KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL.
Vol. 30, No. 5, pp. 1209~1213 (1998)

Escherichia coli O157 : H7을 오염시킨 우육의 감마선 조사에 의한 살균효과

김성 · 육홍선 · 이주운 · 최청* · 변명우
한국원자력연구소 방사선식품공학연구실, *영남대학교 식품가공학과

Sterilization of *Escherichia coli* O157:H7 Contaminated Beef by Gamma Irradiation

Sung Kim, Hong-Sun Yook, Ju-Woon Lee, Cheong Choi, Myung-Woo Byun
Department of Food Irradiation, Korea Atomic Energy Research Institute
**Department of Food Science and Technology, Yeungnam University*

Abstract

The gamma-radiation sensitivity of four kinds of *Escherichia coli* O157 : H7 was investigated in frozen cells (-18°C) with 0.1 M phosphate buffer and inoculated cells in beef. The maximum populations were observed at 12 hr when *E. coli* O157 : H7 was incubated in the tryptic soy broth at 37°C. In the case of the frozen cells at logarithmic phase, the D_{10} and $12D_{10}$ values of four kinds of *E. coli* O157 : H7 were 0.09~0.15 kGy and 1.08~1.80 kGy, and inactivation factors were 13.33~22.22 and 20.00~33.33 at radiation doses of 2 and 3 kGy, respectively. The radiosensitivity of inoculated *E. coli* O157 : H7 in beef showed the D_{10} value of 0.30~0.47 kGy, the $12D_{10}$ value of 3.60~5.64 kGy, and inactivation factor of 4.26~10.00. The radiosensitivity of the frozen cells was higher than that of the inoculated *E. coli* O157 : H7 in beef. Gamma irradiation at doses within the range of 1.5 to 3 kGy is considered to be an effective method to control *E. coli* O157 : H7 in beef.

Key words: *Escherichia coli* O157 : H7, beef, frozen cell, gamma-radiation sensitivity

서 론

Escherchia coli O157은 식품과 물에 의해 전염되는 식중독 균으로 1982년 미국에서 집단 식중독 발생의 원인균으로 보고된 이후 캐나다, 일본 등에서 환자가 발생하여 우리나라에서도 *E. coli* O157:H7에 많은 관심이 집중되고 있다[1-6].

장관출혈성 대장균(EHEC) 중에서 특히 혈청형 O157: H7과 O157 : NM (비운동성)은 식품유래질병의 주요 요인으로[7] 식품과 동물에서 기원하는 덜 익힌 쇠고기, 돼지고기, 가금류 등을 통해 주로 사람에게 감염되며 verotoxin을 생산하여[8,9] 용혈성 요독증후군(Hemolytic Uremic Syndrom-HUS), 출혈성 장염(Hemorrhagic colitis) 및 혈소판 감소성 자반증(Thrombotic Thrombocytopenic Purpura-TTP) 등을 유발한다[10,11]. 증세는 피가 섞인 대변과 복통, 설사 등이 뒤따르고 어린이나 노인의 경우 용혈성 요독증으로 악화되면 5% 정도는 뇌장애로 사망하고 10%는 신장이나 뇌에 후유증이 남는다[12-16].

최근 식품의 오염, 특히 육제품에서 기인된 이러한 병원성 대장균의 오염은 매우 심각한 공중보건 문제의 하나로 전세계적으로 인류건강에 위협을 주고 있어 이를 최소화하기 위한 조치는 식품산업에서 중요한 과제로 되어 있다. 이러한 관점에서 제조관리수칙(GMP)과 위해요소중점관리기준(HACCP)이 도살장과 가공공장에서 강조되어지고 있으나 산발적인 오염은 아직도 가능하다[17,18]. 따라서 육제품의 미생물학적 안전성 확보를 위해서는 방사선 처리가 매우 효과적인 방법으로 대두되고 있다[19].

