

Multiplication of *Escherichia coli* DH5 α ::gfp on Strawberry Fruit Surface

Hyejeong Yun, Kyeonghun Park, Kyoung Yul Ryu, Jong-Chul Yun,
and Byung Seok Kim[†]

Division of Microbial Safety, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-707, Korea

딸기과실 표면에서 *Escherichia coli* DH5 α ::gfp 증식

윤혜정 · 박경훈 · 류경열 · 윤종철 · 김병석[†]
농촌진흥청 국립농업과학원 유해생물과

Abstract

To verify the multiplication of microorganisms on the surface of strawberries, the fate of *E. coli* DH5 α ::gfp at different temperatures, times and strawberry extract concentrations were measured. The population of *E. coli* DH5 α ::gfp rapidly increased by 7.36~7.78 log CFU/g at 25~30°C for 24 hr and slowly increased by 6.49~8.49 log CFU/g at 10~20°C for 48 hr. However, *E. coli* DH5 α ::gfp did not grow at 10~15°C on the surface of the strawberries, regardless of the contact times with the bacterial suspension. *E. coli* DH5 α ::gfp reached 1.52~3.26 log CFU/g at 20°C as the contact frequency increased from two to six times. The contact frequencies did not significantly differ. In the case of the six-time contact on the surface of the strawberry at 25 and 30°C, the *E. coli* DH5 α ::gfp increased by 5.17 and 5.01 log CFU/g. The effects of the strawberry extracts on the growth of *E. coli* DH5 α ::gfp showed that sterilization and non-sterilization do not affect the growth of microorganisms for 96 hr. In the minimal broth, the growth of *E. coli* DH5 α ::gfp increased by 1 log CFU/g for 96 hr. In less than 50 percent of the strawberry extracts, the growth rate of *E. coli* DH5 α ::gfp was higher than in the control and increased by 4 and 5 log CFU/g at 50 and 25 percent of strawberry extracts, respectively. Therefore, *E. coli* DH5 α ::gfp can multiply and survive on the surface of strawberries when it comes into contact with the fruit extract.

Key words : *E. coli* DH5 α ::gfp, food safety, strawberry, extract, multiply

서 론

생활수준의 향상으로 건강에 대한 관심과 고품질의 신선 식품에 대한 수요가 증가하고 있다. 특히 과채류의 경우 신선한 과실제품에 대한 선호도가 높으나 유기농 제품의 경우 충분한 세척단계를 거치지 않으면 미생물 오염이 문제가 된다(1). 국내에서는 즉석섭취, 편의식품에 대해 대장균, 살모넬라, 장염비브리오 등 음성, 황색포도상구균은 1 g당 100 CFU/g 이하, 바실러스 세레우스는 1 g당 1,000 CFU/g 이하, 세균수는 1 g당 100,000 CFU/g 이하로 규정하고 있다(2). 일반적으로 신선채소류에 총균수는 10⁴~10⁶ CFU/g, 품

질저하에 관계되는 미생물은 10³ CFU/g, 그리고 10¹~10³ CFU/g 수준의 부패균 *Fluorescent pseudomonas* 등이 존재하는 것으로 보고한 바 있다(3). 또한 유통되는 채소류에는 저온성 세균 및 중온성 세균수가 10⁸ CFU/g 수준으로 오염도가 심하였으며(4), 혼합 샐러드의 경우 오염도가 더 심한 것으로 나타났다(5,6).

딸기는 생과일 뿐만 아니라 잼, 젤리, 제과, 요구르트 원료 등으로 수요가 증가하고 있으나 조직이 연약하여 수확, 선별 및 수송과정에서 물리적 손상으로 품질저하가 쉽게 발생한다. 대부분의 과채류는 조리과정을 거치지 않고 그대로 섭취하기 때문에 재배과정에서 수확시까지 미생물을 비롯한 다양한 요인에 의한 오염가능성이 있다. 또한 수분 함량이 높아 변질되기 쉬우며 곰팡이가 발생 등으로 저장 유통기한이 매우 짧은 단점이 있다. 상온에서 유통기한이

[†]Corresponding author. E-mail : kbs2000@rda.go.kr
Phone : 82-31-290-0445, Fax : 82-31-290-0407

짧아 저장성 향상을 위해 예냉처리로 호흡량을 감소시켜 신선도를 유지하는 방법(7), MAP 포장(8), 방사선 조사에 의한 회색 곰팡이병 발생억제(9), 항균 포장(10), 열처리(11), CO₂ 처리(12), chitosan coating과 CaCl₂ 처리에 의한 부패 지연(13), citrate 및 lactate 용액처리(14) 등을 이용하여 품질향상 및 저장성 연장에 대한 연구가 진행되고 있다.

