

이산화염소가 *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*의 생존에 미치는 영향

염형준 · 고종관 · 김미리¹ · 송경빈*

충남대학교 식품공학과, ¹충남대학교 식품영양학과

Inhibitory Effect of Aqueous Chlorine Dioxide on Survival of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* in Pure Cell Culture

Hyoungjun Youm, Jongkwan Ko, Meeree Kim¹, and Kyung Bin Song*

Department of Food Science and Technology,

¹Department of Food Science and Nutrition, Chungnam National University

E. coli O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* were treated with aqueous chlorine dioxide to elucidate effect of aqueous chlorine dioxide treatment on major food-borne pathogenic bacteria. Survival plot of *E. coli* O157:H7 at 5 ppm chlorine dioxide showed typical first-order rate. After 5 min of treatment, cell number decreased by 1.5 log cycle. Survival plot slope gave D value of 3.37 min. *S. typhimurium* and *L. monocytogenes* showed biphasic curve. Aqueous chlorine dioxide treatment on *S. typhimurium* and *L. monocytogenes* resulted in bactericidal effect for 5 min, and thereafter no effect was observed under experimental conditions of this study. These results suggest concentration of chlorine dioxide is more important than treatment time, and 5 ppm chlorine dioxide treatment is not sufficient for sanitizing fresh vegetables.

Key words: aqueous chlorine dioxide, D-value, *Salmonella typhimurium*, *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*

서 론

최근 생활 수준의 향상과 국민소득이 증가하면서 식품의 안전성이 문제시되는데 특히 단체급식 등에서 식중독 발생 사고가 자주 발생함에 따라 보다 안전한 식품 세척 및 살균처리의 필요성이 더욱 강조되고 있다. 특히 *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* 등은 육류 및 가공류, 채소류에서 쉽게 오염될 수 있는 만큼 이들 균의 억제는 중요하다.

식품 가공 공장의 살균소독제로서 가장 널리 사용되는 염소는 유기물과의 반응에 따라 발암성 물질을 생성한다고 보고되었다(1). 따라서 염소 대체제에 대한 많은 연구들이 이루어져 왔는데 그 중 이산화염소는 오래 전부터 물의 살균처리에 이용되어 왔으며 최근 들어 이산화염소를 식품산업에 적용하기 위한 연구가 활발히 진행 되고 있다(2).

이산화염소는 높은 온도와 압력에서는 폭발성이 있기 때문에 통상적인 저장 방법대로 저장할 수 없어서 필요할 때 직접 만들어서 사용해야 되는데 염소보다 물에 대한 용해성이 매우

높다(3). 이산화염소는 염소의 살균력 보다 5배 가량 높으며 pH의 영향력은 거의 없다. 또한 염소와 달리 발암물질로 알려진 trihalomethanes이나 chloroamine도 생성하지 않는다(4,5). 그러나 유기물과 반응하여 chlorite ion과 chlorate ion을 생성하기 때문에 미국의 FDA에서는 그 사용 농도를 규제하고 있다(2).

E. coli O157:H7은 주요 식중독 균으로서 10개 정도의 균으로도 출혈성 장염을 일으키는데(6) 최소가공 냉장 저장된 채소류에서 부적절한 가공에 의해 오염될 수 있고(7-11), 특히 신선과채류 및 과일주스 제품에 있어 발병이 증가하고 있는 것으로 보고되고 있다(12,13). *Salmonella*와 *Listeria monocytogenes*는 가공하지 않은 육류 제품 등에 발병하는 주요 식중독 균으로서(14-16) 특히 즉석 닭고기 제품의 포장 시 오염 등에서 보고되고 있다(17,18).

따라서 본 연구에서는 *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* 그리고 *Listeria monocytogenes* 등 대표적 식중독 균에 대한 이산화염소의 살균제로서의 효과를 측정하여 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

미생물 배양

E. coli O157:H7(ATCC 43895), *Salmonella typhimurium* (KCTC 2514), *Listeria monocytogenes*(KCTC 3710)는 KCTC

*Corresponding author: Kyung Bin Song, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture and Life Sciences, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea
Tel: 82-42-821-6723
Fax: 82-42-825-2664
E-mail: kbsong@cnu.ac.kr

(Korean Collection for Type Culture)에서 분양 받아 사용하였다. *E. coli* O157:H7과 *Salmonella typhimurium*은 20 mL TSB (tryptic soy broth, Difco Co., Detroit, MI, USA)를 사용하여 배양하였다. *E. coli* O157:H7의 배양 조건은 37°C, 130 rpm에서 24 hr 배양하였고, *Salmonella*는 37°C, 130 rpm에서 48 hr 배양하였다. *Listeria monocytogenes*는 20 mL BHI(Brain Heart Infusion, Difco Co., Detroit, MI, USA) broth를 37°C, 130 rpm에서 72 hr 배양하였다. 배양된 cell culture는 3회 washing 하였는데 washing은 4°C에서 1,750×g로 15분간 centrifuge한 후 0.1% sterile peptone water로 resuspend시켰다.