본 연구에서는 육류의 안전저장 및 유통기반을 확립하기 위하여 혈청타입이 다른 네 종류의 *E. coli* O157 : H7 균주의 -18°C 동결세포와 우육에 균을 접종한 시료에 감마선을 조사하여 그 살균효과를 살펴보았다.

Corresponding author: Myung-Woo Byun, Department of Food Irradiation, Korea Atomic Energy Research Institute, Yusung P.o.Box 105, Taejon 305-600, Korea

재료 및 방법

공시균주 및 배지

시험에 사용된 균주인 *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43894는 Iowa Pork Industry Center, USA에서, *Escherichia coli* O157:H7 932, 0019 및 933은 Georgia University, USA에서 분양받아 사용하였다. 균주의 보존은 tryptic soy agar (TSA, Difco, Detroit, Lab.) 사면배지에 유지하여 4°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

배양시간별 균체 증식

공시균주를 TSA 사면배지에 수회 계대배양 후 동일한 액체배지(TSB, Difco) 10 mL에 1백금이를 접종, 37°C에서 24시간 진탕배양(150 rpm)하여 활성화하였다. 활성화된 배양액 1 mL를 새로운 액체배지 100 mL에 접종하여 37°C에서 진탕배양하면서 배양시간별로 1 mL를 무균적으로 채취하여 Butterfield's phosphate buffer (0.1 M KH_2PO_4, pH 7.2, 이하 buffer)로 희석하고 TSA 평판배지에 0.1 mL를 도말하여 생성된 colony의 수로 균체 증식을 조사하였다.

균주의 배양과 현탁액의 조제

공시균주를 각각의 사면배지에 24시간 수회 계대배양 후 이것을 동일한 액체배지 100 mL에 1 백금이를 접종하여 37°C에서 18시간 진탕배양 (150 rpm)한 다음 현탁액 1 mL를 다시 새로운 액체배지 100 mL에 접종하고 8시간 진탕배양시켜 대수기의 세포를 얻었다. 이 세포 현탁액을 4°C에서 10분간 원심분리 (9,000×g)하여 얻은 균체를 살균된 냉 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2, 이하 buffer)로 3회 세척, 원심분리하여 최종 균의 농도가 10^7~10^9 CFU/mL가 되도록 조절하였으며 균현탁액은 -18°C 동결과 우육접종 실험에 사용하였다.

우육의 균주접종 및 방사선 조사

시험에 사용된 시료는 도체 후 24시간 경과된 우육(bovine. M. *Semitendinosus*, 80% 살코기)으로 대전지역 도축장에서 구입한 후 50±0.05 g 씩 분할하였다. 분할된 시료는 Stomacher 400 (Tekmar Co., Cincinnati, OH) polyethylen bag에 넣어 함기포장한 후 10 kGy 선량의 감마선을 조사하여 살균하였다. 살균된 시료는 clean bench내에서 각 시료 무게당 1% (10^7~10^9 CFU/mL) 첨가량의 균주를 접종하였다. 감마선 조사는 세포 현탁액의 경우 5.0 mL를 멸균시험관(Ø1.0×10 cm)에 넣고 -18°C에서 10시간 동결하여 그 온도를 유지하면서 방사선 조사를 실시하였고, 또한 우육에 균주를 접종한 시료는 실온상태에서 방사선 조사를 실시하였다. 방사선 조사는 선원 10만 Ci, ^{60}Co 감마선 조사시설을 이용하여 분당 25 Gy의 선량율로 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 및 3.0 kGy의 흡수선량을 얻도록 하였으며, 흡수선량 확인은 ceric cerous dosimeter (USA)를 사용하였고 흡수선량 오차는 ±2 Gy였다.

