



Staphylococcus aureus 의 sublethal heating 후 NaCl 농도에 따른 회복 정도 비교

박경식 · 김민주 · 정혜진 · 김근성*

중앙대학교 식품공학과

Comparison of Recovery Levels of *Staphylococcus aureus* Treated at Different NaCl Concentrations after Sublethal Heating

Kyung-Shik Park, Min-Ju Kim, Hye-Jin Jung, and Keun-Sung Kim*

Dept. of Food Science and Technology, Chung-Ang University, Ansung, 456-756 Korea

(Received October 7, 2009/Revised November 18, 2009/Accepted November 30, 2009)

ABSTRACT - The viability of *Staphylococcus aureus*, a significant cause of food poisoning 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 concentrations 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 7.91, 7.97 and 7.99 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 6.46, 6.47 and 6.48 log CFU/mL on 2, 4 and 6% TSAS, respectively. Decimal reduction times (*D*-value) decreased with increasing NaCl treatment concentrations after sublethal heating at 55 and 60°C. These data imply that the *S. aureus* cells sublethally injured by insufficient heating processes had a lower recovery rate with increasing NaCl concentrations in the recovery media.

Key words: *staphylococcus aureus*, sublethal injury, sublethal heating, NaCl treatment, *D*-value

식품은 그 영양적 가치 및 기호성 등에 못지않게 인간의 질병 예방 및 건강을 유지하는 차원에서 반드시 위생학적 안전성이 확보되어야만 한다. 그러나 해마다 국내·외적으로 식중독세균들에 의한 식중독 사건이 끊임없이 발생하고 그 규모 면에 있어서도 대형화되고 있는 추세이다. 이 중에서도 *Staphylococcus aureus*에 의한 식중독은 우리나라에서 *Vibrio* spp., *Salmonella* spp.에 이어 세 번째로 많이 발생하는 식중독의 원인균으로 식품 위생상 중요하게 다뤄지고 있다.

*S. aureus*는 자연계에 널리 분포하고 있으며, 10%의 NaCl 존재하에서도 성장이 가능한 것으로 알려져 있다. 또한 일반적으로 김밥, 샌드위치, 도시락 등 곡류 및 가공품, 복합조리식품 등에서 많이 검출되고, 식품원료로는 다양한

육제품과 유가공품에서 많이 검출되고 있으며, 특히 닭고기에서는 30-60%, 생유나 유제품에서는 60-90%의 분포로 많이 검출되고 있다.

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 손상된 부분이 회복될 수 있는데 적합한 환경에서 자연치유 될 수 있어서 많은 문제를 야기하고 있다¹⁻⁵⁾. 이에 따라 최근에는 영양배지나 다양한 식품에 *Salmonella* spp.^{2,6-8)}, *Listeria monocytogenes*⁶⁻⁹⁾, *Escherichia coli* O157:H7^{2,8,10-12)}, 그리고 *S. aureus*¹³⁻¹⁵⁾ 등의 균주들을 인위적으로 접종하여 열처리한 후, 선택배지에 spreading하여 sublethal injured cell의 회복 정도를 조사한 연구결과가 보고된 바 있다. 특히 현재까지 *S. aureus*에 대한 선행 연구를 통하여 열처리 후 특정 농도의 NaCl 처리에 따른 회복 정도 비교¹³⁾, 열처리 후 다양한 배지에서의 회복 정도 비교¹⁴⁾, 특정 온도에서의

*Correspondence to: Keun-Sung Kim, Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University, 72-1, Ansung-si, Gyunggi 456-756, Korea
Tel: 82-31-670-3032, Fax: 82-31-675-4853
E-mail: keunsung@cau.ac.kr

