

발간등록번호

11-1541000-000776-01

비가열 살균기술 (광펄스 기술)을 이용한
수산물의 저장 및 유통기한 연장

High intensity pulsed light treatment for preservation and
shelf-life extension of seafoods

전 주 대 학 교

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “비가열 살균기술(광펄스 기술)을 이용한 수산물의 저장 및 유통기한 연장”에 관한 연구과제의 보고서로 제출합니다.

2010 년 10 월 31 일

주관연구기관명	전주대학교	세부연구책임자	정 명 수
주관연구책임자	신 정 규	연 구 원	최 찬 익
세부연구책임자	신 정 규	연 구 원	정 은 애
연 구 원	오 영 택	연 구 원	고 민 정
연 구 원	손 석 민	연 구 원	정 현
연 구 원	한 기 현	위탁연구책임자	박 영 서
연 구 원	조 아 라	연 구 원	노 수 현
연 구 원	김 애 진	연 구 원	박 지 만
연 구 원	김 보 라	연 구 원	박 미 현
연 구 원	박 형 호	참여기업연구원	이 성 열
연 구 보 조 원	김 민 지	참여기업연구원	정 현 욱
연 구 보 조 원	강 보 경	참여기업연구원	김 종 일
연 구 보 조 원	김 윤 희	참여기업연구원	김 민 우
연 구 보 조 원	김 수 현	참여기업연구원	김 명 욱
참여기업연구원	노 재 민	참여기업연구원	황 덕 용

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 비가열 살균기술 (광펄스 기술)을 이용한 수산물의 저장 및 유통기한 연장				
	(영문) High intensity pulsed light treatment for preservation and shelf-life extension of seafoods				
주관연구기관	전주대학교	주 관 연 구 책 임 자	(소속) 전주대학교		
참 여 기 업	(주) 해진물산		(성명) 신 정 규		
총연구개발비 (268,000 천원)	계	268,000	총연구기간	2008.11.1 .~ 2010.10.31.(2 년)	
	정부출연 연구개발비	200,000	총 참 여 연 구 원 수	총 인 원	28명
	기업부담금	68,000		내부인원	5명
	연구기관부담금			외부인원	23명

○ 연구개발 목표 및 내용

비가열 가공기술의 하나인 광펄스 기술을 이용하여 연어, 우럭, 광어 등의 fillet와 새우, 오징어 등의 각종 생·어육식품을 유통하는 과정에서 문제시 되고 있는 식중독 원인균 및 부패 원인균에 대한 살균효과를 확인하여 기초 data를 확립하고자 하며, 이들 기초 data를 바탕으로 실제 생·어육식품의 살균에 광펄스 기술을 적용하여 살균효과를 확인한 후 광펄스 처리장치의 set-up 및 연속처리라인의 개발을 통하여 실제 산업화 공정에 적용하기 위한 토대를 마련하고자 함. 또한, 각종 수산식품의 저장 및 유통기한 연장에 대한 광펄스 처리의 효과를 규명하고자 함.

○ 연구결과

- 1) 회분식 및 연속식 광펄스 살균 시스템 set-up
- 2) 저비용 소용량 광펄스 살균 시스템 설계 및 제작
- 3) 회분식 및 연속식 처리 용기 설계 및 제작
- 4) 수산식품에 존재하는 부패 미생물, 병원성 미생물의 탐색 및 동정
 - 중온성 세균과 저온성 세균이 약 10³-10⁴ CFU/ml 존재함
 - 광어 fillet에서는 *Listeria monocytogenes*와 *Bacillus cereus*, 새우 fillet에서는 *Bacillus cereus*가 존재함
- 5) 광펄스 기술을 이용한 수산 식품에 존재하는 위해 미생물의 저감효과 확인
 - 검사 및 동정 결과를 통해 *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *Pseudomonas*, *E.coli* O:157에 대한 세균 저감 효과 확인

- 6) 광펄스 처리에 의한 수산 식품 내 위해세균의 저감 효과 확인
 - 광어, 연어, 새우 등 실제 수산식품 내 위해세균 저감 효과 확인
- 7) 광펄스에 의한 미생물의 생리학적 기작 규명
 - Transmission Electron Microscope(TEM)을 이용하여 세포막 및 세포내 소기관 손상을 확인함
 - DNA 및 RNA의 손상도 검사를 통해 IPL이 UV와는 다른 세포막 또는 세포막 파괴에 의한 사멸기작을 확인
- 8) 개발된 시스템을 이용한, 실제 수산식품에 대한 광펄스 기술의 적용시험
 - 실제 수산식품 내 위해세균 저감화 효과 확인 (위해세균별, 제품종류별 분석)
- 9) 개발된 시스템을 이용하여 처리된 수산식품의 저장시험
 - 미생물 분석, 이화학적 분석을 통한 저장기간 중 품질 변화의 관찰 및 안전성 검증
 - 냉장 저장시험을 통한 제품별 유통기한의 설정

○ 연구성과 활용실적 및 계획

- 수산식품의 살균에 광펄스 기술을 적용하는데 있어 광펄스의 성질 (파장, 세기, 펄스의 길이 및 수 등), 포장재, 적용식품의 특성(식품의 화학적 특성, 투명도, 색상 등) 등과 같은 주요 공정요소(critical process factors)들에 대한 보다 specific한 결과를 도출함으로써 광펄스 연속처리 시스템의 개발 및 산업화의 근거를 마련하였으며, 개발된 기술의 산업적 적용 타당성을 분석 평가하여 Pilot-scale 광펄스 연속처리 시스템의 개발이 완료단계임.
- 본 연구에서는 수산식품의 표면 살균처리 및 에너지 효율성이 높은 광펄스 기술을 수산식품에 도입함으로써 수산식품의 유통기한 연장에 기여하고, 수산식품의 유통망 확대에 실질적으로 기여하고자 함. 또한, 본 과제를 통해 획득된 수산신선식품의 위해세균 오염도 분석 결과 및 국내에서 생산·유통되는 각종 식품 및 식품원료에 대한 잠재적 위해세균의 오염 정도 모니터링을 통해 친환경 연속식 광펄스 살균시스템의 적용 범위 및 효과 검증을 위한 표준 매뉴얼을 구축하여 산업체 교육 및 대국민 홍보에 적극 활용할 계획임.
- 본 광펄스 기술을 실제 유통·시판중인 식품 및 식품원료에 적용하는 시료별 필드테스트에 활용할 계획이며, 특히 유아용 식품, 신선식품 및 라면스프, 건조스프 등 기타 건조식품의 살균에 응용할 계획이며, 특히, 영·유아 식품인 분유에서 검출되어 논란이 되어온 엔테로박터 사카자키(E. sakazakii)균의 규격이 불검출로 바뀐에 따라 이러한 영·유아식품과 신선식품 등 비가열 식품 속의 위해 세균을 제거하고 식중독 발병률을 감소시키는 일은 더욱더 중요한 사항이 되었으며, 이를 위해 관련 업계에서는 비열처리 살균방법에 대한 연구와 기술의 실용화가 없어서는 안 될 매우 중요한 사안으로 대두되고 있으므로 본 연구의 결과를 바탕으로 광펄스 기술을 분유를 비롯한 영·유아식품과 신선식품에 응용하고자 함.

요 약 문

I. 제 목

비가열 살균기술 (광펄스 기술)을 이용한 수산물의 저장 및 유통기한 연장
High intensity pulsed light treatment for preservation and shelf-life extension of seafoods

II. 연구개발의 목적 및 필요성

소비자들의 건강에 대한 높은 관심으로 천연상태의 품질을 가능한한 유지한 최소 가공 식품에 대한 수요가 크게 증가하였다. 최소가공법은 식품 본래의 신선한 품질을 그대로 유지하면서 식품을 안전하게 보존할 수 있도록 하는 가공 방법을 말한다.

현재 식품공업에서는 대부분 가열 조작이나 보존제의 첨가 등에 의한 방법으로 식품의 보존 기간을 연장하고 있으나 가열조작의 경우 열에 의한 영양성분의 파괴, 식감의 변화, 향기 성분의 손실 등 품질 손실을 피할 수 없으며, 소비자들의 거부감으로 인해 인공 보존료의 사용이 줄어들고 있다.

이러한 기존의 방법에 대한 문제점의 해결과 기존의 방법으로는 살균이 어려운 신선 식품등에 대한 살균을 위해 새로운 기술의 도입이 지속적으로 요구되고 있으며 다양한 非熱 가공 기술이 개발되고 있다. 비열 가공 기술은 종래의 열적, 화학적 방법과는 달리 전기적 및 물리적 방법으로 보다 신선하고 食味が 우수한 고품질의 안전한 식품을 제공할 수 있는 기술이다.

비열 살균 기술 중 광펄스 살균 기술(high intensity pulsed light sterilization technology)은 미국, 일본 등 일부 국가에서 실용화를 위한 연구 시작 단계이며, 국내에서는 아직 연구가 제대로 이루어지지 못하고 있어 이 분야에 대한 체계적인 연구가 이루어질 경우 경쟁력 있는 기술개발이 가능하다.

본 연구에서는 비가열 가공 기술의 하나인 광펄스 기술을 이용하여 연어, 우럭, 광어 등의 fillet과 새우, 오징어 등의 각종 생·어육 식품을 유통하는 과정에서 문제시 되고 있는 식중독 원인균 및 부패 원인균을 조사하고 이에 대한

살균 효과를 확인하여 기초 data를 확립하고자 한다.

이 기초 data를 바탕으로 실제 생·어육식품의 살균에 광펄스를 적용하여 살균 효과를 확인한 후 광펄스 처리장치의 setup 및 연속처리라인의 개발을 통하여 실제 산업화 공정에 적용하기 위한 토대를 마련하고, 광펄스가 미생물을 사멸시키는 기작(mechanism)을 분자생물학적, 생리학적 측면에서 규명함으로써 광펄스 기술을 수산식품의 살균 공정에 적용시킬 수 있는 이론적 배경을 확립하고자 한다.

본 연구를 통해 확립된 방법은 체계적인 정리를 통해 향후 영·유아용 식품이나 야채, 과일, 달걀, 육류 등 기타 신선 식품에 적용하기 위한 가이드라인을 마련하고 새로운 비열 가공 처리 기술을 이용한 위해세균 저감화 기술을 알리기 위한 기술 홍보물을 작성하여 관련 업체 및 소비자 단체 등에 배포함으로써 최종적으로 국민이 안심하고 섭취할 수 있는 식품의 유통에 이바지하고자 한다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

가. 연구개발 목표와 내용

- 비가열 가공 기술의 하나인 광펄스 기술을 이용하여 연어, 우럭, 광어, 도미 등의 fillet(싱싱회)과 새우, 오징어 등의 각종 수산식품을 유통하는 과정에서 문제시되고 있는 식중독 원인균 및 부패 원인균의 살균효과 기초 data 확립
- 기초 data를 바탕으로 실제 수산식품의 살균에 광펄스 기술을 적용하여 살균 효과를 확인한 후 광펄스 처리장치의 setup 및 연속 처리 라인의 개발을 통하여 실제 산업화 공정에 적용하기 위한 토대 마련
- 각종 수산식품의 저장 및 유통 기한 연장에 대한 광펄스 처리의 효과 규명
- 광펄스가 미생물을 사멸시키는 기작(mechanism)을 분자생물학적, 생리학적 측면에서 규명하여 광펄스 기술을 수산식품의 살균공정에 적용시킬 수 있는 이론적 배경 확립
- 본 연구를 통해 확립된 방법을 체계적으로 정리하여 야채, 과일, 달걀, 육류 등 신선식품 및 영·유아용 식품과 같은 타연구에 적용할 수 있는 기초 마련

나. 연차별 연구 목표 및 내용

구 분	연구개발목표	연구개발내용
1차년도	<input type="checkbox"/> 광펄스 살균(회분식, 연속식) 시스템 개발 <input type="checkbox"/> 광펄스 기술을 이용한 수산식품에 존재하는 위해 미생물의 저감 효과 확인 <input type="checkbox"/> 광펄스에 의한 미생물 사멸의 분자생물학적 기작 규명 <input type="checkbox"/> 기존 수산물 유통상의 문제점 파악	<ul style="list-style-type: none"> - 실험실 규모의 장치 set-up 및 개량 - pilot 규모의 장치 set-up 및 개량 - 연속 처리 라인 설계 - 수산식품에 존재하는 위해 세균 검사 및 동정 - 위해 세균에 대한 저감 효과 검토 - DNA상의 thymine dimer 생성 연구 - DNA repair system 손상도 연구 - DNA의 single-strand break 연구 - RNA 손상도 연구 - 기존 유통되고 있는 수산물의 저장 유통 과정 중 문제점 파악
2차년도	<input type="checkbox"/> 연속처리시스템을 이용한 대량처리조건연구 <input type="checkbox"/> 광펄스 처리한 수산식품의 저장시험 및 유통기한 설정 <input type="checkbox"/> 광펄스에 의한 미생물 사멸의 생리학적 기작 규명 <input type="checkbox"/> 산업적 적용 타당성 평가	<ul style="list-style-type: none"> - 연속 처리 라인 제작 - 연속 처리 라인 set-up 및 pilot 규모 장치 개량 set-up - 대량처리조건 연구 - 광펄스 시스템을 이용한 제품별 주요 공정 요인 및 조건 확립 - 저장시험을 통한 제품별 유통기한 설정 - 전자현미경을 이용한 세포막 및 세포내 소기관 손상도 연구 - 광펄스에 의한 세포 내 단백질의 세포 외 유출도 연구 - 세포발달 과정에서의 사멸기작 연구 - 산업적 적용 타당성 평가

IV. 연구개발결과

1. 회분식 및 연속식 처리를 위한 광펄스 살균 시스템 개발

초기에 구성된 실험장치는 실험실용과 pilot 용량으로 모두 사용할 수 있는 장치로서 전원공급부(power supply), 펄스 발생기(pulse generator), 펄스 변압기(transformer), 광원(light source) 그리고 처리 용기(treatment chamber)로 구성되었다. 전원공급부는 220V AC의 입력전원을 고전압 변압기를 통하여 승압하고 DC로 정류하여 50 kV DC 전원을 발생시킬 수 있도록 하였다. 사용된 광원은 Xenon을 충전한 NL계열의 lamp로서 램프의 방전을 위해 램프에 최소 15 kV이상의 전원을 직접적으로 인가하여 발광하는 direct 방식의 시스템을 구성하였다. 이러한 직접 전원 연결 방법은 램프로부터 발생하는 열을 최소화할 수 있어 시료에 열에 의한 영향을 거의 주지 않으나, 빛의 세기가 강하지 않으며 램프에 강한 충격을 가하게 되어 램프의 수명을 줄이게 된다.

램프의 수명을 늘리고 빛의 강도를 높이기 위해 1차년도에 direct 방식의 구성을 triggering 방식을 이용한 시스템을 구성하였다. Triggering 방식의 시스템은 직접 인가 방식에 비해 장치를 소형화할 수 있으며, 제작 비용을 최소화할 수 있다는 장점이 있다. 소형화된 장치는 상시 전원 0~1200 V를 공급할 수 있는 주 전원과 순간적으로 램프를 triggering 할 수 있는 소형의 trigger 전원, 그리고 펄스 발생을 위한 펄스망, 시료의 처리를 위한 처리 용기로 구성되어져 있다.

연속 처리를 위한 시스템은 컨베이어 방식을 도입하여 시료가 컨베이어벨트를 통해 공급되도록 하였다. 시료가 이송되는 컨베이어 벨트 상하에 램프가 위치하도록하여 시료의 윗면, 아랫면이 고르게 처리될 수 있도록 하였다. 또한 처리시간이 조정될 수 있도록 컨베이어 벨트의 속도를 조절할 수 있도록 구성하였다. 이 연속 처리 용기에 연결된 다수의 램프에 연결되는 전원은 직렬 방식의 고전압 공급 방식, 직렬방식의 저전압과 병렬방식의 trigger 전원 공급 방식을 연결할 수 있도록 하였다.

2. 수산식품에 존재하는 부패 미생물 및 병원성 미생물

수산물에 존재하는 미생물의 정량과 병원성 미생물의 정성 분석을 실시하였다. 수산식품, 광어, 연어, 새우에 존재하는 미생물의 일반 세균수와 효모수를 분석한 결과 PCA 배지에서는 일반 세균수는 연어의 경우 5.27×10^3 CFU/mL,

새우는 4.45×10^4 CFU/mL로 측정되었으며 광어에서는 검출되지 않았다. YM agar에서 측정한 결과 효모(또는 저온성 세균)의 수는 광어의 경우 1.45×10^4 CFU/mL, 연어는 4.71×10^4 CFU/mL, 새우는 1.52×10^4 CFU/mL로 사용한 시료 모두 유사한 수준을 나타내었다. 수산식품 시료에 존재하는 미생물의 동정을 위해 16S rRNA의 염기서열 분석을 한 결과 *seudomonas* sp. FLM05-3과 99%, *Brochothrix* sp. NJ-25와 99%, *Delftia* sp. KZ-OAIF2와 99%, *Rahnella* sp. NJ-54와 99%로 일치하는 것으로 확인되었다.

수산식품에 존재하는 병원성 미생물의 정성분석 결과 광어에서는 *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *B. cereus*로 의심되는 균이 검출되었고, 연어에서는 *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. cereus*로 의심되는 균이 검출되었으며, 새우에서는 *E. coli* O157:H7, *S. typhimurium*, *S. aureus*, *B. cereus*로 의심되는 균이 검출되었다.

3. 광펄스 처리에 의한 위해 미생물의 저감 효과

수산식품에 존재하는 부패 및 병원성 미생물의 plate상에서의 살균효과와 실제 수산식품을 처리를 통한 부패 및 병원성 미생물의 저감 효과를 조사하였다. 배지상에서 부패 및 병원성 미생물을 처리한 결과 모든 미생물이 처리 전압, 즉 광원으로부터 발생하는 에너지 밀도가 커짐에 따라 그리고 처리시간이 길어짐에 따라 높은 사멸율을 나타내었다. *E. coli* O157:H7은 최소 3 log에서 최대 6 logm의 사멸 효과를 얻을 수 있었으며, 임계처리시간이나 tailing 현상이 없었다. *Listeria monocytogenes*는 15 kV에서 약 1 log, 25 kV에서는 6 log의 사멸효과를 보여 *E. coli*보다 사멸효과가 다소 낮은 것으로 나타났으며, *E. coli*와는 달리 낮은 전압에서는 임계처리 시간을 보였다. *Bacillus cereus*는 *L. monocytogenes*와 비슷한 사멸 효과를 보였으며, *Pseudomonas aeruginosa*는 *E. coli*와 비슷하게 15 kV, 600 μ s 처리 후 약 3 log, 25 kV, 800 μ s에서 6 log의 사멸 효과를 얻었으며, 낮은 처리 전압에서 임계 처리 시간을 나타내지 않았다.

실제 수산식품에 존재하는 부패 및 병원성 미생물 중 *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*와 *P. aeruginosa*를 연어, 광어, 새우에서 처리한 결과 *E. coli* O157:H7는 25 kV에서 6,000 μ s 처리 후 약 1 log, 광어에서는 1.2 log, 새우에서는 2 log의 사멸 효과를 얻었다. *L. monocytogenes*는 연어에서는 1.5 log, 광어에서는 1 log, 그리고 새우에서는 1.6 log의 사멸 결과를 얻었다. *Pseudomonas aeruginosa*는 같은 시간 처리한 결과 연어에서는 1.5 log, 광어에서는 1.3 log, 새우에서는 2 log의 사멸효과를 얻었다.

일반적으로 수산물에 존재하는 미생물은 수산물 전체에 존재하지 않고 표면에만 존재하기 때문에 수산물의 표면에 존재하는 미생물에 대한 살균 효과를 조사한 결과 *E. coli* O157:H7는 연어에서는 2.5 log, 광어에서는 2.2 log, 새우에서는 3.6 log, *L. monocytogenes*는 연어에서 2.2 log, 광어에서는 1.8 log, 새우에서는 3.0 log, *Pseudomonas aeruginosa*는 연어에서 3 log, 광어에서 2 log, 새우에서는 3.5 log의 사멸 효과를 얻을 수 있었다.

소형화한 시스템을 이용한 수산식품의 적용 시험을 한 결과 연어의 경우에는 31.611 J/cm²의 처리 후 *E. coli* O157:H7은 약 2.3 log, *P. aeruginosa*는 1.0 log, 의 사멸 효과를 얻었으며, *L. monocytogenes*는 2.9 log의 사멸율을 얻었다. 광어에서는 같은 에너지를 인가한 후 *E. coli* O157:H7은 약 2.0 log, *P. aeruginosa*는 1.2 log, 의 사멸 효과를 얻었으며, *L. monocytogenes*는 3.0 log의 사멸율을 얻었다. 새우에서는 *E. coli* O157:H7은 약 1.1 log, *P. aeruginosa*는 1.4 log, 의 사멸 효과를 얻었다. 소형화 시스템에 의한 온도 상승을 보면 32 J/cm²의 에너지를 가하여 1-3 log의 사멸율을 얻는 동안 약 20℃의 온도상승을 보였다. 미국 FDA의 권고 기준이 12 J/cm²의 에너지 밀도를 가한 경우에는 시료와 램프의 거리와 관계없이 10℃미만의 온도 상승을 보였으며, 미생물의 사멸율은 약 90~99%의 사멸율을 보였다.

4. 광펄스 처리한 수산식품의 저장 중 품질 변화

소형화 광펄스 처리 시스템으로 처리한 수산식품을 0, 2, 4, 6, 8, 10일 간격으로 품질 변화를 살펴보았다.

저장 기간 동안 미생물의 변화를 보면 연어와 광어의 경우 대조구는 1,800 cfu/ml~10,400 cfu/ml를 나타내었으나 IPL 처리구의 경우엔 저장 10일까지 미생물이 나타나지 않았다. 그러나 새우의 경우에는 처리하지 않은 대조구는 지속적으로 미생물이 증가되는 경향을 보였으며, 처리구도 일정하지는 않으나 소량 증가하는 경향을 보였다.

저장 기간에 따른 pH의 변화를 보면 저장 기간 10일 동안 처리하지 않은 대조구나 처리한 시료 모두 거의 변화가 없었다.

색도의 경우에는 대조구와 처리구간의 뚜렷한 차이를 보이지 않았으나 대체적으로 대조구가 처리구에 비해 색의 변화가 더 크게 나타나, 광펄스 처리가 화학적, 생물학적 반응에 의한 색상의 변화를 다소간 억제해 줄 수 있음을 확인하였다.

저장기간에 따른 수분함량 및 수분 활성도에 대한 측정 결과 대조구와 처리구 모두 큰 변화가 없었으며, texture의 변화는 광펄스를 처리한 시료가 연어, 광어, 새우 모두 hardness 및 adhesiveness가 대조구에 비해 높은 결과를 보였으며, cohesiveness, gumminess 및 chewiness도 대조구에 비해 전반적으로 더 높게 나타나 광펄스 처리가 식감 유지에 효과가 있는 것으로 나타났다.

5. 광펄스 처리의 사멸 기작

광펄스 처리에 의한 미생물의 사멸 기작을 규명하기 위하여 자외선과 광펄스 처리한 균주의 사멸 기작을 비교하였다.

자외선은 주로 탄소와 탄소의 이중공유결합에 흡수되어 이들을 파괴함으로써 DNA의 재배열 또는 분해를 일으키고 thymine dimer와 같은 pyrimidine dimer등을 생성하여 DNA 복제를 저해함으로써 미생물의 사멸을 일으키는 것으로 보고되고 있는데 실제 UV-C의 조사에 의한 genomic DNA를 분석한 결과 double-strand break가 발생하는 것으로 확인되었다. 또한 single-strand break가 증가하고, single-strand DNA간에 cross-link 현상이 발생하여 고분자량의 DNA들이 발생하는 것을 확인할 수 있었다. 이 이외에도 pyrimidine dimer의 발생등의 현상도 함께 밝혀져 UV-C에 의한 미생물의 사멸은 주로 DNA의 손상에 의한 것으로 판명되었다.

그러나 광펄스 조사에 의한 미생물의 사멸에서는 DNA상에 double-strand break는 미미하게 발생하는 것으로 확인되었으며, single-strand break도 미미하게 발생되기는 하였으나 UV-C 조사에 의한 발생보다는 현저히 낮았다. 또한 pyrimidine dimer의 발생 수준도 매우 낮아 nucleotide excision repair system을 손상시키지 않는 것으로 보였다. 그러나 RNA의 break를 확인한 결과 mRNA의 농도가 감소하는 것으로 나타났는데 이는 광펄스 조사에 의해 mRNA가 분해되기 때문인 것으로 보인다.

전자투과현미경에 의한 세포 파괴도를 살펴 본 결과에 의하면 광펄스 처리를 하지 않은 control 세포와 UV-C 조사한 세포는 세포벽과 세포막이 온전하며, 세포 내 구성물질이 고르게 존재하였으나, 광펄스 처리를 받은 세포는 세포벽과 세포막의 구분이 불분명해졌으며, 세포 내 물질도 상당 부분 유실된 것을 볼 수 있었다. 또한 세포막 부분이 터져 외부로 유출되는 모습도 보였다. 결과적으로 광펄스 처리는 UV-C와는 달리 세포막에 손상을 주어 세포내 물질의 손실에 의한 사멸효과가 큰 것으로 판명되었다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 실용화 · 산업화 계획

실제 생·어육식품의 살균에 광펄스 기술을 적용하여 살균효과를 확인한 하였으며, 광펄스 처리장치의 set-up 및 연속처리라인의 개발을 통하여 실제 산업화 공정에 적용하기 위한 토대를 마련하였다.

특히 본 연구에서는 수산식품의 살균에 광펄스 기술을 적용하는데 있어 광펄스의 성질(파장, 세기, 펄스의 길이 및 수 등), 포장재, 적용식품의 특성(식품의 화학적 특성, 투명도, 색상 등) 등과 같은 주요 공정요소(critical process factors)들에 대한 보다 specific한 결과를 도출함으로써 광펄스 연속처리 시스템의 개발 및 산업화의 근거를 마련하였으며, 개발된 기술의 산업적 적용 타당성을 분석 평가하여 Pilot-scale 광펄스 연속처리 시스템의 개발이 완료단계이다.

본 연구에서는 수산식품의 표면 살균처리 및 에너지 효율성이 높은 광펄스 기술을 수산식품에 도입함으로써 수산식품의 유통기한 연장에 기여하고, 수산식품의 유통망 확대에 실질적으로 기여하고자 한다.

2. 교육 · 지도 · 홍보 등 기술 확산 계획

본 과제를 통해 획득된 수산신선식품의 위해세균 오염도 분석 결과 및 국내에서 생산·유통되는 각종 식품 및 식품원료에 대한 잠재적 위해세균의 오염 정도 모니터링을 통해 친환경 연속식 광펄스 살균시스템의 적용 범위 및 효과 검증에 위한 표준 매뉴얼을 구축하여 산업체 교육 및 대국민 홍보에 적극 활용할 계획이다.

본 과제의 종료 후 6개월 이내에 광펄스 기술을 이용한 위해 세균 저감화 기술을 알리기 위한 기술 홍보물을 작성하여 관련업체 및 소비자단체 등에 배포하여 언론홍보 및 대국민교육에 이용할 계획이며, 광펄스 기술을 이용한 살균기술의 특성 및 기준을 수산식품과 관련된 식품공전에 기재함으로써 이 기술을 관련업체에서 합법적으로 사용하도록 할 예정이다.

3. 특허 · 논문 등 지식 재산권 확보계획

국제학술대회 발표실적

“Intense light pulse treatment for inactivating *Listeria monocytogenes* on the surface of sea foods and shelf-time extension”과 “A study on effect of intense pulsed light treatment for inactivating on the surface of sea foods”가 유명 국제학술대회인 Institute of Food Technologists (IFT)에서 2009(Anaheim, USA)과 2010(Chicago USA)에 각각 발표되었음.

□ 국제학술지 발표실적

“Inactivation of *Enterobacter sakazakii* inoculated on fomulated infant foods by intense pulsed light treatment”가 2009년 국제학술지 Food Science and Biotechnology에 수록되었으며, Nonthermal sterilization of *Listeria monocytogenes* in infant foods by intense pulsed light treatment”가 2010년 국제학술지인 Journal of Food Engineering에 수록되었음.

□ 국제학술지 투고중인 발표실적

“Inactivation of pathogenic microorganisms on various sea foods using intense pulsed light”가 국제학술지인 Food Control에 투고중이며, “ Effects of intense pulsed light treatment for sterilization of *Listeria monocytogenes* on various sea foods”가 국제학술지인 Food Research International에 투고중임. 또한 “Intense pulsed light as a nonthemat treatment for the inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on various sea foods”가 Journal of Food Engineering에 투고 예정임.

□ 국내학술지 발표실적

Review paper인 “전기 에너지를 이용한 비가열 식품 가공 기술 (Nonthermal Food Processing Technology using Electric Power”가 2010년 국내 학술지인 식품과학과 산업에 수록되었음

□ 국내학술대회 발표실적

“연속 자외선 조사와 광펄스 기술을 이용한 수산식품 유래 유해 미생물의 사멸 효과 비교”가 2010년 한국식품과학회 국제학술대회에 발표되었으며, “고전압 에너지를 이용한 비열식품가공기술”은 2009년 한국산업식품공학회, “광펄스를 이용한 돼지고기 표면 대장균의 살균”과 “광펄스 처리가 *E. coli*의 불활성화에 미치는 영향”은 2009년 한국식품과학회 국제학술대회에 발표가 되었으며, “광펄스 처리시 배지 색깔에 따른 *E. coli* O157의 불활성화에 미치는 영향”은 한국식품영양과학회 국제학술대회에 발표가 되었음

4. 추가연구 및 타연구에 활용계획

본 광펄스 기술을 실제 유통·시판중인 식품 및 식품원료에 적용하는 시료별 필드테스트에 활용할 계획이며, 특히 유아용 식품, 신선식품 및 라면스프, 건조스프 등 기타 건조식품의 살균에 응용할 계획이다.

특히, 영·유아 식품인 분유에서 검출되어 논란이 되어온 엔테로박터 사카자키(*E. sakazakii*)균의 규격이 '불검출'로 바뀜에 따라 이러한 영·유아식품과 신선식품 등 비가열 식품 속의 위해 세균을 제거하고 식중독 발병률을 감소시키는 일은 더욱더 중요한 사항이 되었으며, 이를 위해 관련 업계에서는 비열처리 살균방법에 대한 연구와 기술의 실용화가 없어서는 안 될 매우 중요한 사안으로 대두되고 있으므로 본 연구의 결과를 바탕으로 광펄스 기술을 분유를 비롯한 영·유아식품과 신선식품에 응용하고자 한다.

5. 연구기획사업

본 과제외 종료 후 1년 이내에 광펄스 기술을 이용한 위해 세균 저감화 기술을 워크숍 또는 심포지엄을 통하여 학계 및 산업계를 대상으로 발표하고자 하며, 특히 국내 식품업계의 관련분야 비가열 전문가 양성을 위한 사업 등에 적극적으로 활용할 계획이다.

SUMMARY

(영문 요약문)

Intense pulsed light(IPL) is currently being recommended as an innovative nonthermal sterilization technology that kills microorganisms using short pulses of intense broad-spectrum electromagnetic radiation. This nonthermal technology is designed to produce stable and safe food products that are not affected except for damage induced by heating. Therefore, the main objective of this project is to evaluate the suitability of IPL technology for nonthermal sterilization of various sea foods.

The detailed purpose is to determine the inactivation effects of the IPL on *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* which are representative pathogenic microorganisms on surface of sea foods such as flatfish, salmon, shrimp. And also, on the basis of these data, this project evaluated the possibility of the shelf-life extension for the sea food products and of the commercial feasibility of this sterilization method. Overall results showed that the inactivation of microorganisms increased with increasing energy density and treatment time. The cell reduction of *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *B. cereus*, and *P. aeruginosa* were obtained 4 to 6 log for 750 μ s of treatment time, respectively. And, to study a feasibility of IPL for various sea foods, these pathogenic microorganisms were inoculated on flatfish, shrimp fillet and treated by IPL. The inactivation of microorganisms increased with increasing treatment time. The cell reduction of *E. coli* O157:H7 was obtained up to 1 log on salmon fillet, 1.5 log on flatfish fillet and 2 log on shrimp fillet. In case of sea foods inoculated with *L. monocytogenes*, the results showed that the cell reduction was obtained 1, 1.2 and 1.5 log on flatfish, salmon and shrimp fillet, respectively. For sea foods inoculated with *P. aeruginosa*, the results showed that the cell reduction of *P. aeruginosa* was obtained 1.3, 1.5 and 1.8 log on flatfish fillet, salmon fillet and shrimp fillet, respectively. To evaluate the cell damage by IPL treatment processes, microorganisms treated by IPL were observed by a transmission electron microscopy. The microscopic observation clearly indicated that there was cell wall damage, cytoplasmic membrane shrinkage and cellular content leakage

Qualitative analysis of microorganisms in sea food indicated that mesophilic bacteria were detected in salmon and shrimp fillet at the level of 5.27×10^3 and 4.45×10^4 CFU/mL, respectively. Psychrophilic bacteria were detected in flatfish,

salmon, and shrimp fillet at the level of 1.45×10^4 , 4.71×10^4 , and 1.52×10^4 CFU/mL, respectively. *E. coli* O157:H7, *S. aureus*, and *S. typhimurium* were not detected in flatfish, salmon, and shrimp fillet, but *B. cereus* was in flatfish and shrimp fillet, *L. monocytogenes* was in flatfish fillet. When *E. coli* AB1157 and its relevant *uvrA* mutant, *E. coli* AB1886, as a model bacteria were continuously irradiated with UV-C of 254 nm, double-strand break, single-strand break, and pyrimidine dimer were produced in genomic DNA, and RNA was damaged. Also, when *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, and *P. aeruginosa* were continuously irradiated with UV-C, double-strand break, single-strand break, and pyrimidine dimer were produced in genomic DNA, but RNA was not degraded. Treatment of *E. coli* cells with high-intensity pulsed light (IPL) resulted in the production of double-strand break, single-strand break, and pyrimidine dimer at the low level, and RNA was degraded, but nucleotide excision repair system was not damaged. When *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, and *P. aeruginosa* were treated with IPL, double-strand break and single-strand break were induced in genomic DNA at the low level, and pyrimidine dimer was produced, but RNA was rarely degraded. Transmission electron microscope showed that cell membrane and cell wall of *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, and *P. aeruginosa* were disrupted by IPL treatment. This result was confirmed by the quantitative analysis of protein leaked from the broken cells. IPL treatment affected the cell wall damage in Gram positive bacteria rather than Gram negative bacteria. Structural difference during the developmental process in spore-forming bacteria did not affected the cell death rate according to IPL treatment.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Summary	5
Chapter 1. Outline of Project	21
1. Object and Scope of Project	21
a. Object of Project	21
b. Background of Project	21
Chapter 2. Strategy of Art	31
1. Strategy of Art	31
2. Position of technology	47
Chapter 3. Contents and Results of Project	50
1. Literature Review	50
a. Mechanisms of Sterilization	50
b. Effect of Intense pulsed light by Processing factors	52
c. Effect of microbial inactivation	53
d. Application on Foods	53
2. Development of Intense pulsed light system for Batch and Continuous treatment	55
a. Power supply and light source for IPL	55
b. Power supply for Copmpact IPL system	67
c. Design and Setup of Treatment chamber	72
3. Screening and Indentification of pathogenic in seafood	75
a. Screening of Spoilage bacteria in seafood	75
b. Screening of Pathogenic bacteria in seafood	83
4. Inactivation of pathogenic microorganisms on plate by intense pulsed light	94
a. Inactivaton of microorganisms by intense pulsed light	94
5. Inactivation of pathogenic microoragnisms in seafood by intense pulsed light	103
a. Inactivation of microorganisms in seafoods	103
b. Inactivation of microorganisms on seafoods	103
6. Observation of Transmission electron microscope	113
7. Application of Compacti IPL system on Seafoods	116

8. Storage test of IPL treated seafoods	131
9. Inactivation mechanism of microorganism by UV Irradiation	143
a. Inactivation mechanism of microorganism in molecular level by UV Irradiation	143
b. Inactivation mechanism of pathogenic microorganism in seafood by continuous UV-C irradiation	160
10. Inactivation mechanism of microorganism by Intense pulsed light	176
a. Inactivation mechanism of model <i>E. coli</i> by IPL	176
b. Inactivation mechanism of pathogenic microorganism in seafood by IPL ...	189
c. Elucidation of physiological inactivation mechanism by TEM	206
d. Protein leakage of cell by IPL treatment	211
e. Effect of IPL treatment on growth stage of sporulation cells	212
Chapter 4. Achievement and Contribution of Related Fields	219
Chapter 5. Outcome of project and Application plan of project results	224
Chapter 6. Scientific Information of technology	229
Chapter 7. References	235

목 차

요약문	5
제 1 장 연구개발 과제의 개요	21
제 1 절 연구개발의 목적 및 범위	21
1. 연구개발의 최종목표	21
2. 연구개발의 필요성	21
제 2 장 국내외 기술개발 현황	31
제 1 절 국내외 기술개발 현황	31
제 2 절 국내외 기술개발 현황에서 차지하는 위치	47
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	50
제 1 절 문헌 고찰	50
1. 사멸 기작	50
2. Intense Pulsed Light 처리의 영향 요인	52
3. 미생물의 사멸 효과	53
4. 식품에의 적용	53
제 2 절 회분식 및 연속식 처리를 위한 광펄스 살균 시스템 개발	55
1. 광펄스 전원 발생 장치 및 광원	55
2. 소형화 경량 광펄스 전원 발생 장치	67
3. 처리용기의 설계 및 제작	72
제 3 절 수산식품에 존재하는 부패 미생물, 병원성 미생물의 탐색 및 동정	75
1. 수산식품에 존재하는 부패 미생물 탐색	75
2. 수산식품에 존재하는 병원성 미생물 정성 실험	83
제 4 절 광펄스 기술을 이용한 수산식품에 존재하는 위해 미생물의 저감 효과 확 인	94
1. 광펄스 기술의 위해 세균에 대한 저감화 효과 검토	94
제 5 절 광펄스 처리에 의한 수산식품 내 위해 세균의 저감 효과 확인 ...	103
1. 수산식품 내 위해 세균의 저감 효과	103

2. 수산식품 표면의 위해세균의 저감효과	103
제 6 절 Transmission electron microscope(TEM) 측정	113
제 7 절 소형화 시스템을 이용한 수산식품에 대한 광펄스 기술 적용 시험	116
제 8 절 소형화 광펄스 시스템 처리 수산식품의 저장시험	131
제 9 절 자외선 조사에 의한 미생물 사멸 기작 규명	143
1. 자외선 조사에 의한 미생물의 분자생물학적 사멸기작	143
2. 254 nm 연속 UV-C 조사에 의한 수산식품 유래 병원성 미생물의 사멸기작	160
제 10 절 광펄스 조사에 의한 미생물의 사멸 기작 규명	176
1. 광펄스에 의한 <i>E. coli</i> 모델 균주의 사멸 기작	176
2. 광펄스 조사에 의한 수산식품에 존재하는 병원성 미생물의 사멸기작	189
3. 투과전자현미경에 의한 광펄스 처리의 생리학적 사멸 기작 규명	206
4. 광펄스 처리에 의한 세포 내 단백질의 세포 외 유출도 확인	211
5. 광펄스 처리가 포자형성 균주의 세포 발달 과정에 미치는 영향	212
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	219
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	224
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	229
제 7 장 참고문헌	235

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적 및 범위

1. 연구개발의 최종목표

- 비가열 가공기술의 하나인 광펄스 기술을 이용하여 연어, 광어등의 fillet과 새우, 오징어 등의 각종 수산식품을 유통하는 과정에서 문제시 되고 있는 식중독 원인균 및 부패 원인균에 대한 살균효과를 확인하여 기초 data를 확립하고자 함
- 기초 data를 바탕으로 실제 수산식품의 살균에 광펄스 기술을 적용하여 살균효과를 확인한 후 광펄스 처리장치의 set-up 및 연속처리라인의 개발을 통하여 실제 산업화 공정에 적용하기 위한 토대를 마련하고자 함
- 각종 수산식품의 저장 및 유통기한 연장에 대한 광펄스 처리의 효과를 규명
- 광펄스가 미생물을 사멸시키는 기작(mechanism)을 분자생물학적, 생리학적인 측면에서 규명함으로써 광펄스 기술을 수산식품의 살균공정에 적용시킬 수 있는 이론적 배경을 확립하고자 함
- 본 연구를 통해 확립된 방법을 체계적으로 정리하여 향후 영·유아용 식품이나 야채, 과일, 달걀, 육류 등 기타 신선식품에 적용하기 위한 가이드 라인을 마련하고자 함

2. 연구개발의 필요성

- 소비자들의 건강에 대한 높은 관심으로 천연 상태의 품질을 가능한 유지한 최소 가공 식품(minimal processing foods)에 대한 수요가 크게 증가되었으며, 최소 가공법은 식품 본래의 신선한 품질을 그대로 유지하면서 식품의 안전한 보존 수명을 부여할 수 있는 가공방법을 말함
- 현재 식품공업에서 널리 사용되고 있는 보존법은 대부분 가열 조작(thermal operation) 또는 식품 보존제의 첨가 등에 의한 화학적 조작(chemical

operation)에 의존하고 있으나 가열 조작에서는 열에 의한 영양 성분의 파괴, 텍스처의 변화, 향기 성분의 손실 등 품질 손실을 피할 수 없으며, 인공 보존료를 점차 사용하지 않는 경향이 있음

- 따라서 식품 가공 및 포장 기술에서 새로운 기술의 도입이 지속적으로 요구되고 있어 여러 가지 非熱 가공(nonthermal process) 기술이 개발되고 있으며 이들 비열 가공 기술은 종래의 열적(thermal), 화학적(chemical) 방법과는 달리 전기적(electrical) 및 물리적(physical) 조작으로서 이들 기술의 실용화에 의해 소비자들에게 품질적인 측면에서 보다 우수하고, 천연의 영양 성분을 그대로 함유하고 있으며, 신선하고 食味が 우수한 고품질의 안전한 식품을 제공할 수 있음
- 비열 살균 기술 중 광펄스 살균 기술(high intensity pulsed light sterilization technology)은 미국, 일본 등 일부 국가에서 실용화를 위한 연구 시작 단계이므로 이 분야에 대한 연구가 체계적으로 이루어질 경우 국제 경쟁력 있는 기술개발이 충분히 가능함
- 따라서 본 연구에서는 수산 식품의 살균과 유통 기한 연장을 위해 광펄스 살균 기술을 적용하고 이의 자료를 바탕으로 향후 신선 식품의 살균 및 유통 기한 연장 기술 개발에 활용하고자 함

가. 기술적 측면

(1) 비열 가공(非熱加工) 기술

- 식품의 보존성을 효과적으로 향상시키기 위하여 위해 세균을 제거하거나 유통 중 생육을 억제하는 방법으로 식품업계에서는 전통적으로 가열, 건조, 냉동 등의 물리적 방법이나 식품 보존제의 첨가와 같은 화학적 방법을 사용하여 왔음
- 그러나 이러한 기술들은 영·유아용 식품이나 야채, 과일, 달걀, 어·육류 등 신선식품의 살균에는 적용하기 어려우며 식품보존제의 사용에 있어서도 소비자들의 가공식품에 대한 기대수준이 높아짐에 따라 그 사용한도가 점차 제한되고 있음
- 이에 따라 세계적으로 여러 가지 비열처리 기술(non-thermal process)에 대한

연구와 실용화가 이루어지고 있음

- 현재 식품산업에서 실용화를 위해 연구되고 있는 비열처리 가공기술 중 대표적인 물리적 방법으로는 초고압(high hydrostatic pressure), 고전압 펄스 전기장(high voltage pulsed electric field), 진동 자기장(oscillating magnetic fields), 조사법(ionizing radiation), 광펄스(high-intensity pulsed light), 광촉매 산화반응(photocatalytic oxidation) 등이 있음. 이러한 기술들은 각각 대상 식품에 따라 그 적용 분야가 다르며 동시에 모든 식품 분야에 적용할 수 없다는 단점을 가지고 있음
- 현재의 가열살균 기술로는 적용하기 힘든 각종 개별식품에 대한 맞춤형 적용 연구는 식품업계의 어려움을 해결하고 소비자들에 보다 안전한 식품을 제공하여 국민의 건강한 식생활을 이룰 수 있어 그 개발이 시급한 상황임
- 본 연구에서는 비열처리 가공기술 중 광펄스 기술을 이용하여 새우, 오징어, 생선 등의 수산식품을 유통하는 과정에서 문제시 되고 있는 각종 위해 세균을 효과적으로 저감화할 수 있는 방법을 연구하였음

(2) 광펄스 (high-intensity pulsed light) 기술

- 광펄스 기술은 "intensified light pulse", "pulsed white light(WHL)", "broad-spectrum white light" 등 여러 가지 이름으로 불리며 광펄스에서 사용되는 빛의 영역은 170-2600 nm의 범위로 자외선(UV) 영역뿐만 아니라 근적외선(NIR) 영역까지 포함한다는 점에서 기존의 UV 살균과는 구별됨
- 광펄스 살균 장치의 원리는 기본적으로 펄스 전기장 살균 장치와 그 원리가 같으며 펄스 전기장의 살균 장치는 Fig. 1-1에 나타내었음
- 광펄스 살균 장치는 고전압 펄스 전기장의 살균 장치의 pulser pipe와 electrode 대신에 broad spectrum을 갖는 lamp를 연결하게 되며 switch의 역할을 하는 contactor가 L의 위치에 놓이면 고전압 직류 발생기 3에 의해 높은 전압이 capacitor인 5에 축적이 되고, 충전이 완료된 후 contactor가 E에 놓이게 되면 capacitor에 축적되어 있는 전기 에너지가 2 위치에 연결된 lamp를 통해 방전되면서 강한 빛을 발생시키게 되고 이렇게 발생된 빛을 식품에 조사함으로써 살균이 이루어지게 됨

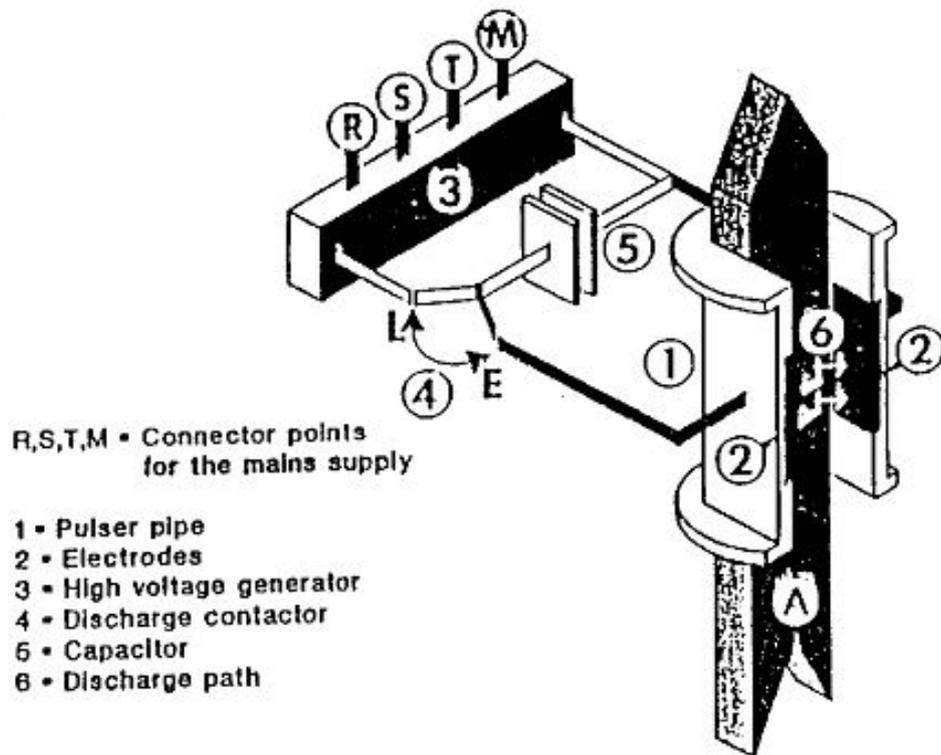


Fig. 1-1. High voltage power generation system

- 광펄스 처리 시 0.01-50 J/cm² 범위의 에너지밀도(energy density)를 가지는 pulse가 1 μs - 0.1 s의 간격으로 1-20회의 flash 형태로 물질에 가해지며, 광 원으로는 일반적으로 450 torr 정도의 압력으로 xenon이 채워진 clear fused quartz tube가 사용됨
- 이 기술의 근본적인 원리는 전 파장의 강한 빛을 아주 짧은 시간 안에 식품에 가하여 식품의 표면을 살균시키거나 표면 미생물 수를 감소시키는데 있으며, 제품의 유통기한을 연장하고 품질을 높이기 위한 목적으로 사용되며 식품표면의 살균뿐만 아니라 포장재나 투명한 약품의 살균에도 사용될 수 있음
- 광펄스 기술의 살균력은 빛의 파장, 빛의 강도, pulse의 수와 주기(조사시간), 시료와 광 원 사이의 거리와 포장재와 식품의 종류, 액체시료의 경우 투명도, 색 등에 의해서 결정되며 제품의 종류와 살균하려는 면적에 따라 lamp의 수와 배치, pulse 주기가 달라짐
- 광펄스 기술에 의한 미생물 사멸 기구는 아직 구체적인 이론이 정립되지 않았으나 기존의 UV 살균의 경우와 마찬가지로 빛을 쬐여 세포의 DNA 구조를 파괴함으로써 미생물이 사멸되는 것으로 보고 있음
- 다만 UV 살균의 경우 손상된 DNA가 특정 환경에서 cell repair system에 의해 미생물이 정상 상태로 회복될 수 있는 확률이 매우 큰 반면, 광펄스 살균은 앞서 UV 살균보다 큰 손상을 주어 미생물이 회복될 수 있는 확률을 낮추어 주기 때문에 UV 살균법에 비해 효과적으로 미생물을 제어할 수 있는 것으로 알려져 있음

(나) 경제·산업적 측면

- 앞서 언급한 바와 같이 비가열 신선식품의 소비량이 점차 증가하고 있는 현 시점에 이러한 식품으로 인한 식중독의 위험은 따라서 증가할 수밖에 없고 소비자들에게 미치는 영향 또한 지대한 것으로 여겨짐
- 그러나 비가열 식품이라는 특성을 지닌 수산식품이나 채소, 과일, 생식 등 여러 신선식품은 최소한의 가열공정만을 거치게 되므로 식품원료 내에 존재하는 미생물 또한 그대로 유지될 수 밖에 없는 문제점을 내포하고 있음
- 어느 연구결과에서는 일부 시판생식에서 식중독 균인 *Bacillus cereus*가 검출

되었고 포자 형성균과 대장균군도 검출되어 생식제품들의 미생물학적 안전성에 대한 문제가 제기된 바 있으며, 특히 수산식품 및 축산식품으로 인한 미생물의 오염으로 인해 구토, 설사, 복통 등의 질병이 발생되어 사망 또는 피해를 입는 사례가 보고되고 있음

- 또한 2008년 4월에는 훈제 연어 7개 제품에서 식중독의 원인균이 *Listeria monocytogenes*가 검출되어 생산된 3161.8 kg 중 1980.2 kg이 회수 및 압류되었으며, 관련 제품에 대한 긴급 회수 조치가 이루어진 예가 있음
- 미국에서 보고된 자료에 의하면 식품 내의 세균감염으로 인한 질병 발생건수가 매년 7백만 건으로 7,000여명이 사망에 이르고 있으며, 이중에서 어류 및 육류로 인한 발병이 전체 발생건수의 절반 이상을 차지하고 사망자가 4,000명으로 어류 및 육류의 안전문제가 큰 문제로 등장하고 있음
- 또한 영·유아 식품인 분유에서 검출되어 논란이 되어온 엔테로박터 사카자키 (*E. sakazakii*)균의 규격이“불검출”로 바뀜에 따라 이러한 영·유아식품과 신선식품 등 비가열 식품 속의 위해 세균을 제거하고 식중독 발병률을 감소시키는 일은 더욱더 중요한 사항이 되었으며, 이를 위해 관련 업계에서는 비열처리 살균방법에 대한 연구와 기술의 실용화가 없어서는 안 될 매우 중요한 사안으로 대두되고 있음

(다) 사회·문화적 측면

- 계속되는 경제적 침체 속에서도 소비자들의 건강에 대한 인식이 변화하면서 신선한 제품을 찾는 경향이 강해지고 있으며, 특히 육류제품에 대한 불안 속에 수산 식품에 대한 관심이 더욱 커지고 있음. 이에 따라 식품업계에서는 최소한의 가공을 통하여 자연 그대로의 품질을 유지하는 식품개발에 대한 관심이 고조되고 있음
- 식품의 보존성을 향상시키기 위하여 전통적으로는 가열, 건조, 냉동 등의 물리적 방법이나 식품 보존제의 첨가와 같은 화학적 방법을 사용하여 왔으나 가열 가공식품은 열에 의해 영양성분을 파괴시키고 조직감 및 색의 변화 그리고 향미성분의 손실 등 식품의 품질저하를 일으키게 되고, 냉동 또는 건조 가공식품은 장기간 저장할 경우 품질 및 소비자 기호도가 감소하게 됨
- 이에 따라 원료와 생산품의 품질을 신선하게 유지하면서 식중독 및 부패를

방지하는 기술인 최소가공기술(minimal process technology)에 대한 관심이 증대되고 연구가 진행되고 있음

- 특히 시장에서 어류 및 육류 등의 신선식품과 영·유아용 식품 등 비가열 식품의 수요가 점점 더 증가하는 동시에 각종 위해세균이 검출되고 이에 따른 논란이 확대됨에 따라 품목별로 위해세균에 대한 적절한 살균방법의 개발이 절실한 시점임. 아래의 표들은 영·유아용 식품, 신선식품 등 비가열 식품의 각종 위해세균의 검출상황을 나타내고 있음
- Table 1-1은 여러 신선식품에서 병원성 박테리아의 검출현황을 나타내고 있음
- Table 1-2는 분유에서 검출된 *Enterobacter sakazakii*와 그밖에 다른 *Enterobacteriaceae*의 검출 현황에 대해 나타내고 있음
- Fig. 1-2에서는 미국의 식중독 발생 현황을 원인 식품별로 나타낸 2000년도 통계자료로서 식중독의 주요 원인이 되는 식품이 어·육류, 가금류, 채소 등 각종 신선식품이 주를 이루고 있음을 보여주고 있음

Table 1-1. Distribution of food-borne pathogenic bacteria at various foods

Region	Total	Vegetable salads	Kimbab/Hambers/Sandwiches	Sliced raw fish
Total sample	250	67	48	40
Detected sample number	23(9.2%)	6(9.0%)	5(10.4%)	3(7.5%)
<i>E. coli</i>	4(1.6%)	2(3.0%)	1(2.1%)	-
<i>S. aureus</i>	9(3.6%)	2(3.0%)	4(8.3%)	3(7.5%)
<i>B. cereus</i>	10(4.0%)	2(3.0%)	-	-
<i>V. parahaemolyticus</i>	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> spp.	-	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i>	-	-	-	-
<i>E. coli</i> O157:H7	-	-	-	-
<i>C. jejuni</i>	-	-	-	-
<i>Cl. perfringens</i>	-	-	-	-
<i>Y. enterocolitica</i>	-	-	-	-

* The Annual Report of KFDA, Vol. 9, 2005

Table 1-2. *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* isolated from powdered infant formulas

Organisms	The number of PIFs (%)
<i>Acinetobacter baumannii/calco</i>	1/51 (2%)
<i>Cedecea davisae</i>	1/51 (2%)
<i>Citrobacter freundii</i>	2/51 (4%)
<i>Cryseomonas luteola</i>	2/51 (4%)
<i>Enterobacter amnigenus</i>	1/51 (2%)
<i>Enterobacter cloacae</i>	12/51 (24%)
<i>Enterobacter sakazakii</i>	4/51 (8%)
<i>Escherichia hermannii</i>	1/51 (2%)
<i>Escherichia vulneris</i>	1/51 (2%)
<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	1/51 (2%)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1/51 (2%)
<i>Micrococcus</i> spp.	1/51 (2%)
<i>Pantoea</i> spp.	1/51 (2%)
<i>Pasteurella pneumotropica/haemolytica</i>	1/51 (2%)
<i>Shigella</i> spp.	1/51 (2%)

※ 국내 조제분유에 존재하는 *Enterobacter sakazakii*의 스크리닝 및 특성 분석
(이화여자대학교 대학원 2005학년도 석사학위 청구논문)

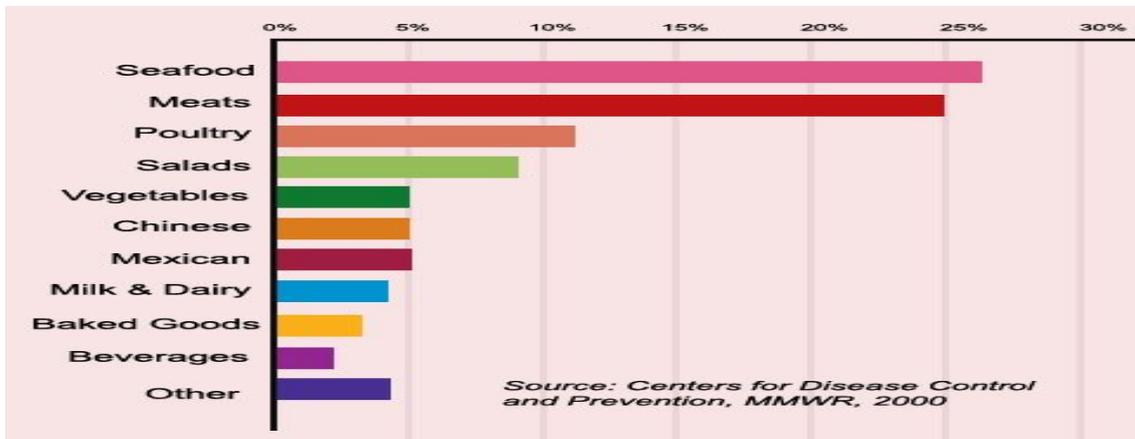


Fig. 1-2. The source foods of food poisoning

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내·외 기술개발 현황

1. 국내 기술개발 현황

- 현재 광펄스 살균 기술은 짧은 연구기간에도 불구하고 가열 살균을 적용하기 어려운 많은 식품을 살균할 수 있는 대체 기술로서의 적용성 여부가 큰 관심으로 떠오르고 있으나, 우리나라의 경우에는 광펄스 살균 기술에 관한 연구가 매우 적은 실정임.
- Cho 등은 광펄스와 UV-C 및 heat와의 병합처리에 의한 *Botritis cinerea*와 *Monilia Fructigena*의 불활성화 정도에 대한 연구를 수행하였으며, 연구 결과 광펄스만 처리하였을 때에 미생물의 불활성화가 3-4 log 정도인 것에 비해 UV-C 및 heat을 함께 처리했을 때 상대적으로 불활성화 정도가 2-3 log 정도 크게 나타났음을 보고하였음
- Cho 등은 또한 발효식품에 널리 산재되어 있는 젖산균을 대상으로 하여 광펄스 처리 기술의 주요공정요인인 광의 세기, 처리 시간, 시료 표면과의 거리 등에 의한 살균 효과에 관한 연구결과를 발표하였는데, 수행된 연구에 따르면 광펄스의 빛의 세기가 증가할수록 처리시간이 길수록, 시료 표면과의 거리가 짧을수록 높은 살균효과를 나타내었음(2-1~3).
- Choi 등은 광펄스에 의한 *Listeria monocytogenes*(KCCM 40307)의 사멸 효과를 살펴본 결과 보고하였는데, 그 결과를 살펴보면 다음과 같음.
 - 광펄스의 처리 조건을 15Hz에서 10, 15, 20, 25 kV로 전압을 달리하여 처리한 후 *L. monocytogenes*의 생균수를 측정한 결과, 처리 전압이 높아지고 처리 시간이 길어질수록 높은 사멸률을 나타냄(Fig 2-4).
 - 처리 전압이 높아질수록 사멸속도 또한 빨라지는 결과를 얻을 수 있었음.
 - 처리 전압과 사멸속도 간에는 exponential의 관계를 나타냄.
 - 10, 15, 20 kV에서는 임계처리시간을 나타냄.

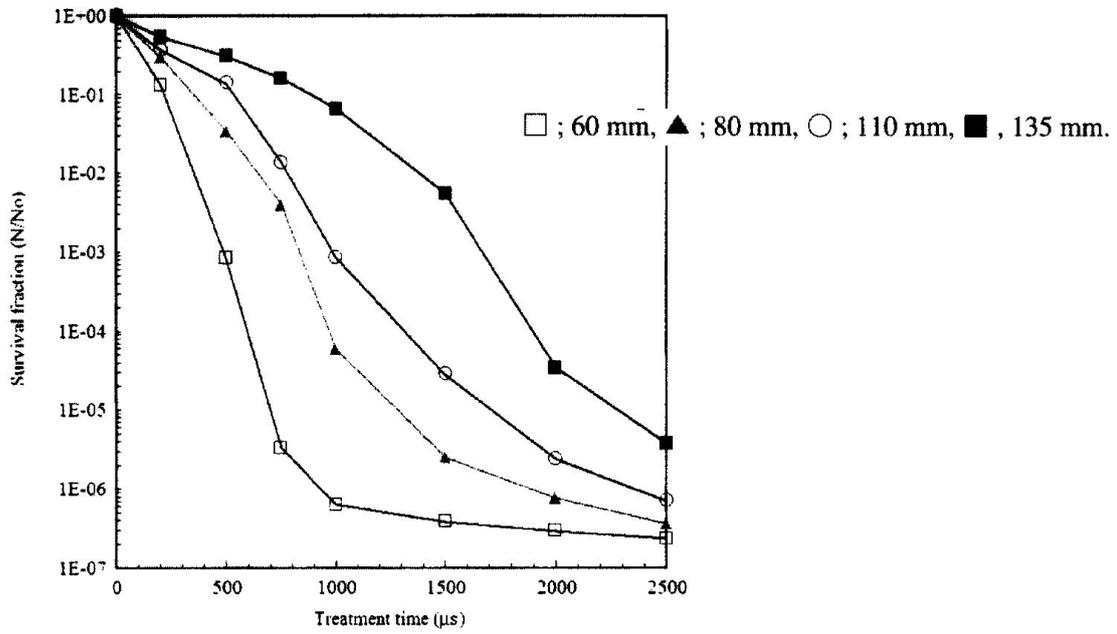


Fig. 2-1. Effect of the distance between the lamp and the surface of sample on inactivation of *L. plantarum* by intense light pulse (1 μm pulse width) treatment at room temperature.

