

환자 분리 *Listeria monocytogenes* YM-7의 저온내성 특성

김영목* · 박미연¹ · 목종수² · 김지회² · 장동석¹
경북대학교 농업과학기술연구소, ¹부경대학교 식품공학과, ²국립수산과학원

Psychrotrophic Characteristics of *Listeria monocytogenes* YM-7 Isolated from a Patient

Young Mog KIM*, Mi Yeon PARK¹, Jong Soo MOK²,
Ji Hoe KIM² and Dong Suck CHANG¹

Institute of Agricultural Science & Technology, Kyungpook National University,
Taegu 702-701, Korea

¹Department of Food Science & Technology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

²National Fisheries Research & Development Institute, Busan 619-900, Korea

Psychrotrophic characteristics of *Listeria monocytogenes* YM-7 showed similar growth at 8°C as *L. monocytogenes* ATCC 15313. But it showed different growth pattern at 4°C. Thus, the isolated strain from the patient can not grow at 4°C, while *L. monocytogenes* ATCC 15313 grow slowly. Number of the injured cells of *L. monocytogenes* YM-7 was higher at -3°C than at -18°C in phosphate buffer solution. The rate of the injured cell was higher in the TSB (tryptic soy broth) medium than in phosphate buffer solution at -3°C and -18°C. When *L. monocytogenes* YM-7 stored at -18°C in homogenized fish muscle, the cell numbers decreased by 2-3 log cycles in 12 weeks.

Key words: *Listeria monocytogenes* YM-7, Psychrotrophic characteristics

서 론

*Listeria monocytogenes*는 Gram 양성, 무포자 간균의 식중독 및 병원성 세균으로 특히 저온에서도 증식 가능하기 때문에 일반식품 뿐만 아니라 냉동식품과 유제품 등의 저온보장 식품에서도 검출될 확률이 높은 균으로 알려져 있고, 이러한 점이 최근의 냉동 유통제품의 급격한 증가에 따라 문제시되고 있다 (Johson et al, 1990; Vasavada, 1988).

이 균은 사람과 가금류 뿐만 아니라 물, 공기, 목초, 하수 등의 자연계와 거의 대부분의 식품 (우유, 육류, 채소류, 수산물 가공식품, 냉동식품 등)에서 분포, 검출되고 있다 (Fuchs and Surendran, 1989; Pini and Gilbert, 1988; Skovgard and Morgen, 1988; Szabo et al., 2000). 특히 1980년대에 들어와 이 균에 의한 집단 식중독이 유럽과 북미대륙에서 발생하여 주목을 받기 시작했다. 예를 들면 1981년 캐나다에서 양배추 샐러드인 coleslaw 섭취에 의한 환자발생, 1983년 미국 메사추세츠주에서 저온살균우유에 의한 환자발생, 그리고 1987년 덴마크, 스위스, 영국 등의 유럽지역에서도 리스테리아증 (listeriosis) 발생하는 등 *L. monocytogenes*에 의한 식중독사고는 전 세계적으로 증가 추세에 있다 (Faber and Peterkin, 1991; Fleming et al., 1985). 이 균은 현재 미국 식품의약국에 의해 우유, 아이스크림, 치즈 및 수산가공편의식품 (ready to eat fishery product) 등의 무가공식품에서 검출되어서는 안 되는 미생물로 규정하고 있다 (FDA, 1996).

*L. monocytogenes*는 인간의 면역계와 결합하여 listeriosis (리스테리아증)를 일으키는 원인 균으로, 감염증상은 패혈증, 뇌막염, 중추신경마비, 폐렴 등이며 면역능력이 약한 임산부, 노약자, 암환자, 간경변 환자 등에게서 감염될 확률이 높다. 특히 임산부가 이 균에 감염되면 신생아 패혈증을 일으키거나 태아가 사망하는 등 매우 심각하다고 보고되고 있으며, 이 질병으로 인한 사망율은 약 30% 정도로 매우 높다고 알려져 있다 (Schuchat et al., 1991).

우리나라에서도 1993년 뉴질랜드산 수입 홍합에서 *L. monocytogenes*가 최초로 검출된 이후, 다양한 종류의 식품에서 *L. monocytogenes*의 분리가 보고되고 있다 (Cha et al., 1998; Chang, 1999; Kim and Yoon, 1998). 그러나, 냉동식품의 소비가 급격히 증가하고 있는 실정에 비해 냉장 온도대에 대한 연구보고 (Fernandes et al., 1998; Hao et al., 1998; Rorvik et al., 1991)는 많지만 냉동식품에 적용되는 온도대에서 이 균의 저온내성에 관한 연구는 국내에서는 없는 상태이다.

