

연구노트

Evaluation of Two Kinetic Models on the Inactivation of Major Foodborne Pathogens by Aqueous Chlorine Dioxide Treatment

Ji Hye Lee, Hyeon Jeong Song and Kyung Bin Song[†]

Department of Food Science & Technology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

이산화염소수 처리에 의한 주요 식중독균의 불활성화에 관한 두 kinetic models의 비교

이지혜 · 송현정 · 송경빈[†]

충남대학교 농업생명과학대학 식품공학과

Abstract

Inactivation kinetic data of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhimurium*, and *Salmonella Enteritidis* via treatment with aqueous chlorine dioxide treatment at a specific concentration were evaluated using the first-order kinetic and Weibull models. The Weibull model showed a better fit with the kinetic data than the first-order kinetic model. The survival curves after the aqueous chlorine dioxide treatment showed t_R values (time required to reduce microbial populations by 90%) of 2.49 min for *E. coli* O157:H7 at 5 ppm, 1.47 min for *L. monocytogenes* at 5 ppm, 0.94 min for *S. aureus* at 5 ppm, 0.87 min for *S. Typhimurium* at 1 ppm, and 0.08 min for *S. Enteritidis* at 1 ppm, according to the Weibull model.

Key words : aqueous chlorine dioxide, inactivation, Weibull model, first-order kinetics

서 론

즉석가공 또는 즉석섭취 식품, 단체급식 등의 증가로 인해 식중독 발생의 가능성이 증가하고 있다. 최근 우리나라에서 발생한 주요 식중독 원인균은 *Escherichia coli*가 11.3%로 가장 많았고, *Salmonella* 9.8%, *Staphylococcus*는 6.8%의 발병률을 보였다(1). 또한 *Listeria*는 발생 건수는 많지 않았으나 30% 이상의 높은 치사율을 가지고 있을 뿐만 아니라(2), 냉장 온도에서도 자랄 수 있는 저온성 균이기 때문에 냉장 보존을 하는 채소류 등에서 증식이 가능하여 오염 시 식중독 발생의 가능성이 높다(3).

샐러드 등 신선편이 채소는 현대인의 식생활 패턴 변화로 인해 간편하게 먹을 수 있다는 장점과 영양적 가치 때문에 수요가 늘어나고 있지만(4), 열처리가 제한되고 또한 식품 자체의 초기 오염 수준이 높아 식중독 발생의 가능성이 상존한다. 따라서 식중독 관련 미생물 오염을 방지하기 위한 식품의 비열처리 방법으로는 감마선 조사, UV-C 조사,

유기산, 염소 처리 등이 있는데(5-7), 그 중에서도 염소의 사용은 살균과정에서 trihalomethane (THM)과 같은 발암성 물질을 생성한다고 알려져 있다(8). 그래서 염소를 대체하기 위한 방안으로 이산화염소에 관한 연구가 활발히 진행되었는데(9), 이산화염소는 THM을 생성하지 않고 염소보다 물에 대한 용해성이 높으며, 짧은 반응시간, 넓은 pH 범위에서도 효과적인 살균력을 가진다(10). 현재 신선편이식품을 대상으로 한 이산화염소 처리를 식품산업에 적용하기 위해 이산화염소 가스 또는 이산화염소수 형태로 진행되고 있다(10-13).

미생물 사멸 관련한 first-order kinetic model은 식품의 가열처리에서 많이 사용되지만(14), survival plots이 항상 linear하지 않고, 특히 비가열처리의 경우에는 first-order kinetic model이 적합하지 않은 경우가 많다(15). 따라서 non-linearity를 설명하기 위한 다양한 model이 제안되었는데(16), 그 중에서도 Weibull model이 가장 적합하다고 알려져 있다(15,17). 최근 Weibull model을 이용하여 이산화염소수, fumaric acid, UV-C 조사에 의한 주요 식중독 균에 대한 불활성화에 관한 보고가 있었는데(18), 그 연구에서는 특정

[†]Corresponding author. E-mail : kbsong@cnu.ac.kr
Phone : 82-42-821-6723, Fax : 82-42-825-2664

시간 동안의 이산화염소수 처리에 의한 이산화염소수 농도에 따른 kinetic data 분석만이 이루어졌기에 주요 식중독균의 이산화염소수 처리에 대한 민감성을 판단하기에는 부족하다. 그래서 그 연구 결과를 토대로 특정 이산화염소수 농도에서의 처리 시간에 따른 보다 근본적인 kinetic analysis가 필요하다고 판단된다.