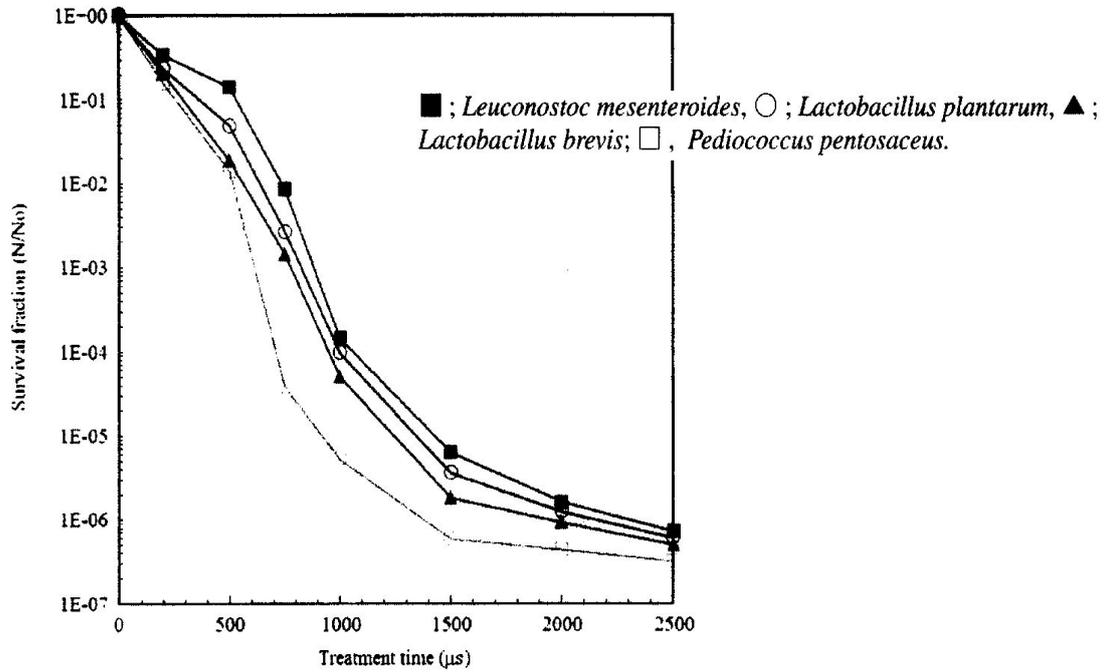


Fig. 2-2. Susceptibility of *Lactobacillus*, *Leuconostoc* and *Pediococcus* exposure to intense light pulse treatments carried out at 15 kV and room temperature

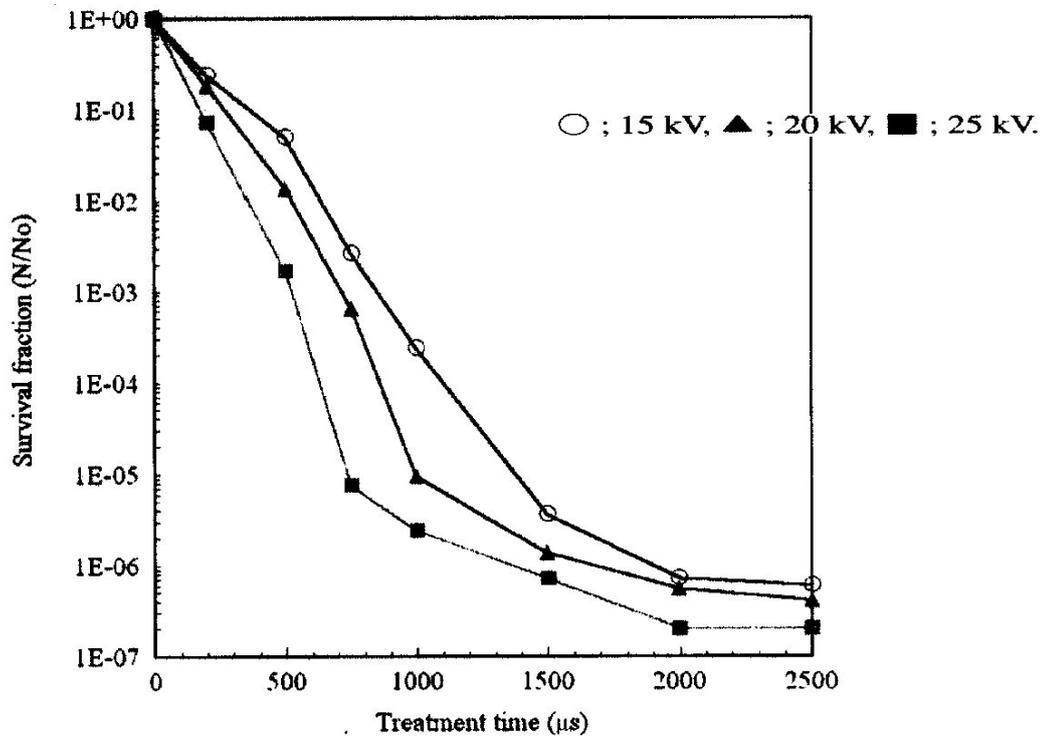


Fig. 2-3. Effect of the distance between the lamp and the surface of sample on inactivation of *L.plantarum* by intense light pulse carried out at 25kV and room temperature

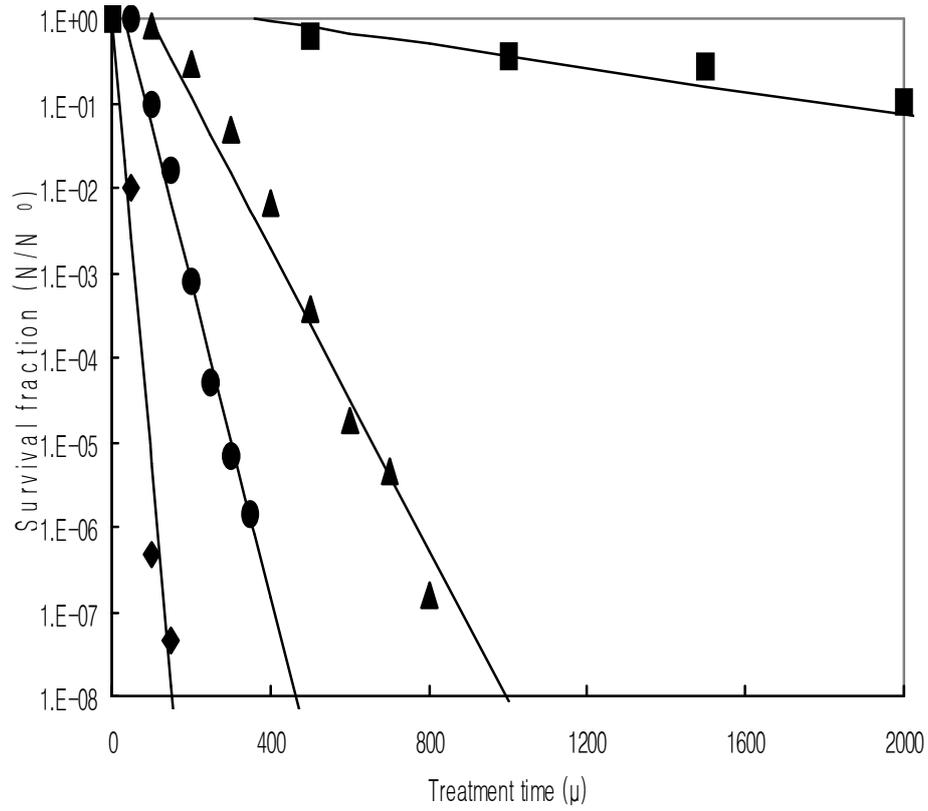


Fig. 2-4. Inactivation of *L. monocytogenes* as treatment voltage by high-intensity pulsed light.

(■ 10 kV, ▲ 15 kV, ● 20 kV, ◆ 25 kV)

- Choi 등은 또한 *Enterobacter sakazakii*(ATCC 51329)의 광펄스 살균효과에 대한 결과도 보고하였는데, 그 결과는 다음과 같음.
 - 광펄스의 처리 조건을 15Hz에서 10, 15 kV로 전압을 달리하여 처리한 후 *E. sakazakii*의 생균수를 측정한 결과, 처리 전압이 높고 처리 시간이 길어 질수록 높은 사멸률을 나타냄(Fig 2-5).
 - 낮은 전압에서도 임계처리시간을 나타내지 않는 결과를 얻을 수 있었음.

- 광펄스에 의한 식품의 살균은 본 연구과제의 총괄책임자인 신정규 교수에 의해 2002년 'Nonthermal pasteurization of lactic acid bacteria by high intensity light pulse'에 대한 연구가 이루어졌으며, 2007년에는 신정규 교수와 세부과제 연구책임자인 정명수 교수가 식품의약품안전청 용역연구사업인 '광펄스 기술을 이용한 식품 중 위해세균 저감화 연구'를 통하여 '식중독균 살균을 위한 광펄스 기술의 응용', '광펄스 처리가 *Listeria monocytogenes*의 불활성화에 미치는 영향' 등에 대한 연구가 이루어졌음.

2. 국외 기술개발 현황

- 광펄스를 이용한 살균 기술은 1990년대에 들어와서 본격적인 연구가 시작되었으며 이 살균법은 오랫동안 사용되어온 자외선 살균의 원리와 최근 들어 비열 살균 기술로서 관심을 끌고 있는 고전압 펄스 전기장 살균 기술의 원리를 병합한 기술로서 미생물의 사멸기작은 자외선 살균과 비슷한 것으로 알려져 있음

- 외국의 경우 광펄스를 이용한 식품, 포장재 등의 살균에 관한 연구가 활발히 진행되고 있음.

- Anderson 등은 광펄스 처리에 의한 여러 종류의 세균 및 곰팡이의 불활성화 정도를 확인하였으며(Fig 2-6), 살균 효과가 광의 세기에 비례한다는 사실을 보고하였음.

- Gomez-Lopez 등은 최소 가공된 야채의 광펄스 살균 효과와 유통기한에 관한 연구가 이루어졌으며, 광펄스 처리 후 최소 가공된 야채의 저장기간이 증가했다는 연구 결과를 발표하였음.

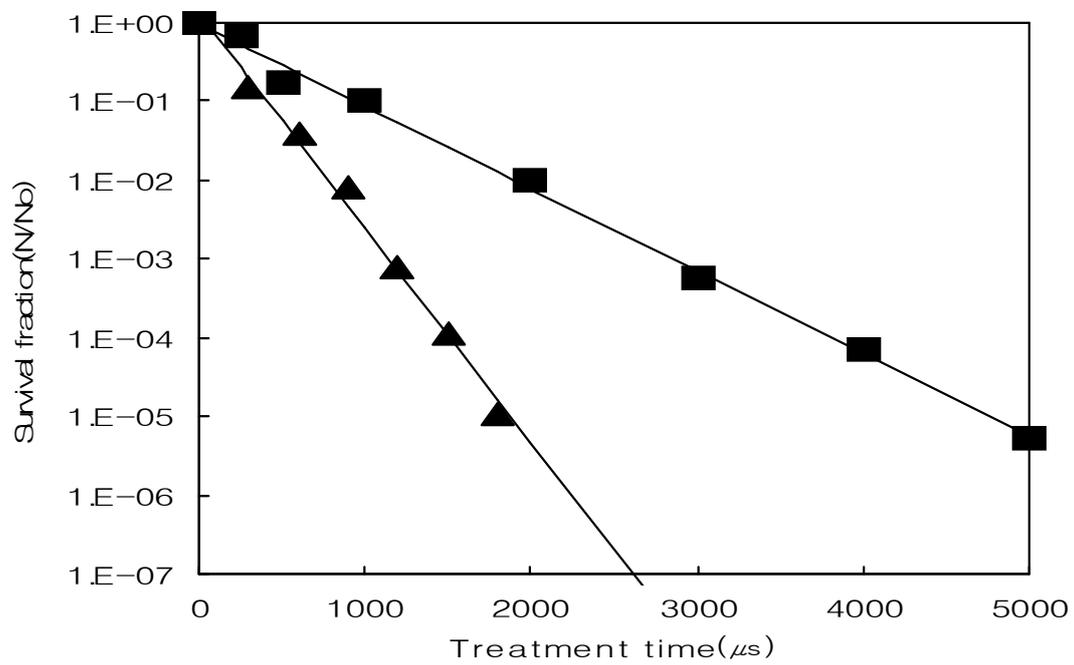


Fig. 2-5. Inactivation of *E. sakazakii* as treatment voltage by high-intensity pulsed light. (■ 10 kV, ▲ 15 kV)

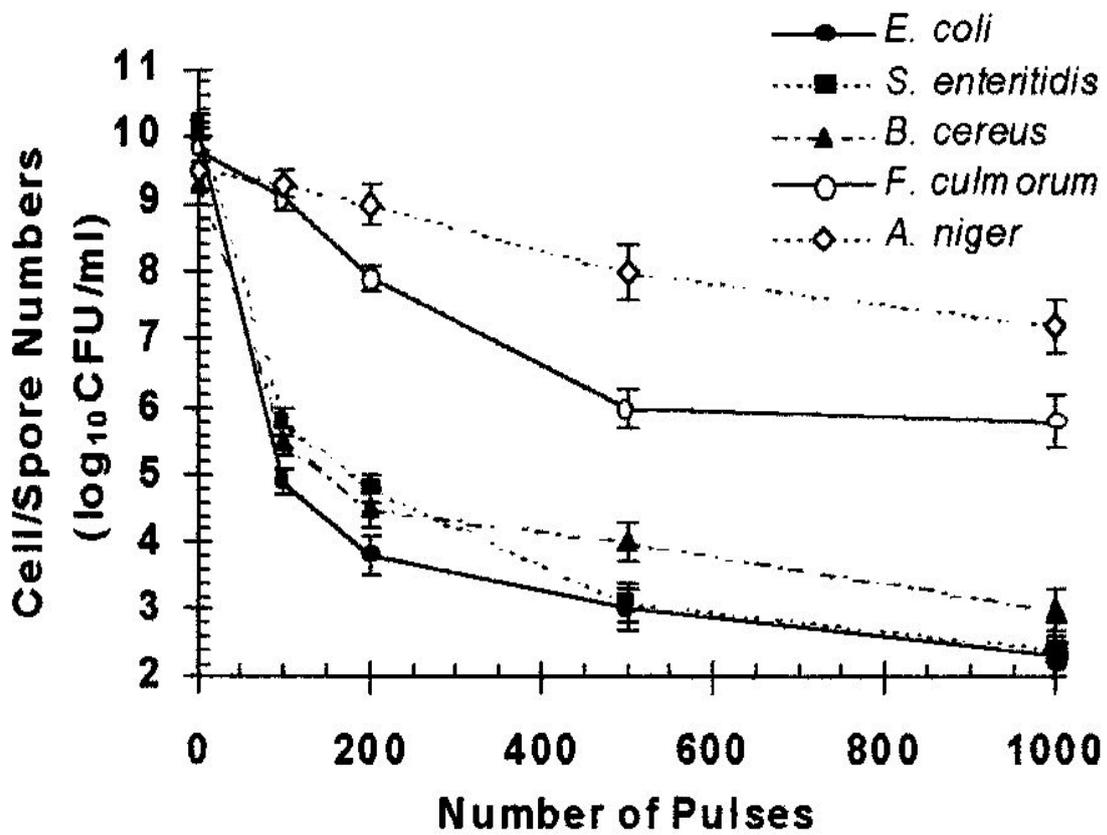


Fig. 2-6. Pulsed-light inactivation of surface-inoculated pathogenic bacteria and spoilage fungi.

- Dunn 등은 빵 제품, 어류, 육류, 생수 등의 광펄스 처리에 관한 연구결과를 발표하였는데 그들에 연구결과에 의하면, 빵 제품의 경우 광펄스 처리가 되지 않은 sample의 경우 5-7일이 지나자 mold colonies가 나타났고 11일이 지나자 심해졌으나 광펄스를 처리한 sample의 경우에는 11일이 지나서도 mold colonies의 증식이 발견되지 않음. 또한 어류의 경우는 광펄스 처리를 한 새우가 7일 정도 먹을 수 있는 상태로 보존되었지만 광펄스 처리를 하지 않은 경우엔 변색되고 심한 이취가 발생하였으며, 육류의 경우에는 역시 광펄스 살균한 결과 2 log 정도 살균 효과가 있음을 보고하였음.

- 광펄스에 의한 식품 유래 병원성 세균의 불활성화에 관한 연구도 활발히 이루어지고 있는데, Rowan 등)은 High UV와 Low UV 의 처리 시 불활성화 정도를 비교함으로써 High UV 시 미생물의 불활성화 정도가 더 크다는 연구결과를 발표하였으며(Fig 2-7), Huffman 등은 다양한 세균 및 바이러스의 불활성화에 광펄스 처리가 효과가 있음을 밝혔음.

- Marquenie 등은 UV-C, heat과 함께 광펄스를 병합 처리함으로써 strawberry의 부패시기를 연장시키는 연구를 수행하였으며, 처리 결과 저장 기간이 2일 정도 늘어났다는 연구결과를 발표하였음.

- Turtoi 등은 paper-polyethylene packaging material의 표면에 존재하는 곰팡이 포자를 불활성화하는 대안으로 광펄스를 이용한 포장재 살균 처리 연구가 수행하였으며, 연구 결과 광펄스 처리는 곰팡이 포자의 불활성화에 매우 효과적이었고, 이로써 광펄스에 의한 packaging material 표면 살균 효과를 기대할 수 있게 되었음(Fig 2-8-9).

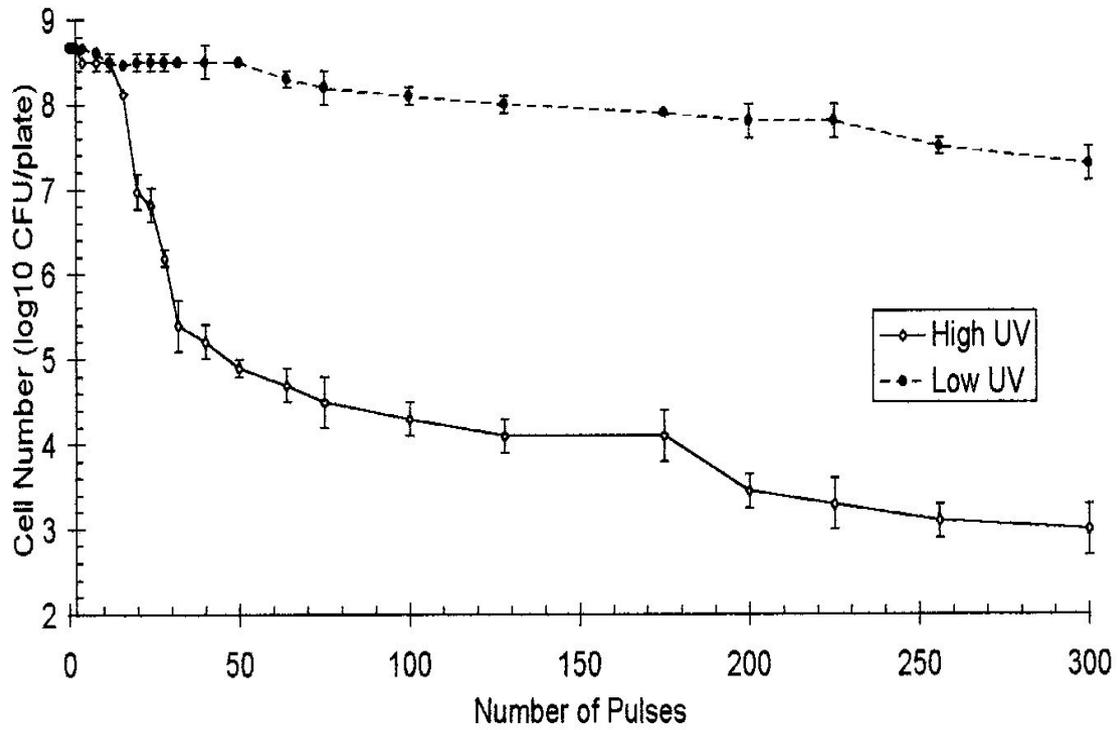


Fig. 2-7. Pulsed light inactivation of surface-inoculated *E. coli* using two light sources which contained either a low or high UV content.

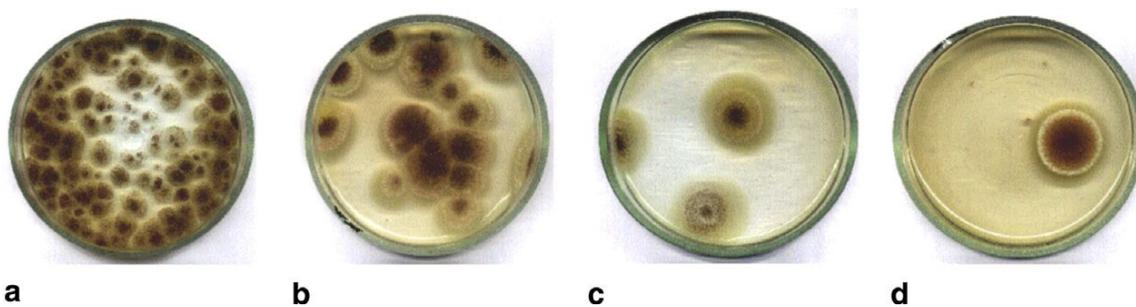


Fig. 2-8. Photos of glass Petri dishes containing colonies of *A. cinnamonomeus* generated by the ILP treatment surviving spores after (20×10^{-3}) s duration of treatment at different energetic densities:

(a) control sample; (b) 0.497 J/cm^2 (c) 0.716 J/cm^2 and (d) 0.977 J/cm^2 .

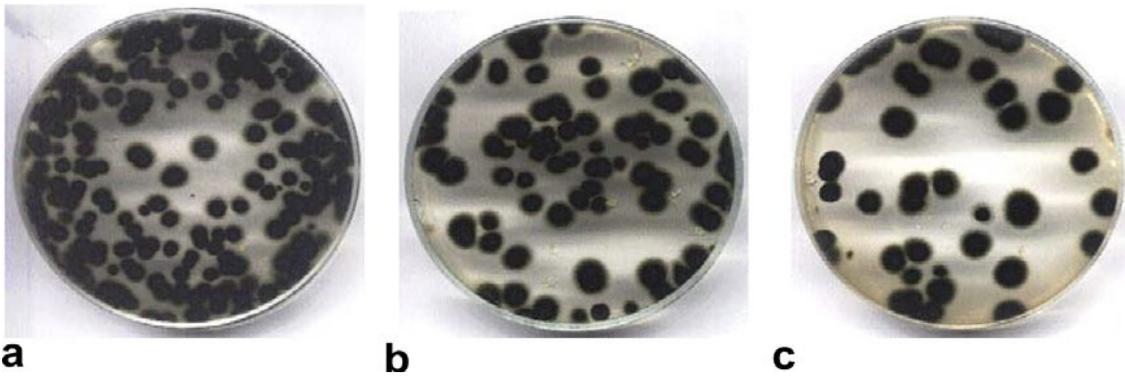


Fig. 2-9. Photos of glass Petri dishes containing colonies of *C. herbarum* generated by the ILP treatment surviving spores when treated at 0.497 J/cm² energetic density for different times:

(a) 10×10^{-3} s; (b) 20×10^{-3} s; and (c) 30×10^{-3} s.

- 미국의 PurePulse Technologies사는 광펄스 장치인 *PureBright*를 개발하여 이를 의약품, 의료기기, 포장재, 생수 등의 살균에 적용하고 있으며, 이 회사에서 개발된 장치에 의해 발생하는 펄스의 세기는 지구표면에 작용하는 태양광선에 비해 20,000배 정도가 되는 것으로 보고되고 있음.
- 또한 이 장치를 이용하여 다양한 종류의 세균(숙주세포 및 포자), 곰팡이, 바이러스 등 각종 미생물에 대한 살균효과를 광범위하게 고찰하고 있는 것으로 알려지고 있음.
- 이 장치는 여러 종류의 식품 및 포장재 살균에 적용하였는데, 일반적으로 토마토는 냉장보관을 해도 금방 물러지기 쉽지만, *PureBright* 장치를 적용한 후 냉장보관을 하였을 때 토마토가 30일 정도 신선하게 보관이 되었으며, 식빵의 포장지를 광펄스 살균한 후 사용하였을 경우에는 식빵이 2주 이상 신선한 상태를 유지하였으나, 광펄스 살균을 하지 않은 포장지에 넣은 식빵의 경우엔 같은 기간에 곰팡이가 많이 발생했다는 연구 결과를 발표하였음.
- 최근에는 이 장치를 의료기의 살균에 적용하고 있음(Fig 2-10).
- 미국의 Maxwell사는 *PureBright* system을 개발하여 pharmaceutical products의 살균에 이용하고 있으며, 독일의 *steribeam* system이 일부 상용화 되고 있음. (<http://www.steriberam.com>)
- Dunn 등은 다양한 빵류의 제품에 광펄스 살균을 적용하여 곰팡이를 효과적으로 살균함으로써 유통기한을 연장할 수 있다는 연구결과를 보고하였고, 새우를 광펄스 처리를 한 후 7일간 냉장 저장하였을 때는 양호한 상태를 유지하였으나, 광펄스 처리를 하지 않고 냉장 저장하였을 때는 변색, 이취 등이 발생하여 식용할 수 없는 상태가 된 것으로 보고하였음.
- Dunn 등은 또한 계육, 핫도그, 치즈 등 여러 종류의 식품에 존재하는 *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Listeria innocua*, *Salmonella*, *Pseudomonas* 등의 살균에 광펄스 기술을 적용하여 관능적 변화를 최소화하면서 효과적으로 유통기한을 연장할 수 있다는 연구결과를 발표하였음.



Fig. 2-10. IPL sterilization system for medicinal purpose

<http://www.pharmaceuticalonline.com/product.mvc/Sterilization-Technology-0001?VNETCOOK>

Sterilization Technology

The PureBright system from PurePulse Technologies, Inc. uses pulsed light sterilization technology and provides a method for terminal sterilization of pharmaceutical products on-line at production speeds.

The treatment time and design time of this system make the process amenable to high throughput and allow it to be integrated into packaging lines. The system consists of a lamp unit and a power unit, which generates high voltage/high current pulses used to energize the lamp unit. The lamp unit, which consists of one or more xenon gas lamps and reflectors, is no bigger than a small suitcase.

This system offers a real-time verification of process lethality which may ultimately satisfy pharmaceutical manufacturers' parametric release requirements, thus eliminating the warehousing of product pending confirmation of sterilization. A computerized data logger enables the system to monitor and document each light pulse. The system can be equipped with a feedback system to stop the line if proper treatment is not provided.

PurePulse Technologies, Inc., 4241 Ponderosa Ave., San Diego, CA, 92123-1506.
Tel: 619-496-4100; Fax: 619-576-1377.



- 미국 FDA에서는 광펄스 살균 기술의 사용 권고 기준을 마련해 놓았는데 (**Food and Drug Administration Issues Approval for Pulsed UV Light in the Production, Processing and Handling of Food [Code 21CFR179.41]**), 여러 문헌에서의 광펄스 살균 기술의 기준과 미국 FDA의 권고 기준의 차이는 다음 table 2-1과 같음.

Table 2-1. Properties of light source for food sterilization

	이론상 기준	FDA 권고 기준
wavelength	170 - 2600 nm	200 - 1000 nm
가해지는 에너지 밀도	0.01 - 50 J/cm ²	12 J/cm ² 이하
pulse range	1 μm - 0.1 s	2 ms 이하

* FDA의 권고 기준에는 기대하는 효과를 얻기 위해서 최소한의 pulsed light만을 사용해야 한다는 점도 명시되어 있음.

- 2000년 이후부터 광펄스의 미생물 사멸작용에 대한 mechanism을 규명하기 위하여 여러 연구팀들이 이에 대한 연구를 시작하였음.
- 초기에는 광펄스에 의한 미생물 사멸작용이 UV 파장에 속하는 광펄스에 의해 UV에 의한 살균효과와 동일한 것으로 판단하였음.
- 차후 다양한 실험에 의해 광펄스에 의한 사멸작용이 photothermal mechanism과 photochemical mechanism이 동시에 작용하여 나타난다고 보고 되었음.
- 그러나 광펄스에 의해 시료의 온도가 상승하지 않는 것으로 볼 때 photothermal mechanism에 대한 이견이 대두되어 현재까지도 정확한 사멸기구를 해명하지 못하고 있는 실정임.
- 광펄스 적용 시, DNA 상에서의 thymine dimer 생성, DNA single strand break에 의해 미생물이 사멸되는 것으로 현재 이론이 정립되고 있으며, 미생물 세포막의 파괴에 의해 세포 내용물이 유출되면서 미생물이 사멸되는 data도 보고되고 있음.
- 최근에는 photosensitizer를 사용하여 광펄스를 적용시켰을 때 미생물의 사멸율이 상승한다는 보고가 있어 photosensitization에 관한 연구가 대두되고 있음.

제2절. 국내·외 기술개발 현황에서 차지하는 위치

1. 국내·외 기술개발 현황의 분석 및 평가

- 앞서 살펴본 바와 같이 광펄스 기술은 식품의 이화학적, 관능적 변화를 최소화 하면서 식품에 존재하는 각종 위해 미생물을 효과적으로 살균함으로써 상업적 식품의 유통기한을 연장할 수 있는 획기적인 비가열 살균법인 것으로 판단됨.
- 특히, 광펄스를 이용한 살균에 관해 진행된 연구들을 검토해 볼 때, 식품 살균을 위한 광펄스의 적용 기술은 식품이나 의약품등의 표면 살균, 투명한 제품 그리고 포장재의 표면 살균에 특히 효과가 있는 것으로 보고되고 있음.
- 하지만 미국 등의 선진국에서조차 광펄스 기술의 상업적 적용이 아직까지 몇몇 식품에 한정되어 있는데 적용의 범위를 더욱 확대하기 위해서는 다음의 제한조건들에 대한 연구가 보다 깊이 이루어져야 할 것으로 사료됨.
- 광펄스의 성질(파장, 세기, 펄스의 길이 및 수 등), 포장재, 적용 식품의 특성(식품의 화학적 특성, 투명도, 색상 등), 액체식품의 경우 대상물의 깊이 등과 같은 주요 공정요소(critical process factors)들이 미생물의 불활성화에 어떻게 영향을 미치는지에 대한 연구가 필요함(12, 13).
- 표면이 울퉁불퉁하고 불투명한 고체 식품에 대해서는 살균효과가 다소 낮은 것으로 알려져 있는데 이에 적합한 광의 종류나 세기에 대한 보다 깊은 연구가 선행되어야 함.
- 전통적으로 사용되고 있는 254 nm 부근의 파장을 가진 자외선(UV) 살균과의 미생물 불활성화 측면에서의 차이점이 좀 더 명확히 밝혀져야 하고, 나아가 광펄스에 의한 미생물 불활성화 기작(mechanisms of microbial inactivation)에 대한 보다 심도 깊은 연구가 이루어져야 함.
- 국내·외 기술수준 비교표

구분	살균 시스템 (연속 처리 시스템)	위해 세균 저감화 연구	살균기작연구	산업적 적용
국내 (국내수준, %)	30	10	-	20
국외 (최고수준국가)	미국/독일	미국/일본	미국/일본	미국

2. 국내·외 기술개발 현황에서 차지하는 본 연구결과의 위치

- 국내·외 기술개발 현황의 분석 및 평가에서 언급한 바와 같이, 식품 살균을 위한 광펄스의 적용 기술은 뛰어나며, 식품이나 의약품등의 표면 살균, 투명한 제품 그리고 포장재의 표면 살균에 특히 효과가 있는 것으로 보고되고 있음.
- 그러나 아직 연구의 범위와 활용정도가 미미한 실정으로 앞으로 더욱 많은 연구가 선행되어야 할 것임.
- 위해 세균 저감화 연구 및 살균 기작 연구에 대한 국내·외 기술개발 현황의 경우, 대부분 국외에서 연구가 진행되었으며, 광펄스 살균에 대한 약 20여 편의 논문이 발표되고 있음. 발표된 논문에서는 병원성 미생물에 대한 살균효과가 일부 이루어지고 있으며, 일반적인 미생물(yeast)에 대한 살균효과 연구가 이루어지고 있음.
- 본 과제의 수행을 통해, 비가열 가공기술의 하나인 광펄스 기술을 이용하여 연어, 우럭, 광어, 새우 등 각종 생·어육식품의 유통과정에서 문제시 되고 있는 대표적인 식중독 원인균 및 부패 원인균인 *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *B. cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*에 대한 살균효과를 확인하고 기초 data를 확립하였음.
- 또한, 각종 수산식품의 저장 및 유통기한 연장에 대한 광펄스 처리의 효과 및 광펄스가 미생물을 사멸시키는 기작(mechanism)을 분자생물학적, 생리학적 측면에서 규명함으로써 광펄스 기술을 수산식품의 살균공정에 적용시킬 수 있는 이론적 배경을 확립함으로써 본 기술의 위치를 국제적 수준으로 향상시킴.

- 살균 시스템 또는 연속처리 시스템에 대한 국내·외 기술개발 현황의 경우, 국내의 연구개발 사례는 없었으며, 대부분 국외에서 연구가 진행되었음. 1997년 미국 Purepulse사에서 물의 살균에 연속식 처리시스템에 대한 개념도와 bench scale의 시스템이 설치된 것으로 보고되었으나, 그 후 실제 시스템에 대한 설명이 이루어진 적은 없으며, 현재 Maxwell사에서 PureBright 시스템이란 광펄스 살균장치를 pharmaceutical 제품살균에 응용한 batch system을 상용화하였음.
- 또한, 광펄스 살균에 대한 외국의 논문을 보면, 현재 대부분의 광펄스 살균 장치는 bench scale로서 그 살균 실험이 이루어지고 있는 것으로 보아, 외국의 경우도 연속식 시스템이나 대용량의 처리 시스템을 갖추고 있는 곳은 많지 않은 것으로 보임.
- 본 과제의 수행을 통해 획득된 연구결과를 바탕으로, 실제 생·어육식품의 살균에 광펄스 기술을 적용하여 살균효과를 확인한 후 광펄스 처리장치의 set-up 및 연속처리라인의 개발을 통하여 실제 산업화 공정에 적용하기 위한 토대를 마련하였음.
- 특히 본 연구에서는 수산식품의 살균에 광펄스 기술을 적용하는데 있어 광펄스의 성질(파장, 세기, 펄스의 길이 및 수 등), 포장재, 적용식품의 특성(식품의 화학적 특성, 투명도, 색상 등) 등과 같은 주요 공정요소(critical process factors)들에 대한 보다 specific한 결과를 도출함으로써 광펄스 연속처리 시스템의 개발이 산업적으로 가능하게 되어 본 기술의 위치를 국제적 수준으로 향상시킴.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 문헌 고찰

- 광펄스 기술은 UV(ultraviolet)부터 근적외선(near infrared)부분까지의 넓은 범위의 빛을 짧은 시간동안 강하게 조사하여 식품의 표면에 존재하는 미생물을 사멸시킴으로서 보존기간을 늘리는 기술로, 'intense pulsed-light, IPL', 'pulsed white light, WHL', 'high intensity broad-spectrum pulse light', 'pulsed UV light', 'pulse light' 등의 여러 가지 이름으로 불리우고 있음.
- IPL 시스템의 개략도는 Fig. 3-1과 같음
- 장치의 전체적인 개념은 PEF 시스템과 비슷하여, 고전압을 발생시킬 수 있는 전원 장치, 전기 에너지를 저장할 수 있는 축전지, 그리고 기체로 충전되어 있는 lamp로 구성되어 있음
- PEF와 시스템과 다른 것은 전극 대신 lamp가 연결되어 있음
- IPL 장치의 작동 원리는 DC의 전원 장치에 발생된 전기 에너지는 축전지에 축전되고 일정량의 전원이 지속적으로 램프에 흐르고, Xeon과 같은 불활성 가스가 충전되어 있는 램프에는 trigger 전원이 연결되어 있음
- Trigger 전원이 아주 짧은 시간(수 μ s)동안 램프에 인가가 되면 일정량의 전원에 의해 약간의 여기 상태에 있던 가스는 순간적으로 크게 발광을 하면서 강한 빛을 발생하게 됨

1. 사멸기작

- 현재 광펄스 처리에 가장 많이 쓰이는 램프는 xenon flash lamp로 미생물의 불활성화에 가장 중요한 부분은 UV-C part임
- Rowan 등은 식품과 밀접한 미생물(*Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aureginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*)의 불활성화에 대해서 보고하였는데 pulsed UV flash 처리의 경우에는 약 5~6 log의 사멸 효과를 보였으나, UV light에 의해서는 1-2 log 정도의 사멸효과만을 나타내었음

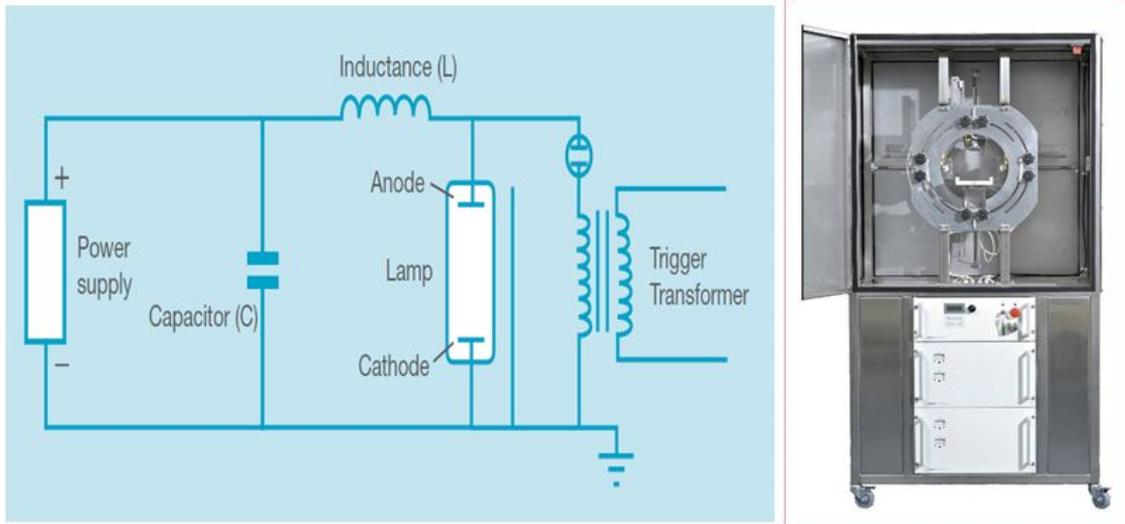


Fig. 3-1. Schematic diagram and photograph of Intense pulse light system

- 단색화장기(monochromator)를 사용한 Wang등의 실험에 의하면 *E. coli*의 불활성화에 효과가 높은 파장은 230~360 nm로 측정되었는데 270 nm 부근에서 최대 사멸율을 보였으며, 300 nm 이상에서는 별 효과가 없었음
- 광펄스에 의한 미생물의 살균 작용은 photothermal 또는 photochemical 효과에 의한 것으로 어느 하나에 의한 것이라기 보다는 두 효과가 함께 영향을 미치는데, 많은 연구자들은 주된 살균 기작을 photochemical 효과에 의한 것으로 보고하고 있으며, 일부의 실험 결과에 의하면 IPL 처리시 온도 상승은 1°C 미만으로 photothermal 효과는 거의 없는 것으로 나타났음
- IPL에 의한 미생물의 사멸은 CW UV에 의한 미생물 사멸처럼 pyrimidine dimers의 형성에 의한 세포 복제 저해, photoproduct의 형성에 의한 single strand와 double strand의 파괴, cyclobutane dimer의 형성등에 의한 것으로 보고되고 있음
- Photothermal 효과를 주장하는 연구결과도 있는데 Hiramoto나 Dunn 등은 미생물이 열을 흡수하여 사멸하게 되고, 식품의 표면층이 광펄스의 에너지를 흡수하여 식품 내의 미생물을 사멸시킨다고 보고하였으나, 이 에너지의 양이 식품 전체를 가열시킬 정도의 열은 아니라고 하였음
- Wekhof과 Wekhof등은 램프로부터의 나오는 에너지가 0.5 J/cm²를 넘을 경우, 세포의 변형과 파괴를 일으키는 열 사멸 효과를 보인다고 하였으며, Photochemical, Photothermal 효과 이외에 DNA의 구조 변화, 세포막의 손상 등도 사멸 기작으로 보고되고 있음

2. IPL처리의 영향 요인

- IPL의 처리시 미생물의 사멸에 영향을 미치는 요인은 램프로부터 나오는 빛의 세기, 빛에 대한 민감성, 램프와 시료사이의 거리, 빛의 전달 매체등임
- IPL 처리시 시료가 광원으로부터의 거리가 가까울수록 그 효과는 더욱 커짐
- 시료의 두께도 사멸 효과에 영향을 미치는데, 시료의 두께가 두꺼울수록 효과가 감소하게 되는데 이는 UV의 투과성에 제한이 따르기 때문이며, 특히 불투명한 시료일 경우 그 효과는 더욱 감소하게 됨
- IPL 처리가 빛에 의해 미생물의 사멸시키는 방법이기 때문에 그림자 효과(shadow effect)도 미생물의 사멸에 크게 영향을 미치는데, 즉 미생물의 접촉

량이 많아져서 중층이 될 경우 그 효과는 크게 떨어지게 됨

- 식품의 성분 조성도 사멸효과에 큰 영향을 미치게 되는데, Gómez-López 등은 여러 식품 성분을 포함하는 한천 배지에 *Photobacterium phosphoreum*, *L. monocytogenes*, *Candida lambica* 등을 도말하여 처리하였는데, 단백질이나 지방이 첨가되었을 경우 사멸 효과가 감소하고, 반면에 물이나 전분이 추가된 배지에서의 사멸효과는 큰 영향을 받지 않았음

3. 미생물의 사멸 효과

- 광펄스에 의한 미생물의 사멸효과에 대한 보고는 많지는 않으나 최근들어 연구가 활발히 진행되고 있음
- MacGregor 등은 *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*에 512 μ s, 380 kW/cm²의 에너지를 가하였을 경우 약 6~7 log의 사멸 효과를 얻었으며, Krishnamurthy 등도 완충용액이나 평판 배지 상에서 *S. aureus*에 IPL처리를 5초동안 하였을 경우 약 7~8 log 사멸시킬 수 있다고 보고하였음
- Fine과 Gervais는 glass bead와 quartz plates에 접종한 *S. cerevisiae*를 IPL 처리 하였을 경우 약 7 log 정도의 사멸율을 얻을 수 있음을 보고하였으며, Cho 등은 *L. plantarum*, *L. brevis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus pentosaceus*와 같은 유산균에 IPL 처리를 하여 각 7 log 이상의 사멸율을 얻었다고 보고하였음
- 액체 시료에 대한 IPL 처리의 미생물 사멸 효과를 보면, *Klebsiella*는 약 7 log, 바이러스나 *Cryptosporidium parvum*은 약 4 log 정도의 사멸 효과를 보이는 것으로 보고하였으며, Ghasemi 등은 *E. coli*와 *Salmonella*를 액체에 현탁하여 약 900 J의 에너지를 가하여 9 log의 사멸율을 얻을 수 있다고 보고하였음
- 광펄스 처리와 다른 처리방법과의 병합처리에 의한 사멸 효과에 대한 연구 결과도 일부 보고가 되고 있는데, MacDonald 등은 *Bacillus* spore에 pulsed UV light과 hydrogen peroxide를 병합 처리하여 pulsed UV light 단독 처리 시보다 2 log 이상 사멸 상승 효과를 얻었다고 보고하였음

4. 식품에의 적용

- 광펄스 처리의 식품 적용 사례로 가장 많이 연구되고 있는 것이 과일 및 야

채류에 존재하는 미생물을 사멸시키는 것임

- Hoornstra 등은 배추, 부추, 파프리카, 당근, 케일등의 야채에 0.6 J/cm²의 IPL 처리를 한 결과 1.6~2.6 log CFU/cm²의 미생물수를 감소시켰으며, 각 야채의 관능적 품질에는 큰 영향을 주지 않고, 7℃와 20℃의 온도에서 7일 이상을 유지하였다고 보고하였음
- Marquenie 등은 딸기와 체리같은 과일류에 존재하는 곰팡이인 *B. cinerea*와 *M. fructigena*에 IPL 처리를 하여 최대 3~4 log 감소되었으며, 역시 딸기의 품질에는 아무런 영향을 주지 않았다고 보고하였음
- 광펄스 처리가 분말 식품이나 종자의 오염을 처리하는 기술로서의 적용도 연구가 되고 있는데, Choi 등은 분말 이유식에 *Listeria monocytogenes*, *Enterobacter sakazakii*를 접종하여 IPL 처리한 결과 각각 4 log, 5 log 이상의 사멸효과를 보이는 것으로 보고하였으며, Jun 등은 옥수수에 접종한 *A. niger* 포자를 처리하여 약 5 log, Fine and Gervais는 밀가루와 후추의 *S. cerevisiae*를 처리하여 1 log 정도의 사멸 효과를 거두었다고 보고하였음
- 또 다른 적용분야로서 최근 수산물의 오염균을 저감하는 기술 개발이 이루어지고 있는데, Shin 등은 연어, 광어, 새우등에 *E. coli*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*등을 접종해서 IPL을 처리했을 경우 1~3.5 log 정도 사멸하는 결과는 얻었으며, Ozer과 Demrci도 연어의 *L. monocytogenes*가 0.86~1.09 log 정도 사멸한다고 보고하였음
- 이 이외에도 육류, 치즈, 케익, 새우등에 적용하는 연구사례가 보고되고 있음

제 2 절 회분식 및 연속식 처리를 위한 광펄스 살균 시스템 개발

1. 광펄스 전원 발생 장치 및 광원

가. Pilot 용량의 광펄스 전원 발생 장치

- 처음 실험을 위해 구성한 광펄스 발생 시스템은 실험실용 및 Pilot 용량으로 모두 사용할 수 있는 장치로 대형의 실험 장치였음
- 실험장치의 전체적인 시스템은 전원 공급부(power supply), 펄스 발생기(pulse generator), 펄스 변압기(transformer), 광원(light source) 그리고 처리용기(treatment chamber)로 구성되어 있음(Fig. 3-2)
- 전원 공급부는 220V AC의 입력 전원을 고전압 변압기를 통하여 승압하고 DC로 정류하여 최대 50 kV DC 전원을 발생시킬 수 있도록 하였으며, 최대 허용치 전력은 50 kW임
- 펄스 발생기는 광원에 펄스를 구성시킬 수 있는 펄스 발생망(pulse forming network, PFN)과 고전압의 전기를 순간적으로 방전시킬 수 있는 스위치로 구성되어 있음
- 펄스 발생망은 광원에 인가되는 펄스의 형태와 길이를 결정하는 중요한 부분으로서 전원 공급부에서 공급된 전원을 충전하고 펄스의 상승시간(rising time)을 결정하는 축전지(capacitor, 1800 pF/each), 펄스의 길이와 하강시간(falling time)을 조절하는 방전 지연 유도기(discharge delay inductor, 2 μ H~20 μ H)로 되어 있으며, exponential decay pulse와 square wave pulse를 발생시킬 수 있도록 구성됨(Fig. 3-3, Fig. 3-4)
- 충전방식은 resonance charging을 택하였으며, 축전지에 충전된 고전압의 power를 순간적으로 방전하는 switch로는 열음극방전관(thyratron, 50 kV, 2500A)을 사용하였으며, 방전시에 발생하는 열을 방지하기 위하여 cooling device를 사용하여 열을 방출하였음

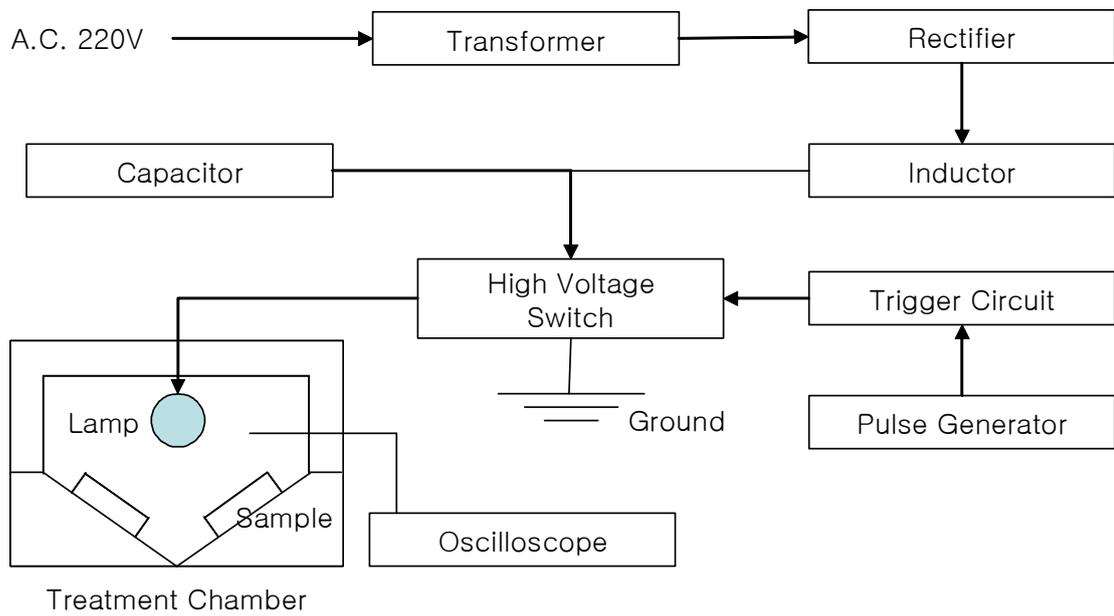


Fig. 3-2. Schematic diagram of high-intensity pulsed light system

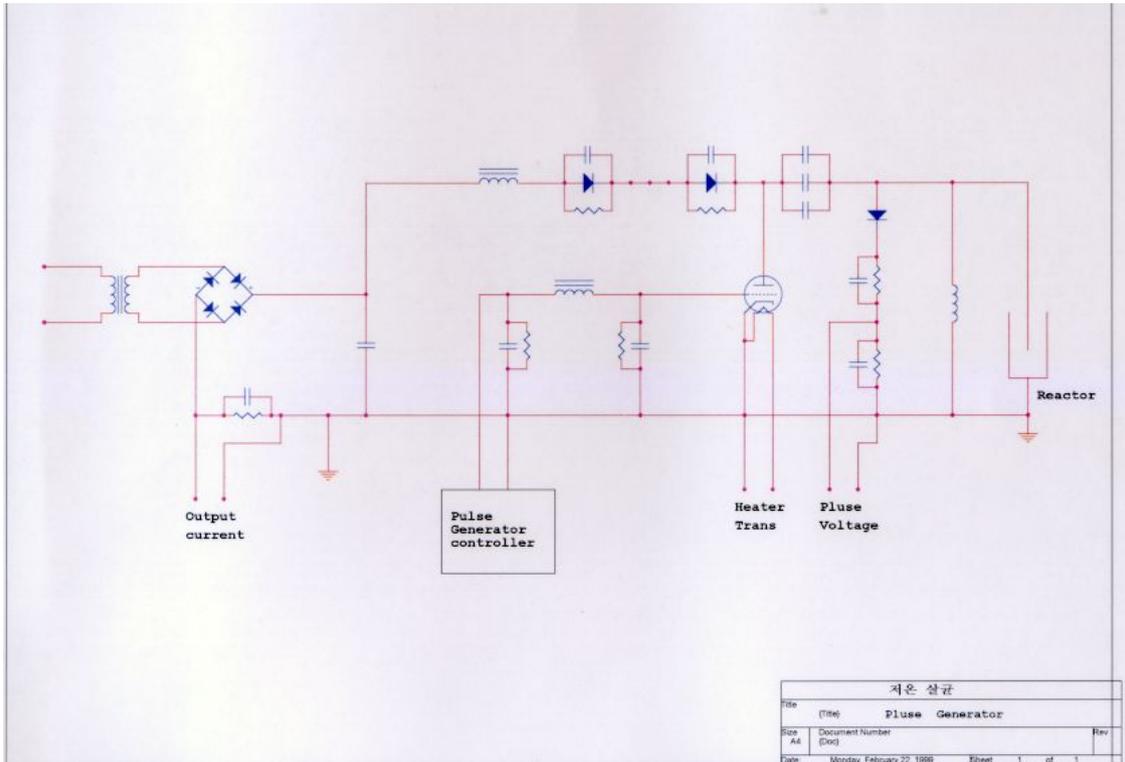


Fig. 3-3. Circuit diagram of pulse generator

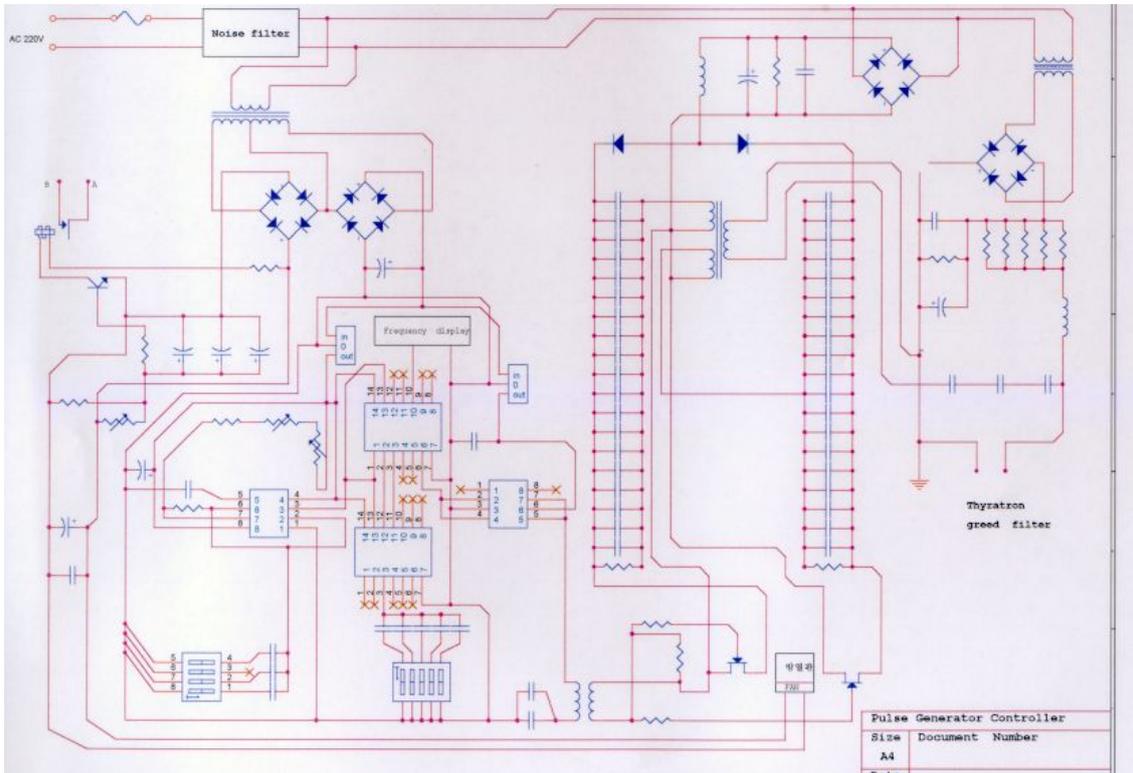


Fig. 3-4. Circuit diagram of pulse generator controller

- 축전지는 corona와 arching을 방지하기 위하여 절연유(제 1 종 silicon oil)에 담았음
- 펄스 변압기는 펄스의 폭은 0.5~8 μ s까지 쉽게 가변할 수 있도록 제작된 것으로 입력부는 0~50 kV, 출력부는 0~100 kV, 최대 에너지 60 J, 펄스상승시간이 4 ns/kV가 되도록 하였음(Fig. 3-5~6)
- 광펄스 처리를 위한 광원은 59 kPa의 압력으로 xenon을 충전한 quartz 재질의 Heraus Noble light XAP series (type NL 4006, Heraeus, UK)를 사용하였음(Fig. 3-7).
- 전원 장치로부터 나오는 전원의 강도와 램프에 인가되는 전압의 세기, 펄스의 길이(pulse duration)를 측정하기 위하여 Oscilloscope(Tektronix)와 high voltage probe를 사용하였음
- 처리 용기는 회분식 처리를 위하여 1개의 램프를 연결하고 시료와의 거리를 조절할 수 있도록 제작하였음(Fig. 3-8)

나. 광원의 동작 (Pulsed Lamp Operation)

- 광펄스 처리 장치에 사용되는 광원은 대부분 Xenon 가스 또는 Krypton 가스가 고압으로 충전되어 있는 Quartz 재질의 Lamp를 사용하고 있음
- 본 실험에 사용된 광원은 Xenon XAP series의 flash lamp는 xenon gas로 충전되어 있어 lamp로부터 빛을 이끌어내기 위해서는 xenon gas를 여기(excitation)시켜 plasma를 형성시켜야 함.
- Xenon gas를 여기시키기 위한 최소 전압은 16 kV이며, 상시적으로 600~2100V의 전압이 공급되어야 함.

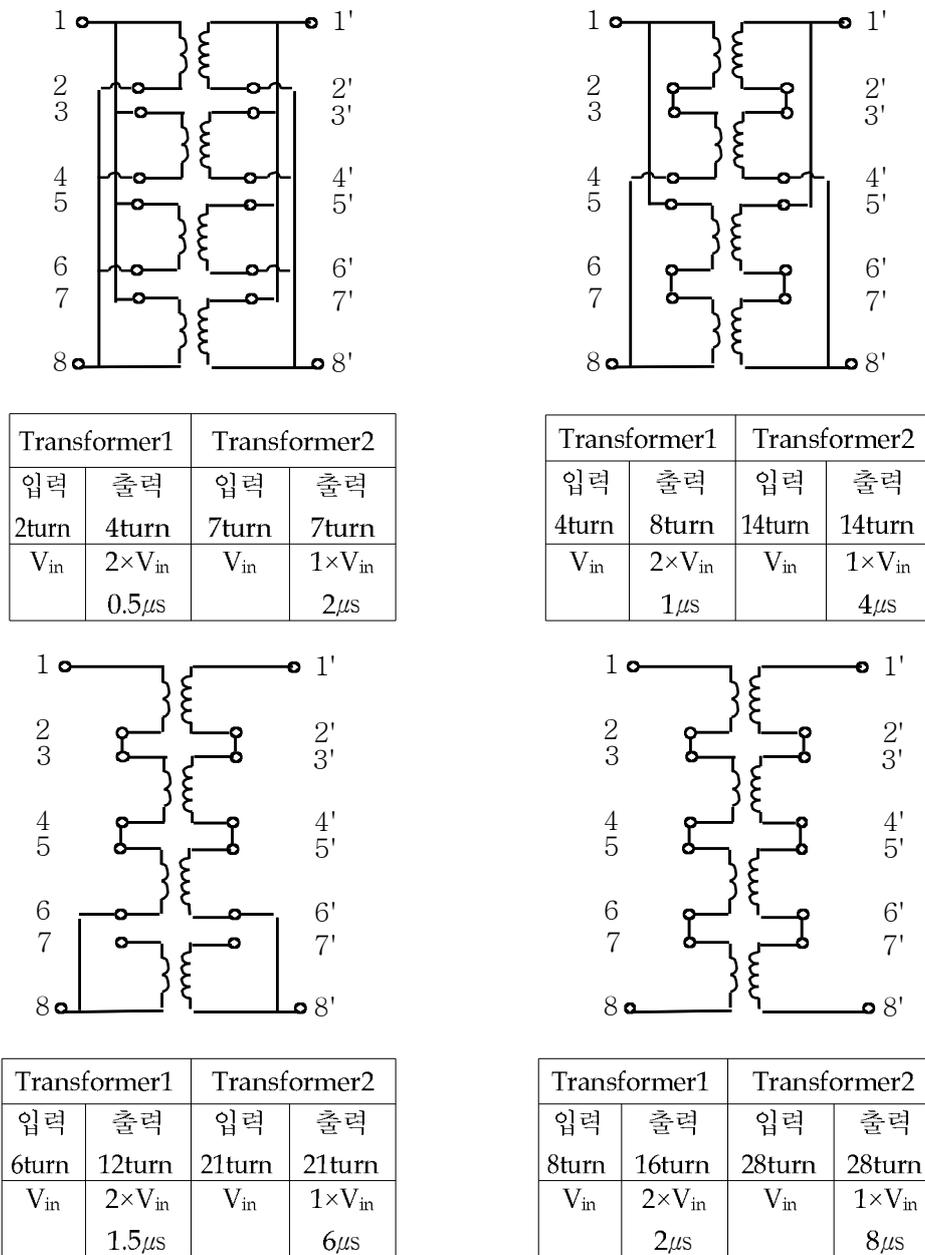


Fig. 3-5. Circuit diagram of Pulse transformer

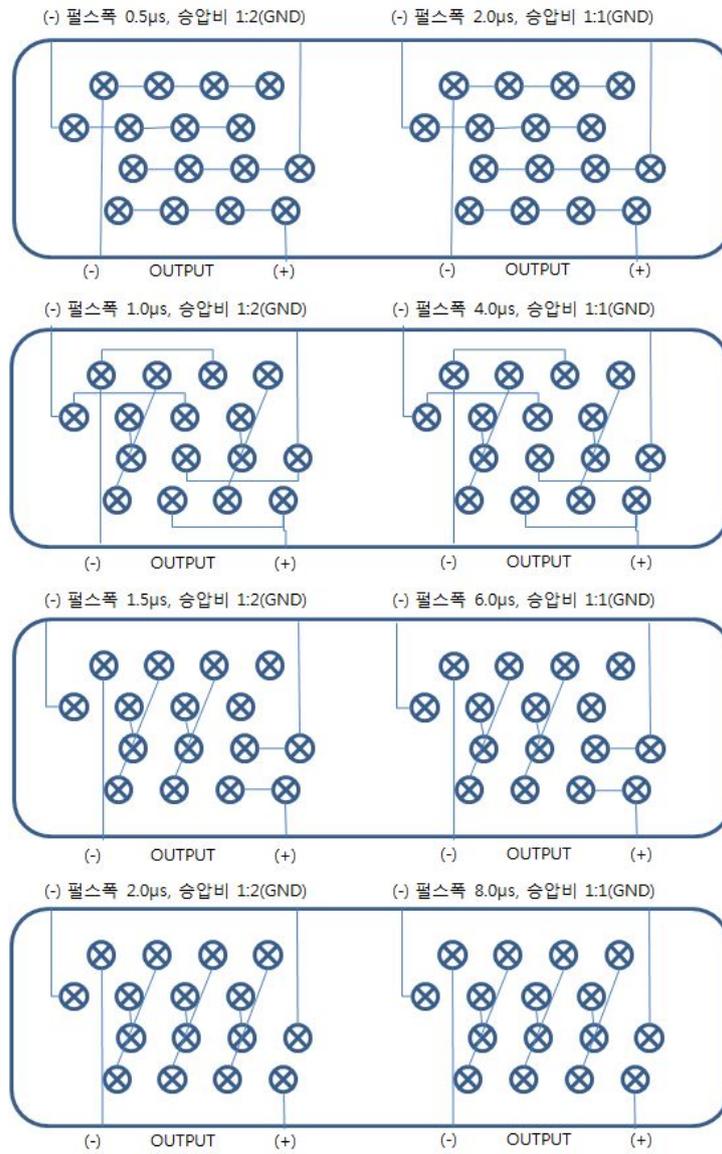


Fig. 3-6. Wiring diagram of pulse transformer



Fig. 3-7. Light source for high-intensity pulsed light treatment system

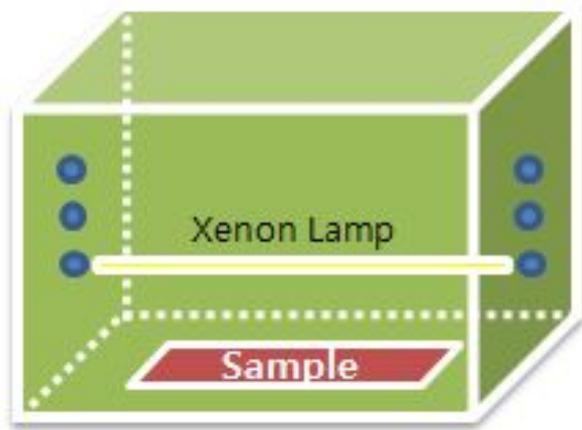


Fig. 3-8. Batch treatment chamber of batch system for high-intensity pulsed light treatment system

- Lamp의 동작을 위한 사양은 Table 3-1과 같음
- Xenon lamp를 사용하기 위해서는 램프에 충전되어 있는 xenon gas를 여기시켜 플라즈마를 발생시켜 다량의 빛이 발광될 수 있는 여건을 만들어주어야 하며, 램프를 여기시키기 위한 램프의 연결 방법에는 몇 가지가 있음
- 1차년도 연구에 사용된 xenon 램프의 여기 방법은 simple pulsed lamp driving circuit 방식으로서 램프에 직접적으로 고전압을 가하여 gas를 여기시켜 발광시키는 방법으로 이 방법은 램프로부터 발생하는 빛의 강도는 약하나 에너지 밀도가 낮아 발열이 거의 없어 수산물이나 기타 열에 민감한 식품의 표면 처리에 적합한 방법임(Fig. 3.9-11)
- 그러나 이 방법은 높은 전압을 상시적으로 공급하여야 하기 때문에 고전압을 발생시킬 수 있는 전원 공급 장치가 필요하고, 펄스를 발생시킬 수 있는 펄스 발생망을 구성해야 하기 때문에 장치의 규모가 크게 되고, 장비의 제작에 비용이 많이 드는 단점이 있음

Table 3-1. Description of Air cooled Xenon Flash Lamp

Description of Xenon Lamp NL4006

Envelope	cqp	Impedance parameter(Ko)	32.0
Wall	1	Explosion const. (Ke)	5.40E+04
		Maximum average power	1414
Bore	3	Max peak current(A)	283
Arc	75	Lamp voltage min.(V)	600
		Lamp voltage max.(V)	2100
Gas type	Xe	Minimum trigger voltage(kV)	16
Pressure(torr)	450	Minimum trigger width(μ s)	0.60

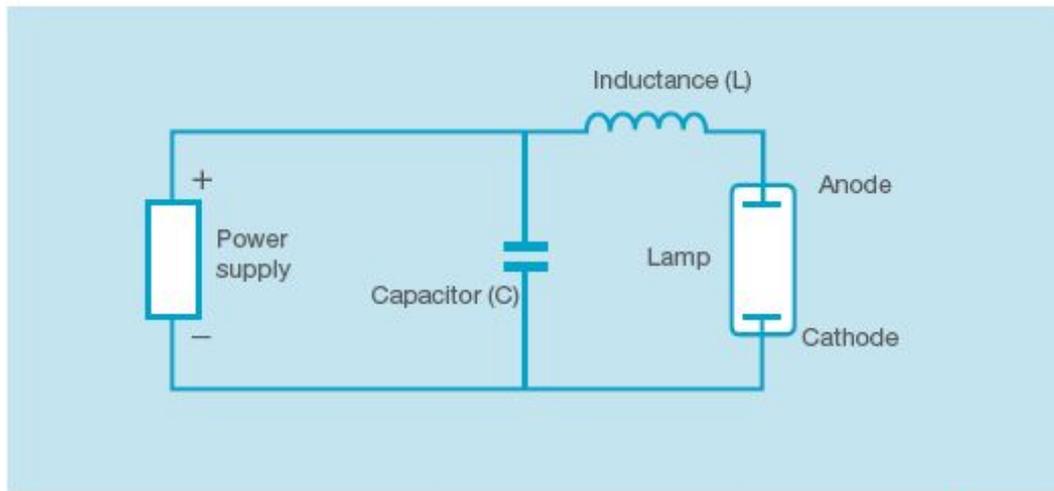


Fig. 3-9. Simple pulsed lamp driving circuit

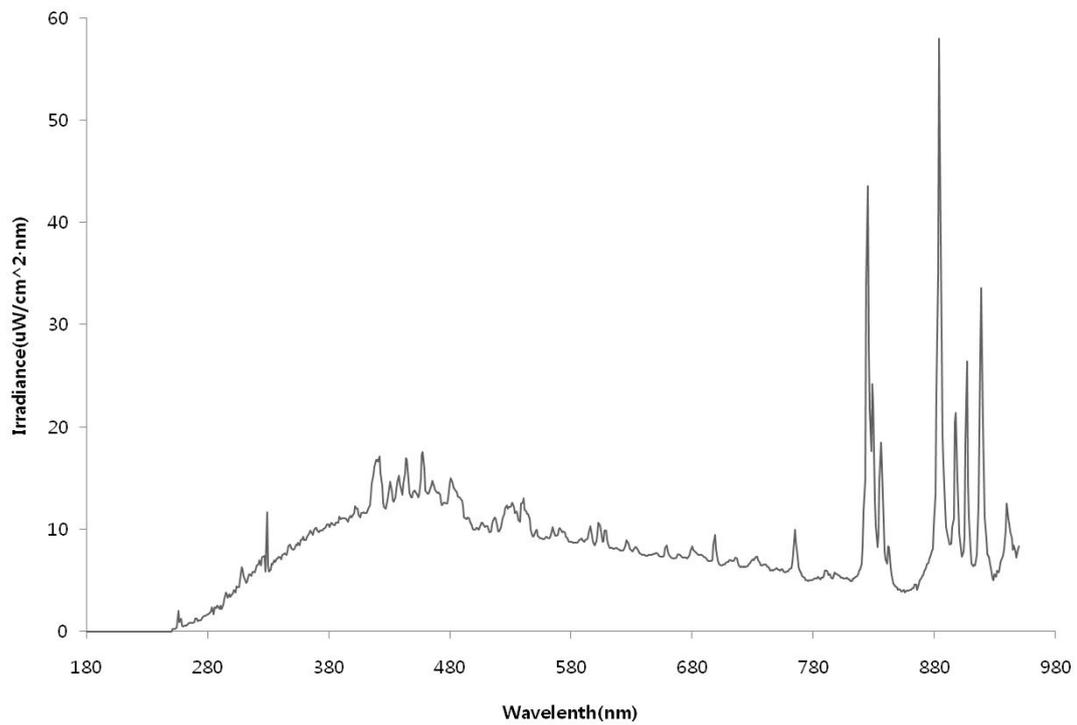


Fig. 3-10. Energy density profile of xenon lamp by high-intensity pulsed light system

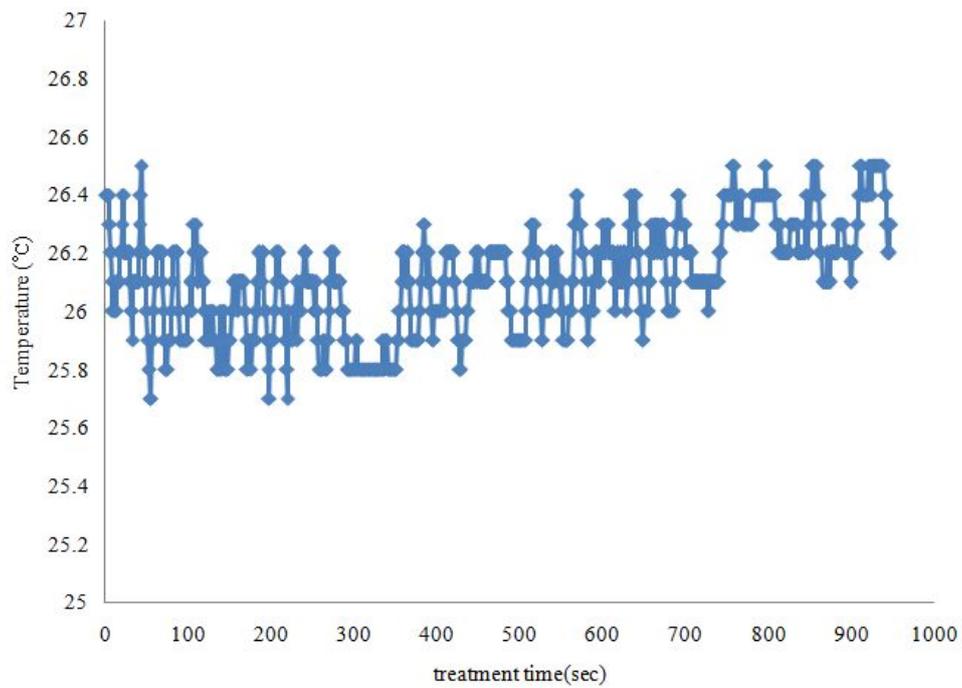


Fig. 3-11. Changes pattern of surface temperature on treatment agar plate.

