

Escherichia coli O157:H7의 살균을 위한 감마선과 가열처리의 효과

권오진 · 육홍선* · 김성애* · 변명우

한국원자력연구소 방사선식품공학연구소, *충남대학교 식품영양학과

Effects of Gamma-Ray and Heat Treatment on Sterilization of *Escherichia coli* O157:H7

Oh-Jin Kwon, Hong-Sun Yook*, Seong-Ai Kim* and Myung-Woo Byun

Department of Food Irradiation, Korea Atomic Energy Research Institute

*Department of Food and Nutrition, Chungnam National University

Abstract

Treatments of irradiation alone and/or in combination with heat were investigated for the sterilization of *Escherichia coli* O157: H7. D values of the strain were 129.2 min at 50°C, 27.1 min at 55°C, and 2.4 min at 60°C. The survival effect of *E. coli* O157:H7 during heating at various media was investigated. On heating at temperature of 60°C for 10 min, the strain was generally more resistant in the media containing such chemical substrates such as 0.03 M cysteine, 1% sodium citrate or 5% sucrose, whereas this strain was appeared weaker in the chemical substrates added group such as 1% meat extract, 1% casein or 1% casamino acid. In the case of irradiation alone, D₁₀ value of *E. coli* O157:H7 was 0.116 kGy, and inactivation factors were 17~25 at doses of 2 to 3 kGy. Pre- and post-irradiation heating showed the same D₁₀ value about 0.07 kGy. And inactivation factors were 25~41 at doses of 2 to 3 kGy. Therefore, combination treatment with heat and irradiation significantly increased in inactivation rate by increasing radiation sensitivity of *E. coli* O157:H7.

Key words: *E. coli* O157:H7, D₁₀ value, gamma irradiation, heat treatment

서 론

1996년 *Escherichia coli* O157:H7 라는 병원성 식중독균이 미국과 일본의 보건당국을 긴장시켰고 우리나라에서도 본 균주가 발견되었으나 집단발병한 사례는 보고되지 않고 있다⁽¹⁻⁶⁾. *E. coli* O157:H7 균주에 감염되면 혈변증상이나 복통, 설사 등을 유발시키며 유아나 노인의 경우, 용혈성요독증으로 악화되면 뇌장해로 사망하거나 신장이나 뇌에 휴유증이 남는다^(7,8). 또한 *E. coli* O157:H7 균주는 주로 동물의 대변에 오염된 물과 덜 익힌 고기나 우유 등을 통해 주로 사람에게 감염되며 치사율은 감염환자의 0.1% 내외로 알려져 있다⁽⁹⁻¹³⁾. 최근 식품의 오염, 특히 육류식품에서 기인된 이러한 병원성 미생물의 오염은 매우 심각한 공중보건 문제의 하나로 전세계적으로 인류건강에 위협을 주고 있어 이를 최소화하기 위한 조치는 식품산업에서 중요한 과제로 되어 있다. 이러한 관점에서 미생

물학적 안전성을 확보하기 위한 방사선 처리는 매우 효과적이다^(14,15). 그러나 방사선 처리에 의한 미생물의 살균은 여러인자, 즉 미생물의 종류, 온도, 공기의 조성, 식품의 성분 등에 따라 감수성이 다르므로 살균목적에 따라 방사선 조사선량을 조절하여야 한다. 실제 식품에서 모든 미생물의 완전 불활성화를 위해서는 다소 높은 선량의 방사선 조사가 요구되나 식품자체의 이화학적 및 기호성의 변화를 최소로 하기 위해서는 가급적 낮은 선량의 조사로서 살균 목적을 달성하기 위해 열 및 pH 등과 병용처리가 시도되고 있다^(16,17).

본 연구는 육류의 안전저장 및 유통기반을 확립하기 위한 기초실험으로서 장관 출혈성 *E. coli* O157:H7 균주의 살균효과를 감마선 조사 단독 및 가열과 병용 처리하여 살펴보고자 한다.