열처리 후 다양한 염농도에서의 회복능력 비교¹⁵⁾에 관한 연구가 보고된 바 있으나 열처리 온도 및 시간 별 다양한 농도의 NaCl처리에 따른 회복 정도 비교에 관한 연구는 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 우리 나라 주요 식중독 원인균인 *S. aureus*를 대상으로 55°C와 60°C에서 불충분하게 열처리할 때 처리 시간별 생존균수의 변화와 NaCl 처리할 때 NaCl 농도별 생존균수의 변화를 각각 조사하였다. 그리고 다양한 열처리 온도(55°C, 60°C)와 시간(5분, 10분, 15분, 30분)에서 불충분하게 열처리한 후 다양한 염농도 조건(0%, 2%, 4%, 6%)하에서 sublethal injured cell의 회복 정도를 조사하였고, 그에 따른 *D*-value도 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주

본 연구를 위하여 표준균주인 *S. aureus* ATCC 19095를 사용하였다. 본 균주는 사용 전 tryptic soy broth (TSB, Difco Laboratories, MI, USA) 및 tryptic soy agar (TSA, Difco Laboratories, MI, USA)에 수회 계대배양하여 사용하였다.

Sublethal heating 처리

S. aureus ATCC 19095 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. 1 mL의 현탁액에 미리 55°C 또는 60°C로 데워진 1 mL의 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.2)를 첨가해 주고, 열처리 시간을 0분(control), 5분, 10분, 15분, 30분으로 달리하여 열처리 한 뒤 반응의 진행을 멈추기 위하여 얼음으로 식혀주었다.

Sublethal heating후 NaCl 처리

다양한 열처리 온도와 시간으로 열처리한 *S. aureus* 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 반복 실험을 통하여 얻은 결과값을 본 연구 결과에 사용하였다.

D-value

각기 다양한 열처리 온도와 시간으로 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°C, 60°C)와 열처리 시간(5분, 10분, 15분, 30분)이 *S. aureus* ATCC 19095의 생존에 미치는 영향을 조사하고자 sublethal injured cell의 회복이 가능한 영양배지인 TSA plate에 열처리한 sample을 spreading한 뒤 colony를 counting하여 생존균수를 측정하였다. 그 결과, Fig. 1에서와 같이 열처리 온도와 시간에 따라 생존균수가 유의적인 감소를 하였다. 우선 열처리 시간에 따른 변화를 보면, 55°C 나 60°C로 열처리를 15분 이상하였을 때 생존균수가 급격하게 감소하였다. 그리고 열처리 온도에 의해서는 초기균수가 9.06 log CFU/mL인 *S. aureus* ATCC 19095을 55°C로 30분간 열처리하였을 때 생존균수가 7.98 log CFU/mL으로 감소하였고, 60°C에서는 초기균수가 8.99 log CFU/mL에서 6.45 log CFU/mL으로 감소하여 열처리 온도가 높을수록 *D*-value가 크게 감소하였다. 또한 생존균수가 1 log-cycle 감소하는데 필요한 시간인 *D*-value도 55°C에서 27.64분인 반면에 60°C로 열처리하였을 경우에는 11.73분으로 열처리 온도가 높을수록 *D*-value가 크게 감소하였다 (Table 1). Kamau 등¹⁶⁾이 우유에 *S. aureus*를 인위적으로 접종하여 52.2°C로 열처리하였을 때 *D*-value가 33.3분,

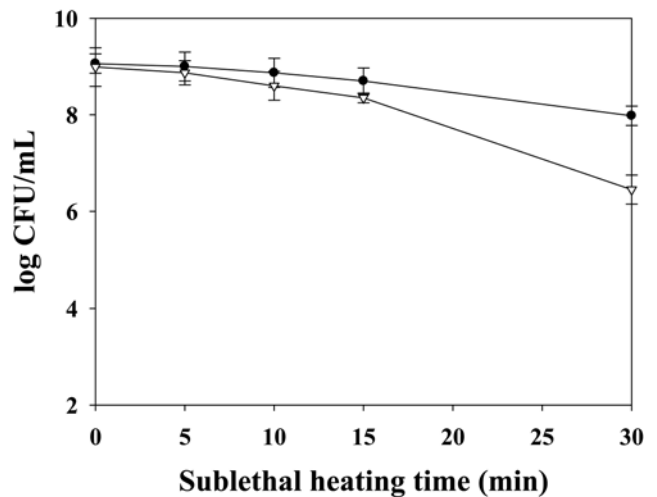


Fig. 1. Effect of sublethal heating on *S. aureus* ATCC 19095 at two different heating temperatures (● : 55°C, ▽ : 60°C).