미생물 생육시험

감마선 조사후 동결된 균 현탁액은 실온에서 해동하고 buffer로 희석하였으며, 균주접종 후 감마선 조사된 우육은 clean bench내에서 멸균해부칼로 4등분하여 각 절편의 중앙에 1 cm^2공간크기의 멸균된 stainless templet를 놓고 loop로 육의 표면을 긁어 모은 후 다시 면봉으로 닦아내어(scraping & swabbing method) 동일 buffer 용액 10 mL가 들어있는 시험관에 넣어 voltex mixer로 1분간 균질화한 후 동일 buffer로 적절히 희석하였다. 희석한 각 시험액은 TSA평판배지를 사용하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양 후 30~300개의 colony가 나타난 3개 평판상의 CFU 를 평균하였고 colony count는 Micro CountTM (IPI. Imaging products, International Inc.)를 이용하였다.

통계분석

공시균주에 대한 미생물 감수성은 CFU/g의 대수로서 나타내었다. 생존균수값은 3개 평판계수에 대한 평균(N) CFU 값을 3번의 제로선량 평균값(N_0)으로 나누어 N/N_0로 나타내었다. D_{10}값(90% 생존균수의 감소를 나타내는 선량: kGy)은 log 생존 균수값의 직선회귀의 역의 기울기로 나타내었다.

결과 및 고찰

배양시간별 균체 증식

E. coli O157:H7 균주의 배양시간별 증식양상은 Fig. 1과 같다. 네 균주 모두 37°C에서 배양 6시간 이후부터 균수가 약 10^9 CFU/mL 정도로 급격히 증가하여 24시간대에 최대균수를 나타내었으며 그 이후 부터는 서서히 감소 하였다. 본 결과로 *Escherichia coli* O157:H7 균주의 대수기는 8시간, 정지기는 24시간으로 하여 다음실험에 적용하였다.

동결균체의 방사선 감수성

E. coli O157:H7 네 균주의 동결균체에서의 감마선의 살균효과를 조사한 결과 Fig. 2의 생존곡선과 이들 생존곡선으로부터 D_{10}값, $12D_{10}$값과 2 kGy와 3 kGy에

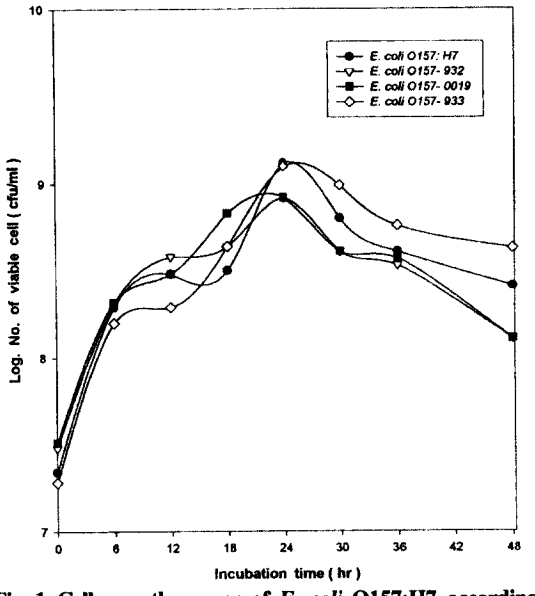

Fig. 1. Cell growth curves of *E. coli* O157:H7 according to cultivation time at 37°C in trypic soy broth.

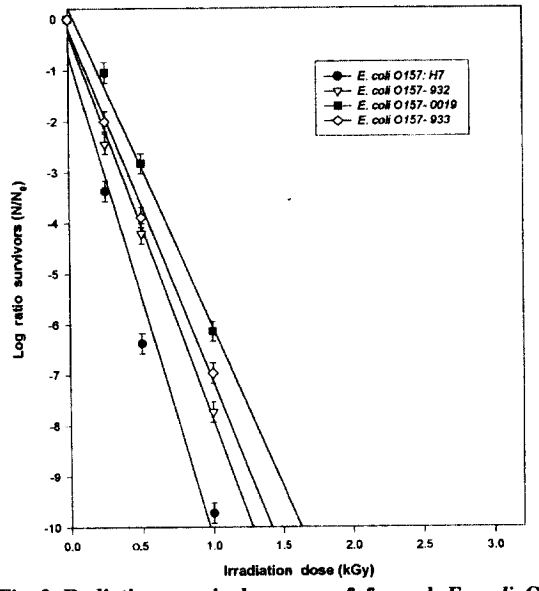

Fig. 2. Radiation survival curves of freezed *E. coli* O 157:H7 cells in phosphate buffer.