재료 및 방법

공시균주

실험에 사용한 균주는 Iowa State University (Iowa

Corresponding author: Myung-Woo Byun, Department of Food Irradiation, Korea Atomic Energy Research Institute, Yuseung P.O. Box 105, Taejeon 305-353, Korea

Pork Industry Center, USA)에서 분양받은 E. coli O157:H7 (ATCC 43894) 균주를 사용하였다.

균주의 배양과 현탁액의 조제

공시균주를 tryptic soy agar (TSA, Difco Laboratories, Detroit, Mich.)의 사면배지에 24시간 간격으로 수회 계대배양 후 이것을 tryptic soy broth (TSB, Difco) 100 mL에 1 백급이를 접종하여 37°C에서 24시간 진탕배양(150 rpm)한 다음 균 현탁액 1 mL를 다시 새로운 액체배지 100 mL에 접종하고 16시간 진탕배양시켜 정상기의 세포를 얻었다. 이 세포 현탁액을 4°C에서 10분간 원심분리(9,000×g)하여 얻은 균체를 냉 Butterfield's phosphate buffer (0.1 M KH₂PO₄를 조제 후 NaOH로 pH 7.1로 조정, 이하 buffer)로 2회 세척, 원심분리하여 최종 영양세포의 농도가 10⁷~10⁸ CFU/mL가 되도록 조절하였다.

가열처리 효과

가열처리는 공시균주의 균 현탁액 2.0 mL를 멸균된 screw tube (16.5×65 mm)에 넣고 50±0.2°C에서 0~180분(interval: 30분), 55±0.2°C에서 0~60분(interval: 10분), 60±0.2°C에서는 0~30분(interval: 5분) 및 60분간 가열처리한 후 살균된 냉 buffer로 적절히 희석하여 TSA 배지가 들어 있는 petri dish에 0.1 mL씩 접종하여 spreader로 도말하고 37°C에서 24시간 배양한 후 생성된 집락을 계수하였다.

화학기질이 열처리에 미치는 효과

Moats 등⁽¹⁰⁾의 방법에 준하여 10 mL의 시험관(Ø 16×80 mm)에 5.4 mL의 시험배지와 0.6 mL의 균 현탁액을 혼합하여 파라핀으로 완전히 밀봉하고 60°C의 수욕조에서 10분간 열처리하였다. 열처리한 접종관은 얼음물로 5°C까지 재빨리 냉각한 다음 살균된 냉 buffer로 적절히 희석하여 상기와 같은 방법으로 생성된 집락의 수로 그 효과를 조사하였다. 사용한 시험배지는 화학기질(Table 2)을 buffer에 완전히 용해시켜 0.1 N NaOH로 pH 7.0~7.2으로 조절한 후 0.2 µm milipore filter (Millex-GV)로 여과하여 사용하였다.

방사선 단독 및 가열과의 병용처리 효과

방사선 단독처리는 균 현탁액 2.0 mL를 멸균된 screw tube (Ø 16.5×65 mm)에 넣고 감마선을 조사한 후 균 현탁액을 살균된 냉 buffer로 희석하여 TSA 평판배지에서 생성된 집락을 계수하였다. 방사선과 가열과의 병용처리 효과는 균 현탁액 2.0 mL를 위와 동

일한 멸균된 screw tube에 넣고 감마선 조사 전·후에 60°C에서 10분간씩 가열처리한 다음 생성된 집락을 계수하였다. 방사선 조사는 선원 10만 Ci, ⁶⁰Co 감마선 조사시설을 이용하여 분당 71.5 Gy의 선량률로 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 및 3.0 kGy를 조사하였다. 미생물의 방사선 감수성은 생존곡선과 D₁₀ 값으로 나타내었으며, 불활성화계수(inactivation factor, n)는 n=D_R-I/D₁₀의 공식으로 유도되는데 여기서 D_R은 미생물의 치사선량(lethal dose), I는 유도선량(induction dose 또는 shoulder dose) 그리고 D₁₀ 값은 미생물을 90% 사멸시키는 데 필요한 방사선 조사선량이다.

