

국내 시판용 Frozen Yogurt의 병원성 미생물 검출 및 미생물학적 품질 평가에 관한 연구

김재원·윤성식
연세대학교 문리대학 생물자원공학과

Detection of *E. coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*, and Appraisal for Microbiological Qualities in the Commercial Frozen Yogurt Products in Korea

Jae-Won Kim and Sung-Sik Yoon

Department of Biological Resources and Technology, Yonsei University, Korea

Abstract

Recently, the high outbreaks of intestinal disease caused by the consumption of frozen dairy foods containing pathogenic bacteria has generated considerable interest in the causative agent such as *Listeria monocytogenes* and *E. coli* O157:H7. This study was carried out to detect the above pathogens and compare the microbiological qualities of three commercial frozen yogurt products. The main results obtained were as follows. *L. monocytogenes*, coliforms and *E. coli* O157:H7 were not detected in the total of seven frozen yogurt samples. For microbiological qualities, the viable lactic counts of products manufactured by FA company were about $2.9 \times 10^8 - 1.6 \times 10^9$ cfu/ml, 1.7×10^6 cfu/ml for FB's, and 1.2×10^6 cfu/ml for FC's. The pH values of FA's, FB's, and FC's products was in the range of pH 4.1~5.3 and the values of FA's were 4.1~4.6 compared by the pH 5.2~5.3 of FB's and FC's products. During refrigeration of the test samples, the survival rates of *L. monocytogenes* spiked into thawed frozen yogurt samples (FA's, FB's and FC's) were 0.55%, 15.61%, and 16.89%, respectively. On the other hand, *E. coli* O157:H7 was little survived in the FA's (Premium mix) at the level of 2.61% compared by 14.39% for FB's (Cherry-Chunk) and 10.22% for FC's (Banana Split). The inhibition rate of *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes* were 12.4% and 25.0% for FA's, 10.08% and 20.8% for FB's, and 10.26% and 22.7% for FC's under 37°C storage. As the results described above, each frozen yogurt products were different in microbiological qualities. The survival rates of pathogens spiked into the samples increased with the pH of the products. This indicates that the pH or any other factors presumably suppressed the growth of *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes* in frozen yogurt products.

Key words : frozen yogurt products, *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*.

서론

세균성 식중독(bacterial food-poisoning)은 오염된 미생물의 섭취 후 잠복기가 짧으며, 동시에 집단적으로 발병하고 환자의 배설물이나 체액 등을 통해서만 타인에게 전파되지 않는 특징이 있다. 최근 전 세계적으로 유제품, 육가

공품 등 다양한 종류의 가공식품 중에서 문제가 되고 있는 미생물로는 *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni* 등이 있다(Acher, 1988).

*Listeria monocytogenes*는 1980년대 부터 식품을 통해 식중독을 일으키고 있는 새로운 식중독균이다. 1983년 미국 Massachusetts주에서는 14명이 시유를 통한 감염으로 사망한 바 있으며, 1985년에도 California주에서 치즈를

Corresponding author : Sung-Sik Yoon, Department of Biological Resources and Technology, Yonsei Univ., Wonju 220-710, Korea.

통해 49명을 사망케 하는 등 유제품을 통한 식중독의 원인 물질로 알려지게 되었다(Brackett, 1988). 이 균은 현재 미국 식품의약국(Food and Drug Administration, FDA)에 의해 우유, 아이스크림, 치즈 등 무가공 섭취 식품(ready-to-eat foods) 중에 단 1마리의 존재도 허용하지 않는 이른바 "Zero tolerance"의 강제 규정을 받도록 되어 있다. 특히 치즈를 비롯한 여러 유제품이 이 균에 잘 오염이 되며 실제로 많은 식중독 발생 사례중 이 균으로 인한 발생 건수가 많은 부분을 차지하고 있다. 따라서 전 세계적으로 유제품을 대상으로 한 *Listeria* 속에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 특히 이 균은 여러 유제품 제조과정시 살아남을 수 있다고 보고되고 있으며 냉장고의 온도에서도 성장하는 냉온성균(psychrotroph)으로 유제품의 냉장 유통기간 동안 계속 살아남아 성장할 수 있기 때문에 더욱 더 문제가 되고 있다(Acher, 1988).

*Listeria monocytogenes*는 Gram positive, 2~3 × 0.5 μm의 끝이 둥근 단간균이며 보통은 4개 이하의 편모를 가지고 운동하고, 아포나협막 등은 없으며 인축공동 감염증인 listeriosis를 유발하는 병원균이다. Blood agar상에서 아주 작은 평활 원형의 직경 0.3~1.5ml의 이슬같은 colony와 함께 좁은 β-용혈대를 나타낸다(Chesemore, 1990). Tryptose agar 같은 투명성 배지상에서 colony는 정상적인 조광(照光) 하에서는 유사한 colony와 구분이 쉽지 않으나 Lachia(1989)의 135° 경사조광 관찰 방법을 이용하면 Bluish-green의 colony의 관찰이 가능하다.

Listeria 속의 종 구분 방법에서는 CAMP test가 분류상 매우 유효하며 *Listeria monocytogenes*는 CAMP⁺/S. aureus이며 CAMP⁻/R. equi이다. *Listeria* 속 내의 species는 Pirie(1940)가 *L. monocytogenes*를 단일 종으로 분류한 후 현재에 이르기까지 총 8종이 알려져 있으나 Seeliger와 Jones(1987)는 아직까지 「분류학상 불확실한 속」으로 간주하고 있다. 총 8종으로는 *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. denitrificans*, *L. murrayi* 및 *L. grayi* 등인데 이 중 DNA/DNA hybridization 방법에 의하면 *L. grayi*와 *L. murrayi* 등은 타 6종보다 낮은 DNA

homology를 보인다는 점(Stuart와 Welshimer, 1974)에서, *L. denitrificans*는 4건의 분류학적 연구(Chatelain과 Second, 1976; Jones, 1975; Stuart와 Pease, 1972; Stuart와 Welshimer, 1974)에서 오히려 *Corynebacterium*이나 *Cellulomonas* 또는 *Arthrobacter*와 더 흡사하다는 점에서 아직 *Listeria* 속으로의 포함 여부가 불확실하다. 이 8종 중에서 *L. monocytogenes*가 주로 관심의 대상이 되고 있는 것은 *Listeria*속 중 동종이 갖는 병원성 리스테리아증(Listeriosis) 유발성 및 Leptospirosis나 Brucellosis 등 보다는 월등하게 높은 치사율 때문이다. 식중독균으로 가장 널리 알려진 *Salmonella*의 경우 1년에 미국에서만 약 300만명이 감염되어 그 중 약 3,000명이 사망하는데 반하여 *L. monocytogenes*는 1년에 25,000명 정도 감염되어 그 중 1,000명이 사망해 사망자수로는 Salmonellosis의 1/3 정도이나 사망률은 40배나 되는 것으로 나타났다.