서의 불활성화계수(n)를 계산하여 Table 1과 같은 결과를 얻었다. *E. coli* O157:H7 네균주들의 D_{10}값으로 나타낸 방사선 감수성은 *E. coli* O157:H7이 0.09 kGy로 가장 높았고 그 다음이 932균주로 0.13 kGy, 0019와 933균주는 0.15 kGy로 가장 낮았다. 본 실험으로 볼때 네 균주의 동결균체를 완전살균하기 위해서는 1.08 kGy에서 1.80 kGy범위의 조사선량이 요구되었으며,

Table 1. Radiosensitivities of *E. coli* O157:H7 at freezed cell (10^8~10^9 cfu/g)

Strain	D_{10} value (kGy)	$12D_{10}$ value (kGy)	Inactivation factor	
			2 kGy	3 kGy
E. coli O157:H7	0.09	1.08	22.22	33.33
E. coli O157:H7 932	0.13	1.56	15.38	23.08
E. coli O157:H7 0019	0.15	1.80	13.33	20.00
E. coli O157:H7 933	0.15	1.80	13.33	20.00

불활성화 계수에 있어서는 2와 3 kGy 조사로서 13~33 log cycles 이상 감소시킬수 있었다.

우육에 접종된 균주의 방사선 감수성

Fig. 3은 *E. coli* O157:H7 균주를 우육에 접종하고 감마선 조사한 후 생존곡선을 나타낸 것이며, 이들 생존 곡선으로 부터 얻어진 방사선 감수성은 Table 2와 같다. 각 균주들의 D_{10} 값은 앞에서 언급된 동결세포에서의 결과와 같이 *E. coli* O157:H7이 0.30 kGy로 가장 높게나타낮으며, 932 균주가 0.32 kGy, 933 균주가 0.33 kGy 그리고 0019 균주가 0.47 kGy로 가장 낮게 나타났다. 네 균주에 대한 $12D_{10}$ 값은 3.60~5.64 kGy 범위 였으며 불활성화계수는 2와 3 kGy 조사로서 4~10 log cycles 이상 감소시킬 수 있었다. 이는 쇠고기에 있어서 Thayer 등[20,21]의 같은 쇠고기의 D_{10}값은 실온에서 0.30 kGy, 3~5°C에서 약 0.25 kGy, 같은 닭고기에

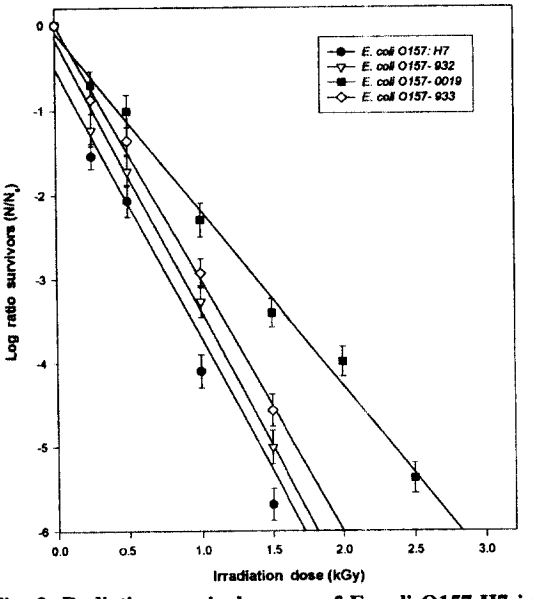

Fig. 3. Radiation survival curves of E. coli O157:H7 in beef.

