

연구노트

Shigella sonnei ATCC 29930의 아치사 가열 후 소금 농도에 따른 회복 정도 비교

정혜진 · 박성희 · 송은섭¹ · 박성수² · 김근성*

중앙대학교 식품공학과, ¹인하대학교 의과대학 산부인과학교실, ²제주한라대학 제주향토식품연구소

Comparison of Recovery Levels of *Shigella sonnei* ATCC 29930 Treated at Different NaCl Concentrations after Sublethal Heating

Hye-Jin Jung, Sung-Hee Park, Eun-Seop Song¹, Sung-Soo Park², and Keun-Sung Kim*

Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University

¹Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Inha University

²Cheju Traditional Food Institute, Cheju Halla College

Abstract The viability of *Shigella sonnei*, a significant cause of gastroenteritis in Korea, on TSA plates was determined after sublethal heating treatments and NaCl treatments. In addition, recovery levels of sublethally injured cells on TSA plates containing different concentrations of NaCl (TSAS) were investigated. The viability decreased significantly with increasing degree of sublethal heating treatments, but increases in NaCl treatment concentration from 0 to 6% had little effect on the viability. After being sublethally treated at 55°C for 30 min, bacterial populations were reduced by 7.58, 7.83 and 7.93 log CFU/mL on 2, 4, and 6% TSAS, respectively. After being sublethally treated at 60°C for 30 min, bacterial populations were reduced by 6.71, 6.73, and 6.73 log CFU/mL on 2, 4 and 6% TSAS, respectively. Decimal reduction times (D-values) decreased with increasing NaCl treatment concentrations after sublethal heating at 55 or 60°C. These data imply that the *S. sonnei* cells sublethally injured by insufficient heating processes had a lower recovery rate with increasing NaCl concentrations in the recovery media.

Key words: *Shigella sonnei*, sublethal injury, sublethal heating, NaCl treatment, D-value

서 론

Shigella spp.에 의한 세균성 이질은 소아에서 빈발하는 설사증의 하나로서 주로 위생상태가 불량한 개발도상국에서 흔히 발병하지만, 선진국에서도 밀집되어 거주하는 고아원 등 사회복지시설, 교도소, 보육원 등에서 집단발생이 보고되고 있다(1). 현재 *Shigella* spp.중에서 개인 접촉, 오염된 우물물 및 다양한 식품에 의하여 전파되는 *S. sonnei*의 경우, 일본에서 발생하는 세균성 이질의 70% 이상(800건), 미국은 75% 이상(약 10,000건)을 차지하며 우리 나라에서도 개발도상국으로의 해외 여행 증가, 집단 급식의 증가 및 국가간의 물자교류의 확대 등으로 1990년대 이후 산발적 및 집단적 발생이 많아지고 있다(2-4). 한편 최근에 국내·외에서 집단적으로 발생한 세균성 이질 환자의 감염원이나 감염경로들은 불분명하였다. 또한 이질균의 발병은 적은 균량(10-100 CFU)으로도 쉽게 감염이 성립되고 전파가 쉬우며 일반적으로 다재내성으로 통제하기가 어려워 식품위생상 중요하게 여겨

지고 있다(2).

