

초음파와 염소 병용처리에 의한 다슬기(*Semisulcospira libertine*) 유래 위생지표미생물의 저감화효과

전은비 · 박신영†

경상국립대학교(학생) · †경상국립대학교(교수)

Effects of Combined Ultrasound and Chlorine Treatment on the Reduction of Sanitary Indicative Microorganism in the Korean Freshwater Snail (*Semisulcospira libertine*)

Eun-Bi JEON · Shin Young PARK†

Gyeongsang National University(student) · †Gyeongsang National University(professor)

Abstract

The current study investigated the effects of ultrasound (US; 40 kHz, 320W, 5 or 10 min) and chlorine (CL; 100 ppm of Cl₂, 5 or 10 min) combined treatment on the indigenous natural microorganism regarded as sanitary indicatives in Korean freshwater snail (*Semisulcospira libertine*). The numbers of total viable bacteria, coliforms, and yeast and mold in the fresh water snail were significantly reduced more ($p>0.05$) by the UL and CL combined treatments than by US or CL single treatment. Single treatment with CL for 10 min showed a maximum 1.38 log reduction of total viable bacteria, while 5 min of US 5 min/CL 5 min, US 10 min/CL 10 min, US 10 min/CL 5 min, and US 10 min/CL 10 min showed 2.1, 2.16, 2.21, and 2.43 log reduction, respectively. The number of coliforms were also revealed as 1.10 and 1.22 log reduction, respectively when combined treated with US 10 min/CL 5 min and US 10 min/CL 10 min. When combined treated with US 10 min/CL 10 min, there were a maximum 2.03 log reduction of yeast and mold.

Key words : Snail, *Semisulcospira libertine*, Ultrasound/Chlorine, Total viable bacteria, Coliforms, Yeast and mold

I. 서론

다슬기(*Semisulcospira libertine*)는 껍질이 짙은 갈색이고 근육이 녹색을 띠는 민물 달팽이의 일종으로 *Semisulcospiridae*과에 속하는 수생 복족류 연체동물이다. 한국, 일본, 중국 등 동아시아의 강, 호수, 하천에 서식하는 다슬기는 우리나라에서는 1급수에서 채취하고 있고 담수식량의 하나로 자리잡고 있다. 다슬기는 단백질과 철분 함량

이 높아 우리나라에서는 전통적으로 간질환 치료제, 빈혈 및 알코올 숙취 완화제의 원료로 사용되어 왔다(Park et al., 2015). 최근에는 국, 오일, 추출물, 정제 등 다양한 가공식품과 기능성 식품에 한국산 민물 다슬기의 활용이 증가하고 있다.

과일 및 야채, 육류 및 육류 가공품, 해산물 및 해산물 가공품에서 병원균을 포함한 다양한 종의 미생물 수를 줄이거나 사멸시키기 위해 염소, 유기산, 방사선 조사, 오존과 같은 다양한 종류의

† Corresponding author : 055-772-9143 sypark@gun.ac.kr

비가열 오염 제거 처리가 널리 연구되고 있다. 이러한 항균작용 중 차아염소산나트륨은 가장 효과적인 염소화합물로서 가정과 식품산업체 등에서 널리 사용하는 살균소독제로 인정받고 있다 (Chang et al., 2004). 염소의 살균 효능은 염소가 박테리아 세포에 침투하여 세포의 세포막에 존재하는 필수 효소를 산화시켜 항균작용을 일으킨다 (Lomander et al., 2004). 초음파는 신선 농산물의 잎이 접힌 부분 등 살균처리가 어려운 부분의 살균효과를 높이는데 도움이 되기 때문에 염소, 유기산을 포함한 다양한 화학 소독제에 사용되는 보조적인 물리적 처리법이다(Sagong et al., 2011).

식품산업에서 일반식품 및 기능성식품 제조를 위한 원료의 미생물 안전성 확보가 시급하다. 이를 위해 다슬기의 경우, 세척 과정에서 사용될 수 있는 초음파와 염소 병용처리에 의한 미생물 감소 효과에 대한 기초적인 연구가 필요하다.