Table 1. Comparison of *D*-values (min) of *S. aureus* ATCC 19095 heated at two temperatures (55 and 60°C) plated on TSA, 2% TSAS, 4% TSAS, and 6% TSAS

NaCl	55°C	60°C
0%	27.64 (± 0.42)	11.73 (± 1.01)
2%	23.47 (± 0.58)	8.14 (± 1.49)
4%	16.13 (± 0.77)	6.48 (± 1.79)
6%	6.57 (± 1.92)	4.62 (± 2.50)

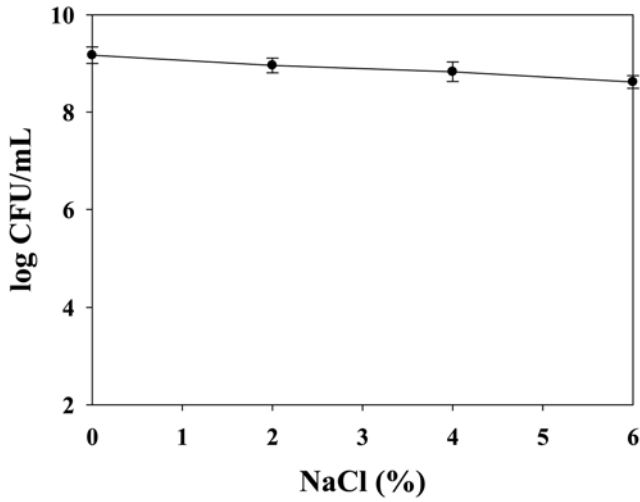


Fig. 2. Effect of NaCl treatment on *S. aureus* ATCC 19095 at four different NaCl concentrations.

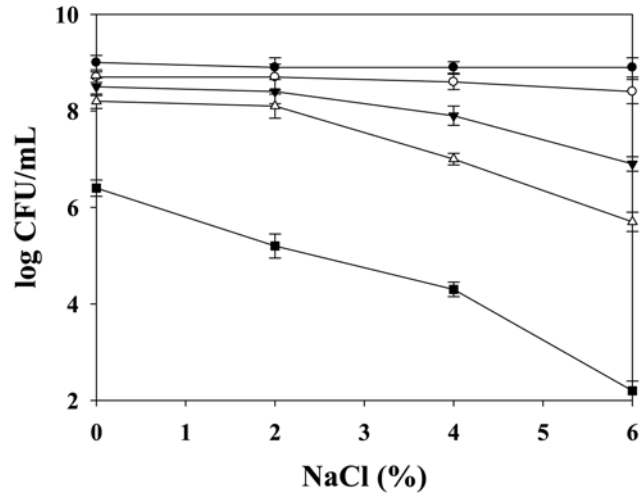


Fig. 4. Effect of various NaCl treatments on *S. aureus* ATCC 19095 after sublethal heating in 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.2) at 60°C (●: 0 min, ○: 5 min, ▼: 10 min, △: 15 min, ■: 30 min).