다양한 식품에서 포자를 형성하지 않는 병원균의 불활성화를 위해 열처리가 주로 사용되고 있다. 그러나 음식의 조리나 재가열시 불충분한 열처리는 sublethal injured cell을 생성하며, 이러한 sublethal injured cell은 항생제나 외부 stress 요인에 대하여 저항성이나 병원성이 증가될 가능성이 크고 적당한 환경에서 자연치유될 수 있어서 많은 문제를 야기하고 있다(5). 그에 따라 최근에는 영양배지나 다양한 식품에 *Salmonella* spp.(5-8), *Listeria monocytogenes*(6-9), *Staphylococcus aureus*(10-12), *Escherichia coli* O157:H7(5,8,13-16), 그리고 *Shigella* spp.(17,18) 등의 균주들을 인위적으로 접종하여 열처리한 후, 선택배지에 spreading하여 sublethal injured cell의 회복정도를 조사한 연구가 활발히 진행되고 있다. 그러나 아직까지 *Shigella* spp.를 비롯한 다른 속의 균주들에서도 불완전한 열처리 후 발생된 sublethal injured cell의 회복 유무에 영향을 줄 수 있으며, 또한 많은 식품에 함유되어 있는 NaCl에 관한 체계적인 연구가 미약한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 세균성 이질을 유발하는 주요 원인균인 *S. sonnei*를 대상으로 55°C와 60°C에서 불충분하게 열처리할 때 처리 시간별 생존 균수의 변화와 NaCl 처리할 때 NaCl 농도별 생존 균수의 변화를 각각 조사하였다. 그리고 다양한 열처리 온도(55, 60°C)와 시간(5, 10, 15, 30분)에서 불충분하게 열처리한 후 다양한 염농도 조건(0, 2, 4, 6%) 하에서 sublethal injured cell의 회복정도를 조사하였고, 그에 따른 D-value도 조사하였다.

*Corresponding author: Keun-Sung Kim, Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University, 72-1, Ansong-si, Gyunggi 456-756, Korea

Tel: 82-31-670-3032

Fax: 82-31-675-4853

E-mail: keunsung@cau.ac.kr

Received September 22, 2005; accepted September 30, 2006

재료 및 방법

사용균주

본 실험에 사용된 표준균주는 *S. sonnei* ATCC 29930으로 ATCC(American Type Culture Collection)에서 분양받았으며, 본 균주는 사용전 tryptic soy broth(TSB, Difco Laboratories, MI, USA) 및 tryptic soy agar(TSA, Difco Laboratories, MI, USA)에 수회 계대 배양하여 사용하였다.

아치사 가열(Sublethal heating) 처리

S. sonnei ATCC 29930 균주를 3 mL의 TSB 배지에 접종하여 37°C에서 18시간 진탕배양 후, 15,000 rpm으로 2분간 원심분리하여 균체를 수확하였다. 수확한 균체는 1 mL의 100 mM potassium phosphate buffer(pH 7.2)를 넣어서 3회 세척한 후, 마지막 균체에 1 mL의 100 mM potassium phosphate buffer(pH 7.2)를 첨가하여 현탁시켰다. 0.5 mL의 현탁액에 미리 55°C 또는 60°C로 데워진 4.5 mL의 100 mM potassium phosphate buffer(pH 7.2)를 첨가해 주고, 열처리 시간을 0(control), 5, 10, 15, 30분으로 달리하여 열처리 한 뒤 반응의 진행을 멈추기 위하여 얼음으로 식혀주었다.

아치사 가열 후 소금 처리

다양한 열처리 온도와 시간으로 열처리한 *S. sonnei* 균주를 serial dilution하여 각각 0.1 mL씩 TSA, 2% TSAS(NaCl 2% 함유), 4% TSAS(NaCl 4% 함유) 및 6% TSAS(NaCl 6% 함유)에 분주하여 spreading한 뒤 37°C, 48시간 배양 후 colony를 counting하여 결과를 측정하였다. 그리고 3회 반복실험을 통하여 얻은 결과값을 본 연구결과에 사용하였다.

D-value

각기 다양한 열처리 온도(55, 60°C)와 시간(5, 10, 15, 30분)으로 열처리한 후, 다른 염농도를 가진 plate에 도말하여 각 plate에 형성된 colony를 counting하여 CFU(colony forming units)로 나타내었다. 각각 counting된 결과는 log scale로 환산하여 열처리 시간과 염농도에 따른 survival rate graph를 그렸으며, 생존수가 1 log-cycle 감소하는데 필요한 시간인 D-value를 구하였다.