이산화염소 용액 처리

이산화염소는 chlorine dioxide generator system(CH₂O Inc., Olympia, Washington, USA)을 사용하여 준비하였으며 농도는 iodometry 방법(19)으로 측정하였다. 이산화염소 용액 9 mL에 pure cell culture 1 mL을 넣어 각 시간 별로 처리 했으며 처리 후 serial dilution하여 배지에 spreading하여 생균수를 측정 하였다. *E. coli* O157:H7은 5.55 ppm 이산화염소 용액 9 mL에 cell culture 1 mL을 넣어 최종 농도가 5 ppm이 되도록 하여 1, 2, 3, 4, 5, 7분 동안 처리하였고, 처리 후 바로 dilution하여 spreading 하였다. 배지는 TBA(tryptic soy agar: TSB + 1.8% agar) plate 를 사용 하였으며 37°C에서 24 hr 배양 후 colony counting 하여 결과를 분석 하였다. *Salmonella typhimurium*은 5.55 ppm 이산화염소 용액 9 mL에 cell culture 1 mL을 넣어 최종 농도가 5 ppm이 되도록 하여 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10분 동안 처리하였고, 처리 후 바로 serial dilution 하여 spreading 하였다. 배지는 TBA plate를 사용하여 37°C에서 48 hr 배양 후 colony counting 하여 결과를 분석 하였다. *Listeria monocytogenes*는 11.11 ppm 이산화염소 용액 4.5 mL에 cell culture 0.5 mL을 넣어 최종 농도가 10 ppm이 되도록 하여 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10분 동안 처리 하였다. 배지는 BHI agar plate를 사용 하였으며 37°C에서 48 hr 배양 후 colony counting 하여 결과를 분석 하였다.

D-Value 측정

이산화염소 처리에서 살아남은 cell은 각 plate에서 형성된 colony를 counting하여 colony forming units(CFU)로 나타내었다. 각기 counting된 결과는 log scale로 환산하여 처리 시간에 따른 survival rate 그래프를 그렸으며 생균수가 1 log 감소하는데 필요한 시간을 계산하여 D-value를 구하였다.

결과 및 고찰

E. coli O157:H7에 대한 이산화염소 처리는 처리 시간에 따라 일정한 비율로 감소하여 survival plot이 전형적인 1st order 유형을 보여주었다(Fig. 1). 본 연구에서 사용한 이산화염소 5 ppm에서의 처리는 처리 5분 후 초기 균수에서 1.5 log 감소를 보였는데 이러한 결과는 Singh 등(20)이 alfalfa에 이산화염소를 처리했을 때 *E. coli* O157:H7의 감소가 0.5-1.1 log₁₀ CFU/g으로 있었다는 보고와 비교되는데 본 실험에서는 pure culture를 사용한 것이 그 차이의 이유로 생각된다. *E. coli* O157:H7의 survival plot의 slope으로부터 D-value를 구한 결과 3.37분으로 측정되었다(Fig. 1).

E. coli O157:H7와는 달리 *Salmonella typhimurium*과 *Listeria monocytogenes*의 처리 결과는 전형적인 biphasic curve를 보였다(Fig. 2-4). 이러한 biphasic curve 형태는 5분 처리까지는 해

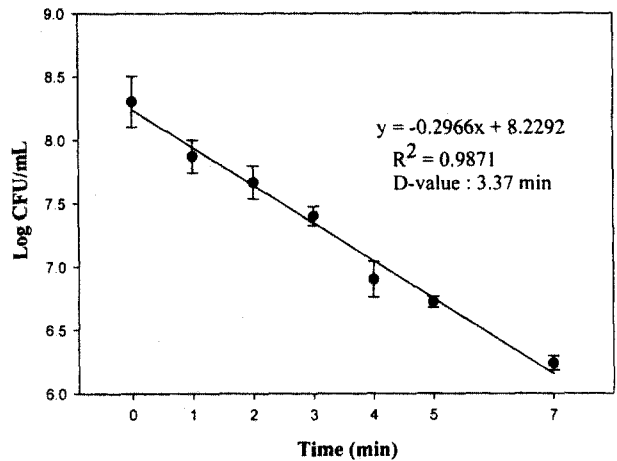


Fig. 1. Effect of 5 ppm aqueous chlorine dioxide on the survival of *E. coli* O157:H7 according to treatment time.