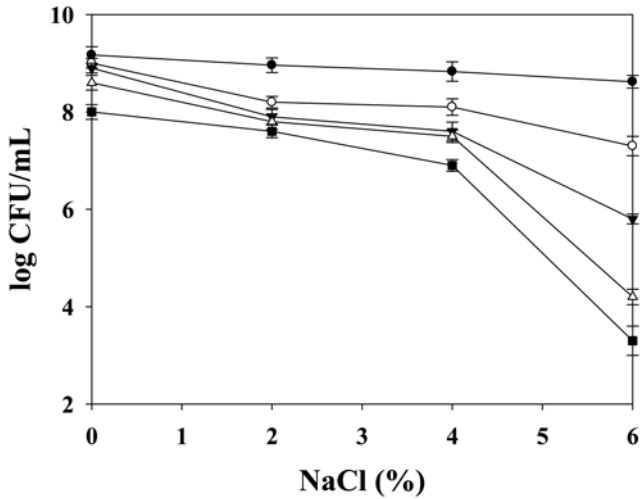


Fig. 3. Effect of various NaCl treatments on *S. aureus* ATCC 19095 after sublethal heating in 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.2) at 55°C (●: 0 min, ○: 5 min, ▼: 10 min, △: 15 min, ■: 30 min).

55.2°C로 열처리하였을 때 *D*-value가 7.6분이었다고 보고하였다. Kennedy 등¹⁷⁾이 TSB (tryptic soy broth)에 *S. aureus*를 인위적으로 접종하여 50°C로 열처리하였을 때 *D*-value가 104.2분, 55°C로 열처리하였을 때 *D*-value가 20.4분, 그리고 60°C로 열처리하였을 때 *D*-value가 5.9분이었다고 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 pattern을 나타내었다.

NaCl 처리에 의한 효과

일반적으로 조리한 후 재가열하지 않고 소비되어 *S. aureus* 식중독을 야기할 수 있는 ready-to-eat 식품(김밥, 샌드위

치 등)이나 소시지, 치즈 등의 소금 함유량은 1-6%이다¹⁸⁾. 따라서 본 연구에서는 다양한 염농도(0%, 2%, 4%, 6%) 조건이 *S. aureus* ATCC 19095의 생존에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과, Fig. 2에서와 같이 염농도가 0, 2, 4 및 6% 일 때 생균수가 각각 9.17, 8.96, 8.83 및 8.62 log CFU/mL로 조사되어 염농도가 6%까지 증가함에 따라 생존균수의 변화가 거의 없는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 일반적으로 *S. aureus*가 10%의 NaCl 존재하에서도 성장이 가능하다는 보고¹⁹⁾를 뒷받침해주는 결과라 할 수 있겠다.

Sublethal heating 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 손상된 부분이 회복될 수 있는데 적합한 환경에서 자연치유 될 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 회복 정도를 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. aureus* ATCC 19095을 55°C에서 30분 동안 열처리하였을 경우, 2% TSAS에서 사멸한 균수는 7.91 log CFU/mL, 4% TSAS에서는 7.97 log CFU/mL, 그리고 6% TSAS에서는 7.99 log CFU/mL로 조사되었고(Fig. 3), 60°C에서 30분 동안 열처리를 하였을 경우에는 2% TSAS에서 6.46 log CFU/mL,

4% TSAS에서는 6.47 log CFU/mL, 그리고 6% TSAS에서는 6.48 log CFU/mL로 조사되었다(Fig. 4). 한편 Smolka 등¹⁵⁾은 *S. aureus*가 불완전한 열처리나 다양한 stress 요인에 의하여 sublethal injury를 입었을 경우, injured cell은 사멸하고 uninjured cell만 성장하는 NaCl 농도를 7.5%라고 보고하였다. 이에 따라 sublethal injured cell의 회복이 가능한 NaCl 농도 범위 내에서 회복 정도를 TSA, 2% TSAS, 그리고 4% TSAS에서 자란 colony 숫자에서 6% TSAS 배지에서 자란 colony 숫자를 감하여서 계산하였다. 그 결과, 55°C에서 30분간 열처리를 하였을 경우, 6% TSAS보다 TSA에서 7.99 log CFU/mL의 sublethal injured cell이 회복이 되었고, 2% TSAS에서는 7.20 log CFU/mL, 그리고 4%에서는 6.43 log CFU/mL이 각각 회복되었다(Fig. 3). 그리고 60°C에서 30분간 열처리를 하였을 경우에는 6% TSAS보다 TSA에서 6.48 log CFU/mL, 2% TSAS에서는 5.11 log CFU/mL, 그리고 4% TSAS에서는 4.14 log CFU/mL의 sublethal injured cell이 각각 회복되었다(Fig. 4). 이와 같은 현상은 높은 염농도를 가질수록 회복되는 sublethal injured cell이 감소하여 나타나는 현상으로 사료되며, 같은 온도에서 열처리 시간이 증가할수록 더욱 명확히 나타났다. 그러므로 불완전한 열처리를 한 경우 *S. aureus*의 NaCl 내성이 급격히 감소하여 더 많은 sublethal injured cell들이 회복이 안되어서 이와 같은 현상이 발생한 것으로 사료된다.

