다)”로 발표된 이후 식품산업에 폭넓게 이용되고 있으며, 비가열(non-thermal treatment) 처리를 통해서 식품의 영양 및 관능적인 품질의 변화를 최소화하면서도 살균·사멸 효과가 매우 뛰어난 미생물 제어법으로 보고되고 있다(10). 현재 56개국에서 230여개의 품목이 허가되어 있으며 국내에서는 26개 식품품목에 대해 감마선과 전자선 조사가 허가되어 있으며 조사선량은 처리 목적에 따라 0.15~10 kGy로 허가되어 있으며 김의 경우는 최대 7 kGy로 허가되어 있다(11). 특히 기존의 방사선(주로 감마선)과는 달리 전자를 빠른 속도로 가속시켜 방출되는 에너지를 활용한 전자선은 전원에 의해서 조절이 가능하여 공정제어의 효율성, 신속·정확성, 에너지 효율성 측면에서 장점을 가지고 있으며 무엇보다도 소비자 수용성 등의 측면에서 방사선에 비해 뛰어난 장점을 가지고 있어 식품으로의 적용이 활발히 연구되고 있는 실정이다(12,13). 하지만 전자선의 식품으로의 적용은 아직 기초 단계에 머무르고 있으며 특히 마른 김을 대상으로 하는 연구는 거의 전무한 상황이다. 따라서 본 연구에서는 마른 김의 전자선조사를 통해 미생물 저감화 효과를 확인하고 조사 처리 후 생존한 전자선 저항성균을 분리·동정하여 전자선 처리를 위한 기초자료로 활용하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

실험에 사용된 마른 김(수분함량 9~10%)은 전라남도 무안에서 구입하였고, polyethylene 필름에 밀봉·포장한 후 전자선 조사 시료로 사용하였다.

전자선 조사 처리

전자선 조사는 electron beam accelerator(ELV-8, EB-Tech

Inc., Daejeon, Korea)를 이용하였으며 총 흡수선량이 4, 7 kGy가 되도록 조사하였으며, ceric cerous dosimeter를 사용하여 흡수선량을 확인하였다.

전자선 조사 김의 총균수 및 전자선 저항성 세균 측정

전자선 조사 직후 각 조사선량에 따라 2 g의 김을 취하여 멸균된 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4, Life technologies Co., Grand Island, NY, USA) 400 mL를 넣고 stomacher(WS-400, Hansol Tech Co., Seoul, Korea)에서 300 rpm으로 3분간 균질화하였다. 현탁액을 십진법에 의해 희석하여 tryptic soy agar(TSA, Difco Inc., Detroit, MI, USA)와 mannitol salt agar(MSA, Difco Inc., Detroit, MI, USA) 평판 배지에 각각 도말한 후 37°C에서 24시간 배양 후 형성된 균락수를 계수하였다. TSA 배지는 총균수의 측정에 사용하였으며, MSA 배지는 전자선 저항성 세균 측정을 위한 선택 배지로 사용하였다. 균락 수는 25~250개 사이의 것을 계수하였으며 그 결과는 CFU/g로 나타내었다.

그람염색 및 광학 현미경 관찰

무작위로 선별된 균주의 한 개 colony를 slide glass에 도포한 후, 증류수를 slide glass에 한 방울 떨어뜨린 후 열고 정시켰다. 여기에 crystal violet 용액을 2~3 방울 떨어뜨린 후 1분간 염색하였다. 염색된 시료를 증류수로 세척한 후 Lugol 용액을 2~3 방울 떨어뜨려 1분간 반응시킨 후 95% ethanol 용액으로 탈색하였다. 최종적으로 safranin 용액으로 1분간 대조 염색 후 광학 현미경(BX40, Olympus Inc., Tokyo, Japan)을 통해 세포의 형태학적 특성 및 그람 염색성을 관찰하였다.

Catalase test

선별된 균주의 colony를 slide glass에 도포한 후, 과산화수소를 한 방울 떨어뜨려 기포가 발생하면 양성으로 판정하였고, 기포가 발생하지 않으면 음성으로 판정하였다.