본 연구는 *L. monocytogenes*균으로 인한 중독사고 방지에 필요한 자료를 얻기 위하여 저온 및 동결온도 영역 (0°C, -3°C, -18°C)에서의 내성과 저장조건에 따른 균 수 변화를 측정하여 리스테리아증 (listeriosis) 환자로부터 분리한 *L. monocytogenes* YM-7균의 저온 내성을 구명하였다.

재료 및 방법

실험재료

*Corresponding author: ymkimchoi@hanmail.net

사용균주

시험용 균주는 리스테리아증 (listeriosis) 환자로부터 분리한 *L. monocytogenes* YM-7 (Kim et al., 1995)와 표준균주인 *L. monocytogenes* ATCC 15313을 사용하였다.

배 지

시험에 사용한 모든 배지는 Difco사 (U.S.A.) 제품으로 *L. monocytogenes* 증균배지로는 tryptic soy broth (TSB)를 사용하였으며, 생균수 측정은 tryptic soy agar에 0.6%의 yeast extract를 첨가한 배지 (TSYE)를 사용하였다. 어육에서의 *L. monocytogenes*균 수는 LPM (lithium chloride phenylethanol agar)배지를 이용하여 측정하였다.

실험방법

인산완충용액과 TSB 배지에서의 균 수 측정

L. monocytogenes YM-7의 증식에 대한 온도의 영향을 알아보기 위해 다양한 온도대(4, 8, 20, 37, 40°C)에서 균의 증식을 TSB 배지에서 관찰하였다.

L. monocytogenes YM-7의 증식이 불가능한 온도대 (0, -3, -18°C)에서 기질에 따른 저온내성의 차이를 알아보기 위하여 유기물질이 전혀 함유되어 있지 않은 인산완충용액과 균 증식용 TSB 배지에 *L. monocytogenes*균을 10⁵-10⁶/mL 접종한 후, 저장시간 경과에 따른 균 수 변화를 시험하였다.

사멸 및 손상된 *L. monocytogenes*균 수 측정

저온에 의하여 손상된 세균 (Injured cell)을 Golden 등 (Golden et al., 1988)의 방법에 따라 TSYE 배지와 여기에 8%의 NaCl을 첨가한 배지를 사용하여 측정하였다. 실험 후 사멸된 균 수와 손상된 균 수는 아래와 같은 식에 의하여 구하였다.

$$\text{Death cells} = \text{Initial viable cells} - A$$

$$\text{Injured cells} = A - B$$

A: Viable cells (log/mL) in TSYE agar at Tx

B: Viable cells (log/mL) in TSYE agar with 8% NaCl at Tx

Tx: Storage times for viable cells counting

어육에서의 균 수 측정

동결 온도에서 *L. monocytogenes*의 생육에 어육이 어떠한 영향을 미치는가를 알아보기 위해 대표적인 적색육인 고등어육과 백색육인 대구육을 선택하여 균 수의 변화를 보았다. 실험에 사용한 고등어 (*Scombrina japonicus*)와 대구 (*Gadus macrocephalus*)는 냉동되지 않은 선어를 부산 소재 자갈치 어시장에서 구입하였다. 무균적으로 어육의 피부 조직을 제거한 후에 각각의 어육 부분만을 취하여 육무게의 4배 되게 인산완충용액 (0.1 M, pH 7.0)을 가하여 균질화 시킨 다음, *L. monocytogenes*균을 10⁵-10⁶/g 되도록 접종하여 저장시간 경과에 따른 균 수의 변화를 살펴보았다. 여기에서 보고된 모든 결과는 두 번 반복한 결과의 평균값으로 나타내었다.