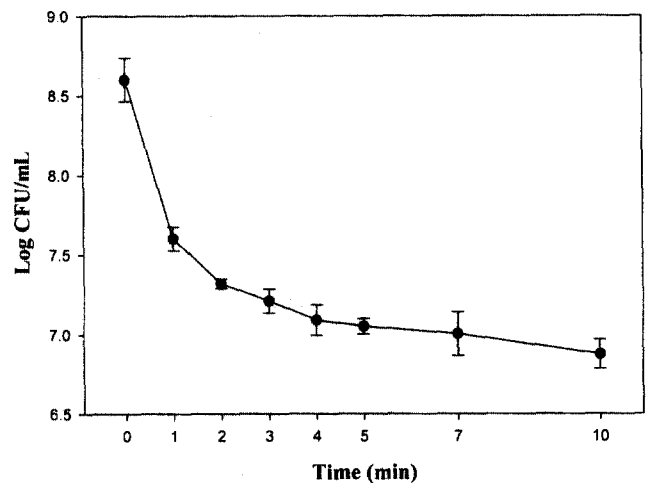


Fig. 2. Effect of 5 ppm aqueous chlorine dioxide on the survival of *Salmonella typhimurium* according to treatment time.

당 이산화염소 농도에서 기대할 수 있는 사멸 효과가 대부분 나타났으나 그 이상의 처리 시간은 효과가 없음을 보여준다. 특히 *Listeria monocytogenes*에 대한 이산화염소 5 ppm과 10 ppm의 처리 결과를 비교해 보면 5 ppm에서 5분 처리했을 때는 0.98 log 감소를 보였지만 10 ppm에서는 1분만 처리 하여도 1.14 log 감소를 보였으며 4분을 더 처리한 5분 처리 시에는 2.2 log 감소를 보였다(Table 1). 이러한 농도와 시간과의 상관관계에서 이산화염소의 사멸 효과는 처리시간보다는 처리농도에 보다 큰 영향을 받는 것을 시사한다. Singh 등(21)의 lettuce와 baby carrot에 이산화염소 가스를 처리한 결과에서도 5 ppm에서 15분 처리한 것이 0.79 log 감소를, 10 ppm에서 1분 처리한 것이 0.80 log 감소를 보여주어 처리시간보다 처리농도가 이산화염소의 살균력에 더 중요한 factor임을 보여주었다.

*E. coli*의 경우 이산화염소 처리 시간이 증가 함에 따라 생존율이 일정한 비율로 감소하는 양상을 보인 반면 *Salmonella*, *Listeria*는 biphasic curve를 보여주었는데 이것은 bacteria cell 자체의 특성과 관련된 것으로 이산화염소에 대한 민감성의 차이로 판단되며 이산화염소의 작용 기작이 명확히 밝혀지지 않았기에 보다 많은 연구가 이루어져야 하겠다(1,2). 이산화염소

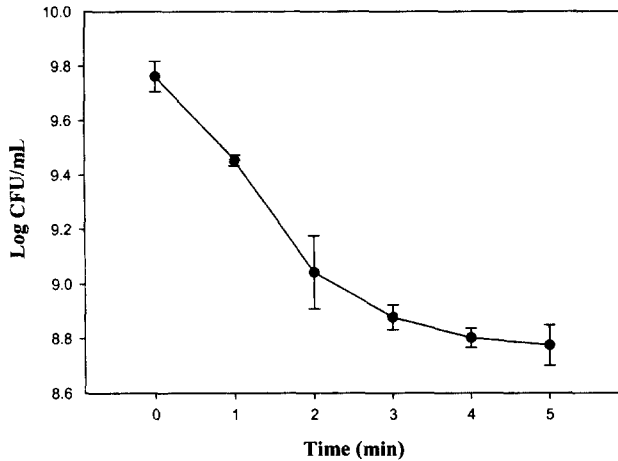


Fig. 3. Effect of 5 ppm aqueous chlorine dioxide on the survival of *Listeria monocytogenes* according to treatment time.