과채류에 쉽게 오염되는 미생물로 *Listeria* spp.와 *Salmonella* spp.는 토양 미생물로서 식물, 토양, 지표수 등 자연계에 널리 분포하기 때문에 재배와 수확과정에 쉽게 오염된다(15). 실제로 *Listeria monocytogenes*가 셀러드에서 검출된 예가 있으며(16), 토마토에서 *L. monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*이 오염된 사례가 있다(17,18). 이외에도 Oyarzable 등(19)은 오렌지, 사과, 파인애플 및 백포도에서 *Salmonella*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*가 -23°C에서 12주 동안 생존하였다고 보고하였다. 이와 같이 과채류의 경우 재배, 수확, 유통과정에서 많은 생물학적 위해요소에 노출되어 있어 국민보건향상을 위해 관리체계 개선이 필요하다.

Green fluorescent protein (GFP)는 jellyfish (*Aequorea victoria*)에서 유래된 유전자이다(20). 이는 UV (360-400 nm)와 청색광(440~480 nm)에서 녹색 형광을 발현하기 때문에 UV를 조사하여 형질전환체를 빠르게 조사할 수 있는 특성이 있다(21). 실제로 배추(22), 유채(23), 담배(24), 메론(25)에 적용한 연구사례가 보고되었다. GFP가 삽입된 균주를 사용 할 경우 분석시료에서 증식 뿐만 아니라 현미경을 통한 분포양상 및 오염도를 좀 더 정확히 파악하는데 도움이 될 것이다.

본 연구에서는 유통 중인 딸기에 접촉으로 야기될 수 있는 생물학적 위해요소인 *E. coli* DH5a:gfp 균주를 인위적으로 접촉시켜 유통 온도 및 접촉경과 시간에 따른 미생물의 증식과 상처나 부패시 발생하는 추출물에 의해 *E. coli* DH5a:gfp의 증식가능 여부를 측정하여 현재 유통 중인 딸기의 수확과정 및 유통과정에서 주요 관리점을 모색하고 해결방안을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

시료 및 추출액 제조

딸기(*Fragaria* spp.)는 2010년 1월에 대형마트(경기도 수원 소재)에서 구입하였다. 외관이 건전하고 상처가 없는 과실을 선별하여 실험에 사용하였다. 딸기 추출액 제조를 위해서 시료 500 g을 분쇄기(SFM-353NK, SHINIL Co. Ltd., Korea)를 이용하여 2~3분 동안 마쇄한 다음 12,000 rpm에서 5분간 원심분리(VS-5500, Vision Scientific Co., Seoul, Korea)한 후 상등액을 Whatmann No. 2 filter paper (Whatmann, Kent, England)로 여과한 액을 시료로 사용하였다.

형질전환

실험에 사용한 *E. coli* DH5a:gfp 균주는 Hojberg 등(26)의 방법에 따라 형질전환을 실시하였다. 균주의 GFP 유전자 삽입 여부를 확인하기 위해 형광 현미경(Nikon B30, Japan)을 이용하였다. GFP 유전자가 삽입된 균주는 형광현미경에서 UV(360~400 nm) 또는 청색광(440~480 nm)하에서 특이적인 녹색 형광을 발현하여 접종한 균의 증식 및 생존여부를 판단하였다. 또한 GFP 유전자에 대한 PCR 분석은 Dellaporta 등(27)에 따라 실시하여 확인하고 실험에 사용하였다.