결과 및 고찰

시험용 배지에서 *L. monocytogenes* YM-7의 저온 내성

TSB 배지에 접종한 *L. monocytogenes* YM-7과 ATCC 15313균의 저온 영역에서의 증식을 Fig. 1에 나타내었다. 표준균주는 4°C와 8°C에서도 완전한 증식이 관찰되었다. 이에 비하여 분리 균주인 YM-7은 4°C에서는 증식하지 못하였으나, 8°C에서는 표준균주와 거의 유사한 증식정도를 나타내었다. 이러한 결과는 대부분의 *L. monocytogenes*가 4°C에서 증식이 가능하다는 보고 (Johnson et al., 1990)와는 달라 환자 분리 균주인 이 균만의 독특한 특성중의 하나로 여겨진다. 한편, 고온 영역인 20-40°C 사이에서는 두 균주간 별다른 배양학적 차이가 관찰되지 않았다.

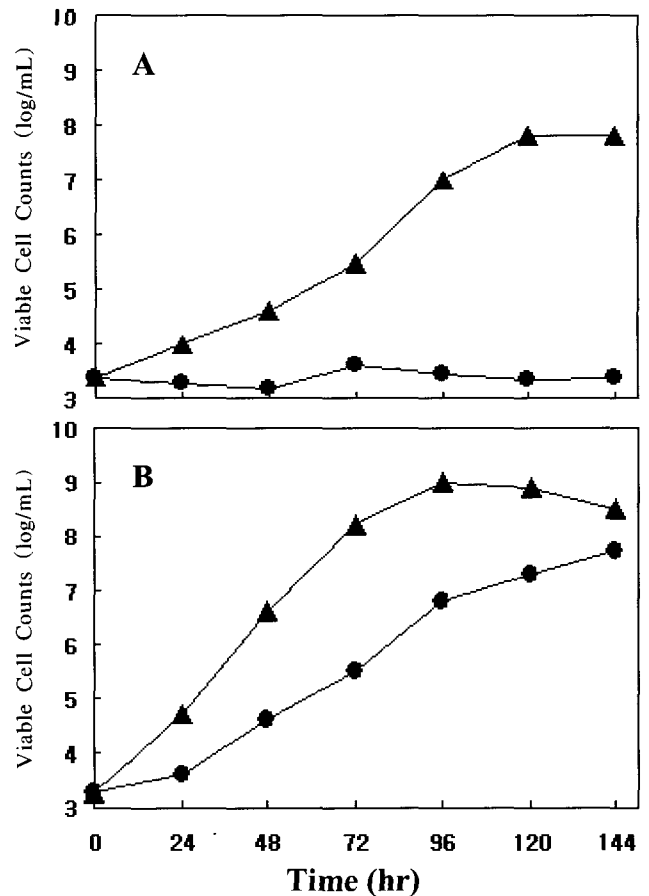


Fig. 1. Effect of temperature on the growth of *Listeria monocytogenes* YM-7 (A) and *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 (B) in tryptic soy broth. ●, 4°C; ▲, 8°C.

TSB 배지에 존재하는 유기물질이 *L. monocytogenes* YM-7의 생존에 어떠한 영향을 미치는가에 대해서 알아보기 위하여 유기물질이 전혀 함유되어 있지 않은 인산완충용액과 비교 검토하였다. TSB 배지와 인산완충용액에 균을 접종하여 0°C에서 저장했을 때의 균 수의 변화는 Table 1에 나타

내었다. 0℃에서 TSB 배지에 접종한 *L. monocytogenes* YM-7은 저장 4주 동안 별다른 균 수의 변화가 나타나지 않았으나 시간이 경과할수록 손상을 받아 4주 후에는 초기 균 수의 22% 정도의 세포가 손상되었다. 그러나 인산완충용액에 접종한 *L. monocytogenes* YM-7은 점진적으로 사멸하여 4주 후에는 1.2 log cycle 정도 감소하였으며, 97% 정도의 세포가 손상되었다.

TSB 배지와 인산완충용액에 균을 접종하여 -3℃에서 저장했을 때의 균 수 변화는 Table 2와 같다. -3℃에서 TSB 배지에 접종한 *L. monocytogenes* YM-7도 0℃에서처럼 균 수의

큰 변화는 관찰되지 않았으나 시간이 경과함에 따라 손상세포가 급격히 증가하여 저장 4주 후에는 80% 정도의 손상을 보였고, 인산완충용액에 접종한 균은 점진적으로 사멸되어 4주 후에는 1.3 log cycle 정도 감소하여 사멸 균 수에 있어서는 0℃ 경우와 큰 차이가 없었다.

