

냉동식품에서 분리한 *Yersinia enterocolitica*의 특성

임순영 · 윤석권
동덕여자대학교 식품영양학과

Characteristics of *Yersinia enterocolitica* Isolated from Frozen Foods.

Soon Young Lim and Suk-Kwon Yoon
Department of Food and Nutrition, Dongduk Women's University

Abstract

Overall prevalence of *Y. enterocolitica* in frozen foods was 5.6% (35 cases of 624 samples). Seasonal variation of contamination was observed. Isolation rate of *Y. enterocolitica* from samples collected in the second half of the year was six times higher than those of the first half of the year. Serotype of the isolated *Y. enterocolitica* was mainly serotype O:5 (9 cases). However, 25 cases of 35 isolates could not be serotyped with antiserum used in this study. The biotype test showed that all isolates were non-pathogenic type 1A. The polymerase chain reaction test with *ail* gene specific primers also confirmed that pathogenic strains were not found in frozen food isolates.

Key words : *Y. enterocolitica*, frozen foods, serotype, polymerase chain reaction, pathogenic, biotype

서 론

현대사회가 발전함에 따라 여성들의 사회참여도가 높아졌으며 이로 인한 가정내 식습관에 많은 변화가 생겼다. 즉, 외식횟수가 점차로 증가되는 추세이며 짧은 시간 내에 간편하게 조리할 수 있는 식품에 대한 요구가 높아졌다. 이러한 사회현상으로 냉동식품의 수요가 급증하였으며 그 종류도 매우 다양해 졌다.

소비자들이 냉동식품을 안전하게 이용할 수 있도록 하기 위해서는 위생적인 식품처리와 공급과정이 요구되며 구입 후 빠른 시간 내에 소비하도록 하는 것이 필요하다. 최근의 여러 연구들은 식품을 냉장고에서 장 시간 보관시 변패하는 등 식품 위생적 측면에서 바람직하지 않은 상황이 초래된다는 보고를 하고 있으며, 가장 큰 원인으로 냉장고에서 생존과 성장이 가능한 미생물 때문이다. 예를 들면 *Bacillus cereus*,

Aeromonas hydrophila, *Yersinia enterocolitica* 그리고 *Clostridium botulinum* 등이다⁽¹⁾. 이중 *Y. enterocolitica*는 사람과 동물에게 급성 위장질환, 패혈증, 피부의 결절성 홍반 그리고 다발성 관절염 등과 같은 예시니아증(yersiniosis)을 일으키는 병원균으로 알려져 있다⁽²⁾.

*Y. enterocolitica*는 다른 장내 세균에 비하여 분리율이 낮았으므로 최근까지는 그 중요시 되지 않았으나⁽³⁾ 임 등⁽⁴⁾은 서울, 대전, 광주, 부산 4개 지역에서 463개의 식육시료중 17.5%에서 *Y. enterocolitica*가 분리되었고 그중 10%(8개시료)가 병원성이 있었다고 보고 하였다. *Y. enterocolitica*는 냉장상태에서 최소한 6개월을 살 수 있으며⁽⁵⁾, 진공포장상태에서도 증식할 수 있는 특성을 가지고 있다⁽⁶⁾. 그리고 냉동온도에서도 생존이 가능하다. 우유중의 *Y. enterocolitica*는 냉동(-20°C) 상태에서 30일간 계속 저장하더라도 생존에는 거의 영향이 없었다고 한다⁽⁷⁾.

이와 같이 *Y. enterocolitica*가 저온에서 생존과 증식을 계속할 수 있다는 것은 식품위생상 중요한 의미가 있으므로 본 연구에서는 서울을 비롯한 우리나라 5개 지역에서 유통중인 냉동식품을 대상으로 *Y. enterocolitica*의 분포를 조사하고 분리 균의 특성을 규명 하였다.