또한 생존수가 1 log-cycle 감소하는데 필요한 열처리 시간인 *D*-value는 55°C로 열처리한 경우에는 TSA에서 27.64분, 2% TSAS에서 23.47분, 4% TSAS에서 16.13분, 그리고 6% TSAS에서 6.57분을 나타낸 반면에 60°C로 열처리한 경우에는 TSA에서 11.73분, 2% TSAS에서 8.14분, 4% TSAS에서 6.48분, 그리고 6% TSAS에서는 4.62분을 나타내었다(Table 1). 이는 동일한 온도에서 열처리 후 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 의하여 생성된 sublethal injured cell의 경우 열처리 후 노출된 염농도가 증가함에 따라 회복 정도가 감소하였고, 특히 6% TSAS에서는 눈에 띄게 감소된 것을 확인할 수 있었다. 그리고 본 연구에서는 potassium phosphate buffer (pH 7.2)에서 열처리를 하였는데, 일반적으로 지방함량이 높은 식품 내에서 미생물의 열저항성이 증가되는 것으로 알려져 있으므로^{20,21)} 다양한 식품에 *S. aureus*를 인위적으로 접종하여 열처리 효과를 조사하는 연구뿐만 아니라 열처리 또는 염처리가 세포내의 어떤 기작에 영향을 미쳐서 sublethal injured cell의 회복이 감소되는지에 대한 연구도 그와 병행하여 수행되어야 하겠다.

요 약

본 연구에서는 우리나라에서 2-3번째로 자주 발생하는 식중독 원인균인 *S. aureus*를 대상으로 불충분한 열처리와 NaCl처리에 따른 각각의 생존균수 변화와 불충분한 열처리 후 다양한 NaCl농도(0%, 2%, 4%, 6%)하에서 sublethal injured cell의 회복 정도를 조사하였다. 그 결과, 불충분한 열처리 정도가 증가함에 따라 생존균수가 유의적인 감소를 하였으나, NaCl 처리시 NaCl 농도가 6%까지 증가함에 따라서 생존균수의 변화가 거의 없었다. 그리고 55°C나 60°C에서 30분간 열처리하는 기간 동안에 sublethal injured cell들이 발생하였으며, 그들의 회복 정도는 높은 염농도에 노출될수록 회복 정도가 감소하였다. 또한 이와 같은 현상은 같은 온도에서 열처리 시간이 증가할수록 더욱 명확히 나타났다. 그리고 동일한 온도에서 sublethal heating 후 노출된 NaCl 농도가 증가함에 따라서 *D*-value가 감소하는 경향을 나타내었다. 이와 같은 결과는 불충분한 열처리 과정에 의하여 생성된 sublethal injured cell들이 열처리 후 회복되는 과정에서 배지의 NaCl 농도가 증가함에 따라서 회복 정도가 감소하였음을 의미한다.

감사의 글

이 논문은 2007년도 중앙대학교 학술연구비 지원에 의해 수행된 것입니다.