*L. monocytogenes*의 오염 경로를 살펴보면 오염된 원유로부터 혹은 유가공장의 환경으로부터 *L. monocytogenes*가 유제품 속으로 오염된 경우가 가장 빈도가 높았다. 1986년부터 1987년 사이 미국 FDA에 의해 조사된 총 2,518의 각종 유제품 sample중 2.5%가 *L. monocytogenes*에 오염되었으며 시유, 초콜렛 우유와 아이스크림들의 냉동 유제품들이 관련되었다. FDA의 검사결과 skim milk, low fat milk, Half & Half, cream 그리고 버터에서는 *L. monocytogenes* 음성으로 나타났다. 그 원인은 아마도 제조공정상 원심분리에 의해 *Listeria* spp.의 수가 감소되었기 때문으로 추정되었다(Ryser & Marth, 1991). 또한 탈지분유와 casein/protein hydrolysate에서 이 세균이 검출되지 않는 것은 열처리 공정과 간접적으로 관련이 있는 것으로 나타났다. Doyle 등(1985)은 skim milk로부터 spray drying으로 탈지분유를 만드는 공정에서 *L. monocytogenes*가 90% 이상 사멸한다고 보고하였다.

이 세균의 검출법과 관련하여 가장 큰 문제점은 일반적으로 사용되는 FDA 방법은 열처리 동안 형성된 sublethally injured cell을 검출하지 못한다는 점이다. 또한 FDA의 방법이 cold enrichment 방법보다 *L. monocytogenes*의 검출율에서 훨씬 낮기 때문에 실제로 이 균

이 유제품에 존재할 가능성은 보고된 수치보다 훨씬 많을 것으로 추정된다.

한편 최근에 이르기까지 밝혀진 다수의 연구들은 임상적 테두리를 벗어나 거의 모든 식품의 원재료와 그 가공식품 분야에서 *L. monocytogenes*는 항상 출현할 수 있음을 보여 주었으며 근래에 이르러는 대부분이 냉장보관을 요하는 축산 및 낙농 가공제품 및 이와 관련된 가공식품 분야에 집중되는 경향이다.

1983년의 Massachusetts의 살균 시유 음용에 의한 대규모 listeriosis 발생은 이러한 동기를 유발시킨 대표적 사건이며, 이를 전후하여 몇 년 동안 일어난 기록적인 listeriosis의 발생 결과 그 평균 사망율이 30% 내외에 도달하였다. 한편 *E. coli* O157:H7은 enteropathogenic *E. coli*의 일종으로 식중독을 일으킬 수 있는 대장균이다. 장출혈성(enterohemorrhagic) *E. coli* O157:H7(EHEC)은 1982년 병원성 미생물로 최초로 확인된 이후 출혈성 결장염(hemorrhagic colitis, HC), 용혈성 요독증(hemolytic uremic syndrome(HUS) 및 급성 신부전(acute renal failure)의 원인균으로 알려져 있다(Doyle, 1991). 즉 이 균이 일단 체내에 침투하면 장 내에서 증식하면서 verotoxin을 생산하며 용혈을 일으키고 신장을 공격하여 요독증을 유발시킨다(Feng, 1995). 그 외에도 혈변, 심한 복부 통증, 중추신경계 장애 등이 알려져 있으며 치사율은 전체 감염환자의 0.1% 정도이다. 식중독의 원인은 우유, 쇠고기, 우유, 물 등이 밀접하게 관련되며 어린 송아지에 adult cattle보다 더 많은 이 균이 보균되어 있다고 한다(Syngé, 1992).

식중독은 10~100마리 정도 수준에서 일어날 수 있다고 보고되었다. 감염증은 우유를 비롯한 각종 식품과 덜 가열된 쇠고기 등이 관련되어 있다. 지난해 일본에서는 초등학교 학생에게 집단적으로 O157식중독이 발병하여 11명의 사망자를 포함하여 만명 이상의 감염환자를 야기하였다. 이 병원균은 일반 대장균과 모양과 크기, 유전형질이 거의 비슷하다. 따라서 검출이 비교적 까다롭고 어렵다. 44.5℃에서는 자라지 못하며 37℃에서 최적 생육한다. Glucuronidase에 대한 MUG 반응은 일반 대장균과는 달리 음성이며, 대장균이 sorbitol positive인 반면 이 균은 negative이다(Doyle, 19-

91). 표준 방법으로 이 균을 검출하는 데는 약 6일이 걸린다. 따라서 신속하게 일반 대장균과 구별하기 위해서 면역학적 검출법이 보통 사용된다. 즉 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)로서 대장균 표면에 위치한 단백질 항원(O항원) 중 157항원 유무를 확인하는 방법이다.

우리나라의 경우, 낙농 유제품 전면 수입 개방에 있어서, 이와 같은 병원성 미생물 추적 프로그램이 수립되어 있지 않을 뿐 아니라, 주요 식중독균으로 대두된 *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* 등과 같은 새로운 맹독성 세균에 관한 실험적 정보가 매우 빈약한 실정이다. 따라서 UR 협정 이후 외국산 낙농 유제품의 수입이 점차 증가하고 있는 현실을 감안한다면 일반 소비자의 식품 위생학적 보호 차원에서 이에 대한 대비가 절실하다고 본다.