Corresponding author : Suk-Kwon Yoon, Dept. of Food and Nutrition, Dongduk Women's University, Weolgokdong, Seongbukgu, Seoul, 136-714, Korea
Tel : 82-2-940-4461
Fax : 82-2-940-4193
E-mail : sky@dongduk.ac.kr

Table 1. Number of samples collected from different area in Korea

Region	Number of samples		
	1st half of year	2nd half of year	Total
Seoul	112	119	231
Daejeon	50	46	96
Kwangju	52	52	104
Pusan	50	50	100
Jeju	46	47	93
Total	310	314	624

재료 및 방법

실험재료

1997년 3월부터 10월까지 서울, 대전, 광주, 부산 그리고 제주 등 5개 지역에서 냉동만두, 피자, 식육가공품 등을 대상으로 Table 1에서와 같이 상반기 310건 하반기 314건, 총 624건의 냉동식품을 구입하여 *Y. enterocolitica*의 오염도를 측정하기 위한 시료로 사용하였다.

***Y. enterocolitica*의 분리 및 확인 시험**

*Y. enterocolitica*의 분리는 미국 FDA 표준방법에⁽⁸⁾ 따라 시험하였다. 즉 검체 25 g을 225 mL peptone sorbitol bile broth(PSBB)에 넣고 homogenizer로 분쇄한 후 10°C에서 10일간 중균배양하였다. 중균배양액 0.1 mL를 1 mL의 0.5% KOH/ 0.5% NaCl에 넣어 5-10초간 잘 섞은 후 MacConkey agar와 Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin(CIN) agar에 각각 획선도말하여 30°C에서 48시간 배양하였다. *Y. enterocolitica*는 MacConkey agar에서는 옅거나 무색 투명한 집락을 형성하였으며 CIN agar에서는 집락 중앙이 짙은 붉은 색을 띠고 주위가 투명한 모양을 띠어 일명 'Bull's eye'의 모양이었다. 이러한 전형적인 집락을 선별하여 brain heart infusion(BHI) agar에 계대배양하였다.

*Y. enterocolitica*인지를 확인하기 위하여 Kligler's iron agar(KIA), urease, L-lysine decarboxylase 및 citrate 이용 등의 생화학반응 시험을 하였으며 API test (BioMerieux, France)를 통하여 최종적으로 *Y. enterocolitica*로 확인된 균주는 -70°C에 보관하였다.

Serotyping

시험균의 혈청형은 slide agglutination 방법을 이용하여 실시하였다. 항혈청은 상품화된 제품(Denka Seiken Co., Japan)을 사용하였으며, 항혈청의 종류로는 O:1,2; O:3; O:5; O:8; O:9등 5가지였으며 시험은 제조회사의 방법에 따라 수행하였다.

Biotyping

Biotyping은 Fukushima 등⁽⁹⁻¹²⁾의 정의를 종합하여 Table 2와 같이 하였다. 즉, *Y. enterocolitica*의 분리균주들을 생화학적 특성에 따라 크게 5가지로 구분하였으며, 이러한 biotype의 구분은 병원성과 매우 연관이 깊다고 알려져 있다⁽¹³⁾.

중합효소연쇄반응(Polymerase chain reaction,PCR)

냉동식품에서 분리된 *Y. enterocolitica*의 병원성여부를 확인하기 위하여 PCR을 실시하였다. PCR에 사용된 primer는 오동⁽¹⁴⁾이 사용한 것을 이용하였으며 이것은 *Y. enterocolitica*의 병원성과 관련 있는 ail gene에 특이적인 2가지의 primer로서 각 primer의 sequence는 각각 Ail 1이 5'-CGTCTGTTAATGTGTACGCTGC-3'이고, Ail 2가 5'-GGTGCCAACCTTTTATGCTATCG-3'이었다.