E. coli DH5a:gfp 배양 및 증식

E. coli DH5a:gfp는 ampicillin (50 µg/mL)(Sigma, St. Louis, USA)과 rifampicin (50 µg/mL)(Sigma, St. Louis, MO, USA)이 첨가된 Luria Bertani broth (Difco, Laboratories, Detroit, MI, USA)를 이용하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양액은 원심분리기를 이용하여 4°C에서 1,950g로 10분간 원심분리하여 회수된 균체를 0.1% 펩톤수에 세척, 원심분리하고 최종 영양세포 농도가 10⁸ CFU/mL이 되도록 하여 실험에 사용하였다. 배양온도와 시간이 *E. coli* DH5a:gfp의 성장에 미치는 영향을 조사하기 위해 10, 15, 20, 25, 30°C에서 각각 24, 48, 72시간 동안 배양하여 균주의 성장을 측정하였다. 또한 딸기추출물 농도가 *E. coli* DH5a:gfp의 성장에 미치는 영향을 조사하기 위해 최소배지(minimal broth, Difco Laboratories, Sparks, MD, USA)를 이용하여 딸기 추출물 농도가 각각 0, 25, 50, 100%가 되도록 조절하여 *E. coli* DH5a:gfp를 10⁴ CFU/mL 수준으로 접종한 다음 25°C에서 각각 96시간 동안 배양하면서 균주의 성장을 측정하였다.

E. coli DH5a:gfp 균주의 인위적인 딸기과실 표면접촉

딸기과실 표면에 10⁸ CFU/mL 농도로 조절된 *E. coli* DH5a:gfp를 작업자 손 표면에 충분히 적신 다음 2, 4, 6회 누적하여 접촉하였다. 이때 1회 접촉 후 2회 접촉까지 시간을 10초 간격으로 실시하였다. 모든 시료가 *E. coli* DH5a:gfp 균주로 접촉되는 시간 동안 접촉된 시료는 실온에 보관하였다. 처리구와 동일하게 대조군도 동일한 시간 동안 실온에서 유지하였다. 접촉처리가 끝난 시료는 96시간 동안 배양 온도 10, 15, 20, 25, 30°C에서 배양하며 접촉 미생물의 밀도 변화를 조사하였다.

미생물 분석

표면에 인위적으로 *E. coli* DH5a:gfp가 접종된 시료는 외피를 두께 5.0 mm 두께로 채취하여 미생물 분석에 이용하였다. 시료 20 g에 멸균된 식염수(0.85%, NaCl) 180 mL를 첨가하여 Bag mixer (400, Interscience, France)를 사용하여 120초 동안 혼합한 후 10진 희석법으로 희석하였다. *E. coli*

DH5α::gfp의 측정은 ampicillin (50 µg/mL)(Sigma, St. Louis, MO, USA)과 rifampicin (50 µg/mL)(Sigma, St. Louis, MO, USA)이 첨가된 Luria Bertani Agar (Difco, Laboratories, Detroit, MI, USA)를 이용하여 25°C에서 96시간 동안 배양하여 형성된 colony 수를 계수하여 1 g당 colony forming unit (CFU/g)으로 나타내었다.

Scanning electron microscope (SEM)

E. coli DH5α::gfp에 접촉된 딸기 표면을 10 mm³ 크기로 절단하고 2% (v/v) glutaraldehyde을 이용하여 48시간 동안 고정하였다. 고정된 시료는 30, 50, 70, 80, 100% ethanol을 이용하여 순차적으로 탈수처리하고 isoamyl acetate를 이용하여 임계점 건조 후 골드 코팅하였다. 그 후 시료는 JSM-30 scanning electron microscope (JEOL, Japan)를 이용하여 딸기 표면에 분포한 *E. coli* DH5α::gfp를 조사하였다. 대조군도 위와 동일한 방법으로 처리하여 실시하였다.

통계분석

모든 실험은 3회 반복 실시하였으며, 얻어진 결과들은 SAS software(28)에서 프로그램된 general linear model procedure을 수행하고 분산분석 후 유의적인 차이가 보일 때 평균값 간 차이를 Duncan의 다중검정법을 사용하여 평가하였다(p<0.05).