따라서 본 연구에서는 주어진 특정 농도, 즉 5 ppm 이하에서의 이산화염소수 처리 시간에 따른 주요 식중독균인 *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Enteritidis*의 불활성화에 미치는 영향을 규명하고자 하였다. 특히, 가열 처리의 decimal reduction time (D) value와 유사한, 미생물 수를 90% 감소시키는데 필요한 시간을 얻기 위하여 특정 농도의 이산화염소수 처리에 의한 bacterial survival curve에 기초하여 first-order linear model, Weibull model 두 가지를 적용하여 kinetic parameter를 비교, 분석하였다.

재료 및 방법

미생물 배양

E. coli O157:H7 (NCTC 12079), *L. monocytogenes* (ATCC 19111), *S. aureus* (ATCC 25923), *S. Typhimurium* (ATCC 14028), *S. Enteritidis* (ATCC 13076) 각각의 균주는 tryptic soy agar (TSA, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)를 사용하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양 후 형성된 균주의 단일 colony를 멸균된 loop로 취해 각각 tryptic soy broth (TSB, Difco)에 접종하여 37°C에서 24시간 동안 진탕 배양하여 균주를 활성화하였다. 배양한 *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*의 pure cell culture를 0.1% sterile peptone water에 vortex mixer (Vortex Genie-2, Scientific Industries, Bohemia, NY, USA)를 사용하여 재현탁시키고 원심분리 (2,000×g, 15 min)하여 3회 세척한 후 침전된 cell pellet을 회석하여 농도가 8-9 log CFU/mL가 되게 하여 사용하였다.

이산화염소수 처리

이산화염소수는 chlorine dioxide system (CH₂O Inc., Olympia, Washington, USA)을 사용하였으며 농도는 iodometry 방법으로 측정하였다(19). 예비실험 결과를 바탕으로 정해진 처리 조건에 따라, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*와 *S. aureus*는 이산화염소수 최종 농도가 5 ppm이 되도록 하여 1, 3, 5, 7, 10분 동안 처리하였고, *S. Typhimurium*은 이산화염소수 최종농도가 1 ppm이 되도록 하여 1, 3, 5, 7, 10분 동안 처리하였으며, *S. Enteritidis*는 이산화염소수 최종농도가 1 ppm이 되도록 하여 1, 3, 5분 동안 처리하였다. 처리된 균주들은 연속 회석하여 TSA배지

에서 37°C, 24시간 배양하였다. 미생물 수 측정은 agar plate에 형성된 colony를 counting하여 colony forming units (CFU)로 나타내었다. 모든 실험은 3회 반복하여 측정하였다.

Microbial inactivation model

특정 농도에서의 이산화염소수 처리 시간에 따른 병원성 미생물의 민감성을 측정하기 위해 first-order kinetic model과 Weibull model을 적용하였다. First-order kinetics는 식 (1)로 나타내는데,

$$\log\left(\frac{N}{N_0}\right) = -kt \quad (1)$$

N은 이산화염소수 처리 시간(min)에 따른 생존균수(CFU/mL), N_0 는 초기 균수(CFU/mL), t 는 처리 시간(min), k 는 constant이다.

Weibull model은 식 (2)로 나타내는데(20, 21),

$$\log\left(\frac{N}{N_0}\right) = -\frac{1}{2.303}\left(\frac{t}{\alpha}\right)^\beta \quad (2)$$

α 는 scale parameter이고, β 는 shape parameter이다. α 와 β 는 Microsoft Excel 2007 (Seattle, WA, USA)의 non-linear least-squares regression로 산출하였고, α 와 β 값으로 식 (3)을 이용하여 t_R 값을 구하였다(21).

$$t_R = \alpha \times (2.303)^{\frac{1}{\beta}} \quad (3)$$

t_R 은 특정 이산화염소수 처리 농도에서의 미생물수를 90% 감소시키는데 필요한 처리 시간으로 가열처리의 decimal reduction time (D value)와 유사하다.