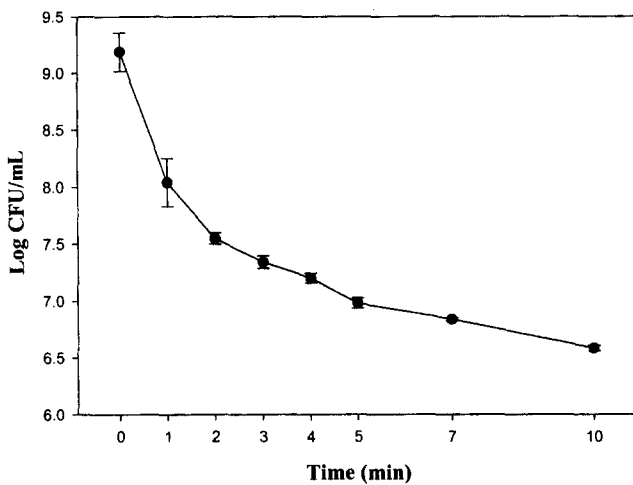


Fig. 4. Effect of 10 ppm aqueous chlorine dioxide on the survival of *Listeria monocytogenes* according to treatment time.

에 의한 미생물 사멸에 관한 연구로는 이산화염소가 단백질의 아미노산 중 cysteine, tyrosine, tryptophan 등과 반응하여 단백질을 변성시켜 사멸시키고(22) 또한 이산화염소가 유리지방산과의 반응으로 지방산화물을 생성한다는 보고가 있다(23). 따라서, 이산화염소의 살균 기작으로는 단백질, 지방산 등과의 반응에 의한 cell membrane의 변화(2), mRNA의 불활성화로 인한 단백질합성 등에 영향을 끼쳐서(24) 사멸 시킨다고 보여진다. 그러므로, 이산화염소의 살균효과가 해당 bacteria cell마다 차이가 있기에 이산화염소에 대한 민감성의 차이로 인하여 *E. coli*, *Salmonella*, *Listeria*의 생존 곡선이 다르게 나타난 것으로 판단된다.

현재 FDA에서 승인한 ClO_2 의 처리 허용 농도는 야채 및 과일에 대해서 5 ppm으로 제한하고 있다. 그러나 본 연구 결과, 다른 유기물이 존재 하지 않는 pure cell culture의 조건에서 이산화염소 5 ppm 조건에서는 완전한 살균효과를 보이지 않음을 확인할 수 있었다. 따라서, 여러 유기물이 복합적으로 포함되어 있는 야채 등의 식품에 처리할 경우는 식품적 안전성을 충분히 보장할 수 있는 정도의 살균 효과를 기대하기 어렵다고 보여지기에 보다 높은 농도의 이산화염소 처리나 다른 화학적

Table 1. Comparison of aqueous chlorine dioxide effect on the survival of *Listeria monocytogenes* at 5 ppm and 10 ppm

Chlorine dioxide concentration (ppm)	Exposure time (min)	Population (\log_{10} CFU/mL)	Reduction in population
5 ppm	0	9.76 ± 0.06	
	5	8.77 ± 0.07	0.98 ± 0.06
10 ppm	0	9.18 ± 0.1	
	1	8.04 ± 0.15	1.14 ± 0.12
	5	6.98 ± 0.03	2.2 ± 0.08

처리를 병행할 때 식품의 안전성을 완전히 확보할 수 있다고 생각된다.

요 약

본 연구에서는 이산화염소 처리를 이용하여 대표적 식중독 미생물인 *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*에 대한 살균 효과를 측정하였다. Pure cell culture 상태에서의 *E. coli*는 이산화염소 5 ppm에서 D-value가 3.37분으로 측정되었다. 그러나 *Salmonella*와 *Listeria*의 생존곡선은 이산화염소 처리시간에 따라 biphasic curve를 나타내었다. 이러한 biphasic curve는 5분까지의 처리로 해당 농도에서의 살균효과는 대부분 나타나고 그 이후는 효과가 없음을 보여주었다. 특히 *Listeria*의 5 ppm과 10 ppm의 처리결과는 이산화염소의 처리에 영향을 주는 인자 중 처리 시간보다는 처리농도가 더 큰 영향을 끼치는 것을 나타내었다. 본 연구 결과는 이산화염소 허용치인 5 ppm이 신선채소에 대한 미생물학적 안전성을 확보하기엔 부족하다는 것을 시사한다.

감사의 글

본 연구는 농림기술관리센터의 농림기술개발사업의 지원으로 이루어진 것입니다.