결과 및 고찰

열처리에 의한 효과

불충분한 열처리 온도(55, 60°C)와 열처리 시간(5, 10, 15, 30분)이 *S. sonnei* ATCC 29930의 생존에 미치는 영향을 조사하고자 sublethal injured cell과 uninjured cell의 회복이 가능한 영양배지인 TSA plate에 열처리한 sample을 spreading한 뒤 colony를 counting하여 생존 균수를 측정하였다. 그 결과, Fig. 1과 Fig. 2에서와 같이 열처리 온도와 시간에 따라 생존균수가 유의적인 감소를 하였다. 우선 열처리 시간에 따른 변화를 보면, 55°C나 60°C로 열처리를 15분 이상하였을 때 생존균수가 급격하게 감소하였다. 그리고 열처리 온도에 의해서는 초기균수가 9.18 log CFU/mL인 *S. sonnei* ATCC 29930을 55°C로 30분간 열처리하였을 때 생존균수가 7.93 log CFU/mL으로 1.25 log CFU/mL가 사멸하였고, 60°C에서는 초기균수가 9.37 log CFU/mL에서 6.73 log CFU/mL으로 2.64 log CFU/mL이 사멸하여 열처리 온도가 높을수록 생존균수가 크게 감소하였다. 또한 생존수가 1 log-cycle 감소하는데 필요한 시간인 D-value도 55°C에서 24.11분인 반면에 60°C로 열처리하였을 경우에는 10.95분으로 열처리 온도가 높을수록 D-value가

크게 감소하였다(Table 1). 한편 *Shigella*속과 같은 그람 음성 세균이며, 생리적으로 매우 유사한 성격을 지닌 *E. coli* O157:H7을 대상으로 Duffy 등(15)이 50°C에서 열처리하였을 때 D-value가 91.14-116.93분, 55°C에서는 17-21.93분, 그리고 60°C에서는 1.18-2.21분이었다고 보고하였다. 그리고 Ahmed 등(16)은 *E. coli* O157:H7을 50°C로 열처리하였을 때 D-value가 92.67분, 55°C에서는 19.26분이었다고 보고하였다. 이와 같은 결과는 열처리 세균의 종류마다 열처리 조건에 따라서 D-value가 각각 다를 수 있으나 일반적으로 동일한 세균에 대하여 열처리 온도가 증가함에 따라 D-value가 급격하게 감소하는 경향을 나타내었다.

소금 처리에 의한 효과

세균성 이질의 집단 발생과 관련된 식품에는 raw, multiple-ingredient foods인 샐러드류, 절임 식품, 소시지, 치즈 및 조리한 후 재가열하지 않고 소비되는 ready-to-eat 식품 등이 있으며, 일반적으로 이러한 식품의 소금 함유량은 1-6%이다(18). 따라서 본 연구에서는 다양한 염농도(0, 2, 4, 6%) 조건이 *S. sonnei* ATCC 29930의 생존에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과, 염농도가 0, 2, 4 및 6%일 때 생존균수가 각각 9.00 log CFU/mL, 8.87 log CFU/mL, 8.81 log CFU/mL 및 8.72 log CFU/mL로 조사되어 염농도가 6%까지 증가함에 따라 생존균수의 변화가 거의 없는 것으로 나타났다(data not shown).