내염성 검사

선별된 균주를 3%, 5%, 10%의 NaCl(Bio Basic Canada Inc., Markham, Ontario, Canada)이 첨가된 TSA 배지에 배양시킨 후, colony가 생성되면 양성으로 판정하였고, colony가 생성되지 않으면 음성으로 판정하였다.

전자선 저항성 균주의 분리 및 동정

4 kGy에서 선별된 붉은색 및 노란색 colony와 7 kGy에서 선별된 붉은색 colony를 tryptic soy broth(TSB, Difco Inc., Detroit, MI, USA)에 접종하여 37°C에서 24시간 동안 배양 후, TSA에 희석 도말하여 단일 colony를 획득하였다. 단일 colony의 유전자 염기서열 분석은 primer 1492R을 사용하여 솔젠트사(Solgent Co., Daejeon, Korea)에 의해 수행되었

고 동정분석은 bioedit program(Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA)과 NCBI(National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)의 BLAST 검색 프로그램을 활용하였다.

통계분석

모든 실험의 각 항목은 3회 반복 실시하여 평균(mean)과 표준편차(SD)를 산출하였고, 통계처리는 SAS(9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) program을 사용 하였으며, 유의성 검정은 분산분석(ANOVA) 후 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였다.

결과 및 고찰

총균수 측정

전자선 조사 후 조사선량에 따른 마른 김의 총균수 변화는 Fig. 1에 나타내었으며, 전자선 조사를 하지 않은 대조구의 총균수 $(1.5 \pm 0.2) \times 10^6$ CFU/g과 비교시, 전자선 조사 후 마른 김의 총균수는 4 kGy, 7 kGy에서 각각 $(5.4 \pm 0.5) \times 10^4$ CFU/g과 $(1.1 \pm 0.6) \times 10^4$ CFU/g으로 유의적으로 감소하였다 ($p < 0.05$).

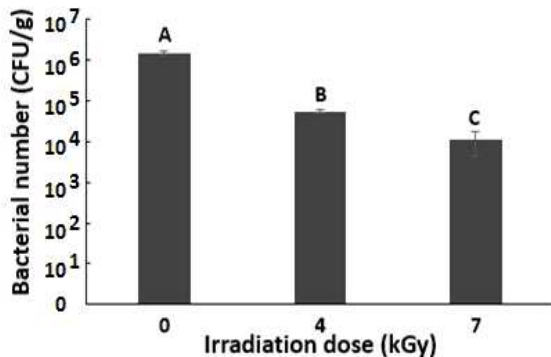


Fig. 1. The number of total bacteria using TSA after exposing to various electron beam irradiation doses.

Means with different letters above bars are significantly different at $p < 0.05$.

전자선 저항성 세균수 측정

MSA 배지에서는 붉은색을 띠는 colony와 노란색을 띠는 colony가 확인되었으며, 각 colony 총균수는 Fig. 2에 나타내었다. 전자선 조사를 하지 않은 대조구는 붉은색 colony와 노란색 colony가 각각 $(2.1 \pm 1.2) \times 10^4$ CFU/g와 $(1.9 \pm 0.5) \times 10^4$ CFU/g으로 계수되었으며, 두 그룹 간의 유의적인 차이는 없었다. 또한 4 kGy 조사 처리구에서는 붉은색 colony와 노란색 colony의 수가 $(1.9 \pm 1.0) \times 10^4$ CFU/g와 $(3.3 \pm 1.2) \times 10^3$ CFU/g으로 각각 나타났으며 두 그룹 간에 유의적인 차이가 확인되었다($p < 0.05$). 7 kGy 조사 처리구에서는 붉은색 colony의 수는 $(1.1 \pm 0.3) \times 10^4$ CFU/g로 대조구 및 4 kGy 처리

구와 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 노란색 colony는 0 CFU/g으로 급격하게 감소함을 알 수 있었다. 따라서, 붉은색 colony는 조사 선량별 유의적인 차이가 없었으나 노란색 colony는 민감하게 영향을 받아 저감화됨을 알 수 있었다.