본 연구에서는 최근에 아이스크림 및 유제품에서 검출되어 큰 문제가 되고 있는 맹독성 병원성 미생물인 *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7가 시중에 판매되고 있는 외국산 후로즌 요구르트(Frozen yogurt) 제품 중에 오염되어 있는지 여부와 제품 간의 미생물학적 품질 비교 및 후로즌 요구르트 제품 중에서 병원성 미생물의 생존율을 각각 측정된 결과이다.

재료 및 방법

시료(Sample)의 구입

본 실험에 공시한 frozen yogurt 제품은 1997년 11월 10일~11월 15일 사이 서울 시내 후로즌 요구르트 대리점에서 각각 구입한 3개 회사 제품(FA 5종, FB 1종, FC 1종)을 구입 즉시 드라이 아이스를 채운 밀폐 용기에 넣어 4시간 이내에 신속하게 실험실로 운반한 다음 -20℃에서 동결시켜 보존하면서 시료로 이용할 때마다 냉장고에서 하룻밤 동안 해동시킨 것을 시험에 사용하였다. 본 시험에 사용한 제품은 Table 1과 같다.

사용 균주

본 실험에 사용한 *E. coli* serotype O157:H7(ATCC 35150), *Listeria monocytogenes* ATCC 19112는 국립보건원(KNIH)으로부터 분양을

Table 1. List of frozen yogurt products collected and determined for their microbiological qualities

Maker	No.	Products	Vol. (ml)	Area
FA (5종)	A	Premium mix	2000	Seoul
	B	Chocolate decadence	473	Seoul
	C	French vanilla	473	Seoul
	D	White chocolate	140	Seoul
	E	Apple pie	140	Seoul
FB (1종)	F	Vanilla cherry chunk (nonfat)	473	Seoul
FC (1종)	G	Banana split (nonfat)	473	Seoul

Table 2. Strains used in this study

Strains	Source
<i>Escherichia coli</i> YSD-16	Dairy Microbiology, Yonsei Univ.
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	KNIH
<i>Listeria monocytogenes</i> (Scott A)	KNIH
<i>Yersinia enterocolitica</i> YSD-48	Dairy Microbiology, Yonsei Univ.

받았으며 유산균으로 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*는 연세대학교 유가공 미생물 연구실에 보존 중인 균주를 각각 이용하였다. 시험기간 동안 공시된 *Listeria* 속과 대장균속 균주의 보존은 0.6% yeast extract가 함유된 TSA(TSAYE)배지에 접종 배양한 다음 냉장고에서 보존하였다. 본 연구에 사용된 균주는 Table 2와 같다.

사용 배지 및 검출용 시약

*L. monocytogenes*의 증균용 배지는 Lovett 등(1987)이 제안한 *Listeria* Enrichment Broth(Difco, 이하 LEB) 또는 0.6% Yeast Extract를 함유한 Trypticase Soy Broth(Difco, Detroit, MI; TSBYE)를 사용하여 25℃에서 16-20시간 증균 배양하였다. 선택 배지는 McBride agar(Difco)를, 면역학적 동정은 Re-

veal *Listeria* test kit(Neogen, Lansing, MI; Greenbiotech, Seoul)을 각각 사용하였다.

한편 *E. coli* O157:H7의 증균용 배지는 modified TSB(Difco, Detroit, MI)배지를, 분리용 배지는 0.1% 4-methyl umbrelliferyl- β -D-glucuronide(MUD, Sigma Chemical Co.)가 함유된 Sorbitol-McConkey Agar No. 3(Oxoid, NY)를 사용하였으며, 최종적인 동정은 Reveal screening test kit(Neogen Co., Lansing, MI; Greenbiotech, Seoul)를 사용하여 gold aggregation 여부를 측정하였다.

미생물의 분리 및 확인

1) *L. monocytogenes*의 분리 및 확인

해동시켜 냉장고에 보관 중인 각각의 시료는 약 20g씩 무게를 달아 무균적으로 Stomacher blending을 60초간 실시하였다. 다음 1ml을 무균적으로 취하여 9ml의 증균용 *Listeria* selective enrichment medium(LSE)가 들어 있는 screw-cap tube에 넣고 충분히 진탕한 다음 35℃에서 24시간 배양하였다. 미생물의 증식이 일어난 시험관 배지 0.1ml을 TSBYE에 옮기고 다시 35℃에서 24시간 동안 배양한 다음 내용물 1ml을 적당히 10진 희석한 후 선택 배지인 McBride agar(Difco) 상에서 평판하여 35℃에서 24시간 동안 배양시킨 후 나타난 의심스런 집락을 면역학적 동정법으로 최종 확인하였다.

한편 동정 실험은 Reveal *Listeria* test kit(Neogen, Lansing, MI; Greenbiotech, Seoul)을 이용하여 다음과 같이 실험하였다. 즉, 증균배양 배지에서 배양한 다음 McBride agar상에서 자란 colony를 소량의 0.85% 생리적 식염수에 현탁시키고, 그 일부를 80℃에서 20분간 가열하여 flagella antigen을 추출한 다음 실온으로 냉각하였다. 다음 135 μ l을 취하여 *Listeria* test kit의 sample 주입구에 넣는다. 시료는 pad를 타고 처음 항체로 표지된 blue latex와 만나 시료 중의 항원과 결합한다. 이 복합체는 모세관을 타고 test strip까지 이동하며 청색선(blue line)을 형성하는 원리를 이용하였다.

2) Coliforms와 *E. coli* O157:H7의 분리 및

확인

해동시켜 냉장고에 보관 중인 각사의 후로즌 요구르트 시료를 잘 혼합한 다음 시료를 취하여 McConkey agar 상에 평판하여 37°C에서 48시간 배양후 집락의 유무를 확인하였다. 또한 *E. coli* O157:H7의 분리 및 확인은 우선 enrichment broth 중에서 증균 배양한 다음 분리하고 Gram staining, motility test, oxidase test를 실시한 후 마지막으로 항체 시험을 통하여 확인하였다.