PCR을 위한 template DNA는 다음과 같은 방법으로 제조하여 사용하였다. 우선 *Y. enterocolitica*를 획선 배양한 평판배지에서 한 개의 집락을 선택하여 BHI broth에 접종한 후 37°C에서 24시간 배양하였다. 50 µL의 배양액을 3,000 rpm에서 5분간 원심 분리한 후 pellet

Table 2. Main biochemical features of *Y. enterocolitica* biotypes

Biochemical feature	Biotypes							
	1A	1B	2	3	3A	3B	4	5
Esculin hydrolysis	+	-	-	-	-	(+)	-	-
Salicin fermentation(acid in 24 h)	+	-	-	-	?	?	-	-
Pyrazinamidase activity	+	-	-	-	+	+	-	-
Indole production	+	+	-	-	-	-	-	-
Acid production from xylose	+	+	+	+	+	+	-	V
Voges-Prokauer test	+	+	+	±	-	-	+	+
Nitrate reduction	+	+	+	+	+	+	+	-
Inositol fermentation	+	+	+	+	±	-	+	+

+: positive, -: negative, ?: not sure, V: variable.

Table 3. Incidence of *Y. enterocolitica* in various frozen foods

Groups of foods	No. of samples	No. of positive samples		
		1st half of the year	2nd half of the year	Total(%)
Kyoza	115	1	3	4(3.5)
Pizza	117	-	2	2(1.7)
Processed meat foods	235	4	14	18(7.7)
Processed sea foods	99	-	9	9(9.1)
Others	58	-	2	2(3.4)
Total	624	5	30	35(5.6)

을 멸균증류수 50 μ L에 균일하게 풀고 100°C에서 15분간 끓였다. 이것을 10,000 rpm에서 15분간 원심 분리한 후 상등액을 template DNA로 사용하였다.

Reaction mixture는 0.5 mL microtube에 10 \times reaction buffer 5 μ L, primer (100 μ M) 각각 0.3 μ L, dNTP(1 mM) 3 μ L, AmpliTaq DNA polymerase(5 units/ μ L) 0.2 μ L와 증류수 15.9 μ L를 가하여 만들었다. 여기에 template DNA(1 ng/ μ L) 6 μ L를 가하여 총 30.7 μ L가 되도록 한 후, Touch down thermal cycler (Hybaid Co., England)를 이용하여 PCR을 행하였다. PCR조건은 denaturation 94°C 1분, annealing 56°C 1분 그리고 extension 72°C, 1분 30초를 1 cycle로 하여 35 cycle을 반응시켰다. PCR이 끝난 후 1.0% agarose gel electrophoresis를 이용하여 증폭된 458bp band의 유무를 확인하였다.

결과 및 고찰

냉동식품중 *Y. enterocolitica*의 오염도 조사

서울, 대전, 광주, 부산, 제주 지역에서 구입한 냉동 만두, 피자, 식육가공품등 총 624건의 냉동식품중 *Y. enterocolitica*는 Table 3과 같이 35건(5.6%)이 분리되었다. 오징어와 새우 튀김 등의 해산물가공품에서의 분리율(9.1%)이 가장 높았고, 다음으로 동그라뽕과 햄버거 패티 등의 식육가공품(7.7%), 만두류(3.5%), 기타 냉동식품(3.4%)의 순이었으며 냉동피자류(1.7%)가 가장 낮은 분리율을 보였다. 아르헨티나의 냉동 저민 대구류중 *Y. enterocolitica*의 분리율은 3.7%(18)로 보고되었으나 본 연구의 해산물가공품 분리율은(9.1%) 이 보다 더 높게 나타났다. 그러나 임 등⁽⁴⁾이 보고한 식육중의 *Y. enterocolitica* 오염도 보다 낮았다.

냉동식품에 대한 *Y. enterocolitica*의 오염원인으로는 식품처리과정중 주변환경에서의 교차오염을 들 수 있다. 일반적으로 식육(소고기, 돼지고기, 닭고기)^(4,17) 및 해산물(새우, 게, 굴)⁽¹⁹⁾ 등은 *Y. enterocolitica*에 오염된 사례가 이미 여러 차례 보고된 바 있다. 이들을 원재

료로 하는 냉동식품의 경우, 도축과정등의 원재료 처리과정에서 이미 오염되었을 경우 이들 식재료를 이용하여 제조하는 냉동식품들도 오염될 가능성이 크다. 이와 달리 만두류와 같이 완전 조리되어 약간의 가운을 통해 섭취하는 냉동식품에서 균이 분리되는 경우는 증숙과정의 미흡과 주위환경에서의 재오염이 원인일 가능성이 크다.