아치사 가열 후 다양한 염농도별 회복

다양한 식품에서 포자를 형성하지 않는 병원균의 불활성화를 위해 열처리가 주로 사용되고 있다. 그러나 음식의 조리나 조리 후 재가열시 불충분한 열처리는 sublethal injured cell을 생성하며, 이러한 sublethal injured cell은 적당한 환경에서 자연치유될 수 있어서 많은 문제를 야기하고 있다. 따라서 본 연구에서는 55°C나 60°C의 불충분한 열처리 후 다양한 염농도(0, 2, 4, 6%) 하에서 sublethal injured cell의 회복정도를 조사하였다. 우선 불충분한 열처리에 의해 sublethal injury를 입은 뒤 염에 의해 사멸한 균수는 sublethal injured cell의 회복이 가능한 비선택 영양배지인 TSA에서 형성된 colony 숫자에서 다양한 염농도(2, 4, 6%)를 가진 선택 배지에서 형성된 colony 숫자를 감하여서 구하였다. 그 결과, *S. sonnei* ATCC 29930을 55°C에서 30분동안 열처리하였을 경우, 2% TSAS에서 사멸한 균수는 7.58 log CFU/mL, 4% TSAS에서는 7.83 log CFU/mL, 그리고 6% TSAS에서는 7.93 log CFU/mL로 조사되었고(Fig. 1), 60°C에서 30분 동안 열처리하였을 경우에는 2% TSAS에서 6.71 log CFU/mL, 4% TSAS에서는 6.73 log CFU/mL, 그리고 6% TSAS에서는 6.73 log CFU/mL로 조사되었다(Fig. 2). 이와 같은 현상은 배지의 염농도가 높을수록 sublethal injured cell들 중 점차적으로 더 많은 비율이 회복이 잘 안되어 사멸한 것으로 사료된다.

또한 생존수가 1 log-cycle 감소하는데 필요한 열처리 시간인 D-value는 55°C로 열처리한 경우에는 TSA에서 24.11분, 2% TSAS에서 20.66분, 4% TSAS에서 16.71분, 그리고 6% TSAS에서 7.35분을 나타낸 반면에 60°C로 열처리한 경우에는 TSA에서 10.95분, 2% TSAS에서 7.69분, 4% TSAS에서 6.42분, 그리고 6% TSAS에서는 5.84분을 각각 나타내었다(Table 1). 이는 동일한 온도에서 열처리후 노출된 염농도가 증가함에 따라 sublethal injured cell의 회복되는 비율이 점차적으로 감소하기 때문에 상대적으로 생존균수의 감소로 인하여 D-value가 감소한 것으로 사료된다.

결론적으로 본 연구에서는 불충분한 열처리 온도와 시간에 의

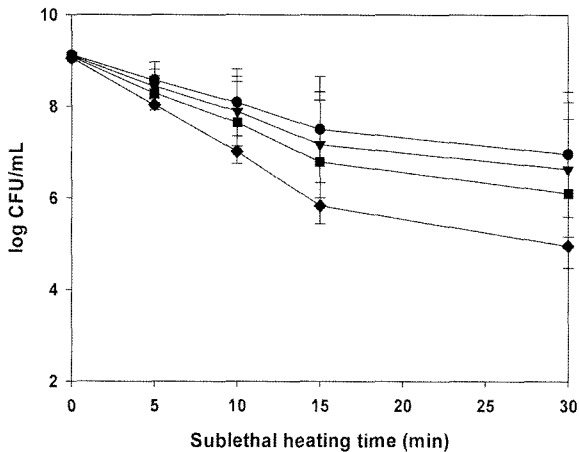


Fig. 1. Effect of various NaCl treatments on *S. sonnei* ATCC 29930 after sublethal heating in 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.2) at 55°C. ●: TSA, ▲: 2% TSAS, ■: 4% TSAS, ◆: 6% TSAS. Error bars indicate standard deviations from triplicate experiments.

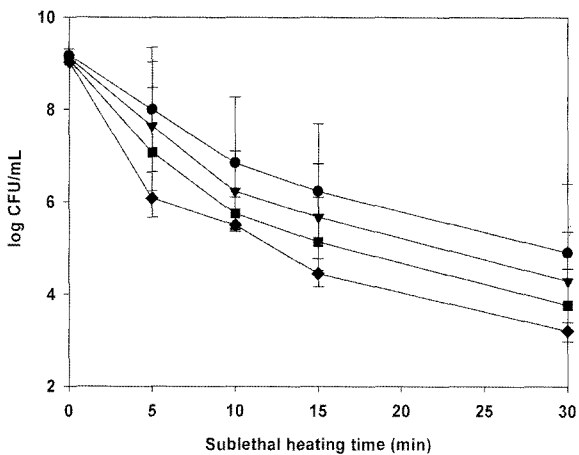


Fig. 2. Effect of various NaCl treatments on *S. sonnei* ATCC 29930 after sublethal heating in 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.2) at 60°C. ●: TSA, ▲: 2% TSAS, ■: 4% TSAS, ◆: 6% TSAS. Error bars indicate standard deviations from triplicate experiments.