해동시켜 냉장고에 보관 중인 각사의 후로즌 요구르트 시료는 약 20g씩 무게를 달아 무균적으로 Stomacher(Seward, Model 400)용 Bag에 넣어 60초간 blending을 실시한 다음 각 시료를 modified TSB media 중에서 37°C에서 16~18시간 150rpm으로 진탕하면서 증균배양하였다. 다음 0.1% 4-methyl umbrelliferyl-β-D-glucuronide(MUD, Sigma chemical Co.)가 함유된 Sorbitol-McConkey Agar No. 3 (Oxoid NY)상에서 직접 평판 배양법으로 실시하였으며 Sorbitol-negative, MUG-negative colony를 presumptive *E. coli* O157:H7로 하였으며 최종적인 동정은 Reveal microbial screening test kit(Neogen, Lansing, MI; Greenbiotech, Seoul)로 확인하였다. 대조구용으로는 해동시킨 후로즌 요구르트에 인위적으로 *E. coli* O157:H7을 현탁시키고 상기와 같은 방법으로 증균 및 분리를 하였다.

분리균에 대한 확인 동정은 Reveal R *E. coli* O157:H7 kit을 사용하였다. 이 방법은 8시간 배양만으로 미생물을 검출할 수 있는 시약으로 다음과 같이 수행된다. 우선 시료를 증균 배양액 중에서 8시간 배양시키고 이 배양액 일부를 reveal device의 둥근 시료입구에 추가한다. 시료는 nitrocellulose pad 심지를 통하여 gold-labelled *E. coli* O157:H7-특이 항체의 reaction zone까지 통하게 되어 있다. 이 항체는 *E. coli* O157:H7과 결합하면 복합체를 형성할 수 있다. 이 complex는 pad를 타고 2번째 라인의 *E. coli* O157:H7 특이적 항체가 함유된 reagent zone으로 이동한다. 여기서 다시 복합체를 형성하여 고정화되어 가시적인 gold 응집을 나타낸다. *E. coli* O157:H7이 시료 중에 있거나 없거나 control window에 line이 생기면 이 반응이 제대로 된 것이다.

대장균군(Coliforms)의 계수

시료 중에 함유된 대장균군 수는 McConkey agar 배지(Difco, MI)를 이용하여 측정하였다. 시료를 0.85% 생리적 식염수로 희석한 10배 희석 시료용액을 미리 조제하여 균혀 놓은 상기 배지에 균일하게 도말하고 37°C에서 24시간 동안 배양한 후 나타난 집락을 계수하였다.

생존율 및 저해율(Inhibition rate)의 측정

제조원별로 약 $10^6 \sim 10^8$ CFU/ml 정도의 유산균이 들어 있는 후로즌 요구르트 시료를 상기와 같이 해동시킨 다음 무균적으로 마개 달린 시험관에 10ml씩 취하여 넣었다. 다음 여기에 0.6% yeast extract가 함유된 TSB(Difco) 배지 중에서 하룻밤 배양시켜 0.85% 생리적 식염수로 적당히 희석하여 10^4 CFU/ml 정도가 되도록 희석한 병원균(*L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7)을 각각 10ml씩 첨가한 다음 충분히 진탕하였다. 시험관의 마개를 막고 냉장고에서 하루 간격으로 5일간 보존하면서 시간의 경과에 따른 병원성 세균의 감소 경향을 측정하되 대장균은 Solbitol-McConkey배지(Difco)를, *L. monocytogenes*는 McBride agar(Difco)를 각각 사용하여 평판한 다음 24~48시간 배양후 생긴 집락을 계수하였다(생존율). 또한 동일한 방법으로 37°C에서 6시간 동안 배양시킨 다음 집락을 계수하여 저해율을 측정하였다. 대조구는 후로즌 요구르트 시료대신 멸균 생리적 식염수를 사용하였으며, 생존율 및 저해율은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Survival or inhibition(\%)} = \frac{(\text{CFU/ml in control}) - (\text{CFU/ml in frozen yogurt})}{(\text{CFU/ml in control})} \times 100$$

Lactobacilli 및 *Str. thermophilus*의 계수

냉장고에서 하룻밤 방치하여 해동시킨 각 후로즌 요구르트 제품을 0.85% 생리적 식염수로 적당한 희석 배수가 되도록 10진 희석하고, 이 희석액 1ml을 BCP Plate Count Agar(Oxoid)에 pour plate법으로 평판하여 37°C에서 48시간 배양후 나타난 집락의 수를 colony

counter(Suntex model 560)로 계수하여 colony-forming unit(CFU/ml)로 표시하였다.

pH의 측정

각 회사별 후로즌 yogurt 시료는 corning pH meter(model 10)을 이용하여 20°C에서 측정하였다.

기타

Catalase 시험 및 oxidase 시험은 생화학 시험법에 준하여 실시하였으며, Gram 염색, 운동성 시험(motility test) 등은 상법에 준하여 실시하였다.

결 과

*Listeria monocytogenes*의 분리 및 확인

후로즌 요구르트 중에 *L. monocytogenes*의 존재 여부를 확인하기 위하여 총 7개의 후로즌 요구르트 시료를 수집한 다음 우선 LEB를 이용하여 증균하고 분리 시험을 실시하였다. Table 3에 나타난 바와 같이 어느 제품에서도 *L. monocytogenes*는 검출되지 않았다. 단 시료 B와 시료 G에서 *Listeria*로 추정되는 집락이 나타났으나(Fig. 1) Reveal *Listeria* test kit(Neogen; Greenbiotech)을 사용한 면역학적 동정 결과 *L. monocytogenes*가 아닌 것으로 최종 확인되었다. 그러나 대조구로 사용된 *L. monocytogenes*는 본 연구에서 사용된 증균 배

지(LEB) 및 McBride 선택 배지에서 생육이 양호하였으며, 집락의 모양은 McBride agar 상에서 전형적인 umbrella형을 나타냈다. 또한 분리균은 운동성이 있고 Gram 양성, esculin 분해능 양성이었으며 현미경으로 관찰한 결과 단간균의 형태였다(data not shown).