저온균인 *Y. enterocolitica*는 열처리에 비교적 민감하여 60°C, 30분간의 열처리에 의해서 사멸된다. 그러므로 이러한 열처리를 통해 제조된 식품은 비교적 안전하나 우유, 음용수, ready-to-eat식품 등은 *Y. enterocolitica*의 교차오염이 발생할 경우 심각한 문제를 초래할 수 있으므로 식품처리 종사자들의 철저한 개인위생이 요구된다⁽¹⁹⁾. 특히 물의 경우 우리나라의 여러 약수터가 *Y. enterocolitica*에 오염된 사례가 발생하였는 데⁽²⁰⁾ 만약 이러한 물을 조리용이나 음용수로 이용할 경우 식품으로의 교차오염과 이로 인한 여시니아증의 발병 우려가 있으므로 깨끗한 물이 항상 공급되도록 해야 한다⁽¹⁹⁾.

시료 채취 기간에 따른 *Y. enterocolitica*의 분리를 비교

상반기(310건)와 하반기(314건)로 나누어 시료를 채취한 후 *Y. enterocolitica*를 분리한 결과 분리율은 각각 1.6%와 9.6%로 하반기가 상반기에 비하여 분리율이 6배가 높았다(Table 3). 임 등⁽⁴⁾은 닭고기와 돼지고기에서 상반기보다 하반기에서 2배 이상 높은 *Y. enterocolitica*가 분리되었다고 보고 하였는데 냉동식품은 이보다 계절별 차이가 훨씬 많았다. 이러한 계절에 따른 분리율의 차이는 *Y. enterocolitica*의 분리율이 가을과 겨울에 최고점에 이른다⁽²¹⁻²²⁾는 이전의 연구결과와 동일한 경향을 나타냈다.

상반기와 하반기에 *Y. enterocolitica*가 분리된 대상식품의 종류도 차이를 보였는데 상반기는 만두류(1건)를 제외하면 모두 식육가공품이었으나 하반기는 모든 식품군에서 골고루 분리되었다는 점이 특이하였다.

분리균의 biotyping 및 serotyping

일반적으로 5가지의 biotype중 biotype 1A, 3A 그리고 3B는 비병원성이며 이들을 제외한 1B~5까지는 병원성으로 알려져 있다⁽¹³⁾. 본 연구에서 분리된 균주 모두가 biotype 1A이었으며 모두 비병원성 biotype에 속했다.

냉동식품 분리균주의 혈청형은 O:5가 9건으로 가장 많았으며 O:1,2는 1건이었고 나머지 25건은 본 연구에서 사용한 항혈청으로는 typing 되지 않았다. O:5는 총 9건중 8건(89%)이 식육가공품, 1건(11%)이 해산물가공품에서 분리된 것이었으며, O:1,2는 수입 해산물가공품에서 분리된 것이었다. 임 등⁽⁴⁾은 식육에서 O:3 및 O:8을 분리하였다고 보고 하였으나 본 연구에서는 분리되지 않았다.

일반적으로 O:1,2와 O:5는 비병원성 혈청형으로 알려져 있으므로 혈청형으로만 본다면 본 연구에서 분리된 균주들은 모두 비병원성이라고 할 수 있다. 그러나 아르헨티나의 냉동대구류에서 분리된 12개의 균주중 혈청형이 O:5인 2개의 균주가 병원성을 나타내기도 하였으므로⁽¹⁸⁾ 혈청형만으로 병원성을 판단하기에는 문제점이 있으므로 serotyping이외의 병원성확인 실험이 필요하다고 보고 하였다.