결과 및 고찰

가열처리의 효과

Fig. 1은 E. coli O157:H7 균주를 50°C, 55°C 및 60°C에서 가열처리 후 생존곡선을 나타낸 것이며, 이들 생존곡선으로부터 얻어진 D 값은 Table 1과 같다. E. coli O157:H7 균주는 50°C와 55°C에서는 거의 완만하게 감소하였으며 60~180분 가열처리시 균수가 약 1~2 log cycles (90~99.38% 사멸) 정도가 감소되었다. 60°C에서는 가열처리 5분부터 약 3 log cycle (99.85% 사멸)이 감소하여 가열처리의 효과가 좋았으나 60분 가열처리시에도 균수가 완전히 사멸되지 않았다. D 값은 50°C에서 129.2분, 55°C에서 27.1분, 60°C에서 2.4분으로 나타났다. 이는 E. coli ATCC 25922의 D 값이 50°C에서 9.8분, 60°C에서 3.7분⁽¹¹⁾, Salmonella enteritidis의 D 값이 50°C에서 33.98분, 60°C에서 3.06분⁽¹²⁾으로 보고된 것과 비교해 볼 때 50°C에서는 본 균주가

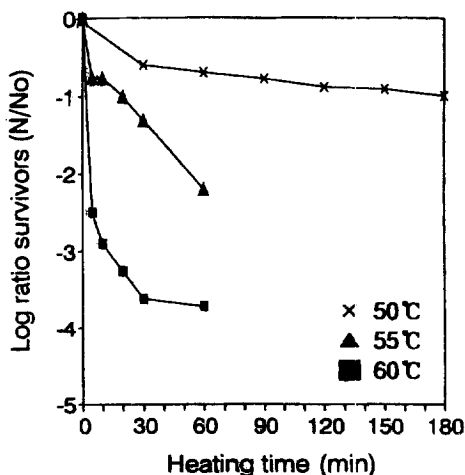


Fig. 1. Survivor curves of Escherichia coli O157:H7 heated at 50°C, 55°C and 60°C.

Table 1. D values of *Escherichia coli* O157:H7 heated at 50°C, 55°C and 60°C

Heating Temp. (°C)	D value (min) ¹⁾
50	129.2
55	27.1
60	2.4

¹⁾D value: Time required to reduce a population by one log₁₀ cycle.

저항성이 높았으나 60°C에서는 열에 매우 약했다. 본 결과로서 *E. coli* O157:H7 균주의 제거는 60°C 이상의 높은 온도가 요구됨을 알 수 있었다.

화학기질이 열저항성에 미치는 효과

미생물은 배지중의 수분함량, 수용성 당, 염, pH, 지방, 단백질 등에 따라 열저항성이 달라지므로 살균시 그 구성에 따라 열처리 온도 및 시간을 달리할 필요가 있다. 이에 본 실험은 buffer에 각종 화학기질을 첨가하여 *E. coli* O157:H7 균주의 열저항성에 미치는 영향을 조사하였다. Fig. 2는 열처리 온도인 60°C에서 30분 동안 공시균주를 TSB 배지와 buffer에 접종하여 생존균수의 변화를 본 것으로 열처리 시간이 경과할수록 균수는 현저히 감소하였으며 TSB 배지에서는 buffer 보다 열에 대해 좀 더 안정하였으며 이는 TSB 배지중의 유기물질이 가열에 대해 어느정도 저항성을 가진 것으로 생각된다⁽¹⁶⁾. 각종 화학기질을 첨가한 배지에서 60°C에서 10분간 열처리하여 *E. coli* O157:H7 균주의 저항성을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 아미노산 기질 중 0.03 M cysteine과 0.1 M alanine이 첨가