결과 및 고찰

***E. coli* DH5α::gfp 성장**

딸기는 유통온도 범위인 10~30°C에서 ampicillin과 rifampicin이 첨가된 Luria Bertani broth를 이용하여 각각 4일 동안 *E. coli* DH5α::gfp의 성장을 조사하였다(Table 1). 딸기에 접촉한 *E. coli* DH5α::gfp는 유통온도인 25°C에서 24시간 배양한 경우 7.36 log CFU/g 수준으로 증가하였으며 배양시간이 72시간에 도달했을 때 8.23 log CFU/g로 나타났다. 실온보다 높은 30°C에서 24시간 배양한 경우 25°C 조건에서 보다 유의적으로 높은 밀도로 증가하였으며 72시간 배양 후에는 8.28 log CFU/g으로 25°C에서와 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 배양온도가 10~20°C인 조건에서는 *E. coli* DH5α::gfp의 증식이 느리며, 배양 후 24시간이 경과하였을 때는 증식하지 않았다. 그러나 배양 48시간 후 20, 15, 10°C에서 각각 8.49, 6.96 및 6.49 log CFU/g으로 20°C 배양조건이 15, 10°C 조건 보다 유의적으로 높게 나타났다. 배양시간이 경과함에 따라 20°C에서 *E. coli* DH5α::gfp의 성장은 72시간 배양 후 8.76 log CFU/g으로 25, 30°C 배양조건에서와 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 특히 10°C에서는 72시간 배양 후 20~30°C에서보다 2.80~3.33 log CFU/g 수준 낮게 나타났다. 이는 실온에서 유통되는 경우보다 저

Table 1. Changes of *E. coli* DH5α::gfp growth by temperature and incubation time in Luria Bertani broth

| Temperature (°C) | Incubation time (hr) | | | SEM ^{d)} |
|-------------------|----------------------|--------------------|---------------------|-------------------|
| | 24 | 48 | 72 | |
| 10 | ND ^{cz} | 6.49 ^{bx} | 5.43 ^{cy} | 0.099 |
| 15 | ND ^{cz} | 6.96 ^{by} | 7.74 ^{bx} | 0.100 |
| 20 | ND ^{3)cy} | 8.49 ^{ax} | 8.76 ^{ax} | 0.124 |
| 25 | 7.36 ^{by} | 8.32 ^{ax} | 8.23 ^{abx} | 0.199 |
| 30 | 7.78 ¹⁾²⁾ | 8.77 ^{ax} | 8.28 ^{aby} | 0.184 |
| SEM ^{d)} | 0.098 | 0.196 | 0.186 | |

Values are means of triplicate experiments (n=3).
¹⁾Values with different letters (a-c) within the same column differ significantly (P<0.05).
²⁾Values with different letters (x-z) within the same row differ significantly (P<0.05).
³⁾ND : Viable cell was not detected with detection limit at <10¹.
⁴⁾Standard errors of the mean (n=20), ³⁾(n=12).

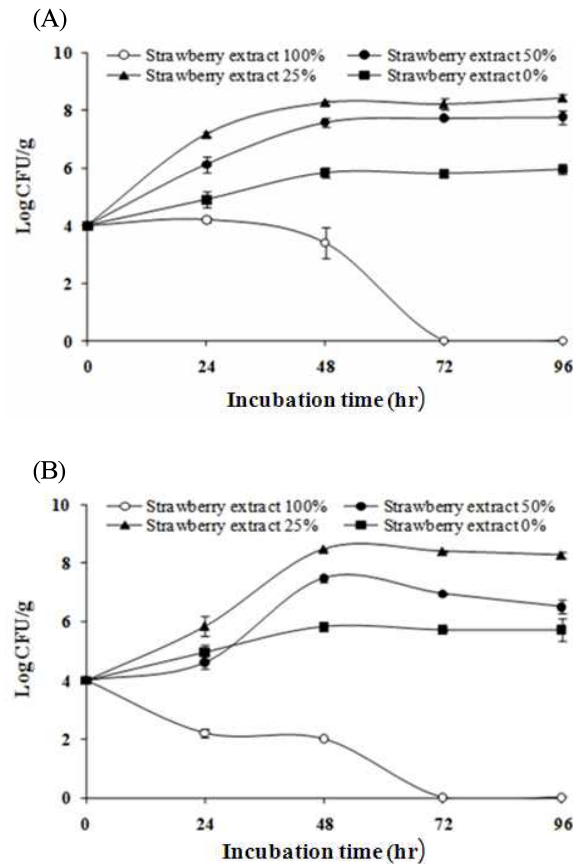


Fig. 1. Growth and viability of cultures of *E. coli* DH5α::gfp in the raw strawberry extract (A) and sterilized strawberry extract (B).