냉동식품뿐만 아니라 1993년 아르헨티나에서는 냉장식품에서도 *Y. enterocolitica*의 분리사례가 보고된 바 있는데, 총 450건의 검체 중 햄에서 O:9(1%), 훈제 소시지에서 O:5와 O:9(1.33%)가 분리되었으며, 이중 O:9는 병원성혈청형이었다⁽²³⁾. 본 냉동식품연구의 분리 균주들은 모두 비병원성으로 확인되었지만 냉장식품들에서 병원성 *Y. enterocolitica*의 분리사례가 보고되고 있으므로 식품위생을 위하여 앞으로 좀더 다양한 식품에 대한 분석과 관리가 필요하다고 사료된다.

중합효소 연쇄반응(PCR)

*Y. enterocolitica*의 병원성 여부를 알아보기 위하여 primer Ail 1과 Ail 2를 이용하여 중합효소연쇄반응을 행하였다. 이들 primer는 진핵세포에 대한 침투능력과 관련된 *ail* gene에 특이적인 것으로 이 유전자를 보유한 *Y. enterocolitica*는 100% 병원성이 있다고 밝혀졌으며 이 primer를 이용하여 PCR을 행할 경우 병원성 *Y. enterocolitica*는 458bp의 DNA fragment를 형성한다고 알려져 있다⁽¹⁴⁾. 본 연구의 분리균주들에 대한 PCR실험결과 458bp DNA fragment를 형성한 균주는 없었으며 냉동식품에서 분리된 균주들은 serotyping과 biotyping에서 나타난 결과와 같이 모두 비병원성으로 판단된다.

요 약

서울등 5개지역에서 수거한 냉동식품 624건을 대상으로 *Y. enterocolitica*를 분리하였다. 분리대상 식품군중 해산물가공품중에서 *Y. enterocolitica*의 분리율(9.1%)이 가장 높았고, 다음으로 식육가공품(7.7%), 만두류(3.5%), 기타 냉동식품(3.4%)의 순이었으며 냉동피자류(1.7%)는 분리율이 가장 낮았다. 그리고 상반기와 하반기의 분리율이 차이를 보였는데 각각 1.6%와 9.6%로 하반기가 상반기에 비하여 분리율이 6배가 높았다.

냉동식품에서 분리된 *Y. enterocolitica* 균주는 모두 35개(5.6%)였고, 분리균주의 serotype은 O:5(9균주)와 O:1,2(1균주)이었다. 이외의 나머지 25개 균주는 본 연구에서 사용한 항혈청에 응집반응을 보이지 않아 혈청형을 typing할 수 없었다. 그리고 이들 균주를 biotyping한 결과 모두 비병원성인 biotype 1A이었으며 중합효소연쇄반응(PCR)으로 확인 결과 또한 모두 비병원성으로 판명되었다.

문 헌

- Schofield, G.M. Emerging foodborne pathogens and their significance in chilled foods. *J. Appl. Bacteriol.* 72: 267-273 (1992)
- Choi, C.S., Park, S.G., Youn, Y.D., Chung, S.I. and Yang, Y.T. Production of heat-stable enterotoxine and virulence-associated cultural characteristics of porcine strains of *Yersinia enterocolitica* and related species with or without plasmid. *J. Korean Soc. Microbiol.* 25(2): 135-146 (1990)
- Heong, S.I. and Kim, J.S. Biotype, serotype and biochemical properties of *Yersinia enterocolitica* isolated in Korea. *J. Korean. Med. Assoc.* 30(4): 421-428 (1987)
- Lim, S.Y., Lee, D.H., Park, S.H., Park, Y.S., Yoon, S.K. and Kim, C.M. Characteristics of *Yersinia enterocolitica* isolated from foods. *Korean J. Food Sci. Technol.* 31(1): 183-188 (1990)
- Harvey, S., Greenwood, J.R., Pickett, M.J. and Mah, R.A. Recovery of *Yersinia enterocolitica* from streams and lakes of California: *Appl. Environ. Microbiol.* 32(3): 352-354 (1976)
- Hartung, M. and Gerigk, K. *Yersinia* in effluents from the food-processing industry. *Rev. Sci. Tech.* 10(3): 799-811 (1991)
- Toora, S. Budu, A.E., Ablett, R.F. and Smith, J. Effect of high-temperature short-time pasteurization milk freezing and thawing and constant freezing, on the survival of *Yersinia enterocolitica*. *J. Food Prot.* 55(10): 803-805 (1992)
- Stephen, D., Weagant, P.F. and John, T.S. *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*, *Bacteriological analytical manual*. 7th ed., Food and Drug