Table 2. Radiosensitivities of *E. coli* O157:H7 contaminated beef

Strain	D_{10} value (kGy)	$12D_{10}$ value (kGy)	Inactivation factor	
			2 kGy	3 kGy
E. coli O157:H7	0.30	3.60	6.67	10.00
E. coli O157:H7 932	0.32	3.84	6.25	9.38
E. coli O157:H7 0019	0.47	5.64	4.26	6.38
E. coli O157:H7 933	0.33	3.96	6.06	9.09

서는 -5~15°C에서 0.3~0.45 kGy였다는 보고와 비슷하였으며, 공시균주들의 동결균체와 우육접종 후 감마선 조사와의 영향은 동결균체들의 완전사멸은 1.08~1.80 kGy이었으나 우육접종시에는 3.60~5.64 kGy로 동결균체에서 방사선 감수성이 더 높게 나타났다. 이러한 결과는 균주 현탁액의 동결시 세포내외의 빙결정 생성에 의한 세포의 물리적 손상이 그 원인 중의 하나로 생각되며, 일반적으로 미생물의 방사선 감수성은 미생물의 종류, 농도, 매개체의 화학적 조성 및 물리적 상태, 방사선 조사 전후의 환경조건 등에 따라 달라진다[22]. Smith[23]는 *E. coli*와 *Salmonella* 균주를 액체배지 상태에서 냉장과 냉동 후 생존균수를 조사하였는데 냉장보다 냉동온도에서 약 3배 내외로 균수가 감소함을 보고하였다. Ingram 등[24]과 Macleod 등[25]의 보고에 의하면 *E. coli* O157:H7 균주는 저온에서 상당한 내성이 있음이 확인되었으며 이는 실제 우육이 냉동체계에서 유통시 본 균주의 오염으로 인한 식중독을 피할 수가 없어 보다 근본적인 문제해결이 절실하다 하겠다. 따라서 본 실험의 결과로 볼때 우육을 비롯한 축육제품에 오염된 *E. coli* O157:H7 균주는 저선량의 감마선 조사로도 안전하게 살균할 수 있음을 시사하였다.

요 약

4종류의 *Escherichia coli* O157:H7을 tryptic soy broth에 배양한 후 0.1 M phosphate buffer에 동결시킨 균체와 우육에 접종한 균체의 감마선 조사에 의한 방사선 감수성을 조사하였다. 균체의 증식은 tryptic soy broth에서 37°C 배양으로 24시간대에 최대균수를 나타내었다. 대수기때의 동결균체의 D_{10} 값은 0.09~0.15 kGy, $12D_{10}$값은 1.08~1.80 kGy, 2와 3 kGy에서 불활성화 계수는 13.33~33.33이었다. 한편, 우육에 접종한 균체의 D_{10}값은 0.30~0.47 kGy, $12D_{10}$값은 3.60~5.64 kGy, 2와 3 kGy 선량에서의 불활성화계수는 4.26~10.00으로 동결균체가 우육접종균체보다 더 높은 방사선 감수성을 나타내었다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부의 1998년도 원자력연구개발사업의 일환으로 수행되었으며 이 지원에 감사드립니다.

