

## 계란 오염 세균의 분리 및 분리 균주의 감마선 감수성 평가

김동호<sup>†</sup> · 윤혜정 · 송현파<sup>1</sup> · 임병락<sup>2</sup> · 조철훈<sup>1</sup>

한국원자력연구원 정읍방사선과학연구소, <sup>1</sup>충남대학교 동물자원생명과학과, <sup>2</sup>H&BT Korea

### Isolation of Egg-Contaminating Bacteria and Evaluation of Bacterial Radiation Sensitivity

Dong-Ho Kim<sup>†</sup>, Hye-Jeong Yun, Hyun-Pa Song<sup>1</sup>, Byung-Lak Lim<sup>2</sup>  
and Cheo-Run Jo<sup>1</sup>

Department of Radiation Biotechnology, Korea Atomic Energy Research Institute, Jeongeup 580-185, Korea

<sup>1</sup>Department of Animal Science and Biotechnology, Chungnam National University, Daejeon, 305-764, Korea

<sup>2</sup>H&BT Korea Co., Ltd., Iksan, 570-982, Korea

#### Abstract

Bacteria contaminated in eggs were isolated using selective media. 16S rDNA sequencing analysis of isolated bacteria was performed and *Staphylococcus sciuri*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, and *Enterococcus faecalis* were identified. No *Salmonella* strain, a typical contaminant of eggs, was found. The radiation sensitivities of isolated bacteria and *Salmonella typhimurium*, in an inoculated model system, were expressed in D<sub>10</sub> values. The ranges of D<sub>10</sub> values shown by *S. typhimurium*, *S. sciuri*, *B. cereus*, *E. coli*, *P. mirabilis*, and *E. faecalis* were 0.365-0.399 kGy, 0.418-0.471 kGy, 1.075-1.119 kGy, 0.280-0.304 kGy, 1.132-1.330 kGy, and 0.993-1.290 kGy, respectively. The growth of all six test bacteria in eggs (inoculated at 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> CFU/g) during 3 days of post-irradiation storage at ambient conditions (25°C) was recorded. *S. typhimurium* was eliminated by irradiation at 3 kGy, and *E. coli* and *S. sciuri* were eliminated by irradiation at 5 kGy. The viable cell counts of *B. cereus*, *P. mirabilis*, and *E. faecalis* in eggs showed 4-6 log reductions after irradiation with 5 kGy.

**Key words** : egg, gamma irradiation, bacteria, radiosensitivity

#### 서 론

계란은 식생활에서 매우 중요한 단백질 영양급원으로서 비교적 생산이 용이하고 가격이 저렴하여 소비가 꾸준히 증가하고 있는 농축산 식품원료이다(1). 계란의 소비는 크게 일반 가정에서의 소비와 가공식품 원료로서의 소비로 구분된다. 계란과 그 가공제품은 대체로 수분이 높고 영양원이 풍부한 미생물학적 환경조건을 지니고 있어서 제조 및 유통 단계에서 원료 관리, 선도 관리, 살균 처리, 완제품의 저온 관리 등을 통한 미생물 증식 억제가 중요한 품질관리 요소인 것으로 알려져 있다(2-4). 미생물에 의한 식중독

가운데 가장 큰 비중을 차지하는 것은 *Salmonella*에 의한 salmonellosis이다(5). 한편, 계란에는 *Salmonella enteritidis*를 비롯한 *S. Typhimurium*, *S. heidelberg* 등의 병원성 미생물 오염과 이로부터 유래한 식중독 발생 사례가 보고되어 있어(6,7) 식품위생측면에서 계란의 위생관리의 중요성이 강조되고 있다. 특히 계란은 계란으로 섭취되는 것보다 다른 식품에 부원료로 많이 사용되기 때문에 오염된 병원성미생물의 확산과 질병에 대한 위험성이 더욱 높다. 계란은 구조적으로 최외각에 존재하는 얇은 cuticle층, 난각, 3중의 난막 (outer-membrane, inner-membrane, limiting-membrane), 난백 및 난황으로 구성되어 있다. 계란의 미생물 오염은 주로 착란 과정 중 산란기에서 기인한 오염원에 의해 이루어지며, 점차 난각 등의 보호층을 통한 내부오염, 그리고 다른 식품으로의 전이 등으로 확산된다(8,9). 현재까지 계

<sup>†</sup>Corresponding author. E-mail : fungikim@kaeri.re.kr,  
Phone : 82-63-570-3140, Fax : 82-63-570-3149

란의 살균 및 신선도 확보를 위한 가장 일반적인 방법으로는 살균제 및 세척 방법이 이용되고 있으나 세척의 경우 세척 과정 중 계란의 외각 cuticle 층이 파괴되어 비 세척란보다 오히려 저장성이 떨어지는 경우도 있으므로 주의가 필요하다(10). 최근에는 mineral oil, gelatin, dextrin, chitosan 등의 피복처리방법이 보고되고 있으나 설비 및 기계장치 도입 등 경제적 문제점이 지적되고 있다(11,12)

방사선 조사 기술은 미생물의 살균에 의한 식품 및 농산물의 부패방지와 여러 공중보건산물의 위생화에 매우 효과적인 방법으로 인정되어 이미 여러 분야에서 유용하게 이용되고 있으며, 세계적으로 점차 그 이용범위가 확대되고 있다(13-15). 현재 국제기구(FAO/IAEA/WHO)와 선진국에서는 안전성과 기술적 타당성을 인정하여 현재 약 40개국에서 230여 품목에 대해서 식품 방사선조사가 이루어지고 있다. 또한 우리나라에서도 1987년 이래로 총 26개 품목의 식품에 대하여 감마선 조사가 허가되었다(16). 이와 같이 적정선량의 방사선 조사는 식품 고유의 품질을 유지하면서도 미생물을 선택적으로 살균할 수 있고 포장된 상태에서도 살균처리가 가능하여 제조공정에서의 2차 오염을 방지할 수 있는 특성을 가지고 있다(17). 하지만, 계란에 대한 오염 미생물의 분리와 방사선 살균효과에 대한 연구는 구체적으로 아직 이루어지지 않고 있다. 따라서 본 연구는 현재 유통 중인 계란의 주요 오염 미생물을 분리하여 방사선 살균을 위한 적정 감마선 조사선량을 설정함으로써 방사선 살균에 의한 계란의 미생물학적 안전성 확보에 필요한 기초자료를 제공하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 시 료

계란 시료는 10개 회사의 시판 제품을 전북 및 대전지역 소재 대형 할인점에서 구입하였다. 시료로 사용한 계란의 평균 중량은  $70 \pm 5.2$  g이었으며, 구입 즉시 시료의 미생물 분리, 감마선 조사 등의 실험을 실시하였다. 표준시험균주로 사용한 *Salmonella* Typhimurium KCTC 1925 (serogroup B)는 Korean Collection for Type Cultures (KCTC, Daejeon, Korea)에서 구입하였다.