본 연구에서는 초음파(40 kHz, 320W의 조건하에서 5분 또는 10분 처리)와 염소(Cl_2 의 5분 또는 10분 침지)의 병용처리가 다슬기의 일반세균, 대장균군 및 진균류 등 위생지표 미생물의 감소에 미치는 영향을 살펴보았다.

II. 연구 방법

1. 연구 시료

본 연구에서 사용한 다슬기(*Semisulcospira libertine*)는 정옥다슬기(경남 하동)로부터 섬진강 1급수 청정수역에서 채취한 자연산 다슬기를 공급받아 아이스박스에 담아 실험실로 가져와 사용하였다. 시료로 사용된 다슬기의 무게와 길이는 각각 1.05 ± 0.49 g, 2.18 ± 0.47 cm이었다.

2. 초음파와 염소의 단일처리

다슬기의 내부 근육과 외부 껍질을 포함한 위생지표 미생물총의 저감화하기 위해 물리적 처리

방법으로 초음파(Branson 8210 Ultrasonic Cleaner, Branson Ultrasonics Corporation, Connecticut, USA)를 사용했다. 단일 초음파 처리를 위해 시료(10 마리)를 멸균 증류수 10 mL와 함께 710 mL Whirl-Pak (Naso, Fort Atkinson, WI, USA)에 넣어 40 kHz의 주파수 및 최대 320W의 전력에서 5분 또는 10분 동안 처리하였다.

염소 단일 처리의 경우 사용 직전에 5% 염소 (free chlorine, Shimadzu Co., Kyoto, Japan)를 멸균 증류수로 희석하여 100 ppm의 염소 용액을 제조하여 사용하였다. 실온에서 시료를 100 ppm의 염소용액에 담그어 5분 또는 10분 동안 자석 교반 막대를 사용하여 교반하였다.

3. 초음파와 염소의 병용처리

시료(10 마리)는 초음파와 염소를 병용처리 할 경우 미생물 세포막을 약화시킬 수 있는 초음파를 1차 미생물 저감화 방법으로 5분 또는 10분 처리하였다. 이후 2차 화학소독제로 염소 100 ppm에 5분, 10분 처리하였다. 이 방법은 염소와 같은 화학적 소독제 처리시 미생물 세포에 더 민감하게 작용 할 수 있는 처리법으로 알려져 있다 (Koivunen and Heinonen-Tanski, 2005).

4. 일반세균, 대장균군 및 진균류의 계수

일반세균과 대장균군의 정량적 분석은 식품공전(MFDS, 2023) 방법에 의해 실시되었다. 일반세균의 정량적 계수를 위해 단일처리 또는 병용처리 후 가식부위 10 g을 멸균된 0.85% 생리식염수 90 mL가 담긴 스토마커 백에 넣고 균질기 (Interscience Co., Saint-Nom la Bretèche Arpents, France)를 사용하여 2분간 균질화하였다. 이 균질액 1 mL를 취한 후 멸균생리식염수 9 mL에 단계 희석한 후 주입평판법(pour plate method)에 따라 각 단계 희석액 1 mL를 평판에 분주하고 plate count agar (PCA; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)를 petri dish에 약 15-20 mL씩 부어 고

르게 혼합하였다. 35±1°C에서 24-48시간 배양시킨 후 15-300개의 집락을 형성한 배지만 계수하여 log CFU (colony-forming unit)/g으로 나타내었다. 대장균군(coliforms)의 정량적 분석은 일반세균수와 동일한 균질액 1 mL을 취하여 멸균생리식염수 9 mL에 단계 희석한 후 각각 대장균군 3M Petrifilm (Coliform/E. coli Count Plate, 3M, Seoul, Korea)에 희석액 1 mL를 분주하여 35±1°C에서 24±2시간 동안 배양하였다. 대장균군은 붉은 집락 중 기포를 형성한 집락을 계수하였다.

