

## 전자선 조사에 의한 동결육에 오염된 *Escherichia coli* O157:H7의 제거

권오진 · 양재승 · 임성일\* · 변명우  
한국원자력연구소 방사선식품공학연구소,  
\*한국식품개발연구원 생물공학연구부

### Elimination of *Escherichia coli* O157:H7 Contaminated in Frozen Beef by Electron Beam Irradiation

Oh-Jin Kwon, Jae-Seung Yang, Seong-Il Lim\* and Myung-Woo Byun  
Department of Food Irradiation, Korea Atomic Energy Research Institute  
\*Food Biotechnology Division, Korea Food Research Institute

#### Abstract

Treatment with electron beam irradiation was investigated for the elimination of *Escherichia coli* O157:H7 which has been linked to outbreaks of foodborne illness on undercooked and raw meat. Before treatment, the maximum populations were observed at 16 hr when *E. coli* O157:H7 was incubated in TSB at 37°C. Incubation at 4°C did not influence survival and growth of the strain. The numbers of *E. coli* O157:H7 were present about 10<sup>7</sup> CFU/mL in the log (6 hr at 37°C) and stationary phase (16 hr at 37°C) of cells, respectively. Freezing (24 hr at -18°C) had a more marked lethal effect. The D<sub>10</sub> value at -18°C of *E. coli* O157:H7 contaminated in frozen beef was 0.45 kGy, and inactivation factor were 6.67~11.11 at the radiation doses of 3~5 kGy. Therefore, electron beam irradiation was an effective method to eliminate of *E. coli* O157:H7.

Key words: *E. coli* O157:H7, electron beam irradiation, D<sub>10</sub> value, frozen beef

## 서 론

*Escherichia coli* O157:H7 균주는 1982년 미국 북서부의 한 햄버거 레스토랑에서 검출된 이래로 북미대륙에서 매년 1~2만명 정도의 환자가 발생하며 남미와 유럽, 남아프리카, 오스트레일리아, 일본 등에서 꾸준히 발병사례가 일어나 이에 대한 집중적인 연구가 수행되어 왔다<sup>(1,4)</sup>. 특히 일본의 경우, 90년 268명의 환자가 발생했으며 96년 5월 25일에 오카야마(岡山)현 오쿠마치(邑久町)에서 시작된 식중독은 현재까지 1만여명의 환자와 10여명의 사망자를 내어 세계 최대의 식중독 사건으로 기록되고 있다<sup>(5)</sup>. 우리나라에선 지난 94년 경남 고성군에서 6명의 식중독 환자가 발생, 그 중 1명에게서 *E. coli* O157:H7 균주가 발견되었을 뿐, 집단발병한 사례는 없다. 보통의 대장균이 일으키는 식중독은 대개 2~3일만에 자연적으로 낫지만 *E. coli* O157:H7 균주가 일으키는 식중독은 2~7일의 잠복기간을 거쳐 심

한 복통설사와 내출혈을 일으키며 심할 경우 사망에 이르게 할 수도 있다<sup>(6,8)</sup>. 이는 *E. coli* O157:H7 균주가 그것이 대장내에서 증식하는 과정에서 vero라는 독성 단백질 합성물질이 대장의 실핏줄을 파괴해 혈변증상(血便症狀)이 나타나며 핏속으로 들어가 적혈구를 파괴함에 따라 신장기능을 마비시키는 용혈성요독증(溶血性尿毒症)을 유발하기 때문으로 알려져 있다<sup>(9,10)</sup>. 또한 *E. coli* O157:H7 균주는 주로 덜 익힌 고기나 우유 등을 통해 주로 사람에게 감염되며 또한 감염력도 일반균에 비해 훨씬 강해 *Salmonella* 균주의 1/10 이하(10~100 마리)만 있어도 발병하고 저온에서도 생존이 가능하여 예방이 어려우나 70°C 내외의 열처리로서 사멸된다<sup>(11-13)</sup>. 한편 이온화 방사선은 감마선, X선 그리고 전자선이 있으며 식품내에서의 화학적 반응에 대한 효과는 감마선과 전자선간의 차이는 거의 없는 것으로 보고된다<sup>(14,15)</sup>. 현재 대부분의 국가는 원료식품, 특히 동물성 식품에서 기인된 질병, 즉 병원성 미생물, 기생충 등의 오염이 인류건강에 가장 큰 위협을 가져오고 이로 인해 경제적 생산성이 크게 저하되고 있으며 선진국에서 이러한 문제점 해결을 위해 방사선 조사 연구