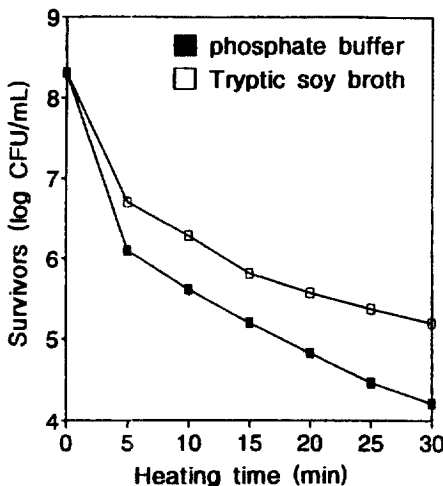


Fig. 2. Survivor curves of *Escherichia coli* O157:H7 heated at 60°C in various chemical substrates.

된 배지에서는 다른 아미노산이 첨가된 배지에서 보다 열에 대한 저항성이 강하였는데 이와 같은 결과는 세포 중의 열에 약한 단백질 혹은 효소분자와의 복합작용으로 열에 대한 안정성이 증가한 것으로 추측되며⁽²¹⁾ Strange와 Shon⁽²²⁾도 비록 첨가농도와 균주에 따라 다소 차이는 있지만 아미노산은 실제적으로 열에 대해 보호작용을 한다고 보고하였다. 염류기질 중 1% sodium citrate는 첨가한 화학기질 중 가장 열에 대해 안정하였는데 이는 sodium citrate에 의해 세포외로 유리된 Mg²⁺ 이온에 의해 열처리율이 감소된 것으로 생각된다⁽²²⁾. 단백질과 펩티드기질에서는 전반적으로

Table 2. Effect of various chemical substrates on the survival of *Escherichia coli* O157:H7 against heat treatment¹⁾

Chemical substrate	CFU/mL	Survival rate ²⁾
Unheated control	2.7 × 10 ⁸	
Heated		
Tryptic soy broth	3.0 × 10 ⁶	4.84
phosphate buffer (0.1 M, pH 7.1)	6.2 × 10 ⁵	1.00
L-Amino acids (0.1 M)		
Alanine	9.0 × 10 ⁵	1.45
Cysteine (0.03 M)	1.9 × 10 ⁶	3.06
Glycine	2.2 × 10 ⁵	0.35
Glutamine (0.05 M)	5.4 × 10 ⁵	0.87
Histidine (0.05 M)	5.9 × 10 ⁵	0.95
Tryptophan	1.9 × 10 ⁵	0.31
Salts (1%)		
Sodium citrate	1.9 × 10 ⁶	3.06
Sodium acetate	3.3 × 10 ⁵	0.53
Lactic acid	2.7 × 10 ⁵	0.44
NaCl (5%)	2.9 × 10 ⁵	0.47
NaCl (10%)	1.4 × 10 ⁵	0.22
Proteins and peptides (1%)		
Peptone	4.4 × 10 ⁵	0.71
Tryptone	1.9 × 10 ⁵	0.31
Casein	1.0 × 10 ⁵	0.16
Casamino acid	1.1 × 10 ⁵	0.18
Yeast extract	1.9 × 10 ⁵	0.31
Meat extract	3.0 × 10 ⁴	0.05
Bovine serum albumin	1.9 × 10 ⁵	0.31
Carbohydrates (5%)		
Glucose	7.6 × 10 ⁵	1.22
Sucrose	1.6 × 10 ⁶	2.58
Lactose	1.2 × 10 ⁶	1.94
Mannitol	1.5 × 10 ⁵	0.24
Fructose	4.0 × 10 ⁵	0.64
Maltose	7.5 × 10 ⁵	1.21
Sorbose	8.8 × 10 ⁵	1.42
Sorbitol	2.8 × 10 ⁵	0.45

¹⁾Heated at 60°C for 10 min.