TSB 배지와 인산완충용액에 균을 접종하여 -18℃에서 동결 저장했을 때의 균 수 변화를 Table 3에 나타내었다. TSB 배지에 균주를 접종해서 -18℃에서 동결 저장했을 경우 *L. monocytogenes* YM-7은 저장 1주 후 1.3 log cycle, 4주 후 1.8 log cycle, 8주 후 2.5 log cycle, 12주 후에 2.7 log cycle 정도 감소했으나 완전히 사멸하지는 않았고, 저장기간의 경과

Table 1. Changes of cell numbers (log/mL) of *Listeria monocytogenes* YM-7 during storage at 0℃. Numbers in parenthesis indicate the rate of injured cells (%).

Suspending liquid	Division	Storage times (weeks)				
		0	1	2	3	4
Tryptic soy broth	Vegetative cells	5.602	5.590	5.702	5.591	5.584
	Dead cells		-0.012	0.100	-0.011	-0.018
	Injured cells		0.352 (6.3)	0.627 (11.0)	0.783 (14.0)	1.228 (22.0)
Phosphate buffer	Vegetative cells	5.602	5.415	5.176	4.779	4.362
	Dead cells		-0.187	-0.426	-0.803	-1.240
	Injured cells		2.274 (42.0)	4.545 (87.8)	4.406 (92.2)	4.231 (97.0)

Table 2. Changes of cell numbers (log/mL) of *Listeria monocytogenes* YM-7 during storage at -3℃. Numbers in parenthesis indicate the rate of injured cells (%).

Suspending liquid	Division	Storage times (weeks)				
		0	1	2	3	4
Tryptic soy broth	Vegetative cells	5.602	5.592	5.580	5.556	5.554
	Dead cells		-0.010	-0.022	-0.046	-0.058
	Injured cells		0.682 (12.2)	4.073 (73.0)	4.334 (78.0)	4.565 (82.2)
Phosphate buffer	Vegetative cells	5.602	5.176	4.820	4.633	4.342
	Dead cells		-0.426	-0.782	-0.967	-1.260
	Injured cells		2.158 (41.7)	1.928 (40.0)	2.882 (62.2)	3.404 (78.4)

Table 3. Changes of cell numbers (log/mL) of *Listeria monocytogenes* YM-7 during storage at -18℃. Numbers in parenthesis indicate the rate of injured cells (%).

Suspending liquid	Division	Storage times (weeks)					
		0	1	2	4	8	12
Tryptic soy broth	Vegetative cells	5.839	4.580	4.415	4.041	3.301	3.176
	Dead cells		-1.259	-1.424	-1.798	-2.538	-2.663
	Injured cells		2.711 (59.2)	2.976 (67.4)	2.461 (60.9)	2.740 (83.0)	2.938 (92.5)
Phosphate buffer	Vegetative cells	5.806	2.602	2.176	1.924	ND	ND
	Dead cells		-3.204	-3.630	-3.882	-	-
	Injured cells		1.059 (40.7)	0.546 (25.1)	0.847 (44.0)	-	-

ND: not detected

에 따라 점진적으로 사멸이 일어났다. 그리고 저장 12주 후에는 90% 이상의 손상을 보여 저장기간이 더 길어지게 되면 서서히 사멸이 일어날 것으로 추정된다. 인산완충용액에 접종한 후, -18℃에서 동결 저장한 *L. monocytogenes* YM-7은 1주 후에 3.2 log cycle, 4주 후에는 3.9 log cycle 정도 감소하였고, 8주 후에는 검출되지 않을 정도로 감소하였다. 그리고 인산완충용액에 접종한 균주는 TSB 배지에서와는 달리 저장 초기에 급격히 균 수가 감소하였다.

L. monocytogenes YM-7균을 저온저장 하였을 때 균 수의 사멸은 -3℃ 보다 -18℃에서 그리고 TSB 배지에서 보다 인산완충용액에서 높게 나타났다. 즉, TSB 배지에 함유되어 있는 유기물질들이 동결에 의한 상해로부터 세포를 보호하는 작용을 하는 것으로 추정된다. *L. monocytogenes* YM-7균을 인산완충용액에 저온저장 하였을 때, -18℃에서 보다 0℃와 -3℃에서 손상균의 비율이 상대적으로 높은 이유는 이 저장 온도대에서는 급격한 사멸이 일어나지 않고 손상된 세균들이 서서히 사멸되기 때문인 것으로 추정된다. -3℃와 -18℃의 저장 온도에서 인산완충용액에서보다 TSB 배지에서 손상균의 비율이 높은 이유 또한 TSB 배지에서는 손상된 세균들이 서서히 사멸되기 때문인 것으로 사료된다.