하여 생성된 sublethal injured cell의 경우 열처리 후 노출된 염농도가 증가함에 따라 회복정도가 감소하였고, 특히 6% TSAS에서는 눈에 띄게 감소된 것을 확인할 수 있었다. 한편 *L. monocytogenes*의 경우 4-5%의 NaCl 농도(19)에서, 그리고 *S. aureus*의 경우 7.5-10%의 NaCl 농도(10)에서 각각 sublethal injured cell들은 모두 사멸하고 손상을 입지 않은 세포들만 정상적으로 성장하는 것으로 알려져 있다. 본 연구 결과를 종합해 볼 때 *S. sonnei*의 경우 6% 내외의 NaCl 농도에서 동일한 현상이 나타나는 것으로 사료된다. 그리고 본 연구에서는 potassium phosphate buffer(pH 7.2)에서 열처리를 하였는데, 일반적으로 지방함량이 높은 식품내에서 미생물의 열저항성이 증가되는 것으로 알려져 있으므로(20) 다양한 식품에 *S. sonnei*를 인위적으로 접종하여 열처리 효과를 조사하는 연구뿐만 아니라 열처리 또는 열처리가 세포내의 어떤 기작에 영향을 미쳐서 sublethal injured cell의 회복이 감소되는지에 대한 연구도 그와 병행하여 수행되어야 하겠다.

Table 1. *D*-values (min) vs. NaCl concentrations for *S. sonnei* ATCC 29930 recovering on TSA plates after being sublethally heated at 55 or 60°C

NaCl	55°C	60°C
0%	24.11 (±0.48)	10.95 (±1.01)
2%	20.66 (±0.59)	7.69 (±1.55)
4%	16.71 (±0.71)	6.42 (±1.91)
6%	7.35 (±1.64)	5.84 (±2.18)

요 약

본 연구에서는 우리 나라 세균성 이질을 유발하는 주요 원인 균인 *S. sonnei*를 대상으로 불충분한 열처리와 NaCl 처리에 따른 각각의 생존균수 변화와 불충분한 열처리 후 다양한 NaCl 농도 (0, 2, 4, 6%) 하에서 sublethal injured cell의 회복정도를 조사하였다. 그 결과, 불충분한 열처리 정도가 증가함에 따라 생존균수가 유의적인 감소를 나타내었으나, NaCl 처리시 NaCl 농도가 6% 까지 증가함에 따라서 생존균수의 변화가 거의 없었다. 그리고 55°C에서 30분 동안 열처리후 2% TSAS 배지에서 7.58 log CFU/mL, 4% TSAS 배지에서 7.83 log CFU/mL, 그리고 6% TSAS 배지에서 7.93 log CFU/mL만큼 각각 생성된 colony 숫자가 감소한 것으로 조사되었고, 60°C에서 30분동안 열처리후 2% TSAS 배지에서 6.71 log CFU/mL, 4% TSAS 배지에서 6.73 log CFU/mL, 그리고 6% TSAS 배지에서 6.73 log CFU/mL만큼 각각 생성된 colony 숫자가 감소한 것으로 조사되었다. 그리고 동일한 온도에서 sublethal heating후 노출된 NaCl 농도가 증가함에 따라서 *D*-value가 감소하는 경향을 나타내었다. 이와 같은 결과는 불충분한 열처리 과정에 의하여 생성된 sublethal injured cell들이 열처리후 회복되는 과정에서 배지의 NaCl 농도가 증가함에 따라서 회복정도가 감소하였음을 의미한다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 건강기능식품개발사업의 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다(01515-FS00-0501-0025).