대장균군의 분리 및 확인

E. coli O157:H7의 분리 및 확인은 우선 enrichment broth 중에서 증균 배양한 다음 분리하고 Gram staining, motility test, oxidase test를 거친 후 마지막으로 항체시험을 통하여 확인하였는데, 1차 증균시험 및 분리시험 결과 총 7개의 후로즌 요구르트 시료중 G와 F에서 Coliform으로 추정되는 집락이 나타났다. 이들에 대한 항체 실험 결과 coliforms 및 *E. coli* O157:H7가 아닌 것을 확인하였다. 결과적으로 전 후로즌 요구르트 제품에서 *E. coli* O157:H7는 전혀 검출되지 않았다(Table 3).

제품의 산도 및 유산균수 측정

공시 7개 시료 중의 제품의 유산균수는 FA사 제품이 $2.9 \times 10^8 \sim 1.6 \times 10^9$ cfu/ml, FB사 제품은 1.7×10^6 cfu/ml, FC사 제품은 1.2×10^6 cfu/ml 정도였고, 생균수 함량이 FA사 제품에서 가장 많았다. 또한 FA사 제품은 pH가 4.1~4.6임에 반하여 FB사 및 FC사 제품은 5.2~5.3 정도로 비교적 높았다. 적정 산도에 있어서도 FC사 제품은 0.6~0.7% 범위였으나

Table 3. The titratable acidity, pH and microbiological qualities of three commercial frozen yogurt products collected at Seoul, 1997

Maker	No.	Products	Vol. (ml)	pH (25°C)	Acidity (%)	LAB (cfu/ml)	Coli-forms	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>L. monocytogenes</i>
FA (5종)	A	Premium mix	2,000	4.1	0.73	1.6×10^9	-	-	-
	B	Chocolate decadence	473	4.61	0.37	1.55×10^9	-	-	-
	C	French vanilla	473	4.33	0.52	2.9×10^8	-	-	-
	D	White chocolate	140	4.32	0.56	3.5×10^8	-	-	-
	E	Apple pie	140	4.17	0.66	4.1×10^8	-	-	-
FB (1종)	F	Vanilla cherry chunk(nonfat)	473	5.21	0.10	1.7×10^6	-	-	-
FC (1종)	G	Banana split (nonfat)	473	5.31	0.07	1.2×10^6	-	-	-

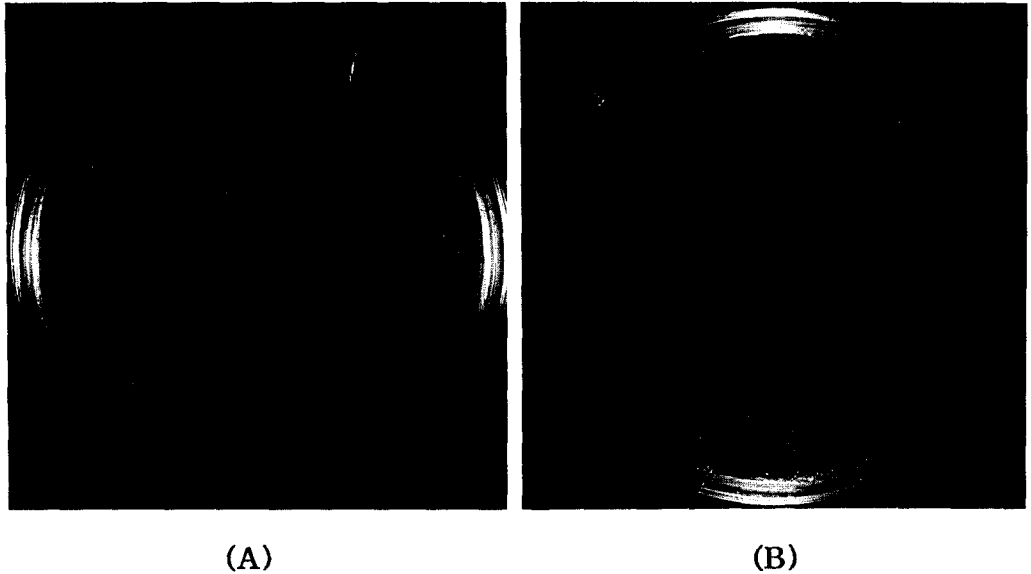


Fig. 1. Appearance of Listeria-like colonies on the McBride agar plates of sample B and G.
A : McBride agar plate of sample B, B : McBride agar plate of sample G

FB사(Vanilla cherry chunk) 및 FC사(Banana split) 제품은 각각 0.1%, 0.07%였다 (Table 3). 일반적으로 국내에서 유통 판매되고 있는 발효유의 최종 pH는 4.5 내외인 것을 감안한다면 FA사 제품 이외의 제품은 발효된 제품으로 보기에 어려운 점이 많다고 사료된다.

생존율 및 저해율의 측정

약 $10^6 \sim 10^8$ CFU/ml 정도의 유산균이 들어 있는 해동시킨 후로즌 요구르 제품에 *E. coli* O157:H7을 인위적으로 접종(spiking)한 다음 냉장고에 5일간 보존하면서 접종된 미생물의 생존율(survival rate)을 대장균은 McCon-

key배지, *L. monocytogenes*는 McBride agar를 각각 사용하여 측정한 바(Table 4), FA사의 Premium mix 중에서는 *E. coli* O157:H7가 2.61%의 생존에 불과하였으나 FB(Cherry chunk)의 경우에는 시험 즉시 접종한 미생물의 14.39%, FC(Banana split)의 경우에는 10.22%만이 생존하는 것으로 나타났다.

*L. monocytogenes*를 접종한 경우에는 FA사 제품, FB사 제품, FC사 제품 중에서 각각 5.45%, 15.61%, 16.89% 생존하였고 대조구는 95.12%의 매우 높은 생존율을 나타냈다.