- Administration, p. 8.01-8.13 (1992)
9. Fukushima, H., Tsubokura, M., Oksuki, K. and Kawaoka, Y. Biochemical heterogeneity of serotype O:3 strains of 700 *Yersinia* strains isolated from humans, other mammals, flies, animal feed, and river water. *Curr. Microbiol.* 11: 149-154 (1985)
 10. Cornelis, G., Laroche, Y., Baligand, G., Sory, M.P. and Wauters, G. *Yersinia enterocolitica*, a primary model for bacterial invasiveness. *Rev. Infect. Diseases* 9(1): 64-87 (1987)
 11. Wauters, G., Janssens, M., Stegerwalt, A.G. and Brenner, D.J. *Yersinia mollaretii* sp. nov. and *Yersinia Bercovieri* sp. nov., formerly called *Yersinia enterocolitica* biogroups 3A and 3B. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 38(4): 424-429 (1988)
 12. Kannko, S. and Maruyama, T. Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3 biotype 3 strains. *J. Clin. Microbiol.* 25: 454-455 (1987)
 13. Burnens, A.P., Frey, A. and Nicolet, J. Association between clinical presentation, biogroups and virulence attribute of *Yersinia enterocolitica* strains in human diarrhoeal disease. *Epidemol. Infect.* 116: 27-34 (1996)
 14. Oh, H.J., Kim, C.M., Seong, W.K. and Min, H.K. Study on the development of rapid detection method for pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* by Polymerase Chain Reaction. *J. Korean Soc. Microbiol.* 31(2): 165-173 (1996)
 15. Aulisio, C.C.G., Mehlman, I.J. and Sanders, A.C. Alkali method for rapid recovery of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* from food. *Appl. Environ. Microbiol.* 39(1): 135-140 (1980)
 16. Swaminathan, B., Harmon, M.C. and Mehlman, I.J. A review *Yersinia enterocolitica*. *J. Appl. Bacteriol.* 52: 151-183 (1982)
 17. Kapperud, G. *Yersinia enterocolitica* in food hygiene. *Int. J. Food Microbiol.* 12: 53-65 (1991)
 18. Velazquez, L del C., Cudero, M.E. and Guzman, A.M.S. Prevalence of *Yersinia enterocolitica* in hake (*Merluccius hubbsi*) filets. *J. Food Prot.* 59(7): 781-783 (1996)
 19. Peixotto, S.S., Finne, G., Hanna, M.O. and Vanderzant, C. Presence, growth and survival of *Yersinia enterocolitica* in oysters, shrimp and crab. *J. Food Prot.* 42: 974-981 (1979)
 20. The health and social daily news(in Korean). 1998. 8. 20. p. 34-35
 21. Cover, T.L. and Aber, R.C. Medical progress-(*Yersinia enterocolitica*), *N. Engl. J. Med.* 321(1): 16-24 (1989)
 22. Mary C.R., Cogan, T.M. and Tobin, S. Incidence of pathogenic bacteria in raw milk in Ireland. *J. Appl. Bacteriol.* 73: 331-336 (1992)
 23. Velazquez, L del C. and Escudero, M.E. Biobars, serobars and phagovars of *Yersinia enterocolitica* isolated from 450 samples of cold food in San Luis, Argentina. *J. Food Prot.* 56(4): 333-335 (1993)

(2000년 3월 22일 접수)