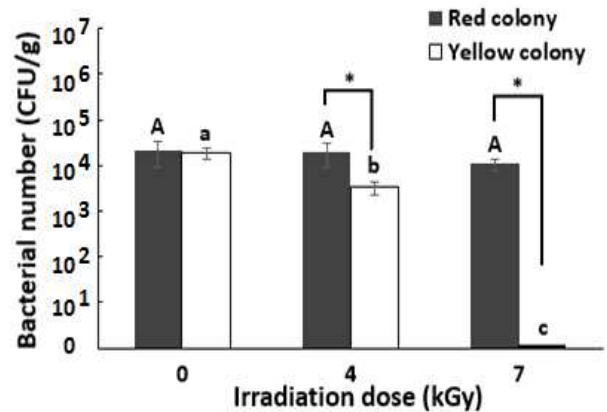


Fig. 2. The number of bacteria using MSA after exposing to various electron beam irradiation doses.

Means with different letters above a bar are significantly different at $p < 0.05$.

전자선 저항성 세균의 형태학적·생화학적 특성

MSA에서 붉은색 colony와 노란색 colony를 순수 분리하여 그람 특성 및 형태학적 특성(Fig. 3)을 살펴보았다. 현미경 관찰 결과 붉은색·노란색 colony 모두 구형이었으며, 그람 염색 결과 모두 양성임을 알 수 있었다. 붉은색 colony의 경우 큰 집락을 형성하기 보다는 2~10개의 균주가 작은 군락을 형성하는 반면, 노란색 colony의 경우 많은 수의 균주가 다발성 집락을 형성하는 특성을 보여주었다. 배양 특성에 관한 고찰 결과(Table 1), 붉은색·노란색 colony 모두 catalase test에서 양성반응을 나타내었으며, 3%와 5%의 NaCl 함유배지에서는 생육이 가능하나 10%의 NaCl 함유 배지에서는 생육이 불가능함을 알 수 있었다.

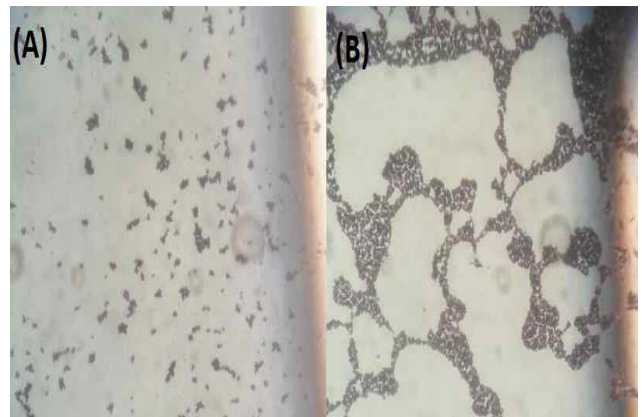


Fig. 3. Microscopic images of red colonies (A) and yellow colonies (B) isolated from MSA plates.

전자선 저항성 세균의 동정

MSA에서 순수 분리한 전자선 저항성 세균의 동정 결과 (Table 2), 4 kGy와 7 kGy의 붉은색 colony는 동일한 균주임을 알 수 있었고, *Deinococcus proteolyticus*(99% 유사성)와 *Deinococcus piscis*(97% 유사성)로 확인되었다. 이에 비해 4 kGy의 노란색 colony는 *Micrococcus flavus*(99% 유사성)와 *Micrococcus luteus*(99% 유사성)로 확인되었다.

감소하여 7 kGy에서는 발견되지 않음을 알 수 있었다. 방사선 저항성 세균을 순수 분리하여 형태학적·생화학적 특성을 살펴본 결과 붉은색과 노란색 colony 모두 균주의 그람양성이었으며 catalase test에서 양성반응을 나타내었고 3%와 5%의 NaCl 함유 배지에서 생육이 가능함을 알 수 있었다. 균주 동정 결과 붉은색 colony는 *D. proteolyticus*와 *D. piscis*로, 노란색 colony는 *M. flavus*와 *M. luteus*로 각각 확인되었다.