온 조건에서 딸기가 유통될 때 유미생물의 증식이 억제될 수 있음을 나타낸다. Rodriguez 등(29)의 연구에서 당 함량 (fructose:glucose:sucrose=1:1:1)이 50 g/L로 첨가된 배지에서 *E. coli* K-12 MG1655의 성장을 측정된 결과 4°C 저장조건에서는 유의적인 차이가 없었으나 20°C에서는 1 log 증가하는 것으로 나타났다. 또한 딸기 paste의 저장온도에 따른

총 호기성세균의 증식에 대한 연구결과 저장온도가 37, 20, 4°C인 경우 각각 4.5, 3.5, 3 log CFU/g 증가하는 것으로 나타났다(29). 또한 Jaquette and Beuchat(31)과 Graham 등(33)은 *Bacillus cereus*와 *Clostridium botulinum*을 각각 4~30°C에서 배양한 경우 온도가 높을수록 이들 균주의 성장이 활발하다고 보고하였다. Yang(34)은 딸기를 0~20°C로 저장한 경우 20>4>0°C 순서로 경도, vitamin C 함량, 당도가 감소할 뿐만 아니라 품질손상도 큰 것으로 나타났다. 이처럼 저장온도가 높을수록 유해미생물의 성장에 적합한 환경을 제공하는 것으로 판단되며 딸기의 경우 고온에서 저장하였을 경우 다양한 미생물의 활성이 활발해져 저장성이 저하되는 것으로 나타났다.

딸기 표면 접촉 횟수에 의한 *E. coli* DH5a:gfp 성장

농가에서 딸기는 수확 및 포장단계에서 작업자의 손 접촉횟수가 4~6회 정도이다. 이를 기초로 작업과정 중 유해미생물이 접촉에 따라 딸기표면에서 오염 및 증식여부를 구명하기 위해 *E. coli* DH5a:gfp 배양액에 작업자의 손을 담구었다. 그 후 딸기 표면에 접촉횟수를 0, 2, 4, 6회로 증가하면서

Table 2. Changes of *E. coli* DH5a:gfp growth after contacted surface of strawberries by temperature (°C) and contact number during incubation for 96h

| Contact number (time) | Temperature (°C) | | | | | SEM ⁵⁾ |
|-----------------------|------------------|-----|----------------------|---------|-------------------|-------------------|
| | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | |
| Control | ND ¹⁾ | ND | ND | NDc | NDd ²⁾ | |
| 2 | NDy | NDy | 1.52xy ³⁾ | 4.21bx | 4.56bx | 0.682 |
| 4 | NDz | NDz | 2.91y | 4.70abw | 4.24cx | 0.117 |
| 6 | NDz | NDz | 3.26y | 5.17ax | 5.01ax | 0.137 |
| SEM ⁴⁾ | | | 0.774 | 0.135 | 0.064 | |

Values are means of triplicate experiments (n=3).
¹⁾ND : Viable cell was not detected with detection limit at <10¹.
²⁾Values with different letters (a-e) within the same column differ significantly (P<0.05).
³⁾Values with different letters (w-z) within the same row differ significantly (P<0.05).
⁴⁾Standard errors of the mean (n=12), ⁵⁾(n=15).

E. coli DH5a:gfp의 밀도변화를 조사한 결과는 Table 2에 나타내었다. 작업환경의 변화를 감안하여 배양온도 조건을 10, 15, 20, 25, 30°C로 구분하여 실시하였다. 딸기과실의 접촉횟수에 상관없이 10, 15°C에서는 *E. coli* DH5a:gfp의 성장이 없었으나 20°C에서는 접촉횟수 증가에 따라 1.52~3.26 log CFU/g 수준으로 증식하였으나 대조군과 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 배양온도 25, 30°C에서 접촉횟수가 6회인 경우 각각 5.17, 5.01 log CFU/g로 유의적으로 높게 나타났다. 접촉횟수에 따른 미생물 밀도의 변화를 살펴보면 2~6회 접촉한 시료군에서 저온보다는 25°C이상의 조건에서 *E. coli* DH5a:gfp의 밀도가 높게 나타났다. 배양온도가 25~30°C인 경우에 접촉횟수 차이에 따른 미생물의 증식은 큰 차이가 없었으나 20°C조건에서는 차이가 나타났다. 이는 접촉횟수보다는 저장온도가 미생물의 밀도변화의 주요한 원인으로 생각된다. Flessa 등(35)은 딸기 표면에 *L. monocytogenes*를 10⁶, 10⁸ CFU 수준으로 접종시킨 다음 4, 25°C에서 저장시킨 결과 25°C에서 저장한 시료는 각각 0.6, 1.2 log 감소하였으며, 4°C에 저장한 시료는 3 log 감소하였다. 또한 딸기 표면에 20% sucrose를 코팅한 시료와 코팅하지 않은 시료를 28일 동안 냉동 저장한 경우 각각 0, 1.2 log 감소하였다. 이는 딸기의 저장시 유해 미생물의 증식은 온도 및 영양성분에 의한 영향을 많이 받는 것으로 판단된다. 본 연구결과는 딸기 수확시 작업자와 과실의 접촉을 최소화하며 유통온도를 저온으로 유지하는 것은 유해미생물에 의한 위험성을 줄일 수 있음을 제시하였다.