²⁾Survival rate: Survivors in indicated medium / survivors in Butterfield's phosphate buffer.

buffer에서 보다 열저항성이 약하였으며 특히, 1% meat extract가 첨가된 배지에서 가장 약하게 나타났다. Mannitol, fructose, sorbitol을 제외한 당은 오히려 공시균주의 저항성을 증가시켰다. 이상의 결과로 buffer에 첨가한 화학기질 중 일부가 E. coli O157:H7 균주에 대해 열저항성을 가지게 하는 것으로 나타났다. Moats 등⁽¹⁸⁾의 Salmonella anatum의 저항성과 비교해 볼 때 그 효과가 매우 낮아, 이를 식품에 적용시 비록 그 성분조성이 다소 차이가 있더라도 E. coli O157:H7 균주를 제거에는 거의 동일한 열처리 효과가 나타날 것으로 생각된다.

방사선 단독 및 가열과의 병용처리 효과

E. coli O157:H7 균주를 방사선 단독 및 가열(60°C, 10분)과 병용처리하여 Fig. 3의 생존곡선과 이들 생존곡선으로부터 D₁₀ 값, 12 D₁₀ 값과 2 kGy와 3 kGy에서의 불활성화 계수를 계산하여 Table 3과 같은 결과를 얻었다. D₁₀ 값으로 나타낸 방사선 감수성은 방사선 단독시는 0.116 kGy, 가열과 병용처리시는 약 0.07 kGy로 나타났으며 완전살균을 위해서는 단독처리시는 1.392 kGy, 병용처리시는 0.9 kGy 내외의 조사선량이 요구되었으며 불활성화 계수에 있어서는 2, 3 kGy 조사로서 단독처리시는 17~25 log cycles 이상 감소시킬 수 있었고 병용처리시는 25~41 log cycles 이상 감소시킬 수 있을 것으로 생각된다. 또한, E. coli O157:H7 균주는 방사선 단독처리에 비하여 가열과의 병용처리시 D₁₀ 값이 0.039~0.043 kGy 정도가 감소되어 병

Table 3. Combined effect of heat (H, 10 min at 60°C) and irradiation (R) on the inactivation of Escherichia coli O157:H7

Treatment	D ₁₀ value ¹⁾ (kGy)	12 D ₁₀ value (kGy)	Inactivation factor	
			2 kGy	3 kGy
R	0.116	1.392	17.24	25.86
R+H	0.073	0.088	27.40	41.10
H+R	0.077	0.924	25.97	38.96

¹⁾D₁₀ value: Dose required to reduce a population by one log₁₀ cycle.

용처리 효과가 매우 좋았고 불활성화계수도 단독처리시 보다 월등히 높아 공시균주에 대한 살균효과가 현저하게 상승되었음을 알 수 있었다. 그러나 가열처리를 방사선 조사전·후에 달리하여도 공시균주의 감수성에는 차이가 나타나지 않았다. 이상의 병용처리 결과를 E. coli O157:H7 균주의 오염으로 문제가 되는 meat system에 적용하면 최소한의 저선량의 방사선 조사로서 살균목적을 충분히 달성할 수 있을 것으로 생각된다. Thayer 등^(6,14,15)은 우유에 오염된 E. coli O157:H7 균주의 D₁₀ 값을 0.26~0.30 kGy로, Monk 등⁽¹⁷⁾은 0.24~0.44 kGy로 각각 보고하였고 Schaffner 등⁽²⁰⁾은 S. enteritidis를 불활성화시 감마선(0.039 kGy/min)과 가열(60°C)과의 병용처리로서 감마선 단독에 비해 조사선량을 1/3로 낮출 수 있음을 보고하였다.