Table 1. Morphological and biochemical characteristics of isolated electron beam-resistant bacteria

	4 kGy						7 kGy		
	colony1	colony2	colony3	colony4	colony5	colony6	colony1	colony2	colony3
Shape	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci
Gram stain	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pigment	Red	Red	Red	Yellow	Yellow	Yellow	Red	Red	Red
NaCl 3%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 5%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 10%	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Table 2. Identification of isolated red and yellow colonies

E-beam dosage	Colony	Sequence length (bp)	Identified strains	Similarity (%)
4 kGy	Red	1096	<i>Deinococcus proteolyticus</i> MRP	99%
			<i>Deinococcus piscis</i> 3ax	97%
			<i>Micrococcus flavus</i> PS5	99%
	Yellow	1087	<i>Micrococcus flavus</i> LW4	99%
			<i>Micrococcus flavus</i> cp-50	99%
			<i>Micrococcus flavus</i> HAU-3	99%
7 kGy	Red	1096	<i>Micrococcus luteus</i> ZBGKL	99%
			<i>Micrococcus luteus</i> NSM12	99%
			<i>Micrococcus luteus</i> BGN4B-01d	99%
	Yellow	1087	<i>Deinococcus proteolyticus</i> MRP	99%
			<i>Deinococcus piscis</i> 3ax	97%
			<i>Micrococcus luteus</i> BGN4B-01d	99%

요 약

본 연구에서는 김의 위생상 안전성 확보를 위해 전자선 조사 선량에 따른 미생물의 저감화 효과를 확인하고 전자선 저항성 세균을 분리·동정하였다. 시중에서 시판되고 있는 건조 김에 4 kGy와 7 kGy 선량으로 전자선을 각각 조사한 후 총균수를 측정하였으며, 대조구 (1.5± 0.2)×10⁶ CFU/g와 비교 시, (5.4±0.5)×10⁴ CFU/g와 (1.1±0.6)×10⁴ CFU/g로 각각 유의적으로 감소함을 알 수 있었다. 또한 방사선 저항성 세균의 수는 조사선량이 증가함에 따라 붉은색 colony수의 변화는 거의 없었으나 노란색 colony의 수는 유의적으로

감사의 글

이 논문은 2013년도 경북대학교 신입교수 정착 연구비 지원사업에 의해 지원되었음.

References

1. Lee SK (1999) Effect of packaging on storage stability and chlorophyll contents of dried, roasted and roasted-seasoned laver during storage. J Fd Hyg Safety, 14, 134-139
2. Lee HK, Song SH, Jeong IH (1987) Quality changes of dried lavers during processing and storage. Korean J Fish Aquat Sci, 20, 408-418
3. Park CK, Kang TK, Shin SU (2001) The relationship between health and laver. Bull Fish Sci Inst Yosu National University, 10, 79-84
4. Kim AJ, Shin JK (2014) Nonthermal sterilization of dried laver by intense pulsed light with batch system. Korean J Food Sci Technol, 46, 778-781
5. Lee NY, Jo C, Chung HJ, Kang HJ, Kim JK, Kim HJ, Byun MW (2005) 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
6. Ahn HJ, Yook HS, Kim DH, Kim S, Byun MW (2001)

- Identification of radiation-resistant bacterium isolated from dried laver (*Porphyra tenera*). J Korean Soc Food Sci Nutr, 30, 193-195
7. Kim BR, Kim AJ, Shin JK (2013) Effect of sterilization by intense pulsed light on radiation-resistant bacterium, *Micrococcus roseus*. Korean J Food Sci Technol, 45, 248-251
 8. Kang SG, Park SH, Ki HJ, Ham KS (2001) Chitosan treatment during the preparation of dried laver affects microbial growth and quality. J Chitin Chitosan, 6, 150-154
 9. Lee HJ, Byun HS, Kim JH, Park HY, Jung KJ, Lee TS (1999) Bacterial contamination of dried laver products. Bull Nat Fish Res Devel Ins, 57, 221-226
 10. Ahn JJ, Lee JE, Baek JY, Jeong IY, Kwon JH (2013) Identification of bulgogi sauce added with low quantity of electron beam-irradiated garlic powders by thermoluminescence analysis: an inter-laboratory study. Korean J Food Nutr, 42, 1857-1863
 11. Farkas J, Farkas CM (2011) History and future of food irradiation. Trends Food Sci Tech, 22, 121-126
 12. Kim JK, Song BS, Kim JH, Park JH, Byun EB, Lee JW (2013) Sterilization characteristics of ionizing irradiation and its industrial application. J Korean Musculoskelet Transplant Soc, 13, 49-57
 13. Kwon JH (2010) Safety and understanding of irradiated food. Korea Food Safety Research Institute, Seoul, Korea, 9-29