2. 소형화 경량 광펄스 전원 발생 장치

- 기존에 대부분 사용하던 광펄스 발생 장치는 고전압 펄스 전기장(high voltage pulsed electric fields, PEF)을 이용한 전원장치를 사용하고 있으며, 주요 구성은 고전압 전원 발생장치, 펄스 발생망, 램프, 처리용기로 구성되어 있음
- 이러한 기존의 PEF 전원 발생장치를 활용한 광펄스 시스템은 광원(xenon lamp)에 직접적으로 고전압의 전원을 가하여 발광을 일으키는 방식으로 항시적으로 높은 전압을 lamp에 가해야하기 때문에 고용량의 전원 발생 장치를 필요로 하며, 고용량의 전원 발생 장치는 장치가 고가이며, 규모가 크기 때문에 제작 및 설치에 큰 어려움이 있음
- 또한 직접적으로 램프에 고전압을 인가하는 방식은 많은 전력을 필요로 하며, 높은 전압으로 인해 램프에 직접적 충격을 가하게 되어 램프의 수명이 줄어들게 됨
- 실제 중소기업이나 소규모의 농가 또는 업체에서 손쉽게 광펄스 살균 장치를 구입하여 사용하기 위해서는 장치를 소형화해야 하며, 짧은 lamp의 수명을 늘릴 수 있는 방안을 찾아야 함
- 이러한 단점을 없애기 위해서는 램프에 직접적으로 고전압을 인가하는 방식을 피하고 저전압의 전압을 램프에 인가하고 고전압의 전력을 외부에서 램프에 가하여 triggering 하는 방식을 택해야 함
- 광을 발생시키기 위한 triggering 방식에는 series triggering circuit, parallel triggering circuit, external triggering circuit이 있음(Fig. 3.12)
- 전압을 램프에 직접 인가하는 방식이 아닌 triggering 하는 방식을 적용하기 위해서는 저전압의 전력을 상시 공급할 수 있는 전원장치와 고전압의 trigger 전원을 발생시킬 수 있는 전원 장치를 필요로 하게 됨

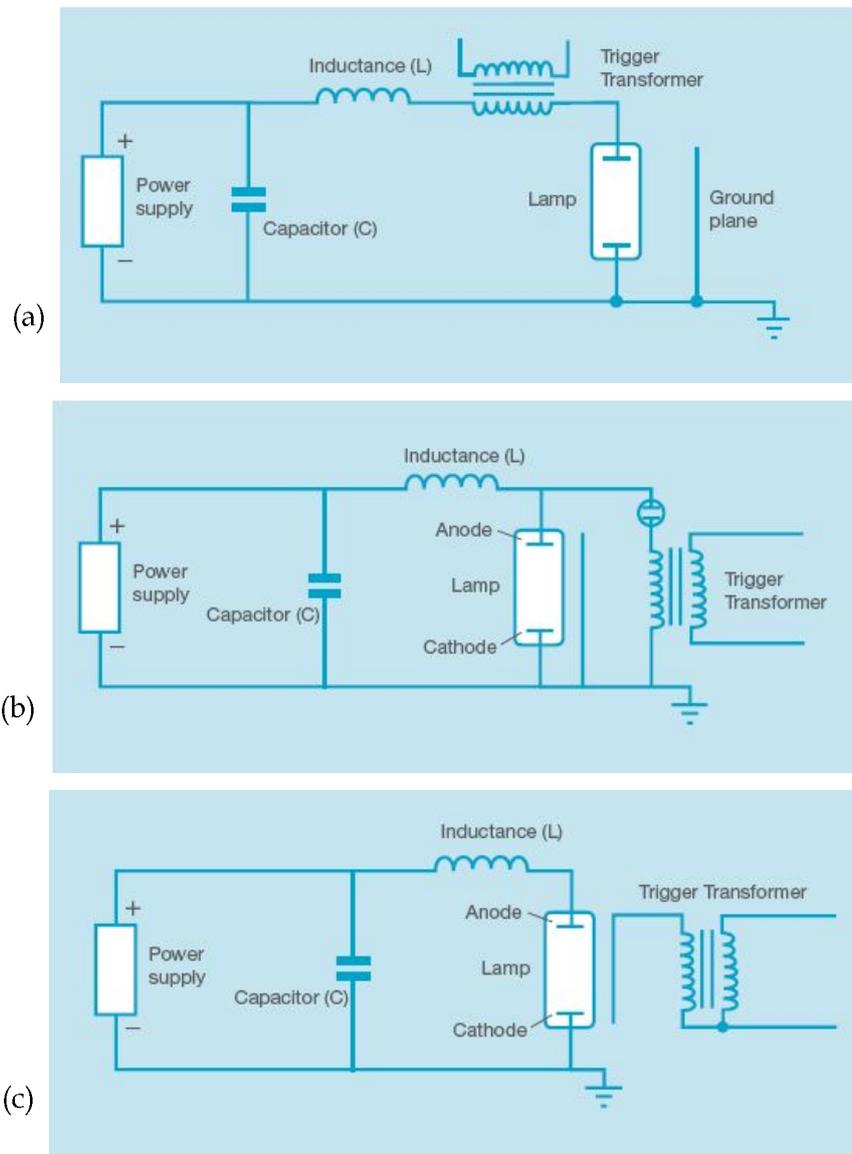


Fig. 3-12. Various Diagram of triggering methods

(a) Series triggering circuit , (b) Parallel triggering circuit, (c) External triggering circuit

- 본 연구에서는 장치의 소형화 및 제작 비용의 절감을 위해 위의 3가지 방식 중에 external triggering 방식을 이용하여 보다 높은 에너지 밀도를 갖는 발광 방식에 대한 연구를 진행하였음
- 이 장치의 개략도는 Fig. 3-13, 장치는 Fig. 3-14와 같음
- 이 장치의 사양을 보면 사용전원은 일반 중소기업이나 소규모의 생산 공장에서도 쉽게 사용할 수 있도록 AC 220V 50/60Hz 단상의 전원을 사용하였으며, 소비전력은 약 1.2 kW로 설계하였음
- 출력부는 DC 전원으로 0 ~ 1200 V의 상시 전압을 출력할 수 있도록 하였으며, 전류는 안전을 고려하여 1A 미만이 되도록 하였음
- 사용가능한 주파수(Hz)는 1~50 Hz로 설정하였으며, duty비는 135 ~ 233 μ s로 총 8 단계로 나누어 사용할 수 있도록 하였으며, 1회 operation 할 수 있는 시간은 최대 60분으로 설정하여 장치에 무리가 가지 않도록 하였음
- 여기된 램프를 발광시키기 위한 trigger 전원은 15~20 kV의 고정 펄스 전압을 사용하였음
- 장치 설계에 사용된 duty table은 table 3-2와 같음
- Display를 위한 window는 frequency, duty, time을 표시하도록 하였으며, control button은 safety switch, main power, setup, memory, upper, low button등으로 구성하였음
- 이렇게 제작된 소형화 전원 발생 장치는 기존에 사용되었던 장비에 비해 그 크기에 있어서는 1/20정도로 줄어들어 작은 공간에도 설치가 가능하게 되었으며, 손쉬운 이동성을 제공할 수 있음
- 장치의 제작 비용에 있어서는 기존의 장비에 비하여 1/10~1/5정도의 비용으로 제작을 할 수 있도록 하여 기업의 입장에서 현장에 설치하는데 있어 부담을 크게 줄일 수 있도록 하였음

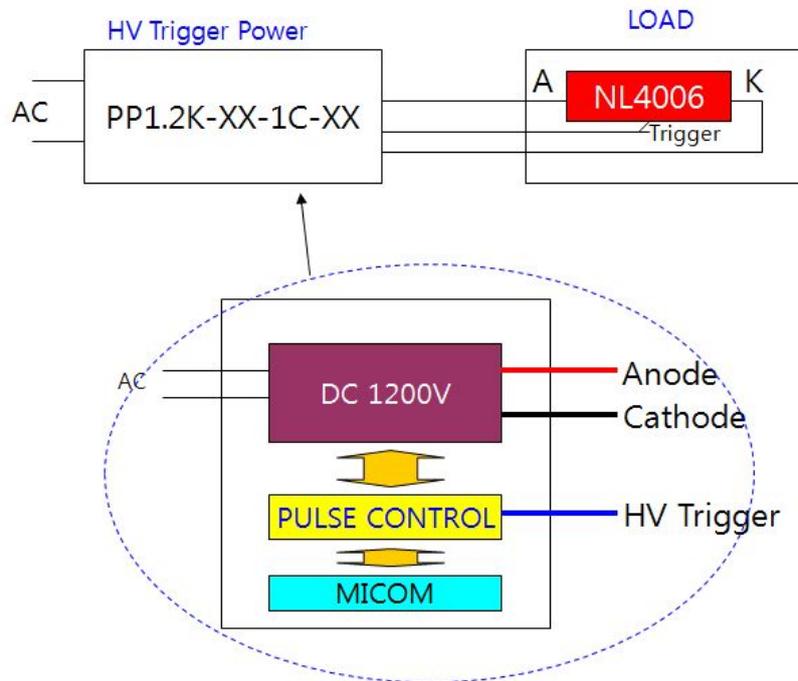


Fig. 3-13. Schematic diagram of compact intense pulsed light system



Fig. 3-14. Photograph of compact intense pulsed light power supply

Table 3-2. Duty table of compact IPL system

step	capacitor tap (μF)	Pulse width (μs)
1	2.2	135.1
2	2.8	152.4
3	3.3	165.4
4	4.4	191.0
5	5.0	203.6
6	5.5	213.5
7	6.1	224.9
8	6.6	233.9

$$\text{DUTY (t)} = \frac{1}{\frac{1}{2\pi\sqrt{LC}}} \quad (\mu\text{s})$$

3. 처리 용기의 설계 및 제작

- 처리 용기는 광펄스 처리 중 식품이 실제로 빛을 받아 처리 받는 부분으로서 균일한 빛을 조사할 수 있도록 설계되어야 하며, 빛의 왜곡 현상을 막도록 설계가 되어야 하고, 또한 직접 연결 방식이든 trigger 방식 모두에서 고전압이 인가되므로 안전성이 확보되어야 함
- 광펄스의 처리 용기는 회분식과 연속식 두 가지 종류로 구성될 수 있으며, 각각의 형태는 크게 다르지 않음
- 회분식의 경우에는 일반적으로 처리 시료가 직접적으로 광원으로부터 빛을 조사받기 위하여 처리 용기 상단에 위치하는 경우가 많으며, 처리 받는 시료의 수는 광원과 동일한 거리에 시료가 위치할 수 있도록 사선의 형태로 2개를 놓는 방식이 많이 사용되었으나 본 실험에서는 한번에 하나의 시료가 처리 될 수 있는 방식을 택하였음
- 그러나 처리 용기의 상단부 광원을 위치하도록 하여 처리 할 경우 처리 시료의 상단부는 처리를 받을 수 있으나 하단부는 처리를 받지 못하여 시료가 균일하게 광원에 노출되지 않아 시료의 처리가 불완전해지는 현상을 보였음
- 이러한 결과로 수산물의 표면 살균 처리와 수산물을 전체 처리하였을 경우에는 전체 시료를 처리하여 미생물의 사멸율보다 표면 처리시 살균율이 높게 나타나는 현상을 보여 이는 연속 라인 설계시에 반드시 해결해야 할 문제점으로 보였음
- 최근에는 이러한 회분식 처리 용기의 단점을 보완하기 위하여 처리 용기 내의 광원의 위치를 상단부 뿐만 아니라 하단부, 좌우에 설치하여 시료가 광원에 고르게 노출될 수 있도록 하였으며, 광원을 1-2개만 설치할 경우에는 처리 용기 내부에 유리, 알루미늄과 같은 반사성이 있는 반사판을 설치하여 광원으로부터의 빛이 난반사를 일으켜 고른 조사가 이루어지도록 하고 있음
- 연속식 처리 용기는 식품의 대량 처리를 위해 반드시 해결되어야 하는 것으로, 본 실험에서는 연속식 처리를 위한 처리 용기로 컨베이어 벨트식의 처리 용기를 설계·제작하였음
- 연속식 처리 용기는 상단부에 5개, 하단부에 5개의 광원이 엇갈려 위치하도록 하였으며, 컨베이어벨트는 투명한 재질을 사용하여 시료가 이송되면서

상·하부 모두가 고르게 처리 받도록 하였음(Fig. 3-15)

- 시료가 광펄스 처리를 받는 시간을 조절할 수 있도록 컨베이어벨트의 속도를 조절할 수 있도록 하였으며, 강한 빛으로부터 눈을 보호하기 위해 외부에는 광원이 외부로 새는 것을 막기 위한 외부 차단 장치를 설치하였음
- 연속식 처리 용기에는 광원(램프)을 다수를 설치해야 하기 때문에 연결되는 전원의 방식을 달리 해야 함
- 연속식 처리 용기에 설치된 광원에 전원을 연결하는 방법은 pilot system의 방식에 사용한 대용량의 전원을 광원과 직접 연결하는 방법이 있고, compact system처럼 저전압의 전원을 광원에 흘려보내고 순간적으로 고전압의 trigger 전원을 공급하는 방식이 있음
- 고전압의 대용량 전원을 광원에 직접 연결하는 방식은 기존에 사용되고 있는 고전압 펄스 전기장에 사용되는 50 kV 전원 장치 이상의 장치가 필요할 것으로 예상되며, 고가의 장치비가 들 것으로 예상됨
- 저전압을 이용한 triggering 방식의 연결 방법은 상시 전원을 병렬 방식으로 공급하고, 고전압의 trigger 전원을 광원 수만큼 연결하는 방식을 택하는 것이 유리한 것으로 판단됨

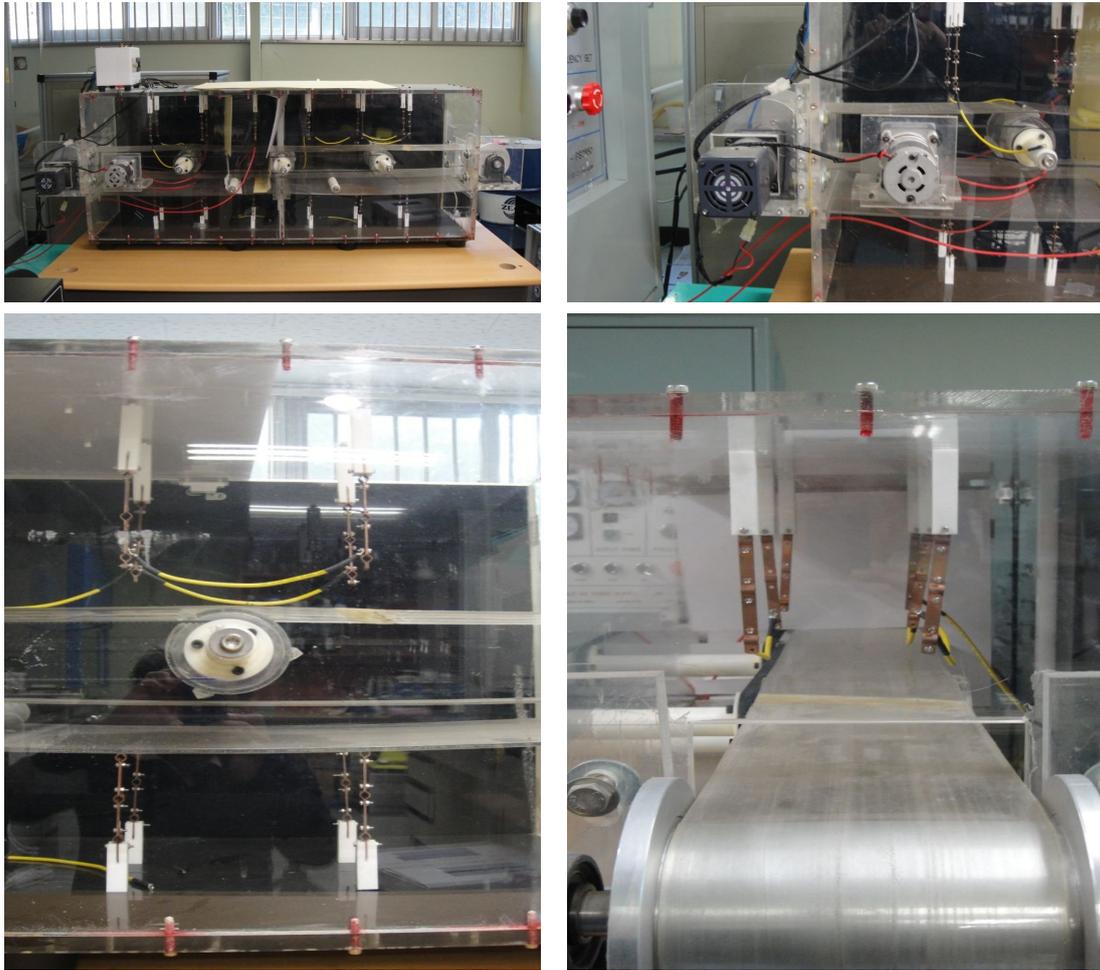


Fig. 3-15. Photograph of continuous treatments chamber with conveyer system for IPL treatment

제 3 절 수산식품에 존재하는 부패 미생물, 병원성 미생물의 탐색 및 동정

1. 수산식품에 존재하는 부패 미생물 탐색

가. 실험방법

(1) 시료

- 수산식품에 존재하는 미생물의 정량과 병원성 미생물의 정성 분석을 위하여 해진물산(주)로부터 공급받은 광어, 연어와 새우 fillet을 사용하였음

(2) 수산식품에 존재하는 미생물 정량 실험

- 수산식품에 존재하는 일반 세균수는 Plate Count Agar(PCA, Difco Co.) 배지를 사용하여 측정하였으며, 효모는 YM agar(Difco Co.) 배지를 사용하였음
- 수산식품 각 시료를 25 g씩 취하여 멸균된 stomacher bag에 넣고 0.88% NaCl 용액 225 mL를 넣어 1/10로 희석한 다음 120초 간 Stomacher를 사용하여 균질화 한 후, 균질화된 시료는 0.88% NaCl 용액을 사용하여 10진 희석법에 의해 10^{-3} 이 될 때까지 희석을 한 후 1 mL를 취하여 petridish에 분주하였음
- 분주한 petri dish에 50°C 정도로 식힌 PCA 배지와 YM agar 배지를 부어 주고 고형화시켰다. 일반 세균은 37°C에서 48-72시간 동안 배양하였고, 효모는 25°C에서 48-72시간 동안 배양하였으며, 배양 후 colony 수가 30-100개인 plate를 선택하여 colony 수를 측정하고 희석배수를 곱하여 단위 부피당 미생물 수를 CFU/mL의 단위로 산출하였음

(3) 미생물 동정

- 수산식품 시료 중에 존재하는 미생물을 동정하기 위하여 PCA 배지와 YM agar 배지에서 성장한 colony 중에서 형태적으로 상이한 colony 4개를 선별한 후, 이들 균주의 16S rRNA 유전자의 염기서열을 이용하여 동정 실시함
- 균주로부터 16S rRNA 유전자를 cloning하기 위하여 colony polymerase

chain reaction(PCR)을 다음과 같이 수행함

- Plate에서 생육한 colony를 취한 후 AccuPower[®] PreMix(Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하여 PCR sprint(Hybaid Ltd., London, UK)로 반응
- PCR primer는 8F (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3'), 15R (5'-AAGGAGGTGATCCAACCGCA-3')을 사용하였으며, PCR 조건은 94℃에서 2분(1 cycle), 94℃에서 30초, 60℃에서 1분, 72℃에서 1분(35 cycle), 72℃에서 7분간 반응시킴

- PCR 산물은 agarose gel 전기영동으로 확인하고, 100 V에서 40 분간 전기영동한 후 254 nm의 자외선 조명하에서 관찰함
- 사진촬영은 UV-filter와 orange filter가 장착된 디지털카메라(C4040Z, Olympus America Inc., Center Valley, PA, USA)를 이용함
- DNA 단편의 회수는 Bioneer사(Daejeon, Korea)의 AccuPrep[®] Gel Purification Kit를 사용하여 제조사의 manual에 따라 수행함
- PCR 산물의 염기서열 결정은 Macrogen사(Seoul, Korea)에 의뢰하여 Applied Biosystems사(Foster City, CA, USA)의 ABI PRISM BigDye[™] Terminator Cycle Sequencing Kit를 사용하여 MJ Reserch사(Reno, NV, USA)의 PTC-225 Peltier Thermal Cycler와 ABI PRISM 3730 XL Analyzer를 이용하였음
- DNA 염기서열의 분석은 InfoMax Inc.(Bethesda, MD, USA)의 Vector NTI Suite 7.1 program을 사용하여 수행하였으며 DNA 염기서열의 homology 분석은 BLASTN online program(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)을 이용하였음

나. 실험 결과

(1) 수산식품에 존재하는 미생물의 정량분석

- 광펄스(high-intensity pulsed light) 기술의 원리는 170~2,600 nm의 광범위한 파장의 강한 빛을 아주 짧은 시간 안에 가하여 식품의 표면을 살균시키거나 표면 미생물 수를 감소시키는데 있으며, 제품의 유통기한을 연장하고 품질을 높이기 위한 목적으로 사용되고 있음

- 본 연구에서는 수산식품에 존재하는 부패 미생물을 광펄스로 처리하였을 때의 사멸기작을 UV 조사의 경우와 비교하여 광펄스 조사에 의한 DNA thymine dimer 생성, DNA와 RNA 사슬의 절단, DNA repair system 연구 등 분자생물학적인 방법으로 규명하고자 하였음
- 이를 위하여 우선적으로 수산식품에 존재하는 미생물 수를 정량 분석하였음
- 수산식품으로는 광어, 연어, 새우 fillet을 사용하였으며 이들 시료에 존재하는 일반세균수와 효모수를 측정하였음
- 그 결과 Table 3-3과 같이 PCA 배지를 이용하여 37°C에서 생육시킨 일반세균수는 연어의 경우 5.27×10^3 CFU/mL, 새우는 4.45×10^4 CFU/mL로 측정되었으며 광어에서는 검출되지 않았음
- 한편 YM agar 배지를 사용하여 25°C에서 생육시켰을 경우 광어의 경우 1.45×10^4 CFU/mL, 연어는 4.71×10^4 CFU/mL, 새우는 1.52×10^4 CFU/mL로 사용한 시료 모두 유사한 수준을 나타내었음
- YM agar 배지는 일반적으로 효모를 선별적으로 생육시킬 때 사용하는 배지이지만 본 연구에서 YM agar 배지 상에 생육한 colony는 형태학적 특성으로 볼 때 효모가 아닌 저온성 세균으로 판단되었음
- 일반적으로 생선 fillet에는 효모가 관찰되지 않고, 중온성 세균보다는 저온성 세균이 많이 존재하는 것으로 알려져 있으며, 본 연구결과에서도 연어와 광어 fillet에서 중온성 세균보다는 저온성 세균이 많이 검출되는 것으로 확인되었음
- 수산식품 시료에 존재하는 미생물을 동정하기 위하여 PCA 배지와 YM agar 배지에서 생육한 colony 중에서 임의로 4종류의 균주를 선택하여 16S rRNA 유전자의 염기서열을 분석하고 이를 NCBI의 BLASTN online database program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)을 이용하여 균주 동정을 실시하였음(Fig 3-16~19).

Table 3-3. Viable cell number on the PCA and YM agar media

(Unit: CFU/mL)

	PCA	YM agar
Flatfish	- ¹⁾	1.45±1.04×10 ⁴ ²⁾
Salmon	5.27±1.81×10 ³	4.71±1.14×10 ⁴
Shrimp	4.45±0.02×10 ⁴	1.52±6.04×10 ⁴

¹⁾Not detected

²⁾Mean±SD

GCTACACATGCAGTCGAGCGGTAGAGAGAAGCTTGCTTCTCTTGAGAGCGG
CGGACGGGTGAGTAATACCTAGGAATCTGCCTGATAGTGGGGGATAACGTT
CGGAAACGGACGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGAC
CTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTTCGGATTAGCTAGTTGGTGA
GGTAATGGCTCACCAAGGCTACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCA
GTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGG
GGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGA
AGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCATTAAAC
CTAATACGTTGGTGTCTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCT
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACT
GGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTGTAAAGTTGAATGTGAAATCCCCGGG
CTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACCTGGCAAGCTAGAGTATGGTAGAGGG
TAGTGGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACAC
CAGTGGCGAAGGCGACTACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGC
GTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATG
TCAACTAGCCGTTGGGAGTCTTGAACCTTCTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAA
GTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGAC
GGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAA
GAACCTTACCAGGCCTTGACATCCAATGAACTTTCTAGAGATAGATTGGTGC
CTTCGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTG
AGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTACCAG
CACGTAATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAG
GTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTG
CTACAATGGTTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCC
ATAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTC
GGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCCGGC
CTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCT
AGTCTAACCTTCGGGAGGACGGTTACCACGGTGTGATTCATGACCTGGGGTG
AAGTCCGTAACC

Fig. 3-16. Nucleotide sequence of 16S rRNA gene from isolate No. 1.

AACGGATAAAGAGCTTGCTCTTTTGAAGTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAAC
ACGTGGGTAACCTGCCTCACAGCTGGGGATAACATCGAGAAATCGATGCTA
ATACCGAATGTGCTGAACATCATAAGATGTTCAAGTGAAAGACGGTTTCGGC
TGTCACTGTGAGATGGACCCGCGCTGGATTAGCTAGTTGGTAAGGTAATGGC
TTACCAAGGCGACGATCCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTG
GGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC
GGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGCC
TTCGGGTCGTAAAGCTCTGTTGTTAGAGAAGAACATGGGTGAGAGTAACTGT
TCACCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGC
AGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAA
AGCGCGCGCAGGCGGTCTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCG
GGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGGACAGAAGAGGAGAGTGA
ATTCCAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTTGGAGGAACACCAGTGGC
GAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTTACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGA
GCAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTA
AGTGTTAAGGGGGTTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGTTAACGCATTAAGCACT
CCGCCTGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAGGAATTGACGGGGGC
CCGCACAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCTT
ACCAGGTCTGACATCTTTGACATCTGGAGACAGAACTTCCCTTCGGGGACA
AAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT
TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATTTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGG
GCACTCTAAAGTGA CTGCCGGTGTAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC
AAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATAAT
ACAAAGGGTCGCGAAGCCGCGAGGTGGAGCCAATCCCATAAAATTATTCTC
AGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAA
TCGTAGATCAGCATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGC
CCGTACACCACGAGAGTTTGTAACACCCAAAGCCGTTTGGTAACCTTCGG
GAGCTAGCCGTCTAAGGTGGGATAGATAATTGGGGGAAGTTCG

Fig. 3-17. Nucleotide sequence of 16S rRNA gene from isolate No. 2.

GCTGCTTACCATGCAGTCGAACGGTAACAGGTCTTCGGACGCTGACGAGTGG
CGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGCCAGTCGTGGGGGATAACTAC
TCGAAAGAGTAGCTAATACCGCATAACGATCTGAGGATGAAAGCGGGGGACC
TTCGGGCCTCGCGGATTGGAGCGGCCGATGGCAGATTAGGTAGTTGGTGGG
ATAAAAGCTTACCAAGCCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAG
CCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG
GAATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGCAGGAT
GAAGGCCTTCGGGTTGTAAACTGCTTTTGTACGGAACGAAAAGCTCCTTCT
AATACAGGGGGGCCATGACGGTACCGTAAGAATAAGCACCGGCTAACTACG
TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTAAGT
GGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTATGTAAGACAGATGTGAAATCCCCGGG
CTCAACCTGGGAACTGCATTTGTGACTGCATGGCTAGAGTACGGTAGAGGGG
GATGGAATTCACGTGTAGCAGTCAAATGCGTAGATATGCGGAGGAACACC
GATGGCGAAGGCAATCCCCTGGACCTGTACTGACGCTCATGCACGAAAGCG
TGGGAGCAAACAGGATTACATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAACGATGTC
AACTGGTTGTTGGGAATTAGTTTTCTCAGTAACGAAGCTAACCGCTGAAGTT
GACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGG
GACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGTTTAATTTCGATGCAACCGGAAAAA
CCTTACCCACCTTTGACATGGCAGGAAGTTTCCAGAGATGGATTCGTGCTCG
AAAGAGAACCTGCACACAGGCACTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTG
AGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCATTAGTTGGTAC
ATTCAGTTGAGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTG
GGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATAGGTGGGGCTACACACGTCATA
CAATGGCTGGTACAGAGGGTTGCCAACCCGCGAGGGGGGAGCTAATCCCATA
AAACCAGTCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGG
AATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCT
TGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGCGGGTCTCGCCAGAAGTAGGTA
GCCTAACCGCAAGGAGGGCGCTTACCACGGCGGGGTTTCGTGACTGGGGTGA
AGTCGT

Fig. 3-18. Nucleotide sequence of 16S rRNA gene from isolate No. 3.

GGAGCCTACACATGCAAGTCGAGCGGTAGCACGGGAGAGCTTGCTCTCTGG
GTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGG
GGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATGACCTCGCAAGAGCAA
AGTGGGGGACCTTCGGGCCTCACGCCATCGGATGTGCCCAGATGGGATTAGC
TAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGA
GGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGG
CAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCG
CGTGTGTGAAGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAG
GCGTTGTAGTTAATAGCTGCAGCGATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCG
GCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATC
GGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGA
AATCCCCGAGCTTAACTTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCAAGCTAGAGTCT
TGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTG
GAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAG
GTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCT
GTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCT
AACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAA
ATGAATTGACGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGC
AACGCGAAACCTTACCTACT

Fig. 3-19. Nucleotide sequence of 16S rRNA gene from isolate No. 4.

- 그 결과 분석한 4균주의 16S rRNA 유전자 염기서열은 각각 *Pseudomonas* sp. FLM05-3과 99%(Fig 3-16), *Brochothrix* sp. NJ-25와 99%(Fig 3-17), *Delftia* sp. KZ-OAIF2와 99%(Fig 3-18), *Rahnella* sp. NJ-54와 99%(Fig 3-19)로 일치하는 것으로 확인되었음
- *Pseudomonas* sp.는 물 등 자연에 널리 분포되어 있는 균주로서 임상에서는 기회 감염균으로 관심의 대상이 되고 있는 균주이며, 우유 치즈, 육제품 및 수산식품의 부패를 유발하는 세균임
- *Brochothrix* sp.는 냉장식품의 부패를 유발하는 세균으로 특히 냉장 육제품 또는 가공육제품의 주요 부패균으로 병원성은 없는 것으로 보고되고 있으며, *Rahnella* sp.는 장내세균과에 속하는 세균으로 분변에서는 거의 발견되지 않고 상대적으로 양질의 먹는 물에서 증식하는 것으로 알려져 있음

2. 수산식품에 존재하는 병원성 미생물 정성 실험

가. 실험방법

(1) 사용균주

- 수산식품에 존재하는 병원성 미생물 정성 실험을 위하여 대조구로 사용한 표준균주로는 *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43859, *Bacillus cereus* KCCM 40935, *Salmonella Typhimurium* KCCM 40253, *Listeria monocytogenes* KCCM 40307, *Staphylococcus aureus* ATCC 13585를 한국중균협회 부설 한국미생물보존센터로부터 분양받아 사용하였음

(2) *E. coli* O157:H7 검출법

- 증균배양: 수산식품 시료 25 g을 멸균된 stomacher bag에 넣고 225 mL의 Modified EC Medium (mEC, Difco Co.)을 이용하여 10^{-1} 희석한 후 120초간 Stomacher로 균질화한 다음 37°C에서 24시간동안 진탕배양
- 분리배양: 증균 배양액을 1백금이 취하여 선택배지인 MacConkey Sorbitol agar 배지(Difco Co.)에 도말하고, 37°C에서 24시간동안 배양하였다. Sorbitol을 분해하지 않는 무색 colony를 취하여 확인배지인 Eosin Methylene Blue Agar(EMB) agar 배지(Difco Co.)에 도말한 후 37°C에서 24시간 배양

- 확인시험: EMB agar 배지에서 중심이 검은색이고 녹색의 금속성 광택을 지닌 colony를 Nutrient agar 배지(Difco Co.)에 옮겨 37°C에서 24시간 배양한 후 Gram 염색 실시
- 혈청형 시험: Gram 음성으로 확인되어 대장균으로 동정된 균은 MacConkey sorbitol 배지(Difco Co.)를 사용하여 배양한 후 Microgen 사의 *E. coli* O157 Latex Kit를 사용하여 혈청형을 결정하여 최종 확인

(3) *Bacillus cereus* 검출법

- 분리배양
 - 수산식품 시료 25 g을 멸균 stomacher bag에 넣고 225 mL의 peptone water를 넣어 10⁻¹ 희석한 다음 120초 간 Stomacher로 균질화시킨 후 37°C에서 24시간동안 진탕배양
 - 균질화된 시료를 1백금이 취하여 선택배지인 MYP 배지(Difco Co.)에 도말한 후 37°C의 24시간동안 배양하여 lecithinase 생성에 의해 침전물로 둘러싸인 혼탁한 환을 지니는 분홍색 colony를 선별
- 확인시험: MYP agar 배지에서 생성된 전형적인 colony를 선별하여 Nutrient agar 배지에 도말한 후 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양 후 Gram 염색을 실시하여 Gram 양성세균으로 확인된 균은 API 50CHB(Biomerieux, France)를 이용하여 최종 확인하였음

(4) *Salmonella Typhimurium* 검출법

- 증균배양
 - 수산식품 시료 25 g을 멸균 stomacher bag에 넣고 225 mL의 peptone water를 넣어 10⁻¹ 희석한 다음 120초 간 Stomacher로 균질화시킨 후 37°C에서 24시간동안 진탕배양하였음
 - 배양액 0.1 mL를 Rappaport vassiliadis R10 배지 10 mL에 접종하여 37°C에서 24시간 진탕배양하여 증균
- 분리배양: 증균배양액을 선택배지인 XLD agar 배지(Difco Co.)에 1 백금이 도말한 후 37°C에서 24시간 배양
- 확인시험: XLD agar 배지에서 증양이 검은색이며 붉은 색인 colony를 확인

배지인 Nutrient agar 배지에 도달한 후 37℃에서 24시간 배양하고, 이를 Gram 염색하여 Gram 음성인 균을 선별하여 API 20E(Biomeriux)를 이용하여 최종 확인

(5) *Listeria monocytogenes* 검출법

- 증균배양: 수산식품 시료 25 g을 멸균 stomacher bag에 넣고 225 mL의 Listeria enrichment broth(Difco Co.)를 넣어 10⁻¹ 희석한 후 120초 간 Stomacher로 균질화시킨 다음 37℃에서 24시간동안 진탕배양하였음
- 분리배양
 - 증균 배양액을 선택배지인 Oxford Listeria agar 배지(Difco Co.)에 도달하고 30℃에서 24시간 배양
 - Oxford Listeria agar 배지에서 ferric acid와 반응하여 형성된 검은색 colony를 취하여 0.6%의 yeast extract가 포함된 Tryptic soy agar 배지(Difco Co.)에 도달한 후 30℃에서 24시간 배양
- 확인시험: Gram 염색을 통해 Gram 양성으로 확인되면 API Listeria(Biomeriux)로 최종 확인

(6) *Staphylococcus aureus* 검출법

- 증균배양: 수산식품 시료 25 g을 멸균 stomacher bag에 넣고 225 mL의 Tryptic soy broth에 10%의 NaCl이 첨가된 배지를 넣어 10⁻¹ 희석한 후 120초 간 Stomacher로 균질화시킨 다음 37℃에서 24시간동안 정치배양
- 분리배양: 증균배양액을 선택배지인 Baird Parker agar 배지(Difco Co.)에 도달한 후 37℃에서 24시간 배양한 후 투명한 환을 가진 검은색 colony를 선별하여 Nutrient agar 배지에 도달하고 37℃에서 24시간 배양
- 확인시험: Gram 염색을 통해 Gram 양성인 균이 확인되면 coagulase test를 수행하였다. Coagulase test는 토끼혈청을 가한 생리식염수를 멸균한 시험관에 0.5 mL씩 무균적으로 분주한 후, Nutrient agar 배지에 도달되어 있는 균을 1 백금이 접종하여 37℃에서 정치배양한 다음 3, 6, 24시간동안 관찰하여 응고현상이 발생되면 *S. aureus* 양성으로 판정하였음

나. 실험 결과

- 본 연구에 사용된 생선 fillet에 병원성 미생물이 존재하는지 알아보기 위하여 *E. coli* O157:H7, *B. cereus*, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* 등 5 가지 주요 식중독 미생물을 대상으로 증균 배양, 선택배지를 사용한 분리 배양, 확인시험 과정을 통해 식중독 미생물의 존재 여부를 분석하였음
- 광어, 연어 및 새우 fillet에 존재하는 미생물을 증균한 후 각각의 병원성 미생물을 선택적으로 검출할 수 있는 선택배지를 이용하여 배양한 결과 표 5와 같이 광어에서는 *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *B. cereus*로 의심되는 균이 검출되었고, 연어에서는 *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. cereus*로 의심되는 균이 검출되었으며, 새우에서는 *E. coli* O157:H7, *S. typhimurium*, *S. aureus*, *B. cereus*로 의심되는 균이 검출되었음
- Table 3-4에서 나타난 결과로부터 각 시료의 선택배지에서 의심되는 colony를 Nutrient agar에 배양시킨 다음 Gram 염색을 실시하였다. Table 3-5에서 보는 바와 같이 *E. coli* O157:H7과 *S. typhimurium*은 Gram 음성균, *L. monocytogenes*, *S. aureus*와 *B. cereus*는 Gram 양성균임
- 광어, 연어, 새우의 *E. coli* O157:H7 선택배지에서 생육한 균은 Gram 음성으로 판별되어 모두 *E. coli* O157:H7으로 의심되었으며, 새우의 *S. typhimurium* 선택배지에서 생육한 균도 Gram 음성균으로 판별되어 *S. typhimurium*으로 의심되었으며, 광어와 연어의 *L. monocytogenes* 선택배지에서 생육한 균은 Gram 양성균으로 판별되어 *L. monocytogenes*로 의심되었음
- 반면 연어의 *S. aureus* 선택배지에서 생육한 균은 Gram 음성균으로 판별되어 *S. aureus*와는 다른 균인 것으로 생각되어지며, 새우의 경우에는 Gram 양성균으로 판별되어 *S. aureus*로 의심되었고, 광어, 연어와 새우의 *B. cereus* 선택배지에서 생육한 균은 Gram 양성으로 판별되어 *B. cereus*로 의심되었음
- 각 시료를 대상으로 선택배지를 사용하여 분리한 식중독 미생물로 의심되는 균주들은 확인시험을 통하여 식중독 미생물 여부를 최종 판정하였음
- *E. coli* O157:H7의 확정시험은 Latex test를 이용하였는데 Latex test에 의해 *E. coli* O157:H7은 응집 반응을 나타냄

Table 3-4. Identification of food-borne pathogenic bacteria using selection medium

	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>Samonella</i> Typhimurium	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	<i>Bacillus</i> <i>cereus</i>
Flatfish 1	+ ¹⁾	- ²⁾	+	-	+
Flatfish 2	+	-	+	-	+
Salmon 1	+	-	+	+	+
Salmon 2	+	-	+	+	+
Shrimp 1	+	+	-	+	+
Shrimp 2	+	+	-	+	+

¹⁾+: Positive,

²⁾-. Negative

Table 3-5. Gram staining of isolates from Nutrient agar medium

	<i>E.coli</i> O157:H7	<i>Samonella</i> <i>typhimurium</i>	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	<i>Bacillus</i> <i>cereus</i>
<i>E.coli</i> O157:H7	- ¹⁾				
<i>Salmonella</i> <i>Typhimurium</i>		-			
<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>			+ ²⁾		
<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>				+	
<i>Bacillus cereus</i>					+
Flatfish 1	-		+		+
Flatfish 2	-		+		+
Salmon 1	-		+	-	+
Salmon 2	-		+	-	+
Shrimp 1	-	-		+	+
Shrimp 2	-	-		+	+

¹⁾-.: Gram negative

²⁾+: Gram positive

- 광어, 연어, 새우 각각의 시료에서 분리된 *E. coli* O157:H7 의심균은 모두 응집반응을 나타내지 않아, *E. coli* O157:H7이 아닌 것으로 최종 판정하였음 (Table 3-6)
- *S. aureus*의 확정시험은 coagulase test를 이용하였는데 일정 시간에서 응고 또는 섬유소가 석출된 것은 모두 coagulase 양성으로 간주하고 이는 *S. aureus* 양성이라고 판정함
- 연어와 새우에서 분리된 *S. aureus* 의심균은 모두 응고반응을 나타내지 않아 *S. aureus*가 아닌 것으로 최종 판정하였음 (Table 3-7)
- 한편, *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *S. typhimurium*의 확정 판정을 위해서는 API kit를 이용하였음
- Table 3-8에 나타낸 바와 같이 새우에서 분리된 *S. Typhimurium* 의심균은 *Pseudomonas aeruginosa*로 판명되었고, 광어에서 분리된 *L. monocytogenes* 의심균은 *L. monocytogenes*로 판명되었으나 연어에서 분리된 의심균은 *L. seeligeri*로 판명되었음
- 또한 광어와 새우에서 분리된 *B. cereus* 의심균은 *B. cereus*로 판정되었으나 연어에서 분리된 균은 *B. cereus*가 아닌 것으로 확인되었음
- 이상의 결과를 종합하여 볼 때 본 연구에서 사용한 수산식품인 광어, 연어, 새우 fillet에는 *E. coli* O157:H7, *S. aureus*와 *S. Typhimurium*은 검출되지 않았으나 광어에서 *L. monocytogenes*와 *B. cereus*가, 새우에는 *B. cereus*가 존재하는 것을 확인하였음
- *L. monocytogenes*는 Gram 양성의 단간균($0.5 \times 0.5 \sim 2 \mu\text{m}$)이며 주모성 편모를 지니고 있어 운동성이 있고 포자는 지니고 있지 않는 감염형 식중독 세균으로 식물, 동물, 토양, 지표수에 등에 널리 산재하여 있고, 하수, 도축장 폐수, 정장 소의 우유와 유방염에 걸린 소의 우유, 사람과 동물의 분변에서 발견됨
- 1983년 미국 메사추세츠주에서 우유를 먹은 49명(성인42명, 유아 및 신생아 7명)이 발병하여 48명이 사망한 식중독 사건 이후 식중독균으로 주목을 받기 시작한 이래 꾸준히 그 발생률이 증가하고 있으며 최근 수입육류에서 그 검출 빈도가 높아 위생상의 문제점으로 부각되고 있음

Table 3-6. Latex test for the identification of *E. coli* O157:H7

Sample	Agglutination
<i>E. coli</i> O157:H7	+ ¹⁾
Flatfish 1	- ²⁾
Flatfish 2	-
Salmon 1	-
Salmon 2	-
Shrimp 1	-
Shrmp 2	-

¹⁾+: Positive

²⁾ -: Negative

Table 3-7. Coagulase test for the identification of *S. aureus*

	Incubation time (hr)		
	3	6	24
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+
Salmon 1	-	-	-
Salmon 2	-	-	-
Shrimp 1	-	-	-
Shrimp 2	-	-	-

¹+: Positive

² -: Negative

Table 3-8. API test for the identification of *L. monocytogenes*, *B. cereus*, and *S. typhimurium*

	API 20E	API Listeria	API 50CHB
<i>S. Typhimurium</i>	<i>Samonella</i> spp.		
<i>L. monocytogenes</i>		<i>L. monocytogenes</i>	
<i>B. cereus</i>			<i>B. cereus</i>
Flatfish 1		<i>L. monocytogenes</i>	<i>B. cereus</i>
Flatfish 2		<i>L. monocytogenes</i>	<i>B. coagulans</i>
Salmon 1		<i>L. seeligeri</i>	<i>B. subtilis</i>
Salmon 2		<i>L. seeligeri</i>	<i>B. firmus</i>
Shrimp 1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>B. cereus</i>
Shrimp 2	-		<i>B. cereus</i>

- 특히 저온(10℃ 이하)과 고온(40℃ 이상)에서도 발육이 가능하여 열저항성이 높다. 따라서 일반 세균과 달리 4℃ 이하에서도 증식이 가능하기 때문에 냉장상태로 보존하더라도 안심할 수 없는데, 리스테리아 식중독은 감염형 식중독 중에서 식중독을 발병하기 위해 필요로 하는 균수가 가장 적은 식중독의 하나이다(보통 수 개 세포/g). 이 세균은 생식품, 가공품 모두에 널리 존재하는데 18,000여 가지의 음식 중 6%가 오염이 되어 있고 그 중 5%는 1,000 CFU/g 이상의 균이 존재함이 보고되고 있음
- 해산물, 어육가공품에서도 25% 정도가 오염되어 있으며 훈제 어육은 10⁴ CFU/g까지 오염되어 있는 것으로 보고되고 있고, 건강한 사람의 분변에서도 2~6% 분리가 분리되고 있는데 Listeriosis에 감염된 사람 중 21%는 10⁴ CFU/g 이상 검출되고 있음
- *B. cereus*는 포자를 형성하는 Gram 양성인 큰 간균으로 주모성의 편모를 갖는 호기성 세균으로 토양 등 자연계에 중요한 부패 원인균으로서 널리 분포되어 있는데, 조리된 식품을 실온에 오래 방치하면 균이 이상 증식하여 10⁸-10⁹/g에 이르면 독소형 식중독을 일으킴
- 이 세균이 일으키는 식중독은 enterotoxin을 원인독소로 하는 설사형 식중독과 구토독소에 의한 구토형 식중독의 두 가지 형태가 있는데, 설사형의 경우 향신료를 사용한 식품이나 요리로 육류, 스프류, 바닐라 소스, 소시지, 푸딩 등 여러 가지 식품에 의하여 발생하고 있으나 구토형의 경우는 원인식품의 90% 가까이가 전분을 주체로 한 식품에 의하여 발생하고 있음

제 4 절 광펄스 기술을 이용한 수산식품에 존재하는 위해 미생물의 저감효과 확인

1. 광펄스 기술의 위해 세균에 대한 저감화 효과 검토

가. 실험 방법

(1) 사용균주

- 수산식품에 존재하는 위해 세균 검사 및 동정 결과를 토대로 균을 선정함
- E. coli* O157:H7
- Listeria monocytogenes*
- Bacillus cereus*
- Pseudomonas aeruginosa*

(2) 생균수의 측정

- E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*를 5 mL의 TSB(Tryptic soy broth), 37 °C, 200 rpm으로 shaking incubator에서 overnight하여 전 배양함
- 전배양된 배양액 1 mL를 취해 100 mL의 TSB에 첨가 후 *E. coli* O157:H7는 37°C, 200 rpm에서 10시간, *Listeria monocytogenes*는 37°C, 200 rpm에서 8시간, *Bacillus cereus* 37°C, 200 rpm에서 10시간, *Pseudomonas aeruginosa*는 37°C, 200 rpm에서 10시간 분 배양함
- 대수증식기 후반까지 배양된 박테리아를 원심분리 후 살균된 생리식염수 (0.85% NaCl solution)에 2회 세척 후 4°C에서 보관함
- 예측된 희석배수만큼 균주를 희석하여 0.1 mL 취한 후 Tryptic soy agar에 spreading함
- Treatment time, kV, Hz를 변수로 High-intensity pulsed light를 조사함
- 광펄스 처리된 plate를 37°C에서 48시간 동안 incubator 배양 후 생균수를 측정함

실험 균주	배양		균수확인		
	MEDIA	배양조건	dilution	MEDIA	culture
<i>E. coli</i> O157:H7	Tryptic soy broth (Difco)	37°C, 200rpm shaking incubation, 10h	0.85% NaCl solution	Tryptic soy agar (Difco)	37°C 36h
<i>Listeria monocytogenes</i> KCCM 40307		37°C, 200rpm shaking incubation, 8h			37°C 48h
<i>Bacillus cereus</i>		37°C, 200rpm shaking incubation, 10h			37°C 24h
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		37°C, 200rpm shaking incubation, 10h			37°C 24h

(3) 광펄스 발생 장치 및 광원

- 광펄스의 발생을 위한 시스템은 실험실 용량으로 설계, 제작되었음
- 광펄스 발생장치는 25 kV, DC를 발생시킬수 있는 전원 발생부와 펄스의 길이 및 주파수를 조절할 수 있는 조절부, 광원으로 사용되는 램프로 구성됨
- 220V, AC, 25A의 입력 전원을 고전압 변압기를 통하여 승압하고 정류하여 최대 30 kV, DC 전원을 발생시킬 수 있도록 하였으며, 최대 허용치 전력은 25 kW임
- 공급된 고전압은 capacitor에 담아 충전된 고전압을 순간적으로 방전하는 열음극 방전관을 사용함
- 광펄스 처리를 위해 사용한 광원(lamp)은 59 kPa의 압력으로 Xenon을 충전한 quartz 재질의 Heraeus Noblight Series를 사용하였으며, lamp의 크기는 147 mm × 7.14 mm임
- Lamp에 인가되는 전원의 세기와 파형은 oscilloscope(Lecroy Digital Oscilloscope, Model 9300 AM, Dual 400 MHz Swizerland)로 측정함.
- 광펄스 처리 용기는 광이 외부로 방출되는 것을 막기 위해 불투명 재질의 acetal을 사용하였으며, 램프의 위치를 조절하여 시료 표면과 램프 사이의 거리를 조절할 수 있도록 설계함.

나. 실험결과

(1) 광펄스에 의한 *E. coli* O157:H7 의 살균

- 광펄스의 처리조건을 5 Hz에서 10, 15, 20, 25 kV로 전압을 달리하여 처리한 후 *E. coli* O157:H7의 생균수를 측정해 본 결과 처리 전압이 높아질수록, 처리 시간이 길어질수록 높은 사멸률을 나타냄(Fig 3-20).
- 처리전압이 높아질수록 사멸속도 또한 빨라지는 결과를 얻을 수 있었음.
- 15 kV, 5 Hz, 450 μ s 처리 후 3 log 정도의 사멸 결과를 얻었으며, 25 kV, 5 Hz, 750 μ s 처리 후 6 log 정도의 사멸 결과를 얻을 수 있었음.
- 낮은 처리전압에서도 임계처리시간을 나타내지 않는 결과를 얻을 수 있었음.

(2) 광펄스에 의한 *Listeria monocytogenes*의 살균

- 광펄스의 처리조건을 5 Hz에서 10, 15, 20, 25 kV로 전압을 달리하여 처리한 후 *Listeria monocytogenes*의 생균수를 측정한 결과 처리 전압이 높아질수록, 처리 시간이 길어질수록 높은 사멸률을 나타냄(Fig 3-21).
- 15 kV, 5 Hz, 450 μ s 처리 후 약 1 log 의 사멸 결과를 얻을 수 있었으며, 25 kV, 5 Hz, 900 μ s 처리 후 6 log 정도의 사멸 결과를 얻을 수 있었음.
- 10, 15 kV에서는 임계처리시간을 나타냄.

(3) 광펄스에 의한 *Bacillus cereus*의 살균

- 광펄스의 처리조건을 5 Hz에서 10, 15, 20, 25 kV로 전압을 달리하여 처리한 후 *Bacillus cereus* 의 생균수를 측정한 결과 처리 전압이 높아질수록, 처리 시간이 길어질수록 높은 사멸률을 나타냄(Fig 3-22).
- 15 kV, 5 Hz, 450 μ s 처리 후 약 1 log 의 사멸 결과를 얻을 수 있었으며, 25 kV, 5 Hz, 750 μ s 처리 후에는 6 log 정도의 사멸 결과를 얻을 수 있었음.

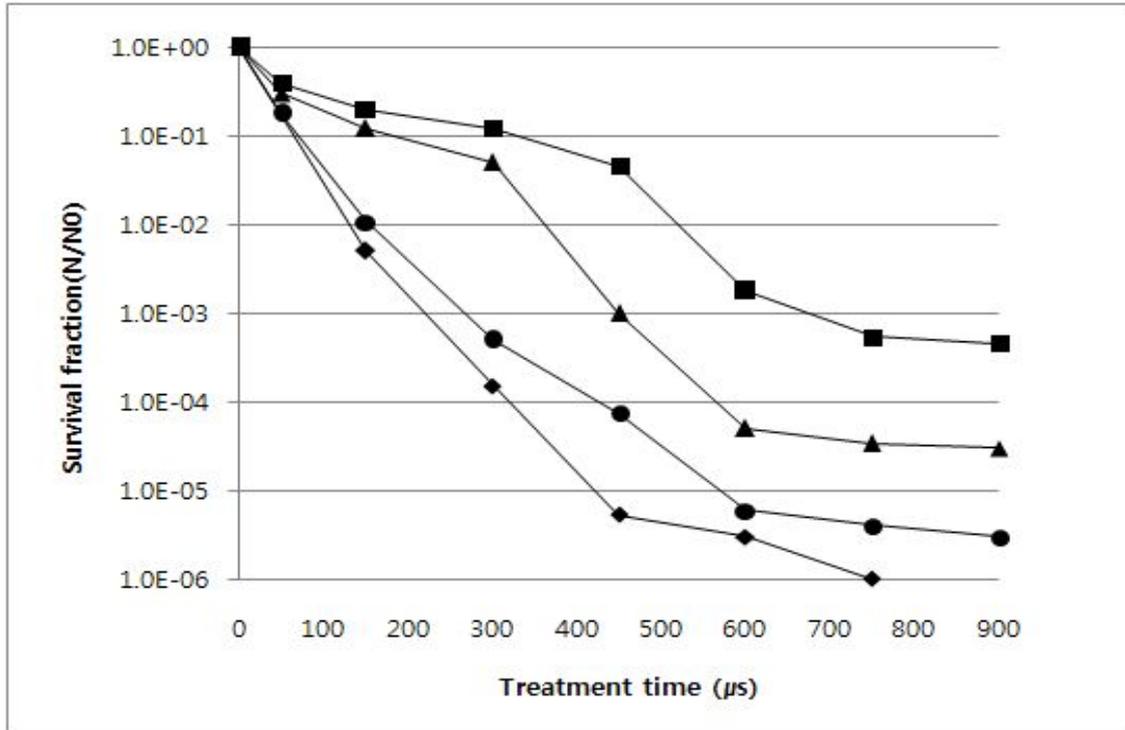


Fig. 3-20. Inactivation of *E. coli* O157:H7 as treatment voltage by High-intensity pulsed light.
 (■ 10 kV, ▲ 15 kV, ● 20 kV, ◆ 25 kV)

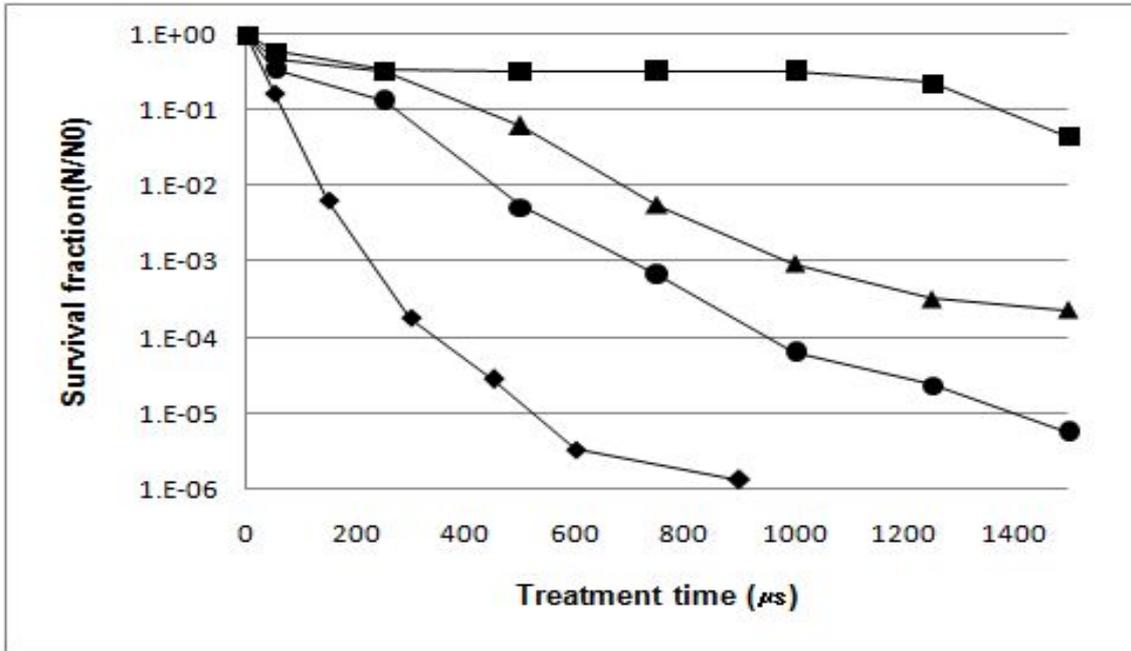


Fig. 3-21. Inactivation of *Listeria monocytogenes* as treatment voltage by High-intensity pulsed light.
 (■ 10 kV, ▲ 15 kV, ● 20 kV, ◆ 25 kV)

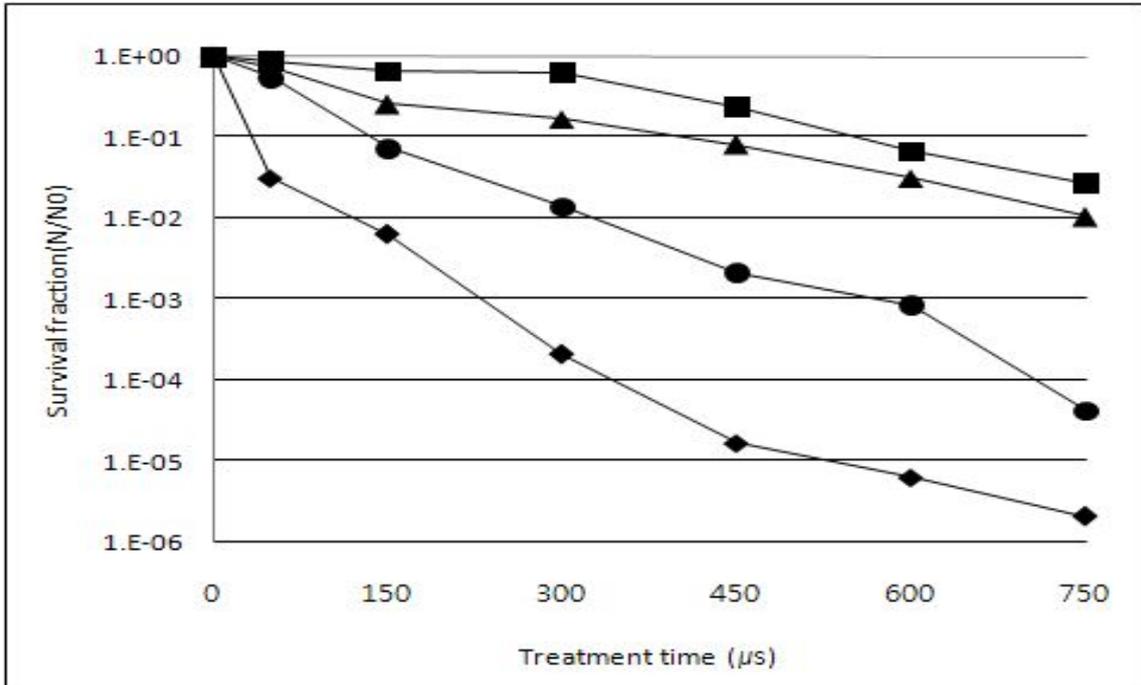


Fig. 3-22. Inactivation of *Bacillus cereus* as treatment voltage by High- intensity pulsed light.
 (■ 10 kV, ▲ 15 kV, ● 20 kV, ◆ 25 kV)

□ 10, 15 kV 에서는 임계처리시간을 나타냄.