문 헌

- Mohle-Boetani JC, Stapleton M, Finger R, Bean NH, Poundstone J, Blake PA, Griffin PM. Communitywide shigellosis: control of an outbreak and risk factors in child day-care centers. *Am. J. Public Health* 85: 812-816 (1995)
- Terajima J, Tamura K, Hirose K, Izumiya H, Miyahara M, Konuma H, Watanabe H. A multi-prefectural outbreak of *Shigella sonnei* infections associated with eating oysters in Japan. *Microbiol. Immunol.* 48: 49-52 (2004)
- Gupta A, Polyak CS, Bishop RD, Sobel J, Mintz ED. Laboratory-confirmed shigellosis in the United States, 1989-2002: epidemiologic trends and patterns. *Clin. Infect. Dis.* 38: 1372-1377 (2004)
- Kim YB, Moon JY, Lee BK. Antibiotic resistance and genetic analysis of *Shigella sonnei* strains isolated in South Korea and Japan. *J. Bacteriol. Virol.* 34: 93-102 (2005)
- Blackburn CW, Curtis LM, Humpheson L, Billon C, McClure PJ. Development of thermal inactivation models for *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7 with temperature, pH and NaCl as controlling factors. *Int. J. Food Microbiol.* 38: 31-44 (1997)
- Li X, Sheldon BW, Ball HR. Thermal resistance of *Salmonella*

- enterica* serotypes, *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus* in high solids liquid egg mixes. *J. Food Prot.* 68: 703-710 (2005)
7. Bunning VK, Crawford RG, Tierney JT, Peeler JT. Thermotolerance of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* after sublethal heat shock. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 3216-3219 (1990)
 8. Kang DH, Siragusa GR. Agar underlay method for recovery of sublethally heat-injured bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 5334-5337 (1999)
 9. Taormina PJ, Beuchat LR. Survival and heat resistance of *Listeria monocytogenes* after exposure to alkali and chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2555-2563 (2001)
 10. Iandolo JJ, Ordal ZJ. Repair of thermal injury of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 91: 134-142 (1966)
 11. Smolka LR, Nelson FE, Kelley LM. Interaction of pH and NaCl on enumeration of heat-stressed *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol.* 27: 443-447 (1974)
 12. Hernandez FJ, Goyache J, Orden JA, Blanco JL, Domenech A, Suarez G, Gomez-Lucia E. Repair and enterotoxin synthesis by *Staphylococcus aureus* after thermal shock. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1515-1519 (1993)
 13. Clavero MR, Beuchat LR. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in broth and processed salami as influenced by pH, water activity, and temperature and suitability of media for its recovery. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2735-2740 (1996)
 14. Juneja VK, Klein PG, Marmer BS. Heat shock and thermotolerance of *Escherichia coli* O157:H7 in a model beef gravy system and ground beef. *J. Appl. Microbiol.* 84: 677-684 (1998)
 15. Duffy G, Riordan DCR, Sheridan JJ, Eblen BS, Whiting RC, Blair IS, McDowell DA. Differences in thermotolerance of *Escherichia coli* O157:H7 strains in a salami matrix. *Food Microbiol.* 16: 83-91 (1999)
 16. Ahmed NM, Conner DE, Huffman DL. Heat-resistance of *Escherichia coli* O157:H7 in meat and poultry as affected by product composition. *J. Food Sci.* 60: 606-610 (1995)
 17. Zaika LL, Phillips JG. Model for the combined effects of temperature, pH and sodium chloride concentration on survival of *Shigella flexneri* strain 5348 under aerobic conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 101: 179-187 (2005)
 18. Zaika I.L. The effect of NaCl on survival of *Shigella flexneri* in broth as affected by temperature and pH. *J. Food Prot.* 65: 774-779 (2002)
 19. Novak JS, Juneja VK. Detection of heat injury in *Listeria monocytogenes* Scott A. *J. Food Prot.* 64: 1739-1143 (2001)
 20. Juneja VK, Eblen BS. Heat inactivation of *Salmonella typhimurium* DT104 in beef as affected by fat content. *Lett. Appl. Microbiol.* 30: 461-467 (2000)