진균류의 정량적 분석은 식품공전(MFDS, 2023) 방법에 의해 실시되었다. 진균류의 정량적 분석을 위해 일반세균수와 동일한 균질액 1 mL을 취하여 멸균생리식염수 9 mL에 단계 희석한 후 주입 평판법(pour plate method)에 따라 각 단계 희석액 1 mL를 평판에 분주하고 10% tartaric acid로 acidified시킨 potato dextrose agar (PDA, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)를 petri dish에 약 15-20 mL씩 부어 고르게 혼합하였다. 이를 25°C에서 5일간 배양시킨 후 15-300개의 집락을 계수하여 log CFU/g으로 나타냈다.

5. 통계분석

모든 실험은 3반복으로 수행되었으며 관찰된 실험 결과는 SPSS 25(IBM SPSS Statistics, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) program을 이용하여 분석하였다. 각각의 실험군이 통계적으로 유의적(p<0.05)으로 나타나는 경우에 각각의 3반복 실험에 의한 평균값을 다중위검정법(Duncan Multiple-Range Test)을 이용하여 분석하였다.

Ⅲ. 연구 결과

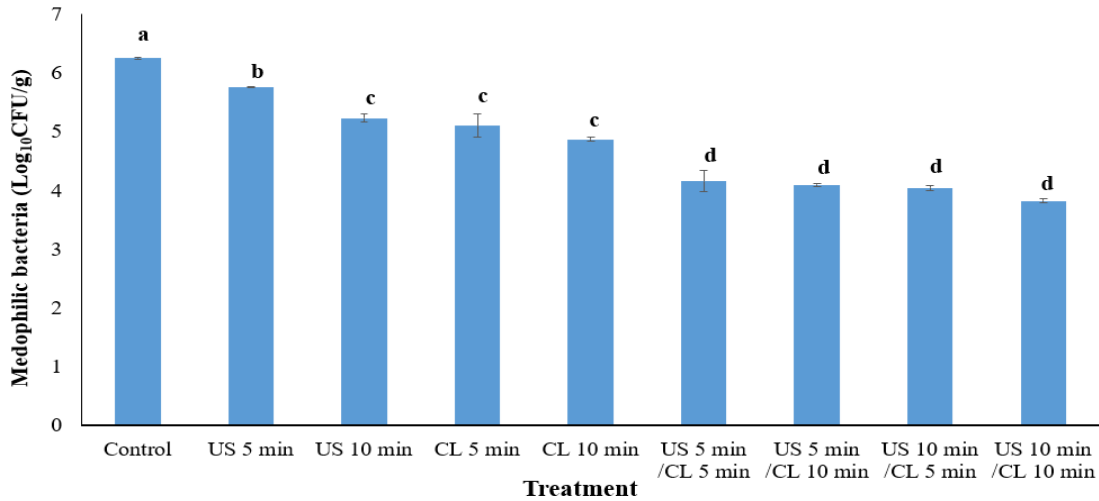
1. 초음파와 염소처리의 병용처리에 의한 다슬기 중 일반세균과 대장균군의 저감화 효과

초음파는 일반적으로 식품산업에서 10-20 kHz

의 주파수에서 사용되며 박테리아의 지질막을 파괴하고 신선한 농산물에서 박테리아를 분리할 수 있는 공동화 미세 기포를 생성하여 항균작용 기능을 가능하게 한다 (Piyasena et al., 2003). 본 연구에서는 농산물과 달리 다슬기의 두꺼운 껍질로 인해 낮은 주파수로는 영향이 거의 없을 것으로 생각되어 내부 근육까지 주파수가 도달하기 위해서 40 kHz의 주파수를 사용하였다. 일반적으로 다슬기를 포함한 담수 패류 및 해수 패류를 식품의 원료로 사용할 때 깨끗한 물에 담그어 이들 내부에 있는 흙과 유기물, 냄새 등을 제거하는 해감 공정을 실시한다(Song et al., 2001). Choi et al.(2019)는 다슬기의 상수와 지하수 해감시 오히려 위생지표 미생물의 수가 원료 다슬기보다 유의적으로 높거나 아무런 효과가 없다고 하였으며 지하수로 해감한 다슬기는 원료 다슬기에서 검출되지 않았던 대장균도 검출되었다고 보고하였다.