Corresponding author: Oh-Jin Kwon, Department of Food Irradiation, Korea Atomic Energy Research Institute, Yusing P.O. Box 105, Taejeon 305-353, Korea

가 수행되고 있다. 특히 가금이나 진공포장된 fresh beef cuts, ground beef 중에 오염된 *Salmonellae*, *Campylobacter jejuni*, *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* 등의 병원성 세균들에 효과적이다<sup>(16-18)</sup>.

이에 본 연구에서는 병원성 대장균인 O157:H7 균주에 의한 식중독을 미연에 예방하고자 우육에 본 균주를 오염, 동결시켜 전자선에 의한 살균효과를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 공시균주

본 실험에 사용한 균주는 Iowa State University (Iowa Pork Industry Center, USA)에서 분양받은 *E. coli* O157:H7 (ATCC 43894)를 사용하였다.

### 시험용 동결육의 살균

우육은 일반정육점에서 구입한 후 5 mm의 두께로 절단하여 동결, 진공포장한 후 전자선 조사시설(10 MeV)로 10 kGy의 선량을 조사하여 살균하였다.

### 배양시간별 균체증식과 pH 변화

공시균주를 tryptic soy agar (TSA, Difco Laboratories, Detroit, Mich.) 사면배지에 24시간 수회 계대배양 후 이것을 동일한 액체배지(TSB, Difco) 100 mL에 1백균이를 접종, 37°C에서 24시간 진탕배양(150 rpm)하여 활성화하였다. 활성화된 배양액 1 mL를 새로운 액체배지 100 mL에 접종하여 4°C와 37°C에서 각각 진탕하면서 배양시간별로 1 mL를 무균적으로 채취하여 Butterfield's phosphate buffer (0.1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , adjusted to pH 7.1 with NaOH, 이하 buffer)로 적절히 희석하고 TSA 평판배지에 0.1 mL를 도말하여 생성된 colony의 수로 균체증식을 조사하였고 배양액의 pH 변화도 관찰하였다.

### API kit에서의 균주의 특성

공시균주는 API 20 E (API Systems S.A., La Balme Les Grottes, France)로 그 생리적 특성을 조사하였다. 즉, TSA 배지에서 분리된 집락 하나를 따서 5 mL의

suspension medium (demineralized water)에 현탁시킨 다음 API 20 E kit의 각 ample에 50  $\mu\text{L}$ 를 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후 각각의 시약을 첨가하여 반응성을 조사하였다.

### 균주의 저온내성

공시균주의 저온내성은 활성화된 균 배양액 1 mL를 TSB 100 mL에 접종, 배양하여 대수기와 정지기의 균 배양액 1 mL를 동일배지 99 mL에 각각 첨가하여 잘 혼합한 후 멸균된 screw tube (16.5×65 mm)에 2 mL씩 분주하여 0~2°C의 온도에서 하룻밤 방치한 다음 0°C (chilled)와 -18°C (frozen)에서 각각 24시간 배양하여 생존 colony로 조사하였다. 이때 대조균은 25°C에서 5분간 처리한 것으로 하였고 -18°C 처리 후 동결된 균 배양액은 25±0.1°C에서 30분간 해동시킨 다음 실험하였으며, 각 실험의 결과는 2회 반복한 평균값으로 나타내었다.

### 전자선 조사의 효과

살균된 우육 1 g 당 균 현탁액(약  $10^8$  CFU/mL) 10 mL를 멸균된 bag (10×10 cm)에 넣고 Stomacher 400 Laboratory Blender로 90초간 혼합시킨 후 포장하여 동결하고 -18°C에서 전자선을 조사하였다. 전자선 조사는 10 MeV (2.1 kW)의 ISU linear accelerator를 이용하여 0.25~2.5 kGy의 선량을 얻도록 하였으며 Table 1은 조사시 실제 얻어진 흡수선량을 나타낸 것이다. 전자선 조사 후 동결된 우육은 2배량의 buffer를 첨가하여 Stomacher에서 1.5분간 처리 후 적절히 희석하여 TSA 배지가 들어 있는 petri dish에 0.2 mL 씩 접종, spreader로 도말하고 37°C에서 24시간 배양한 후 생성된 집락을 계수하였다.