### 선택배지를 이용한 세균의 분리

시료의 미생물 분리는 ISO 6579(18)에 준하여 실시하였다. 구입한 10개의 시료구에서 각각 10개씩 총 100개의 계란을 무작위로 표본 추출한 다음, 무균적으로 파쇄하여 난백과 난황을 제거한 후 난각 부분을 회수하였다. 회수된 100개의 난각을 각각 50 mL conical tube에 넣고 멸균 식염수 (NaCl 0.85%)를 첨가하여 4°C의 조건에서 30분간 진탕 교반한 다음 부유액 1 mL를 tryptic soy broth 10 mL에 접종

하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양액을 멸균 식염수 (NaCl 0.85%)를 이용하여 1/10 씩 단계별로 희석한 다음 각 희석액 1 mL를 취하여 선택배지 15 mL에 pour plating한 후, 이를 37°C의 배양기에서 48시간 배양하여 생성된 colony를 colony의 색, 모양 등의 외관적 차이에 따라 분리하였다. 분리된 colony는 각각의 선택배지에서 3회 계대 배양하여 순수분리 세균으로 보관하였다. 선택배지에서의 잠정적 미생물 분리 기준은 *Salmonella*-shigella agar (Difco Co. Detroit, MI, USA)에서 검은색을 나타내는 colony는 *Salmonella*로, 10% egg yolk가 첨가된 MYP agar (Oxoid, Basingstoke, U.K)에서 침전을 가진 분홍색을 나타내는 colony는 *Bacillus*로, Baird Parker agar (Oxoid, Basingstoke, U.K)에서 투명한 환을 가진 흑회색 colony는 *Staphylococcus*로, eosin methylene blue agar (Difco Co. Detroit, MI, USA)에서 녹황색을 나타내는 colony는 *E. coli*로 구분하였으며, 각 선택배지에서 다른 외관 특성을 나타내는 colony 또한 별도로 분리 보관하였다.

### 16S rDNA 서열분석에 의한 분리균주의 확인

각각의 선택배지에서 분리된 균주 5종에 대하여 universal primer를 이용한 16S rDNA 분석을 실시하여 염기 서열을 결정하였다. 배양액의 DNA 분리는 Dario 등(19)의 방법에 따라, DNA 증폭을 위한 PCR은 Breidt(20)의 방법에 따라 실시하였으며 사용한 primer는 16S rDNA의 공통서열에 바탕을 둔 universal primer를 사용하였다. Primer 서열은 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'(position 8-27, *Escherichia coli* numbering)와 5'-AAG GAG GTC ATC CAG CCG CA-3'(position 1541-1522) 으로 디자인 하였다. PCR 반응조건은 증류수 70 uL, 10X PCR buffer 10 uL, 25 mM MgCl<sub>2</sub> 10 uL, dNTP 1 uL, DNA 4 uL, Taq polymerase 1 uL (5 U/uL), primer (50 mM) 2 uL 를 첨가하여 denaturation 은 95°C에서 20초, annealing 50°C에서 40초, extension 72°C에서 1분 30초 씩 30회 반복 실시하였으며 72°C에서 5분으로 반응하였다.

### 분리균주 접종

본 실험에서 분리된 *Staphylococcus sp.*, *Bacillus. cereus*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis*, 그리고 본 실험에서는 분리되지 않았으나 계란의 오염미생물로 알려진 *Salmonella* Typhimurium KCTC 1925 (serogroup B) 공식균주를 배양하여 계란의 난각 표면과 내부에 접종하여 감마선 감수성을 측정하였다. 접종균주는 시험균주 6종의 단일 colony를 tryptic soy broth (Difco Co. Detroit, MI, USA) 10 mL에 접종하여 37°C에서 24시간 동안 1차 배양한 후, 배양액 0.1 mL를 취해 다시 tryptic soy broth 100 mL에 접종하여 18시간 동안 배양하여 준비하였다. 계란 접종을 위한 미생물 시료는 각 균주 배양액의 생균수가

$10^{7-8}$  CFU/mL 수준이 되도록 식염수로 희석하여 제조하였다. 미생물 접종 실험을 위한 계란 시료는 5 kGy의 감마선을 조사하여 무균 상태를 확인한 후 실험에 사용하였다. 분리 균주의 접종은 난각 표면과 내부접종으로 구분하여 실시하였다. 난각 표면 접종은 계란을 각각의 균주 배양액에 30분 동안 침지한 다음 상온에서 건조시킨 후 멸균팩에 포장하여 실험에 사용하였으며, 내부접종은 난각에 구멍을 낸 다음 일회용 주사기에 균주 희석액 1mL를 취하여 접종하고 접종 부위를 parafin으로 밀봉하여 멸균팩에 담아 실험에 사용하였다.

### 감마선 조사

미생물을 접종한 계란시료를 조사선량 및 접종균주에 따라 각각 40개씩 준비하여 감마선을 조사하였다. 시료의 감마선 조사는 한국원자력연구소의 선원 100,000 Ci, Co-60 감마선 조사시설(AECL, IR-79, Canada)을 이용하여 15°C의 실온에서 분당 70 Gy의 선량률로 각각 0, 1, 3, 5 kGy의 총 흡수선량을 얻도록 하였다. 이 때 분리균주의 배양액도 동일 선량 조건에서 감마선을 조사하여 감마선 감수성 평가 시료로 준비하였다. 감마선 흡수선량의 확인은 5 mm-diameter alanine dosimeter (Brucker Instruments, Rjeomstettem, Germany)를 사용하였고 총 흡수선량의 오차는  $\pm 5\%$  이내로 하였다. 미생물 접종 실험을 위한 계란 시료의 살균은 동일한 조건에서 5 kGy의 감마선을 조사하였다.