딸기 추출액에서 *E. coli* DH5a:gfp 성장

딸기는 수확작업과 유통과정 중 표면의 물리적 상처 및 손상에 의한 과즙 유출시 유해미생물의 정착 및 증식에 대한 영향을 살펴보고자 딸기 추출물에서의 *E. coli* DH5a:gfp의 밀도변화를 조사하여 Fig. 1에 나타내었다. 딸기 추출액은 멸균 전 추출액과 멸균 후 추출액 으로 구분하여 실험을 실시하였다. 딸기 추출액 함량을 0, 25, 50 및 100%로 구분하였으며 다른 영양원에 의한 영향을 줄이기 위해

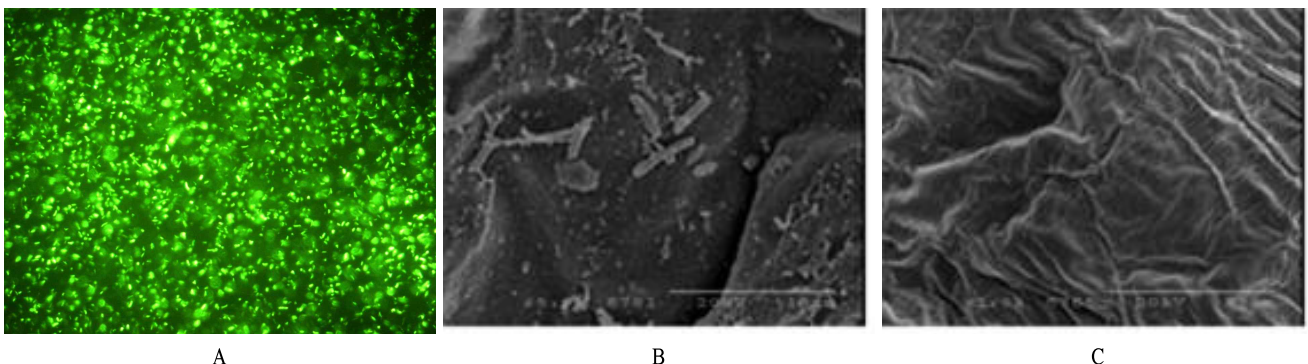


Fig. 2. Fluorescence spots and scanning electron micrographs (SEM).

Fluorescence spot caused by the GFP labeled *E. coli* (A). Many of bacteria were established on fruit surface of strawberry with contact by *E. coli* DH5a:gfp (B). The fruit surface of strawberry without contact showed the typical wrinkled shape and bacteria were not observed by SEM (C).

minimal broth를 이용하여 조절하였다. 접종원 *E. coli* DH5a::gfp의 밀도는 4 log CFU/g 수준으로 접종하여 딸기 추출액 함량이 미생물의 증식에 미치는 영향을 살펴본 결과 추출액의 멸균여부에 상관없이 유사한 경향을 나타내었다. 추출액 함량이 100%인 경우 배양 24시간 동안 초기 접종 수준을 유지하다 서서히 감소하여 72시간 후에는 증식이 이루어지지 않았다. 대조군으로 딸기 추출물 0%인 경우 minimal broth에서 *E. coli* DH5a::gfp의 증식은 배양기간 동안 1 log CFU/g 증가하는 수준으로 유지되었다. 추출물 함량이 50% 미만인 경우 대조군에 비해 *E. coli* DH5a::gfp의 증식이 유의적으로 높게 나타났으며, 50, 25% 추출액에서 각각 4, 5 log CFU/g 증가하였다. 딸기의 영양성분은 수분 90.1%, 단백질 0.9%, 지질 0.2%, 당질 7.5%이며 본 실험에 사용한 딸기의 당질 성분 중 glucose 2.5%, fructose 2.6%, sucrose 3.8%를 나타내어 당 함량이 높게 나타났다. 본 실험에서 딸기 추출액 100%인 시료군에서 배양 초기 *E. coli* DH5a::gfp가 접종수준의 밀도를 나타내었으나 배양시간이 경과함에 따라 증식이 감소한 것은 높은 당 함량에 의한 삼투압 등 영향으로 미생물의 증식이 이루어지지 않은 것으로 판단된다.