한편 해동시킨 각 제품 중에 시험 미생물을 균일하게 접종한 다음 37°C에서 6시간 동안 배양시킨 후 측정된 저해율(inhibition rate)은

Table 4. Survival of *E. coli* O157:H7 in three commercial frozen yogurt products refrigerated for 5 days

Frozen yogurts	Viable cell counts(CFU/ml) ¹⁾		Survival(%)
	Initial	Final	
Premium mix(FA)	4.4×10^4	11.5×10^2	2.61
Cherry chunk(FB)	4.1×10^4	5.9×10^3	14.39
Banana split(FC)	4.5×10^4	4.6×10^3	10.22
0.85% saline(Control)	4.2×10^4	4.0×10^4	95.23

1) Average of three duplicate

Table 5. Survival of *Listeria monocytogenes* in three commercial frozen yogurt products refrigerated for 5 days

Frozen yogurts	Viable cell counts(CFU/ml) ¹⁾		Survival(%)
	Initial	Final	
Premium mix(FA)	4.4×10^4	2.4×10^2	0.55
Cherry chunk(FB)	4.1×10^4	6.4×10^3	15.61
Banana split(FC)	4.5×10^4	7.6×10^3	16.89
0.85% saline(Control)	4.1×10^4	3.9×10^4	95.12

1) Average of three duplicate

Table 6. *In vitro* inhibition of *E. coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* by three commercial frozen yogurt products

Frozen yogurts	Inhibition of pathogens(%) ¹⁾	
	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>L. monocytogenes</i>
Premium mix(FA)	12.4	22.0
Cherry chunk(FB)	11.8	20.8
Banana split(FC)	11.5	22.7
0.85% saline (Control)	<1.0	<1.0

1) Average of three duplicate

Table 6과 같았다. *E. coli* O157:H7 및 *L. monocytogenes*에 대하여 FA 12.4%, 25.0%, FB 10.08%, 20.8%, FC 10.26, 22.7%를 보여주었다. 이와 같은 결과로 판단하건대 각 후로즌 요구르트 제품은 항균 활성을 가지고 있다고 생각되었다. 특히 FA사 제품의 병원성 세균 저해활성이 타 2개 회사의 제품보다 우수하게 나타났다. 제품 간에 이러한 항균 활성이 나타나는 원인은 현재로서는 불확실하나 발효용 유산균종의 차이, 제품의 산도 및 pH, 유산균이 생산하는 발효 대사 산물의 차이에 기인한 결과로 추정된다.

이상의 결과를 종합적으로 판단하여 볼 때 3개 회사 제품중에서 FA사 제품이 병원성 세균의 억제 효과 측면에서 가장 우수한 제품으로 볼 수 있었으며 실제로 우유를 발효시킨 후 후로즌 요구르트 제품으로 제조하는 것으로 판단되었다.

고 찰

동결 요구르트 3개 회사 총 7가지 제품 중에

는 coliforms, *E. coli* O157:H7 및 *Listeria monocytogenes*의 오염이 전혀 없는 것으로 나타났다. 단지 분리 과정에서 일부 시료(B와 G)중 McBride 배지상에서 *L. monocytogenes*와 아주 유사한 집락을 관찰하였다. 그러나 이 분리균에 대한 보충시험 통하여 결국 *L. monocytogenes*가 아님을 확인하였다. 따라서 선택 배지로 가장 일반적으로 널리 사용되는 McBride agar만으로는 잘못된 시험 결과를 낼 가능성이 있으므로 유념할 필요가 있다고 생각되었다.

공시된 모든 제품의 pH가 증가할수록 병원성 세균에 대한 저해율이 낮아지고 생존율은 증가하는 양상을 보여주었다. 이 결과는 각 후로즌 요구르트 제품이 *L. monocytogenes* 및 *E. coli* O157:H7의 생육을 억제하는 작용을 가지고 있다고 생각되었다. 그러나 아직 그 원인이 어디에 기인하는가 대한 증거는 현재로서는 불확실하다. 발효 유산균의 차이, 제품의 산도 및 pH, 유산균이 생산하는 발효 대사 산물의 차이에 기인한 결과로 추정된다. 이러한 현상과 관련하여 요구르트의 세균 저해 효과는 hydrogen peroxide, 젖산균이 생산한 각종 organic acids(pH), bacteriocin과 같은 antimicrobial substance의 생산과 관계가 있다는 연구 결과가 보고된 바 있다(Johnson, 1994).

본 연구에서는 계절에 따라 후로즌 요구르트 시료를 구입하여 병원성 세균을 분리, 검출하지 않았으나 연구를 늦가을에 시작하였으므로 병원성 세균이 존재하되 분리되지 않을 가능성을 배제할 수 없었다. 기존의 연구를 보면 *L. monocytogenes*는 봄철의 검출율이 6.67%로서 가장 높았고, 가을철이 1.67%로서 가장 낮았으며, 여름과 겨울철은 3.33%로서 중간 정도라는 보고가 있다(Hayes 등, 1986; Lovett

등, 1987; Faber 등, 1988). 그러나 Doores와 Amelang(1988)은 Pennsylvania의 원유에서 이 균의 검출 경향이 겨울 > 봄 > 여름 > 가을 순위로 검출 빈도가 높았다고 보고하였다. 봄이 *L. monocytogenes*의 검출율이 월등히 높은 이유는 동절기 유우의 주급여 사료인 silage에서 *Listeria*가 오염되기 쉽기 때문으로 추정하였는데, 실제로 Donnelly(1986)에 의하면 *Listeria*에 오염된 사일리지(silage)를 먹인 44두의 Holstein 젖소 중 8두에서 짠 우유에서 이 미생물이 검출되었음을 보고하였다.

한편 국내의 관련 연구(강과 유 1988; 정 1993)를 살펴보면 국산 전지분유, 탈지분유 및 유아용 조제 분유, 버터 치즈 및 요구르트, 총 118개 시료에서 *L. monocytogenes*는 검출되지 않았다. 이것은 가공과정에서의 지속적인 고열처리와 관계되는 것으로 추정하였다. 그러나 가공유(1/30 samples) 및 ice cream(2/40 samples)에서는 각각 검출되었는데, 검출된 두 품목은 그 조성에서 차지하는 우유성분 함량 등으로 미뤄볼 때 원유에서 기인하는 것이라기 보다는 가공 과정 중의 어떤 오염원으로부터 유래되었을 가능성이 큰 것으로 추정 보고되었다.