### 감마선 조사 시료의 미생물 분석

감마선 조사 직후의 미생물 생균 수를 측정하여 접종 균주의 방사선 감수성을 계산하였으며 감마선 조사 시료를 25°C 상온에 3일간 보관하면서 감마선 조사 후 보존기간에 따른 미생물의 성장변화를 관찰하였다. 표준시험균주 *S. Typhimurium*과 분리균주 5종의 생균수 측정은 상기에 언급한 선택배지에서 pour plating에 의한 plate count 방법으로 검사하였다(21). 모든 균주는 37°C에서 2일간 배양하여 생성된 colony의 수를 계수하여 계란 1 g당의 colony formation unit (CFU/g)으로 나타내었다. 미생물의 개체수를 1/10로 줄이는데 필요한 방사선량  $D_{10}$  값은 아래의 log 생균수값의 회귀식에 의하여 산출하였다.

$$D_{10} = \frac{\text{Dose (kGy)}}{(\log N_0 - \log N)}$$

( $N_0$ : 미생물의 초기균수,  $N$ : 방사선 조사 후 생존한 미생물의 수, dose: kGy)

### 결과 및 고찰

#### 계란의 미생물 분리

계란 오염 미생물의 방사선 감수성을 측정하기 위한 목

적으로 시중 계란에 오염된 세균을 분리한 결과 5 종류의 세균을 선정하였다. 1차적으로 10% egg yolk가 첨가된 MYP agar에서 침전을 가진 분홍색을 나타내는 colony는 *Bacillus*로, Baird Parker agar에서 투명한 환을 가진 흑회색 colony는 *Staphylococcus*로, eosin methylene blue agar에서 녹색을 나타내는 colony는 *E. coli*로 잠정 구분하였으며, 각 선택배지에서 출현빈도가 높은 2 종류의 colony 또한 별도로 분리 보관한 다음 16S rDNA 염기서열분석을 통하여 속단위의 잠정 동정을 실시하였다. 선택배지에서 1차적으로 분리된 세균 5종에 대한 16S rDNA 염기서열분석을 통한 분리·동정 결과 *Staphylococcus sciuri*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* 및 *Enterococcus faecalis*를 국내 유통계란의 주요 오염 미생물인 것으로 잠정 동정하였다(Table 1). 일반적으로 계란의 병원성미생물 주요염원은 *Salmonella*인 것으로 알려져 있으나(6,7) 본 실험에서는 *Salmonella* 분리 선택배지인 *Salmonella-shigella* agar에서 *Salmonella* 특유의 검은색을 나타내는 colony가 발견되지 않아 *Salmonella*는 검출되지 않은 것으로 판정하였다. 한편, Moon과 Ko(22)은 시중 유통 계란의 오염실태 조사에서 시험 시료의 41.3%가 세균에 오염되어 있었다고 보고하였으며, Lee 등(23)은 난각의 일반 세균수는  $8.2 \times 10^3$  CFU/g이며, 조사 품목의 5%에서는 대장균군이 검출되었다고 보고한 바 있어 시중 유통 계란의 위생학적 개선이 시급함을 알 수 알 수 있다.

#### 계란 분리 세균의 감마선 감수성

본 실험에서 계란으로부터 분리된 세균 5종의 broth culture, 계란 난각 표면 접종, 계란 배부 접종 조건에서의 감마선 조사에 대한 감수성을  $D_{10}$  값으로 계산하여 Table 2에 제시하였다. *Salmonella*는 본 실험에서는 분리되지 않았으나 계란의 주요 병원성 미생물로 알려져 있어(6,7) 표준 시험균주로 추가하였다. 시험 균주 중 표준균주인 *S. Typhimurium*의  $D_{10}$  값은 0.365~0.399 kGy, *Staphylococcus sciuri*는 0.442~0.471 kGy, *E. coli*는 0.280~0.344 kGy의 범위로 계산되어 비교적 감마선에 대한 감수성이 높은 것으로 평가되었다. 그리고 *Enterococcus faecalis*와 *P. mirabilis*는 1.0 kGy 전후, 그리고 *B. cereus*는 1.075~1.119 kGy 수준의  $D_{10}$  값을 나타내어 비교적 감마선에 대한 저항성이 높은 것으로 나타났다.

육 등(24)은 우육에 접종된 균주의 감마선 저항성 연구결과에서 *Staphylococcus*와 *S. Typhimurium*의  $D_{10}$  값이 각각 0.44, 0.54 kGy로 보고한 바 있으며, Maxcy(25)는 저지방육에서 *S. Typhimurium*의  $D_{10}$  값을 0.59 kGy로 보고한 바 있다. 본 실험의 결과는 이러한 보고에 비하여 *Salmonella*의  $D_{10}$  값은 다소 낮고 *Staphylococcus*는 유사한 경향이었으나 *Salmonella* spp.에 대해 0.5~1.0 kGy의  $D_{10}$  값은 균주, 조사 상태 및 기질에 따라 차이가 있다는 Thayer 등(26)의 연구결