Scanning electron micrograph (SEM)

딸기과실 표면에 미생물 접촉시 주요한 은신처를 확인하기 위하여 주사전자현미경으로 검정한 결과는 Fig. 2에 나타났다. 미생물의 증식여부를 판단하기 위하여 GFP 마커를 삽입한 *E. coli* DH5a::gfp는 현미경에서 특이적인 형광반응 발현여부를 조사하였다(Fig. 2 A). 유해미생물이 접촉하지 않은 딸기과실은 Fig. 2 B와 같이 표면에 상처가 없었고 전형적인 딸기 표면형태를 유지하고 있었다. 그러나 유해미생물과 접촉한 딸기과실표면은 부분적으로 상처가 발생하였고 유해미생물은 과실표면의 주름진 부위에 부착하고 있었다(Fig. 2 C). 딸기과실 접촉은 기계적인 상처를 유발시키고 동시에 은신처를 제공하기 때문에 안전관리 측면에서 세심한 주의가 필요하였다.

한편, 유통 중인 신선편의식품의 미생물 오염도를 조사한 결과 파프리카는 총 호기성세균 4 log CFU/g, 대장균군 3 log CFU/g, 딸기는 총 호기성세균 4~5 log CFU/g, 대장균군 3 log CFU/g으로 딸기의 미생물 오염도가 높게 나타났다(35). 또 Cho 등(30)의 연구에서 총 호기성세균 7 log CFU/g, 대장균군 2 log CFU/g 으로 다소 차이가 있었는데 이는 딸기 품종, 수확 계절, 장소에 의한 영향과 과실의 표면이 매끄럽지 않고 재배시 지표면과 접촉 가능성이 높고, 토양, 먼지 또는 작업시 접촉횟수와 같은 작업환경으로부터 세균의 오염도가 높은 것으로 판단된다. 신선편의식품에서 발견되는 대표적인 부패세균은 *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Eriwinia*, *Lactobacillus*, *Rhizopus* 등이며 식중독 유발 세균으로는 *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium*

botulinum, *Aeromonas hydrophila*, *Salmonella*, *E. coli* O157:H7, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni* 등이 있다(34). 실제로 Yu 등(36)의 연구에서 딸기로부터 *Staphylococcus aureus*가 발견되어 수확 및 유통시 위생관리가 요구된다. 기존 연구에서 딸기의 유해 미생물 제거를 위해서는 온도, pH, 보존제 첨가(30) 및 세척을 통해 *Salmonella*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*를 1~2 log 저감화시킬 수 있다고 보고하였다(37). 이외에 현장 유통시스템 및 생산현장에서의 위해요소 저감화를 위한 방법으로 수확 후 접촉을 최소화하고 저장 온도를 4°C 조건의 냉장조건에서의 유통과정이 필요한 것으로 판단된다.