이상의 결과에서 알 수 있듯이 *L. monocytogenes* YM-7균의 저온내성 특성은 기질 의존적으로, 실제로 어떤 식품에 오염되었을 경우, 오염된 식품의 주요구성성분에 따라 *L. monocytogenes*균의 저온내성에 차이가 있을 수 있다는 것을 의미한다.

고등어육과 대구육에 따른 *L. monocytogenes* YM-7의 저온 내성

Table 4에서는 대표적인 적색육인 고등어육과 백색육인 대구육에 *L. monocytogenes* YM-7을 접종하여 -18℃에서 동결 저장에 따른 균 수의 변화를 실험했다. *L. monocytogenes* YM-7을 고등어육에 접종하여 -18℃에서 동결 저장한 것은 1주 후에 0.1 log cycle, 4주 후에 0.7 log cycle, 8주 후에 1.4 log cycle, 12주 후에 1.6 log cycle 정도 감소하였다. 한편 대구육에서는 1주 저장 시 0.7 log cycle, 4주 후에 1.4 log cycle, 8주 후에 2.3 log cycle, 12주 후에 3.1 log cycle 정도 감소하였으나 저장 12주 후에도 균은 완전히 사멸하지 않았다. 고등어육과 대구육에 접종한 분리 균주는 TSB 배지에서와

마찬가지로 저장기간의 경과에 따라 점진적으로 균이 사멸하였다. 대구육에서 상대적으로 균의 사멸률이 높은 이유는 본 실험에서 사용된 두 어육 대조구중 에서 단백질과 지질 함량이 높은 고등어육이 상대적으로 동결에 의한 상해로부터 세포를 보호하는데 유리하기 때문인 것으로 추정된다. 고등어육에 있어서 단백질과 지질 함량은 각각 20.6% 및 9.4%이고 대구육의 경우에는 각각 17.6% 및 0.5%이다. 이 같은 결과에서, *L. monocytogenes* YM-7을 어육에 접종하여 -18℃에서 저장할 때 12주 경과 시에 균 수는 2-3 log cycle 정도 감소한다는 것을 알 수 있다.

L. monocytogenes YM-7균주를 인산완충용액, TSB 배지 및 어육(고등어육, 대구육)에 접종하여 -18℃에서 저장하면서 저온내성을 살펴본 결과, 저장기간의 경과에 따라 균의 사멸과 손상이 일어났는데 기질에 따라 차이가 있어 기질에 따라 저온내성의 차이가 난다는 다른 연구 결과와도 비슷하였다 (Calcott, 1974; Clement, 1961; El-Kest and Marth, 1991; Mackay, 1984).

이상의 결과를 종합해 보면, *L. monocytogenes* YM-7균을 저온저장 하였을 때 균 수의 사멸은 -3℃ 보다 -18℃에서 그리고 TSB 배지에서 보다 인산완충용액에서 높았다. 인산완충용액에 저온저장 하였을 때 손상균 발생률은 -18℃에서 보다 -3℃에서 높게 나타났으며, -3℃와 -18℃의 저장 온도에서는 인산완충용액에서 보다 TSB 배지에서 손상균의 비율이 높게 나타났다. *L. monocytogenes* YM-7균을 어육에 접종하여 -18℃에서 저장할 때 12주 경과 시에 균 수는 2-3 log cycle 정도 감소하였다.

참 고 문 헌

- Calcott, P.H. 1974. Survival of *Escherichia coli* from freeze-thaw damage: a theoretical and practical study. *Can J. Microbiol.*, 20, 671-681.
- Cha, I.H., S.H. Jin, E.H. Park, S.H. Park, S.B. Kim, H.C. Cho, Y.S. Lee and Y.G. Lee. 1998. Prevalence of *Listeria* spp. over commercial frozen and refrigerated food the super market level. *J. Food Sci. Nutr.*, 3, 157-162.
- Chang, Y.H. 1999. Isolation and characteristic of *Listeria monocytogenes* from frozen foods in Korea. *Kor. J. Food Sci. Technol.*, 31, 1324-1329. (in Korean)

Table 4. Changes of cell numbers (log/mL) of *Listeria monocytogenes* YM-7 during storage at -18℃ in homogenized fish meat