결과 및 고찰

Kinetic models의 비교

특정 농도에서의 이산화염소수로 처리한 주요 식중독균의 시간의 경과에 따른 미생물의 불활성화 data를 first-order kinetic model과 Weibull model을 적용하여 kinetic parameter를 비교, 분석하였다. *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*의 root mean square error (RMSE)값은 Weibull model에서 0.05, 0.15, 0.04, 0.07, 0.08로 나타난 반면 first-order kinetic model은 0.14, 0.24, 0.31, 0.37, 0.19로 나타났다(Table 1). 또한 Weibull model과 first-order kinetic model의 correlation coefficients (R^2)는 *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*와 *S. aureus* 경우에는 두

model 간의 유의적인 큰 차이가 없었지만, *S. Typhimurium* 과 *S. Enteritidis*는 Weibull model의 R^2 은 0.99인 반면 first-order kinetic model의 R^2 값은 0.89를 나타냈다(Table 1). 결과적으로 R^2 값은 유의적으로 큰 차이가 나타나지 않았지만 RMSE 값을 고려할 때, first-order kinetic model에 비해 Weibull model이 이산화염소수 처리에 대한 미생물의 민감성을 측정하기 위한 survival plot의 결과 분석에 더 적합하다고 판단된다.

Table 1. Evaluation of the two kinetic models on the inactivation of major foodborne pathogens by 5 ppm aqueous ClO₂ treatment

Microorganism	Models	RMSE ¹⁾	R ²
<i>E. coli</i> O157:H7	First-order	0.14	0.98
	Weibull	0.05	0.99
<i>L. monocytogenes</i>	First-order	0.24	0.97
	Weibull	0.15	0.99
<i>S. aureus</i>	First-order	0.31	0.97
	Weibull	0.04	0.99
<i>S. Typhimurium</i> ²⁾	First-order	0.37	0.89
	Weibull	0.07	0.99
<i>S. Enteritidis</i> ²⁾	First-order	0.19	0.89
	Weibull	0.08	0.99

¹⁾root mean square error

²⁾1 ppm aqueous ClO₂ treatment

또한 이산화염소수 처리 후, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*의 survival curve를 Fig. 1에 나타내었는데, Weibull model이 first-order kinetic model에 비해 data에 더 적합한 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 Bialka 등(21)과 Chun 등(18)의 보고에서 Weibull model이 미생물의 inactivation kinetic data 분석에 더 적합하다는 결과와 일치한다.

이산화염소수 처리 효과

S. Enteritidis survival plot의 slope를 *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. Typhimurium*과 비교하였을 때 다른 식중독균에 비해 보다 큰 slope 값을 가졌는데, 이는 *S. Enteritidis*가 다른 미생물보다 이산화염소수 처리에 보다 민감하다는 것을 나타낸다. 그리고 Weibull model의 parameter β 는 survival curve 형태에 대한 것으로, parameter β 가 1보다 작은 경우 concave upward의 형태를 보이고, β 가 1보다 큰 경우에는 survival curve가 concave downward 형태로 나타나며, β 가 1일 경우 linear 형태를 보인다. 본 연구에서 사용된 미생물 모두 parameter β 가 1보다 작으므로 concave upward 형태로 나타나는 것을 알 수 있었다 (Table 2).

Weibull model에서 가열처리의 D-value와 유사한 t_R value

는 이산화염소수 처리에 의한 미생물의 민감성을 나타내는 것으로 각 미생물들의 t_R value는 *E. coli* O157:H7가 이산화염소수 농도 5 ppm에서 2.49 min로 이산화염소수에 가장 저항성이 컸고, *L. monocytogenes*가 5 ppm에서 1.47 min, *S. aureus*가 5 ppm에서 0.94 min을 나타냈다 (Table 2). 또한, *S. Typhimurium*과 *S. Enteritidis*이 이산화염소수 처리 농도 1 ppm에서 각각 0.87 min, 0.08 min으로 나타나, 다른 미생물들 보다 이산화염소수 처리 농도가 낮았음에도 불구하고 t_R value가 가장 작은 값으로 나타났었다(Table 2). 따라서 이산화염소수 처리에 *Salmonella*가 보다 민감함을 보여 주었으며, 특히 *S. Enteritidis*가 가장 민감하다는 것을 나타내었다. 이러한 결과는 이전의 연구 보고(18)에서 3분간 여러 이산화염소 처리 농도에 따른 미생물의 민감성 결과에서 *S. aureus*가 *Salmonella*를 비롯한 다른 식중독균에 비해 이산화염소수 처리에 가장 민감하였다는 것과는 차이를 보인다. 이러한 차이는 이산화염소수 처리 시간을 3분으로 고정된 이전 연구의 실험조건과 초기 미생물 수 등 처리 환경 조건이 상이한 것에 의한 것으로 생각되며, 이번 연구 결과가 주어진 이산화염소수 농도에서의 처리 시간에 따른 미생물 수 변화에 기초한 것으로 이산화염소수에 대한 주요 식중독균의 민감성을 나타내는 보다 더 나은 지표라고 판단된다. 또한 본 연구 결과는 식품 내 *Salmonella* 보다는 *E. coli* O157:H7에 의한 오염이 이산화염소수 처리에 있어서 저항성이 크기 때문에 보다 더 이산화염소수 처리 조건을 강화해야 된다는 것을 시사한다.