## 결과 및 고찰

### 배양시간별 균체증식과 pH 변화

*E. coli* O157:H7 균주의 배양온도 및 시간별 증식양상은 Fig. 1 과 같다. 4°C에서는 mL당 균수가 전배양 기간에 걸쳐 약  $10^6$  정도로 나타났으며 48시간 배양까지 균수의 큰 변화는 관찰할 수 없었다. 37°C에서는

**Table 1. Desired and actual electron irradiation doses for frozen beef slices inoculated with *Escherichia coli* O157:H7**

| Absorbance dose range | Actual dose after application of desired dose (kGy) |       |       |       |       |       |
|-----------------------|---|-------|-------|-------|-------|-------|
|                       | 0.25  | 0.5   | 1.0   | 1.5   | 2.0   | 2.5   |
| Low level             | 0.241   | 0.447 | 0.999 | 1.559 | 2.017 | 2.596 |
| High level            | 0.251   | 0.516 | 1.088 | 1.597 | 2.205 | 2.634 |

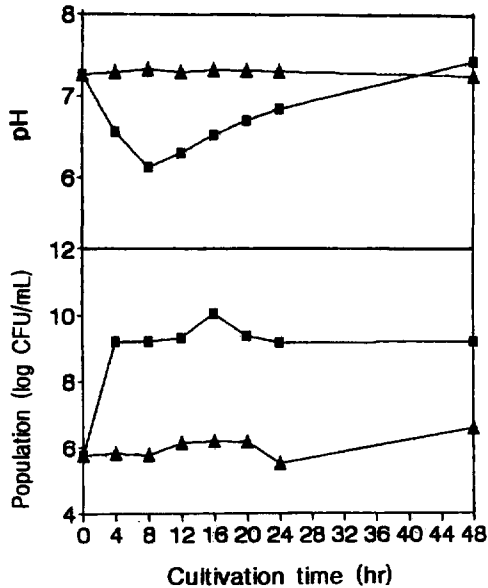


Fig. 1. pH and cell growth of *Escherichia coli* O157:H7 according to cultivation time at 4°C (▲—▲) and 37°C (■—■).

배양 4시간 이후부터 균수가 약  $10^9$  CFU/mL 정도로 급격히 증가하여 전배양기간에 걸쳐 그 균수를 계속 유지하였으며 배양온도에 관계없이 16시간째에 최대 균수를 나타내었다. 본 결과로서 *E. coli* O157:H7 균주의 대수기는 6시간, 정지기는 16시간으로 하여 다음 실험부터 이를 적용하였다. Abdul-Raouf 등<sup>(2)</sup>은 ground, roasted beef를 5°C에서 72시간 배양하여 *E. coli* O157:H7 균주의 분포를 조사한 결과, 전배양기간 동안 약  $10^5$  CFU/mL 내외로 변화가 없었음을 보고하였다. pH의 변화는 4°C에서는 전배양기간 동안 7.2 내외를 유지하였고 37°C에서는 배양 8시간째에 6.12로 떨어졌으나 그 후 pH가 상승하여 배양 48시간째는 접종전의 pH 보다 약간 높은 7.4로 나타났다.

#### API kit에서의 균주의 특성

API 20 E kit를 사용하여 *E. coli* O157:H7 균주의 특성을 조사한 결과는 Table 2와 같다. *E. coli* O157:H7 균주는 gram 음성, 통기성 간균으로 반유동 고층배지에서 운동성이 있었으며 catalase, indol 및 ONPG 반응이 양성이었고 gelatin 액화력과 H<sub>2</sub>S 생성능력이 없었다. 또한 Voges-Proskauer 반응은 음성이었으며 urea를 가수분해하지 못하였고 inositol, sorbitol, amygdalin을 제외한 모든 당을 분해하는 등 api 20 E analytical profile index로 비교한 결과, 전형적인 *E. coli*의 특성이 나타났다.