**Table 1. Identification of isolated bacteria from the egg using 16S rDNA sequencing analysis**

Isolate No.	16S rDNA sequence analysis		
	Nearst(?) relative in GenBank	Accession No.	Similarity (%) nt difference /compared
A	<i>Staphylococcus sp.</i>	EU419917.1	100 0/533
	<i>Staphylococcus sp.</i>	EU277741.1	100 0/533
	<i>Staphylococcus sciuri</i>	EU095646.1	100 0/533
	<i>Staphylococcus sciuri</i>	AM778178.1	100 0/533
	<i>Staphylococcus sciuri strain RTE 61</i>	EF213033.1	100 0/533
	<i>Staphylococcus sciuri</i>	DQ536508.1	100 0/533
	<i>Staphylococcus sciuri strain BSD 14</i>	DQ518614.1	100 0/533
	<i>Staphylococcus sciuri</i>	EF204306.1	100 0/533
	<i>Staphylococcus sciuri</i>	EF204305.1	100 0/533
	<i>Staphylococcus sciuri</i>	EF204304.1	100 0/533
	<i>Staphylococcus sciuri</i>	DQ364587.1	100 0/533
	<i>Bacillus cereus strain W-2</i>	EU187485.1	99 1/936
	<i>Bacillus sp.</i>	EU584544.1	99 1/936
	<i>Bacillus sp.</i>	EU584537.1	99 1/934
	<i>Bacillus cereus</i>	EF473136.1	99 1/934
	<i>Bacillus cereus</i>	EF473128.1	99 1/934
B	<i>Bacillus cereus</i>	DQ339659.1	99 1/930
	<i>Bacillus cereus</i>	DQ289058.1	99 1/934
	<i>Bacillus sp.</i>	EU573774.1	99 0/925
	<i>Bacillus sp.</i>	EU584552.1	99 1/933
	<i>Bacillus sp.</i>	EU558976.1	99 0/925
	<i>Bacillus cereus strain HNR10</i>	EU373359.1	99 0/925
	<i>Escherichia coli strain BE27</i>	EF560780.1	99 1/907
	<i>Escherichia coli</i>	EF191171.1	99 1/907
	<i>Escherichia coli strain BE39</i>	EF560783.1	99 1/905
	<i>Escherichia coli ATCC 8739</i>	CP000946.1	99 1/904
C	<i>Shigella flexneri strain FBD002</i>	EU009187.1	99 1/904
	<i>Escherichia coli strain SYW003</i>	EF620924.1	99 1/904
	<i>Escherichia coli strain BEE15</i>	EF560791.1	99 1/904
	<i>Escherichia coli strain CICCHLQ41</i>	EF528266.1	99 1/904
	<i>Escherichia coli O157:H7</i>	AM184233.1	99 1/904
	<i>Proteus mirabilis strain HI4320</i>	AM942759.1	100 0/633
	<i>Proteus mirabilis strain HI4320</i>	EU382215.1	100 0/633
	<i>Proteus mirabilis</i>	AM231709.1	100 0/633
D	<i>Proteus mirabilis strain MP4</i>	AY186055.1	100 0/633
	<i>Proteus sp.</i>	AM232728.1	100 0/633
	<i>Proteus mirabilis</i>	EF194104.1	99 1/633
	<i>Proteus mirabilis</i>	EF091150.1	99 1/633
	<i>Proteus sp.</i>	EU530206.1	99 1/633
	<i>Enterococcus faecalis strain IJ-12</i>	EU547777.1	99 1/928
	<i>Enterococcus faecalis</i>	AB362602.1	99 1/928
E	<i>Enterococcus faecalis</i>	AB362600.1	99 1/928
	<i>Enterococcus faecalis</i>	AB362592.1	99 1/928
	<i>Enterococcus faecalis</i>	AB244434.1	99 1/928
	<i>Enterococcus faecalis strain 47/3</i>	AM697463.1	99 1/928

**Table 2. Radio-sensitivity (D<sub>10</sub> value) of *Salmonella* Typhimurium and isolated bacteria from egg in a broth culture and egg inoculated model system**

Microorganism	D10 value (kGy)		
	Broth culture	Outer-membrane	Inner-membrane
<i>Salmonella</i> Typhimurium	0.365	0.378	0.399
<i>Staphylococcus sciuri</i>	0.442	0.471	0.418
<i>Bacillus cereus</i>	1.075	1.119	1.094
<i>Escherichia coli</i>	0.280	0.304	0.290
<i>Proteus mirabilis</i>	1.132	1.330	1.303
<i>Enterococcus faecalis</i>	1.044	1.290	0.993

과를 감안할 때 선행연구결과와 유사한 수준인 것으로 해석되었다. 한편, 감마선 조사에 대한 *Bacillus*의 저항성은 영양 세포는 0.5 kGy 내외, 내생포자 상태에서는 2.5 kGy 수준인 것으로 보고되고 있는데(27,28), 본 실험에서는 전 배양을 실시한 후 분 배양된 균주 배양액을 10<sup>6-7</sup> CFU/g 수준으로 접종하여 실험한 것으로 영양세포와 내생포자가 혼재되어 1.075~1.119 kGy 범위의 D<sub>10</sub> 값이 나타난 것으로 해석되었다. 이는 Fig. 3에 나타난 바와 같이 3 kGy 이하의 조사선량에서는 접종한 *B. cereus*의 사멸률이 3 log 단위 이상이나 3~5 kGy의 범위에서는 0.5 log 단위로 사멸율이 급격히 낮아지는 결과로도 확인할 수 있다. 일반적으로 감마선이 미생물에 미치는 영향은 라디칼에 의한 간접작용에 의해 나타나는데 미생물이 서식하고 있는 주변환경이 미생물에 대한 효과적인 조사선량을 결정하는데 중요한 역할을 한다. 즉, 수분활성이 낮을수록, 주변 환경의 화학적 조성이 복잡할수록 감마선에 의하여 세포 내부로 생성되는 라디칼과의 경쟁이 커져서 미생물의 감마선 저항성이 다소 높아진다(29). 본 실험에서도 수분 활성이 높은 broth culture나 난각 내부에 접종한 미생물에 비하여 외기와 접하고 있어 수분활성이 낮은 난각 표면 접종 미생물의 감마선 저항성이 다소 높은 것으로 나타났으나 통계적인 유의차(P<0.05)는 나타나지 않았다.