Homogenized fish meat	Division	Storage times (weeks)						
		0	1	2	4	6	8	12
Mackerel	Vegetative cells	6.176	6.709	5.869	5.447	4.959	4.803	4.580
	Dead cells		-0.097	-0.307	-0.729	-1.217	-1.363	-1.596
Cod	Vegetative cells	6.176	5.491	5.204	4.771	4.301	3.869	3.114
	Dead cells		-0.685	0.972	-1.405	-1.875	-2.307	-3.062

- Clement, M.T. 1961. Effects of freezing, freeze drying and storage in the frozen state on viability of *Escherichia coli* cells. *Can. J. Microbiol.*, 7, 99-106.
- El-Kest, S.E. and E.H. Marth. 1991. Strains and suspending menstrua as factors affecting death and injury of *Listeria monocytogenes* during freezing and frozen storage. *J. Dairy Sci.*, 74, 1209-1213.
- Farber, J.M. and P.I. Peterkin. 1991 *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogens. *Microbiol. Rev.*, 55, 476-511.
- FDA. 1996. Compliance Program 7303.842 Guidance Manual. U.S. Government Printing Office part V, pp. 3.
- Fernandes, F.F., G.J. Flick and T.B. Thomas. 1998. Growth of inoculated psychrotrophic pathogens on refrigerated fillets of aquacultured rainbow trout and channel catfish. *J. Food Protect.*, 61, 313-317.
- Fleming, D.W., S.L. Cochi, K.L. MacDonald, J. Brondum, P.S. Hayes, B.D. Plikaytis, M.B. Hilmes, A. Auduriier, C.V. Broome and A.L. Reingold. 1985. Pasteurized milks a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *New England J. Medicine*, 312, 404-407.
- Fuchs, R.S. and P.K. Surendran. 1989. Incidence of *Listeria* in tropical fish and fishery products. *Lett. Appl. Microbiol.*, 9, 19-51.
- Golden, D.A., L.R. Beuchat and R.E. Brackett. 1988. Inactivation and injury of *Listeria monocytogenes* as affected by heating and freezing. *Food Microbiol.*, 5, 17-23.
- Hao, Y.Y., R.E. Brackett and M.P. Doyle. 1998. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* by plant extract in refrigerated cooked beef. *J. Food Protect.*, 61, 307-312.
- Johnson, J.L., M.P. Doyle and R.G. Cassens. 1990. *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in meat and meat products (a review). *J. Food Protect.*, 53, 81-91.
- Kim, J.W. and S.S. Yoon. 1998. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*, and appraisal for microrbiological qualities in the commercial frozen yogurt products and in Korea. *Kor. J. Food Sci. Ani. Resour.* 18, 63-74. (in Korean)
- Kim, Y.M., U.Y. Park, J.S. Mok and D.S. Chang. 1995. Physiological characteristics of *Listeria monocytogenes* YM-7. *J. Kor. Fish. Soc.*, 28, 443-450. (in Korean)
- MacKay, B.M. 1984. Lethal and sublethal effects of refrigeration, freezing and freeze-drying on microorganisms. Academic Press Inc., New York, pp. 45-75.
- Pini, P.N. and R.J. Gilbert. 1988. The occurrence in the U. K. of *Listeria* species in raw chickens and soft cheeses. *Int. J. Food Microbiol.*, 6, 317-326.
- Rorvik, L.M., M. Yndestad and E. Skjerve. 1991. Growth of *Listeria monocytogenes* in vacuum-packed, smoked salmon, during storage at 4°C. *Inter. J. Food Microbiol.*, 14, 111-118.
- Schuchat, A., B. Swaminathan and C. Broome. 1991. Epidemiology of human listeriosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 4, 169-183.
- Skovgard, N. and C.A. Morgen. 1988. Detection of *Listeria* sp. in faeces from animals, in feeds, and in raw foods of animal origin. *Inter. J. Food Microbiol.*, 6, 229-242.
- Szabo, E.A., K.J. Scurrah and J.M. Burrows. 2000. Survey for psychrotrophic bacterial pathogens in minimally processed lettuce. *Lett. Appl. Microbiol.*, 30, 456-460.
- Vasavada, P.C. 1988. Pathogenic bacteria in milk (a review). *J. Dairy Sci.*, 71, 2809-2816.

2002년 12월 31일 접수

2003년 5월 24일 수리