구미 각국에서 listeriosis 발생 원인으로 가장 주목되고 있는 자연 치즈의 경우, 우리나라에서는 그 소비가 미비한 실정이므로 아직 자연 치즈에 의한 listeriosis 발생 문제는 현 시점에서는 우려할 정도는 아니라 생각되지만 식단의 서구화 경향으로 장차 치즈의 소비가 일반화 되고 있는 추세이므로 이에 대한 대책이 시급히 강구되어야 할 것이다.

요 약

최근에 아이스크림 및 유제품에서 검출되어 큰 문제가 되고 있는 맹독성 병원성 미생물인 *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7가 시중에 판매되고 있는 3개의 외국산 후로즌 요구르트 제품 총 7개 시료중(FA사 5종, FB사 1종, FC사 1종)에 오염되어 있는지 여부와 후로즌 yogurt 중에서 이들의 생존성을 각각 측정할 결과 다음과 같은 성적을 얻었다.

1. 총 7개의 시료중 어느 제품에서도 *L. monocytogenes*는 검출되지 않았다. 대조

구로 사용된 *L. monocytogenes*는 본 연구에서 사용된 증균배지 및 선택 배지에서 생육이 양호하였으며 McBride agar상에서 umbrella형의 집락을 나타냈다. 또한 세균은 Gram 양성, esculin 분해능 양성이었으며 현미경으로 관찰한 결과 단간균의 형태였다.

2. 본 시험에 공시한 3개 회사 7종의 후로즌 요구르트 시료 중에서 coliforms 및 *E. coli* O157:H7을 전혀 검출할 수 없었다.
3. 공시 7개 시료 중의 제품의 유산균수는 FA사 제품이 $2.9 \times 10^8 \sim 1.6 \times 10^9$ cfu/ml, FB사 제품은 1.7×10^6 cfu/ml, FC사 제품은 1.2×10^6 cfu/ml 정도였고, 생균수 함량이 FA사 제품에서 가장 많았다. 또한 FA사 제품은 pH가 4.1~4.6임에 반하여 FB사 및 FC사 제품은 pH 5.2~5.3 정도로 비교적 높았다.
4. 해동시킨 후로즌 요구르트 제품에 *E. coli* O157:H7을 인위적으로 접종(spiking)한 다음 냉장고에 5일간 보존하면서 접종된 미생물의 생존율(survival rate)을 대장균은 McConkey배지, *L. monocytogenes*는 McBride agar를 각각 사용하여 측정할 바, FA사의 Premium mix 중에서는 *E. coli* O157:H7가 2.61%의 생존에 불과하였으나 FB(Cherry chunk)의 경우에는 시험 즉시 접종한 미생물의 14.39%, FC(Banana split)의 경우에는 10.22%만이 생존하는 것으로 나타났다. 또한 *L. monocytogenes*를 접종한 경우에는 FA사 제품, FB사 제품, FC사 제품 중에서 각각 0.55%, 15.61%, 16.89% 생존하였고 대조구는 95.12%의 매우 높은 생존율을 나타냈다.
5. 상기 제품에 공시 미생물을 접종하고 37°C에서 6시간 동안 배양시킨 후 측정할 저해율(inhibition rate)은 *E. coli* O157:H7 및 *L. monocytogenes*에 대하여 FA사 제품 12.4%, 25.0%, FB사 제품 10.08%, 20.8%, FC사 제품 10.26%, 22.7%를 보여주었다.
6. 공시된 모든 제품의 pH가 증가할수록 병원성 세균에 대한 저해율이 낮아지고 생존율은 증가하는 양상을 보여주었다.

7. 이상의 결과는 각 후로즌 요구르트 제품이 *L. monocytogenes* 및 *E. coli* O157:H7의 생육을 억제하는 작용이 있으며, 억제 작용은 제품마다 차이가 큰 것으로 밝혀졌다.

감사의 글

본 연구는 1997년도 연세대학교 매지학술연구비의 부분적인 지원을 받아 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

- Acher, D. L. : Review of the latest FDA information on the presence of *Listeria* in foods. WHO Working Group On Foodborne Listeriosis. Geneva, Switzerland, Feb. 15-19(1988).
- Beckers, H. J., Soentoro, P. S. S. and Delfgouvanasch, E. H. M. : The occurrence of *L. monocytogenes* in soft cheese and raw milk and its resistance to heat. *Int. J. Food Microbiol.*, 4, 249-256(1987).
- Brackett, R. E. M. : Presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in food and water. *Food Technol.*, 42, 162-178 (1988).
- Catelain, R. and Second, L. : Taxonomie numerique de quelques *Brevibacterium*. *Ann. Inst. Pasteur.*, 111, 630-644 (1976).
- Chesemore, R. G. : FDA Bacteriological Analytical Manual, Chapter. 29, *Listeria* isolation; Culture medium substitution in method of analysis. *Federal Register* 55(183), 38753-38754(1990).
- Curtis, G. D. W., Mitchell, R. G., King, A. F. and Griffin, E. J. :- A selective differential medium for the isolation of *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 8, 95-98(1989).
- Donnelly, C. W. : Listeriosis and dairy products; Why now and why milk? *Dairyman*, 131(14), 663-687(1986).
- Doores, S. and Amelang, J. : Incidence of *Listeria monocytogenes* in the raw milk supply in Pennsylvania., 327. Abst. IFT Annual Meeting, New Orleans, LA., U. S. A. (1988).
- Doyle, M. P. : *E. coli* O157:H7 and its significance in foods. *Int. J. Food Microbiol.*, 12, 289-302(1991).
- Doyle, P., Meske, L. M. and Marth, E. H. : Survival of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and storage of nonfat dry milk. *J. Food Protec.*, 48, 740-742(1991).
- El-Shenawy, M. A. and Marth, E. H. : A review; *Listeria monocytogenes* and Foods: History, Characteristics, Implications, Isolation method, and control. *Egyptian J. Dairy Sci.*, 17, 1-18(1989).
- Farber, J. M., Sanders, G. W., Speirs, J. I., Aoust, J. Y. D., Emmons, D. B. and Mckellar, R. : Thermal resistance of *L. monocytogenes* in inoculated and naturally contaminated raw milk. *Intern. J. Food Microbiol.*, 7, 277-286(1988).
- Feng, P. : *E. coli* O157:H7; novel vehicles of infection and emergence of phenotypic variants. *Emerging Infect. Dis.*, 1, 47-52(1995).
- Fernandez-Garayzabal, J. A., Rodriguez, L. D., Boland, J. A. V., Cancelo, J. L. B. and Fernandez, G. S. : *Listeria monocytogenes* dans la tate pasteurise. *Can. J. Microbiol.*, 32, 149-150(1986).
- Gasparovic, E. von., Sabolic, M., Unglaub, W. and Terplan, G. : Untersuchungen uber das Vorkommen Von *L. monocytogenes* in Rohmilch in Sudwurttemberg. *Tierarztl. Umschau*, 44, 783-790(1989).
- Gledel, J. : Epidemiology and significance of listeriosis in France. WHO consultation on prevention and control of listeriosis. Berlin, Dec. 10-12(1986).
- Golnazarlan, C. A., Donnelly, C. W., Pintauro, S. J. and Howard, D. B. :