현재 우리나라는 채소·과실류의 살균 목적에 한하여 이산화염소수를 염소계 살균 소독제로 100 ppm까지 허용하고 있지만(22), FDA는 과일과 야채의 표면 살균에 이산화염소수의 농도를 5 ppm 이하로 제한하고 있다(23). 그러므로 본 연구에서 수행된 pure culture가 아닌 실제 식품에서는 이산화염소수 처리만으로는 미생물학적 안전성을 보장할 정도의 살균효과를 기대하기는 어렵다고 생각된다. 따라서 실제 식품에서는 이산화염소수 처리에 부가적으로 다른 비열처리를 병행한 hurdle technology가 보다 더 효과적일 수 있다고 판단된다.

Table 2. Weibull model parameters for inactivation of foodborne pathogens by 5 ppm aqueous ClO₂ treatment

Microorganism	α ¹⁾	β ²⁾	t_R ³⁾
<i>E. coli</i> O157:H7	0.83	0.76	2.49
<i>L. monocytogenes</i>	0.50	0.77	1.47
<i>S. aureus</i>	0.27	0.67	0.94
<i>S. Typhimurium</i> ⁴⁾	0.12	0.42	0.87
<i>S. Enteritidis</i> ⁴⁾	0.01	0.43	0.08

¹⁾ α : scale parameter

²⁾ β : shape parameter

³⁾ t_R : time required for 90% reduction of the populations of pathogenic bacteria