(4) 광펄스에 의한 *Pseudomonas aeruginosa*의 살균

□ 광펄스의 처리조건을 15 Hz에서 10, 15 kV로 전압을 달리하여 처리한 후 *Pseudomonas aeruginosa* 의 생균수를 측정한 결과 처리 전압이 높아질수록, 처리 시간이 길어질수록 높은 사멸률을 나타냄(Fig 3-23~24)

□ 15 kV, 5 Hz, 600 μ s 처리 후 약 3 log 의 사멸 결과를 얻을 수 있었으며, 25 kV, 5 Hz, 800 μ s 처리 후 6 log 정도의 사멸 결과를 얻을 수 있었음

□ 낮은 처리전압에서도 임계처리시간을 나타내지 않는 결과를 얻을 수 있었음

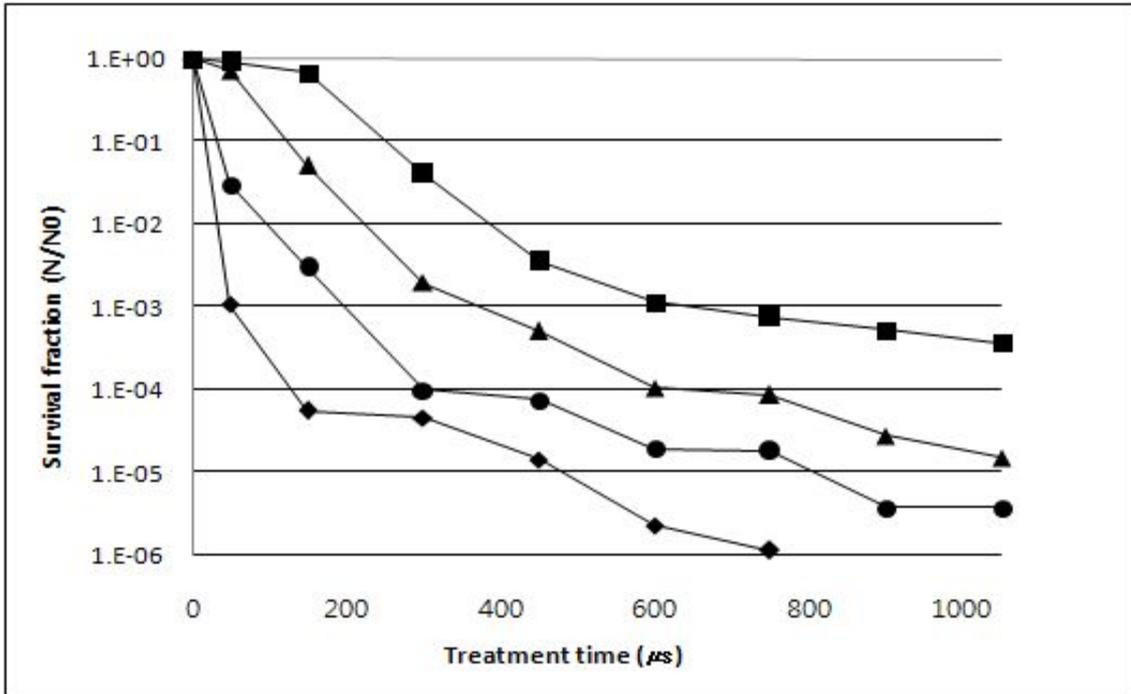


Fig. 3-23. Inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* as treatment voltage by High-intensity pulsed light.
 (■ 10 kV, ▲ 15 kV, ● 20 kV, ◆ 25 kV)

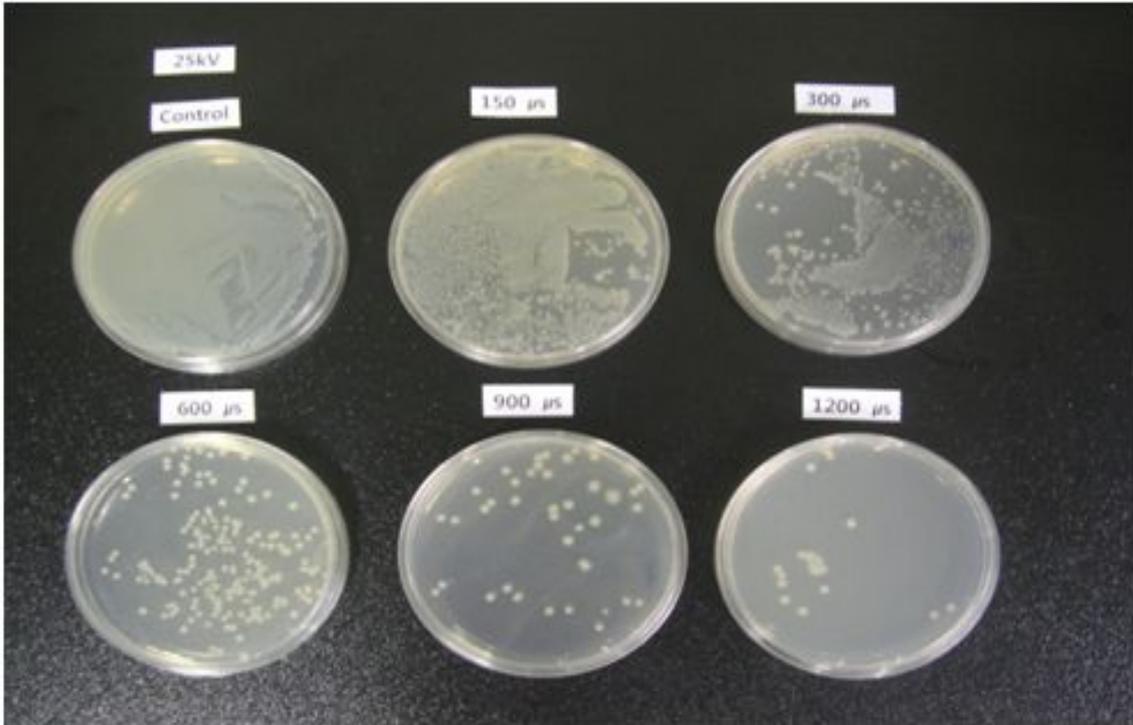


Fig. 3-24. A photo of glass Petri dishes containing colonies of *E. coli* O157:H7 generated by the IPL treatment at 25 kV treatment.

제 5 절 광펄스 처리에 의한 수산식품 내 위해 세균의 저감 효과 확인

1. 수산식품 내 위해 세균의 저감 효과

가. 실험방법

(1) 사용균주

- E. coli* O157:H7
- Listeria monocytogenes*
- Pseudomonas aeruginosa*

(2) Sample

- 연어 fillet
- 광어 fillet
- 새우 fillet

(3) Sample 준비 및 접종

- 냉동보관 상태인 연어, 광어, 새우 fillet를 흐르는 물에서 10분간 해동시킴
- 표면상의 물기를 잘 제거한 후 준비한 균 현탁액 0.01 mL을 sample 표면에 조금씩 떨어뜨리면서 살균된 유리막대를 이용하여 spreading하며 표면에 고루 퍼질 수 있게 집중함
- 준비된 sample을 treatment time을 변수로 설정하여 High-intensity pulsed light를 적용함

(4) 생균수 측정

- 광펄스 처리된 연어, 광어, 새우 fillet를 살균된 증류수와 함께 stomach bag에 넣고 stomacher를 이용하여 2 min간 잘 분쇄한 후 살균된 증류수에 희석한 뒤 PCA 배지(plate count agar)에 spreading하였고, 37°C 24~48시간 동안 incubator에서 배양 후 생균수를 측정함.

나. 실험결과

- Sample 표면에 *E. coli* O157:H7을 접종한 뒤, 25 kV, 5 Hz에서 treatment time을 변수로 설정하여 High-intensity pulsed light를 적용함. 그 결과, 연어 fillet는 6000 μ s 처리 후 약 1 log 정도의 사멸 결과를 얻을 수 있었고, 광어 fillet는 약 1.2 log 정도의 사멸 결과를, 새우 fillet는 약 2 log 정도의 결과를 얻을 수 있었음[Fig 3-25].
- Sample 표면에 *L. monocytogenes*를 접종한 뒤, 25 kV, 5 Hz에서 treatment time을 변수로 설정하여 High-intensity pulsed light를 적용함. 그 결과, 연어 fillet는 6000 μ s 처리 후 약 1.5 log 정도의 사멸 결과를 얻을 수 있었고, 광어 fillet는 약 1 log 정도의 사멸 결과를, 새우 fillet는 약 1.6 log 정도의 결과를 얻을 수 있었음[Fig 3-26].
- Sample 표면에 *Pseudomonas aeruginosa*를 접종한 뒤, 25 kV, 5 Hz에서 treatment time을 변수로 설정하여 High-intensity pulsed light를 적용함. 그 결과, 연어 fillet는 6000 μ s 처리 후 약 11.5 log 정도의 사멸 결과를 얻을 수 있었고, 광어 fillet는 약 1.3 log 정도의 사멸 결과를, 새우 fillet는 약 2 log 정도의 결과를 얻을 수 있었음[Fig 3-27].

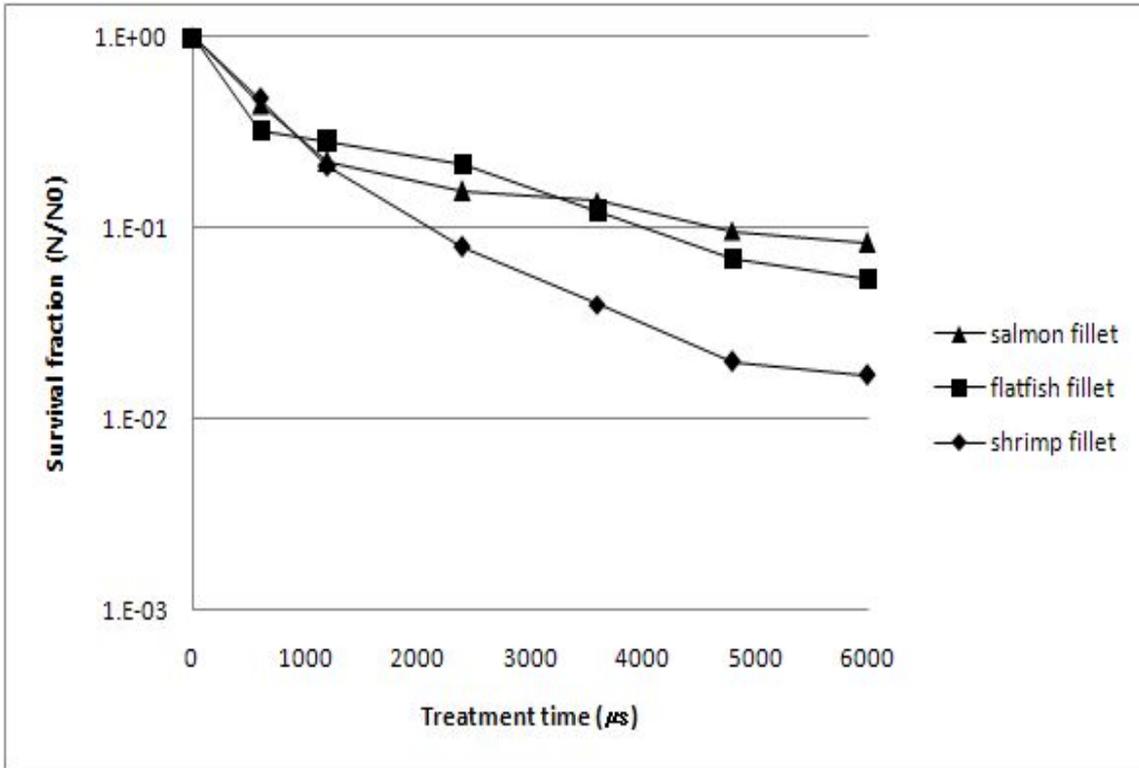


Fig. 3-25. Survival fraction of *E. coli* O157:H7 in sea foods as a function of treatment time of IPL at 25 kV

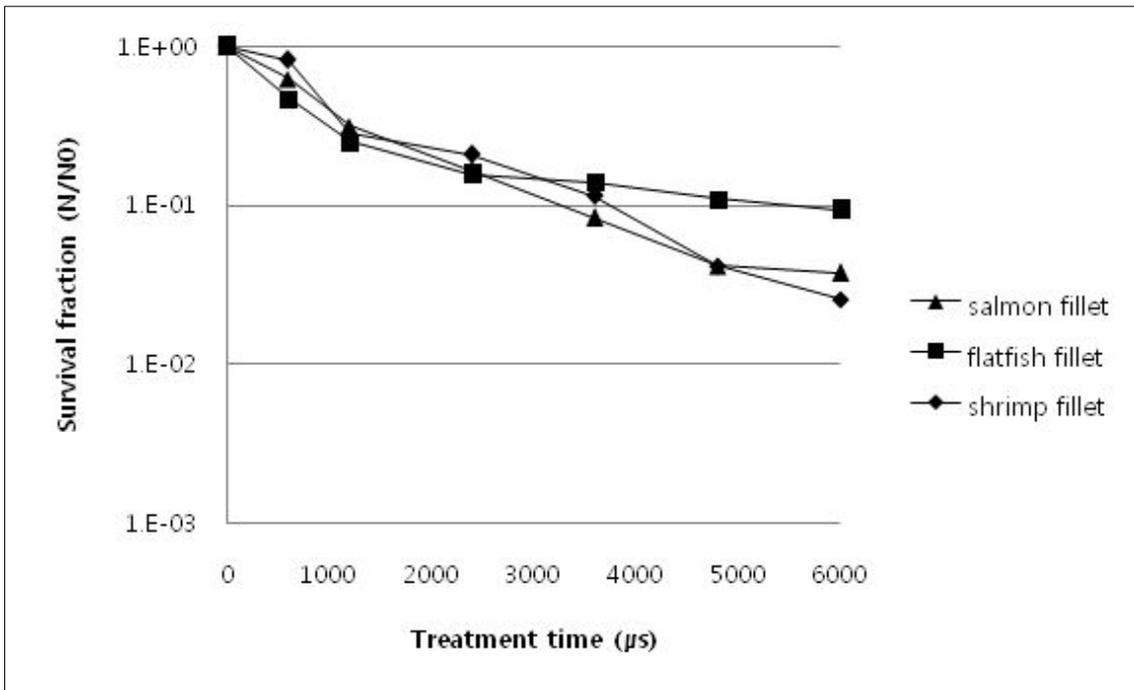


Fig. 3-26. Survival fraction of *L. monocytogenes* in sea foods as a function of treatment time of IPL at 25 kV

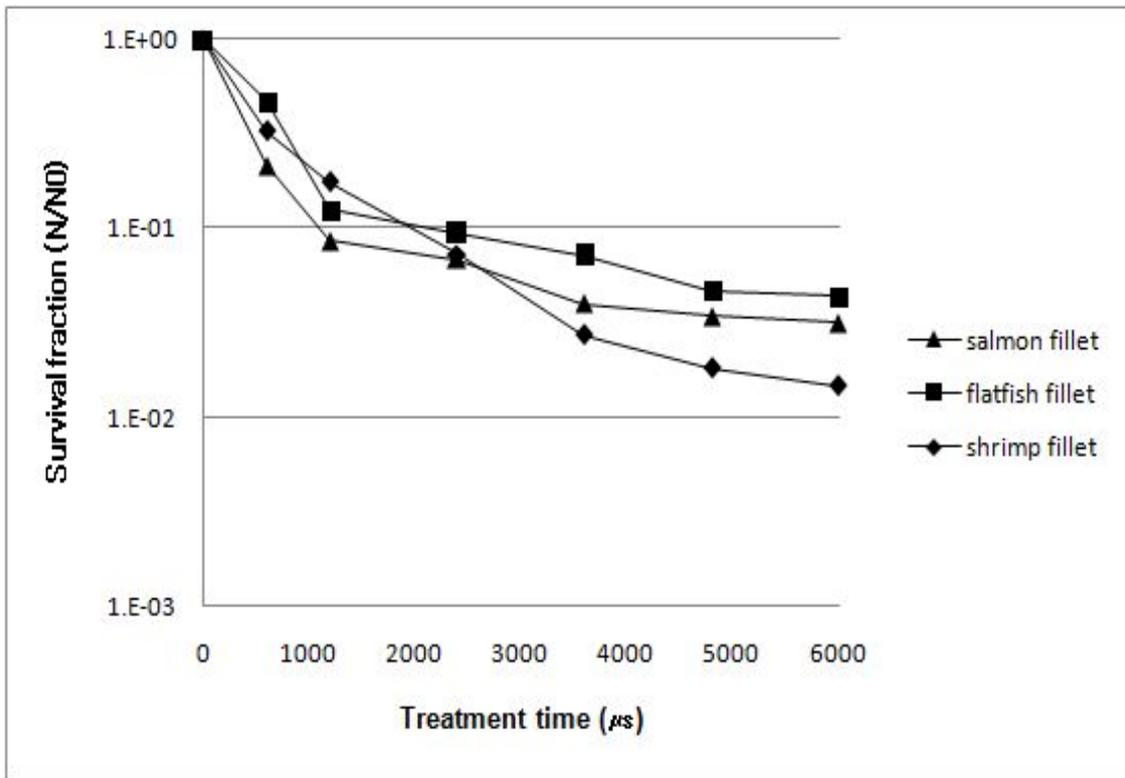


Fig. 3-27. Survival fraction of *P. aeruginosa* in sea foods as a function of treatment time of IPL at 25 kV

2. 수산 식품 표면의 위해세균의 저감효과

가. 실험방법

(1) 사용균주

- E. coli* O157:H7
- Listeria monocytogenes*
- Pseudomonas aeruginosa*

(2) Sample

- 연어 fillet
- 광어 fillet
- 새우 fillet

(3) Sample 준비 및 접종

- 냉동보관 상태인 연어, 광어, 새우 fillet를 흐르는 물에서 10분간 해동시킴.
- 표면상의 물기를 잘 제거한 후 준비한 균 현탁액 0.01 mL을 sample 표면에 조금씩 떨어뜨리면서 살균된 유리막대를 이용하여 spreading하며 표면에 고루 퍼질 수 있게 접종함.
- 준비된 sample을 treatment time을 변수로 설정하여 High-intensity pulsed light를 적용함.

(4) 생균수 측정

- 광펄스 처리된 연어, 광어, 새우 fillet 표면의 위해세균 저감 효과를 보기 위해 접종하여 처리한 면을 TSA 배지에 찍고, 배지 위에 10 mL의 살균된 증류수를 가한 뒤 살균된 spreader로 표면을 잘 긁어 희석함. 다시 예측된 희석배수만큼 희석한 뒤 TSA 배지에 spreading하였고, 37°C 24-48시간 동안 incubator에서 배양 후 생균수를 측정함.

나. 실험결과

- Sample 표면에 *E. coli* O157:H7을 접종한 뒤 25 kV, 5 Hz에서 treatment time을 변수로 설정하여 High-intensity pulsed light를 적용함. 그 결과, 연어 fillet 는 6000 μ s 처리 후 약 2.5 log 정도의 사멸 결과를 얻을 수 있었고, 광어 fillet 는 약 2.2 log 정도의 사멸 결과를, 새우 fillet 는 약 3.6 log 정도의 결과를 얻을 수 있었음(Fig 3-28)
- Sample 표면에 *L. monocytogenes*를 접종한 뒤 25 kV, 5 Hz에서 treatment time을 변수로 설정하여 High-intensity pulsed light를 적용함. 그 결과, 연어 fillet는 6000 μ s 처리 후 약 2.2 log 정도의 사멸 결과를 얻을 수 있었고, 광어 fillet는 약 1.8 log 정도의 사멸 결과를, 새우 fillet는 약 3 log 정도의 결과를 얻을 수 있었음(Fig 3-29).
- Sample 표면에 *Pseudomonas aeruginosa* 를 접종한 뒤 25 kV, 5 Hz에서 treatment time을 변수로 설정하여 High-intensity pulsed light를 적용함. 그 결과, 연어 fillet 는 6000 μ s 처리 후 약 3 log 정도의 사멸 결과를 얻을 수 있었고, 광어 fillet 는 약 2 log 정도의 사멸 결과를, 새우 fillet 는 약 3.5 log 정도의 결과를 얻을 수 있었음(Fig 3-30).
- 광펄스 처리 후, sample 전체의 총균수를 살펴본 실험과 표면만의 살균 효과에 대한 실험 결과를 비교해 본 결과, 표면의 살균 효과가 뛰어남. Sample 조직 자체의 영향으로 접종 시 균액이 표면에만 남아있지 않고 스며들어 불투명한 고체 식품의 경우 두께에 따라 살균효과가 다르고, 표면 살균 효과에 탁월한 광펄스가 가지는 한계점을 극복하지 못한 결과 예상됨.

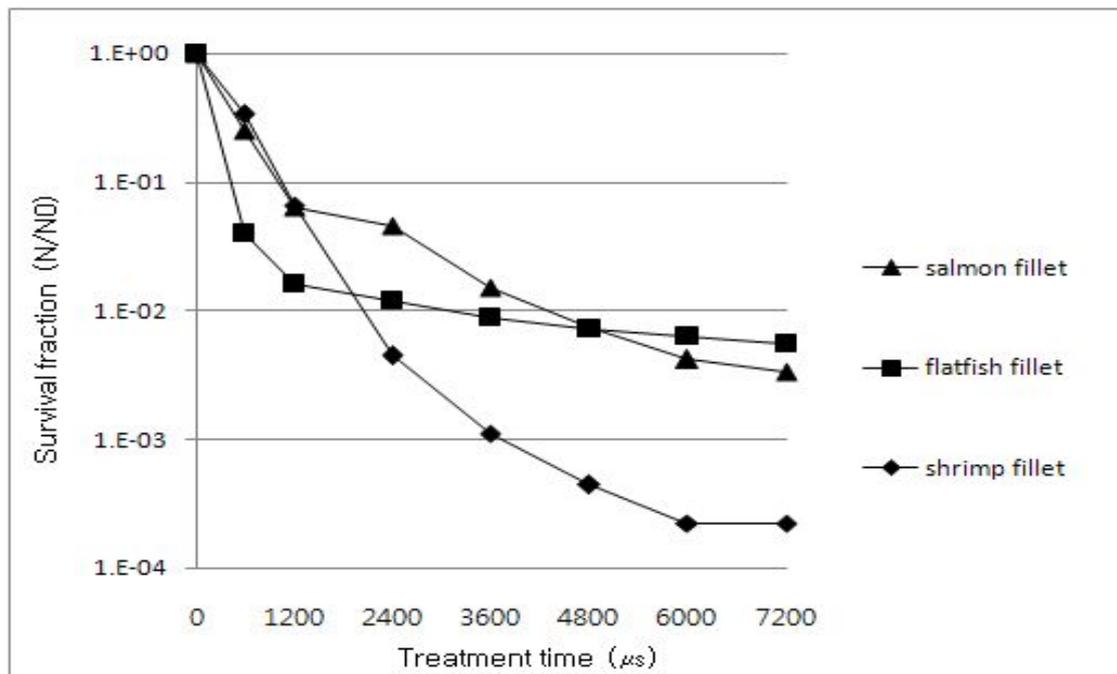


Fig. 3-28. Survival fraction of *E. coli* O157:H7 on the surface of sea foods as a function of treatment time of IPL at 25 kV

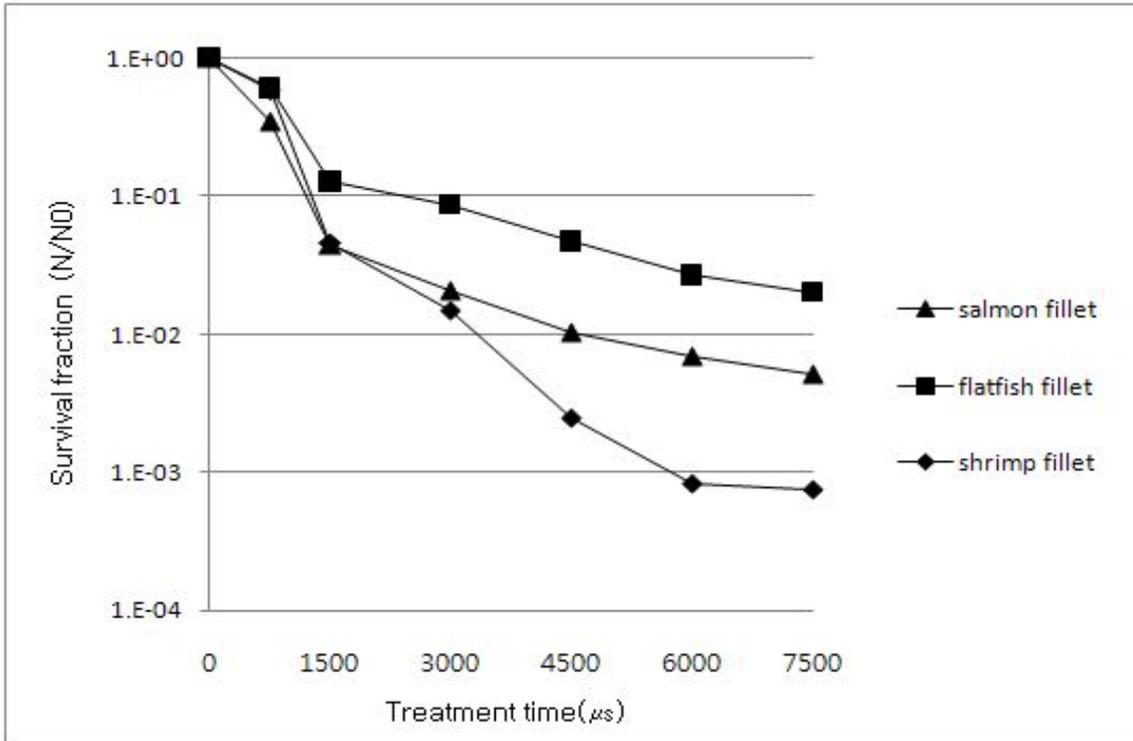


Fig. 3-29. Survival fraction of *Listeria monocytogenes* on the surface of sea foods as function of treatment time of IPL at 25 kV

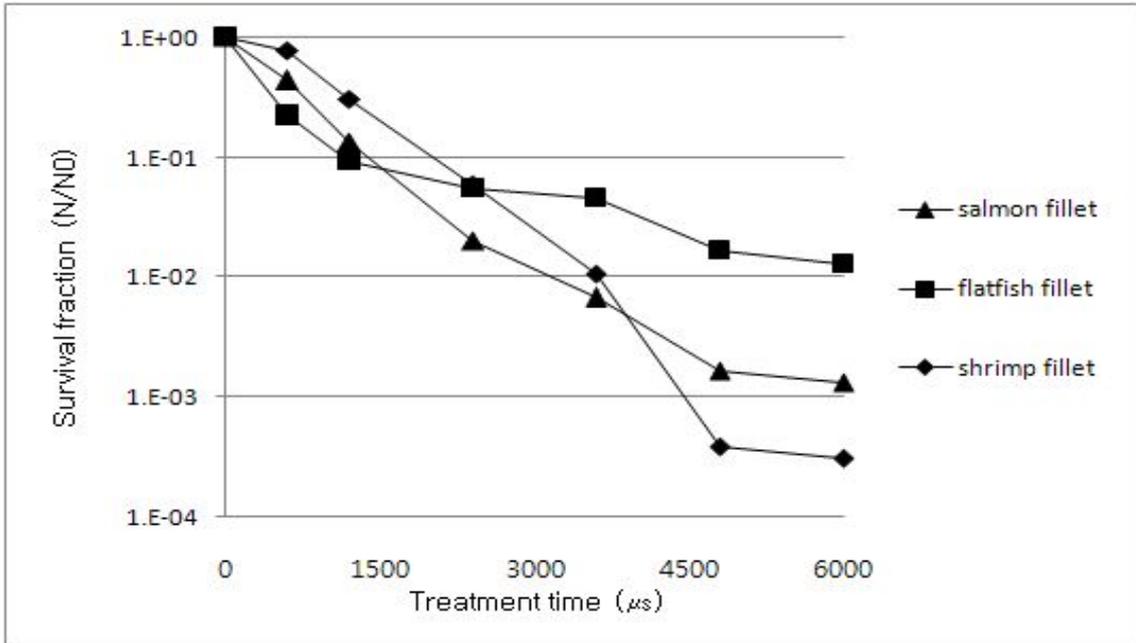


Fig. 3-30. Survival fraction of *Pseudomonas aeruginosa* on the surface of sea foods as a function of treatment time of IPL at 25 kV

제 6 절 Transmission electron microscope(TEM) 측정

가. 실험방법

- Transmission electron microscopy(TEM) 을 이용하여 광펄스 처리 후 균 세포의 내부 변화 양상을 관찰하였음.
- 25 kV, 1500 μ s 처리를 한 *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Pseudomonas aeruginosa* 세포 현탁액과 무처리 시료를 고정액(2% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde in 0.05 M sodium cacodylate buffer)에서 overnight한 후에 0.05 M sodium cacodylate buffer로 세척하였음. 후고정액으로 1% osmium tetroxide를 사용하였으며, 2시간 고정하여 다시 세척된 증류수로 세척한 뒤, 0.5% uranyl acetate로 en bloc staining을 1시간 동안 하였음.
- 그리고 탈수 용매제 ethanol 50, 70, 80, 90%에 각각 10분 동안 탈수시킨 후, 마지막으로 100% ethanol로 10, 10, 10분으로 나누어 탈수시킨 뒤, 100% propylene oxide에 15분간 2번 치환하였음. 이를 spurr's resin 과 propylene oxide를 1:1로 혼합하여 2시간 동안 포매(embedding)하였음.
- Ultramicon(MT-X, RMC, Tucson, Az, USA)으로 sample을 semi- section하고, 광학 현미경으로 관찰한 다음 전자 현미경으로 관찰하고자 하는 부위를 정하여 thin section을 한 뒤, 완성된 section을 2% uranyl acetate액에 7분, reynolds lead citrate액에 7분 동안 전자염색을 하였음.
- 염색이 끝난 후 증류수로 washing을 하여 건조하고 TEM(Libra 120, Carl zeiss, Germany)을 이용하여 세포를 관찰하였음.

나. 실험결과

- 광펄스 처리 전과 처리 후 *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Pseudomonas aeruginosa* 세포의 내부적인 변화를 관찰하기 위해 광의 세기 25 kV에서 1500 μ s 처리 후에 세포의 내부를 Transmission electron microscopy(TEM)을 이용하여 관찰하였음.

- Fig. 3-31과 같이 광펄스 처리를 하지 않은 control 세포는 세포벽과 세포막이 온전하며, 세포 내 구성 물질이 고르게 존재하였으나, intense pulsed light 처리를 받은 세포는 세포벽과 세포막의 구분이 불분명해졌으며, 세포 내 물질도 상당 부분 유실된 것을 볼 수 있었음.
- 또한 세포막 부분이 터져 외부로 유출되는 모습도 보였음. 이는 intense pulsed light의 사멸기작의 한 부분으로서 세포벽과 세포막의 손상에 의한 세포 내 물질 유출 때문이라는 것을 알 수 있었음.
- 세포 내부 구조에 차이가 있는 그람 양성균(*Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*)과 그람 음성균(*E. coli* O157:H7, *Pseudomonas aeruginosa*)을 나누어 결과를 살펴보면, 두꺼운 펩티도글리칸 층의 세포벽을 가지고 있는 *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*와 같은 그람 양성균은 세포벽이 유실된 부분도 있었지만 형태는 비교적 뚜렷하게 남아 있었음.
- 그러나 얇은 세포벽을 가진 *E. coli* O157:H7, *Pseudomonas aeruginosa*와 같은 그람 음성균은 세포벽이 상당 부분 손상되어 울퉁불퉁해지고 세포막 부분이 전체적으로 터져 외부로 많이 유출되는 모습을 관찰할 수 있었음.
- 따라서 광펄스 처리는 그람 양성균보다 상대적으로 그람 음성균의 손상에 더 큰 영향을 줄 가능성이 크다는 사실을 알 수 있었음.

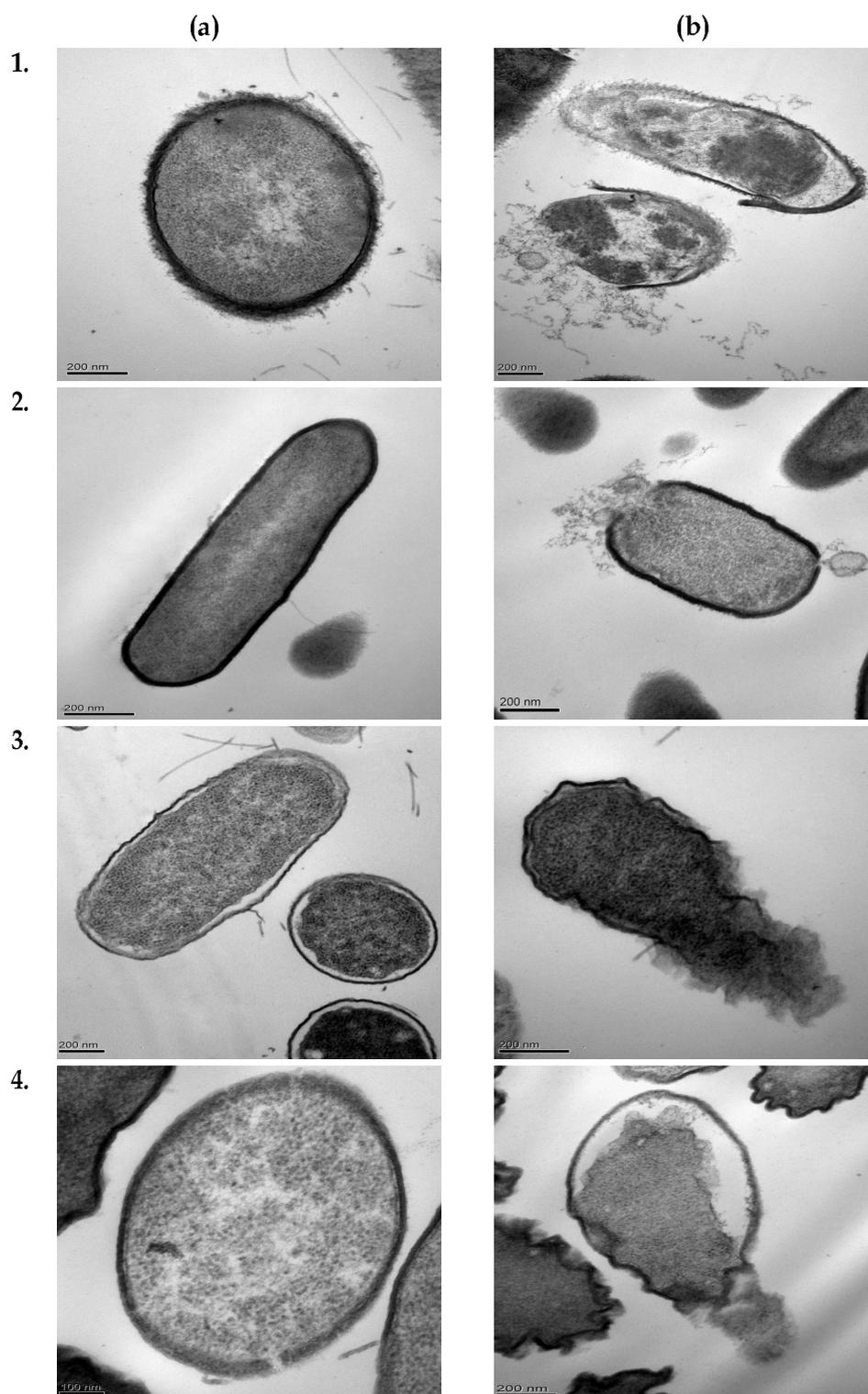


Fig. 3-31 Evaluation of intense pulsed light induced damages in microorganisms by TEM: (a) control, (b) intense pulsed light treatment.

1. *Bacillus cereus*, 2. *Listeria monocytogenes*, 3. *E. coli* O157:H7, 4. *Pseudomonas aeruginosa*.

제 7 절 소형화 시스템을 이용한 수산식품에 대한 광펄스 기술 적용시험

가. 실험방법

(1) 사용균주

- Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*를 각각 5 mL의 TSB(Tryptic soy broth), 37 °C, 250 rpm으로 shaking incubator에서 overnight하여 전 배양함.
- 전배양된 배양액 1 mL를 취해 100 mL의 TSB에 첨가 후, *E. coli* O157:H7는 37°C, 250 rpm에서 5시간, *L. monocytogenes*는 37°C, 250 rpm에서 11시간, *P. aeruginosa*는 37°C, 250 rpm에서 5시간 분 배양하였으며, 초기균수 5×10^7 CFU/100 μ L가 되도록 희석해 줌.
- 이렇게 대수증식기 후반까지 배양된 박테리아를 4000 rpm으로 10 min 원심 분리 후, 살균된 생리식염수(0.85% NaCl solution)에 2회 세척하여 접종 시 사용함.

(2) Sample 준비 및 접종

- 냉동보관 상태인 연어, 광어, 새우 fillet를 흐르는 물에서 10분간 해동시킴.
- 표면상의 물기를 잘 제거한 후 준비한 균 현탁액 0.01 mL을 sample 표면에 조금씩 떨어뜨리면서 spreading하여 표면에 고루 퍼질 수 있게 접종함.

(3) 개발된 광펄스 발생 장치 및 광원의 에너지밀도 측정

- 실험실 용량으로 설계 및 제작된 광펄스 실험 장치를 사용함.
- 광펄스 발생 장치는 triggering voltage 16 kV 이상의 DC를 발생시킬 수 있는 전원 발생부와 펄스의 길이 및 주파수를 조절할 수 있는 조절부, 광원으로 사용되는 램프, 처리 용기로 구성됨.
- 광펄스 처리 용기는 시료대의 위치를 조절하여 시료 표면과 램프 사이의 거리를 조절할 수 있으며, 석영판과 fan을 통해 용기 내부 온도가 급격히 상승

하는 것을 차단할 수 있도록 자체 제작된 것을 사용함.

- 광펄스 처리를 위해 사용한 광원은 59 kPa의 압력으로 xenon을 충전한 quartz 재질의 Heraeus Noblelight Series를 사용하였고, 광원의 에너지밀도는 spectroradiometer를 이용하여 maintaining voltage 500-800 V, Frequency 5, 10 Hz, treatment time 별로 모두 측정하였으며, 그 total irradiance를 J/cm²으로 환산하여 기록 및 광펄스 처리 실험 시 적용함.

(4) 접종된 시료에 대한 광펄스 처리

- 광펄스 실험 장치의 control sample은 균을 접종하고 아무 처리도 해주지 않은 시료로 하였으며, 에너지밀도를 변수로 설정하여 준비된 sample에 각각 광펄스 조사함.
- 시료와 램프 사이의 거리는 12 cm가 되도록 놓고, 처리 용기를 밀봉한 후 광펄스 처리를 실시함.

(5) 생균수 측정

- 광펄스 처리된 연어, 광어, 새우 fillet를 살균된 0.85% NaCl과 함께 stomach bag에 넣고 stomacher를 이용하여 9 h/s로 3분 간 잘 분쇄한 후, 살균된 0.85% NaCl에 희석하여 TSA 배지(tryptic soy agar)에 spreading하였음.
- 접종된 시료를 37°C 24-48시간 동안 incubator에서 배양한 후, 생균수를 측정하였으며, 각 실험군은 2번씩 반복 측정하여 CFU/mL로 나타내었음.

실험 균주	배양		균수확인		
	MEDIA	배양조건	dilution	MEDIA	culture
<i>E. coli</i> O157:H7	Tryptic soy broth (TSB)	37°C, 250 rpm shaking incubation, 5 h	0.85% NaCl solution	Tryptic soy agar (TSA)	37°C 36 h
<i>Listeria monocytogenes</i>		37°C, 250 rpm shaking incubation, 11 h			37°C 48 h
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		37°C, 250 rpm shaking incubation, 5 h			37°C 24 h

(6) 광펄스 처리 시 온도 측정

- 비열 살균인 광펄스 처리 시 샘플의 온도변화를 파악하기 위해 Fo monitor를 이용하여 광펄스를 처리하는 동안 시료 표면의 온도변화를 측정함.
- 각각 시료의 램프 사이의 거리를 12, 17, 22, 27, 31.5 cm로 놓고, 에너지밀도에 따라 광펄스 처리를 행하면서 온도변화를 측정함.

나. 실험 결과

(1) 광펄스에 의한 연어 fillet의 살균

- 연어 fillet의 표면에 *E. coli* O157:H7을 접종한 뒤 에너지밀도를 변수로 설정하여 High-intensity pulsed light를 적용함. 그 결과, 에너지밀도 31.611 J/cm²의 광펄스 처리 후, 약 2.3 log 정도의 사멸 결과를 얻을 수 있었음 (Fig. 3-32)
- 연어 sample 표면에 *P. aeruginosa*을 접종한 뒤 에너지밀도를 변수로 설정하여 광펄스 처리함. 그 결과, 에너지밀도 31.611 J/cm²의 광펄스 처리 후, 약 1 log 정도의 사멸 결과를 얻을 수 있었음(Fig. 3-33)
- 연어 fillet의 표면에 *L. monocytogenes*를 접종한 뒤, 에너지밀도를 변수로 설정하여 광펄스 처리함. 그 결과, 에너지밀도 31.611 J/cm²의 광펄스 처리 후, 약 2.9 log 정도의 결과를 얻을 수 있었음(Fig 3-34)

(2) 광펄스에 의한 광어 fillet의 살균

- 광어 fillet의 표면에 *E. coli* O157:H7을 접종한 뒤 에너지밀도를 변수로 설정하여 High-intensity pulsed light를 적용함. 그 결과, 에너지밀도 31.611 J/cm²의 광펄스 처리 후, 약 2 log 정도의 사멸 결과를 얻을 수 있었음(Fig. 3-35).
- 광어 sample 표면에 *P. aeruginosa*을 접종한 뒤 에너지밀도를 변수로 설정하여 광펄스 처리함. 그 결과, 에너지밀도 29.357 J/cm²의 광펄스 처리 후, 약 1.2 log 정도의 사멸 결과를 얻을 수 있었음(Fig 3-36).

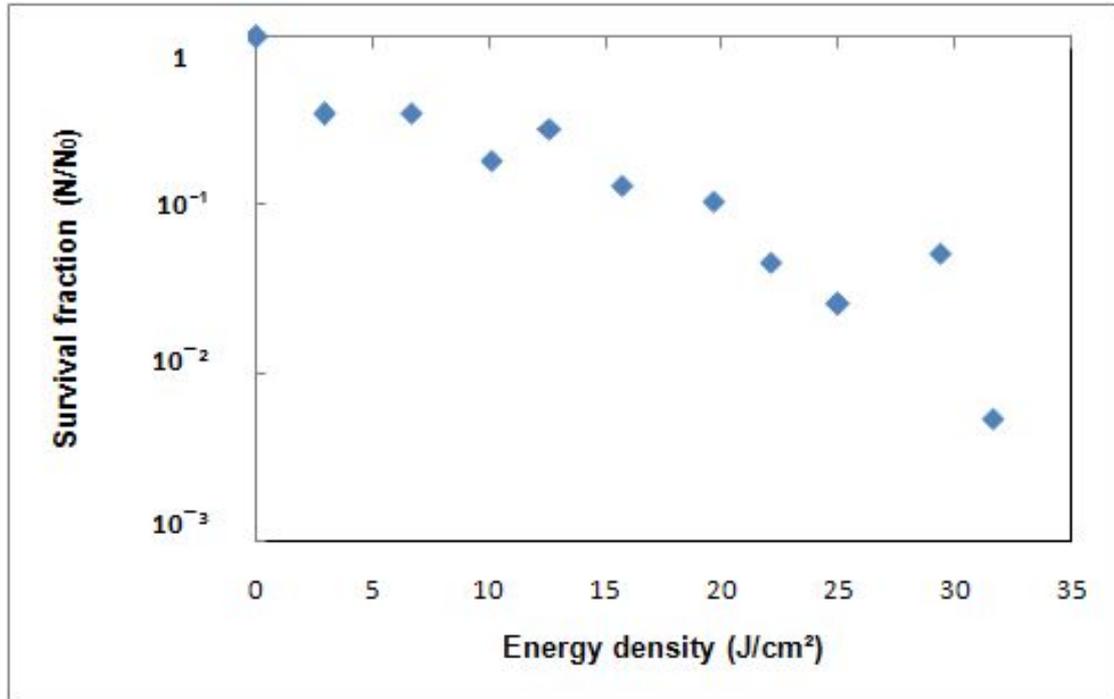


Fig. 3-32. Survival fraction of *E. coli* O157:H7 in salmon fillet as a function of energy density of IPL.

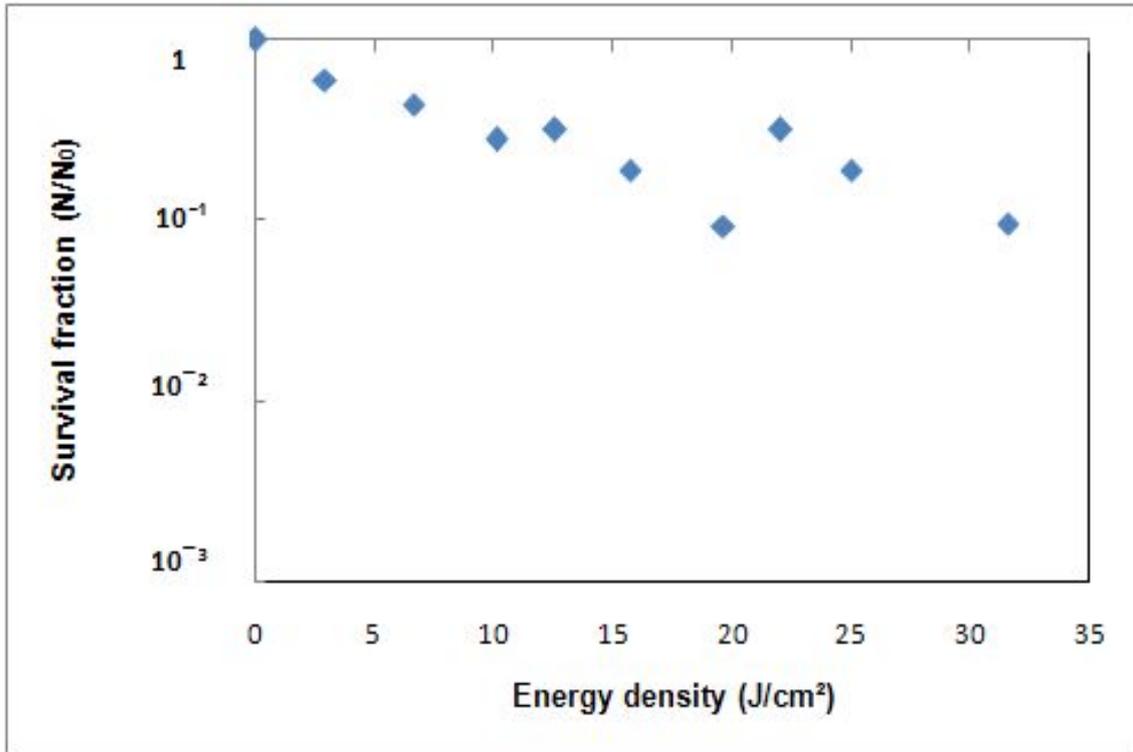


Fig. 3-33. Survival fraction of *P. aeruginosa* in salmon fillet as a function of energy density of IPL.

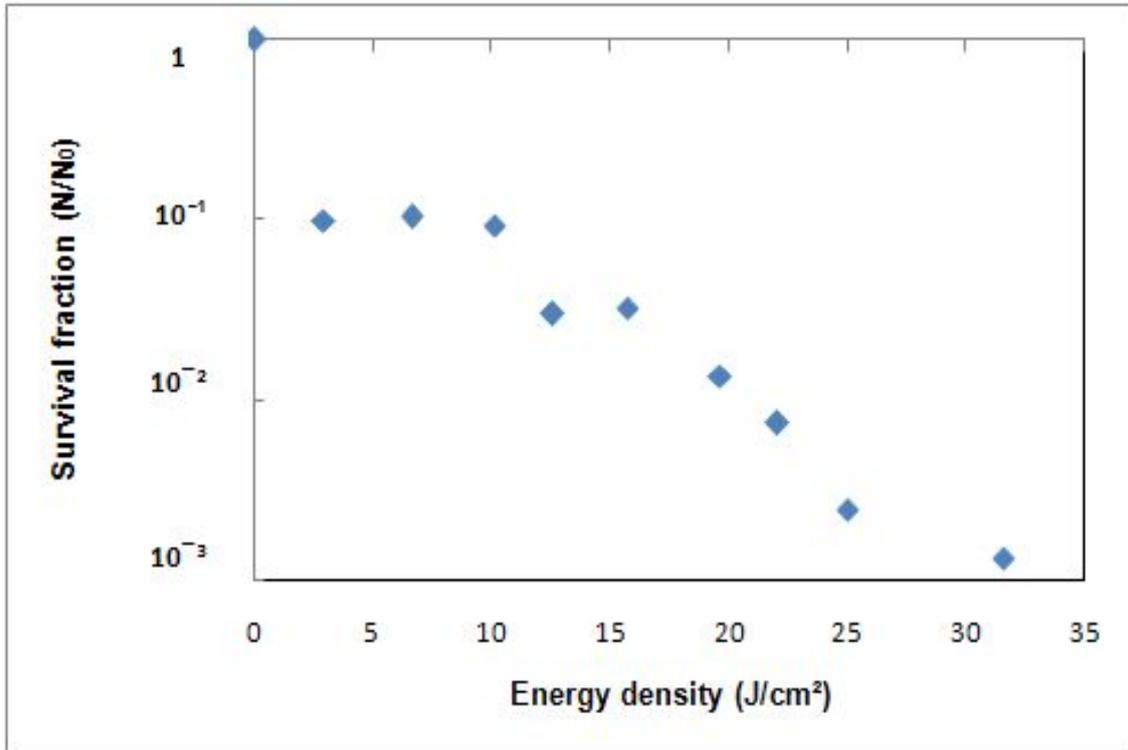


Fig. 3-34. Survival fraction of *L. monocytogenes* in salmon fillet as a function of energy density of IPL.

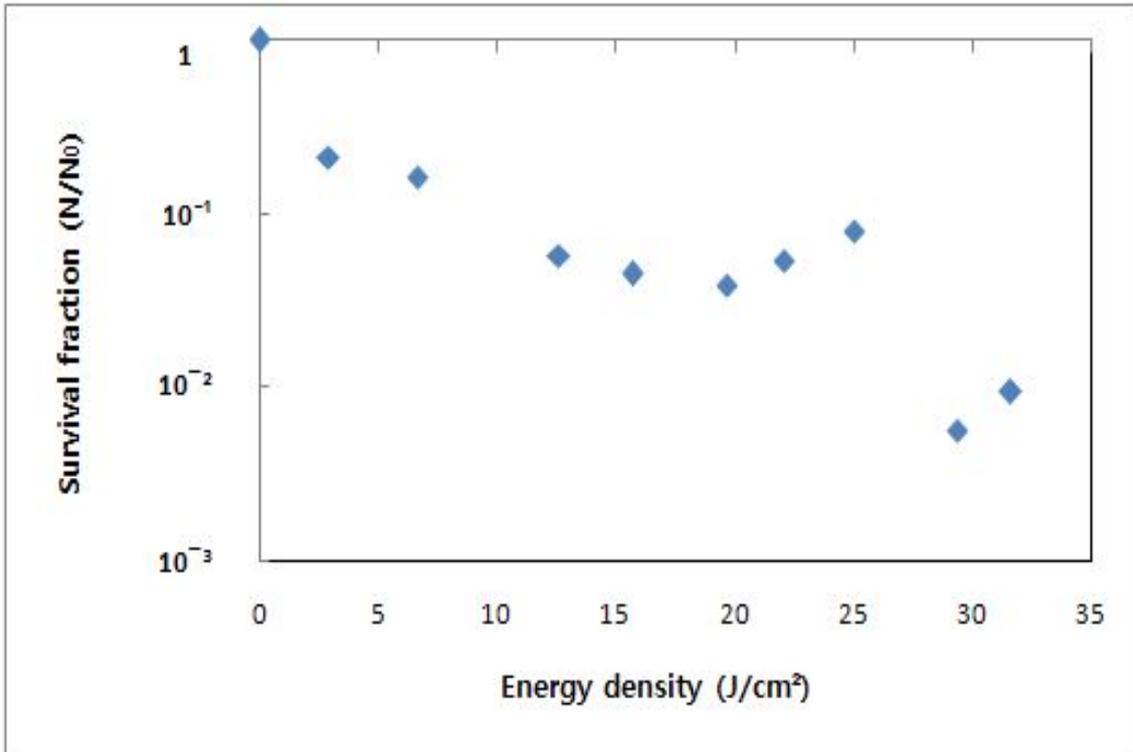


Fig. 3-35. Survival fraction of *E. coli* O157:H7 in flatfish fillet as a function of energy density of IPL.

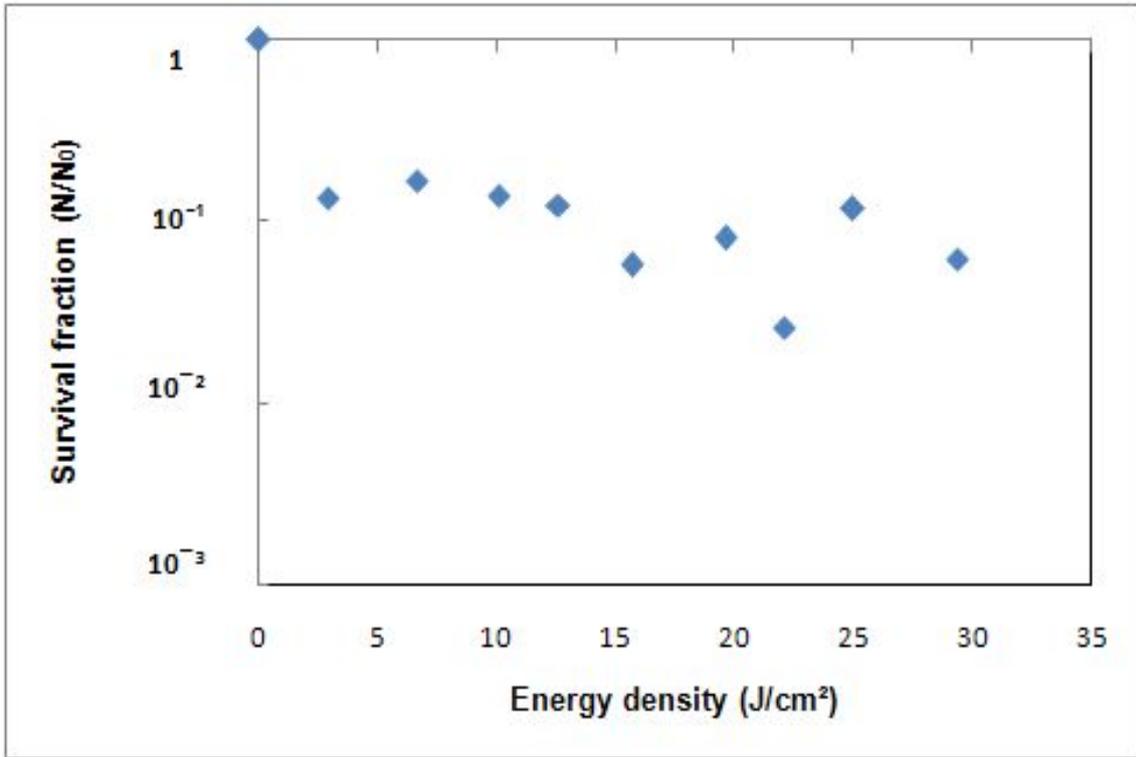


Fig. 3-36. Survival fraction of *P. aeruginosa* in flatfish fillet as a function of energy density of IPL.

- 광어 fillet의 표면에 *L. monocytogenes*를 접종한 뒤, 에너지밀도를 변수로 설정하여 광펄스 처리를 실시함. 그 결과, 에너지 밀도 22.068 J/cm²의 광펄스 처리 후, 약 3 log 정도의 사멸 결과를 얻을 수 있었음(Fig 3-37)

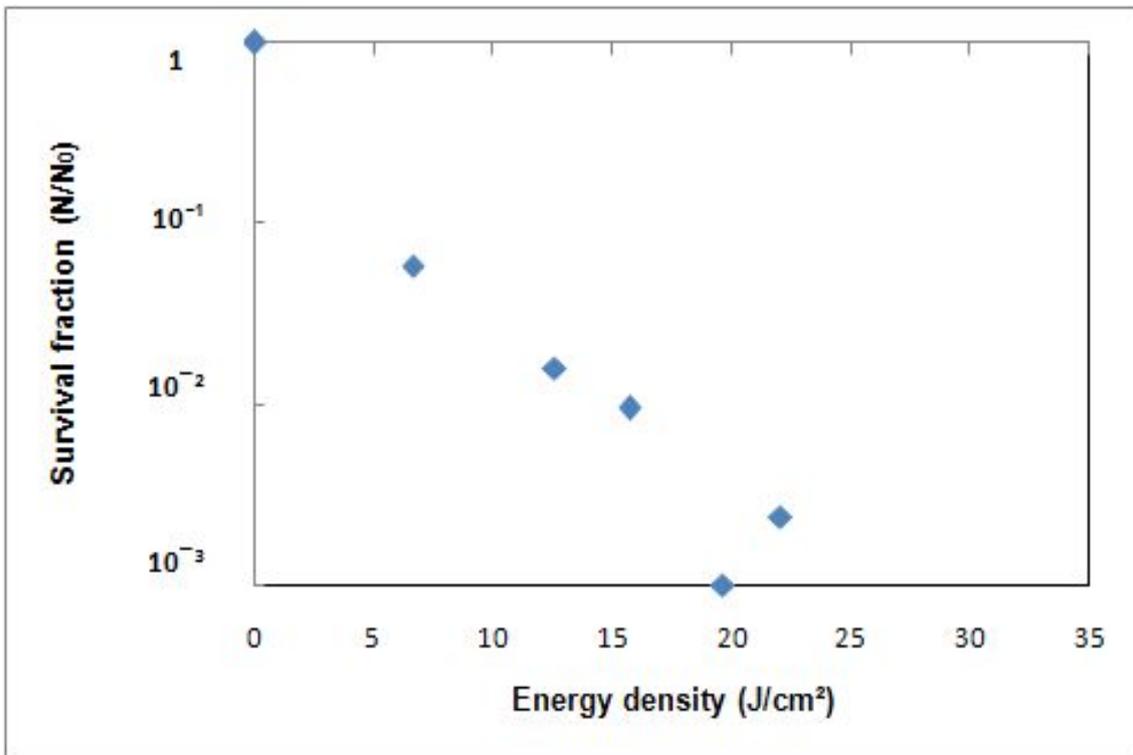


Fig. 3-37. Survival fraction of *L. monocytogenes* in flatfish fillet as a function of energy density of IPL.

(3) 광펄스에 의한 새우 fillet의 살균

- 새우 fillet의 표면에 *E. coli* O157:H7을 접종한 뒤 에너지밀도를 변수로 설정하여 High-intensity pulsed light를 적용함. 그 결과, 에너지밀도 31.611 J/cm²의 광펄스 처리 후, 약 1.1 log 정도의 사멸 결과를 얻을 수 있었음(Fig 3-38)
- 새우 fillet의 표면에 *P. aeruginosa*를 접종한 뒤, 에너지밀도를 변수로 설정하여 광펄스 처리를 실시함. 그 결과, 에너지밀도 29.357 J/cm²의 광펄스 처리 후, 약 1.4 log 정도의 결과를 얻을 수 있었음(Fig 3-39).

(4) 광펄스 처리 시 온도 변화

- F₀ monitor를 이용하여 에너지밀도별로 광펄스 처리 시 샘플 표면의 온도가 광원과의 거리에 따라 변화하는 정도에 대하여 실험을 실시함. 시료 표면의 초기 온도는 모두 27-30℃이었으며, 그 결과는 Fig 3-40과 같음.
- 광펄스의 에너지밀도가 증가함에 따라, 그리고 시료와 램프 사이의 거리가 가까워질수록 높은 온도 상승률을 나타냄.
- 실험 조건 중 12-31.5 cm의 모든 거리에서, 32 J/cm² 미만의 모든 에너지밀도 조건으로 연어 fillet을 광펄스 처리했을 시, sample 표면의 온도는 50℃ 이하였으며, 약 20℃ 정도의 온도 상승이 관찰됨.
- 본 결과로부터 식품살균에 적합한 광의 세기로서 미국 FDA가 권고하는 12 J/cm²의 에너지밀도 이하에서는 시료와 램프와의 거리에 관계없이 10℃ 이하의 온도 상승이 관찰되었으며, 이러한 사항은 향후 산업화 적용단계에서 기술의 안전성 측면이나 적용되는 식품의 품질측면에서 매우 중요하게 고려되어야 할 것으로 사료됨.
- 본 연구에서 시료와 램프와의 거리로 설정된 12 cm에서 12 J/cm²의 에너지밀도 부근에서의 각 생선 fillet 표면에 접종된 미생물의 사멸정도를 살펴보면 Table 3-9와 같음.