Table 2. Characteristics of *Escherichia coli* O157:H7

| Characteristics             | O157:H7 | Characteristics                  | O157:H7 |
|-----------------------------|---------|----------------------------------|---------|
| Shape                       | Rod     | Gelatinase                       | -       |
| Gram stain                  | -       | Glucose                          | +       |
| Catalase                    | +       | Mannitol                         | +       |
| Motility                    | +       | Inositol                         | -       |
| MacConkey                   | +       | Sorbitol                         | -       |
| ONPG <sup>1)</sup>          | +       | Rhamnose                         | (+)     |
| Arginine dihydrolase        | -       | Sucrose                          | (+)     |
| Lysine decarboxylase        | +       | Melibiose                        | +       |
| Ornithine decarboxylase     | +       | Amygdalin                        | -       |
| Citrate utilization         | -       | Arabinose                        | +       |
| H <sub>2</sub> S production | -       | Cytochrome-oxidase               | -       |
| Urease                      | -       | NO <sub>3</sub> -NO <sub>2</sub> | +       |
| Tryptophane desaminase      | -       | NO <sub>3</sub> -N <sub>2</sub>  | -       |
| Indole production           | +       | API of Oxidation                 | +       |
| Voges-proskauer             | -       | Fermentation                     | +       |

<sup>1)</sup>Ortho-nitro-phenyl-galactosidase.

#### 균주의 저온내성

*E. coli* O157:H7 균주의 0°C (chilled)와 -18°C (frozen)에서의 저온내성을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 대수기나 정지기 모두 저온처리 후 약  $10^7$  CFU/mL의 균수를 나타내었고 log phase 보다 stationary phase에서의 감수성 차이는 거의 없었으며 chilled 보다 frozen 온도에서 균주의 사멸율이 높게 나타났다. 이러한 결과는 chilled 온도에서는 세포막이 약간의 화학적 변화에 의해 손상을 받았지만 37°C에서 재배양될 때 쉽게 원상회복할 수 있었고 frozen 온도에서는 세포내·외에 빙결정 생성에 의해 물리적 손상이 일어나 균주를 좀 더 저해시켰음을 추측할 수 있었다<sup>(19,20)</sup>. 그러나 상기의 결과로서 *E. coli* O157:H7 균주는 저온에서 상당한 내성이 있음이 확인되었으며 이는 실제 우육을 cold system에서 유통시에도 본 균주의 오염으로 인한 식중독을 피할 수가 없어 보다 근본적인 문제해결이 절실하다 하겠다. Smith<sup>(21)</sup>는 *E. coli*와 *Salmonella* 균주로 chilled에서 보다 frozen 온도에서 약 3배의 내외의

Table 3. Decrease of *Escherichia coli* O157:H7 chilled or frozen in duplicate in either the early log or the stationary phase of growth in tryptic soy agar plates<sup>1)</sup>

| Growth phase | Treatment | CFU/mL                                 |
|--------------|-----------|--|
| Log          | —         | $2.1 \times 10^7$                      |
|              | Chilled   | $2.0 \times 10^7$ (4.76) <sup>2)</sup> |
|              | Frozen    | $1.2 \times 10^7$ (42.86)              |
| Stationary   | —         | $1.2 \times 10^7$                      |
|              | Chilled   | $1.0 \times 10^7$ (16.67)              |
|              | Frozen    | $0.8 \times 10^7$ (33.33)              |

<sup>1)</sup>All values are averages of duplicate trials.

<sup>2)</sup>Death rate (%).

균수감소를 보고하였다.