#### 감마선 조사후 보존기간에 따른 미생물 생장

시험 균주가 접종된 계란에 감마선을 조사하여 25℃에 3일간 저장하면서 미생물의 생장변화를 측정하여 Fig. 1~6에 나타내었다. *S. Typhimurium*을 접종한 시료는 난각 표면과 계란 내부 접종 시험구 모두 3 kGy 이상의 조사선량에서는 생존 미생물이 검출되지 않았으며 저장 기간 중에는 보존 1일째에 다소 감소하였다가 증가하는 양상을 나타내었다. 이는 Thayer(17)의 멸균된 닭고기에 *S. Typhimurium*을 접종하여 3 kGy 감마선 조사에 의해 6 log cycle 수준의 미생물 증식억제를 나타낸 결과와 유사한 수준이었다. *Staphylococcus sciuri* 균주를 각각 표면과 난각에 접종한 경우 1, 3 kGy 감마선 조사구에서는 미생물의 생존과 보존

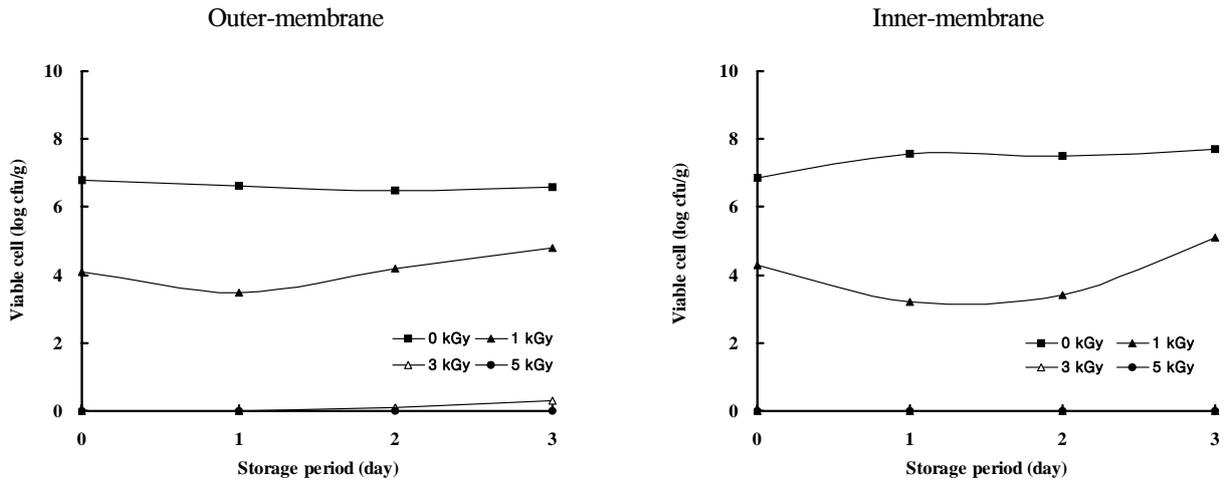


Fig. 1. Growth of inoculated *Salmonella* Typhimurium in egg during 3 days of post-irradiation storage at 25°C.

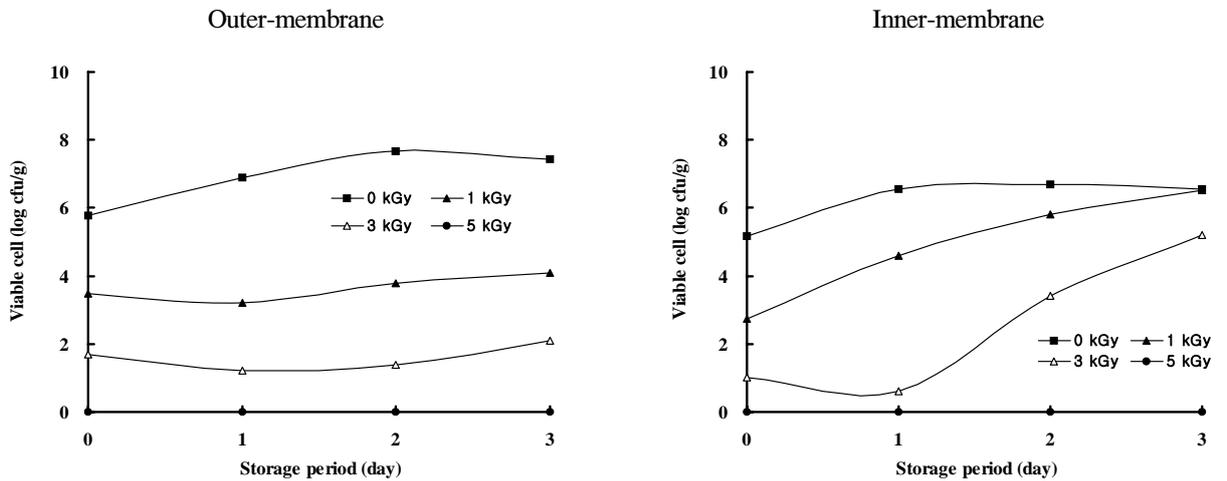


Fig. 2. Growth of inoculated *Staphylococcus sciuri* in egg during 3 days of post-irradiation storage at 25°C.

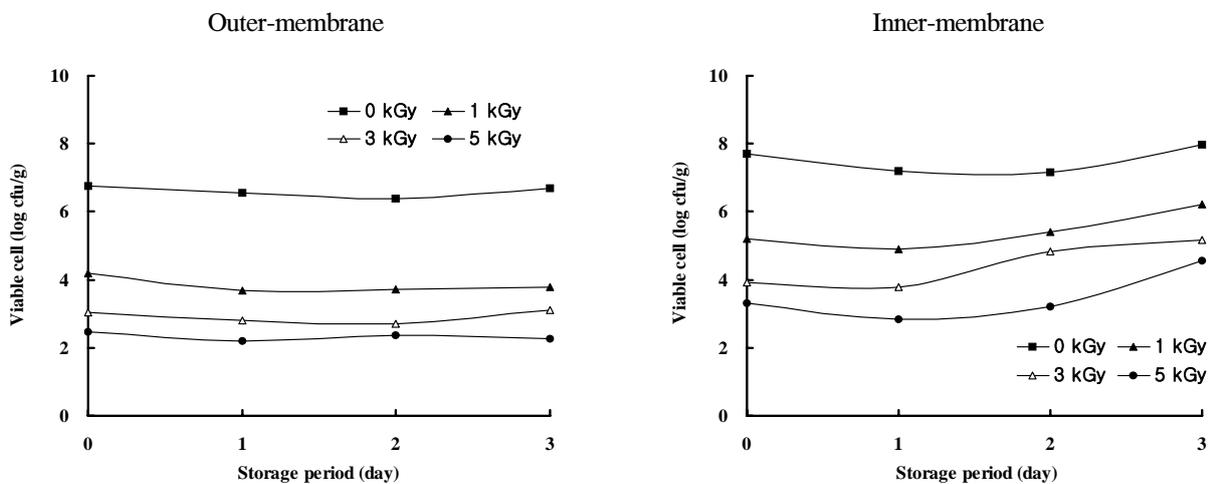


Fig. 3. Growth of inoculated *Bacillus cereus* in egg during 3 days of post-irradiation storage at 25°C.