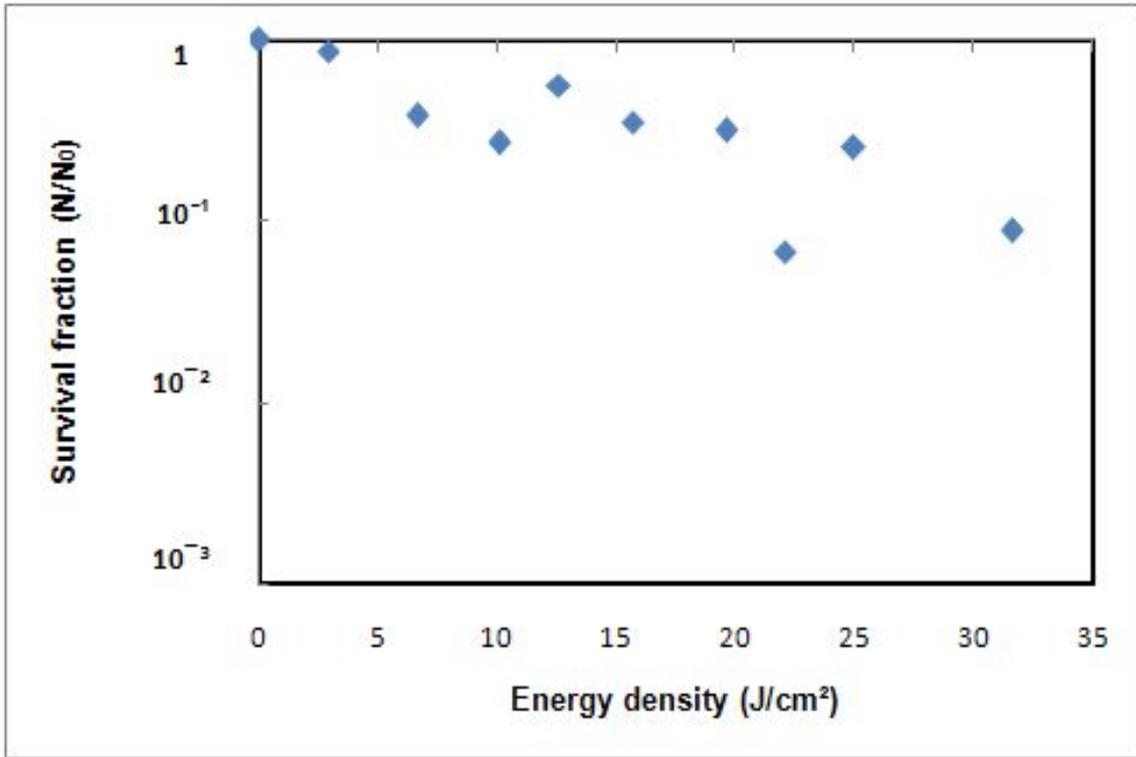


Fig. 3-38. Survival fraction of *E. coli* O157:H7 in shrimp fillet as a function of energy density of IPL.

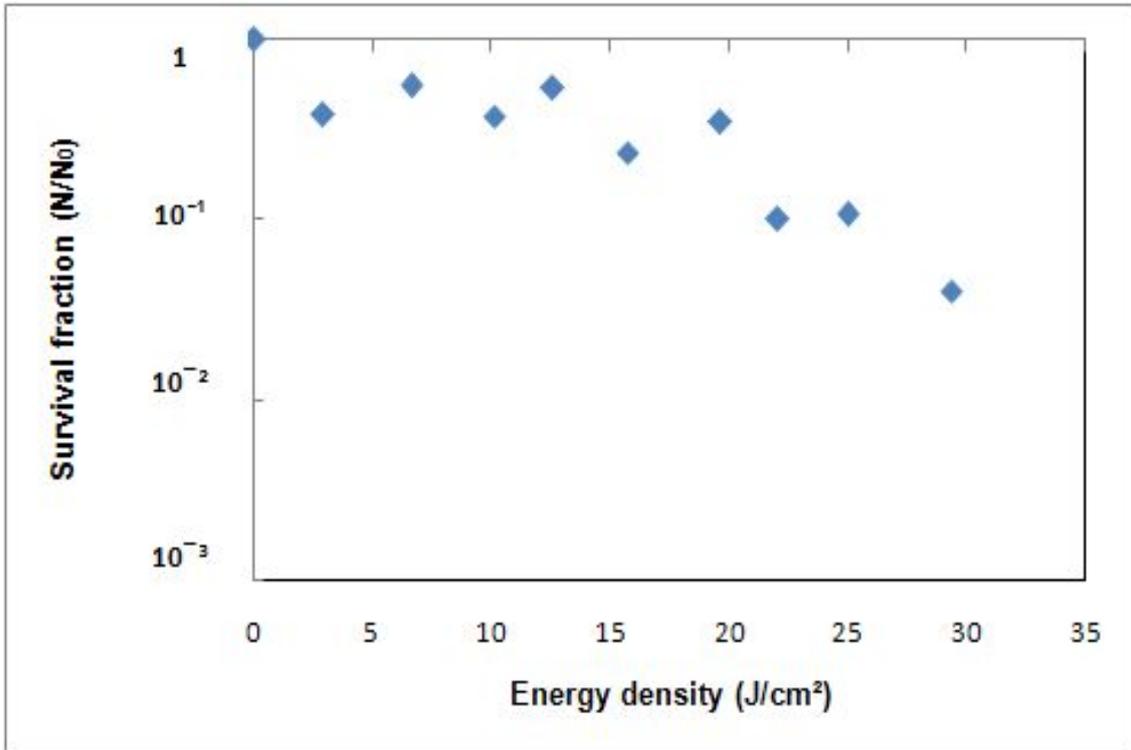


Fig. 3-39. Survival fraction of *P. aeruginosa* in shrimp fillet as function of energy density of IPL.

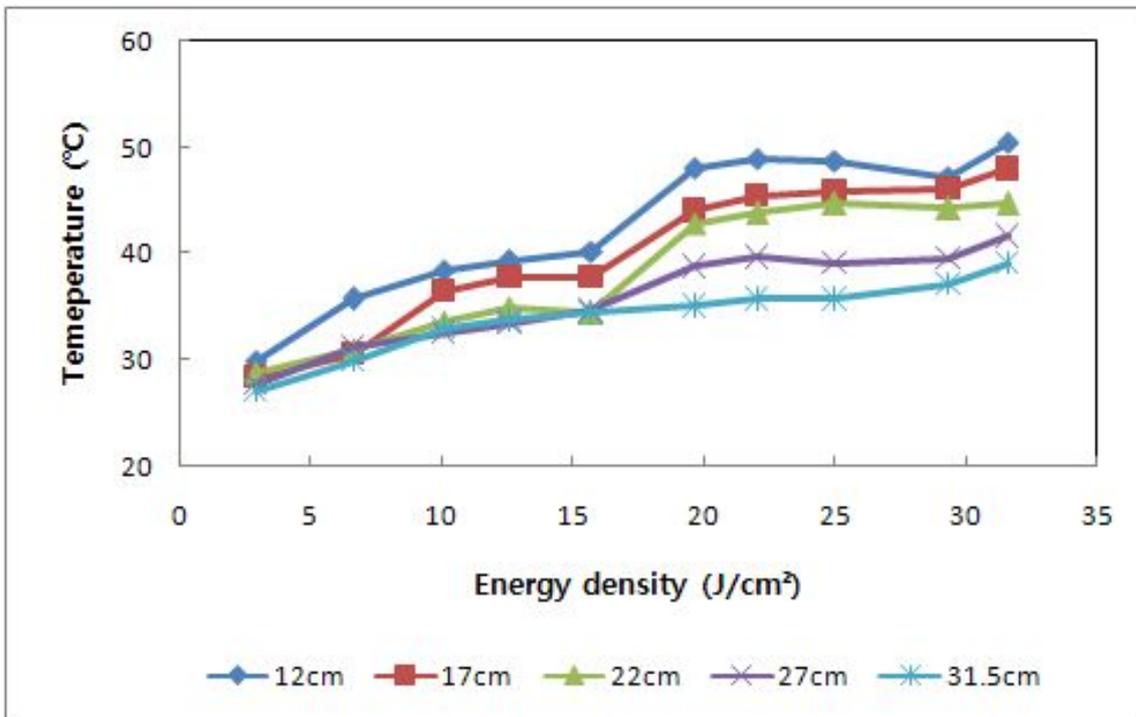


Fig. 3-40. Temperature profile on surfaces of salmon fillets at various distances from lamp during IPL treatment.

Table 3-9. Sterilization effect of IPL treatment with energy density of 12 J/cm² (Illuminating distance: 12 cm from sample)

	Log reduction		
	Salmon fillet	Flatfish fillet	Shrimp fillet
<i>E. coli</i> O157:H7	1.2	1.3	0.8
<i>L. monocytogenes</i>	0.8	1.0	-
<i>P. aeruginosa</i>	1.8	2.1	0.8

제 8 절 소형화 광펄스 시스템 처리 수산식품의 저장시험

가. 실험방법

(1) Sample 준비 및 control sample 보관

- 냉동보관 상태인 연어, 광어, 새우 fillet를 흐르는 물에서 10분간 해동시킴.
- 표면상의 물기를 잘 제거한 후 한 조각의 생선 fillet(2-3 g)를 반으로 절단하여 1/2 조각을 untreated control sample로서 빈 plate에 밀봉하여 2-4℃에 보관함.
- 미생물 및 이화학적 분석을 통해 냉장 저장기간 중 0, 2, 4, 6, 8, 10일 간격으로 control sample의 품질 변화를 관찰함.

(2) 소형화 시스템을 이용한 광펄스 처리 및 treated sample 보관

- 에너지밀도 12 J/cm² 부근의 광펄스 처리 조건에서 (1)에서 준비된 나머지 1/2 조각의 sample에 광펄스를 조사함.
- 시료와 램프 사이의 거리는 12 cm가 되도록 하였으며, 처리 용기를 밀봉한 후 2-4℃에 보관함.
- 미생물 및 이화학적 분석을 통해 냉장 저장기간 중 0, 2, 4, 6, 8, 10일 간격으로 광펄스 처리된 sample의 품질 변화를 관찰함.

(3) 생균수 측정

- 보관된 연어, 광어, 새우 fillet를 살균된 0.85% NaCl과 함께 stomach bag에 넣고 stomacher를 이용하여 9 h/s로 3 min간 잘 분쇄한 후, 살균된 0.85% NaCl에 희석하여 PCA 배지(plate count agar)에 spreading하였음.
- 접종된 시료를 37℃ incubator에서 24-48시간 동안 배양한 후, 생균수를 측정하였으며, CFU/mL로 나타내어 각 날짜별로 control과 처리군을 비교하였음.

(4) pH 및 색도 측정

- 보관된 연어, 광어, 새우 fillet에 증류수를 가하여 10배 희석하고 stomacher로 잘 마쇄한 뒤, pH meter(ORION)를 이용하여 pH를 3번 반복 측정함.
- 색도는 ColorQuest XE Spectrocolorimeter(Hunter Lab)를 이용하여 연어, 광어, 새우 fillet에 대한 Hunter L(명도), a(적색도), b(황색도) 및 ΔE (색차) 값을 측정함. 각 sample은 3번 반복 측정하여 평균값으로 나타냄.

(5) Texture 측정

- Texture analyzer(TA-XT2i)를 이용하여 보관된 연어, 광어, 새우 fillet에 대한 texture profile analysis(TPA)를 실시함.
- Cylindrical aluminium probe(No. P/20a)를 이용하여 Pre-test speed, test speed, post-test speed 모두 1.0 mm/sec, time 2.00 sec, distance 80% strain 의 조건에서 3회 반복 측정하여 평균값을 표시함.
- TPA 곡선 분석을 통해 각 sample의 hardness, fracturability, adhesiveness, springiness, cohesiveness, gumminess, chewiness 값을 얻음. 이때, 점착성은 'Gumminess = Hardness x Cohesiveness x 100' 식에 의해서, 그리고 저작성은 'Chewiness = Gumminess x Springiness' 식에 의해 계산하여 그 값을 얻음.

나. 실험 결과

(1) 생균수 측정 결과

- 저장기간 동안 날짜별로 각각 control sample 및 12 J/cm²의 에너지밀도로 광펄스 처리된 연어, 광어, 새우 fillet의 총균수 비교를 실시함(Table 3-10).

Table 3-10. Changes in total viable cells of control and treated samples.

Storage period (days)	Salmon fillet (CFU/mL)		Flatfish fillet (CFU/mL)		Shrimp fillet (CFU/mL)	
	Control	IPL 처리	Control	IPL 처리	Control	IPL 처리
0	0	0	80	0	1400	140
2	1800	0	0	0	4600	116
4	0	0	80	0	7000	76
6	200	0	80	0	21,800	456
8	10,400	0	0	0	4000	400
10	0	0	80	0	6000	80

- 위의 표에서 연어 fillet의 경우 4일 및 10일 저장시료는 원 시료에 균이 존재하지 않았던 것으로 보이며, 2일, 6일 및 8일 저장시료와 같이 원 시료에 균이 존재한 경우에는 광펄스 살균에 의해 모두 사멸하였음. 특히 저장기간 8일 시료의 경우 광펄스 처리를 하지 않은 control 시료는 10^3 /mL 정도의 균이 관찰되었으나 광펄스 처리 시료의 경우 균이 관찰되지 않음.
- 광어 fillet의 경우 원 시료에 존재하는 균수가 모든 시료에서 미미하기는 하였으나, 광펄스 처리 시 모든 시료에서 균이 사멸된 것으로 나타남.
- 새우 fillet의 경우 전반적으로 광펄스 처리시 0.5-1 log 정도 균이 저감화 됨. 특히 저장기간 4일 및 10일 시료의 경우 1 log reduction 정도의 사멸효과를 보임.

(2) pH 측정 결과

- 저장기간에 따른 control sample 및 12 J/cm^2 의 에너지밀도로 광펄스 처리된 sample의 pH 측정을 실시함. 그 결과, 저장기간 동안 연어, 광어, 새우 fillet의 pH는 모두 큰 변화를 나타내지 않았음(Table 3-11).

(3) 색도 측정 결과

- 저장기간에 따른 control sample 및 15.711 J/cm^2 의 에너지 밀도로 광펄스 처리된 sample의 색도 측정을 실시함. 그 결과, 저장기간 동안 변화하는 연어, 광어, 새우 fillet의 L(명도), a(적색도), b(황색도) 값을 각각 얻었으며, 이를 이용하여 $\Delta E = \{(L-L_0)^2 + (a-a_0)^2 + (b-b_0)^2\}^{1/2}$ 식에 의해 계산한 ΔE 값의 변화 추이는 다음 Table 3.6.3과 같음. 이때, 표준백판의 L값은 96.85, a값은 -0.43, b값은 0.64이었음(Table 3-12)
- 새우 fillet의 경우, control 및 광펄스 처리된 sample 간에 뚜렷한 차이를 보이지 않았으나, 광어, 연어 fillet의 경우 control sample이 광펄스 처리된 sample보다 그 색차가 전반적으로 더 크게 나타났음. 이는 광펄스 처리가 화학적, 생물학적 반응에 의한 색상의 변화를 다소간 억제해 줄 수 있음을 확인한 결과임.

Table 3-11. Changes in pH of control and treated samples during storage at 4°C

Storage period (days)	Salmon fillet		Flatfish fillet		Shrimp fillet	
	Control	IPL 처리	Control	IPL 처리	Control	IPL 처리
0	6.415	6.370	7.315	7.430	6.765	6.750
2	6.125	6.285	7.840	7.605	6.790	6.735
4	6.605	6.735	7.925	7.825	6.725	6.650
6	6.680	6.645	6.750	6.605	6.750	6.605
8	6.488	6.630	6.755	6.665	6.755	6.665
10	6.295	6.615	6.890	6.795	6.890	6.795

Table 3-12. Changes in ΔE values of control and treated samples during storage at 4°C.

Storage period (days)	Salmon fillet		Flatfish fillet		Shrimp fillet	
	Control	IPL 처리	Control	IPL 처리	Control	IPL 처리
0	62.03	62.83	45.62	37.67	48.32	44.55
2	75.75	65.97	43.35	33.45	50.28	41.96
4	64.15	59.41	37.31	29.16	38.63	37.43
6	45.51	43.49	39.49	30.52	36.76	38.24
8	44.90	43.51	40.64	32.93	36.05	38.00
10	45.89	42.07	40.16	34.29	36.49	39.90

(4) 수분함량 측정 결과

- 저장기간에 따른 control sample 및 15.711 J/cm²의 에너지 밀도로 광펄스 처리된 sample의 수분함량 및 수분활성도에 대한 측정을 실시함. 그 결과, 저장기간 동안 연어, 광어, 새우 fillet의 수분함량은 모두 큰 변화를 나타내지 않음[Table 3-13~14]. 이는 광펄스 처리가 시료의 water holding capacity에 영향을 미치지 않았음을 확인할 수 있는 결과임.

(5) Texture profile analysis(TPA)

- 저장기간에 따른 control sample 및 12 J/cm²의 에너지 밀도로 광펄스 처리된 sample의 texture 측정을 실시함. 저장기간 동안 연어, 광어, 새우 fillet의 hardness, fracturability, adhesiveness, springiness, gumminess, chewiness 등 texture 값의 변화 추이는 다음 Table 3-15와 같음.
- 이 표의 결과로부터 광펄스 처리를 함에 따라 연어, 광어, 새우 fillet 모두 hardness 및 adhesiveness을 유지시켜 주는 효과가 매우 큰 것으로 나타났으며, cohesiveness와 관계된 2차적 물성 특성인 gumminess 및 chewiness 또한 control sample 보다 광펄스 처리된 sample에서 전반적으로 더 높게 나타나 광펄스 처리가 식감유지에도 어느 정도 효과가 있는 것으로 나타남.
- Fracturability 및 springiness는 광펄스 처리 유무에 관계없이 모두 비슷하게 나타남.

Table 3-13. Changes in moisture contents of control and treated samples during storage at 4 °C.

Storage period (days)	Salmon fillet		Flatfish fillet		Shrimp fillet	
	Control	IPL 처리	Control	IPL 처리	Control	IPL 처리
0	67.50	64.00	72.20	64.25	76.30	74.10
2	69.00	67.90	66.45	63.45	74.70	73.15
4	68.25	63.50	69.15	63.10	76.10	72.20
6	69.00	65.40	68.40	61.80	76.30	73.30
8	64.10	64.20	66.18	62.60	74.10	70.95
10	67.40	63.00	63.95	63.40	74.45	73.40

Table 3-14. Changes in water activity of control and treated samples during storage at 4°C.

Storage period (days)	Salmon fillet		Flatfish fillet		Shrimp fillet	
	Control	IPL 처리	Control	IPL 처리	Control	IPL 처리
0	0.929	0.920	0.925	0.920	0.931	0.944
2	0.914	0.924	0.911	0.911	0.936	0.943
4	0.937	0.933	0.936	0.918	0.921	0.920
6	0.915	0.919	0.952	0.938	0.937	0.906
8	0.920	0.920	0.928	0.922	0.947	0.930
10	0.931	0.949	0.921	0.922	0.954	0.933

Table 3-15 Changes in texture profile analysis of salmon fillets during storage at 4 °C; (a) Hardness, (b) Fracturability, (c) Adhesiveness, (d) Springiness, (e) Gumminess, (f) Chewiness.

(a) Hardness(견고성)

Storage period (days)	Salmon fillet		Flatfish fillet		Shrimp fillet	
	Control	IPL 처리	Control	IPL 처리	Control	IPL 처리
0	1546.35	3056.43	4162.37	6234.51	5903.60	9628.10
2	1566.48	3059.50	4575.12	6654.34	6803.39	9432.66
4	1859.35	3317.35	4496.86	6346.16	6662.70	9435.65
6	2038.32	3078.42	4054.11	6208.95	7288.26	8441.22
8	1859.35	3100.54	5204.73	6023.45	7227.31	9984.06
10	1954.26	3113.98	4631.55	6654.53	7225.64	10047.08

(b) Fracurability(취약성)

Storage period (days)	Salmon fillet		Flatfish fillet		Shrimp fillet	
	Control	IPL 처리	Control	IPL 처리	Control	IPL 처리
0	3.222	3.832	3.873	3.469	3.412	4.882
2	4.269	3.738	2.925	4.419	4.223	4.615
4	4.017	4.119	4.202	30991	4.864	4.218
6	3.580	4.223	3.881	4.978	4.116	4.434
8	3.385	3.773	4.912	3.992	3.671	3.548
10	3.641	3.571	4.886	5.002	3.255	2.901

(c) Adhesiveness(부착성)

Storage period (days)	Salmon fillet		Flatfish fillet		Shrimp fillet	
	Control	IPL 처리	Control	IPL 처리	Control	IPL 처리
0	-93.072	-5.953	-117.823	-36.320	-50.264	-2.606
2	-39.473	-18.185	-58.959	-47.551	-28.243	-12.479
4	-40.806	-12.867	-69.528	-31.833	-31.928	-9.084
6	-23.248	-6.574	-53.267	-31.886	-21.667	-3.034
8	-66.619	-19.423	-63.035	-17.832	-43.464	-5.159
10	-42.519	-6.672	-38.895	-61.312	-34.697	-4.801

(d) Springiness(탄력성)

Storage period (days)	Salmon fillet		Flatfish fillet		Shrimp fillet	
	Control	IPL 처리	Control	IPL 처리	Control	IPL 처리
0	0.674	0.717	0.546	0.811	0.517	0.507
2	0.665	0.746	0.591	0.647	0.428	0.558
4	0.715	0.743	0.586	0.708	0.449	0.548
6	0.674	0.754	0.569	0.733	0.426	0.596
8	0.545	0.686	0.610	0.755	0.414	0.560
10	0.578	0.659	0.654	0.702	0.473	0.607

(e) Gumminess(점착성)

Storage period (days)	Salmon fillet		Flatfish fillet		Shrimp fillet	
	Control	IPL 처리	Control	IPL 처리	Control	IPL 처리
0	737.609	797.729	2260.17	3675.24	2473.61	4082.31
2	385.354	1101.421	2557.49	3892.79	2857.42	3612.71
4	485.289	962.032	2943.19	3950.49	3130.13	3918.63
6	762.332	871.193	2642.87	4076.18	3499.82	4570.92
8	1012.416	1187.508	2865.20	3987.52	3309.38	5495.22
10	539.374	1276.110	2994.76	4115.16	3227.70	6010.16

(f) Chewiness(저작성)

Storage period (days)	Salmon fillet		Flatfish fillet		Shrimp fillet	
	Control	IPL 처리	Control	IPL 처리	Control	IPL 처리
0	497.148	571.573	1234.05	2978.79	1278.85	2069.73
2	256.261	821.660	1511.48	2518.63	1222.98	2045.89
4	346.982	714.790	1725.59	2796.94	1403.87	2147.02
6	513.430	656.880	1503.53	2989.47	1492.32	2725.64
8	551.767	814.037	1746.34	3010.58	1371.08	3073.48
10	311.489	841.084	1958.28	2886.79	1526.05	3648.77

제 9 절 자외선 조사에 의한 미생물 사멸 기작 규명

1. 자외선(continuous-wave UV light) 조사에 의한 미생물의 분자 생물학적 사멸기작

가. 실험방법

(1) 사용균주

- 자외선(continuous-wave UV light) 조사에 의한 미생물의 사멸기작을 연구하기 위하여 *E. coli* Genetic Stock Center에서 분양받은 *E. coli* AB1157 (CGSC 1157)과 이 균주의 *uvrA* 유전자에 대한 돌연변이균주인 *E. coli* AB1886 (CGSC 1886)을 모델 미생물로 이용하였음(Table 3-16)

(2) 자외선 조사

- 자외선 조사에 의한 미생물의 사멸기작을 연구하기 위하여 모델 미생물인 *E. coli* AB1157과 *E. coli* AB1886을 각각 5 mL의 LB broth(Difco Co.)에 접종한 후, 37°C에서 24시간동안 진탕배양하였음
- 각 배양액을 10,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 상등액을 제거한 다음 세포를 0.1 M의 potassium phosphate buffer 5 mL로 세척하였음
- 이를 원심분리하여 상등액을 제거하고 0.1 M potassium phosphate buffer 5 mL로 현탁한 후 지름 10 cm의 Petri dish에 분주하였으며, 시료가 함유된 Petri dish를 254 nm의 파장을 지나는 UV-C 광원과 12 cm 간격을 두고 일정시간동안 조사하였음
- 자외선의 에너지 밀도는 Ruggedized wideband spectroradio meter ILT 900-R(International light, USA)를 이용하여 측정하였으며, 상기 모든 과정은 가시광선에 의한 광회복(photoreactivation)을 막기 위해 암실 상태에서 실험을 수행하였음

Table 3-16. *E. coli* strains used in this study

strain	Relevant genotype	Origin or source
<i>E. coli</i> AB1157	<i>tF thr-1 leuB6 D(gpt-proA)62 hisG4 thi-1 argE3 lacY1 galK2 ara-14 xyl-5 mtl-1 tsx-33 supE44 rpsL31 kdgK51 rfbD1 mgl-51 lcs rac</i>	<i>E. coli</i> Genetic Stock Center, USA
<i>E. coli</i> AB1886	same as AB1157 but <i>uvrA6</i>	<i>E. coli</i> Genetic Stock Center, USA

(3) DNA 분리

- UV-C 또는 광펄스를 조사한 균체를 Petri dish로부터 15 mL tube에 회수하고 10,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 200 μ L의 SET buffer(20% sucrose, 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 50 mM EDTA)로 현탁하였음
- 여기에 50 μ L의 60 mg/mL lysozyme(Sigma Co.)과 3 μ L의 20 mg/mL RNase A(Sigma Co.) 용액을 첨가하여 37°C에서 15분간 반응시켰고, 반응 후 20 μ L의 20 mg/mL proteinase K(Sigma Co.)를 첨가하여 37°C에서 15분간 반응시킨 다음 Bioneer사의 Genomic DNA Extraction Kit를 사용하여 제조사의 manual에 따라 균체의 genomic DNA를 분리하였음
- 회수된 DNA의 농도는 UV spectrophotometer(Shimadzu)를 사용하여 260 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 확인하였음

(4) RNA 분리

- RNA 분리를 위해 모든 시약 및 glassware는 0.1% diethyl pyrocarbonate (DEPC)로 37°C에서 12시간 동안 처리한 후 100°C에서 15분간 autoclave하였음
- 실험에 사용한 모든 plastic ware도 RNase-free 제품을 사용하였다. UV-C 또는 광펄스를 조사한 균체를 Petri dish로부터 15 mL conical tube에 회수하고 10,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 0.5 mL의 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.6)로 현탁하였음
- 세포 현탁액을 Qiagen사의 RNeasy Protect Bacteria Mini Kit를 사용하여 제조사의 manual에 따라 RNA를 분리하였음
- 회수된 RNA의 농도는 UV spectrophotometer를 사용하여 260 nm의 파장에서 측정하여 확인하였음

(5) 효소처리

- UV-C 조사한 균체의 DNA에 *cis-syn*-cyclobutane pyrimidine dimer가 생성되었는지의 여부를 알아보기 위하여 균체로부터 분리된 genomic DNA에 T4 endonuclease V(T4 PDG, NEB, England)를 처리하였음

- 효소 반응은 DNA 15 μ L(2 μ g), 10 \times T4 PDG reaction buffer 2 μ L, 10 \times BSA(100 μ g/mL) 2 μ L, T4 PDG 1 μ L(100 Unit)로 하여 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시켰음

(6) 전기영동

- UV-C 조사한 균체의 genomic DNA에 double-strand break 또는 single-strand break가 발생하였는지 조사하기 위하여 전기영동을 실시하였음
- Double-strand break의 확인을 위해서 전기영동 완충용액으로 0.5 \times TAE buffer(40 mM Tris-acetate, pH 8.0, 1 mM EDTA)를 사용하였으며 0.5 μ g/mL의 ethidium bromide를 첨가한 0.8%의 agarose(Bio-Rad) 수평 gel을 사용하여 시료의 1/10배량의 10 \times gel loading buffer(0.25%(w/v) bromophenol blue, 40%(w/v) sucrose)를 가한 DNA 용액을 100 V에서 30분간 전기영동하였음
- Single-strand break의 확인을 위해서는 전기영동 완충용액으로 alkaline agarose gel buffer (50 mM NaOH, 1mM EDTA)를 사용하였으며 0.8%의 alkaline agarose 수평 gel을 사용하여 시료의 1/6량의 6 \times alkaline gel loading buffer(300 mM NaOH, 6 mM EDTA, 40%(w/v) sucrose, 0.15%(w/v) bromocresol green, 0.25%(w/v) xylene cyanol)를 가한 DNA 용액을 35 V에서 300분간 전기영동하였고, 전기영동 후 gel을 0.5 μ g/mL의 ethidium bromide 용액에 1시간동안 염색한 후 증류수로 30분간 탈색하였음
- 균체로부터 분리된 RNA를 확인하기 위해서는 전기영동 완충용액으로 0.5 \times TAE buffer(40 mM Tris-acetate, pH 8.0, 1 mM EDTA)를 사용하였으며 0.5 μ g/mL의 ethidium bromide를 첨가한 2%의 agarose(Bio-Rad) 수평 gel을 사용하여 시료의 1/10배량의 10 \times gel loading buffer(0.25% bromophenol blue, 40%(w/v) sucrose)를 가한 RNA 용액을 50 V에서 100분간 전기영동하였음
- 전기영동한 agarose gel은 254 nm의 자외선 조명하에서 관찰하였으며 사진 촬영은 UV-filter와 orange filter가 장착된 디지털카메라(Olympus C4040Z)를 이용하였으며, 사진촬영한 DNA와 RNA band의 이미지는 Image J(public domain NIH Image program, USA)를 이용하여 각각의 DNA 또는 RNA

band의 면적을 계산하여 band의 상대적인 양을 구하였음

나. 실험결과

(1) Double-strand DNA break

- 광펄스 살균은 170~2,600 nm의 광범위한 파장을 지니고 있는 광을 10^{-1} ~ 10^{-6} sec의 펄스로 식품 표면에 조사함으로써 미생물을 사멸시키는 살균 방법임
- 최근 광펄스의 미생물 사멸기작에 대한 연구가 많이 이루어지고 있으나 아직까지 구체적인 사멸기작은 밝혀져 있지 않음
- 현재까지의 연구 결과에 따르면 미생물 세포의 일부 구성성분을 파괴하는 광화학기작(photochemical mechanism)과 미생물 세포를 투과하여 가열에 의해 사멸시키는 광열기작(photothermal mechanism)이 동시에 작용하는 것이라고 알려져 있음
- 광화학기작의 주된 효과는 광펄스가 지니고 있는 자외선이 미생물의 DNA를 손상시키는 것으로 추측하고 있음
- 자외선은 주로 탄소와 탄소의 이중공유결합에 흡수되어 이들을 파괴함으로써 DNA의 재배열 또는 분해를 일으키고 thymine dimer와 같은 pyrimidine dimer, pyrimidine pyrimidone photoproduct를 생성하여 DNA 복제를 저해함
- 따라서 본 연구에서는 광펄스에 의한 미생물 사멸기작을 규명하기 위한 비교 연구로서 연속 UV-C 조사에 의한 미생물의 핵산 손상도를 알아보았음
- 이를 위하여 모델 균주로서 야생주인 *E. coli* AB1157과 이 야생주의 *uvrA* 유전자가 결손된 돌연변이주인 *E. coli* AB1886, 그리고 수산식품유래 식중독 미생물인 *L. monocytogenes*, *E. coli* O157, *P. aeruginosa*를 대상으로 254 nm의 UV-C를 연속 조사하여 DNA와 RNA의 손상도를 전기영동을 통하여 분석하였음
- Ruggedized wideband spectroradio meter ILT 900-R로 측정된 UV-C의 에너지 밀도는 2.1 W/m^2 이었으며, 이를 J/cm^2 단위로 환산하였을 경우, 10분에서는 0.126 J/cm^2 , 20분에서는 0.252 J/cm^2 , 30분에서는 0.378 J/cm^2 , 40분에는

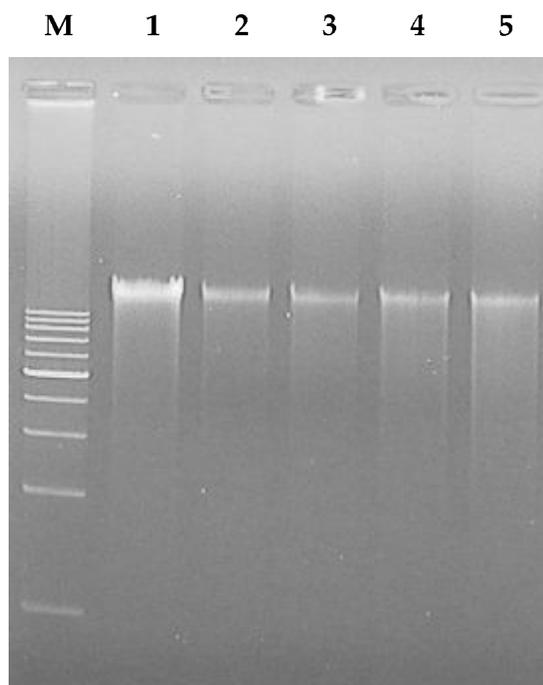
서는 0.504 J/cm²의 값을 나타내었음

- *E. coli* AB1157의 배양액에 UV-C를 40분간 조사하면서 10분 간격으로 세포를 취한 다음 genomic DNA를 분리하여 0.8%(w/v) neutral agarose gel에서 전기영동하여 genomic DNA에 double-strand break가 발생하였는지 조사하였음
- 그 결과 Fig. 3-41에 나타낸 바와 같이 UV-C를 10분 간 조사하였을 때 genomic DNA 밴드의 농도가 감소하였고 40분까지 조사하였을 때 시간이 경과함에 따라 DNA 밴드의 상대 면적이 처리 전 9,637.598에서 5,431.426, 5,053.305, 5,662.841, 5,949.062로 지속적으로 감소함과 동시에 band 아래로 분해된 DNA들이 smear하게 나타남을 알 수 있었음
- *E. coli* AB1157의 *uvrA* 유전자의 결손 돌연변이주인 *E. coli* AB1886에서도 DNA의 상대 면적이 10,966.84에서 4,090.012, 4,320.598, 4,167.012, 4,797.648로 감소함을 확인하여 야생주인 *E. coli* AB1157과 유사한 결과를 나타냄을 알 수 있었음(Fig. 3-42)
- 이 결과로부터 UV-C 조사에 의해 genomic DNA에서 double-strand break가 발생하는 것을 확인하였다. Genomic DNA에 double-strand break가 발생되면 이를 회복할 수 있는 시스템이 세포 내에 존재하지 않기 때문에 결국 사멸에 이르게 됨(Chu, 1997).

(2) Single-strand DNA break

- UV-C 조사에 의해 genomic DNA 상에 single-strand break가 생성되는지 조사하기 위하여 *E. coli* AB1157의 배양액에 UV-C를 5분 간격으로 20분간 조사한 후 genomic DNA를 분리하여 0.8%(w/v) alkaline agarose gel에서 전기영동을 실시하였음
- 그 결과 Fig. 3-43의 lane 1,3,5,7,9에서와 같이 UV-C 조사 시간이 경과함에 따라 single-strand break가 증가하는 것을 확인할 수 있었으며 single-strand DNA간에 cross-link 현상이 발생하여 고분자량의 DNA들이 발생하는 것을 알 수 있었음
- *E. coli* AB1157의 *uvrA* 유전자의 결손 돌연변이주인 *E. coli* AB1886에서도 동일한 결과를 확인하였음(Fig. 3-44, lane 1,3,5,7,9)

(a)



(b)

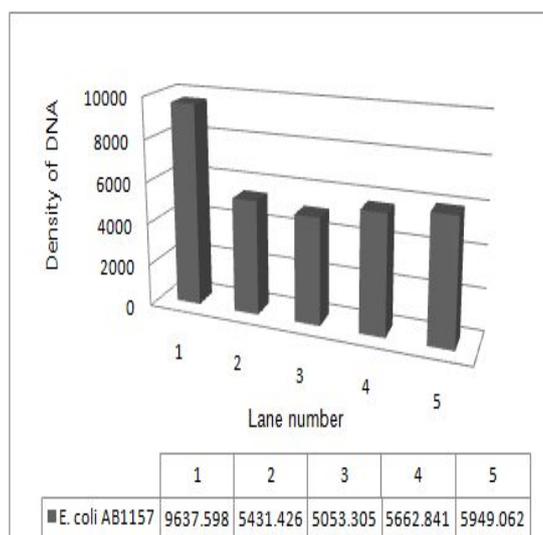


Fig. 3-41. Photograph of 0.8% neutral agarose gel electrophoresis of genomic DNAs extracted from *E. coli* AB1157 cells irradiated with artificial UV-C (a) and densitometric analysis of each lane (b).

Lane M, molecular weight marker; 1, non-irradiated control DNA; 2, 10 min irradiation; 3, 20 min irradiation; 4, 30 min irradiation; 5, 40 min irradiation. The same amount of DNA ($1.35 \mu\text{g}$) was loaded on the each lane of the gel.

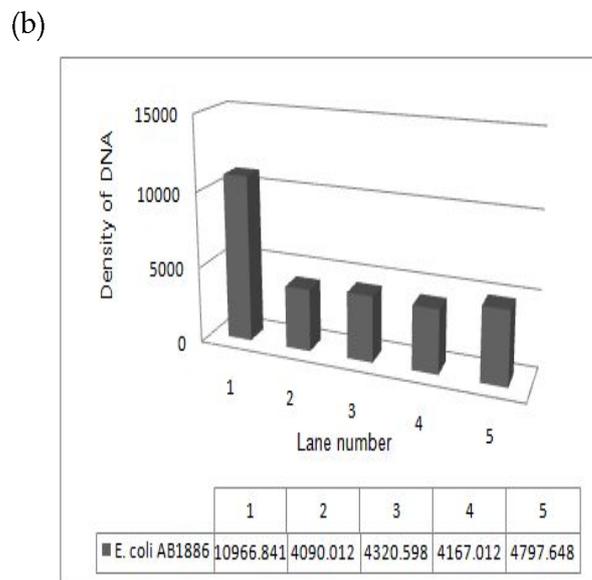
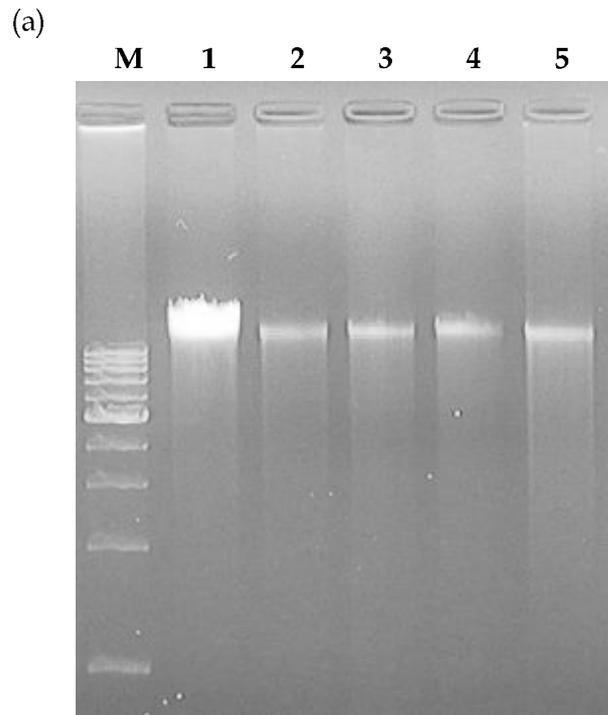


Fig. 3-42. Photograph of 0.8% neutral agarose gel electrophoresis of genomic DNAs extracted from *E. coli* AB1886 cells irradiated with artificial UV-C (a) and densitometric analysis of each lane (b).

Lane M, molecular weight marker; 1, non-irradiated control DNA; 2, 10 min irradiation; 3, 20 min irradiation; 4, 30 min irradiation; 5, 40 min irradiation. The same amount of DNA ($1.5 \mu\text{g}$) was loaded on the each lane of the gel.

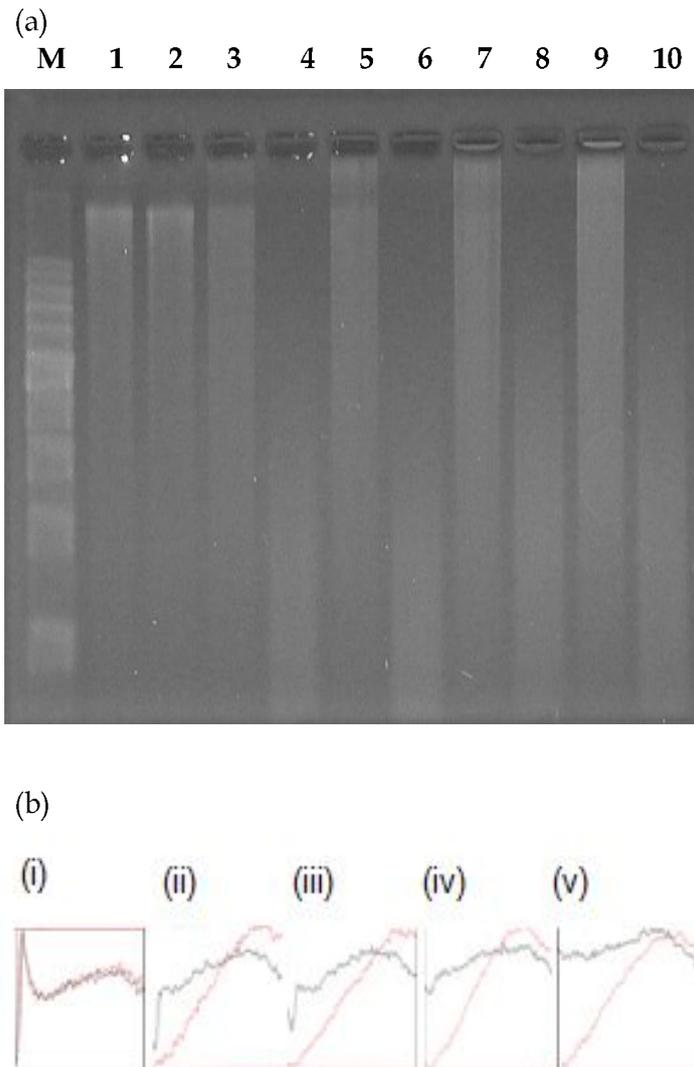


Fig. 3-43. Photograph of 0.8% alkaline agarose gel electrophoresis of genomic DNA extracted from *E. coli* AB1157 cells irradiated with artificial UV-C (a) and densitometric scan of each lane (b). The samples are paired, of which the first of each pair was not treated with T4 PDG and the second was treated with T4 PDG.

Lane M, Molecular weight marker; 1, non-irradiated control DNA; 2, control DNA (non-irradiated but treated with T4 PDG); 3, 5 min irradiation; 4, 5 min irradiation followed by treatment with T4 PDG; 5, 10 min irradiation; 6, 10 min irradiation followed by treatment with T4 PDG; 7, 15 min irradiation; 8, 15 min irradiation followed by treatment with T4 PDG; 9, 20 min irradiation; 10, 20 min irradiation followed by treatment with T4 PDG. The same amount of DNA (1 μg) was loaded on the each lane of the gel.

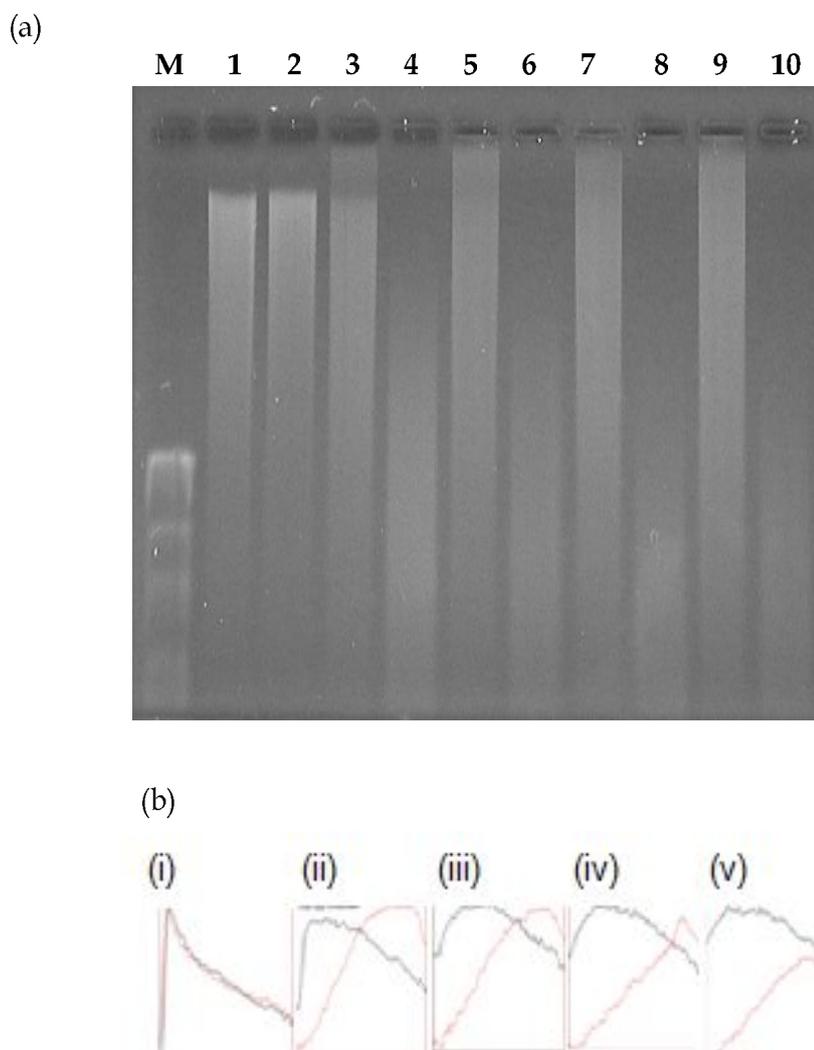


Fig. 3-44. Photograph of 0.8% alkaline agarose gel electrophoresis of genomic DNA extracted from *E. coli* AB1886 cells irradiated with artificial UV-C (a) and densitometric scan of each lane (b). The samples are paired, of which the first of each pair was not treated with T4 PDG and the second was treated with T4 PDG.

Lane M, Molecular weight marker; 1, non-irradiated control DNA; 2, control DNA (non-irradiated but treated with T4 PDG); 3, 5 min irradiation; 4, 5 min irradiation followed by treatment with T4 PDG; 5, 10 min irradiation; 6, 10 min irradiation followed by treatment with T4 PDG; 7, 15 min irradiation; 8, 15 min irradiation followed by treatment with T4 PDG; 9, 20 min irradiation; 10, 20 min irradiation followed by treatment with T4 PDG. The same amount of DNA ($1 \mu\text{g}$) was loaded on the each lane of the gel.

(3) Pyrimidine dimer 형성

- UV-C 조사에 의해 genomic DNA 상에 pyrimidine dimer가 생성되는지 조사하기 위하여 *E. coli* AB1157의 배양액에 UV-C를 5분 간격으로 20분간 조사한 후 genomic DNA를 분리한 다음 pyrimidine dimer의 cross-link 결합을 절단하는 효소인 T4 endonuclease V(T4 PDG)를 처리하여 0.8%(w/v) alkaline agarose gel에서 전기영동을 실시하였음
- 그 결과 Fig. 3-43의 lane 2,4,6,8,10에서와 같이 효소처리 시 DNA의 band가 효소처리 하지 않은 DNA에 비해 상당량 분해되는 것으로 보아 UV-C 조사에 의하여 pyrimidine dimer가 발생하는 것을 확인할 수 있었음
- 그러나 UV-C 조사 시간이 증가함에 따라 pyrimidine dimer의 발생 정도가 감소하는 것으로 나타났는데 이는 UV-C 조사 시간 중에도 *E. coli* 세포가 지니고 있는 nucleotide excision repair system이 작동하여 생성되고 있는 pyrimidine dimer를 제거하는 것이기 때문으로 판단되며 pyrimidine dimer의 생성 속도보다 pyrimidine dimer를 제거하는 속도가 빠르기 때문에 UV-C 조사 시간의 증가에 따라 pyrimidine dimer 발생량이 감소하는 것으로 보임
- *E. coli* AB1157의 *uvrA* 유전자의 결손 돌연변이주인 *E. coli* AB1886에서도 UV-C 조사에 의해 pyrimidine dimer가 생성되는 것을 확인할 수 있었으나 야생주인 *E. coli* AB1157과는 달리 UV-C 조사시간이 증가함에 따라 pyrimidine dimer 생성량도 증가하였음(Fig. 3-44, lane 2,4,6,8,10)
- 이는 *E. coli* AB1886은 *uvrA* 유전자의 결손으로 nucleotide excision repair system의 구성인자인 UvrA 단백질이 세포 내에 존재하지 않기 때문에 UV-C 조사에 의해 생성된 pyrimidine dimer가 제거되지 않기 때문인 것으로 판단됨
- DNA에 UV를 조사하면 cyclobutane pyrimidine dimer(CPD)와 pyrimidine-pyrimidone adduct 등과 같은 다양한 photoproduct가 생성됨 (Fig. 3-45)

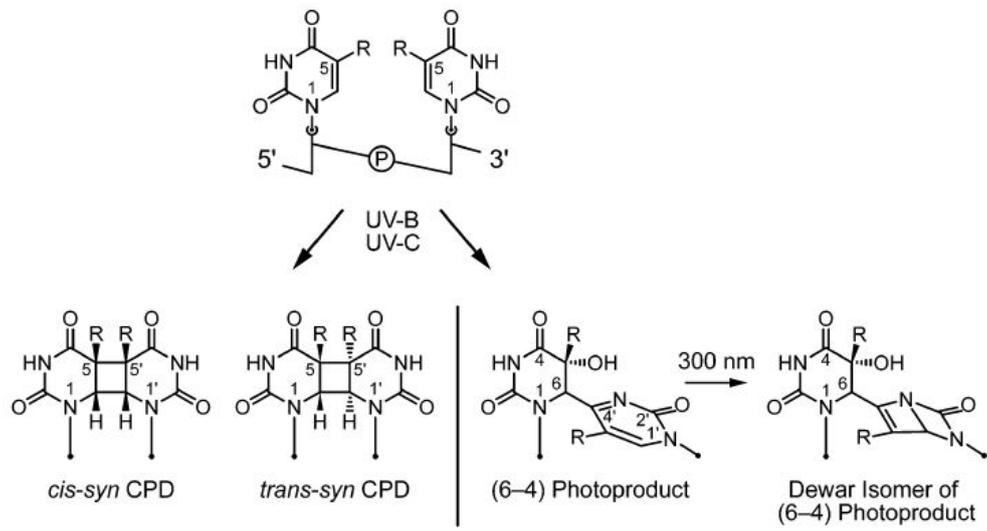


Fig. 3-45. The structure of the most mutagenic UV-induced DNA lesions. R denotes either H in uracil (U) or CH₃ in thymine (T).

- 이러한 DNA 손상이 회복되지 못하고 유지된다면 돌연변이(mutagenesis)를 일으키고 사멸에 이르게 된다(kiyosawa *et al.*, 2001). 따라서 이러한 조건에서 미생물이 생존하기 위해 여러 가지 방법을 통해서 손상된 DNA를 회복시키는데, 첫 번째로 가시광선(380 nm)의 존재 하에 UV에 의한 손상을 회복(Okubo *et al.*, 1970)시키는 광회복(photoreactivation) 시스템이 있고, 두 번째로 DNA 상에서 손상된 사슬의 일부를 끊어내고 반대 사슬의 DNA를 주형으로 하여 회복시키는 nucleotide excision repair(NER)로서 여기에는 *uvrA*와 같은 유전자가 관여하며, 세 번째로 손상부위가 있는 사슬을 주형 DNA로 이용하는 recombinational repair system으로 *recA*와 같은 유전자가 관여함

(4) RNA break

- UV-C 조사에 의한 미생물 세포가 지니고 있는 RNA 손상 여부를 조사하기 위하여 *E. coli* AB1157의 배양액에 UV-C를 10분 간격으로 40분간 조사한 후 total RNA를 분리하여 2.0%(w/v) agarose gel에서 전기영동을 실시하였음
- 대장균과 같은 세균은 mRNA, tRNA, rRNA 등 크게 3종류의 RNA를 지니고 있고 rRNA는 23S, 16S, 5S rRNA로 분류되는데, 이들 중에서 일반적인 agarose gel 상에서는 23S rRNA와 16S rRNA가 주요 RNA band로 나타나고 mRNA는 희미하게 나타남
- Fig. 3-46에서와 같이 전기영동상에서 23S rRNA와 16S rRNA가 2개의 주요 band로 나타나고 있는데 UV-C 조사에 의해 16S rRNA 아래쪽에 새로운 band가 형성된 것을 확인할 수 있었는데, 이는 23S 또는 16S rRNA가 분해 또는 cross-link에 의해 형성된 것으로 판단됨
- 또한 전기영동 상에서 희미하게 보이는 mRNA가 UV-C 조사에 의해 농도가 감소하는 것으로 나타났는데 이는 UV-C 조사에 의해 mRNA가 분해되었기 때문인 것으로 판단됨
- RNA에 UV-C를 조사하면 intra-, inter-molecular RNA cross-links가 발생된다고 보고되고 있으며(Wayne, 2005), *E. coli* AB1886 세포에서도 동일한 RNA 분해 현상을 관찰할 수 있었음(Fig. 3-47).

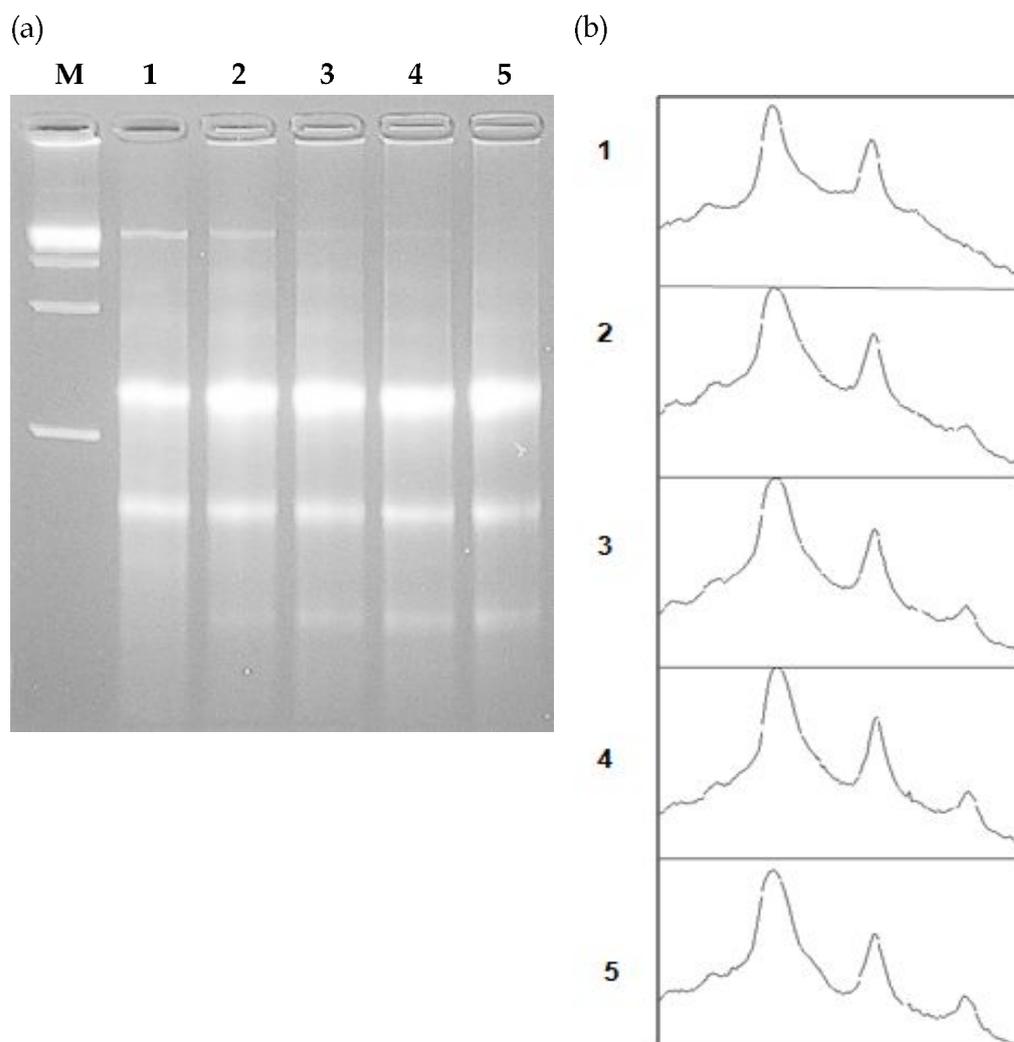


Fig. 3-46. Photograph of neutral 1.2% agarose gel electrophoresis of RNAs extracted from *E. coli* AB1157 cells irradiated with artificial UV-C (a) and densitometric scan of each lane (b).

Lane M, Molecular weight marker; 1, control RNA (non-irradiated); 2, 10 min irradiation; 3, 20 min irradiation; 4, 30 min irradiation; 5, 40 min irradiation. The same amount of RNA ($1.4 \mu\text{g}$) was loaded on the each lane of the gel.

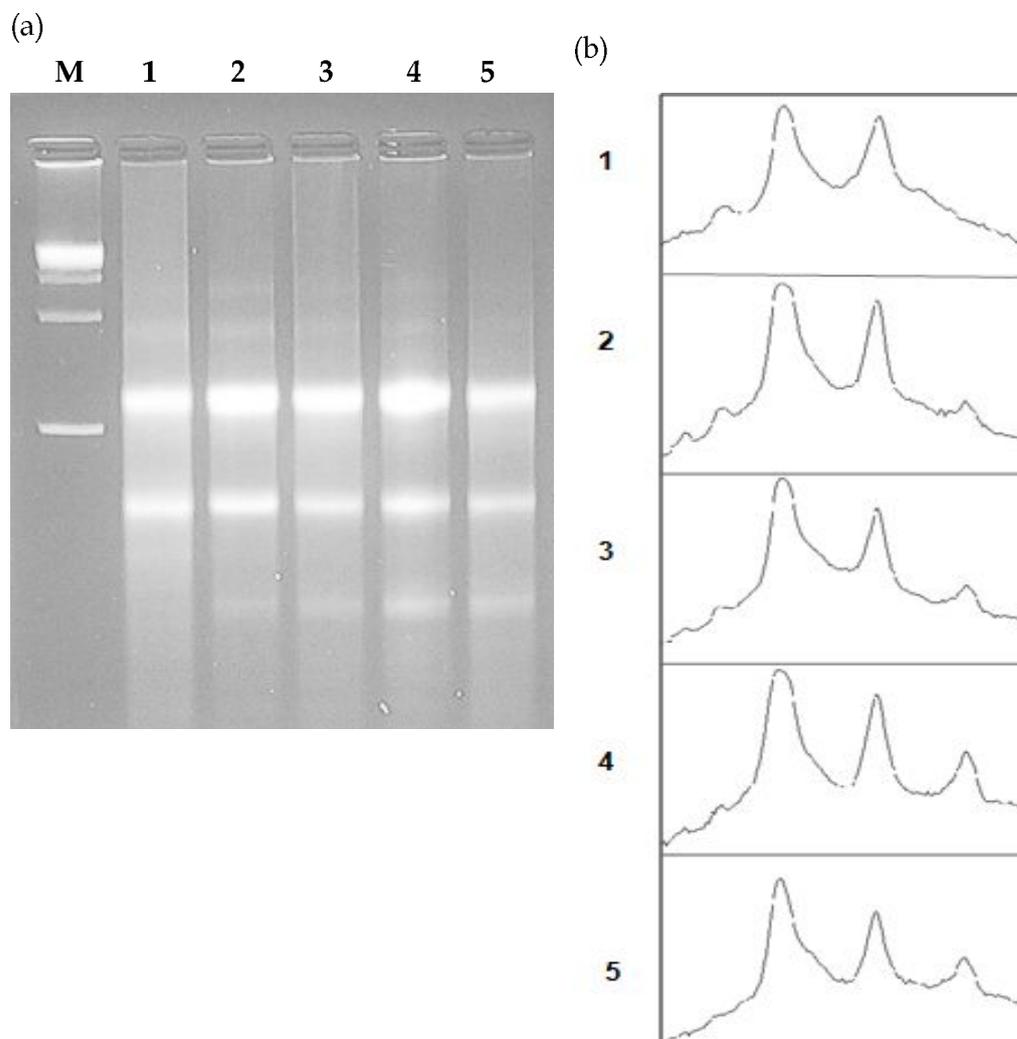


Fig. 3-47. Photograph of neutral 1.2% agarose gel electrophoresis of RNAs extracted from *E. coli* AB1886 cells irradiated with artificial UV-C (a) and densitometric scan of each lane (b).

Lane M, Molecular weight marker; 1, control RNA (non-irradiated); 2, 10 min irradiation; 3, 20 min irradiation; 4, 30 min irradiation; 5, 40 min irradiation. The same amount of RNA ($1.6 \mu\text{g}$) was loaded on the each lane of the gel.

(5) UV 조사에 의한 *E. coli* 세포의 사멸율

- UV-C 조사에 의한 *E. coli* 세포의 생균수와 이에 따른 사멸율을 조사한 결과 Table 3-17와 같았음
- 야생주인 *E. coli* AB 1157은 UV를 조사하지 않을 경우 1.76×10^9 CFU/mL의 생균수를 나타내었으며 10분간 조사하였을 때에는 3.32×10^5 CFU/mL의 생균수를 나타내어 급격한 생균수의 감소를 보여주었으나, 조사 20분 후부터는 생균수에 큰 변화를 나타내지 않아 20분 이상의 UV 조사는 *E. coli* 세포의 사멸에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었음
- UV 조사 시간에 따른 사멸율은 10분 조사 시 0.372, 20분 조사시 0.233, 30분 조사시 0.126, 40분 조사할 경우 0.106으로 조사시간이 증가함에 따라 즉, 에너지 밀도가 증가함에 따라 사멸율이 감소하는 것으로 나타났는데, 이 결과는 야생주인 *E. coli* AB 1157이 지니고 있는 nucleotide excision repair system이 작동하여 UV 조사에 의해 손상된 DNA가 일정 수준 회복되기 때문인 것으로 사료되며, double-strand break와 single-strand break 실험 결과와도 일치함을 알 수 있었음
- 한편 *E. coli* AB 1157의 *uvrA* 유전자 결손 돌연변이인 *E. coli* AB 1886의 경우에는 UV를 10분 조사할 경우 3.07×10^5 CFU/mL로 생균수의 급격한 감소를 보여 주었으며 20분 이상의 UV 조사에 의해 모든 세포가 사멸함을 알 수 있었음
- 이는 *uvrA* 유전자 결손에 의해 nucleotide excision repair system이 작동하지 않아 UV 조사에 의해 손상된 DNA가 회복되지 않았기 때문으로 사료됨

Table 3-17. Viable cell number and death rate of *E. coli* cells by UV irradiation

Bacterial strain	UV irradiation time (min)	Energy density ¹⁾ (J/cm ²)	Viable cell number (CFU/mL)	Death rate ²⁾
<i>E. coli</i> AB 1157	0		1.76±0.65×10 ⁹	
	10	0.126	3.32±1.26×10 ⁵	0.372
	20	0.252	3.77±2.80×10 ⁴	0.233
	30	0.378	2.86±1.80×10 ⁵	0.126
	40	0.504	9.77±7.52×10 ⁴	0.106
<i>E. coli</i> AB 1886	0		1.94±0.21×10 ⁹	
	10	0.126	3.07±4.19×10 ⁵	0.380
	20	0.252	- ²⁾	
	30	0.378	-	
	40	0.504	-	

¹⁾ Energy density (J/cm²) = W/m² x s (time)/10000

²⁾ Death rate = -log (viable cell number before UV irradiation/viable cell number after UV irradiation)/duration time (min) of UV irradiation.

³⁾: Not detected.