따라서 해감 공정 이후 잔존 미생물을 효과적으로 제어할 수 있는 세척 소독의 공정이 필요하기 때문에 초음파와 염소의 병용처리가 다슬기의 위생지표미생물 저감화 효과를 살펴보았다. 다만 본 연구에서는 예비시험 결과(데이터 미제시) 대장균이 다슬기에서 검출되지 않았으므로 대장균을 제외한 일반세균, 대장균군 및 진균류의 위생지표미생물에 대한 저감화 효과를 [Fig. 1], [Fig. 2] 및 [Fig. 3]에 각각 나타내었다.

일반세균은 초음파와 염소 단일처리에 비해 초음파와 염소 병용처리시 유의적으로 더 많이 감소하였다(p<0.05) ([Fig. 1]). 염소 10분 처리시 일반세균수의 최대 1.38 log 감소를 보인 반면 초음파 5분/염소 5분, 초음파 5분/염소 10분, 초음파 10분/염소 5분 및 초음파 10분/염소 10분 처리시 일반세균수의 평균은 각각 4.15(2.1 log 감소), 4.09(2.16 log 감소), 4.04(2.21 log 감소) 및 3.82(2.43 log 감소) log CFU/g이었다. 단 이들 병용처리 간의 유의적 차이는 없었으며, 초음파와 염소의 병용처리에 의한 일반세균은 2 log-3 log



[Fig. 1] Populations of total viable bacteria in Korean freshwater snail (*Semisulcospira libertine*) after single and combined treatment of US and CL.

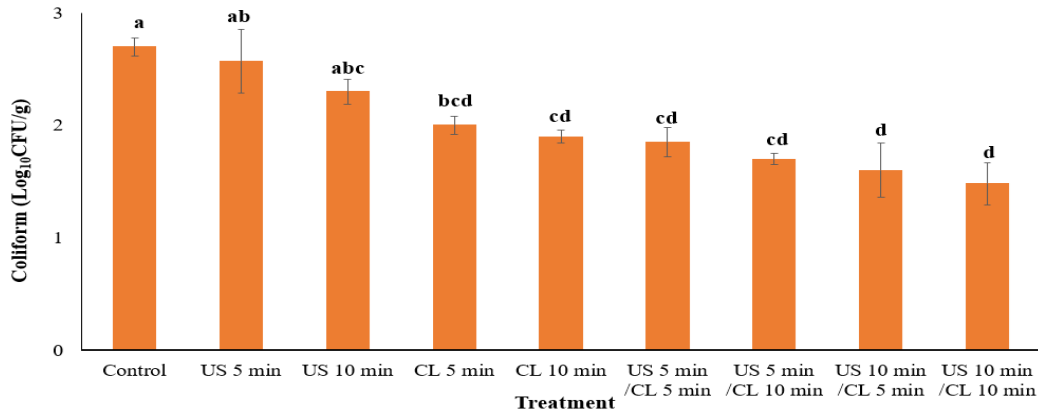
US: ultrasound, CL: chlorine (100 ppm Cl₂).

Means with different letters (a-d) differ significantly ($p < 0.05$) by Duncan's multiple-range test at the 5% level of probability.

감소되는 경향을 보이고 있다. Seymour et al.(2002)의 연구에서는 염소수와 초음파를 병용 처리 했을 때 염소수 단독처리보다 약 1 log CFU/g 시너지효과가 있었다고 보고하였다. 또한 Chung et al.(2015)의 연구에 의하면 조미오징어에서 강산성차아염소산수 및 초음파를 병용처리했을 때 일반세균수의 경우 2.69 log CFU/g 감소되는 경향을 보여 본 연구와 유사한 결과를 나타내었다. Solberg et al.(1990)은 미생물적 안전 기준으로 일반세균수를 6 log CFU/g 이하로 규정하고 있다. 식품에 7-8 log CFU/g 정도의 일반세균이 오염되어 있는 식품을 섭취시 다른 식품과의 복합적인 작용 또는 면역이 약한 기저 질환자 등의 사람에게 작용하여 병원균이 없는 세균일지라도 식중독을 일으킬 가능성이 있다 (Park et al., 2005).