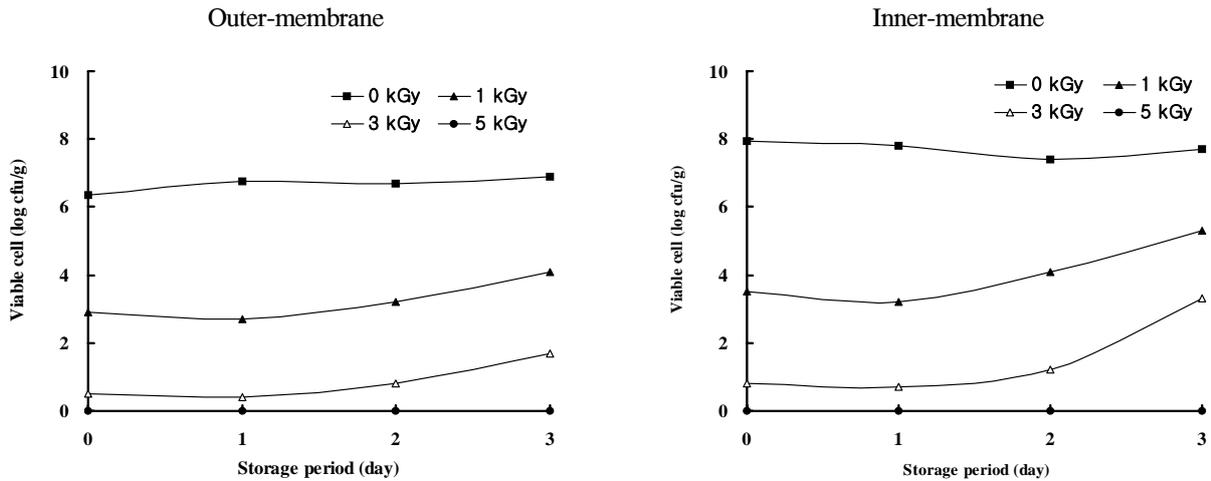


Fig. 4. Growth of inoculated *Escherichia coli* in egg during 3 days of post-irradiation storage at 25°C.

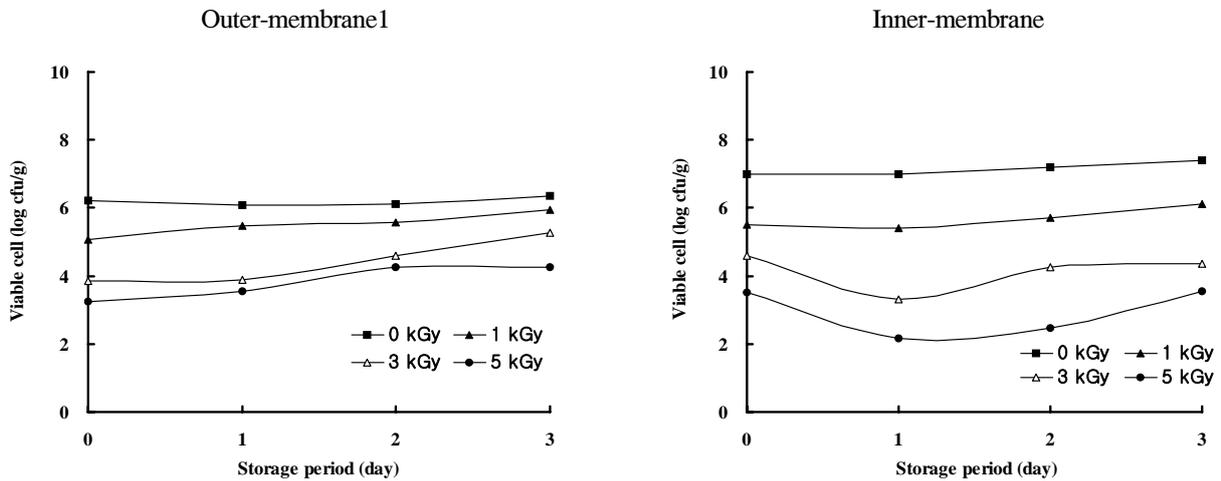


Fig. 5. Growth of inoculated *Proteus mirabilis* in egg during 3 days of post-irradiation storage at 25°C.

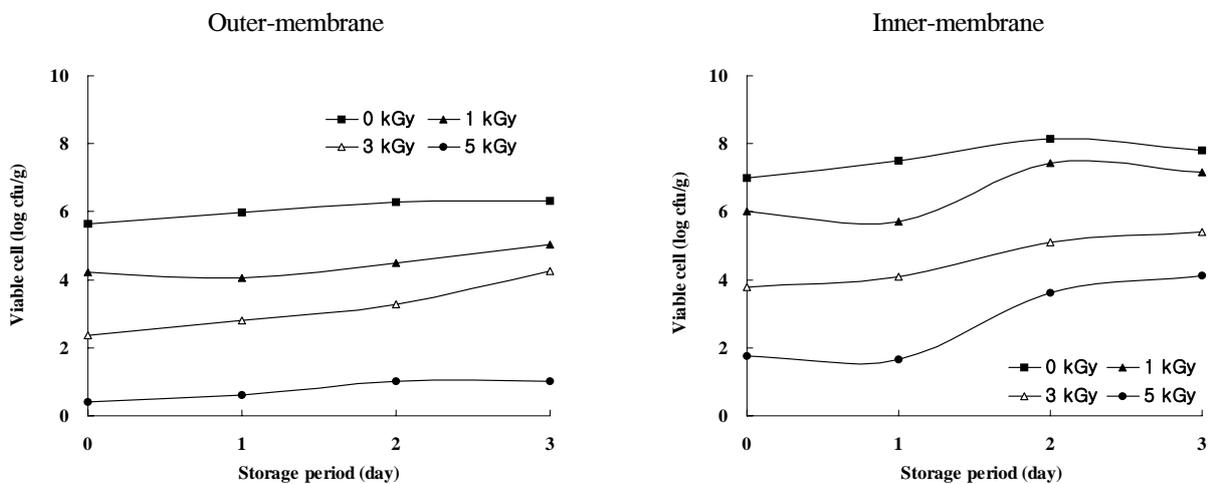


Fig. 6. Growth of inoculated *Enterococcus faecalis* in egg during 3 days of post-irradiation storage at 25°C.