참고문헌

1. Rajashekara G, Haverly E, Halvorson, D.A, Ferris K.E, Lauer D.C, Nagaraja K.V.: Multidrug-resistant *Salmonella typhimurium* DT104 in poultry. *J. Food Prot.* **63**, 155-161 (2000).
2. Blackburn C.W, Curtis L.M, Humpheson L, Billon C, McClure P.J.: 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).
3. Carson C.A, Reid S.R, Irwin R.J, Martin W.S, McEwen S.A.: Antimicrobial resistance in generic fecal *Escherichia coli* from 29 beef farms in Ontario. *Can. J. Vet. Res.* **72**, 119-128 (2008).
4. Osaili T.M, Griffis C.L, Martin E.M, Breard B.L, Keener A.E, Marcy J.A.: Thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* in breaded pork patties. *J. Food Sci.* **72**, 56-61 (2007).
5. Wilhelm B, Rajic A, Waddell L, Parker S, Harris J, Roberts K.C, Kydd R, Greig J, Baynton A.: Prevalence of zoonotic or potentially zoonotic bacteria, antimicrobial resistance, and somatic cell counts in organic dairy production: current Knowledge and research gaps. *Foodborne Pathog. Dis.* **6**, 525-539 (2009).

6. Li X, Sheldon B.W, Ball H.R.: 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 V.K, Crawford R.G, Tierney J.T, Peeler J.T.: Thermotolerance of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* after sublethal heat shock. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 3216-3219 (1990).
8. Kang D.H, Siragusa G.R.: Agar underlay method for recovery of sublethally heat-injured bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 5334-5337 (1999).
9. Taormina P.J, Beuchat L.R.: Survival and heat resistance of *Listeria monocytogenes* after exposure to alkali and chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2555-2563 (2001).
10. Clavero M.R, Beuchat L.R.: 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).
11. Juneja V.K, Klein P.G, Marmer B.S.: 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).
12. Duffy G, Riordan D.C.R, Sheridan J.J, Eblen B.S, Whiting R.C, Blair I.S, McDowell D.A.: Differences in thermotolerance of *Escherichia coli* O157:H7 strains in a salami matrix. *Food Microbiol.* **16**, 83-91 (1999).
13. Iandolo J.J, Ordal Z.J.: Repair of thermal injury of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **91**, 134-142 (1966).
14. Hernandez F.J, Goyache J, Orden J.A, Blanco J.L, Domech A, Suarez G, Gomez-Lucia E.: Repair and enterotoxin synthesis by *Staphylococcus aureus* after thermal shock. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1515-1519 (1993).
15. Smolka L.R, Nelson F.E, Kelley L.M.: Interaction of pH and NaCl on enumeration of heat-stressed *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol.* **27**, 443-447 (1974).
16. Kamau D.N, Doores S, Pruitt K.M.: Enhanced thermal destruction of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* by the lactoperoxidase system. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 2711-2716 (1990).
17. Kennedy J, Blair I.S, McDowell D.A, Bolton D.J.: An investigation of the thermal inactivation of *Staphylococcus aureus* and the potential for increased thermotolerance as a result of chilled storage. *J. Appl. Microbiol.* **99**, 1229-1235 (2005).
18. Zaika L.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. Jung H.J, Cho J.I, Park S.H, Ha S.D, Lee K.H, Kim C.H, Song E.S, Chung D.H, Kim M.G, Kim K.Y, Kim K.S.: Genotypic and phenotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from lettuces and raw milk. *Korean J. Food Sci. Technol.* **37**, 134-141 (2005).
20. Juneja V.K, Eblen B.S.: Heat inactivation of *Salmonella typhimurium* DT104 in beef as affected by fat content. *Lett. Appl. Microbiol.* **30**, 461-467 (2000).
21. Shachar D, Yaron S.: Heat tolerance of *Salmonella enterica* serovars Agona, Enteritidis, and Typhimurium in peanut butter. *J. Food Prot.* **69**, 2687-2691 (2006).