2. 254 nm 연속 UV-C 조사에 의한 수산식품 유래 병원성 미생물의 사멸 기작

가. 실험방법

(1) 사용균주

- 수산식품 유래 식중독 미생물의 사멸기작을 연구하기 위하여 표준균주인 *Listeria monocytogenes* KCCM 40307, *E. coli* O157:H7 ATCC 43859, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145를 이용하였음

(2) 자외선 조사

- 수산식품 유래 병원성 미생물인 *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *P. aeruginosa*의 자외선 조사에 의한 세포의 사멸기작을 조사하기 위하여 Tryptic soy broth에 각각의 균주를 접종한 후, 37°C에서 24시간 배양한 후 모델 미생물과 동일 방법으로 처리하였음

(3) DNA와 RNA의 분리

- 수산식품 유래 병원성 미생물을 광펄스 처리한 후 모델 미생물과 동일한 방법으로 DNA와 RNA를 분리하여 DNA와 RNA의 농도를 특정하여 확인하였음

(4) 효소처리

- UV-C 조사한 균체의 DNA에 *cis-syn-cyclobutane* pyrimidine dimer가 생성되었는지의 여부를 알아보기 위하여 균체로부터 분리된 genomic DNA에 T4 endonuclease V(T4 PDG, NEB, England)를 처리하였음
- 효소 반응은 DNA 15 μ L(2 μ g), 10 \times T4 PDG reaction buffer 2 μ L, 10 \times BSA(100 μ g/mL) 2 μ L, T4 PDG 1 μ L(100 Unit)로 하여 37°C에서 30분간 반응시켰음

(5) 전기영동

- UV-C 조사한 균체의 genomic DNA에 double-strand break 또는 single-

strand break가 발생하였는지 조사하기 위하여 전기영동을 실시하였음

- Double-strand break의 확인을 위해서 전기영동 완충용액으로 0.5×TAE buffer(40 mM Tris-acetate, pH 8.0, 1 mM EDTA)를 사용하였으며 0.5 μg /mL의 ethidium bromide를 첨가한 0.8%의 agarose(Bio-Rad) 수평 gel을 사용하여 시료의 1/10배량의 10×gel loading buffer(0.25%(w/v) bromophenol blue, 40%(w/v) sucrose)를 가한 DNA 용액을 100 V에서 30분간 전기영동하였음
- Single-strand break의 확인을 위해서는 전기영동 완충용액으로 alkaline agarose gel buffer (50 mM NaOH, 1mM EDTA)를 사용하였으며 0.8%의 alkaline agarose 수평 gel을 사용하여 시료의 1/6량의 6×alkaline gel loading buffer(300 mM NaOH, 6 mM EDTA, 40%(w/v) sucrose, 0.15%(w/v) bromocresol green, 0.25%(w/v) xylene cyanol)를 가한 DNA 용액을 35 V에서 300분간 전기영동하였고, 전기영동 후 gel을 0.5 μg /mL의 ethidium bromide 용액에 1시간동안 염색한 후 증류수로 30분간 탈색하였음
- 균체로부터 분리된 RNA를 확인하기 위해서는 전기영동 완충용액으로 0.5×TAE buffer(40 mM Tris-acetate, pH 8.0, 1 mM EDTA)를 사용하였으며 0.5 μg /mL의 ethidium bromide를 첨가한 2%의 agarose(Bio-Rad) 수평 gel을 사용하여 시료의 1/10배량의 10×gel loading buffer(0.25% bromophenol blue, 40%(w/v) sucrose)를 가한 RNA 용액을 50 V에서 100분간 전기영동하였음
- 전기영동한 agarose gel은 254 nm의 자외선 조명하에서 관찰하였으며 사진 촬영은 UV-filter와 orange filter가 장착된 디지털카메라(Olympus C4040Z)를 이용하였으며, 사진촬영한 DNA와 RNA band의 이미지는 Image J(public domain NIH Image program, USA)를 이용하여 각각의 DNA 또는 RNA band의 면적을 계산하여 band의 상대적인 양을 구하였음

나. 실험결과

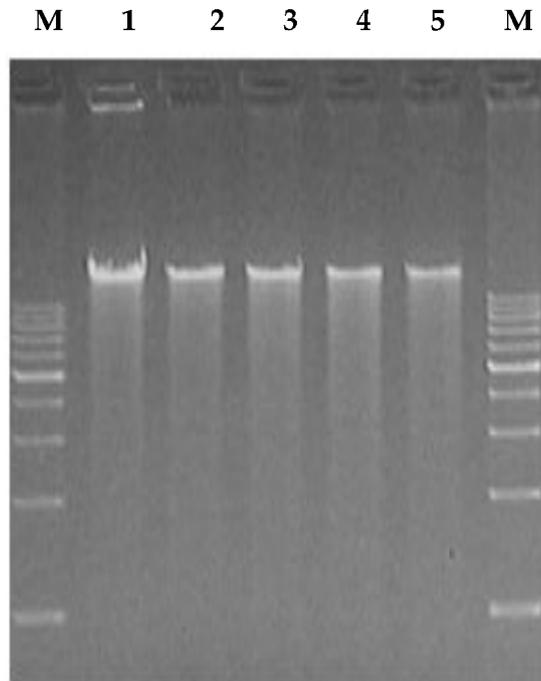
(1) Double-strand DNA break

- 광펄스에 의한 미생물 사멸기작을 규명하기 위한 비교 연구로서 연속 UV-C

조사에 의한 수산식품 유래 병원성 미생물의 핵산 손상도를 조사하였으며, 이를 위하여 수산식품 유래 병원성미생물 배양액에 254 nm의 UV-C를 연속 조사하여 DNA와 RNA의 손상도를 agarose gel 전기영동을 통하여 분석하였다.

- *L. monocytogenes*의 배양액에 UV-C를 20분간 조사하면서 5분 간격으로 세포를 취한 다음 genomic DNA를 분리하여 0.8%(w/v) neutral agarose gel에서 전기영동하여 genomic DNA에 double-strand break가 발생하였는지 조사하였음
- 그 결과 Fig. 3-48에 나타낸 바와 같이 UV-C를 5분간 조사하였을 때 genomic DNA 밴드의 농도가 감소하였고 20분까지 조사하였을 때 시간이 경과함에 따라 즉, 에너지 밀도가 증가함에 따라 DNA 밴드의 상대 면적이 13,939.31에서 9,938.891, 11,591.55, 9,752.426, 9,632.355의 수치로 나타나 지속적으로 감소함과 동시에 band 아래로 분해된 DNA들이 smear하게 나타남을 알 수 있었음
- *L. monocytogenes*뿐 아니라 *E. coli* O157:H7과 *P. aeruginosa*에서도 동일한 결과를 확인하였음(Fig. 3-49~50)
- *E. coli* O157:H7은 에너지 밀도가 증가함에 따라 DNA 밴드의 상대 면적이 9,801.255에서 6,929.962, 6,469.598, 5,958.841, 5,281.841로 감소하였고, *P. aeruginosa*는 9,801.255에서 6,929.962, 6,469.598, 5,958.841, 5,281.841로 감소하는 경향을 나타냈음
- 이 결과로부터 UV-C 조사에 의해 genomic DNA에서 double-strand break가 발생되는 것을 확인하였음
- Genomic DNA에 double-strand break가 발생되면 이를 회복할 수 있는 시스템이 세포 내에 존재하지 않기 때문에 결국 사멸에 이르게 됨(Chu, 1997).

(a)



(b)

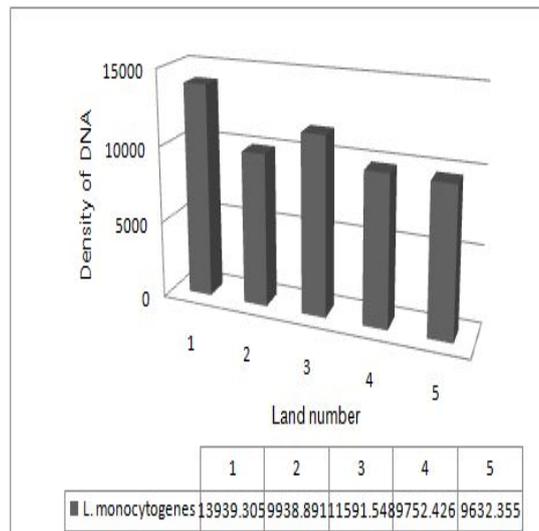
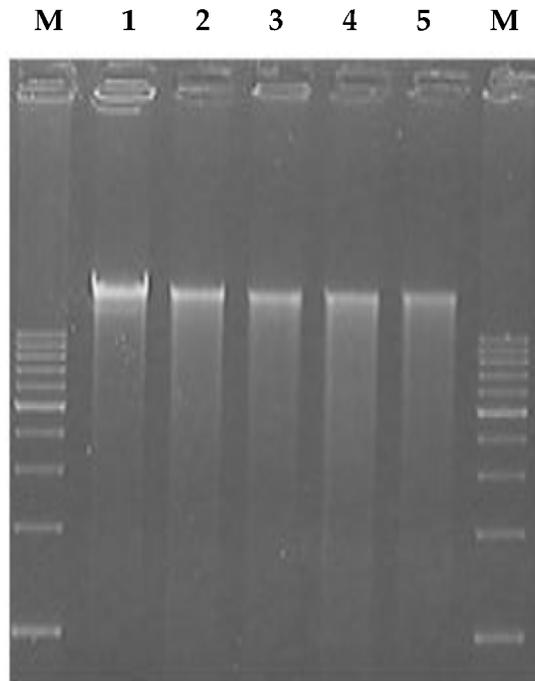


Fig. 3-48. Photograph of 0.8% neutral agarose gel electrophoresis of genomic DNAs extracted from *L. monocytogenes* cells irradiated with artificial UV-C (a) and densitometric analysis of each lane (b).

Lane M, molecular weight marker; 1, non-irradiated control DNA; 2, 5 min irradiation; 3, 10 min irradiation; 4, 20 min irradiation; 5, 30 min irradiation. The same amount of DNA ($0.4 \mu\text{g}$) was loaded on the each lane of the gel.

(a)



(b)

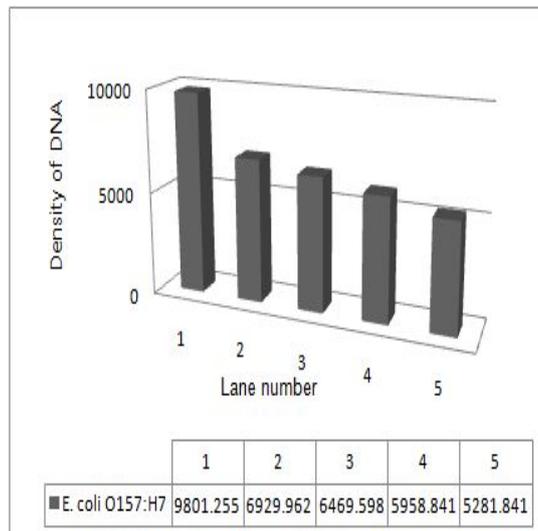


Fig. 3-49. Photograph of 0.8% neutral agarose gel electrophoresis of genomic DNAs extracted from *E. coli* O157:H7 cells irradiated with artificial UV-C (a) and densitometric analysis of each lane (b).

Lane M, molecular weight marker; 1, non-irradiated control DNA; 2, 5 min irradiation; 3, 10 min irradiation; 4, 20 min irradiation; 5, 30 min irradiation. The same amount of DNA ($0.5 \mu\text{g}$) was loaded on the each lane of the gel.

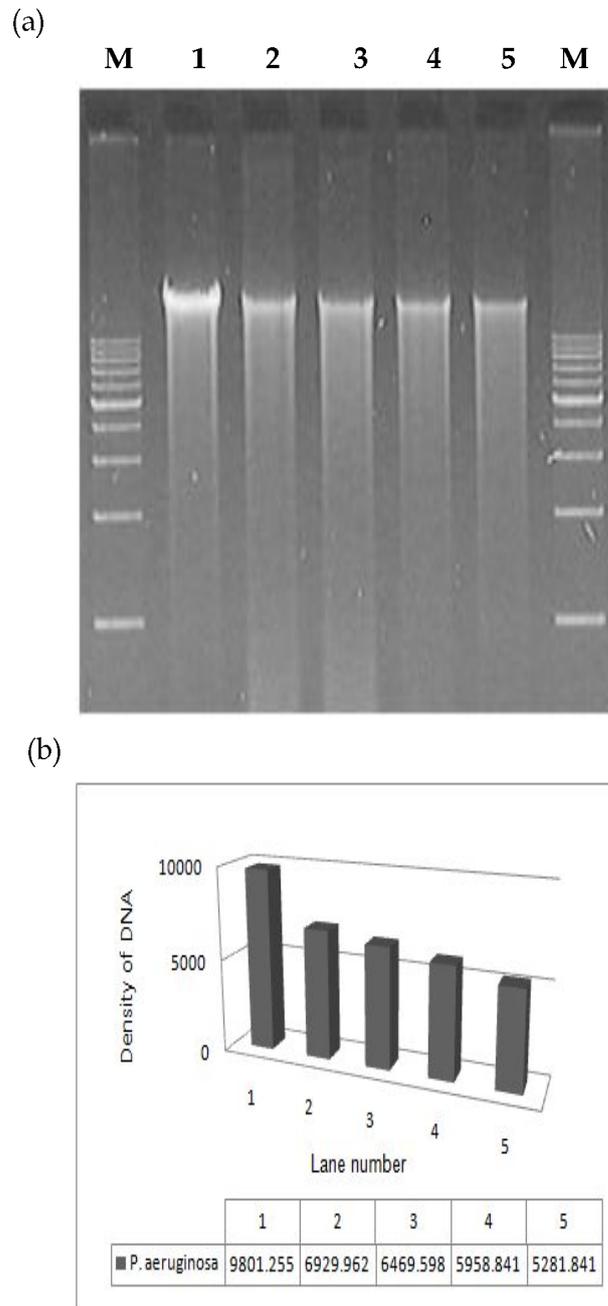


Fig. 3-50. Photograph of 0.8% neutral agarose gel electrophoresis of genomic DNAs extracted from *P. aeruginosa* cells irradiated with artificial UV-C (a) and densitometric analysis of each lane (b). Lane M, molecular weight marker; 1, non-irradiated control DNA; 2, 5 min irradiation; 3, 10 min irradiation; 4, 20 min irradiation; 5, 30 min irradiation. The same amount of DNA ($0.5 \mu\text{g}$) was loaded on the each lane of the gel.

(2) Single-strand DNA break

- UV-C 조사에 의해 수산식품 유래 병원성 미생물의 genomic DNA 상에 single-strand break가 생성되는지 조사하기 위하여 *L. monocytogenes*의 배양액에 UV-C를 5분 간격으로 20분간 조사한 후 genomic DNA를 분리하여 0.8%(w/v) alkaline agarose gel에서 전기영동을 실시하였다. 그 결과 Fig. 3-51의 lane 1,3,5,7,9에서와 같이 UV-C 조사 시간이 경과함에 따라 single-strand break가 증가하는 것을 확인할 수 있었으며 single-strand DNA간에 cross-link 현상이 발생하여 고분자량의 DNA들이 발생하는 것을 알 수 있었다. *E. coli* O157:H7과 *P. aeruginosa*에서도 동일한 결과를 확인하였다(Fig. 3-52~53, lane 3,5,7,9).

(다) Pyrimidine dimer 형성

- UV-C 조사에 의해 genomic DNA 상에 pyrimidine dimer가 생성되는지 조사하기 위하여 *L. monocytogenes*의 배양액에 UV-C를 5분 간격으로 20분간 조사한 후 genomic DNA를 분리한 다음 pyrimidine dimer의 cross-link 결합을 절단하는 효소인 T4 endonuclease V(T4 PDG)를 처리하여 0.8%(w/v) alkaline agarose gel에서 전기영동을 실시하였음
- 그 결과 Fig. 3-51의 lane 4,6,8,10에서와 같이 효소처리 시 DNA의 band가 효소처리 하지 않은 DNA에 비해 상당량 분해되는 것으로 보아 UV-C 조사에 의하여 pyrimidine dimer가 발생하는 것을 확인할 수 있었음
- 그러나 UV-C 조사 시간이 증가함에 따라 pyrimidine dimer의 발생 정도가 감소하는 것으로 나타났는데 이는 UV-C 조사 시간 중에도 야생 병원성세포가 지니고 있는 nucleotide excision repair system이 작동하여 생성되고 있는 pyrimidine dimer를 제거하는 것이기 때문으로 판단되며 pyrimidine dimer의 생성 속도보다 pyrimidine dimer를 제거하는 속도가 빠르기 때문에 UV-C 조사 시간의 증가에 따라 pyrimidine dimer 발생량이 감소하는 것으로 판단됨.
- *E. coli* O157:H7과 *P. aeruginosa*에서도 동일한 결과를 확인하였다(Fig. 3-52~53, lane 4,6,8,10).

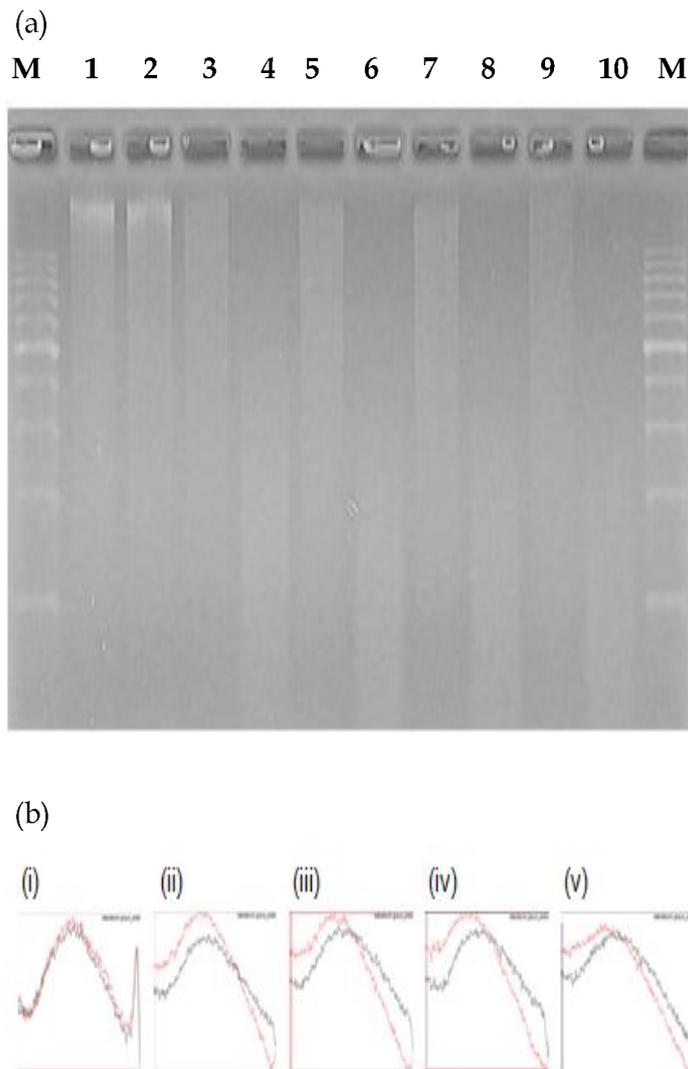


Fig. 3-51. Photograph of 0.8% alkaline agarose gel electrophoresis of genomic DNA extracted from *L. monocytogenes* cells irradiated with artificial UV-C (a) and densitometric scan of each lane (b). The samples are paired, of which the first of each pair was not treated with T4 PDG and the second was treated with T4 PDG.

Lane M, Molecular weight marker; 1, non-irradiated control DNA; 2, control DNA (non-irradiated but treated with T4 PDG); 3, 5 min irradiation; 4, 5 min irradiation followed by treatment with T4 PDG; 5, 10 min irradiation; 6, 10 min irradiation followed by treatment with T4 PDG; 7, 15 min irradiation; 8, 15 min irradiation followed by treatment with T4 PDG; 9, 20 min irradiation; 10, 20 min irradiation followed by treatment with T4 PDG. The same amount of DNA (1 μg) was loaded on the each lane of the gel.

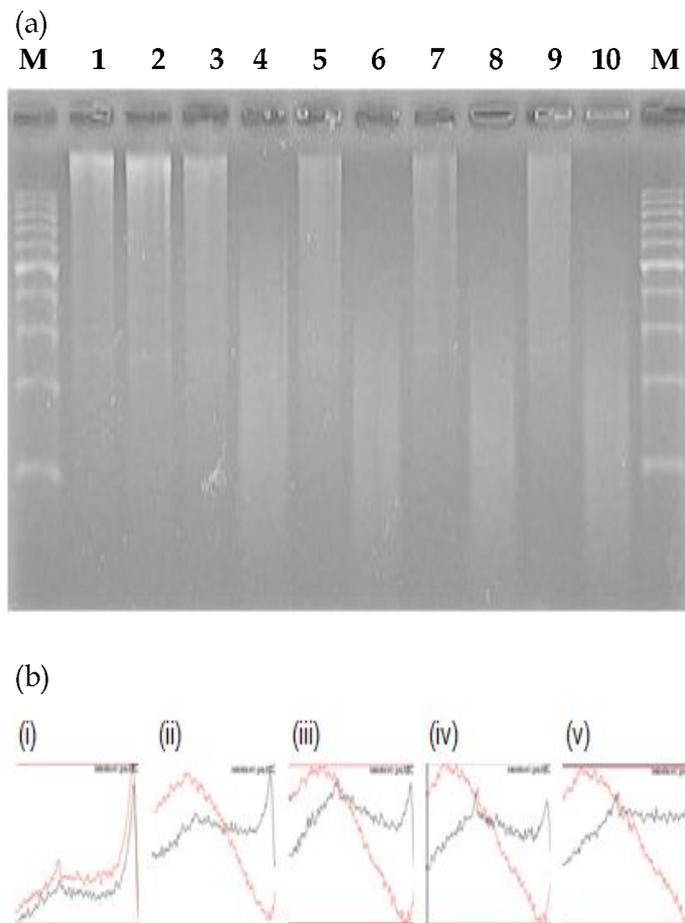


Fig. 3-52. Photograph of 0.8% alkaline agarose gel electrophoresis of genomic DNA extracted from *E. coli* O157:H7 cells irradiated with artificial UV-C (a) and densitometric scan of each lane (b). The samples are paired, of which the first of each pair was not treated with T4 PDG and the second was treated with T4 PDG.

Lane M, Molecular weight marker; 1, non-irradiated control DNA; 2, control DNA (non-irradiated but treated with T4 PDG); 3, 5 min irradiation; 4, 5 min irradiation followed by treatment with T4 PDG; 5, 10 min irradiation; 6, 10 min irradiation followed by treatment with T4 PDG; 7, 15 min irradiation; 8, 15 min irradiation followed by treatment with T4 PDG; 9, 20 min irradiation; 10, 20 min irradiation followed by treatment with T4 PDG. The same amount of DNA (1 μ g) was loaded on the each lane of the gel.

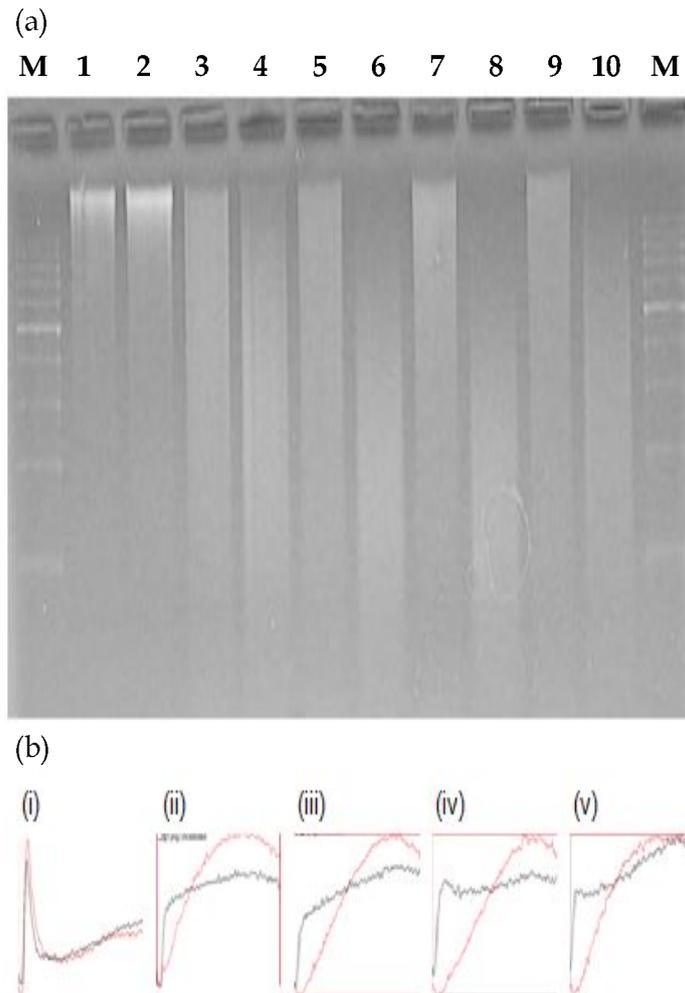


Fig. 3-53. Photograph of 0.8% alkaline agarose gel electrophoresis of genomic DNA extracted from *P. aeruginosa* cells irradiated with artificial UV-C (a) and densitometric scan of each lane (b). The samples are paired, of which the first of each pair was not treated with T4 PDG and the second was treated with T4 PDG.

Lane M, Molecular weight marker; 1, non-irradiated control DNA; 2, control DNA (non-irradiated but treated with T4 PDG); 3, 5 min irradiation; 4, 5 min irradiation followed by treatment with T4 PDG; 5, 10 min irradiation; 6, 10 min irradiation followed by treatment with T4 PDG; 7, 15 min irradiation; 8, 15 min irradiation followed by treatment with T4 PDG; 9, 20 min irradiation; 10, 20 min irradiation followed by treatment with T4 PDG. The same amount of DNA (1 μg) was loaded on the each lane of the gel.

(라) RNA break

- UV-C 조사에 의한 미생물 세포가 지니고 있는 RNA 손상 여부를 조사하기 위하여 *L. monocytogenes*의 배양액에 UV-C를 5분 간격으로 20분간 조사한 후 total RNA를 분리하여 1.2 %(w/v) agarose gel에서 전기영동을 실시하였음
- 이들 중에서 일반적인 agarose gel 상에서는 23S rRNA와 16S rRNA가 주요 RNA band로 나타나고 mRNA는 희미하게 나타남.
- Fig. 3-54에서와 같이 전기영동상에서 23S rRNA와 16S rRNA가 2개의 주요 band로 나타나고 있는데 control과 비교하여 UV-C를 조사한 균의 RNA band의 변화가 없었음
- *E. coli* O157:H7과 *P. aeruginosa* 세포에서도 UV-C 조사에 따른 RNA의 분해 현상을 관찰할 수 없었음(Fig. 3-55~56).

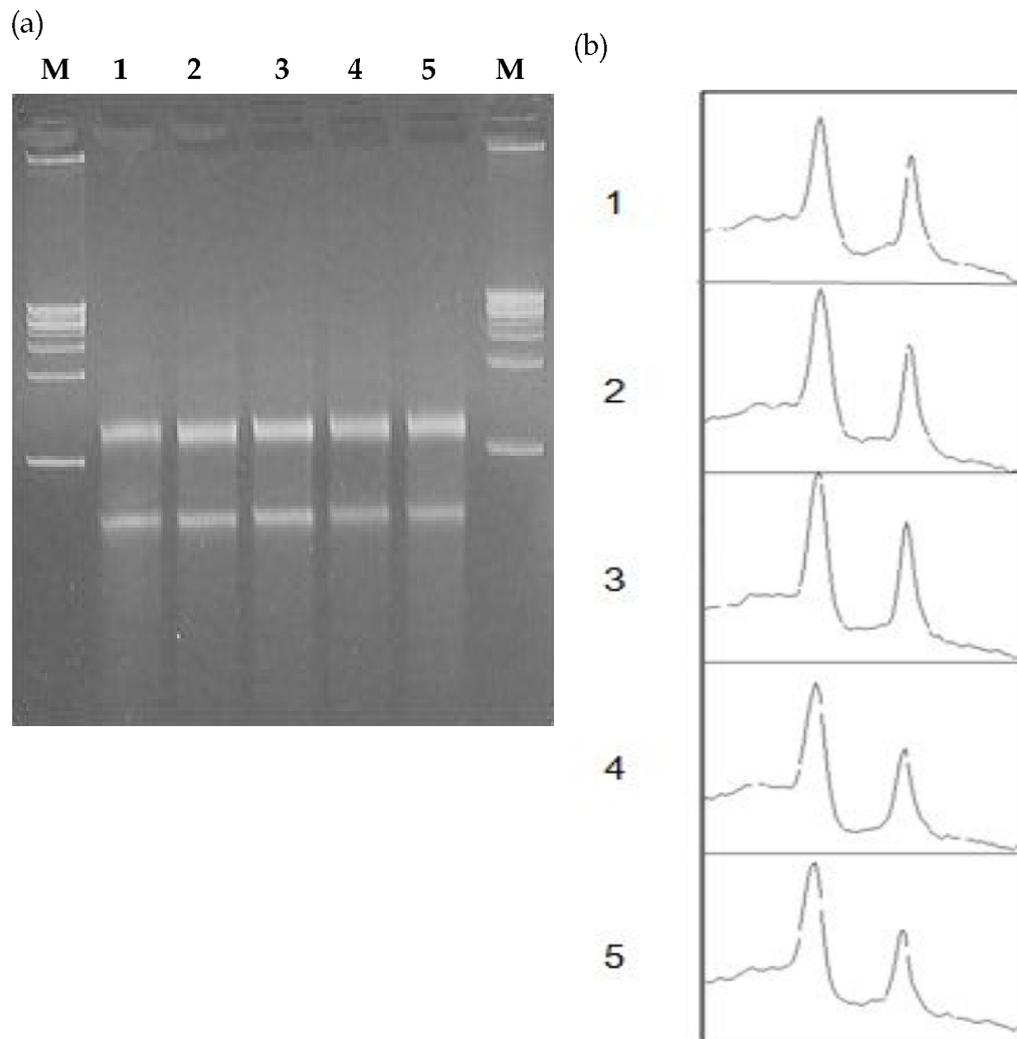


Fig. 3-54. Photograph of neutral 1.2% agarose gel electrophoresis of RNAs extracted from *L. monocytogenes* cells irradiated with artificial UV-C (a) and densitometric scan of each lane (b).

Lane M, Molecular weight marker; 1, control RNA (non-irradiated); 2, 5 min irradiation; 3, 10 min irradiation; 4, 20 min irradiation; 5, 30 min irradiation. The same amount of RNA ($1 \mu\text{g}$) was loaded on the each lane of the gel.

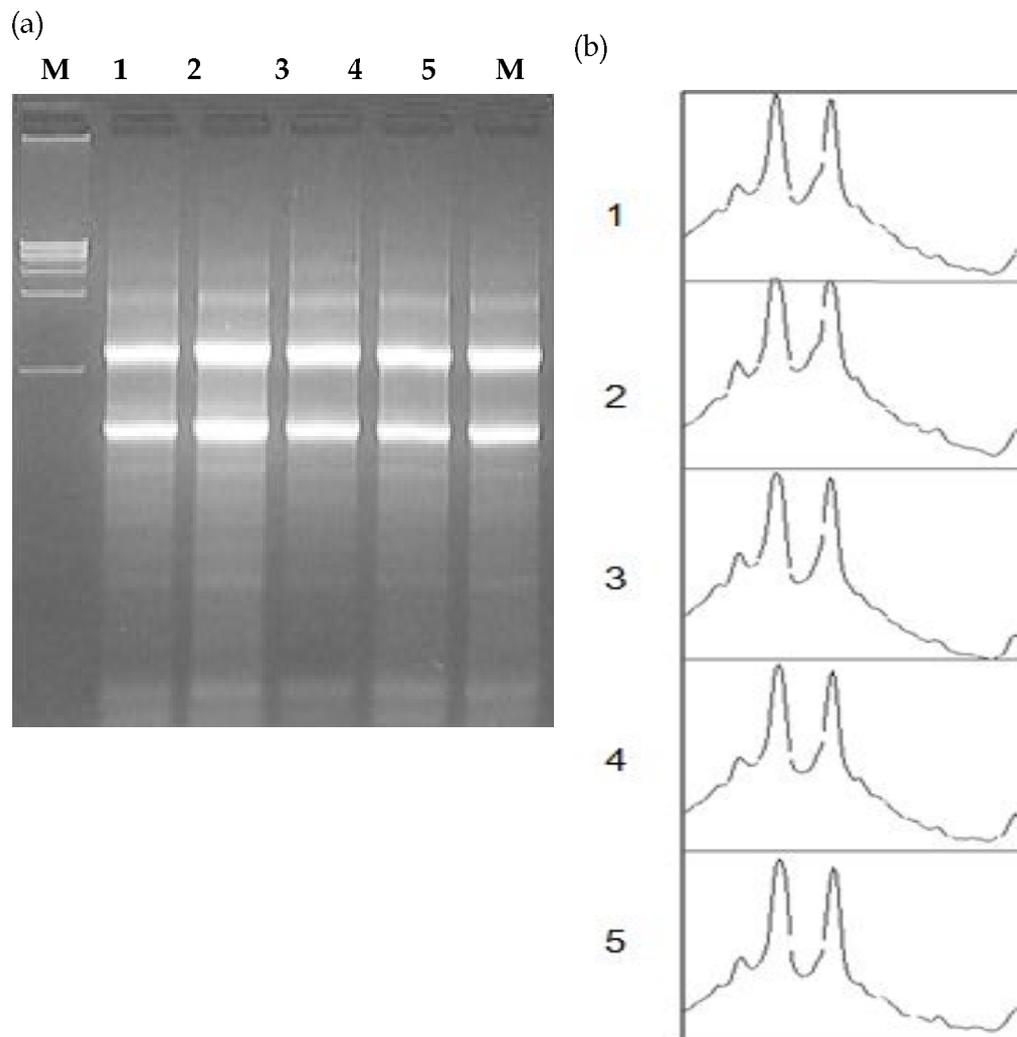


Fig. 3-55. Photograph of neutral 1.2% agarose gel electrophoresis of RNAs extracted from *E. coli* O157:H7 cells irradiated with artificial UV-C (a) and densitometric scan of each lane (b).

Lane M, Molecular weight marker; 1, control RNA (non-irradiated); 2, 5 min irradiation; 3, 10 min irradiation; 4, 20 min irradiation; 5, 30 min irradiation. The same amount of RNA ($1 \mu\text{g}$) was loaded on the each lane of the gel.

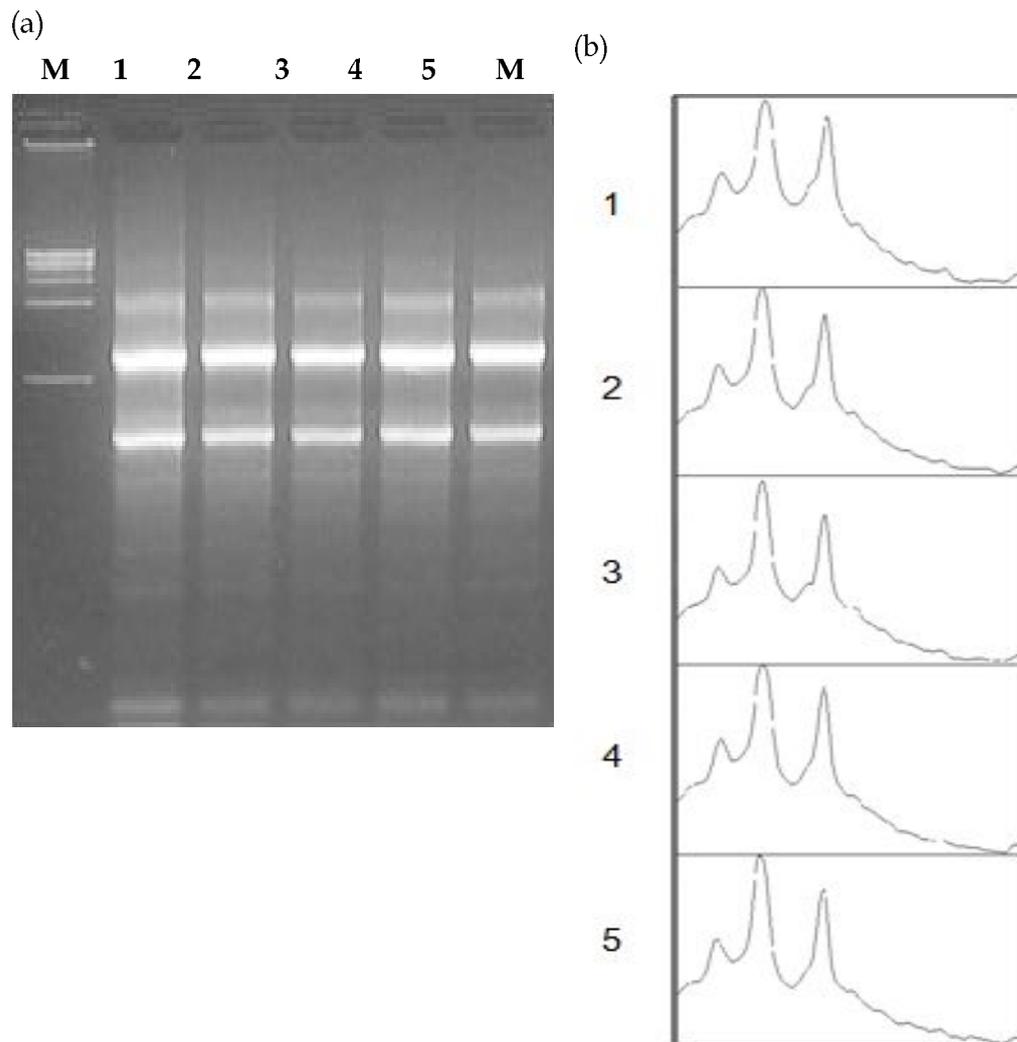


Fig. 3-56. Photograph of neutral 1.2% agarose gel electrophoresis of RNAs extracted from *P. aeruginosa* cells irradiated with artificial UV-C (a) and densitometric scan of each lane (b).

Lane M, Molecular weight marker; 1, control RNA (non-irradiated); 2, 5 min irradiation; 3, 10 min irradiation; 4, 20 min irradiation; 5, 30 min irradiation. The same amount of RNA ($1 \mu\text{g}$) was loaded on the each lane of the gel.

(마) UV-C 조사에 의한 수산식품 유래 병원성 미생물의 사멸율

- UV-C 조사에 의한 병원성미생물의 생균수와 이에 따른 사멸율을 조사한 결과 Table 3-18과 같음
- 야생주인 *L. monocytogenes* 는 UV를 조사하지 않을 경우 8.2×10^8 CFU/mL의 생균수를 나타내었으며 5분간 조사하였을 때에는 1.1×10^6 CFU/mL, 10분간 조사 시 3.9×10^5 CFU/mL, 15분간 조사 시 2.5×10^5 CFU/mL, 20분간 조사 시 8.9×10^4 CFU/mL의 생균수를 나타내어 급격한 생균수의 감소를 보여 주었음
- 그러나 조사 10분 후부터는 생균수에 큰 변화를 나타내지 않아 10분 이상의 UV 조사는 *L. monocytogenes* 세포의 사멸에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었음
- UV 조사 시간에 따른 사멸율은 5분 조사 시 0.30, 10분 조사 시 0.16, 15분 조사 시 0.11, 20분 조사할 경우 0.09으로 조사시간이 증가함에 따라 즉, 에너지 밀도가 증가함에 따라 사멸율이 감소하는 것으로 나타났다. 이 결과는 야생주인 *L. monocytogenes*의 double-strand break와 single-strand break 실험 결과와도 일치함을 알 수 있었음
- *E. coli* O157:H7는 UV를 조사하지 않을 경우 5.1×10^9 CFU/mL의 생균수를 나타내었으며 5분간 조사 시 4.8×10^5 CFU/mL, 10분간 조사 시 5.8×10^4 CFU/mL, 15분간 조사 시 1.4×10^4 CFU/mL, 20분간 조사 시 6.2×10^3 CFU/mL의 생균수를 나타내었다. UV 조사 시간에 따른 사멸율은 5분 조사 시 0.34, 10분 조사 시 0.2, 15분 조사 시 0.16, 20분 조사할 경우 0.13의 값을 나타내었음
- *P. aeruginosa* 는 UV를 조사하지 않을 경우 8.5×10^9 CFU/mL의 생균수를 나타내었으며 5분간 조사 시 2.1×10^7 CFU/mL, 10분간 조사 시 1.1×10^6 CFU/mL, 15분간 조사 시 9.7×10^5 CFU/mL, 20분간 조사 시 5.6×10^5 CFU/mL의 생균수가 측정되었고, UV 조사 시간에 따른 사멸율은 5분 조사 시 0.27, 10분 조사 시 0.16, 15분 조사 시 0.11, 20분 조사할 경우 0.09의 값이 나타내어 수산식품유래 병원성 미생물은 모두 유사한 결과를 보여 주었음

Table 3-18. Viable cell number and death rate of pathogen bacterial cells by UV irradiation

Bacterial strain	UV irradiation time (min)	Energy density ¹⁾ (J/cm ²)	Viable cell number (CFU/mL)	Death rate ¹⁾
<i>L. monocytogenes</i>	0		8.2±8.5×10 ⁸	
	5	0.126	1.1±2.3×10 ⁶	0.30
	10	0.252	3.9±6.9×10 ⁵	0.16
	15	0.378	2.5±2.9×10 ⁵	0.11
	20	0.504	8.9±9.9×10 ⁴	0.09
<i>E. coli</i> O157:H7	0		5.1±3.9×10 ⁹	
	5	0.126	4.8±7.1×10 ⁵	0.34
	10	0.252	5.8±2.5×10 ⁴	0.2
	15	0.378	1.4±3.0×10 ⁴	0.16
	20	0.504	6.2±7.6×10 ³	0.13
<i>P. aeruginosa</i>	0		8.5±3.5×10 ⁹	
	5	0.126	2.1±2.4×10 ⁷	0.27
	10	0.252	1.1±2.4×10 ⁶	0.16
	15	0.378	9.7±12×10 ⁵	0.11
	20	0.504	5.6±6.9×10 ⁵	0.09

¹⁾ Energy density (J/cm²) = W/m² x s (time)/10000

²⁾ Death rate = -log (viable cell number before UV irradiation/viable cell number after UV irradiation)/duration time (min) of UV irradiation.

제 10 절 광펄스 조사에 의한 미생물의 사멸 기작 규명

1. 광펄스에 의한 *E. coli* 모델 균주의 사멸기작

가. 실험 방법

(1) 사용균주

- 자외선(continuous-wave UV light) 조사에 의한 미생물의 사멸기작을 연구하기 위하여 *E. coli* Genetic Stock Center에서 분양받은 *E. coli* AB1157 (CGSC 1157)과 이 균주의 *uvrA* 유전자에 대한 돌연변이균주인 *E. coli* AB1886 (CGSC 1886)을 모델 미생물로 이용하였음

strain	Relevant genotype	Origin or source
<i>E. coli</i> AB1157	<i>tF thr-1 leuB6 D(gpt-proA)62 hisG4 thi-1 argE3 lacY1 galK2 ara-14 xyl-5 mtl-1 tsx-33 supE44 rpsL31 kdgK51 rfbD1 mgl-51 lcs rac</i>	<i>E. coli</i> Genetic Stock Center, USA
<i>E. coli</i> AB1886	same as AB1157 but <i>uvrA6</i>	<i>E. coli</i> Genetic Stock Center, USA

(2) 광펄스 조사

- 광펄스 조사에 의한 미생물의 사멸기작을 연구하기 위해서 모델 미생물인 *E. coli* AB1157과 *E. coli* AB1886을 각각 5 mL의 LB broth에 접종한 후, 37°C에서 24시간 배양하였음
- 각 배양액을 10,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 상등액을 제거한 다음 세포를 0.1 M의 potassium phosphate buffer 5 mL로 세척하였음
- 이를 원심분리하여 상등액을 제거하고 0.1 M potassium phosphate buffer 5 mL로 현탁한 후 지름 10 cm의 petri dish에 분주하였음

- 시료가 함유된 Petri dish를 high-intensity pulsed light 기기의 xenon lamp 와 12 cm의 간격을 두고 25 kV, 500 V 또는 600 V의 전압으로 5분간 광펄스를 조사하였음
- 광펄스의 에너지 밀도는 Ruggedized wideband spectroradio meter ILT 900-R(International light, USA)를 이용하여 측정하였으며, 가시광선에 의한 photoreactivation을 방지하기 위해 암실 상태에서 실험을 수행하였음
- 한편 수산식품 유래 병원성 미생물인 *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *P. aeruginosa*의 광펄스 조사에 의한 세포의 사멸기작을 조사하기 위하여 Tryptic soy broth에 각각의 균주를 접종한 후, 37°C에서 24시간 배양한 후 모델 미생물과 동일 방법으로 처리하였음

(3) DNA 분리

- UV-C 또는 광펄스를 조사한 균체를 Petri dish로부터 15 mL tube에 회수하고 10,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 200 μ L의 SET buffer(20% sucrose, 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 50 mM EDTA)로 현탁하였음
- 여기에 50 μ L의 60 mg/mL lysozyme(Sigma Co.)과 3 μ L의 20 mg/mL RNase A(Sigma Co.) 용액을 첨가하여 37°C에서 15분간 반응시켰고, 반응 후 20 μ L의 20 mg/mL proteinase K(Sigma Co.)를 첨가하여 37°C에서 15분간 반응시킨 다음 Bioneer사의 Genomic DNA Extraction Kit를 사용하여 제조사의 manual에 따라 균체의 genomic DNA를 분리하였음
- 회수된 DNA의 농도는 UV spectrophotometer(Shimadzu)를 사용하여 260 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 확인하였음

(4) RNA 분리

- RNA 분리를 위해 모든 시약 및 glassware는 0.1% diethyl pyrocarbonate (DEPC)로 37°C에서 12시간 동안 처리한 후 100°C에서 15분간 autoclave하였음
- 실험에 사용한 모든 plastic ware도 RNase-free 제품을 사용하였다. UV-C 또는 광펄스를 조사한 균체를 Petri dish로부터 15 mL conical tube에 회수하고 10,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 0.5 mL의 0.1 M potassium phosphate

buffer(pH 7.6)로 현탁하였음

- 세포 현탁액을 Qiagen사의 RNeasy Protect Bacteria Mini Kit를 사용하여 제조사의 manual에 따라 RNA를 분리하였음
- 회수된 RNA의 농도는 UV spectrophometer를 사용하여 260 nm의 파장에서 측정하여 확인하였음

(5) 효소처리

- UV-C 조사한 균체의 DNA에 *cis-syn-cyclobutane* pyrimidine dimer가 생성되었는지의 여부를 알아보기 위하여 균체로부터 분리된 genomic DNA에 T4 endonuclease V(T4 PDG, NEB, England)를 처리하였음
- 효소 반응은 DNA 15 μ L(2 μ g), 10 \times T4 PDG reaction buffer 2 μ L, 10 \times BSA(100 μ g/mL) 2 μ L, T4 PDG 1 μ L(100 Unit)로 하여 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시켰음

(6) 전기영동

- UV-C 조사한 균체의 genomic DNA에 double-strand break 또는 single-strand break가 발생하였는지 조사하기 위하여 전기영동을 실시하였음
- Double-strand break의 확인을 위해서 전기영동 완충용액으로 0.5 \times TAE buffer(40 mM Tris-acetate, pH 8.0, 1 mM EDTA)를 사용하였으며 0.5 μ g/mL의 ethidium bromide를 첨가한 0.8%의 agarose(Bio-Rad) 수평 gel을 사용하여 시료의 1/10배량의 10 \times gel loading buffer(0.25%(w/v) bromophenol blue, 40%(w/v) sucrose)를 가한 DNA 용액을 100 V에서 30분간 전기영동하였음
- Single-strand break의 확인을 위해서는 전기영동 완충용액으로 alkaline agarose gel buffer (50 mM NaOH, 1mM EDTA)를 사용하였으며 0.8%의 alkaline agarose 수평 gel을 사용하여 시료의 1/6량의 6 \times alkaline gel loading buffer(300 mM NaOH, 6 mM EDTA, 40%(w/v) sucrose, 0.15%(w/v) bromocresol green, 0.25%(w/v) xylene cyanol)를 가한 DNA 용액을 35 V에서 300분간 전기영동하였고, 전기영동 후 gel을 0.5 μ g/mL의 ethidium bromide 용액에 1시간동안 염색한 후 증류수로 30분간 탈색하였음

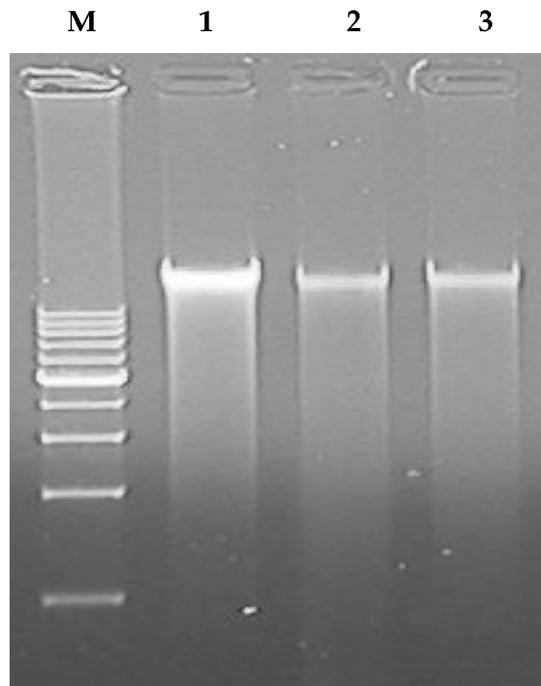
- 균체로부터 분리된 RNA를 확인하기 위해서는 전기영동 완충용액으로 0.5×TAE buffer(40 mM Tris-acetate, pH 8.0, 1 mM EDTA)를 사용하였으며 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 ethidium bromide를 첨가한 2%의 agarose(Bio-Rad) 수평 gel을 사용하여 시료의 1/10배량의 10×gel loading buffer(0.25% bromophenol blue, 40%(w/v) sucrose)를 가한 RNA 용액을 50 V에서 100분간 전기영동하였음
- 전기영동한 agarose gel은 254 nm의 자외선 조명하에서 관찰하였으며 사진 촬영은 UV-filter와 orange filter가 장착된 디지털카메라(Olympus C4040Z)를 이용하였으며, 사진촬영한 DNA와 RNA band의 이미지는 Image J(public domain NIH Image program, USA)를 이용하여 각각의 DNA 또는 RNA band의 면적을 계산하여 band의 상대적인 양을 구하였음

나. 실험 결과

(1) Double-strand DNA break

- 광펄스에 의한 미생물 사멸기작을 분자생물학적으로 조사하기 위하여 모델균주 *E. coli* 세포에 광펄스를 조사하였을 경우 DNA와 RNA의 손상도를 조사하였음
- Ruggedized wideband spectroradio meter ILT 900-R로 측정된 광펄스의 전체 에너지 밀도는 500 V에서 376.02 W/m^2 , 600 V에서 455.92 W/m^2 이었으며, 이를 J/cm^2 단위로 환산할 경우, 5분에서 500 V는 11.28 J/cm^2 , 600 V는 13.68 J/cm^2 의 값을 나타내었음
- 광펄스의 UV-C 영역은 500 V에서 0.73 W/m^2 , 600 V에서는 1.43 W/m^2 로 측정되었음
- *E. coli* AB1157 세포의 배양액에 광펄스를 500 V와 600 V로 5분간 조사한 후, genomic DNA를 분리하여 0.8%(w/v) neutral agarose gel에서 전기영동하여 DNA에 double-strand break가 발생하였는지 조사한 결과, Fig. 3-57에 나타낸 바와 같이 광펄스 조사에 의해 DNA 밴드의 상대 면적이 16,839.62에서 11,248.91, 11,310.26으로 감소하였다. 이는 5분 동안의 UV조사에 의한 DNA의 면적이 9,637.598에서 5,431.426로 감소하는 결과에 비해 현저히 낮은 감소량을 나타냄을 보여줌

(a)



(b)

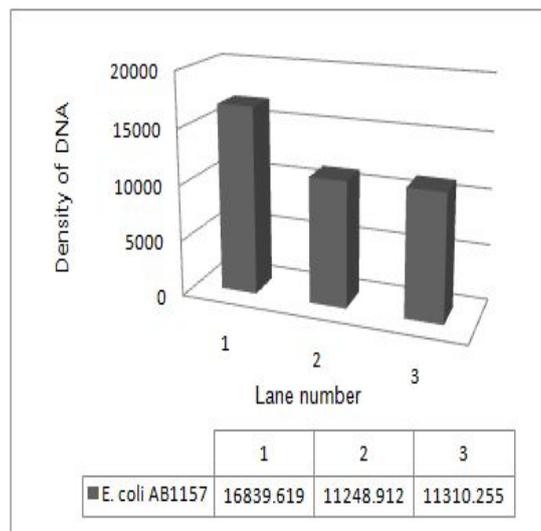


Fig. 3-57. Photograph of 0.8% neutral agarose gel electrophoresis of genomic DNAs extracted from *E. coli* AB1157 cells irradiated with IPL (a) and densitometric analysis of each lane (b).

Lane M, molecular weight marker; 1, control DNA (non-irradiated); 2, IPL-irradiated DNA at 500 V; 3, IPL-irradiated DNA at 600 V. The same amount of DNA (0.5 μg) was loaded on the each lane of the gel.

- 따라서 광펄스 조사로 DNA상에 double-strand break는 미미하게 발생하는 것으로 생각되며, *E. coli* AB1886 세포에서도 DNA 밴드의 면적이 12,432.35에서 11,841.57, 10,725.03의 수치로 감소하여 *E. coli* AB1157과 같은 패턴의 현상이 관찰되었음(Fig. 3-58).

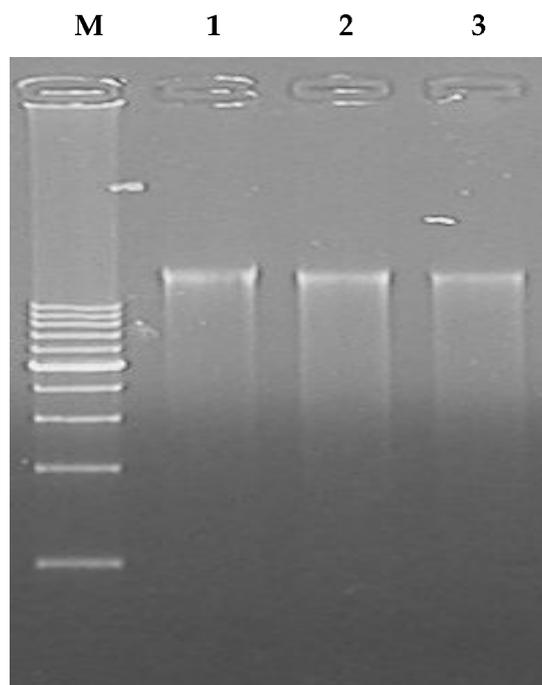
(2) Single-strand DNA break

- 광펄스 조사에 의해 모델균주 *E. coli* 세포의 genomic DNA 상에 single-strand break가 생성되는지 조사하기 위하여 각 미생물의 배양액에 광펄스를 500 V와 600 V로 5분간 조사한 후 genomic DNA를 분리하여 0.8%(w/v) alkaline agarose gel에서 전기영동을 실시하였음
- 그 결과 Fig. 3-59에서와 같이 *E. coli* AB1157과 이 균주의 *uvrA* 유전자의 결손 돌연변이주인 *E. coli* AB1886(Fig. 3-60) 세포 모두 DNA 상에서 single-strand break가 약간 발생하였으나(lane 3과 5) UV-C 조사와 비교할 경우 매우 약하게 발생하는 것을 알 수 있었음

(3) Pyrimidine dimer 형성

- 광펄스 조사에 의해 genomic DNA 상에 pyrimidine dimer가 생성되는지 조사하기 위하여 모델균주인 *E. coli*의 각 배양액에 광펄스를 500 V와 600 V로 5분간 조사한 후 genomic DNA를 분리한 다음 pyrimidine dimer의 cross-link 결합을 절단하는 효소인 T4 endonuclease V(T4 PDG)를 처리하여 0.8%(w/v) alkaline agarose gel에서 전기영동을 실시하였음
- 그 결과 Fig. 3-59의 lane 2, 4, 6에서와 같이 *E. coli* AB1157 균주에서는 pyrimidine dimer가 약간 발생하였으나 이 균주의 *uvrA* 유전자의 결손 돌연변이주인 *E. coli* AB1886(Fig. 3-60)에서는 DNA 상에서 pyrimidine dimer가 상당히 발생하였음(lane 2, 4, 6)
- 이는 DNA repair system이 정상적으로 존재하는 *E. coli* AB1157 균주에서는 광펄스 조사에 의해 발생된 pyrimidine dimer를 nucleotide excision repair system이 작동하여 제거함으로써 pyrimidine dimer의 발생이 낮은 수준으로 발생되었기 때문으로 판단되며, 이 결과로부터 광펄스 조사가 세포의 nucleotide excision repair system를 손상시키지는 않는 것으로 사료됨

(a)



(b)

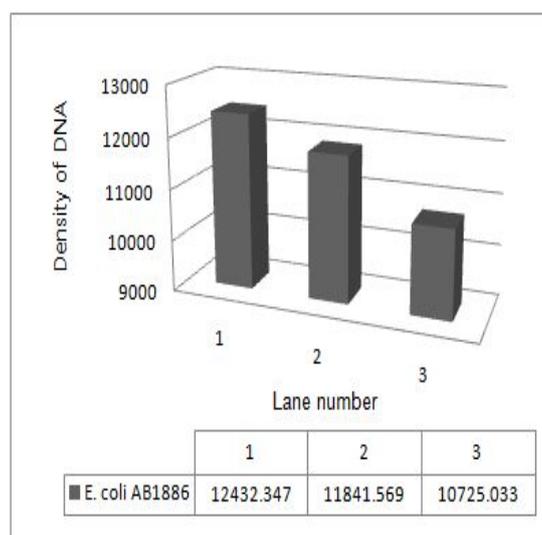


Fig. 3-58. Photograph of 0.8% neutral agarose gel electrophoresis of genomic DNAs extracted from *E. coli* AB1886 cells irradiated with IPL (a) and densitometric analysis of each lane (b).

Lane M, molecular weight marker; 1, control DNA (non-irradiated); 2, IPL-irradiated DNA at 500 V; 3, IPL-irradiated DNA at 600 V. The same amount of DNA (0.4 μ g) was loaded on the each lane of the gel.

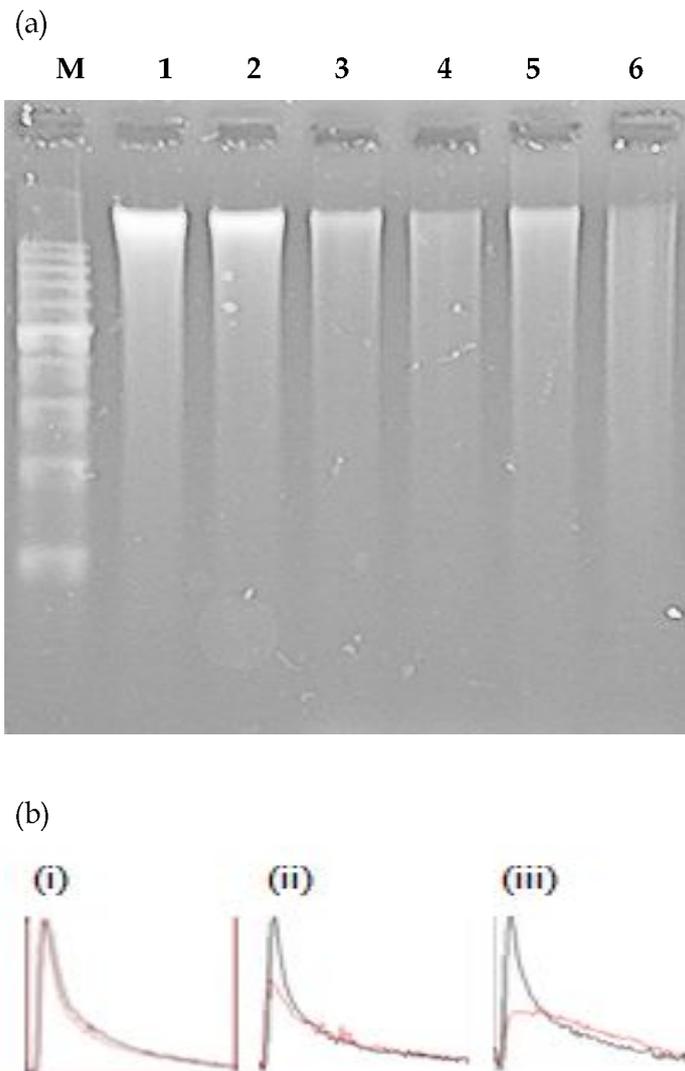


Fig. 3-59. Photograph of 0.8% alkaline agarose gel electrophoresis of genomic DNA extracted from *E. coli* AB1157 cells irradiated with IPL (a) and densitometric scan of each lane (b). The samples are paired, of which the first of each pair was not treated with T4 PDG and the second was treated with T4 PDG.

Lane M, Molecular weight marker; 1, control DNA (non-irradiated); 2, control DNA (non-irradiated but treated with T4 PDG); 3, IPL-irradiated DNA at 500 V; 4, IPL-irradiated DNA at 500 V followed by treatment with T4 PDG; 5, IPL-irradiated DNA at 600 V; 6, IPL-irradiated DNA at 600 V followed by treatment with T4 PDG. The same amount of DNA ($1.5 \mu\text{g}$) was loaded on the each lane of the gel.

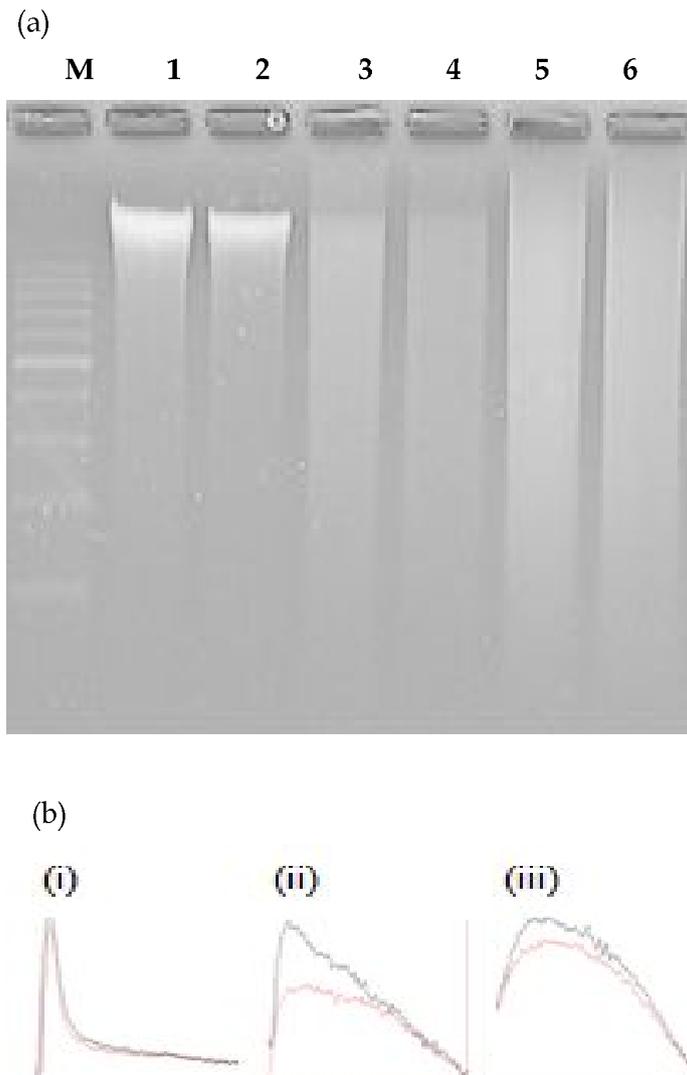


Fig. 3-60. Photograph of 0.8% alkaline agarose gel electrophoresis of genomic DNA extracted from *E. coli* AB1886 cells irradiated with IPL (a) and densitometric scan of each lane (b). The samples are paired, of which the first of each pair was not treated with T4 PDG and the second was treated with T4 PDG.

Lane M, Molecular weight marker; 1, control DNA (non-irradiated); 2, control DNA (non-irradiated but treated with T4 PDG); 3, IPL-irradiated DNA at 500 V; 4, IPL-irradiated DNA at 500 V followed by treatment with T4 PDG; 5, IPL-irradiated DNA at 600 V; 6, IPL-irradiated DNA at 600 V followed by treatment with T4 PDG. The same amount of DNA ($1.5 \mu\text{g}$) was loaded on the each lane of the gel.

(4) RNA break

- 광펄스 조사에 의해 미생물 세포가 지니고 있는 RNA가 손상되는지 여부를 조사하기 위하여 모델균주 *E. coli* 각 배양액에 광펄스를 500 V와 600 V로 5분간 조사한 후 total RNA를 분리하여 1.2%(w/v) agarose gel에서 전기영동을 실시하였음
- 그 결과 Fig. 3-61에서와 같이 조사한 모든 미생물에서 광펄스 조사에 의해 23S 또는 16S rRNA가 분해되었거나 cross-link에 의해 고분자량 핵산이 형성된 것으로 판단되었다. 또한 전기영동 상에서 희미하게 보이는 mRNA가 광펄스 조사에 의해 농도가 감소하는 것으로 나타났는데 이는 광펄스 조사에 의해 mRNA가 분해되었기 때문인 것으로 판단됨
- *E. coli* AB1886 세포에서도 동일한 RNA 분해 현상을 관찰할 수 있었다(Fig. 3-62).