에 따른 생장이 관찰되었으나 5 kGy 처리구에서는 생존 미생물이 검출되지 않았다. 한편, *Staphylococcus sciuri*를 접종하여 3 kGy의 감마선 조사를 실시한 시료의 경우 난각 표면 접종 시료는 생존 미생물의 생장이 1 log CFU/g 단위로 낮았으나 난각 내부 접종 시료는 3 log CFU/g 단위로 급격히 증식하였다. 이러한 결과는 다소의 차이는 있으나 다른 미생물의 접종 시험구에서도 일반적인 경향으로 나타났다. 이는 난각 표면은 공기와 접하고 있어 건조한 환경이 유지되고 영양물질이 제한되는데 반하여 계란의 내부는 수분활성이 높고 미생물이 이용 가능한 영양분이 풍부한 환경적 차이 때문인 것으로 사료되었다. *B. cereus*는 3 kGy의 선량에서 비조사 대조구에 비하여 약 4 log CFU/g 단위의 미생물 억제 효과가 나타났으며 *E. coli*는 6~7 log CFU/g 내외의 미생물 생장 억제 효과가 관찰되었다. *P. mirabilis*는 상대적으로 미생물 저항성이 높아 5 kGy의 감마선 조사선량에서 3~4 log CFU/g 수준의 미생물 생장 억제효과를 보였고 *E. faecalis*는 동일 선량에서 5~6 log CFU/g 수준의 미생물 생장 억제효과가 나타났다. 일반적으로 감마선 조사된 시료에서 미생물 증식이 억제되는 것은 완전사멸 또는 감마선 조사에 의해 손상 받은 생존 세포가 저장 기간이 경과함에 따라 주변 환경에 적응하지 못하고 점차 사멸되는 post-irradiation effect(30, 31)에 의한 것으로 알려져 있는데 본 연구에서도 *P. mirabilis*를 비롯한 시험구에서 이러한 경향이 관찰 되었다.

Lee 등(23)은 계란 난각의 일반적인 세균 오염도가  $8.2 \times 10^3$  CFU/g 수준이라고 보고한 바 있고, Kim 등(32)은 구운 계란의 미생물 오염도가 일반세균  $>10^4$  CFU/g, 대장균군  $<10^1$  CFU/g, 곰팡이 포자  $>10^2$  CFU/g 수준이며 이러한 수준의 미생물 오염도는 3 kGy 수준의 감마선 조사로 제어 가능하다고 보고한 바 있다. 한편, 감마선 조사 계란을 이용한 가공제품의 물성변화는 없는 것으로 밝혀져 있으므로(33) 계란에 대한 감마선 조사 기술적용은 계란 위생화에 적용될 수 있는 유효한 기술이 될 것으로 판단된다. 본 실험은 시중 유통계란의 미생물 검출 수준보다 높은  $10^{6-7}$  CFU/g 의 미생물을 인위적으로 접종하여 계란 미생물의 감마선 조사에 의한 제어를 살펴본 것으로, 일반적인 시중 유통 계란의 3 kGy 수준의 감마선 조사선량으로 계란의 품질을 유지하면서 위생학적으로 안전한 수준으로 미생물을 저감화 할 수 있을 것으로 판단된다.

## 요 약

계란의 주요 오염 미생물을 분리하여 계란의 난각 표면과 내부에 접종한 다음 감마선 살균을 실시하여 각 미생물의 감마선 감수성을 평가하였다. 본 실험에서 시중 유통 계란으로부터 분리된 미생물을 16S rDNA 염기서열분석을

통하여 잠정 동정한 결과 *Staphylococcus sciuri*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* 및 *Enterococcus faecalis*의 5 종의 미생물이 확인되었으며 *Salmonella*는 검출되지 않았다. 표준 시험균주인 *S. Typhimurium*을 비롯하여 계란 분리균주 5종을 계란 난각 표면과 내부에  $10^{6-7}$  CFU/g되게 접종한 다음 감마선을 조사하여 D10 값으로 감마선 감수성을 평가한 결과, *S. Typhimurium*은 0.365~0.399 kGy, *Staphylococcus sciuri*는 0.418~0.471 kGy, *B. cereus*는 1.075~1.119 kGy, *E. coli*는 0.280~0.304 kGy, *P. mirabilis*는 1.132~1.330 kGy, 그리고 *Enterococcus faecalis*는 0.993~1.290 kGy 수준의 D10 값을 나타내었다. 감마선 조사 후 25°C 상온저장 조건에서 미생물의 생장을 살펴본 결과, *S. Typhimurium*은 3 kGy에서, *E. coli*와 *Staphylococcus sciuri*는 5 kGy에서 완전 사멸되었으며 다른 미생물 접종 시험군에서도 각각의 D10 값에 준하는 미생물생장 억제효과가 나타났다. 일반적인 계란의 미생물 오염 수준을  $10^2$  CFU/g 수준임을 감안할 때, 3 kGy의 감마선 조사선량으로 계란의 미생물 제거가 가능할 것으로 사료되었다.