요 약

본 연구는 Escherichia coli O157:H7 균주를 살균하고자 감마선 단독 및 가열과의 병용처리 효과를 조사하였다. E. coli O157:H7 균주의 가열 단독처리시 D 값은 50°C에서 129.2분, 55°C에서 27.1분, 60°C에서 2.4분으로 나타났다. E. coli O157:H7 균주는 0.03 M cysteine, 1% sodium citrate 및 5% sucrose가 첨가된 배지에서는 열에 대한 저항성이 증가하였고 1%, meat extract, 1% casein 및 1% casamino acid가 첨가된 배지에서는 감소하였다. 감마선 단독처리시는 D₁₀ 값과 불활성화 계수가 0.116 kGy와 17~25 이었으나 가열과의 병용처리시는 약 0.07 kGy와 25~41로 나타났다. 이로써 가열과 방사선의 병용처리시 E. coli O157:H7 균주의 방사선 감수성을 현저하게 상승시켜 본 균주의 살균에 효과적이었다.

문 헌

1. Doyle, M.P.: Escherichia coli O157:H7 and its significance in foods, Int. J. Food Microbiol., 12, 289

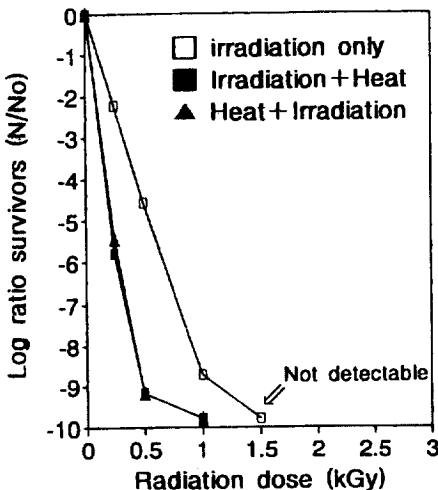


Fig. 3. Survivor curves of Escherichia coli O157:H7 by the combined treatment of heat (10 min at 60°C) and irradiation.

- (1991)
2. 編集部 : 病原大腸菌O157とその検査方法, 食品と開発, **31**, 30 (1996)
 3. 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)
 4. 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)
 5. Thayer, D.W. and Boyd, G.: Elimination of *Escherichia coli* O157:H7 in meats by gamma irradiation, *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 1030 (1993)
 6. Padhye, N.V. and Doyle, P.: *Escherichia coli* O157:H7: Epidemiology, pathogenesis, and methods for detection in food, *J. Food Prot.*, **55**, 555 (1992)
 7. 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)
 8. 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)
 9. 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)
 10. 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)
 11. Padhye, N.V. and Doyle, M.P.: Rapid procedure for detecting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in food, *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 2693 (1991)
 12. 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)
 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.: Use of irradiation to kill enteric pathogens on meat and poultry, *J. Food Safety*, **15**, 181 (1995)
 15. 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)
 16. Banati, D., Fielding, L.M., Grandison, A.S. & Cook, P. E.: The effect of combinations of irradiation and pH on the survival of *Escherichia coli* on chicken meat, *Lett. Appl. Microbiol.*, **16**, 239 (1993)
 17. Monk, J.D., Beuchat, L.R. and Doyle, M.P.: Irradiation inactivation of food-borne microorganism, *J. Food Prot.*, **58**, 197 (1995)
 18. Moats, W.A., Dabbah, R. and Edwards, V.M.: Survival of *Salmonella anatum* heated in various media, *Appl. Microbiol.*, **21**, 476 (1971)
 19. 권오진, 변명우 : 식품위생관계 미생물에 대한 가열처리와 감마선조사의 병용효과, 한국식품영양과학회지, **25**, 804 (1996)
 20. Schaffner, D.F., Hamdy, M.K., Toledo, R.T. and Tift, M.L.: *Salmonella* inactivation in liquid whole egg by thermoradiation, *J. Food Sci.*, **54**, 902 (1989)
 21. Veitch, F.P., Jr. and McComb, R.B.: The purification of hog kidney D-amino acid oxidase, *J. Amer. Chem. Soc.*, **78**, 1363 (1956)
 22. Strange, R.E. and Shon, M.: Effects of thermal stress on viability and ribonucleic acid of *Aerobacter aerogenes* in aqueous suspension, *J. Gen. Microbiol.*, **34**, 99 (1959)

(1997년 5월 9일 접수)