문 헌

- Kraybill HF. Origin, classification, and distribution of chemicals in drinking water with an assessment of their carcinogenic potential. Vol. 1, pp. 211-228. In: Water Chlorination. Jolly RL (ed). Ann Arbor Science, Ann Arbor, MI, USA (1978)
- Kim JM. Use of chlorine dioxide as a biocide in the food industry. Food Ind. Nutr. 6: 33-39 (2001)
- Gordon G, Kieffer RG, Rosenblatt DH. The chemistry of chlorine dioxide. Vol. 15, pp. 202-286. In: Progress in Inorganic Chemistry. Lippard SJ (ed). John Wiley and Sons, New York, NY, USA (1972)
- Moore G.S, Calabrese EJ, DiNardi SR, Tuthill RW. Potential health effect of chlorine dioxide as a disinfectant in potable water supplies. Med. Hypoth. 4: 481-496 (1978)
- Symons JM, Stevens AA, Clark BM, Geldreich EE, Love OT, DeMarco J. Treatment technique for controlling trihalomethanes in drinking water. US EPA-600 2-81-156. US Government Printing Office, Washington, DC, USA (1981)
- Buchanam RL, Doyle MP. Foodborne disease significance of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *E. coli*. Food Technol. 51: 69-76 (1997)
- Beuchat LR. Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces applied to lettuce and effectiveness of chlorinated water as a disinfectant. J. Food Prot. 62: 845-849 (1999)

8. Fisher TL, Golden DA. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in ground apples used in cider production. *J. Food Prot.* 61: 1372-1374 (1998)
9. Diaz C, Hotchkiss JH. Comparative growth of *Escherichia coli* O157:H7, spoilage organisms and shelf-life of shredded iceberg lettuce stored under modified atmospheres. *J. Sci. Food Agric.* 70: 433-438 (1996)
10. Rosario BA, Beuchat LR. Survival and growth of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in cantaloupe and watermelon. *J. Food Prot.* 58: 105-107 (1995)
11. Abdul-Raouf UM, Beuchat LR, Ammar MS. Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 on salad vegetables. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1999-2006 (1993)
12. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Foodborne outbreaks of enterotoxigenic *Escherichia coli* -Rhode Island and New Hampshire. *Morbid. Mortal. Weekly Rep.* 43: 81-89 (1994)
13. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with eating alfalfa sprouts-Michigan and Virginia. *Morbid. Mortal. Weekly Rep.* 46: 741-745 (1997)
14. Bailey JS, Cox NA, Craven SE, Cosby DE. Serotype tracking of *Salmonella* through integrated broiler chicken operations. *J. Food Prot.* 65: 724-745 (2002)
15. Mikolajczyk A, Radkoeski M. *Salmonella* spp. on chicken carcasses in processing plant in Poland. *J. Food Prot.* 65: 1475-1479 (2002)
16. Rose BE, Hill WE, Umholtz R, Ransom GM, James WO. Testing for *Salmonella* in raw meat and poultry products collected at federally inspected establishments in the United States. *J. Food Prot.* 65: 937-947 (2002)
17. Tompkin RB. Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. *J. Food Prot.* 65: 709-725 (2002)
18. Kanuganti SR, Wesley IV, Reddy PG, Mckean J, Hurd HS. Detection of *Listeria monocytogenes* in pigs and pork. *J. Food Prot.* 65: 1470-1474 (2002)
19. American Public Health Association. Standard methods for the examination of water and wastewater. 19th ed. Method 4-54. American Public Health Association, Washington, DC, USA (1995)
20. Singh N, Singh RK, Bhunia AK. Sequential disinfection of *Escherichia coli* O157:H7 inoculated alfalfa seed before and during sprouting using aqueous chlorine dioxide, ozonated water, and thyme oil. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 36: 235-243 (2003)
21. Singh N, Singh RK, Bhunia AK, Stroschine RL. Efficacy of chlorine dioxide, ozone and thyme essential oil or a sequential washing in killing *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce and baby carrots. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 35: 720-729 (2002)
22. Noss CI, Hauchman FS, Olivieri VP. Chlorine dioxide reactivity with proteins. *Water Res.* 20: 351-356 (1986)
23. Ghanbari HA, Wheeler WB, Kirk JR. Reactions of aqueous chlorine and chlorine dioxide with lipids: Chlorine incorporation. *J. Food Sci.* 47: 482-485 (1982)
24. Bernarde MA, Snow WB, Olivieri VO, Davidson B. Kinetics and mechanism of bacterial disinfection by chlorine dioxide. *Appl. Microbiol.* 15: 257-265 (1967)

(2004년 4월 22일 접수; 2004년 5월 22일 채택)