⁴⁾1 ppm aqueous ClO₂ treatment

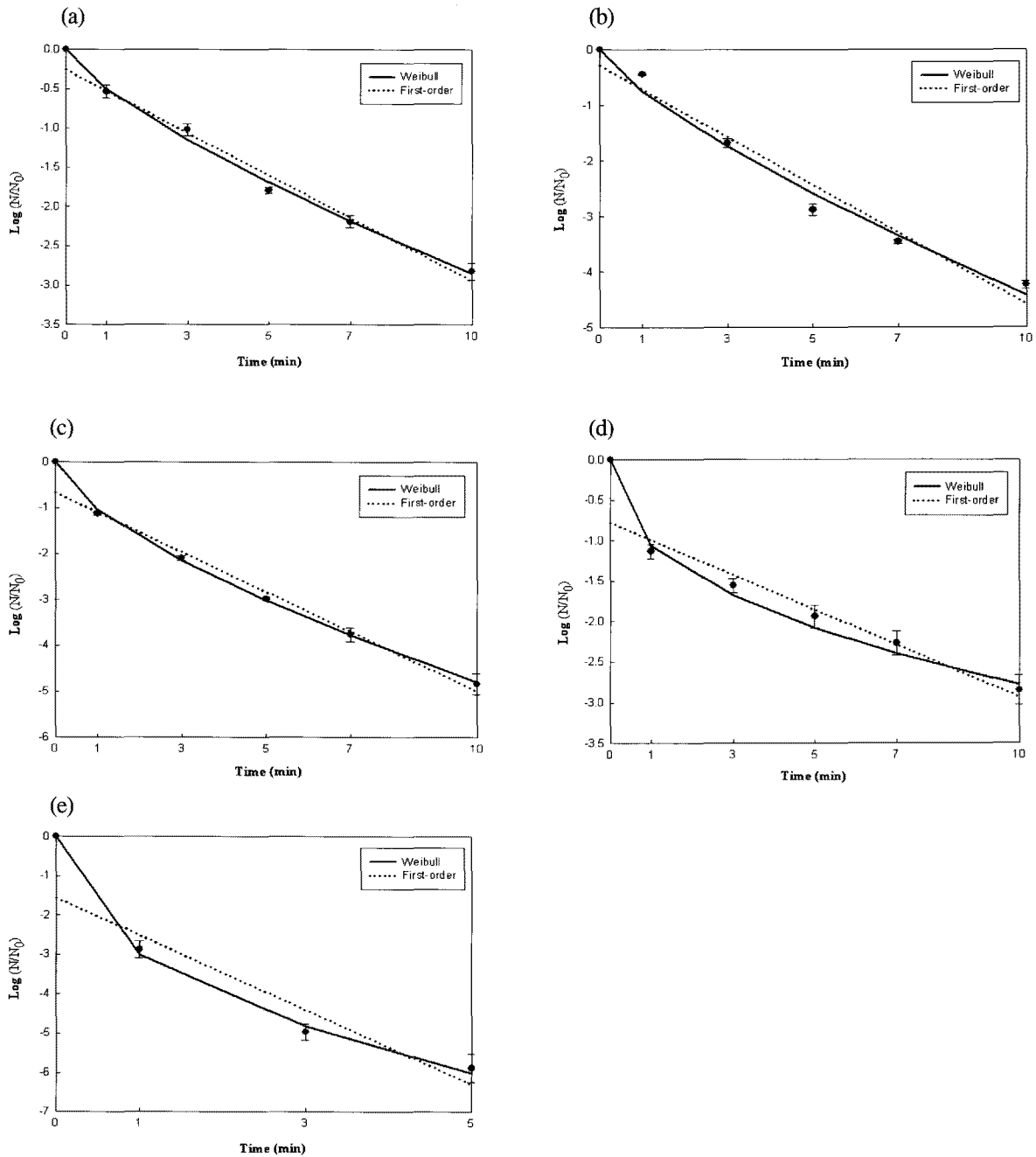


Fig. 1. Survival curves of major foodborne pathogens by aqueous ClO₂ treatment.

Data were fitted with the first-order kinetic and Weibull models, respectively. Error bars indicate standard deviation.

(a) *E. coli* O157:H7 (b) *L. monocytogenes* (c) *S. aureus* (d) *S. Typhimurium* (e) *S. Enteritidis*

요 약

주요 식중독균인 *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. Typhimurium*과 *S. Enteritidis*를 주어진 이산화염소수 농도에서 시간별로 처리한 inactivation data를 first-order kinetic model과 Weibull model을 이용하여 kinetic

parameter를 비교, 분석하였다. 그 결과 Weibull model이 first-order kinetic model보다 inactivation kinetic data에 더 적합한 것을 보였다. 또한 특정 농도의 이산화염소수에서 처리한 survival plot의 tR values(특정 이산화염소수 농도에서 미생물 90%를 감소시키기 위해 필요한 시간)는 Weibull model을 적용 시, *E. coli* O157:H7가 5 ppm에서 2.49 min, *L. monocytogenes*가 5 ppm에서 1.47 min, *S. aureus*가 5 ppm

에서 0.94 min, *S. Typhimurium*이 1 ppm에서 0.87 min 그리고 *S. Enteritidis*가 1 ppm에서 0.08 min으로 측정되었다.

감사의 글

본 연구는 2010년도 농림수산식품기술기획평가원의 지원에 의하여 수행된 연구과제의 일부로써 지원에 감사를 드립니다.