대장균군은 일반세균의 저감화 경향과 다소 유사하나 전반적으로 초음파와 염소처리의 대장균군 저감화 효과는 다소 떨어진다([Fig. 2]). 초음파 5분, 초음파 10분, 염소 5분 및 염소 10분 처

리 시 평균 대장균군수는 각각 2.57(0.13 log 감소), 2.30(0.40 log 감소), 2.10(0.70 log 감소) 및 0.80(2.43 log 감소) log CFU/g 이었다. 이런 미미한 효과와는 다르게 초음파 10분/염소 5분 및 초음파 10분/염소 10분 처리시 대장균군 수는 각각 1.60(1.10 log 감소) 과 1.40(1.22log 감소) log CFU/g를 보여 전체 처리 중 이두가지 병용처리만이 대장균군수의 1-2 log CFU/g 감소효과를 보였다. Kwon, (2018)의 연구에 의하면 마른김에 존재하는 대장균 및 황색포도상구균의 경우 초음파(40 kHz)와 염소 200 ppm농도에서 병용 처리시 각각 0.5~1 log CFU/g 저감화되어 대장균의 변화는 거의 없는 것으로 나타났다. 대장균군의 검출은 식품의 *Shigella* spp., *Salmonella* spp. 등과 같은 병원성 세균의 존재 가능성을 보여주기 때문에 식품의 위생학적 면에서 중요한 위생지표세균이다. 특히 대장균군 검출시 장병원성 대장균 (*Enteropathogenic Escherichia coli*)이 포함되어 있을 가능성을 배제할 수 없기 때문에 대장균군의 위생적 처리는 반드시 필요하다.



[Fig. 2] Populations of coliforms in Korean freshwater snail (*Semisulcospira libertine*) after single and combined treatment of US and CL.

US: ultrasound, CL: chlorine (100 ppm Cl₂).

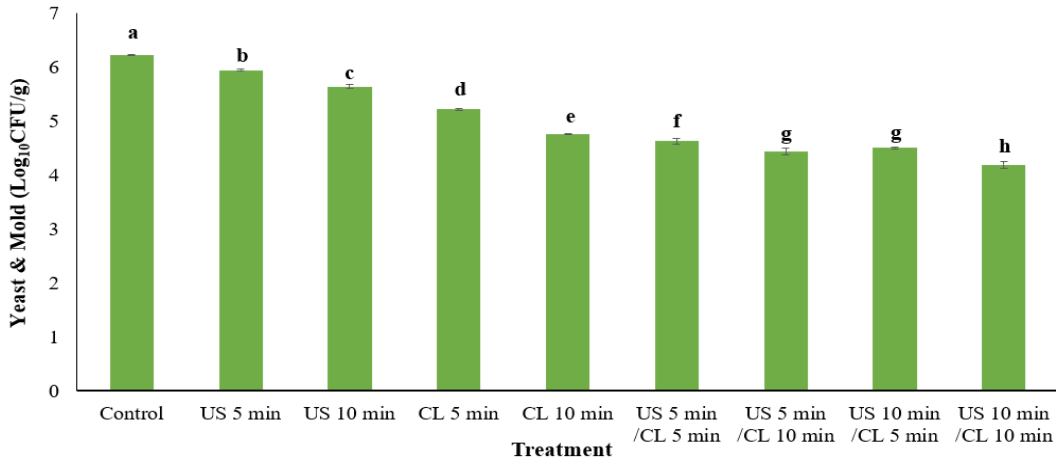
Means with different letters (a-d) differ significantly ($p < 0.05$) by Duncan's multiple-range test at the 5% level of probability.