#### 전자선 조사의 효과

*E. coli* O157:H7 균주를 살균된 우유에 오염, 동결시켜 전자선에 대한 감수성을 조사하였다. Fig. 2의 전자선 조사에 의한 생존곡선과 이들 생존 곡선으로부터  $D_{10}$  값, 12  $D_{10}$  값과 불활성화 계수( $n$ )를 계산한 결과는 Table 4와 같다. *E. coli* O157:H7 균주의  $D_{10}$  값과 12  $D_{10}$  값은 0.45와 5.4 kGy로 각각 나타났으며 불활성화 계수는 3~5 kGy 조사로서 6.67~11.11 log cycle을 감소시킬 수 있는 것으로 나타났다. 한편 권과 변<sup>(22)</sup>은 실온에서 균 현탁액의 상태로 조사하였을 때 *E. coli* (ATCC 25922)의  $D_{10}$  값이 0.14 kGy로, Thayer와 Boyd<sup>(16,23)</sup>는 0°C에서 우유에 오염시킨 *E. coli* O157:H7 (ATCC 43895)의  $D_{10}$  값이 0.27 kGy, *Campylobacter jejuni*가 0.16 kGy, *Aeromonas hydrophila*가 0.14~0.19 kGy로 각각 보고한 것과 비교해 보면 본 실험의 공시 균주인 *E. coli* O157:H7 균주가 방사선에 대한 저항성이 높았고 또한, 실온이나 0°C 보다 -18°C로 동결된 우유에서 더 높았다. 이러한 결과는 100 eV 당 물에서 해리된( $e_{aq}$ )와 ( $OH^{\cdot}$ )의 분자수로 본 G 값이 meat system에서 실온은 2.8 ( $e_{aq}$ ), 2.7 ( $OH^{\cdot}$ ), -5°C에서는 0.3 ( $e_{aq}$ ), 1.0 ( $OH^{\cdot}$ )으로 보고<sup>(23)</sup>한 것과 비교해 볼 때도 냉동상태에서는 OH radical의 이동이 엄격히 방해되므로 free radical의 수가 실온보다 감소되어 동결조사시 미생물 세포의 손상에 미치는 영향이 낮았기 때문으로 생각된다. 이와 같은 관점에서 국제적으로 공인된 식품조사 안전허용선량인 10 kGy 보다 낮은 3.0 kGy

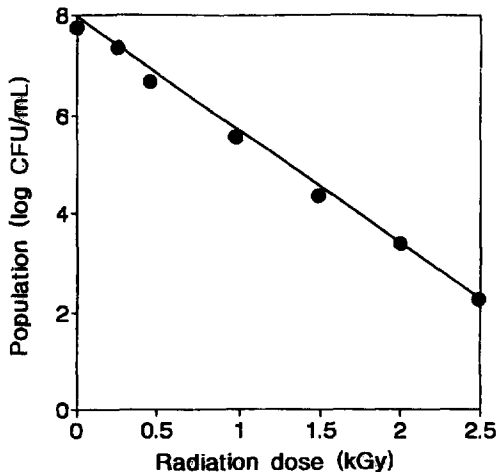


Fig. 2. Irradiation inactivation curve for *Escherichia coli* O157:H7 inoculated in frozen beef.

Table 4. Radiation sensitivity of the *Escherichia coli* O157:H7

| Pathogen               | $D_{10}$ value (kGy) | 12 $D_{10}$ value (kGy) | Inactivation factor |       |
|------------------------|----------------------|-------------------------|---------------------|-------|
|                        |                      |                         | 3 kGy               | 5 kGy |
| <i>E. coli</i> O157:H7 | 0.45                 | 5.4                     | 5.4                 | 6.67  |

이하의 저선량으로 실제 동결된 우유에 오염된 *E. coli* O157:H7 균주를 안전하게 살균할 수 있는 전자선의 조사가 매우 바람직한 것으로 나타났다.

#### 요 약

본 연구는 병원성 *Escherichia coli* O157:H7 균주에 의한 식중독을 미연에 예방하고자 우유에 본 균주를 오염, 동결시켜 전자선에 의한 살균효과를 조사하였다. 37°C에서는 배양 16시간째에 최대균수를 나타내었고 4°C에서는 균주의 증식이 거의 없었다. *E. coli* O157:H7 균주는 대수기나 정지기 모두가 0°C (chilled)와 -18°C (frozen)에서 배양시 약  $10^7$  CFU/mL의 균수를 나타내었고 -18°C에서는 20°C 보다 균주의 사멸율이 높았다. 동결우유에 오염된 *E. coli* O157:H7 균주의 방사선 감수성은  $D_{10}$  값이 0.45 kGy, 불활성화계수가 3~5 kGy에서 6.67~11.11로 각각 나타났다. 본 결과로서 전자선 조사는 동결우유에 오염된 *E. coli* O157:H7 균주의 제거방법으로 매우 효과가 있었다.