- Comparison of infectious dose of *Listeria monocytogenes* F5817 as determined for normal versus compromised C57B1/6J mice. *J. Food Prot.*, 52, 696-701(1983).
18. Hayes, P. S., Feely, J. C., Graves, L. M., Ajello, G. W. and Fleming, D. W. : Isolation of *L. monocytogenes* from raw milk. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51, 438-440(1986).
 19. Hird, D. W. : Review of evidence for zoonotic listeriosis. *J. Food Protec.*, 50, 429-433(1987).
 20. Johanson, C., Gram L. and Meyer, A. S. : The combined inhibitory effect of lysozyme and low pH on growth of *L. monocytogenes*. *J. Food Protec.*, 57, 561-566(1994).
 21. Jones, D. : A numerical taxonomic study of coryneform and related bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 87, 52-96(1975).
 22. Kampelmacher, E. H. : Foodborne listeriosis facts and fiction. In *Foodborne Listeriosis*. Proceedings of a symposium, Wiesbaden, FRG. Technomic Pub. Co. Inc. Lancaster, Basel(1990).
 23. Lachia, R. V. : Modified Henry technique for the initial recognition of *Listeria* colonies. Ann. Mtg., Soc. *Indust. Microbiol.*, Seattle, WA, August 13-18. Abstr., p. 44(1989).
 24. Lee, W. H. and McClain, D. : Improved *L. monocytogenes* selective agar. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52, 1215-1217(1986).
 25. Liwen, M. B., and Plautz, M. W. : Occurrence of *L. monocytogenes* in raw milk in Nebraska. *J. Food Protec.*, 51, 840-841(1988).
 26. Lovett, J., Francis, D. W. and Hunt, J. M. : *Listeria monocytogenes* in raw milk; detection, and pathogenicity. *J. Food Protec.* 50, 188-192(1987).
 27. Lovett, J. and Hitchlins, A. D. : *Listeria* isolation, Chater 29. In *Supplement to FDA Bacteriological Manual*, 6th ed(revised). Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA(1991).
 28. Marth, E. H. and Ryser, E. T. : Chapter 23. Occurrence of *Listeria* In foods, milk and dairy foods. Elsevier, Amsterdam, Now York, Oxford(1990).
 29. Rodniguez, L. D., Garayzabal, J. F. F., Boland, J. A. V., Ferri, E. R. and Fernandez, G. S. : Isolation de microorganismes dugenre *Listeria* a partir de lait cru destine ala consommation humalne. *Can. J. Microbiol.*, 31, 38-941(1985).
 30. Ryser, E. T. and Marth, E. H. : *Listeria*, listeriosis and food safety. Chapter 9. In *Listeria in Unfermented Dairy Products*, Marcel Dekker, Inc., NY(1991).
 31. Seeliger, H. P. R. and Jones, D. : In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 9th ed., Williams. and Wilkins, Baltimore, pp. 1235-1245(1987).
 32. Stelma, G. N. Jr., Reyes, A. L., Peeler, J. T., Francis, D. W., Hunt, J. M., Spaulding, P. L., Johnson, C. H. and Lovett, J. : Pathogenicity test for *Listeria monocytogenes* using immunocompromised mice. *J. Clin. Microbiol.*, 25, 2085-2089(1987).
 33. Stuart, M. R. and Pease, P. E. : A numerical study on the relationships of *Listeria* and *Erysipelorhrix*. *J. Gen. Microbiol.*, 73, 551-565(1972).
 34. Stuart, S. E. and Welshimer, H. J. : Taxonomic reexamination of *Listeria* Pirie and transfer of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a new genus, *Murrraya*. *Int. J. System. Bacteriol.*, 24, 177-185(1974).
 35. Synge, B. A. and Hopkins, G. F. : Verotoxigenic *E. coli* 0157:H7 in Scottish calves, *Vet. Rec.*, 130, 583(1992).
 36. U. S. FDA and Milk Ind. Found., Recommended guidelines for controlling environmental contamination in dairy plants. *Dairy Food Sanitations* 8, 52-56(1988).
 37. Weeratna, R. D. and Doyle, M. P. : De-

- tection and production of verotoxin 1 of *E. coli* in food, *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 2951-2955(1991)
38. WHO, Foodborne Listeriosis, Document No. WHO/WHE/FOS/88.5. World Health Organization, Geneva, Switzerland(1988).
39. 강국희, 유익종 : 새로운 식중독 *Listeria monocytogenes*의 문제점. *Kor. Journal of Food Hygiene* 3(4), 241-250(1988).
40. 정동관 : 식중독균 *Listeria monocytogenes*의 문제점. *Kor. Journal of Food Hygiene* 8(2), S1-S11(1993).

(1998년 1월 30일 접수)