2. 초음파와 염소처리의 병용처리에 의한 다슬기 중 진균류의 저감화 효과

진균류(효모, 곰팡이) 역시 초음파와 염소 단일 처리에 비해 초음파와 염소 병용처리시 유의적으로 더 많이 감소하였다($p < 0.05$) (Fig. 3). 전체 병용처리 중 초음파 10분/염소 10분 처리시 진균류 수의 평균은 4.19 log CFU/g로 최대 2.03 log 감소를 보였다. 이는 초음파 5분/염소 10분(1.59 log 감소), 초음파 10분/염소 5분(1.72 log 감소) 및 초음파 10분/염소 5분(1.78 log 감소) 처리시 보다 유의적으로 높은 진균류 저감화 효과를 보인 것이다. 보존성의 문제와 독소에 의한 피해를 발생시킬 수 있는 위생학적으로 주목하는 또 하나의 미생물은 진균류이다. 다슬기 등의 민물 패류의 진균류 오염은 물에 존재하는 곰팡이와 관련되어 있는 것으로 사료된다. 물에서는 *Saprolegnia*, *Achlya*, *Aphanomyces*, *Calyptratheca*, *Thraustotheca*, *Leptolegnia*, *Pythiopsis* 및 *Leptomitogener*속 등 8종의 곰팡이 속이 흔히 관찰되고 있으며, 이들은 물 뿐만 아니라 토양 중의 식물체 또는 동물체에 부생성을 나타내고 있으며, 이러한 8종을 흔히 물곰팡이(water mold) 라고 지칭되고 있다(Yanong,

2003). 이 중 *Saprolegnia* spp., *Achlya* spp., 및 *Aphanomyces* spp. 이 세 가지 속이 다슬기를 포함한 담수 패류에서 발견되는 물곰팡이병 원인 진균이다. 특히 *S. prasitica*는 독성이 강하여 'Winter kill'의 원인체이며 50% 이상의 폐사를 유발하기도 한다(Bruno and Wood, 1999; Lee et al, 1994).

이러한 초음파와 염소 병용처리의 항미생물 기작은 초음파에 의한 캐비테이션이 다슬기 근육과 껍데기에 있는 미생물들을 떼어내는 동시에 표면이나 상처가 난 조직에 차아염소산나트륨 용액을 좀더 용이하게 침투시킴으로써 나타난다고 할 수 있다. 염소는 가수분해($\text{Chlorine} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HOCl} + \text{NaOH}$)를 통해 강력한 살균제인 차아염소산(HOCl)으로 전환된다. HOCl 은 약산이며 용액 pH에 따라 차아염소산 이온($-\text{OCl}$)과 양성자(H^+)로 해리된다 (Fukuzaki, 2006). 차아염소산은 가장 활성이 높은 염소화합물로 포도당 대사에 필수적인 세포질 효소의 설프하이드릴기(sulfhydryl group)의 염소매개 산화를 통해 포도당 산화를 억제하여 미생물 세포를 사멸시키는 역할을 한다(Fukuzaki, 2006).



[Fig. 3] Populations of yeast and mold in Korean freshwater snail (*Semisulcospira libertine*) after single and combined treatment of US and CL.

US: ultrasound, CL: chlorine (100 ppm Cl₂).

Means with different letters (a-h) differ significantly ($p < 0.05$) by Duncan's multiple-range test at the 5% level of probability.

IV. 결론

본 연구는 민물 다슬기에 대한 식품원료학적 안전성 확보를 위하여 대표적 화학적 살균제인 염소와 물리적 처리인 초음파의 병용처리가 위생 지표미생물인 일반세균, 대장균군 및 진균류의 저감화 효과를 조사하였다. 최종적으로 미생물 저감화를 위한 염소 및 초음파 병용처리 효과를 비교해 본 결과, 염소 10분/초음파 10분 처리시 일반세균수, 대장균군, 진균은 각각 최대 2.43, 1.22 및 2.03 log CFU/g 저감화 되었으며, 이는 단독처리보다 더 높은 살균 효과를 나타내었다. 하지만 원료가 아닌 완제품에 대한 염소 및 초음파 기술을 적용하기 위해서는 다양한 염소농도, 진동수, 강도 및 처리시간에 따른 품질특성 연구가 추가적으로 수행되어야 할 것으로 판단된다.

References

Bruno DW and Wood BP(1999). Saprolegnia and other oomycetes. pp. 599-659. In: Fish Diseases

and Disorders. Wood, P. T. K., Bruno, D. W. (eds). Wallingford, UK.