(5) 광펄스 조사에 의한 *E. coli* 모델균주의 사멸율

- 광펄스 조사에 의한 *E. coli* 모델균주의 생균수와 이에 따른 사멸율을 조사한 결과 Table 3-19에 나타낸 바와 같이 야생주인 *E. coli* AB1157은 광펄스를 조사하지 않을 경우 1.4×10^9 CFU/mL의 생균수를 나타내었으며 5분간 500 V에서 조사하였을 때에는 1.2×10^6 CFU/mL, 600 V에서는 1.5×10^5 CFU/mL의 생균수를 나타내어 급격한 생균수의 감소를 보여주었음
- 5분간 광펄스를 처리시 사멸율은 500 V에서 0.30, 600 V에서 0.35로 나타났다. *E. coli* AB1157의 돌연변이주인 *E. coli* AB1886도 UV를 조사하지 않을 경우 1.2×10^9 CFU/mL의 생균수를 나타내었으며 5분간 500 V에서는 1.3×10^5 CFU/mL, 5분간 600 V에서는 1.8×10^5 CFU/mL의 생균수가 측정되었고, UV 조사 시간에 따른 사멸율은 5분 조사 시 0.36, 10분 조사 시 0.35로 *E. coli* AB1157과 유사한 결과를 나타내었음

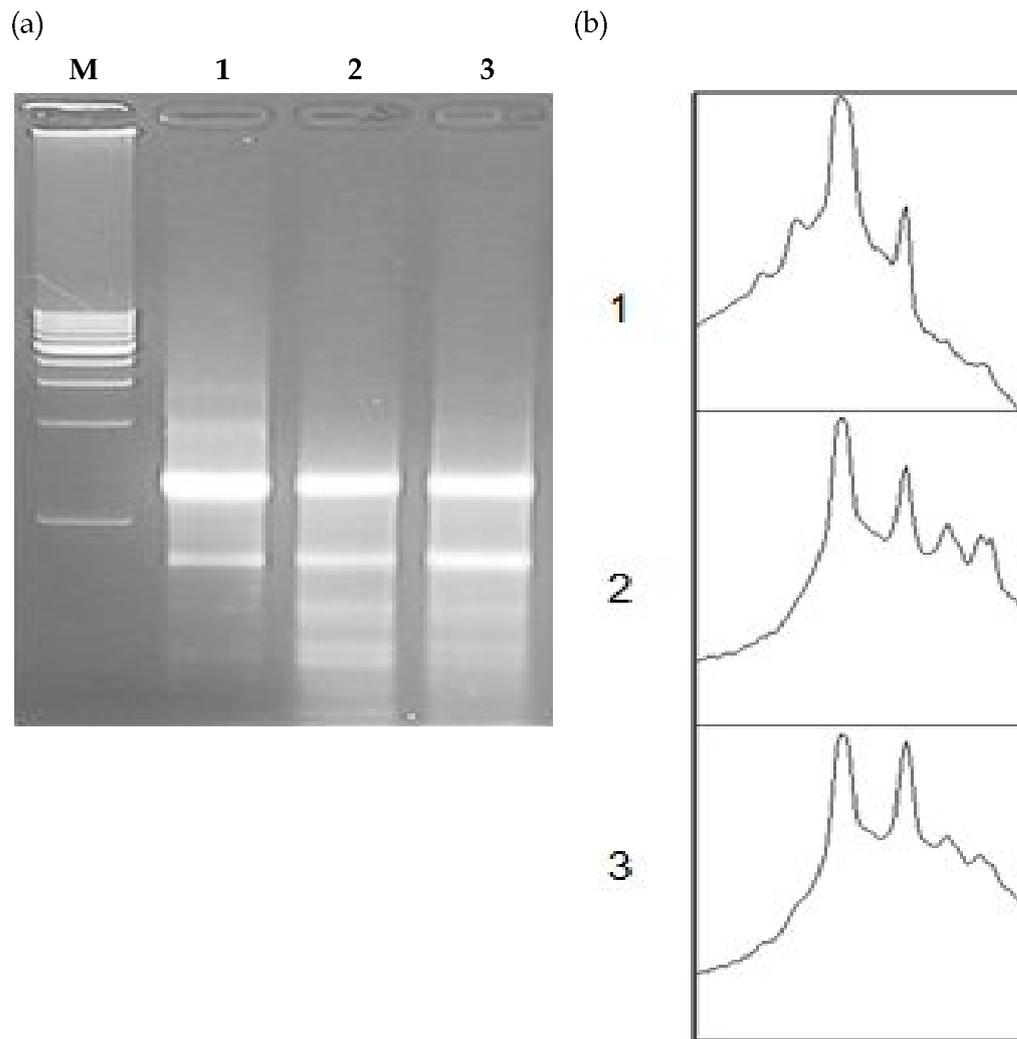


Fig. 3-61. Photograph of neutral 1.2% agarose gel electrophoresis of RNAs extracted from *E. coli* AB1157 cells irradiated with artificial UV-C (a) and densitometric scan of each lane (b).

Lane M, Molecular weight marker; 1, control RNA (non-irradiated); 2, IPL-irradiated RNA at 500 V; 3, IPL-irradiated RNA at 600 V. The same amount of RNA ($1 \mu\text{g}$) was loaded on the each lane of the gel.

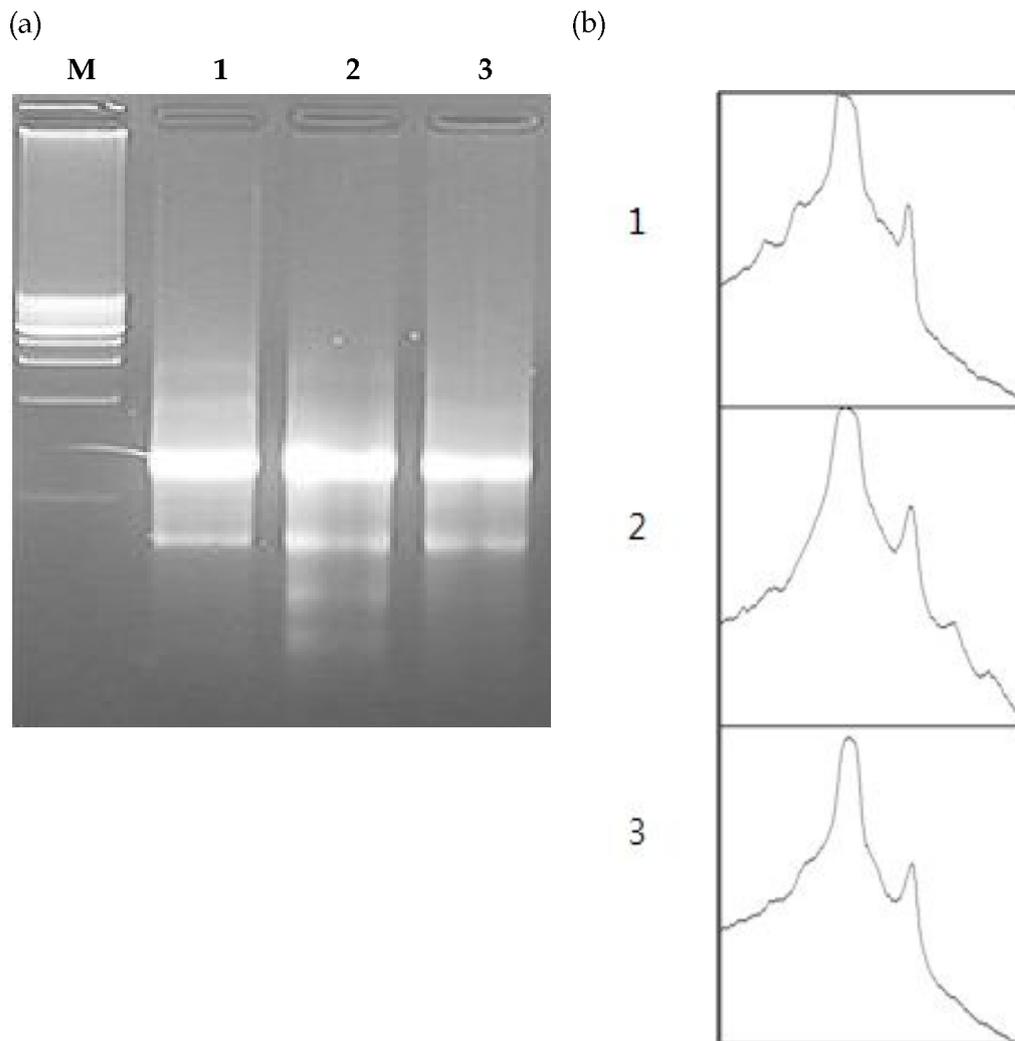


Fig. 3-62. Photograph of neutral 1.2% agarose gel electrophoresis of RNAs extracted from *E. coli* AB1886 cells irradiated with artificial UV-C (a) and densitometric scan of each lane (b).

Lane M, Molecular weight marker; 1, control RNA (non-irradiated); 2, IPL-irradiated RNA at 500 V; 3, IPL-irradiated RNA at 600 V. The same amount of RNA ($1 \mu\text{g}$) was loaded on the each lane of the gel.

Table 3-19. Viable cell number and death rate of *E. coli* cells by IPL irradiation

Bacterial strain	IPL irradiation voltage (V)	Energy density ¹⁾ (J/cm ²)	Viable cell number (CFU/mL)	Death rate ²⁾
<i>E. coli</i> AB1157	0		1.4±0.24×10 ⁹	
	500	11.28	1.2±1.10×10 ⁶	0.30
	600	13.68	1.5±2.00×10 ⁵	0.35
<i>E. coli</i> AB1886	0		1.2±0.83×10 ⁹	
	500	11.28	1.3±1.80×10 ⁵	0.36
	600	13.68	1.8±1.10×10 ⁵	0.35

¹⁾ Energy density (J/cm²) = W/m² × s (time)/10000

²⁾ Death rate = -log (viable cell number before IPL irradiation/viable cell number after IPL irradiation)/duration time (min) of IPL irradiation.

2. 광펄스 조사에 의한 수산식품에 존재하는 병원성 미생물의 사멸기작

가. 실험 방법

(1) 사용균주

- 수산식품 유래 식중독 미생물의 사멸기작을 연구하기 위하여 표준균주인 *Listeria monocytogenes* KCCM 40307, *E. coli* O157:H7 ATCC 43859, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145를 이용하였음

(2) 광펄스 처리

- 수산식품 유래 병원성 미생물인 *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *P. aeruginosa*의 자외선 조사에 의한 세포의 사멸기작을 조사하기 위하여 Tryptic soy broth에 각각의 균주를 접종한 후, 37°C에서 24시간 배양한 후 모델 미생물과 동일 방법으로 처리하였음

(3) DNA와 RNA의 분리

- 수산식품 유래 병원성 미생물을 광펄스 처리한 후 모델 미생물과 동일한 방법으로 DNA와 RNA를 분리하여 DNA와 RNA의 농도를 특정하여 확인하였음

(4) 효소처리

- UV-C 조사한 균체의 DNA에 *cis-syn-cyclobutane* pyrimidine dimer가 생성되었는지의 여부를 알아보기 위하여 균체로부터 분리된 genomic DNA에 T4 endonuclease V(T4 PDG, NEB, England)를 처리하였음
- 효소 반응은 DNA 15 μ L(2 μ g), 10 \times T4 PDG reaction buffer 2 μ L, 10 \times BSA(100 μ g/mL) 2 μ L, T4 PDG 1 μ L(100 Unit)로 하여 37°C에서 30분간 반응시켰음

(5) 전기영동

- UV-C 조사한 균체의 genomic DNA에 double-strand break 또는 single-

strand break가 발생하였는지 조사하기 위하여 전기영동을 실시하였음

- Double-strand break의 확인을 위해서 전기영동 완충용액으로 0.5×TAE buffer(40 mM Tris-acetate, pH 8.0, 1 mM EDTA)를 사용하였으며 0.5 μg /mL의 ethidium bromide를 첨가한 0.8%의 agarose(Bio-Rad) 수평 gel을 사용하여 시료의 1/10배량의 10×gel loading buffer(0.25%(w/v) bromophenol blue, 40%(w/v) sucrose)를 가한 DNA 용액을 100 V에서 30분간 전기영동 하였음
- Single-strand break의 확인을 위해서는 전기영동 완충용액으로 alkaline agarose gel buffer (50 mM NaOH, 1mM EDTA)를 사용하였으며 0.8%의 alkaline agarose 수평 gel을 사용하여 시료의 1/6량의 6×alkaline gel loading buffer(300 mM NaOH, 6 mM EDTA, 40%(w/v) sucrose, 0.15%(w/v) bromocresol green, 0.25%(w/v) xylene cyanol)를 가한 DNA 용액을 35 V에서 300분간 전기영동하였고, 전기영동 후 gel을 0.5 μg /mL의 ethidium bromide 용액에 1시간동안 염색한 후 증류수로 30분간 탈색하였 음
- 균체로부터 분리된 RNA를 확인하기 위해서는 전기영동 완충용액으로 0.5×TAE buffer(40 mM Tris-acetate, pH 8.0, 1 mM EDTA)를 사용하였으며 0.5 μg /mL의 ethidium bromide를 첨가한 2%의 agarose(Bio-Rad) 수평 gel을 사용하여 시료의 1/10배량의 10×gel loading buffer(0.25% bromophenol blue, 40%(w/v) sucrose)를 가한 RNA 용액을 50 V에서 100분간 전기영동하였음
- 전기영동한 agarose gel은 254 nm의 자외선 조명하에서 관찰하였으며 사진 촬영은 UV-filter와 orange filter가 장착된 디지털카메라(Olympus C4040Z)를 이용하였으며, 사진촬영한 DNA와 RNA band의 이미지는 Image J(public domain NIH Image program, USA)를 이용하여 각각의 DNA 또는 RNA band의 면적을 계산하여 band의 상대적인 양을 구하였음

나. 실험 결과

(1) Double-strand DNA break

- 광펄스는 식품 표면의 세균과 곰팡이 등을 사멸시키는 효과적인 방법으로 알려져 있는데(Dunn, 1996; Anderson et al., 2000), 광펄스 조사에 의해 세균은

2~8 log, 곰팡이는 4.5 log의 사멸효과가 있다고 보고되고 있음(MacGregor et al., 1998; Rowan et al., 1999).

- 광펄스의 사멸효과를 결정하는 중요 인자는 방출되는 spectrum의 조성인데, UV 파장만으로도 일정 수준 이상의 사멸효과를 나타냄
- 광펄스 처리에 저항성을 나타내는 정도는 UV를 흡수하는 색소 함량에 의해 영향을 받는데, 예를 들면 *Aspergillus niger*는 conidia의 진한 색소에 의해 저항성이 증가함(Rowan et al., 1999; Anderson et al., 2000).
- 광펄스에 의한 미생물 사멸기작을 분자생물학적으로 조사하기 위하여 수산식품 유래 병원성 미생물 3종을 선정하여 이들 미생물에 광펄스를 조사하였을 경우 DNA와 RNA의 손상도를 조사하였음
- 선정된 병원성 미생물은 본 연구의 대상 식품인 수산식품 중에 존재하는 *L. monocytogenes*와 *B. cereus* 중에서 수산식품 위생에 문제가 되고 있는 *L. monocytogenes*를 선정하였고, 광펄스 실험의 비교 실험인 UV-C 조사 실험에 사용하였던 *E. coli* 균주와 동일한 종인 *E. coli* O157:H7을 선정하였으며, 수산식품의 부패 미생물로 알려진 *P. aeruginosa*를 추가로 선정하여 실험에 사용하였음
- 선정된 병원성 미생물의 각 배양액에 광펄스를 25 kV에서 5분간 조사한 후 genomic DNA를 분리하여 0.8%(w/v) neutral agarose gel에서 전기영동하여 DNA에 double-strand break가 발생하였는지 조사한 결과, Fig. 3-57에 나타낸 바와 같이 3종의 병원성 미생물 모두 광펄스 조사에 의해 DNA상에 double-strand break가 거의 발생되지 않는 것으로 나타났다. 3종의 병원성 미생물 배양액에 500 V와 600 V로 광펄스 조사를 재수행한 결과 *L. monocytogenes*(Fig. 3-58)는 DNA 밴드의 면적이 13,096.01에서 10,928.96, 8,781.548로, *E. coli* O157:H7(Fig. 3-59)는 DNA 밴드의 면적이 11,387.05에서 8,619.497, 7,059.376로, *P. aeruginosa*(Fig. 3-60)는 DNA 밴드의 면적이 13,978.3에서 13,182.71, 11,387.05의 수치로 감소하여, 모두 광펄스 조사에 의해 DNA상의 double-strand break가 약하게 발생되었음을 확인하였음
- 이 결과로부터 광펄스에 의한 DNA의 double-strand break는 UV-C 조사에 비해 매우 낮은 수준으로 발생하는 것을 알 수 있었음

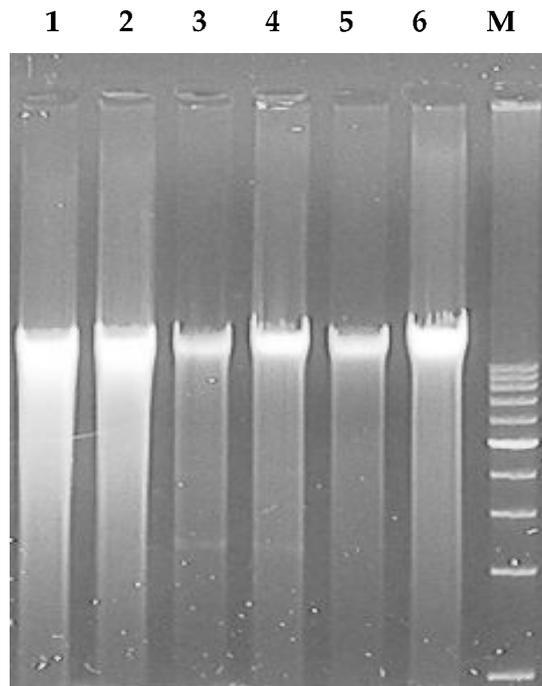
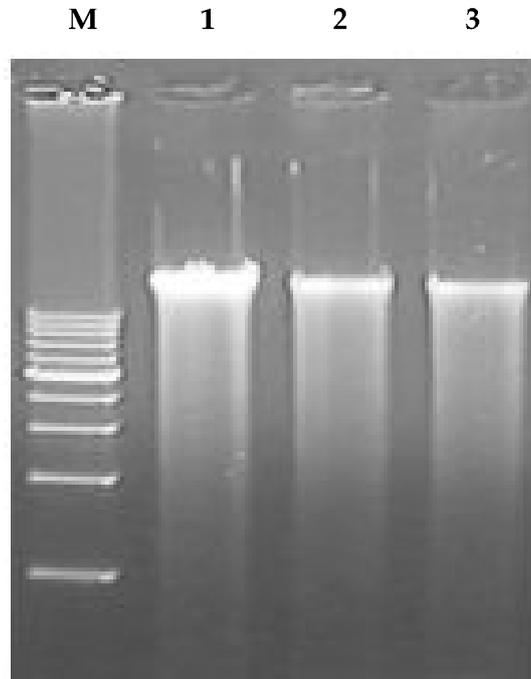


Fig. 3-57. Photograph of 0.8% neutral agarose gel electrophoresis of genomic DNAs extracted from food-borne pathogen cells irradiated with IPL. Lane M, molecular weight marker; 1, control DNA from *L. monocytogenes* (non-irradiated); 2, IPL-irradiated DNA from *L. monocytogenes*; 3, control DNA from *E. coli* O157:H7 (non-irradiated); 4, IPL-irradiated DNA from *E. coli* O157:H7; 5, control DNA from *P. aeruginosa* (non-irradiated); 6, IPL-irradiated DNA from *P. aeruginosa*. The same amount of DNA (1.65 μg) was loaded on the each lane of the gel.

(a)



(b)

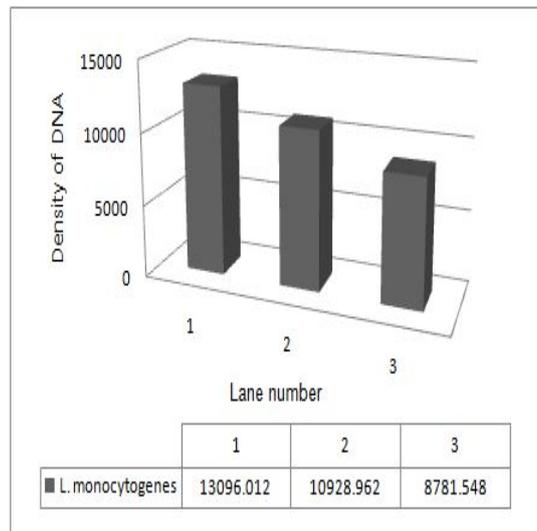
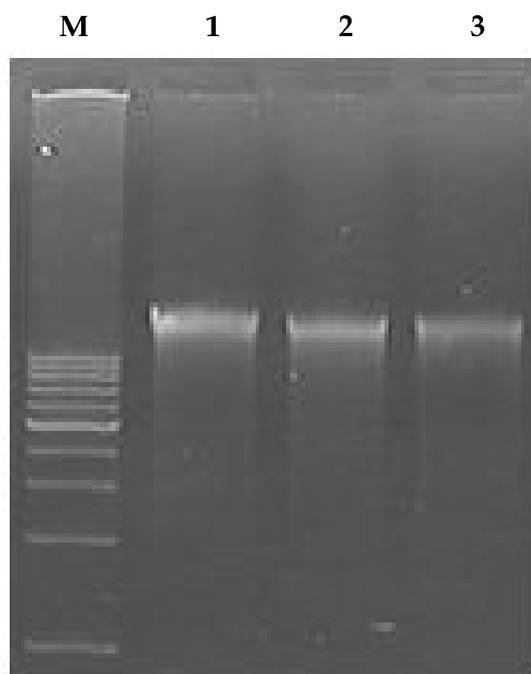


Fig. 3-58. Photograph of 0.8% neutral agarose gel electrophoresis of genomic DNAs extracted from *L. monocytogenes* irradiated with IPL (a) and densitometric analysis of each lane (b).

Lane M, molecular weight marker; 1, control DNA (non-irradiated); 2, IPL-irradiated DNA at 500 V; 3, IPL-irradiated DNA at 600 V; The same amount of DNA ($0.4 \mu\text{g}$) was loaded on the each lane of the gel.

(a)



(b)

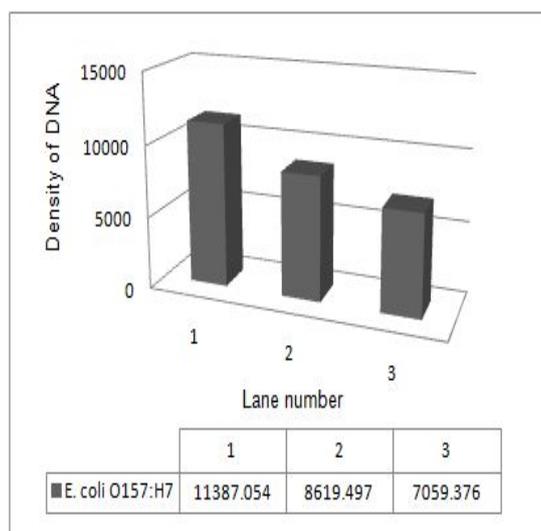


Fig. 3-59. Photograph of 0.8% neutral agarose gel electrophoresis of genomic DNAs extracted from *E. coli* O157:H7 irradiated with IPL (a) and densitometric analysis of each lane (b).

Lane M, molecular weight marker; 1, control DNA (non-irradiated); 2, IPL-irradiated DNA at 500 V; 3, IPL-irradiated DNA at 600 V; The same amount of DNA (0.5 μ g) was loaded on the each lane of the gel.

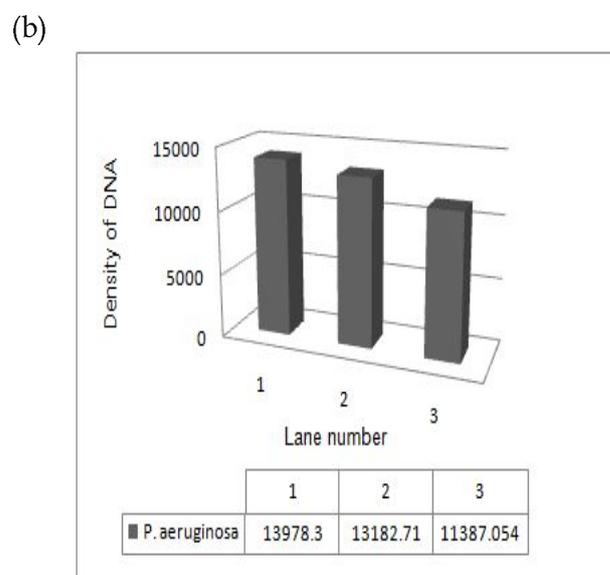
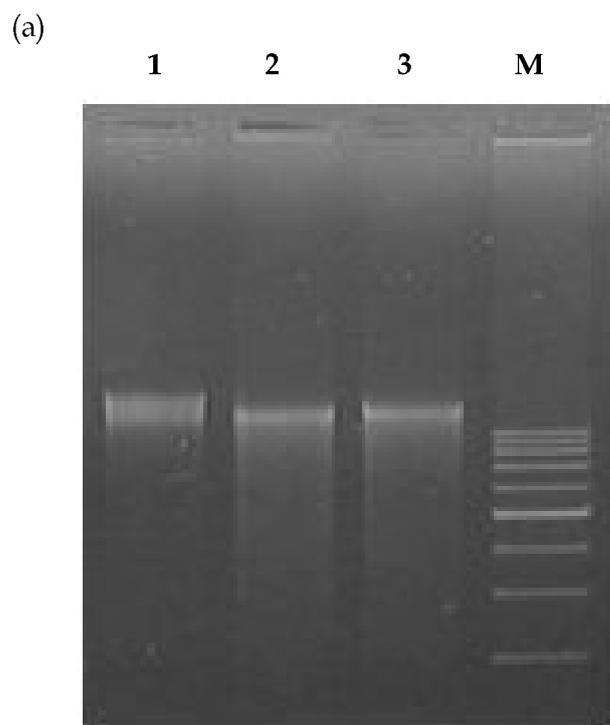


Fig. 3-60. Photograph of 0.8% neutral agarose gel electrophoresis of genomic DNAs extracted from *P. aeruginosa* irradiated with IPL (a) and densitometric analysis of each lane (b).

Lane M, molecular weight marker; 1, control DNA (non-irradiated); 2, IPL-irradiated DNA at 500 V; 3, IPL-irradiated DNA at 600 V; The same amount of DNA ($0.5 \mu\text{g}$) was loaded on the each lane of the gel.

(2) Single-strand DNA break

- 광펄스 조사에 의해 병원성 미생물의 genomic DNA 상에 single-strand break가 생성되는지 조사하기 위하여 각 병원성 미생물의 배양액에 광펄스를 25 kV에서 5분간 조사한 후 genomic DNA를 분리하여 0.8%(w/v) alkaline agarose gel에서 전기영동을 실시하였음
- 그 결과 Fig. 3-61에서와 같이 조사한 3종의 미생물 모두 DNA 상에서 single-strand break가 약간 발생하였으나(lane 3, 7, 11) UV-C 조사와 비교할 경우 매우 약하게 발생하는 것을 알 수 있었음
- 조사한 3종의 병원성 미생물 중에서는 *P. aeruginosa*에서 single-strand break가 가장 많이 발생하는 것으로 나타남(lane 11).
- 3종의 병원성 미생물 배양액에 500 V와 600 V로 광펄스 조사를 재수행한 결과 *L. monocytogenes*(Fig. 3-62), *E. coli* O157:H7(Fig. 3-63)과 *P. aeruginosa*(Fig. 3-64)에서 모두 광펄스 조사에 의한 DNA상의 single-strand break가 일부 발생되었음을 확인하였음(lane 3은 500 V 처리, lane 5는 600 V 처리).
- 이 결과로부터 광펄스에 의한 DNA의 single-strand break는 UV-C 조사에 비해 매우 낮은 수준으로 발생하는 것을 알 수 있었음

(a)

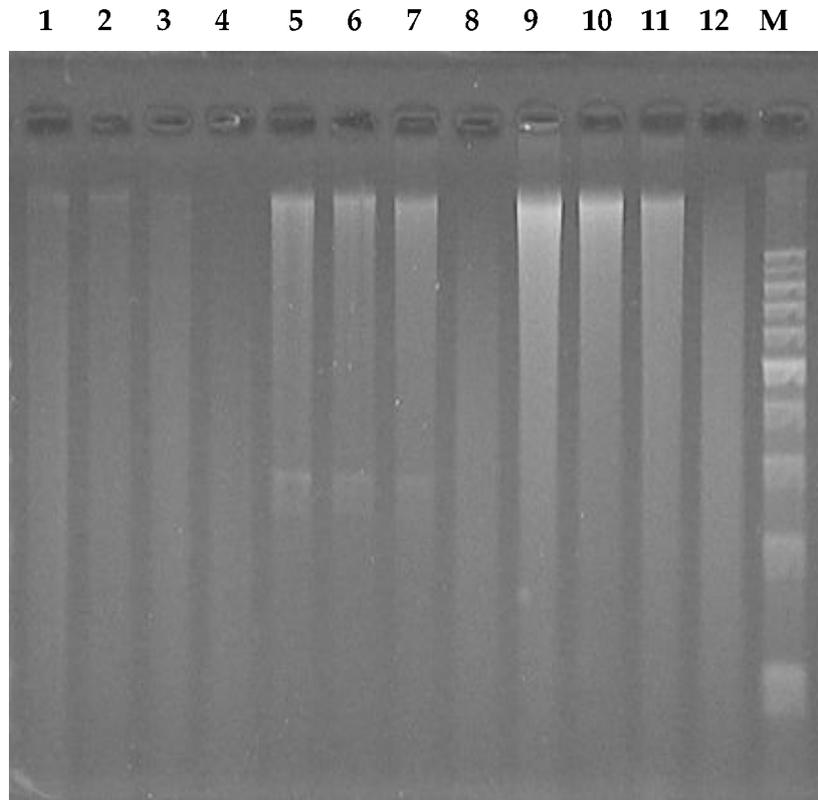


Fig. 3-61. Photograph of 0.8% alkaline agarose gel electrophoresis of genomic DNA extracted from food-borne pathogen cells irradiated with IPL. Lane M, Molecular weight marker; 1, control DNA from *L. monocytogenes* (non-irradiated); 2, control DNA from *L. monocytogenes* (non-irradiated but treated with T4 PDG); 3, IPL-irradiated DNA from *L. monocytogenes*; 4, IPL-irradiated DNA from *L. monocytogenes* followed by treatment with T4 PDG; 5, control DNA from *E. coli* O157:H7 (non-irradiated); 6, control DNA from *E. coli* O157:H7 (non-irradiated but treated with T4 PDG); 7, IPL-irradiated DNA from *E. coli* O157:H7; 8, IPL-irradiated DNA from *E. coli* O157:H7 followed by treatment with T4 PDG; 9, control DNA from *P. aeruginosa* (non-irradiated); 10, control DNA from *P. aeruginosa* (non-irradiated but followed by treatment with T4 PDG); 11, IPL-irradiated DNA from *P. aeruginosa*; 12, IPL-irradiated DNA from *P. aeruginosa* followed by treatment with T4 PDG. The same amount of DNA (1.65 μg) was loaded on the each lane of the gel.

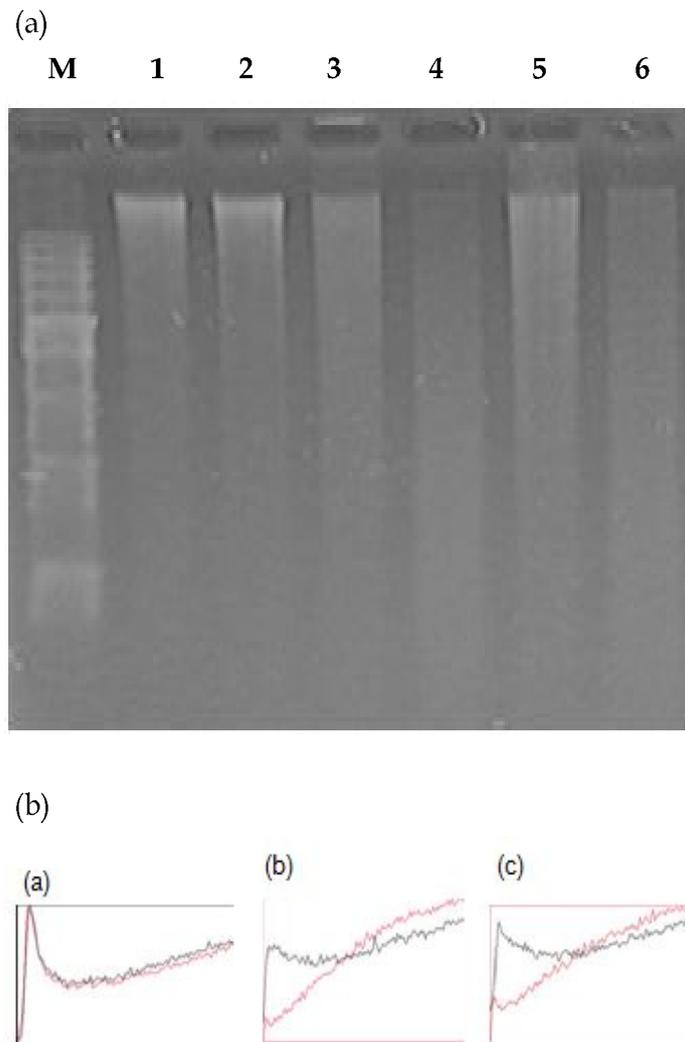


Fig. 3-62. Photograph of 0.8% alkaline agarose gel electrophoresis of genomic DNA extracted from *L. monocytogenes* cells irradiated with IPL (a) and densitometric scan of each lane (b). The samples are paired, of which the first of each pair was not treated with T4 PDG and the second was treated with T4 PDG.

Lane M, Molecular weight marker; 1, control DNA (non-irradiated); 2, control DNA (non-irradiated but treated with T4 PDG); 3, IPL-irradiated DNA at 500 V; 4, IPL-irradiated DNA at 500 V followed by treatment with T4 PDG; 5, IPL-irradiated DNA at 600 V; 6, IPL-irradiated DNA at 600 V followed by treatment with T4 PDG. The same amount of DNA (1 μ g) was loaded on the each lane of the gel.

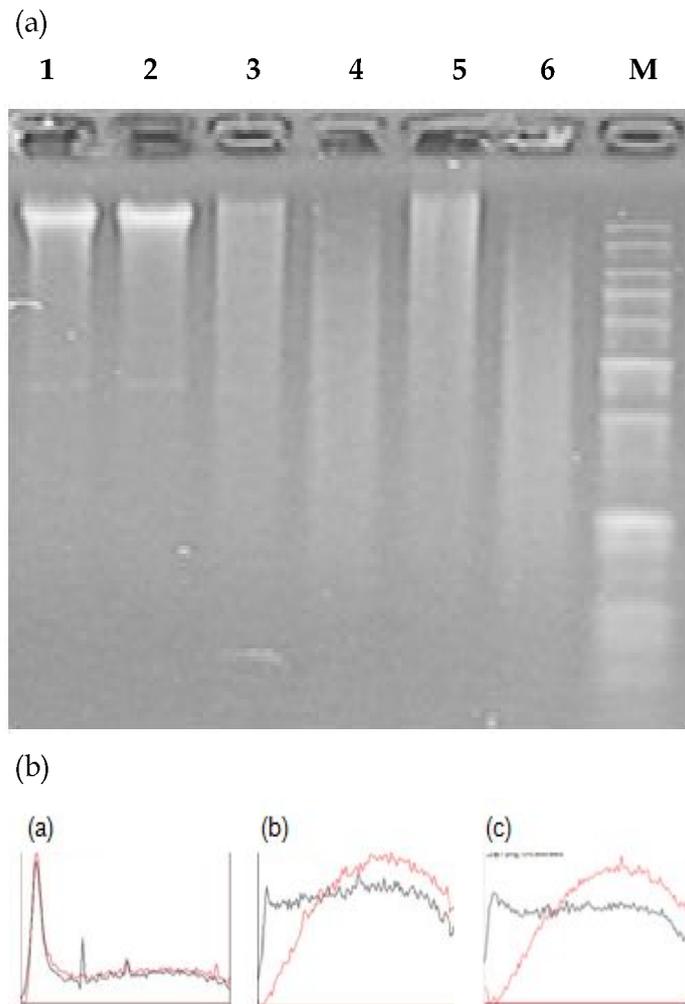


Fig. 3-63. Photograph of 0.8% alkaline agarose gel electrophoresis of genomic DNA extracted from *E. coli* O157:H7 cells irradiated with IPL (a) and densitometric scan of each lane (b). The samples are paired, of which the first of each pair was not treated with T4 PDG and the second was treated with T4 PDG.

Lane M, Molecular weight marker; 1, control DNA (non-irradiated); 2, control DNA (non-irradiated but treated with T4 PDG); 3, IPL-irradiated DNA at 500 V; 4, IPL-irradiated DNA at 500 V followed by treatment with T4 PDG; 5, IPL-irradiated DNA at 600 V; 6, IPL-irradiated DNA at 600 V followed by treatment with T4 PDG. The same amount of DNA (1 μ g) was loaded on the each lane of the gel.

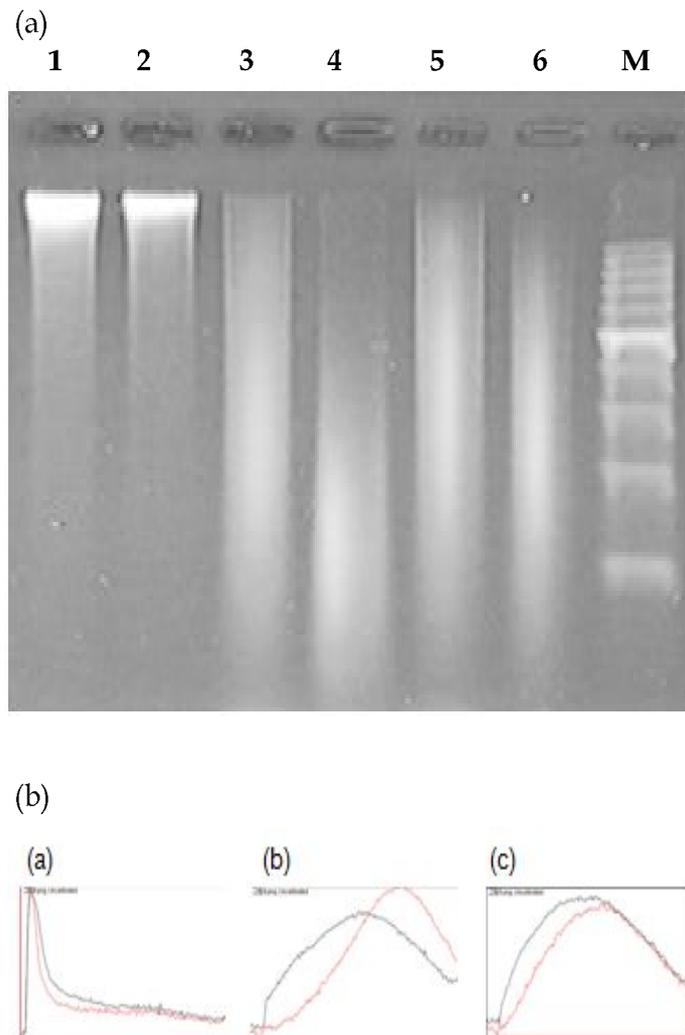


Fig. 3-64. Photograph of 0.8% alkaline agarose gel electrophoresis of genomic DNA extracted from *P. aeruginosa* cells irradiated with IPL (a) and densitometric scan of each lane (b). The samples are paired, of which the first of each pair was not treated with T4 PDG and the second was treated with T4 PDG.

Lane M, Molecular weight marker; 1, control DNA (non-irradiated); 2, control DNA (non-irradiated but treated with T4 PDG); 3, IPL-irradiated DNA at 500 V; 4, IPL-irradiated DNA at 500 V followed by treatment with T4 PDG; 5, IPL-irradiated DNA at 600 V; 6, IPL-irradiated DNA at 600 V followed by treatment with T4 PDG. The same amount of DNA (1 μ g) was loaded on the each lane of the gel.

(3) Pyrimidine dimer 형성

- 광펄스 조사에 의해 genomic DNA 상에 pyrimidine dimer가 생성되는지 조사하기 위하여 3종의 병원성 미생물 각 배양액에 광펄스를 25 kV에서 5분간 조사한 후 genomic DNA를 분리한 다음 pyrimidine dimer의 cross-link 결합을 절단하는 효소인 T4 endonuclease V(T4 PDG)를 처리하여 0.8%(w/v) alkaline agarose gel에서 전기영동을 실시하였음
- 그 결과 Fig. 3-61의 lane 4, 8, 12에 나타난 바와 같이 효소처리 시 DNA의 band가 효소처리 하지 않은 DNA에 비해 분해되는 것으로 보아 pyrimidine dimer가 형성되는 것을 확인하였음
- 3종의 병원성 미생물 배양액에 500 V와 600 V로 광펄스 조사를 재수행한 결과 *L. monocytogenes*(Fig. 3-62), *E. coli* O157:H7(Fig. 3-63)과 *P. aeruginosa*(Fig. 3-64)에서 모두 광펄스 조사에 의한 DNA상의 pyrimidine dimer가 일부 발생되었으나(lane 4은 500 V 처리, lane 6은 600 V 처리), UV-C 조사와 비교할 경우 매우 약하게 발생하는 것을 알 수 있었음

(4) RNA break

- 광펄스 조사에 의해 미생물 세포가 지니고 있는 RNA가 손상되는지 여부를 조사하기 위하여 3종의 병원성 미생물 각 배양액에 광펄스를 25 kV에서 5분간 조사한 후 total RNA를 분리하여 2.0%(w/v) agarose gel에서 전기영동을 실시하였음
- 그 결과 Fig. 3-65에서와 같이 조사한 모든 미생물에서 광펄스 조사에 의해 RNA의 분해 현상의 거의 관찰되지 않아 광펄스에 의해 RNA가 심각한 손상을 받지 않는 것으로 확인되었음
- 3종의 병원성 미생물 배양액에 500 V와 600 V로 광펄스 조사를 재수행한 결과 *L. monocytogenes*(Fig. 3-66), *E. coli* O157:H7(Fig. 3-67)과 *P. aeruginosa*(Fig. 3-68)에서 모두 광펄스 조사에 의해 RNA의 분해 현상은 발생하지 않는 것으로 확인되었음.

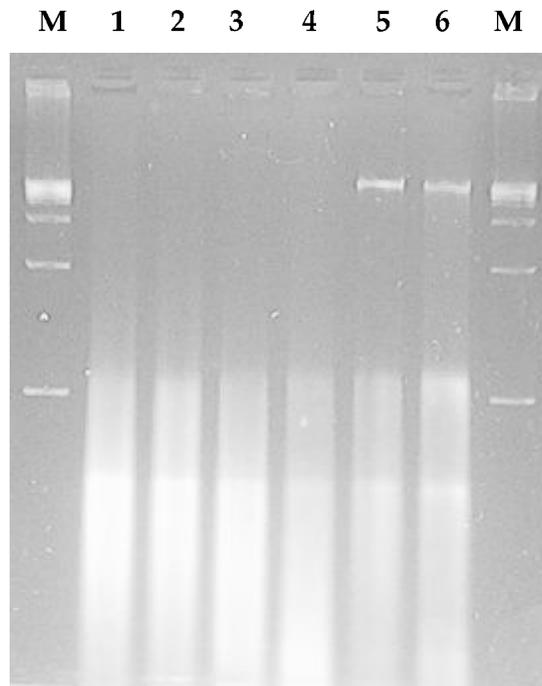


Fig. 3-65. Photograph of neutral 1.2% agarose gel electrophoresis of RNAs extracted from food-borne pathogenic bacteria irradiated with IPL. Lane M, Molecular weight marker; 1, control RNA (non-irradiated) from *L. monocytogenes*; 2, IPL-irradiated RNA from *L. monocytogenes*; 3, control RNA (non-irradiated) from *E. coli* O157:H7; 4, IPL-irradiated RNA from *E. coli* O157:H7; 5, control RNA (non-irradiated) from *P. aeruginosa*; 6, IPL-irradiated RNA from *P. aeruginosa*. The same amount of RNA (1.35 μg) was loaded on the each lane of the gel.

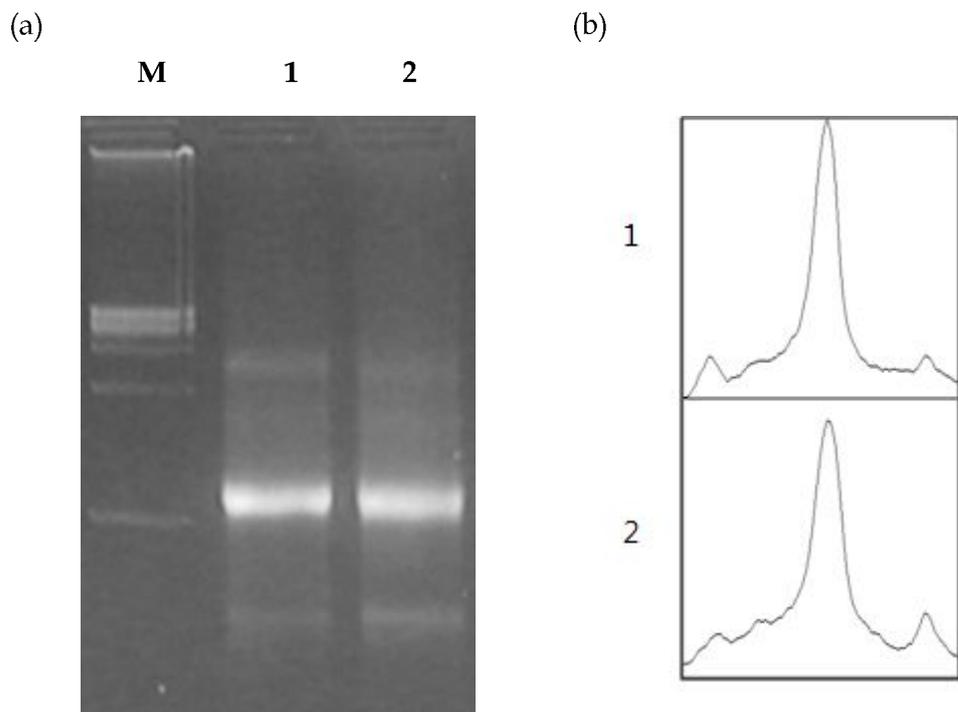


Fig. 3-66. Photograph of neutral 1.2% agarose gel electrophoresis of RNAs extracted from *L. monocytogenes* irradiated with IPL (a) and densitometric scan of each lane (b). Lane M, Molecular weight marker; 1, control RNA (non-irradiated); 2, IPL-irradiated RNA at 500 V. The same amount of RNA ($0.8 \mu\text{g}$) was loaded on the each lane of the gel.

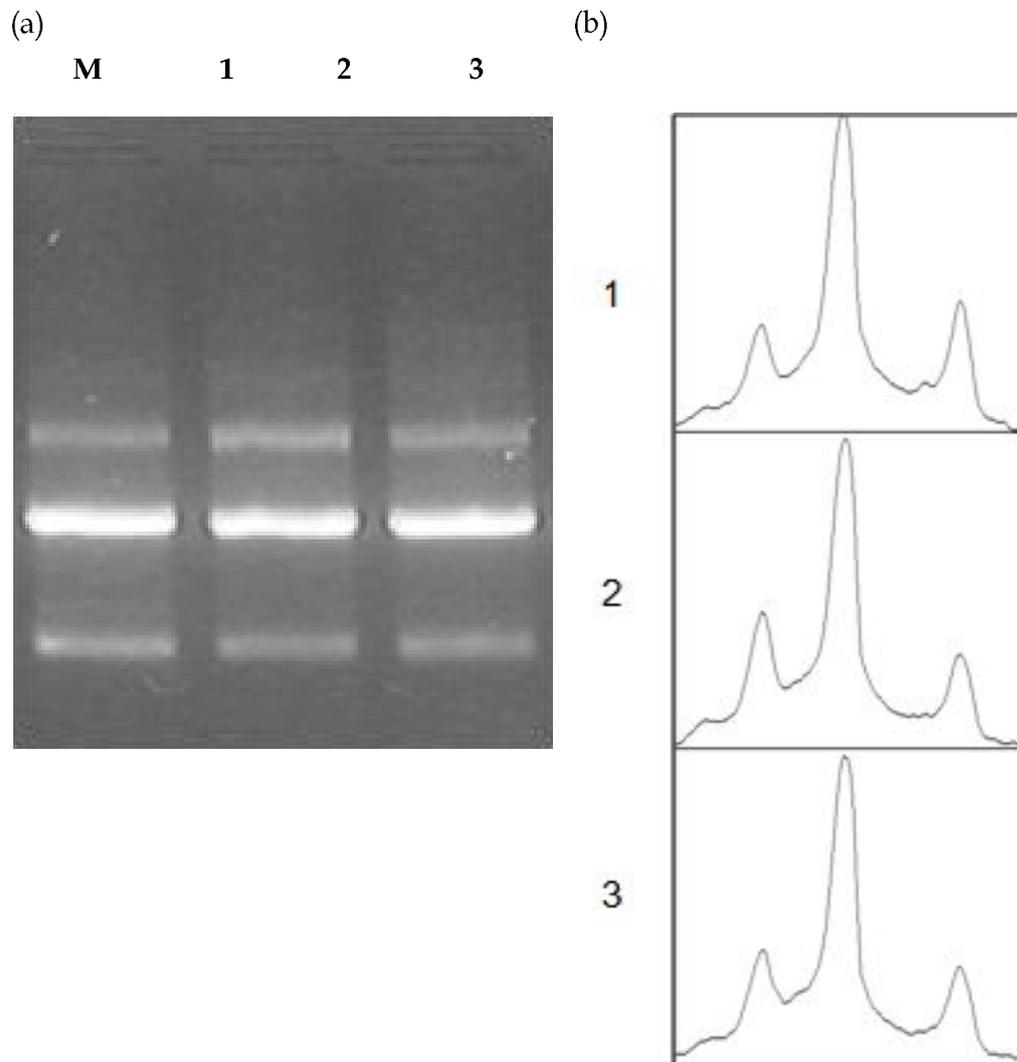


Fig. 3-67. Photograph of neutral 1.2% agarose gel electrophoresis of RNAs extracted from *E. coli* O157:H7 irradiated with IPL (a) and densitometric scan of each lane (b).

Lane M, Molecular weight marker; 1, control RNA (non-irradiated); 2, IPL-irradiated RNA at 500 V; 3, IPL-irradiated RNA at 600 V. The same amount of RNA ($0.8 \mu\text{g}$) was loaded on the each lane of the gel.

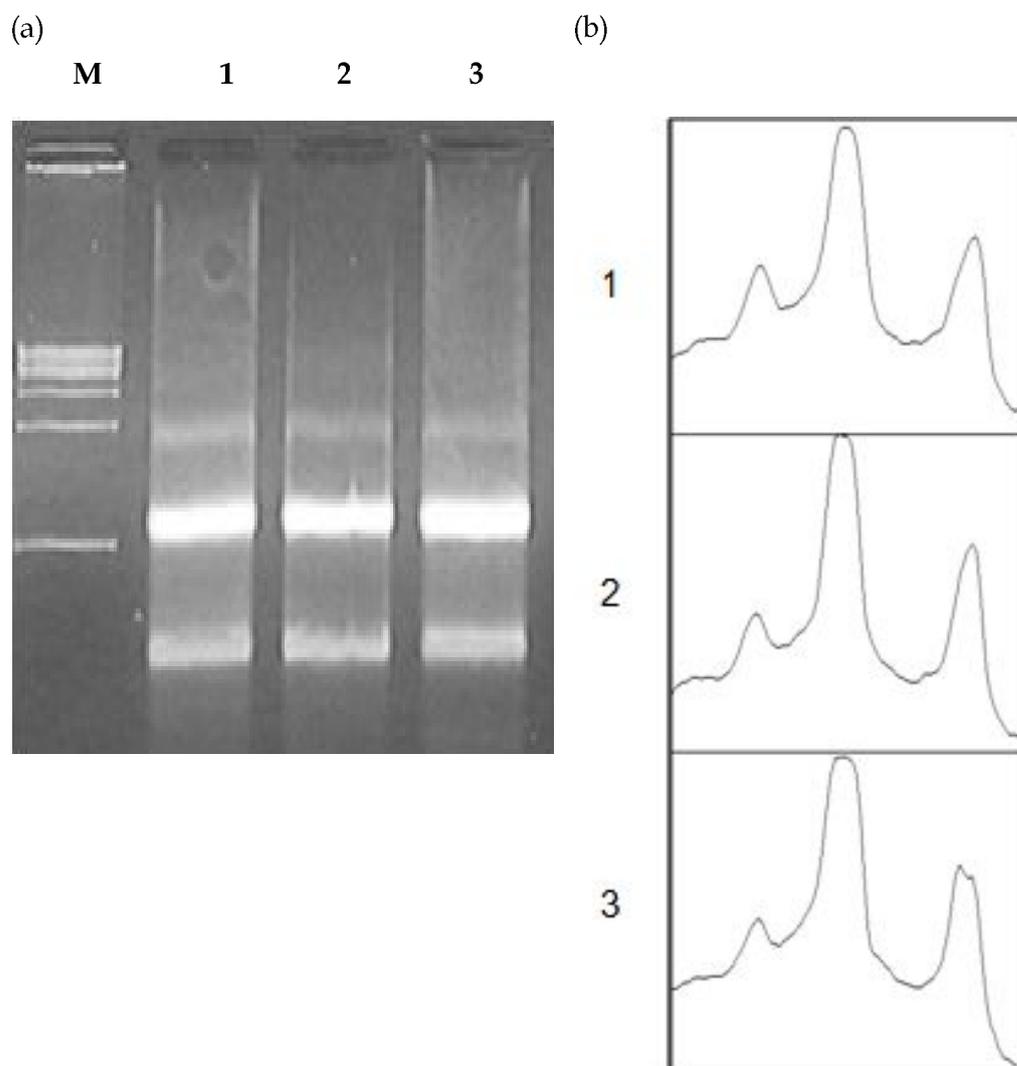


Fig. 3-68. Photograph of neutral 1.2% agarose gel electrophoresis of RNAs extracted from *P. aeruginosa* irradiated with IPL(a) and densitometric scan of each lane (b).

Lane M, Molecular weight marker; 1, control RNA (non-irradiated); 2, IPL-irradiated RNA at 500 V; 3, IPL-irradiated RNA at 600 V. The same amount of RNA ($0.8 \mu\text{g}$) was loaded on the each lane of the gel.

(5) 광펄스 조사에 의한 수산식품 유래 병원성미생물의 사멸율

- 광펄스 조사에 의한 병원성미생물의 생균수와 이에 따른 사멸율을 조사한 결과 Table 3-19에 나타낸 바와 같이 야생주인 *L. monocytogenes*은 광펄스를 조사하지 않을 경우 2.3×10^9 CFU/mL의 생균수를 나타내었으며 5분간 500 V에서 조사하였을 때에는 5.1×10^3 CFU/mL, 600 V에서는 6.5×10^2 CFU/mL의 생균수를 나타내어 급격한 생균수의 감소를 보여주었음
- 5분간 광펄스를 처리시 사멸율은 500V에서 0.50, 600V에서 0.67로 나타났다. *E. coli* O157:H7에서는 광펄스를 조사하지 않을 경우 7.6×10^9 CFU/mL의 생균수를 나타내었고, 5분간 500 V에서 조사하였을 때에는 5.4×10^3 CFU/mL, 600 V에서는 9.3×10^2 CFU/mL를 나타내었으며 각각의 사멸율은 0.53, 0.67이 었음
- *P. aeruginosa* 세포에서는 광펄스를 조사하지 않을 경우 9.2×10^9 CFU/mL의 생균수를 나타내었고, 5분간 500 V에서 조사하였을 때에는 9.9×10^3 CFU/mL, 600 V에서는 2.9×10^3 CFU/mL의 생균수를 나타내었으며 각각의 사멸율은 0.50, 0.58로 3종의 병원성미생물 모두 유사한 결과를 나타내었음.

3. 투과전자현미경(Transmission Electron Microscope, TEM)에 의한 광펄스 처리의 생리학적 사멸 기작 규명

가. 실험방법

- 투과전자현미경(TEM)을 이용하여 광펄스 처리 전후 미생물 세포의 파괴 현상을 관찰하였음
- 광펄스를 500 V의 전압으로 처리한 *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *P. aeruginosa* 세포 현탁액과 무처리 세포 시료, UV-C 조사한 세포 시료를 고정액(2% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde in 0.05 M sodium cacodylate buffer)에서 하룻밤 처리한 후 0.05 M sodium cacodylate buffer로 세척하였음

Table 3-19. Viable cell number and death rate of pathogen bacterial cells by IPL irradiation

Bacterial strain	IPL irradiation Voltage (V)	Energy density ¹⁾ (J/cm ²)	Viable cell number (CFU/mL)	Death rate ²⁾
<i>L. monocytogenes</i>	0		2.3±0.97×10 ⁹	
	500	11.28	5.1±1.4×10 ³	0.50
	600	13.68	6.5±0.07×10 ²	0.67
<i>E. coli</i> O157:H7	0		7.6±3.2×10 ⁹	
	500	11.28	5.4±6.5×10 ³	0.53
	600	13.68	9.3±2.3×10 ²	0.67
<i>P. aeruginosa</i>	0		9.2±0.78×10 ⁹	
	500	11.28	9.9±11×10 ³	0.50
	600	13.68	2.9±2.9×10 ³	0.58

¹⁾ Energy density (J/cm²) = W/m² × s (time)/10000

²⁾ Death rate = -log (viable cell number before IPL irradiation/viable cell number after IPL irradiation)/duration time (min) of IPL irradiation.

- 후고정액으로 1% osmium tetroxide를 사용하였으며, 2시간 고정하여 살균된 증류수로 세척한 후, 0.5% uranyl acetate로 en bloc staining을 1시간 동안 수행하였음
- 그 후 탈수 용매제인 ethanol 50, 70, 80, 90%에 각각 10분 동안 탈수시킨 후, 마지막으로 100% ethanol로 10분간 3회에 걸쳐 총 30분간 탈수시킨 다음, 100% propylene oxide에 15분간 2번 치환하였음
- 이를 spurr's resin 과 propylene oxide를 1:1로 혼합하여 2시간 동안 포매 (embedding)하였음
- Ultramicron (MT-X, RMC, Tucson, Az, USA)으로 sample을 semi-section하고, 광학 현미경으로 관찰한 다음 전자 현미경으로 관찰하고자 하는 부위를 정하여 thin section을 한 뒤, 완성된 section을 2% uranyl acetate액에 7분, reynolds lead citrate액에 7분 동안 전자염색하였다. 염색이 종료된 후 증류수로 세척하여 건조하고 TEM(Libra 120, Carl zeiss, Germany)을 이용하여 세포를 관찰하였음

나. 실험결과

- 광펄스 처리 전과 처리 후 *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *P. aeruginosa* 세포의 내부적인 변화를 관찰하기 위해 500 V와 600 V에서 광펄스 처리 후에 처리 전후의 세포 파괴도를 투과전자현미경(TEM)을 이용하여 관찰하였음
- Fig. 3-69와 같이 광펄스 처리를 하지 않은 control 세포와 UV-C 조사한 세포는 세포벽과 세포막이 온전하며, 세포 내 구성 물질이 고르게 존재하였으나, 광펄스 처리를 받은 세포는 세포벽과 세포막의 구분이 불분명해졌으며, 세포 내 물질도 상당 부분 유실된 것을 볼 수 있었다. 또한 세포막 부분이 터져 외부로 유출되는 모습도 보였음
- 이는 광펄스의 사멸기작의 한 부분으로써, 세포벽과 세포막의 손상에 의한 세포 내 물질 유출 때문이라는 것을 알 수 있었음

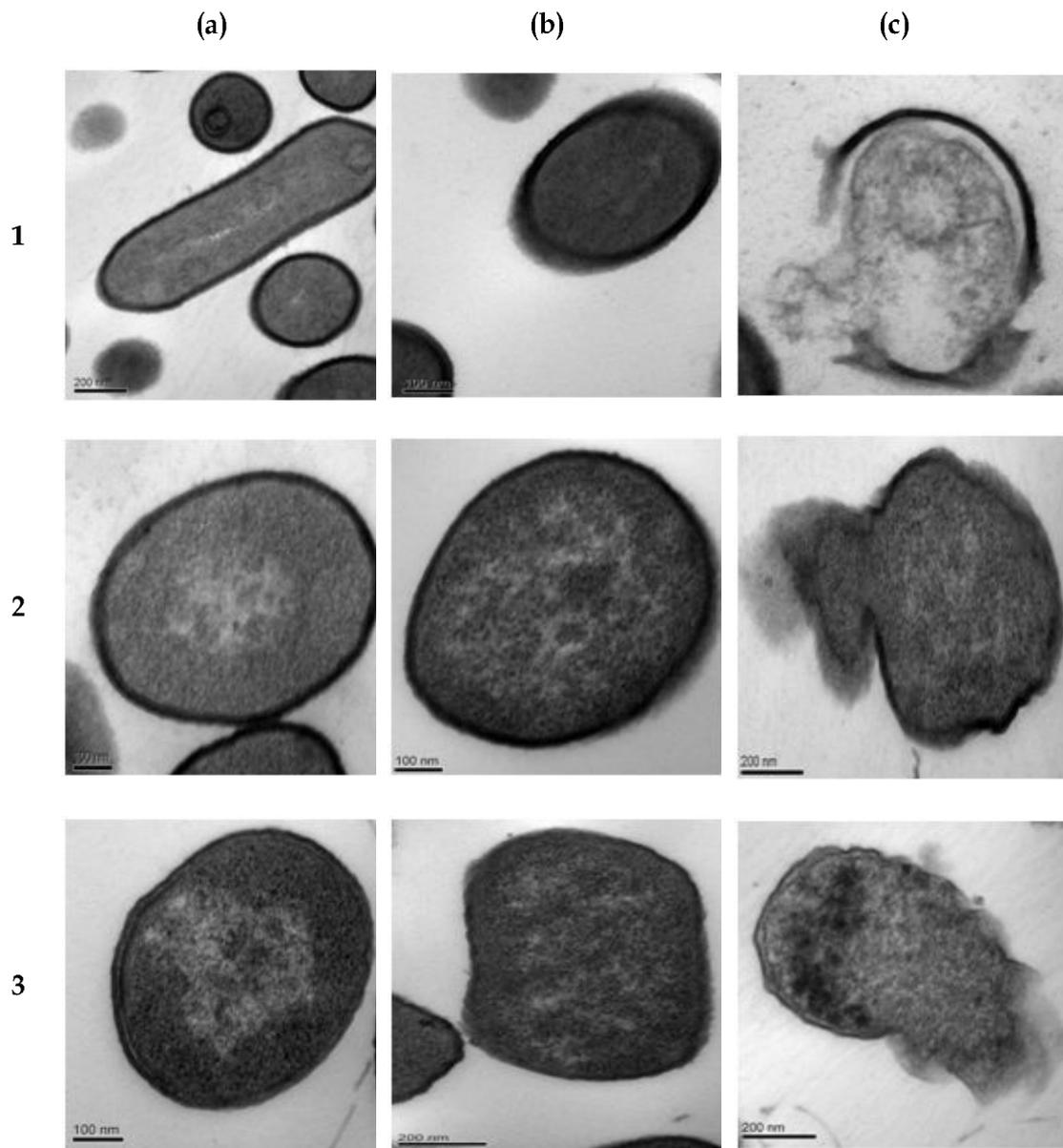


Fig. 3-69. Evaluation of intense pulsed light induced cell damages in microorganisms using TEM.

a, control; b, UV-C treatment; c, intense pulsed light treatment;

1, *Listeria monocytogenes*; 2, *E. coli* O157:H7; 3, *Pseudomonas aeruginosa*.