참고문헌

1. Korea Food and Drug Administration (2010) Statistics on food poisoning. Seoul, Korea
2. Jeon BS, Lee SB, Hong CH (2010) Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from pork cutting plants and meat shops. Korean J Vet Publ Hlth, 34, 109-115
3. Zhang Y, Yeh E, Hall G, Cripe J, Bhagwat AA, Meng J (2007) Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from retail foods. Int J Food Microbiol, 113, 47 - 53
4. Chen Z, Zhu C, Zhang Y, Niu D, Du J (2010) Effect of aqueous chlorine dioxide treatment on enzymatic browning and shelf-life of fresh-cut asparagus lettuce. Postharvest Biol Tec, 58, 232-238
5. Wen HW, Chung HP, Chou FI, Lin IH, Hsieh PC (2006) Effect of gamma irradiation on microbial decontamination, and chemical and sensory characteristic of lycium fruit. Radiat Phys Chem, 75, 596 - 603
6. Artes-Hernandez F, Robles PA, Gomez PA, Tomas-Callejas A, Artes F (2010) Low UV-C illumination for keeping overall quality of fresh-cut watermelon. Postharvest Biol Tec, 55, 114 - 120
7. Kim YJ, Kim MH, Song KB (2009) Efficacy of aqueous chlorine dioxide and fumaric acid for inactivating pre-existing microorganisms and *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* on broccoli sprouts. Food Control, 20, 1002-1005
8. Hong HC, Liang Y, Han BP, Mazumder A, Wong MH (2007) Modeling of trihalomethane (THM) formation via chlorination of the water from Dongjiang River (source water for Hong Kong's drinking water). Sci Total Environ, 385, 48-57
9. Jin YY, Kim YJ, Chung KS, Won MS, Song KB (2007) Effect of aqueous chlorine treatment on the microbial growth and qualities of strawberries during storage. Food Sci Biotechnol, 16, 1018-1022
10. Vaid R, Linton RH, Morgan MT (2010) Comparison of inactivation of *Listeria monocytogenes* within a biofilm matrix using chlorine dioxide gas, aqueous chlorine dioxide and sodium hypochlorite treatments. Food Microbiol, 27, 979-984
11. Singh N, Singh RK, Bhunia AK (2003) Sequential disinfection of *Escherichia coli* O157:H7 inoculated alfalfa seeds before and during sprouting using aqueous chlorine dioxide, ozonated water, and thyme essential oil. LWT-Food Sci Technol, 36, 235-243
12. Mahmoud BSM, Vaidya NA, Corvalan CM, Linton RH (2008) Inactivation kinetics of inoculated *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Poona on whole cantaloupe by chlorine dioxide gas. Food Microbiol, 25, 857-865
13. Kim YJ, Kim MH, Song KB (2009) Combined treatment of fumaric acid with aqueous chlorine dioxide or UV-C irradiation to inactivate *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* inoculated on alfalfa and clover sprouts. LWT-Food Sci Technol, 42, 1654-1658
14. Buzrul S, Alpas H (2007) Modeling inactivation kinetics of food borne pathogens at a constant temperature. LWT-Food Sci Technol, 40, 632 - 637
15. Lee H, Zhou B, Liang W, Feng H, Martin SE (2009) Inactivation of *Escherichia coli* cells with sonication, manosonication, thermosonication, and manothermosonication: Microbial responses and kinetics modeling. J Food Eng, 93, 354-364
16. Buzrul S, Alpas H (2004) Modeling the synergistic effect of high pressure and heat on inactivation kinetics of *Listeria innocua*: A preliminary study. FEMS Microbiol Lett, 238, 29 - 36
17. Chen H, Hoover DG (2004) Use of Weibull model to describe and predict pressure inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A in whole milk. Innov Food Sci Emerg, 5, 269-276
18. Chun HH, Kim HJ, Won M, Chung KS, Song KB (2010) A comparison of kintetic models of foodborne pathogen inactivation by aqueous chlorine dioxide, fumaric acid, and ultraviolet-C. J Korean Appl Biol Chem, 53, 243-248
19. American Public Health Association (1995) Standard methods for the examination of water and wastewater. 19th ed, Method 4-54, American Public Health

- Association, Washington DC, USA
20. Boekel MAJS (2002) On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *Int J Food Microbiol*, 74, 139-159
 21. Bialka KL, Demirci A, Puri VM (2008) Modeling the inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* on raspberries and strawberries resulting from exposure to ozone or pulsed UV-light. *J Food Eng*, 85, 444-449
 22. Youm HJ, Ko JK, Kim MR, Song KB (2004) Inhibition effect of aqueous chlorine dioxide on survival of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* in pure cell culture. *Korean J Food Sci Technol*, 36, 514-517
 23. Korea Food and Drug Administration (2009) Use of chlorine-based sanitizers. Seoul, Korea
-
- (접수 2010년 12월 1일 수정 2011년 4월 28일 채택 2011년 5월 20일)