## 참고문헌

1. Yoo, Y.M. (2003) Changes in quality of eggs with storage temperature and time. Monthly Poultry, 3, 119-124
2. Kim, J.W., Kim, H.C. and Hur, J.W. (1998) Quality changes of egg products during storage. Korean J. Food Sci. Technol., 30, 1480-1483
3. Jang, K.I., Park, J.H. and Kim, K.Y. (1999) Studies on *Salmonella enteritidis* contamination in chicken egg using confocal scanning laser microscopy. Korean J. Food Sci. Technol., 31, 771-777
4. Jones, F.T., Rives, D.V. and Carey, J.B. (1995) *Salmonella* contamination in commercial eggs and an egg production facility. Poult. Sci., 74, 753-757
5. Gast, R.K. and Beard, C.W. (1992) Detection and enumeration of *Salmonella enteritidis* in fresh and stored egg laid by experimentally infected hens. J. Food Prot., 55, 152-156
6. Schoeni, J.L., Glass, K.A., McMernott, J.L. and Wong, A.C.L. (1995) Growth and penetration of *Salmonella enteritidis*, *Salmonella heidelberg* and *Salmonella typhimurium* in egg. Int. J. Food Microbiol., 24, 385-396
7. Jones, F.T., Rives, D.V. and Carey, J.B. (1995) *Salmonella* contamination in commercial eggs and an egg production facility. Poult. Sci., 74, 753-757
8. Gast, R.K. and Beard, C.W. (1992) Detection and enumeration of *Salmonella enteritidis* in fresh and stored

- eggs laid by experimentally infected hens. *J. Food Prot.*, 55, 152-156
9. Hammack, T.S., Sherrod, P.S., Bruce, V.R., June, G.A., Satchell, F.B. and Andrews, W.H. (1993) Growth of *Salmonella enteritidis* in grade A eggs during prolonged storage. *Poult. Sci.*, 72, 373-377
  10. Lee, S.H., No, H.K. and Jeong, Y.H. (1996) Effect of chitosan coating on quality of egg during storage (in Korea). *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 25, 288-293
  11. Jang, K.I., Park, J.H. and Kim, K.Y. (1999) Studies on *Salmonella enteritidis* contamination in chicken egg using confocal scanning laser microscopy. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 31, 771-777
  12. Farag, R.S., Daw, Z., Shallan, M.A. and Ebtesam, A.M. (1994) Biochemical and microbial studies on the efficiency of some coating materials for egg preservation. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 45, 263-273
  13. FAO/IAEA/WHO (1999) High-dose irradiation: Wholesomeness of food irradiated with doses above 10 kGy. In WHO technical report series 890. World Health Organization, Geneva. p.49-77
  14. Byun, M.W. (1997). Application and aspect of irradiation technology in food industry. *Food Sci. Ind.*, 30, 89-100.
  15. Grant, I.R. and Patterson, M.F. (1992) Sensitivity of foodborne pathogens to irradiation in the components of a chilled ready meal. *Food Microbiol.*, 9, 95-103
  16. Byun, M.W. and Lee, J.W. (2003) Application of irradiation technology for food safety and security. *Food Sci. Ind.*, 36, 25-41
  17. Thayer, D.W. (1994) Wholesomeness of irradiated foods. *Food Technol.*, 48, 58-67
  18. ISO 6579 (1993) Microbiology-General Guidance on Methods for the Detection of *Salmonella* International Organization of Standardization.
  19. Dario, D.M., Luciana, C., Elisabetta D., Simona, D.P., Emma, F. and Laura, T. (2003) Evaluation of DNA extraction methods for use in combination with sybr green I real-time PCR to detect *Salmonella enterica* serotype enteritidis in poultry. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 3456-3461
  20. Breidt, F. and Fleming, H.P. (1996) Identification of lactic acid bacteria by ribotyping. *J. Rapid Methods Automation Microbiol.*, 4, 219-233
  21. Harrigan, W.F. and Mccane, M.E. (1976) Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology. Academic Press, London, p.25-146
  22. Moon, E.S. and Ko, M.H. (2006) Quality grade of eggs in the food stores. *Safe Food*, 1, 23-26
  23. Lee, S.M., Kim, K.H., Lee, J.G., Park, E.J., Lee, S.W. and Hong, C.H. (2002) Hygienic quality of eggs in the department food stores in the Incheon metropolitan area. *J. Food Hyg. Safety*, 17, 129-136
  24. Yook, H.S., Kim, S., Lee, K.H., Kim, Y.J., Kim, K.P. and Byun, M.W. (1998) Gamma-radiation sensitivity of pathogen bacteria in beef. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 30, 1432-1438
  25. Maxcy, R.B. (1983) Significance of residual organisms in foods after substerilizing doses of gamma irradiation. *J. Food Safety*, 5, 203-211
  26. Thayer, D.W., Boyd, G., Muller, W.S., Lipson, C.A., Hayne, W.C. and Baer, S.H. (1990) Radiation resistance of *Salmonella*. *J. Ind. Microbiol.*, 5, 383-390
  27. Kim, D.H., Yook, H.S., Youn, K.C., Cha, B.S., Kim, J.O. and Byun, M.W. (2000) Changes of microbiological and general quality characteristics of gamma irradiated *Chungkukjang*. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 32, 896-901
  28. Briggs, A. (1966) The resistance of spores of the *Bacillus* to phenol, heat and radiation. *J. Appl. Bacteriol.*, 29, 490-504
  29. Farkas, J. and Roberts, T.A. (1976) The effect of sodium chloride, gamma irradiation and/or heating on germination and development of spores of *Bacillus cereus* in single germinant and complex media. *Acta Alimentaria*, 5, 289-302
  30. Ma, K. and Maxcy, R.B. (1981) Factors influencing radiation resistance of vegetative bacteria and spores associated with radappertization of meat. *J. Appl. Bacteriol.*, 36, 677-682
  31. Kim, D.H., Ahn, H.J., Yook, H.S., Kim, M.J., Sohn, C.B. and Byun, M.W. (2000) Quality properties of gamma irradiated *Samjang*, seasoned soybean paste during storage. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 32, 396-401
  32. Kim, D.H., Song, H.P., Lee, Y.S., Cha, B.S., Kim, B.K. and Byun, M.W. (2004) Effects of gamma irradiation on the shelf stability of whole baked egg. *Korean J. Food Preserv.*, 11, 394-399
  33. Jang, A., Lim, D.G., Jeon, H.J., Jo, C., Kim, I.J. and Lee, M. (2007) Optimum conditions for the separation of lecithin from egg yolk by response surface methodology. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.*, 27, 482-488