Chang TE, Han JS, Song OJ, Chung DH and Shin IS(2004). Study on reducing methods of natural food-borne pathogenic microorganisms originated from Saengshik. Korean J Food Cook Sci, 36, 1020~1025.

Choi MS, Jun EB, Choi S, Bang H-J and Park SY(2018). Investigation of Microbial Contamination in *Semisulcospira libertine* and Evaluation of Its Reduction Effects by Sediment Removal Treatment. J. Food Hyg. Saf. 34, 361~366.

<https://doi.org/10.13103/JFHS.2019.34.4.361>

Chung WH, Ko J-S, Shin, I-S(2015). Study on Reduction of Microbial Contamination on Daruma by Combination Treatment of Strong Acidic Hypochlorous Water and Ultrasonic Waves. Journal of Food Hygiene and Safety, 30, 166~172. <https://db.koreascholar.com/Article/Detail/346119>

Fukuzaki S(2006). Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection process. Biocontrol Sci, 11, 147~157.

<https://doi.org/10.4265/bio.11.147>

Fukuzaki S(2006). Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes. Biocontrol Science, 11, 147~157.

- <https://doi.org/10.4265/bio.11.147>
- Koivunen J and Heinonen-Tanski H(2005). Inactivation of enteric microorganisms with chemical disinfectants, UV radiation and combined chemical/UV treatments. *Water Research*, 39, 1519~1526.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.01.021>
- Kwon KO(2018). Microbial Zazard Analysis and Microbial Changes in Processing of Dried-Laver Manufacturing Facilities; Department of Food Science and Technology, Graduate School, Pukyong National University: Busan, Korea.
- Lee JD, Jung YK and Joo WH(1994): Mycological research. Sejong Book Publishing Company, Seoul, Korea pp. 107~144.
- Lomander A, Schreuders P, Russek-Cohen E and Ali L(2004). Evaluation of chlorines' impact on biofilms on scratched stainless steel surfaces. *Bioresour. Technol*, 94, 275~283.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.01.004>.
- Ministry of Food and Drug Safety (MFDS). www.foodsafetykorea.go.kr. on Dec 14. 2023
- Park SY, Choi JW, Yeon JH, Lee MJ, Oh DH, Hong CH, Park GJ, Woo GJ, Park JS and Ha SD(2005). Assessment of Contamination Level of Foodborne Pathogens in the Main Ingredients of Kimbab during the Preparing Process. *Korean J. Food Sci. Technol*, 37, 122~128.
- Park YM, Lim JW, Lee JE and Seo EW(2015). Protective effect of *Semisulcospira libertine* extract on induced Hepatitis in rats. *J. Life Sci*, 25, 539~547.
<https://doi.org/10.5352/JLS.2015.25.5.539>
- Piyasena P, Mohareb E and McKellar RC(2003). Inactivation of microbes using ultrasound: a review. *Int. J. Food Microbiol*, 87, 207~216.
[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00075-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00075-8)
- Sagong HG, Lee SY, Chang PS, Heu S, Ryu S, Choi YJ and Kang DH(2011). Combined effect of ultrasound and organic acids to reduce *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* on organic fresh lettuce. *Int. J. Food Microbiol*, 145, 287~292.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.010>
- Seymour IJ, Burfoot D, Smith RL, Cox LA and Lockwood A(2002). Ultrasound decontamination of minimally processed fruits and vegetables. *Int. J. Food Sci. Technol*, 37, 547~557.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2002.00613.x>
- Solberg M., Buckalew JJ, Chen CC, Schaffner DW, O'Neil K, McDowell J, Post LS and Boderck M(1990). Microbiological safety assurance system for foodservice facilities. *Food Technol.*, 44, 68~73.
- Song KC, Mok JS, Kang CS and Chang DS(2001). Sand elimination in short necked clam, *Ruditapes philippinarum*, harvested from western coast of Korea. *Korean J. Fish. Aquat. Sci*, 34, 179~183.
- Yanong RPE(2003). Fungal diseases of fish. *Vet. Clin. North. Am. Exot. Anim. Pract*, 6, 377~400.
-
- Received : 21 December, 2023
 - Revised : 05 February, 2024
 - Accepted : 08 February, 2024