#### 문 헌

1. Abdul-Raouf, U.M., Beuchat, L.R. and Ammar, M.S.: Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 on salad vegetables, *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 1999 (1993)
2. Abdul-Raouf, U.M., Beuchat, L.R. and Ammar, M.S.: Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ground, roasted beef as affected by pH, acidulants, and temperature, *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 2364 (1993)
3. Wells, J.G., Davis, B.R., Wachsmuth, I.K., Riley, L.W., Remis, R.S., Sokow, R. and Morris, G.K.: Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype, *J. Clin. Microbiol.*, **18**, 289 (1993)
4. Doyle, M.P.: *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods, *Int. J. Food Microbiol.*, **12**, 289 (1991)
5. 編集部: 病原大腸菌O157とその検査方法, *食品と開発*, **31**, 30 (1996)
6. Kim, M.S. and Doyle, M.P.: Dipstick immunoassay to detect enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in retail ground beef, *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 1764 (1992)

7. Padhye, N.V. and Doyle, M.P.: Rapid procedure for detecting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in food, *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 2693 (1991)
8. Pudden, D., Tuttle, N., Korn, D., Carlson, J., Carter, A. and Hockin, J.: Hemorrhagic colitis in a nursing home-Ontario, *Can. Dis. Weekly Rep.*, **11**, 169 (1985)
9. Thompson, J.S., Hodge, D.S. and Borczyk, A.A.: Rapid biochemical test to identify verotoxin-positive strains of *Escherichia coli* serotype O157, *J. Clin. Microbiol.*, **28**, 2165 (1990)
10. Weeratna, R.D. and Doyle, M.P.: Detection and production of verotoxin 1 of *Escherichia coli* O157:H7 in food, *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 2951 (1991)
11. Tsai, S.H. and Chou, C.C.: Injury, inhibition and inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 by potassium sorbate and sodium nitrite as affected by pH and temperature, *J. Sci. Food Agric.*, **71**, 10 (1996)
12. Ahmed, N.M., Conner, D.E. and Huffman, D.L.: Heat-resistance *Escherichia coli* O157:H7 in meat and poultry as affected by product composition, *J. Food Sci.*, **60**, 606 (1995)
13. Doyle, M.P., and Schoeni, J.L.: Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry, *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 2394 (1987)
14. Thayer, D.W., Boyd, G. and Huhtanen, C.N.: Effects of ionizing radiation and anaerobic refrigerated storage on indigenous microflora, *Salmonella*, and *Clostridium botulinum* types A and B in vacuum-canned, mechanically deboned chicken meat, *J. Food Prot.*, **58**, 752 (1995)
15. Fujikawa, H., Ushioda, H. and Kudo, Y.: Kinetics of *Escherichia coli* destruction by microwave irradiation, *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 920 (1992)
16. Thayer, D.W.: Use of irradiation to kill enteric pathogens on meat and poultry, *J. Food Safety*, **15**, 181 (1995)
17. Thayer, D.W., Boyd, G., Fox, J.B., Jr., Lakritz, L. and Hampson, J.W.: Variations in radiation sensitivity of foodborne pathogens associated with the suspending meat, *J. Food Sci.*, **60**, 63 (1995)
18. Norberg, P.: Enteropathogenic bacteria in frozen chicken, *Appl. Environ. Microbiol.*, **42**, 32 (1981)
19. Ingram, M. and Mackay, B.M.: Inactivation by cold. In Inhibition and Inactivation of Vegetative Microbes, F.A. Skinner and W. B. Hugo(Ed.), Academic Press, London, p.111 (1976)
20. MacLeod, R.A. and Calcott, P.H.: Cold shock and freezing damage to microbes. In the Survival of Vegetative Microbes, T.R.G. Gray and J. R. Postgate (Ed.), Cambridge University Press, p.81 (1976)
21. Smith, M.G.: Survival of *E. coli* and *Salmonella* after chilling and freezing in liquid media, *J. Food Sci.*, **60**, 509 (1995)
22. 권오진, 변명우 : 식품위생관계 미생물에 대한 가열처리와 감마선조사의 병용효과, 한국식품영양과학회지, **25**, 804 (1996)
23. Thayer, D.W. and Boyd, G.: Elimination of *Escherichia coli* O157:H7 in meats by gamma irradiation, *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 1030 (1993)

---

(1997년 5월 9일 접수)