문 헌

1. Doyle, M.P.: *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. *Int. J. Food Microbiol.*, **12**, 289-194 (1991)
2. Tsai, S.H. and Chou, C.C.: Injury, inhibition and inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 by potassium sorbate and sodium nitrate as affected by pH and temperature. *J. Sci. Food Agric.*, **71**, 10-16 (1996)
3. Ahmed, N.M., Conner, D.E. and Huffman, D.L.: Heat resistence *Escherichia coli* O157:H7 in meat and poultry as affected by product composition. *J. Food Sci.*, **60**, 606-610 (1995)
4. Padhye, N.V. and Doyle, P.: *Escherichia coli* O157:H7 Epidermiology, pathogenesis, and methods for detection in food. *J. Food Prot.*, **55**, 555-601 (1992)
5. Griffin, P.M. and Tauxe, R.V.: The epidemiology of infectionscaused by *E. coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol. Rev.* **13**, 60-98 (1991)
6. Padhye, N.V. and Doyle, M.P.: *Escherichia coli* O157:H7: epidemiology, phatogenesis and methods for detection in food. *J. Food Prot.* **55**, 555-565 (1992)
7. Pina M.F., Buchanan, R.L. and Cooke, P.H.: Virulence of an *E. coli* O157:H7 sorbitol-positive Mutant. *Appl. and Environ. Microbiol.* **59**, 4245-4252 (1993)
8. Levin, M.M., Xu, J., Kaper, J.B., Lior, H., Prado, V., Tall, B., Natan, J., Karch, H. and Wachsmuth, K.: A DNA-probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. *J. Infect. Dis.* **156**, 175-182 (1987)
9. Samadpour, M., Liston, J., Ongreth, J.E. and Tarr, P.I.: Evaluation of DNAprobes for detection of Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* in food and calf fecal samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1212-1215 (1990)
10. Karmali, M.A.: Infection by verotoxin-producing *Escherichia coli. Clin. Microbiol. Rev.*, **2**, 15-39 (1989)
11. Karmali, M.A., Petric, M. and Lom, C.: The association between hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli. J. Infect. Dis.*, **151**, 775-782 (1985)
12. Doyle, M.P. and Schocni, J.L.: Isolation of Escherichia coli O157:H7 from retail fresh meats and poultry. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 2394-2396 (1987)
13. Snyder, O.P.: HACCP-an industry food safety self-control program, part III. *Dairy Food Environ. Sanit.*, **12**, 164-167 (1992)
14. Beery, J.T., Doyle, M.P. and Schoeni, J.L.: Colonization

of chicken cecae by *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 310-315 (1985)
15. Borczyk, A.A., Karmali, M.A., Lior, H. and Duncan, L. M.C.: Bovine reservoir for verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet i*:98 (1987)
16. Martin, M.L., Shipman, L.D., Wells, J.G., Potter, M.E., Hedberg, K., Wachsmuth, I.K., Tauxe, R.V., Davis, J.P., Arnoldi, J. and Tillei, J.: Isolation of *Escherichia coli* O 157:H7 from dairy cattle associated with two cases of haemolytic uraemic syndrome. *Lancet ii*:1043 (1986)
17. Karr, K.J., Maretzki, A.N. and Knabel, S.J.: Meat and poulrty companies assess USDA's Hazard Analysis and Critical Point system. *Food Technol.*, **48**, 117-122 (1994)
18. Tompkin, R.B.: Indicator organisms in meat and poultry products. *Food Technol.*, **37**, 107-110 (1983)
19. Beuchat, L.B., Doyle, M.P. and Brackett, R.E.: *Irradiation inactivation of bacterial pathogens in ground beef.* University of Georgia Center for Food safety and Quality Enhancement Report to the American Meat Institute, September (1993)
20. Thayer, D.W. and Boyd, G.: Elimination of *Escherichia coli* O157:H7 in meats by gamma irradiation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 1030-1034 (1993)
21. Thayer, D.W., Boyd, G., Fox, J.B., Lakritz, L. and Hampson, J.W.: Variations in radiation sensitivity of food-borne pathogens associated with the suspending meat. *J. Food Sci.*, **60**, 63-67 (1994)
22. Josephson, E.S. and Peterson, M.S.: *Preservation of Food by Ionizing Radiation. Vol. II*, CRC Press, Florida (1982)
23. Smith, M.G.: Survival of *E. coli* and Salmonella after chilling and freezing in liquid media. *J. Food Sci.*, **60**, 509-514 (1995)
24. 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)
25. 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)

(1998년 7월 27일 접수)