- 반면, UV-C의 조사는 세포막과 세포벽에는 손상을 미치지 않았기 때문에, UV 조사에 의한 미생물의 사멸은 염색체 DNA와 RNA의 손상이 미친 photochemical effect의 영향이 크며, 광펄스에 의한 미생물의 사멸은 photochemical effect에 의한 것이라기 보다는 세포벽과 세포막이 파괴되는 photophysical effect에 의해서 발생하는 것으로 사료되었음
- 세포벽의 구조에 차이가 있는 Gram 양성균 (*L. monocytogenes*)과 Gram 음성균(*E. coli* O157:H7, *P. aeruginosa*)을 나누어 결과를 살펴보면, 두꺼운 펩티도글리칸 층의 세포벽을 가지고 있는 *L. monocytogenes*와 같은 Gram 양성균은 세포벽이 유실된 부분도 있었지만 형태는 비교적 뚜렷하게 남아있었음
- 그러나 얇은 세포벽을 가진 *E. coli* O157:H7, *P. aeruginosa*와 같은 Gram 음성균은 세포벽이 상당부분 손상되어 울퉁불퉁해지고 세포막 부분이 전체적으로 터져 외부로 많이 유출되는 모습을 관찰할 수 있었음
- 광펄스 처리는 Gram 양성균보다 상대적으로 Gram 음성균의 세포벽 손상에 더 큰 영향을 준다는 것을 알 수 있었음

4. 광펄스 처리에 의한 세포 내 단백질의 세포 외 유출도 확인

가. 실험방법

- 광펄스 처리에 의한 미생물 세포질의 유출정도를 확인하기 위해 세포 배양 상등액의 단백질 정량을 다음과 같이 수행하였음
- 수산식품 유래 병원성 미생물인 *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *P. aeruginosa*를 각각 Tryptic soy broth에 각각의 균주를 접종한 후, 37°C에서 24시간 배양한 후 광펄스를 처리한 다음 광펄스 처리 균주와 광펄스 미처리 균주의 배양액을 원심분리한 상등액을 증류수에 일정 농도로 희석하였음
- 희석액 800 μ L에 200 μ L의 protein assay reagent(Bio-Rad, USA)를 첨가하여 혼합한 후 상온에서 5분간 반응시킨 다음 595 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였음
- 표준곡선 작성을 위해 bovine serum albumin(BSA) (10 μ g/mL)을 증류수에 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100% 희석하였다. 희석한 각각의 BSA 용액 800 μ L에 200 μ L의 protein assay reagent를 혼합한 후 상온에서 5분간 방치한 다음 595 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였음
- 측정된 값은 microsoft사의 excel 2007을 사용하여, 추세선 방정식을 도출하였고, 실험값을 표준곡선식에 도입하여 결과 값을 얻은 뒤, SPSS사의 PASW statistics 18 프로그램을 사용하여 평균과 표준오차를 구하였으며, 독립표본 T 검정에 의해 신뢰구간 95% ($p < 0.05$)에서 구간 유의차를 검증하였음

나. 실험 결과

- 투과전자현미경 검경을 통하여 광펄스 처리에 의하여 *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7과 *P. aeruginosa* 세포의 세포막과 세포벽이 파괴되어 세포 내 물질이 유출되는 것을 확인하였는데 세포 내 물질의 유출 정도를 단백질 정량을 통하여 검증하였음
- 3종의 수산식품 유래 병원성 미생물의 배양액을 광펄스 처리하여 처리 전후의 배양액을 원심분리한 후 배양 상등액의 단백질 농도를 측정한 결과 *L. monocytogenes*는 광펄스를 처리하지 않은 세포 배양액의 단백질 농도는 0.61 μ g/mL이었고 광펄스 처리 후 1.45 μ g/mL로 증가하여 광펄스에 의해 배양

상등액의 단백질 농도가 약 2.4 배 증가함을 알 수 있었음(Table 3-20)

- *E. coli* O157:H7는 광펄스를 처리하지 않은 세포 배양액의 단백질 농도가 0.14 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 광펄스 처리 후 2.11 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 증가하여 광펄스에 의해 배양 상등액의 단백질 농도가 15배 이상 증가하였으며, *P. aeruginosa*의 경우에는 광펄스를 처리하지 않은 세포 배양액의 단백질 농도가 0.53 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 광펄스 처리 후 1.17 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 증가하여 광펄스에 의해 배양 상등액의 단백질 농도가 약 2.2배 증가함을 알 수 있었다. 이 결과는 투과전자현미경 검정 결과와 일치하는 것으로 특히 Gram 음성 세균인 *E. coli* O157:H7의 단백질 유출도가 매우 높았는데, 이는 광펄스 처리가 Gram 양성 세균보다는 Gram 음성 세균에서 보다 효과적으로 작용한다는 것을 보여주는 것임.

5. 광펄스 처리가 포자형성균주의 세포발달과정에 미치는 영향

가. 실험방법

(1) 사용 균주

- 광펄스 처리가 포자형성 미생물의 발달과정, 즉 포자형성과정에 미치는 영향을 연구하기 위하여 *Bacillus* Genetic Stock Center(USA)에서 분양받은 *B. subtilis* 168(BGSC 1A1)과 이 균주의 포자 형성 단계별 돌연변이균주인 *B. subtilis* PB3A(BGSC 1S5), *B. subtilis* Z3(BGSC 1S49), *B. subtilis* 94U(BGSC 1S38), *B. subtilis* P20(BGSC 1S46), *B. subtilis* 89(BGSC 1S50), *B. subtilis* 513(BGSC 1S88)을 모델 미생물로 이용하였음

(2) 광펄스 조사

- 광펄스 조사에 의한 포자형성 미생물의 사멸기작과 포자 형성 과정에 미치는 영향을 연구하기 위해서 대표적인 포자 형성 미생물인 *B. subtilis*와 포자형성의 단계별 돌연변이균주를 이용하여 포자 형성을 유도한 후 광펄스를 조사하였음

Table 3-20. Analysis of OD₅₉₅ value for the measurement of protein concentration of culture supernatant of pathogens

Bacterial strain	Treatment	Protein concentration (µg/mL)	F value	t value
<i>L. monocytogenes</i>	control	0.61±0.08 ¹⁾	5.83	0.009 ²⁾
	IPL treatment	1.45±0.60		
<i>E. coli</i> O157:H7	control	0.14±0.02	8.78	0.015*
	IPL treatment	2.11±0.52		
<i>P. aeruginosa</i>	control	0.53±0.08	1.723	0.039*
	IPL treatment	1.17±0.28		

¹⁾ Mean±SD

^{2)*}: $p < 0.05$

- 이를 위하여 *B. subtilis* 168과 포자 형성 단계별 돌연변이 균주의 세포를 3 mL의 Brain Heart Infusion broth에 접종한 후, 37°C에서 24시간 배양하였다. Sporulation salt(MnSO₄ 40 mg/L, CaCl₂ 100 mg/L)가 첨가된 Nutrient agar 배지에 배양액을 20 µL씩 도말한 후, 37°C에서 7일간 배양하여 포자 형성을 유도한 후 배지로부터 포자를 회수하여 5 mL의 증류수에 현탁하였음
- 포자 현탁액을 10,000×g에서 15분간 원심분리한 후 상등액을 제거하는 세척 과정을 3회 반복한 다음 상등액이 제거된 세포를 5 mL의 증류수에 현탁하였음
- 이를 80°C에서 10분간 가열한 다음 상기 세척과정을 3회 반복하여 잔존하는 영양세포를 제거하였고, 침전된 포자를 멸균 증류수 5 mL로 현탁한 후 지름 10 cm의 Petri dish에 분주한 다음 high-intensity pulsed light 기기에 넣고 500 V와 600 V의 전압으로 5분간 광펄스를 조사하였음

나. 실험 결과

- 광펄스 처리가 세포의 발달과정에 따라 세포의 사멸율에 영향을 미치는지 연구하기 위하여 대표적인 세포발달현상인 포자형성과정을 이용하여 세포의 발달과정에 따른 광펄스의 세포 사멸율을 조사하였음
- 사용한 균주는 대표적인 포자형성균주인 *B. subtilis*를 이용하였고 포자형성의 야생주인 *B. subtilis* 168와 이 균주의 포자형성단계별 돌연변이균주인 *B. subtilis* PB3A(*spo0A3*), *B. subtilis* Z3(*spoIIB131*), *B. subtilis* 94U(*spoIIIC94*), *B. subtilis* P20(*spoIVA178*), *B. subtilis* 89(*spoVA89*), *B. subtilis* 513(*spoVIA513*)을 본 연구에 사용하였음
- *B. subtilis*와 같이 내생포자를 형성하는 균주의 포자형성과정은 다음과 같이 크게 6단계로 이루어짐. ① 염색체 DNA의 복제 후 포자격벽이 형성되어 새로 복제된 염색체 DNA와 소량의 원형질을 분리시킴 ② 세포막이 1단계에서 분리된 염색체 DNA, 원형질을 둘러쌌 ③ 포자격벽이 분리된 부분을 둘러싸 전포자(apo-spore)를 형성함 ④ 막 사이에 펩티도글리칸 층이 형성됨 ⑤ 포자 외피가 형성됨 ⑥ 내생포자가 세포로부터 유리됨.
- 본 연구에 사용된 포자형성 돌연변이 균주의 특성을 보면 다음과 같음.

- *spo0A* 유전자는 포자형성 개시를 조절하는 중심적인 유전자로 *spo0A* 유전자의 돌연변이균주인 *B. subtilis* PB3A은 포자 형성이 1단계에서 중지된 균주임
- *spoIIB* 유전자는 포자형성 2단계를 진행시키는 유전자로 *spoIIB* 유전자의 돌연변이균주인 *B. subtilis* Z3은 포자 형성이 2단계에서 중지된 균주이다. *spoIIIC* 유전자는 포자형성 4단계에서 모세포 특이적 후기 유전자 발현에 관련된 유전자로 *spoIIIC* 유전자의 돌연변이균주인 *B. subtilis* 94U는 포자 형성이 4단계에서 중지되어 포자 외피가 결손된 전포자를 형성하는 균주이다. *spoIVA* 유전자는 포자형성 4단계에서 포자 외피 형성과 조립에 관련된 유전자로 *spoIVA* 유전자의 돌연변이균주인 *B. subtilis* P20은 포자 형성이 4단계에서 중지되어 포자 외피가 불완전하게 형성되고 외피 단백질이 모세포의 원형질에 축적되는 균주임
- *spoVA* 유전자는 포자형성 5단계를 진행시키는 유전자로 *spoVA* 유전자의 돌연변이균주인 *B. subtilis* 89는 포자 형성이 5단계에서 중지되어 포자 외피가 형성되어 toluene과 lysozyme에 부분적으로 내성을 지니나 열에 약한 포자가 형성되는 균주임
- *spoVIA* 유전자는 포자형성 6단계를 진행시키는 유전자로 *spoVIA* 유전자의 돌연변이균주인 *B. subtilis* 513은 포자 형성이 6단계에서 중지되어 포자 외피가 불완전하게 형성되어 lysozyme에 민감한 포자가 형성되고 발아가 지연되는 균주임
- 광펄스 조사에 의한 *B. subtilis* 모델균주의 생균수와 이에 따른 사멸율을 조사한 결과 Table 3-21와 같이 야생주인 *B. subtilis* 168은 광펄스를 조사하지 않을 경우 1.6×10^9 CFU/mL의 생균수를 나타내었으며 5분 조사 시 500 V에서 1.2×10^6 CFU/mL, 600 V에서 5.0×10^5 CFU/mL의 생균수를 나타내어 생균수가 감소됨을 보여주었음
- 광펄스 조사의 사멸율은 500 V에서 0.3, 600 V에서 0.32로 나타났음
- *B. subtilis* 168의 포자형성과정의 단계별 돌연변이주의 생균수와 사멸율을 측정한 결과 *B. subtilis* 168의 생균수 및 사멸율과 유사한 수준의 결과를 나타내었는데 이로부터 광펄스 처리 효과가 포자 형성의 발달단계에 따른 세포의 구조적 차이에는 영향을 받지 않는 것으로 판단되었음

Table 3-21. Viable cell number and death rate of *B. subtilis* cells by IPL irradiation

Bacterial strain (<i>spo</i> genotype)	IPL irradiation voltage (V)	Energy density ¹⁾ (J/cm ²)	Viable cell number (CFU/mL)	Death rate ²⁾
<i>B. subtilis</i> 168 (wild type)	0		1.6±0.8×10 ⁹	
	500	11.28	1.2±1.7×10 ⁶	0.30
	600	13.68	5.0±4.3×10 ⁵	0.32
<i>B. subtilis</i> PB3A (<i>spo0A3</i>)	0		1.2±2.1×10 ⁸	
	500	11.28	7.8±11×10 ⁶	0.25
	600	13.68	1.4±1.7×10 ⁶	0.28
<i>B. subtilis</i> Z3 (<i>spoIIB131</i>)	0		7.5±4.8×10 ⁷	
	500	11.28	3.4±4.0×10 ⁵	0.28
	600	13.68	2.2±2.8×10 ⁵	0.29
<i>B. subtilis</i> 94U (<i>spoIIIC94</i>)	0		3.3±7.3×10 ⁷	
	500	11.28	8.2±1.8×10 ⁵	0.25
	600	13.68	5.8±6.9×10 ⁵	0.26
<i>B. subtilis</i> P20 (<i>spoIVA178</i>)	0		2.0±1.0×10 ⁹	
	500	11.28	6.8±4.0×10 ⁶	0.27
	600	13.68	3.1±3.3×10 ⁶	0.29
<i>B. subtilis</i> 89 (<i>spoVA89</i>)	0		1.2±1.8×10 ⁹	
	500	11.28	8.5±4.2×10 ⁵	0.31
	600	13.68	4.9±4.9×10 ⁵	0.32
<i>B. subtilis</i> 513 (<i>spoVIA513</i>)	0		3.1±1.8×10 ⁹	
	500	11.28	7.1±7.2×10 ⁶	0.28
	600	13.68	5.3±4.1×10 ⁵	0.33

¹⁾ Energy density (J/cm²) = W/m² x s (time)/10000

²⁾ Death rate = -log (viable cell number before IPL irradiation/viable cell number after IPL irradiation)/duration time (5 min) of IPL irradiation.

- *B. subtilis* 168의 포자형성과정의 단계별 돌연변이주를 광펄스 처리한 후 처리 전후의 세포 파괴 정도로 투과전자현미경을 관찰한 결과 Fig. 3-70(a)와 같이 각 돌연변이주는 포자를 형성하지 못하는 것으로 나타났음
- Fig. 3-70의 4는 포자 형성 6단계를 주관하는 유전자가 돌연변이된 것으로 포자는 형성된 것으로 사진 상에 나타났지만 포자 외피가 불완전하게 형성되는 돌연변이 균주임
- 이들 돌연변이주를 광펄스 처리하였을 경우 Fig. 3-70(b)와 같이 포자형성 5단계까지 돌연변이된 균주들은 광펄스 처리에 의해 세포가 대부분 파괴되는 것으로 나타났고 포자 형성 6단계에서 포자형성이 정지된 균주(Fig. 3-70의 4)도 세포는 파괴되나 세포 내부에서 형성된 내생포자 자체는 광펄스 처리에 의해 파괴되지 않는 것으로 확인되었음
- 그러나 Table 3-21의 결과와 비교할 때 광펄스 처리에 의해 파괴되지 않은 포자가 발아되어 형성되는 생균수는 대조구와 유의적인 차이가 나타나지 않아 이에 대한 연구는 보다 구체적으로 수행되어야 할 것으로 사료됨.

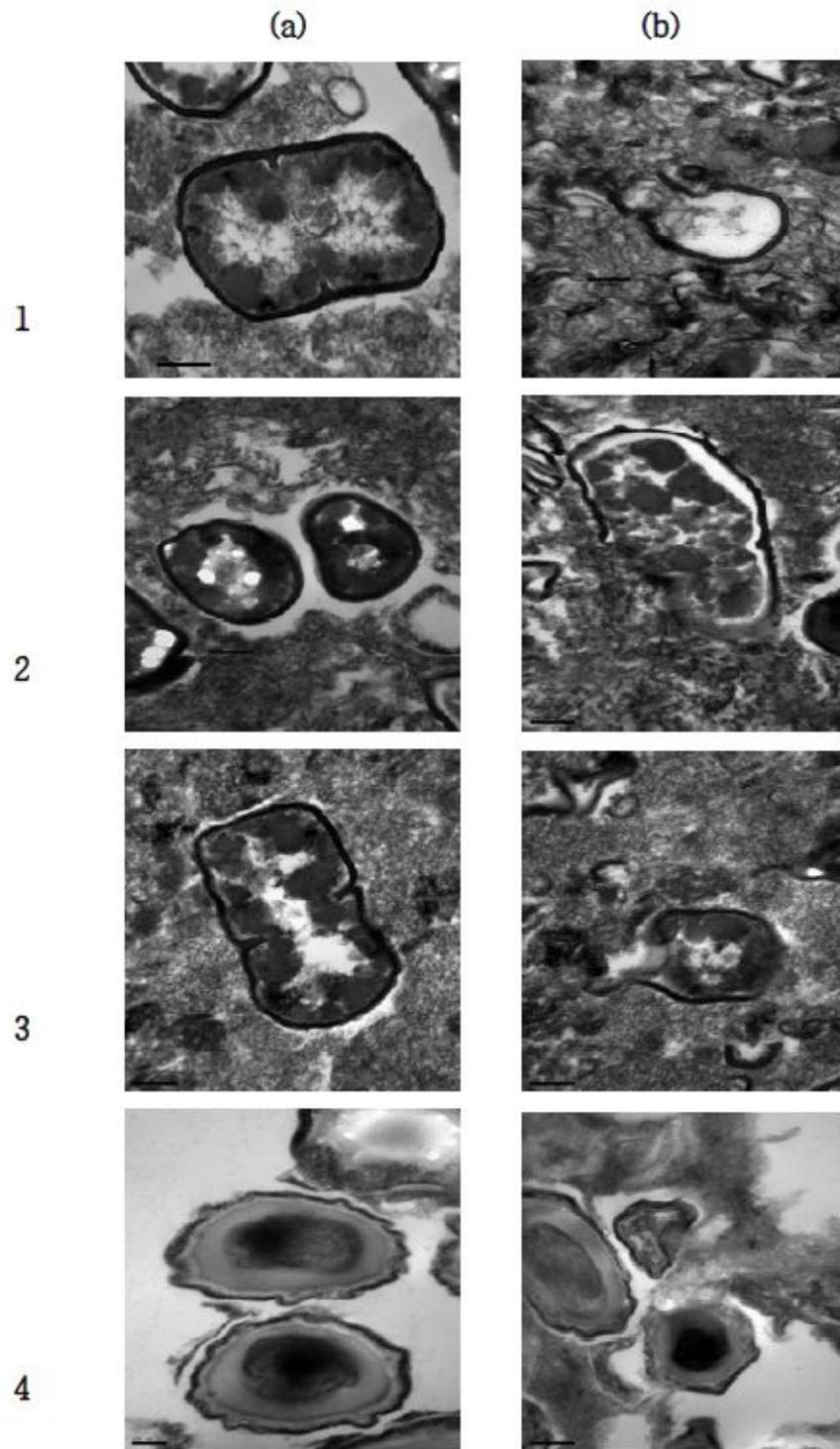


Fig. 3-70. Evaluation of intense pulsed light-induced endospore damages in *B. subtilis* sporulation mutants using TEM.

a, control; b, IPL treatment; 1, *B. subtilis* PB3A (*spo0A3*); 2, *B. subtilis* Z3 (*spoIIB131*); 3, *B. subtilis* 89 (*spoVA89*); 4, *B. subtilis* 513 (*spoVIA513*).

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제1절 연구개발 목표 및 달성도

1. 연구개발 최종목표

- 비가열 가공기술의 하나인 광펄스 기술을 이용하여 연어, 광어, 새우 등의 각종 수산식품을 유통하는 과정에서 문제시 되고 있는 식중독 원인균 및 부패 원인균에 대한 살균효과를 확인하여 기초 data를 확립하고자 함.
- 기초 data를 바탕으로 실제 수산식품의 살균에 광펄스 기술을 적용하여 그 살균 효과를 확인한 후, 광펄스 처리장치의 set-up 및 연속처리라인의 개발을 통하여 실제 산업화 공정에 적용하기 위한 토대를 마련하고자 함.
- 각종 수산식품의 저장 및 유통기한 연장에 대한 광펄스 처리의 효과를 규명하고자 함.
- 광펄스가 미생물을 사멸시키는 기작(mechanism)을 분자생물학적, 생리화학적 측면에서 규명함으로써 광펄스 기술을 수산식품의 살균공정에 적용시킬 수 있는 이론적 배경을 확립하고자 함.
- 본 연구를 통해 확립된 방법을 체계적으로 정리하여 향후 영, 유아용 식품이나 야채, 과일, 달걀, 육류 등 기타 신선식품에 적용하기 위한 가이드라인을 마련하고자 함.
- 새로운 비열처리 가공기술을 이용한 위해세균 저감화 기술을 알리기 위한 기술 홍보물을 작성하여 관련업체 및 소비자단체 등에 배포함으로써 최종적으로 국민이 안심하고 섭취할 수 있는 식품의 유통에 이바지하고자 함.

2. 연구목표 및 달성도

연구개발목표	목표대비결과	목표 달성도 (%)
광펄스 기술에 대한 선행 연구자료 분석	<ul style="list-style-type: none"> - 선행연구자료를 다각적으로 수집하여 약 40여편 이상의 논문을 정리하였으며, Review 논문을 식품과학과 산업지에 투고 게재하였음 - 선행연구에 관한 자료분석을 통하여 기술의 적용 가능한 범위(광의 세기, 에너지밀도, 살균효과 등)와 기술의 원리 및 살균 메커니즘을 분석함 	100%
광펄스 살균(회분식, 연속식) 시스템 개발	<ul style="list-style-type: none"> - Direct 고전압 인가 방식의 실험실용 및 pilot scale의 IPL system을 set-up하였음 - 회분식 처리용기와 연속식 처리 용기를 설계, 제작하여 IPL 처리에 적용하였으며, 문제점 및 장단점을 파악하였음 - 이를 바탕으로 문제점을 파악, 저렴하고 compact한 시스템 설계 및 제작에 활용하였음 - 장치의 크기를 1/20정도로 줄여 이동성과 공간 확보에 대한 부담을 줄였으며, 또한 장치 제작비용도 기존 장비에 비해 10~20%수준에서 제작할 수 있도록 하여 경제적 부담을 크게 줄였음 	120%
광펄스 기술을 이용한 수산식품에 존재하는 위해 미생물의 저감 효과 확인	<ul style="list-style-type: none"> - 수산식품에 존재하는 위해 세균 동정 결과, <i>Listeria monocytogenes</i>, <i>Bacillus cereus</i>, <i>Pseudomonas aeruginosa</i>가 검출됨. - 검출된 위해 세균을 대상으로 plate 상에서 광펄스 처리한 결과, 높은 살균효과를 나타냄. - 광어회, 연어회, 새우 등 수산식품 내 위해세균의 저감효과를 확인하였음. 	120%
광펄스에 의한 미생물 사멸의 분자생물학적 기작 규명	<ul style="list-style-type: none"> - DNA 및 RNA 분리, 효소처리, 전기영동등을 통해 DNA와 RNA의 breakdown 여부, 사멸 정도, 손상 후 회복에 대한 결과를 통해 사멸 기작을 확인하였음 	100%
기존 수산물 유통상의 문제점 파악	<ul style="list-style-type: none"> - 참여기관의 자문을 통해 유통 상에서 문제가 되어 해결해야 하는 문제점에 대한 파악을 함. 	100%

연구개발목표	목표대비결과	목표 달성도 (%)
연속처리시스템을 이용한 대량처리조건연구	<ul style="list-style-type: none"> - 연속식 처리 용기를 개발하고 이에 알맞은 전원 연결 방식, 처리 방법, 시스템 설계를 완료하였음 - 실 공정에 적용하기 위한 대량처리를 위해서는 기존의 direct 전원 인가방식을 통해서는 고용량의 전원이 필요하여 이에 대한 실험을 실시하지 못하였음 - 그러나 저전압의 전원 사용과 triggering 방식의 고전압 사용 시스템을 이용한 연속 처리 조건을 확립하였음 	60%
광펄스 처리한 수산식품의 저장시험 및 유통기한 설정	<ul style="list-style-type: none"> - 개발된 광펄스 처리 시스템을 이용하여 광어, 연어, 새우 등 수산식품 내 위해세균의 저감 효과를 확인하였음. - 미생물 및 이화학적 분석을 통한 저장기간 중 품질 변화를 관찰하고 안전성을 검증하였음. - 저장시험을 통한 광펄스 처리 수산식품별 유통기한 설정의 근거를 마련함. 	100%
광펄스에 의한 미생물 사멸의 생리학적 기작 규명	<ul style="list-style-type: none"> - 투과전자현미경, 세포 파괴에 의한 세포내 물질 유출 정도, 세포 발달 단계에 따른 손상 여부등을 확인하였음 	100%
산업적 적용 타당성 평가	<ul style="list-style-type: none"> - 개발된 기술의 산업화 적용 타당성을 분석 평가하였고 이를 토대로 pilot-scale 연속처리 시스템의 개발이 완료단계임. 	90%
장치의 소형화 연구	<ul style="list-style-type: none"> - 저비용 소형화 IPL 시스템을 설계 제작하였으며, Lamp의 수명도 함께 연장할 수 있는 시스템을 구성하였음 	추가 연구
전체 연구 대비 목표 달성도		100%

제2절 관련분야의 기술발전예의 기여도

- 본 과제를 통한 선행연구 자료의 분석 결과를 종합해 볼 때, 식품 살균을 위한 광펄스의 적용 기술은 뛰어나며, 식품이나 의약품등의 표면 살균, 투명한 제품 그리고 포장재의 표면 살균에 특히 효과가 있는 것으로 확인되었으며, 수산식품이나 육류식품 등 신선식품의 표면살균 및 분유나 생식 등 분말식품의 살균처리에 있어 적용 안전성 측면과 고 에너지 효율성의 측면에서 적용 가능성이 매우 높은 기술로 확인됨.
- 그러나 국내에서는 아직까지 그 연구의 범위와 활용도가 매우 미약한 수준에 머무르고 있으며 광펄스에 의한 미생물 사멸기작에 대한 연구가 전혀 시도되고 있지 않아 앞으로 이 기술의 실용화를 앞당기기 위해서는 보다 폭넓고 깊은 연구가 선행되어야 할 것으로 사료됨.
- 본 과제의 연구수행을 통해 국내 수산업의 대표적 수산식품인 연어, 우럭, 광어, 새우 등 각종 생·어육식품의 유통과정에서 문제시 되고 있는 대표적인 식중독 원인균 및 부패 원인균 *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *B. cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*에 대한 광펄스 기술의 살균 효과를 확인하고 기초 data를 확립하였음.
- 또한, 각종 수산식품의 저장 및 유통기한 연장에 대한 광펄스 처리의 효과 및 광펄스가 미생물을 사멸시키는 기작(mechanism)을 분자생물학적, 생리학적인 측면에서 규명함으로써 광펄스 기술을 수산식품의 살균공정에 적용시킬 수 있는 이론적 배경을 확립함으로써 본 기술의 위치를 국제적 수준으로 향상시킴.
- 특히 본 연구에서는 광펄스 기술의 적용을 통한 수산식품의 살균에 요구되는 광펄스의 성질(파장, 세기, 펄스의 길이 및 수 등), 포장재, 적용식품의 특성(식품의 화학적 특성, 투명도, 색상 등) 등 주요 공정요소(critical process factors)들의 보다 specific한 결과를 도출함으로써 광펄스 연속처리 시스템의 개발 및 산업화에 국제적 우위를 선점함.
- 광펄스에 의한 비열 살균기술을 수산식품에 도입함으로써 수산식품의 유통기한의 연장 및 폐기물의 감소 등에 기여할 수 있을 것으로 기대되며, 유통기한을 연장함으로써 수산식품의 유통망 확대도 기대할 수 있을 것으로 예상된다.

- 영·유아 식품인 분유에서 검출되어 논란이 되어온 엔테로박터 사카자키(*E. sakazaki*)균의 규격이“불검출”로 바뀐에 따라 이러한 영·유아식품과 신선식품 등 비가열 식품 속의 위해 세균을 제거하고 식중독 발병률을 감소시키는 일은 더욱 더 중요한 사항이 되었으며, 이를 위해 관련 업계에서는 비열처리 살균방법에 대한 연구와 기술의 실용화가 없어서는 안 될 매우 중요한 사안으로 대두되고 있으므로, 본 연구의 결과를 바탕으로 광펄스 기술을 분유를 비롯한 영·유아식품과 다양한 신선식품에 적용할 수 있는 근거를 마련함.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 실용화 · 산업화 계획

- 식품의 보존성을 효과적으로 향상시키기 위하여 위해 세균을 제거하거나 유통 중 생육을 억제하는 방법으로 식품업계에서는 전통적으로 가열, 건조, 냉동 등의 물리적 방법이나 식품 보존제의 첨가와 같은 화학적 방법을 사용하여 왔음.
- 그러나 이러한 기술들은 영·유아용 식품이나 야채, 과일, 달걀, 어·육류 등 신선식품 살균에는 적용하기 어려우며, 식품보존제의 사용에 있어서도 소비자들의 가공식품에 대한 기대수준이 높아짐에 따라 그 사용한도가 점차 제한되고 있음.
- 이에 따라 세계적으로 여러 가지 비열처리 기술(non-thermal process)에 대한 연구와 실용화가 이루어지고 있음. 이러한 비열처리 가공기술 중 광펄스 기술은 ‘intensed light pulse’, ‘pulsed white light(WHL)’, ‘broad-spectrum white light’ 등 여러 가지 이름으로 불리며, 광펄스에서 사용되는 빛의 영역은 170-2600 nm의 범위로서 자외선(UV) 영역뿐만 아니라 근적외선(NIR) 영역까지 포함한다는 점에서 기존의 UV 살균과는 구별되며 UV 살균에 비해 월등히 높은 살균력을 가지는 것으로 알려지고 있음.
- 국내·외 기술개발 현황의 분석 및 평가에서 언급한 바와 같이, 식품 살균을 위한 광펄스의 적용 기술은 뛰어나며, 식품이나 의약품등의 표면 살균, 투명한 제품 그리고 포장재의 표면 살균에 특히 효과가 있는 것으로 보고되고 있으나, 아직 연구의 범위와 활용정도가 미미한 실정으로 앞으로 더욱 많은 연구가 선행되어야 할 것임.
- 본 과제의 연구결과를 바탕으로, 실제 생·어육식품의 살균에 광펄스 기술을 적용하여 살균효과를 확인한 하였으며, 광펄스 처리장치의 set-up 및 연속처리라인의 개발을 통하여 실제 산업화 공정에 적용하기 위한 토대를 마련하였음.
- 특히 본 연구에서는 수산식품의 살균에 광펄스 기술을 적용하는데 있어 광펄스의 성질(파장, 세기, 펄스의 길이 및 수 등), 포장재, 적용식품의 특성(식품의 화학적 특성, 투명도, 색상 등) 등과 같은 주요 공정요소(critical process

factors)들에 대한 보다 specific한 결과를 도출함으로써 광펄스 연속처리 시스템의 개발 및 산업화의 근거를 마련하였으며, 개발된 기술의 산업적 적용 타당성을 분석 평가하여 Pilot-scale 광펄스 연속처리 시스템의 개발이 완료단계임.

- 본 연구에서는 수산식품의 표면 살균처리 및 에너지 효율성이 높은 광펄스 기술을 수산식품에 도입함으로써 수산식품의 유통기한 연장에 기여하고, 수산식품의 유통망 확대에 실질적으로 기여하고자 함.

제 2 절 교육 · 지도 · 홍보 등 기술 확산 계획

- 최근 소비자들의 건강에 대한 관심이 높아지고 시장에서 신선한 제품을 찾는 경향이 강해지면서 식품업계에서는 최소한의 가공을 통하여 자연 그대로의 품질을 유지하는 식품 개발에 대한 관심이 고조되고 있음.
- 식품의 보존성을 향상시키기 위하여 전통적으로는 가열, 건조, 냉동 등의 물리적 방법이나 식품 보존제의 첨가와 같은 화학적 방법을 사용하여 왔으나, 가열 가공식품은 열에 의해 영양성분을 파괴시키고 텍스처 및 색의 변화 그리고 향미성분의 손실 등 식품의 품질저하를 일으키게 되고, 냉동 또는 건조 가공식품은 장기간 저장할 경우 품질 및 소비자 기호도가 감소하게 됨.
- 특히 시장에서 어류, 육류, 채소, 과일, 생식 등의 신선식품 및 영·유아용 식품과 같은 비가열 식품의 수요가 점점 더 증가하는 동시에 각종 위해세균이 검출되고 이에 따른 논란이 확대됨에 따라 품목별로 위해세균에 대한 적절한 살균방법의 개발이 절실한 시점임.
- 앞서 미국의 식중독 발생 현황을 원인 식품별로 나타낸 2000년도 통계자료 [Fig 1.1.2]에서 보여준 바와 같이 식중독의 주요 원인이 되는 식품이 어·육류, 가금류, 채소 등 각종 신선식품이 주를 이루고 있음.
- 미국에서 보고된 자료에 의하면 식품 내의 세균감염으로 인한 질병 발생건수가 매년 7백만 건으로 7,000여명이 사망에 이르고 있으며, 이중에서 육류 및 어류로 인한 발병이 전체 발생건수의 절반 이상을 차지하고 사망자가 4,000명으로 육류 및 어류의 안전문제가 큰 문제로 등장하고 있음.
- 따라서 현재의 가열살균 기술로는 적용하기 힘든 각종 개별식품에 대한 맞춤형 적용연구는 식품업계의 고충을 해결해 주기 위한 이유에서뿐만 아니라 소

비자들에 보다 안전한 식품을 제궐 제궐자국민의 건전한 식문화를 창달하기 위한 대승적인 차원에서 하루 속히 이루어져야할 것으로 사료됨.

- 또한, 본 과제를 통해 획득된 수산신선식품의 위해세균 오염도 분석 결과 및 국내에서 생산·유통되는 각종 식품 및 식품원료에 대한 잠재적 위해세균의 오염 정도 모니터링을 통해 친환경 연속식 광펄스 살균시스템의 적용 범위 및 효과 검증을 위한 표준 매뉴얼을 구축하여 산업체 교육 및 대국민 홍보에 적극 활용할 계획임.
- 본 과제의 종료 후 6개월 이내에 광펄스 기술을 이용한 위해 세균 저감화 기술을 알리기 위한 기술 홍보물을 작성하여 관련업체 및 소비자단체 등에 배포하여 언론홍보 및 대국민교육에 이용할 계획이며, 광펄스 기술을 이용한 살균기술의 특성 및 기준을 수산식품과 관련된 식품공전에 기재함으로써 이 기술을 관련업체에서 합법적으로 사용하도록 할 예정임.

제 3 절 특허·논문 등 지식 재산권 확보계획

- 국제학술대회 발표실적

“Intense light pulse treatment for inactivating *Listeria monocytogenes* on the surface of sea foods and shelf-time extension”과 “A study on effect of intense pulsed light treatment for inactivating on the surface of sea foods”가 유명 국제학술대회인 Institute of Food Technologists (IFT)에서 2009(Anaheim, USA)과 2010(Chicago USA)에 각각 발표되었음.

- 국제학술지 발표실적

“Inactivation of *Enterobacter sakazakii* inoculated on fomulated infant foods by intense pulsed light treatment”가 2009년 국제학술지 Food Science and Biotechnology에 수록되었으며, Nonthermal sterilization of *Listeria monocytogenes* in infant foods by intense pulsed light treatment”가 2010년 국제학술지인 Journal of Food Engineering에 수록되었음.

- 국제학술지 투고중인 발표실적

“Inactivation of pathogenic microorganisms on various sea foods using intense pulsed light”가 국제학술지인 Food Control에 투고중이며, “ Effects of intense pulsed light treatment for sterilization of *Listeria monocytogenes* on various sea foods”가 국제학술지인 Food Research International에 투고중임. 또한 “Intense pulsed light as a nonthemal treatment for the inactivation of *Escherichia coli*

O157:H7 on various sea foods"가 Journal of Food Engineering에 투고 예정임.

□ 국내학술지 발표실적

Review paper인 "전기 에너지를 이용한 비가열 식품 가공 기술(Nonthermal Food Processing Technology using Electric Power"가 2010년 국내 학술지인 식품과학과 산업에 수록되었음

□ 국내학술대회 발표실적

"연속 자외선 조사와 광펄스 기술을 이용한 수산식품 유래 유해 미생물의 사멸 효과 비교"가 2010년 한국식품과학회 국제학술대회에 발표되었으며, "고전압 에너지를 이용한 비열식품가공기술"은 2009년 한국산업식품공학회, "광펄스를 이용한 돼지고기 표면 대장균의 살균"과 "광펄스 처리가 *E. coli*의 불활성화에 미치는 영향"은 2009년 한국식품과학회 국제학술대회에 발표가 되었으며, "광펄스 처리시 배지 색깔에 따른 *E. coli* O157의 불활성화에 미치는 영향"은 한국식품영양과학회 국제학술대회에 발표가 되었음

제 4 절 추가연구 및 타연구에 활용계획

□ 앞서 언급한 바와 같이 비가열 신선식품의 소비량이 점차 증가하고 있는 현 시점에 이러한 식품으로 인한 식중독의 위험은 따라서 증가할 수밖에 없고 소비자들에게 미치는 영향 또한 지대한 것으로 여겨짐.

□ 그러나 비가열 식품이라는 특성을 지닌 어류, 육류, 채소, 과일, 생식 등 여러 신선식품은 최소한의 가열 공정만을 거치게 되므로 식품원료 내에 존재하는 미생물 또한 그대로 유지될 수밖에 없는 문제점을 내포하고 있음.

□ 최근 미국에서 보고된 자료에 의하면 식품 내의 세균감염으로 인한 질병 발생건수가 매년 7백만 건으로 7,000여명이 사망에 이르고 있으며, 한 연구결과에서는 일부 시판생식에서 식중독 균인 *Bacillus cereus*를 포함한 포자 형성균과 대장균균이 검출되어 생식제품들의 미생물학적 안전성에 대한 문제가 제기된 바 있고 특히 축산식품 및 수산식품으로 인한 미생물의 오염으로 인해 구토, 설사, 복통 등의 질병이 발생되어 사망 또는 피해를 입는 사례가 보고되고 있음.

□ 따라서 본 광펄스 기술을 실제 유통·시판중인 식품 및 식품원료에 적용하는 시료별 필드테스트에 활용할 계획이며, 특히 유아용 식품, 신선식품 및 라면 스프, 건조스프 등 기타 건조식품의 살균에 응용할 계획임,

- 특히, 영·유아 식품인 분유에서 검출되어 논란이 되어온 엔테로박터 사카자키(*E. sakazakii*)균의 규격이 ‘불검출’로 바뀔에 따라 이러한 영·유아식품과 신선식품 등 비가열 식품 속의 위해 세균을 제거하고 식중독 발병률을 감소시키는 일은 더욱더 중요한 사항이 되었으며, 이를 위해 관련 업계에서는 비열처리 살균방법에 대한 연구와 기술의 실용화가 없어서는 안 될 매우 중요한 사안으로 대두되고 있으므로 본 연구의 결과를 바탕으로 광펄스 기술을 분유를 비롯한 영·유아식품과 신선식품에 응용하고자 함.
- 본 기술의 효율적 살균방식 및 친환경 고 에너지 효율의 특성을 살려 가전제품(가정용 냉장고의 신선실 등)에 응용할 계획임.

제 5 절 연구기획사업

- 본 과제의 종료 후 1년 이내에 광펄스 기술을 이용한 위해 세균 저감화 기술을 워크숍 또는 심포지엄을 통하여 학계 및 산업계를 대상으로 발표하고자 하며, 특히 국내 식품업계의 관련분야 비가열 전문가 양성을 위한 사업 등에 적극적으로 활용할 계획임.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 수산식품과 관련한 식중독의 주요 원인으로는 bacteria 및 virus 등의 병원성 미생물이 가장 일반적이며, 그중 감염을 유발하는 가장 일반적인 종류의 미생물로는 *Eschericia coli* O157:H7, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, and *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* 등이 있으며, 해산물에 존재하는 병원성 미생물을 감소시키는 방법을 통해 수산식품의 품질을 높이고 그 유통기한을 연장시킬 수 있음(Dunn, 1991; Dunn, 1995; Martinez-Manzanares, 1992).
- *L. monocytogenes*는 비포자형성균으로서 이미 오래 전부터 식중독 균으로 널리 알려져 있으며, 리스테리아증(*listeriosis*)의 원인이 되는 주요 병원성 미생물로서 관심을 받고 있음. *L. monocytogenes*는 식품 종류에 따라 그 오염이 다르게 나타나는데, 특히 어류 및 새우, 연어 외 해산물 샐러드 등의 인스턴트 수산식품은 이 *L. monocytogenes*에 의해 오염될 가능성이 상당히 높은 것으로 분류됨(Ben Embarek, 1994; Lasse vigel, 1998).
- 위장관에서 성장하는 동안 이질균 독소(Shiga toxin)을 내는 *E.coli* O157:H7은 용혈성 빈혈을 일으킬 수 있으며 심할 경우 사망에 이르게 할 수 있기에 최근 세계적으로 큰 관심사가 되고 있음(Tarr P.I, 1995).
- 특히 최근들어 *E.coli* O157:H7과 관련된 식중독이 급격히 증가하고 있는 실정인데, CSPI 및 CDC 보고서에 따르면 1990-2002년 사이에 해산물에서 *E.coli* O157:H7으로 인한 식중독이 여러 건 보고되었으며, 미국에서는 매년 약 73,000건의 *E.coli* O157:H7 관련 식중독이 발병하고 있음(CSPI, 2003; CDC, 2003; Su and Brandt, 1995).
- 식중독 유발 원인균 중 하나인 *B.cereus*는 설사형과 구토형의 질병을 유발하며, 고기, 우유, 야채 및 생선 등 다양한 식품이 설사형 식중독과 관련되어 있음. 독일의 한 생선 공장에서는 herring marinades에 오염된 향신료 추가 후 *B.cereus*가 검출되었음(Frerck Feldhusen, 2000).
- 최근 소비자들의 건강에 대한 관심이 높아지고 시장에서 신선한 가공식품을 찾는 경향이 강해짐에 따라, 원료와 생산품의 천연 그대로의 품질을 신선하게 유지하면서 식중독 및 부패를 방지하는 기술인 최소가공기술(Minimal process teocnology)에 대한 관심이 증대되고 있음. 특히, 여러 비열 가공 기술 중 광펄스(intense pulsed-light) 기술이 혁신적인 비가열 살균 기술로서

각광받고 있음.

- 광펄스를 이용한 살균 기술은 1990년대에 들어와서 본격적인 연구가 시작되었으며, 이 살균법은 오랫동안 사용되어온 자외선 살균의 원리와 최근 들어 비열 살균 기술로서 관심을 끌고 있는 고전압 펄스 전기장 살균 기술의 원리를 병합한 기술로서 미생물의 사멸기작은 자외선 살균과 비슷한 것으로 알려져 있음(Dunn, 1995; Cho, 2002).
- 광펄스 기술은 'intensed light pulse', 'pulsed white light(WHL)'(Marquenie et al., 2003), 'high intensity broad-spectrum light'(Roberts & Hope, 2003), 'pulsed light'(Rowan et al., 1999), 'pulsed UV light'(Sharma & Demirci, 2003) 등 여러 가지 이름으로 불림.
- 광펄스 기술의 가장 근본적인 원리는 전 파장의 강한 빛을 아주 짧은 시간 안에 식품에 가하여 식품의 표면을 살균시키거나 표면 미생물 수를 감소시키는데 있음. 또한 제품의 유통기한을 연장하고 품질을 높이기 위한 목적으로 사용되며, 식품 표면의 살균뿐만 아니라 포장재나 투명한 약품의 살균에도 사용될 수 있는 유용한 기술임(Vicente M et al, 2007).
- 광펄스 처리 시 0.01-50 J/cm² 범위의 에너지밀도(energy density)를 가지는 pulse가 1 μs - 0.1 s의 간격으로 1-20회의 flash 형태로 물질에 가해지며, 광원으로는 일반적으로 450 torr 정도의 압력으로 xenon이 채워진 clear fused quartz tube가 사용됨.
- 광펄스에서 사용되는 빛의 영역은 170-2600 nm의 범위로서 자외선(UV) 영역뿐만 아니라 근적외선(NIR) 영역까지 포함한다는 점에서 기존의 UV 살균과는 구별되며(Cho et al., 2002), 이때 사용하는 광은 태양광과 유사하게 400-500 nm에서 peak emission을 가지나, 해수면의 태양광보다는 약 20,000 배 정도 강한 것으로 알려져 있음(Dunn et al., 1991).
- 광펄스 기술의 살균력은 빛의 파장, 강렬한 정도, pulse의 수와 주기, 시료와 광원 사이의 거리 및 포장재와 식품의 종류, 액체시료의 경우 투명도, 색 등에 의해서 결정되며, 제품의 종류와 살균하려는 면적에 따라 lamp의 수와 배치, pulse 주기가 달라짐.
- 2000년 이후부터 광펄스의 미생물 사멸작용에 대한 mechanism을 규명하기 위하여 여러 연구팀들이 이에 대한 연구를 시작하였음.

- 초기에는 광펄스에 의한 미생물 사멸작용이 UV 파장에 속하는 광펄스에 의해 UV에 의한 살균효과와 동일한 것으로 판단하였으나, 차후 다양한 실험에 의해 광펄스에 의한 사멸작용이 photothermal mechanism과 photochemical mechanism이 동시에 작용하여 나타난다고 보고되었으며, 이 중 photothermal mechanism에 대해서는 광펄스에 의해 시료의 온도가 상승하지 않는다는 이견이 대두되어 현재까지도 정확한 사멸기작을 해명하지 못하고 있는 실정임.

- 광펄스 적용 시 DNA 상에서의 thymine dimer 생성, DNA single strand break에 의해 미생물이 사멸되는 것으로 현재 이론이 정립되고 있으며 미생물 세포막의 파괴에 의해 세포 내용물이 유출되면서 미생물이 사멸되는 data도 보고되고 있음. 즉, 광펄스 기술에 의한 미생물 사멸 기구는 아직 구체적인 이론이 정립되지 않았으나, 기존의 UV 살균의 경우와 마찬가지로 빛을 쬐여 세포의 DNA 구조를 파괴함으로써 미생물이 사멸되는 것으로 보고 있음(Vicente M. et al., 2007).

- 다만, UV 살균의 경우 손상된 DNA가 특정 환경에서 cell repair system에 의해 미생물이 정상 상태로 회복될 수 있는 확률이 매우 큰 반면, 광펄스 살균은 앞서 UV 살균보다 큰 손상을 주어 미생물이 회복될 수 있는 확률을 낮추어 주기 때문에 UV 살균법에 비해 효과적으로 미생물을 제어할 수 있는 것으로 알려져 있음.

- Anderson 등에 의해 광펄스 처리에 의한 여러 종류의 세균 및 곰팡이의 불활성화 정도를 확인되었으며, 살균 효과가 광의 세기에 비례한다는 사실이 보고되었음. 또한 Gomez-Lopez 등은 최소 가공된 야채의 광펄스 살균 효과와 유통기한에 관한 연구가 이루어졌으며, 광펄스 처리 후 최소 가공된 야채의 저장기간이 증가했다는 연구 결과를 발표하였음(Anderson, 2000; Gomez-Lopez, 2005).

- Dunn 등은 빵 제품, 어류, 육류, 생수 등의 광펄스 처리에 관한 연구결과를 발표하였는데 그들에 연구결과에 의하면 빵 제품의 경우 광펄스 처리가 되지 않은 견과에 1e의 경우 5-7일이 지나자 mold colony가 나타났고 11일이 지나자 심해졌으나 광펄스를 처리한 견과에 1e의 경우에는 11일이 지나서도 mold colonie의 증식이 발견되지 않음. 또한 어류의 경우는 광펄스 처리를 한 새우가 7일 정도 먹을 수 있는 상태로 보존되었지만 광펄스 처리를 하지 않은 경우엔 변색되고 심한 이취가 발생하였으며, 육류의 경우에는 역시 광펄스 살균한 결과 2구결og 정도 살균 효과가 있음을 보고하였음(Dunn, 1995).

- 또한 계육, 핫도그, 치즈 등 여러 종류의 식품에 존재하는 *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Listeria innocua*, *Salmonella*, *Pseudomonas* 등의 살균에 광펄스 기술을 적용하여 관능적 변화를 최소화하면서 효과적으로 유통기한을 연장할 수 있다는 연구결과가 발표된 바 있음(Dunn, 1995).

- 광펄스에 의한 식품 유래 병원성 세균의 불활성화에 관한 연구도 활발히 이루어지고 있는데 Rowan 등은 high UV와 low UV의 처리 시 불활성화 정도를 비교함으로써 high UV 시 미생물의 불활성화 정도가 더 크다는 연구결과를 발표하였으며, Huffman 등은 다양한 세균 및 바이러스의 불활성화에 광펄스 처리가 효과가 있음을 밝혔음(Rowan, 1999; Huffman, 2000).

- Marquenie 등은 UV-C, heat과 함께 광펄스를 병합 처리함으로써 strawberry의 부패시기를 연장시키는 연구를 수행하였으며 처리 결과 저장기간이 2일 정도 늘어났다는 연구결과를 발표하였으며, Turtoi 등은 paper-polyethylene packaging material의 표면에 존재하는 곰팡이포자를 불활성화하는 대안으로 광펄스를 이용한 포장재 살균 처리 연구가 수행하였으며, 연구 결과 광펄스 처리는 곰팡이 포자의 불활성화에 매우 효과적이었고 이로써 광펄스에 의한 packaging material 표면 살균 효과를 기대할 수 있게 되었음(Marquenie, 2003; Turtoi, 2007).

- 광펄스 처리 시 빵류, 해산물, 육류, 과일 및 채소류 등 많은 식품에서 위해 세균 저감화 및 유통기한 연장을 통한 안전성 증가 효과가 나타나는 동시에 그 품질은 천연 그대로 유지될 수 있다는 보고가 있었음(Dunn, 1991).

- 소시지나 고기 패티 등 육류의 경우, 광펄스 처리 시 냉동할 필요 없이 냉장 조건 아래 유통기한이 연장되었음. 또한 감자 및 토마토 등의 채소류, 사과 및 바나나 등의 과일류, 파스타 및 rice entrees 등의 가공식품에서도 유통기한 연장 효과가 보고된 바 있음(J. Rice *et al.*, 1994).

- 일반적으로 토마토는 냉장보관을 해도 금방 물러지기 쉽지만 광펄스 처리한 후 냉장보관을 하였을 때 토마토가 30일 정도 신선하게 보관이 되었으며, 이와 유사하게 식빵의 포장지를 광펄스 살균을 한 후 사용하였을 경우에는 식빵이 2주 이상 신선한 상태를 유지하였으나, 광펄스 살균을 하지 않은 포장지에 넣은 식빵의 경우엔 같은 기간에 곰팡이가 관찰되었음(J. Rice *et al.*, 1994).

- 이외에 광펄스 살균 기술에 대한 선행 연구가 많이 이루어져 있으며, 식품, 음료, 포장재 및 식품 표면의 광펄스 처리에 의한 미생물 불활성화 효과에 대해 요약한 결과는 Table 6-1과 같음.

Table 6-1. The effects of PL treatments on microbial inactivation in foods

Microrganisms	Food product and food contact materials	Pulse Energy (J)	Number pulses	Pulse width	Log reduction	Reference
Liquids						
<i>Serratia marcescens</i>	Milk	12.6	-	20 ns	> 2.0	8
<i>Staphylococcus aureus</i>	Milk	1.27	16	-	7.2	20
Plant foods						
<i>Aspergillus niger</i> spores	Corn meal		300	-	4.93	21
<i>Botrytis cinerea</i>	Strawberries	5.6	3,750	30 μ s	3	7
Mesophilic aerobic microorganisms	Blueberries	7	180	-	4.9	22
	Raspberries	32.4	180	-	3.9	22
	Strawberries	72.0	180	-	3.3	22
	Alfalfa seeds	64.8	135	-	< 1.82	5
	Shredded spinach	5.6	2,700	30 μ s	0.9	12
	Grated celeriac	7	675	30 μ s	0.21	12
	Chopped green paprika	7	2,700	30 μ s	0.56	12
	Soybean sprouts	7	675	30 μ s	0.65	12
	Shredded radicchio	7	2,700	30 μ s	0.56	12
	Great carrot	7	675	30 μ s	1.67	12
	Shredded iceberg lettuce	7	2,700	30 μ s	2.0	12
	Shredded white cabbage	7	2,700	30 μ s	0.8	12
	Strawberries	32.4	3,750	30 μ s	4	7
	<i>Monilia fructigena</i>	Blueberries	59.4	180	-	3.8
<i>Salmonella enteric</i>	Raspberries	64.8	180	-	3.4	22
<i>Salmonella</i> spp.	Strawberries		180	-	4.3	22
Other foods						
<i>Clostridium sporogenes</i>	Honey	5.6		-	0.89-5.46	19
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Salmon fillets	5.6	135	-	0.24-0.91	23
<i>Listeria monocytogenes</i>	Salmon fillets	5.6	135		0.72-0.8	23
Packaging material						
<i>Cladosporium herbarum</i> l	Paper-polyethylene Packaging material	0.977	30	-	2.7	24
Food contact surfaces						
<i>Listeria innocua</i>	Stainless steel surfaces	1.27	3	-	1.93-2.77	16

제 7 장 참고문헌

1. Anderson JG, Rowan, NJ, MacGregor SJ, Fouracre RA and Farish O. Inactivation of food-born Enteropathogenic bacteria and Spoilage fungi using pulsed-light. IEEE Transactions on Plasma Sci. 28: 83-88. (2000)
2. Barvosa-Canovas GV, Palou, E, Pothakamury UR and Swanson BG. Application of light pulses in the sterilization of foods and packaging materials. In: Nonthermal Preservation of Foods. Chapter 6. pp. 139-161. Marcel Dekker. New York. US. (1997)
3. Ben Embarek, P.K. Presence, detection and growth of *Listeria monocytogenes* in seafood. A review. Int. J. Food Microbiol. 23, 17-34. (1994)
4. Bialka, K.L., Demirci, A., Puri, V.M., Modeling the inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* on raspberries and strawberries resulting from exposure to ozone or pulsed UV-light. Journal of Food Engineering 85,444 - 449 (2008)
5. Bolton JR, Linden KG. Sterilization of methods for fluence (UV dose) determination in bench-scale UV experiments. Journal of Environmental Engineering, 129: 209-215 (2003)
6. Cho HY, Shin JK, Song, YA, Yoon SJ, Kim JM, Pyun YR. Nonthermal Pasteurization of Lactic acid bacteria by High intensity light pulse, Korean Journal of Food Science and Technology, 34: 631-636 (2002)
7. Cho MS. Nonthermal sterilization of *Enterobacter sakazakii* and *Listeria monocytogenes* in infant foods using intense pulsed light, M.S. thesis, Ewha Univ. (2008)
8. Choi MS, Cheigh CI, Jeong EA Shin JK, Park JY, Song KB, Park JH, Kwon KS, Chung MS. Inactivation of *Enterobacter sakazakii* inoculated on formulated infant foods by intense pulsed light treatment, Food Science and Biotechnology, 18: 1537-1540 (2009)
9. Choi MS, Cheigh CI, Jeong EA, Shin JK, Chugn MS. Nonthermal sterilization of *Listeria monocytogenes* in infant foods by intense pulsed-light treatment, Journal of Food Engineering, 97: 504-509 (2010)
10. Chu G. Double strand break repair. J. Biol. Chem. 272: 24097-24100 (1997)
11. Dunn J, Clark RW, Asmus J, Pearlman J, Boyer K, Painchaud F and Hoffmann G. Methods for preservation of food stuffs. US Patent 5,034,235. (1991)
12. Dunn J, Ott T and Clark W. Pulsed-Light Treatment of Food and packaging. Food Technol. 49(9): 95-98. (1995)
13. Dunn J. Pulsed light and pulsed electric field for foods and eggs. Poultry

- Sci. 75: 1133-1136 (1996)
14. Dunn JE, Clark RW, Asmus JF, Pearlman JS, Boyerr K, Painchaud F. Methods for preservation of foodstuffs. US Patent 4,871,559 (1989)
 15. Fine F, Gervais P. Efficiency of pulsed UV light for microbial decontamination of food powders. *Journal of Food Protection*, 67: 787-792 (2004)
 16. Frerk Feldhusen. The role of seafood in bacterial foodborne diseases. *Microbes and Infection* 2000, 1651-1660. (2000)
 17. Ghasemi Z, Macgregor S, Anderson J, Lamont Y. Development of an integrated solid-state generator for light inactivation of food related pathogenic bacteria. *Measurement Science and Technology*, 14: N26-N32 (2003)
 18. Gomez-lopez VM, Devlieghere F, Bonduelle V and Debevere J. Factors affecting the inactivation of micro-organisms by intense light pulsed. *J. Applied Microbiol.* 99: 460-470. (2005)
 19. Gómez-López VM, Devlieghere F, Bonduelle V, Devere J. Intense light pulses decontamination of minimally processed vegetables and their shelf-life, *International Journal of Food Microbiology*, 103: 79-89 (2005)
 20. Gomez-Lopez VM, Ragaert P, Debevere J and Devlieghere F. Pulsed light for food decontamination: a review. *Trends in Food Sci. Technol.* xx (2007) 1-10.
 21. Hillegas SL, Demirci A. Inactivation of *Clostridium sporogenes* in clover honey by pulsed UV-light treatment. *Agricultural Engineering International*, V. Manuscript FP 03009 (2003)
 22. Hiramoto T. Method of sterilization, US Patent 4,464,336 (1984)
 23. Hoornstra E, de Jong G, Notermans S. Preservation of vegetables by light. In *Society for Applied Microbiology(Ed.) Frontiers in microbial fermentation and preservation*, Washington, the Netherlands.
 24. Huffman DE, Slifko TR, Salisbury K, Rose JB. Inactivation of bacteria, virus and *Cryptosporidium* by a point of use device using pulsed broad spectrum white light. *Water Research*, 34: 2491-2498 (2000)
 25. Jun S, Irudayaraj J, Demirci A, Geiser D. Pulsed UV-light treatment of corn meal for inactivation of *Aspergillus niger* spores. *International Journal of Food Science and Technology*, 38: 883-888 (2003)
 26. Karel N, Radim K, Jaroslav K. Genomic DNA regions whose Complementary strands are prone to UV light-induced crosslinking. *Arch. Biochem. Biophys.* 388: 216-224 (2001)
 27. Kiyosawa K, Tanaka M, Matsunaga T. Amplified UvrA protein ameliorate the ultraviolet sensitivity of an *Escherichia coli recA* mutant. *Mutation Res.* 487: 149-156 (2001)

28. Krishnamurthy K, Demirci A, Irudayaraj J. Inactivation of *Staphylococcus aureus* by pulsed UV-light sterilization. *Journal of Food Protection*, 67: 1027-1030 (2004)
29. Krishnamurthy K., Jagdish C, Tewari, Joseph Irudayaraj, Ali Demirci. Microscopic and spectroscopic evaluation of inactivation of *Staphylococcus aureus* by Pulsed UV Light and Infrared heating (2007)
30. MacGregor SJ, Rowan NJ, McIlvaney L, Anderson JG, Fouracre RA, Farish O. Light inactivation of food related pathogenic bacteria using a pulsed power source. *Letters in Applied Microbiology*, 27: 67-70 (1998)
31. Marmur, J, Grossman, L. Ultraviolet light induced linking of deoxyribonucleic acid strands and its reversal by photoreactivating enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 47: 778-787 (1961)
32. Marquenie D, Geeraerd AH, Lammertyn J, Soontjens C, Van Impe JF, Michiels CW and Nicolai BM. Combinations of pulsed white light and UV-C or mild heat treatment to inactivate conidia of *Botrytis cinerea* and *Monilia Fructigena*. *International J. Food Microbiol.* 85: 185-196. (2003)
33. Marquenie D, Michaels CW, Van Imper JF, Schrevens E, Nicolai BN, Pulsed white light in combination with UV-C and heat to reduce storage rot of strawberry. *Postharvest Biology and Technology*, 28: 455-461 (2003)
34. McDonald KF, Curry RD, Clevenger TE, Brazos BJ, Unklesbay K, Eisenstark, A. et al. A comparison of pulsed and continuous ultraviolet light sources for the decontamination of surface, *IEEE Transactions on Plasma Science*, 28: 1581-1587 (2000)
35. Nil P. Ozer & Ali Dmirci. Inactivation of *Escherchia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* inoculated on raw salmon fillets by pulsed UV-light treatment, *Interntional Journal of Food Science an Technology* 2006,41,354-360. (2006)
36. Okubo S, Nakayama H, Takagi Y. Repair of ultraviolet-damaged DNA in *Micrococcus lisodeikticus*. *Biochim. Biophys. Acta* 228:83-94. (1971)
37. Ozer NP, Demirci A. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* inoculated on raw slamon fillets by pulsed UV-light treatment. *International Journal of Food Science and Technology*, 41: 354-360 (2006)
38. Roberts P, Hope A. Virus inactivation by high intensity broad spectrum pulsed light. *Journal of Virological Methods.* 110: 61-65 (2003)
39. Rowan NJ, Macgregor SJ, Anderson JG, Fouracre RA, Mclivaney LM and Farish O. Pulsed-light inactivation of food-related microorganisms. *Applied Environ. Micobiol.* 65(3): 1312-1315. (1999)
40. Rowan NJ, MacGregor SN, Anderson JG, Fouracre RA, McIlvaney L, Farish O. Pulsed-light inactivation of food-related microorganisms. *Appl. Environ.l*

- Microbiol. 65: 1312-1315 (1999)
41. Sharma RR, Demirci A. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on inoculated alfalfa seeds with pulsed ultraviolet light and response surface modeling. *Journal of Food Science*, 68: 1448-1453 (2003)
 42. Shin JK, Chung MS, Park YS. High intensity pulsed light treatment for preservation and shelf-life extension of seafoods, Unreported Report, (2010)
 43. Slieman TA, Nicholson WL. Artificial and solar UV radiation induces strand breaks and cyclobutane dimer in *Bacillus subtilis* spore DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 1977-1983 (2000)
 44. Takeshita K, Shibato J, Sameshima T, Fukunaga S, Isobe S, Arihara K. Damage of yeasts induced by pulsed light irradiation. *International Journal of Food Microbiology*, 85:151-158 (2003)
 45. Turtoi, M., Nicolau, A. Intense light pulse treatment as alternative method for mould spores destruction on paper-polyethylene packaging material, *Journal of food engineering* 2007, 47-53. (2007)
 46. Vincent, M., Gomez-Lopez, Peter, P., Johan, D. and Frenk, D. Pulsed light for food decontamination. A review. *Trends in food science and technology*. 18, 1-10. (2007)
 47. Wang T, MacGregor SJ, Anderson JG, Woolsey GA. Pulsed ultra-violet inactivation spectrum of *Escherichia coli*. *Water Research*, 39: 2921-2925 (2000)
 48. Wayne H, Sujit KG, Kavita N, Paul W. Internucleotide movements during formation of 16S rRNA-rRNA photocrosslinks and their connection to the 30S subunit conformational dynamics. *J. Mol. Biol.* 354: 358-374 (2005)
 49. Wekhof A, Trompeter FJ, Franken O. Pulse UV disintegration (PUVD): A new sterilization mechanism for packaging and broad medical-hospital applications. The first international conference on ultraviolet technologies, Washington D.C., USA. (2001)
 50. Wekhof A. Disinfection with flash lamps. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 54: 264-276 (2000)
 51. Wuytack EY, Thi Phuong LD, Aertsen A, Reyns KMF, Marquenie D, De Kerelaere B. Comparison of sublethal injury induced in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* by heat and by different nonthermal treatments. *Journal of Food Protection*, 66: 31-37 (2003)
 52. 식품의약품안전청. 식품의 기준 및 규격. 식품공전(2008)

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.