요 약

본 연구는 딸기에 *E. coli* DH5a::gfp 균주를 인위적으로 접촉시켜 배양 온도(10, 15, 20, 25, 30°C), 시간(24, 47, 72, 96시간) 및 접촉횟수(0, 2, 4, 6회)에 따른 미생물의 증식가능성을 살펴보고, 딸기 추출물 함량에 의해 *E. coli* DH5a::gfp의 증식가능 여부를 측정하였다. 저장온도 및 시간에 의한 *E. coli* DH5a::gfp의 증식은 25, 30°C에서 24시간 배양 후 7.36~7.78 log CFU/g로 급격히 증가하였으나 10~20°C에서는 48시간 후 6.49~8.49 log CFU/g로 서서히 증식하였다. 각각의 온도에서 96시간 배양 후 15, 25°C조건에서 *E. coli* DH5a::gfp의 밀도가 가장 높았으며 10°C에서 가장 낮게 나타났다. 접촉횟수에 의한 *E. coli* DH5a::gfp의 증식은 접촉횟수에 상관없이 10, 15°C에서는 *E. coli* DH5a::gfp의 성장이 이루어지지 않았으며 20°C에서는 접촉횟수 증가에 따라 1.52~3.26 log CFU/g 수준으로 증식하였으나 대조군과의 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 배양온도가 25, 30°C인 경우 접촉횟수가 6회인 경우 각각 5.17, 5.01 log CFU/g로 유의적으로 높게 나타났다. 딸기 추출액 함량이 미생물의 증식에 미치는 영향을 살펴본 결과 추출액의 멸균여부에 상관없이 유사한 경향을 나타내었다. 대조군으로서 딸기 추출물 0%인 경우 minimal broth에서의 *E. coli* DH5a::gfp의 증식은 배양기간 동안 1 log CFU/g 증가하는 수준으로 유지되었다. 추출물 함량이 50% 미만인 경우 대조군에 비해 *E. coli* DH5a::gfp의 증식이 유의적으로 높게 나타났으며, 50, 25% 추출액에서 각각 4, 5 log CFU/g 증가하였다.

감사의 글

본 논문은 2011년도 농촌진흥청 국립농업과학원 박사후 연구과정지원사업에 의해 수행되었음

참고문헌

1. Jeong JW, Kim JH, Kwon KH, Park KJ (2006) Disinfection effects of electrolyzed water on strawberry and quality changes storage. *Korean J Food Preserv*, 13, 316-321
2. KFDA Food Code (2009). 10-3-1-43. Korea Food and Drug Administration. Seoul, Korea
3. Kim JS, Bang OK, Chang HC (2004) Examination of microbiological contamination of ready-to-eat vegetable salad. *J Food Hyg Safety*, 19, 60-65
4. Choi JW, Park SY, Yeon JH, Lee MJ, Chung DH (2005) Microbial contamination levels of fresh vegetables distribution in markets. *J Food Hyg. Safety*, 20, 43-47
5. Marchetti R, Casadei MA, Huerzoni ME (1992) Microbial population dynamics in ready to use vegetable salads. *Ital J Food Sci*, 2, 97-108
6. Brackett RW (1994) Microbiological spoilage and pathogens in minimally processed refrigerated fruits and vegetables in minimally processed refrigerated fruits and vegetables, Wiley, R.C., ed., Chapman & Hall, NY, USA, p. 269-312.
7. Salunkhe DK, Desai BR (1984) Postharvest biotechnology of fruit. CRC Press, New York, NY, USA. p117-120
8. Chung SK, Cho SH, Lee DS (1998) Modified atmosphere packaging of fresh strawberries by antimicrobial plastic films. *Korean J Food Sci Technol*, 30, 1140-1145
9. Maxie EC, Bommer NF, Mitchell FG (1971) Infeasibility of irradiating fresh fruits and vegetables. *Hort Sci*, 6, 202-204
10. Chung SK, Cho SH, Lee DS (1998) Effect of antimicrobial packaging films on the keeping quality of strawberries. *Food Eng Prog*, 2, 157-161
11. Garcia JM, Aguilera C, Albi MA (1995) Postharvest heat treatment on spanish strawberry (*Fragaria xananassa* Cv. Tudla). *J Agric Food Chem*, 43, 1489-1492
12. Gil MI, Holcroft DM, Kader AA (1997) Changes in strawberry anthocyanins and other polyphenols in response to carbon dioxide treatments. *J Agric Food Chem*, 45, 1662-1667
13. Ghaouth AE, Arul J, Ompalam R, Oulet M (1993) Chitosan coating effect on storability and quality of fresh strawberries. *J Food Sci*, 56, 1618-1620
14. Morris JR, Sistrunk WA, Sims CA, Main GL (1985) Effect of cultivar, postharvest storage, preprocessing dip treatment and style of pack on the processing quality of strawberries. *J Am Soc Hor Sci*, 110, 172-177
15. Kampelmacher EH (1990) Food borne listeriosis facts and fiction. In "Food borne Listeriosis". Proceedings of a symposium, Wesbaden, FRG. Technomic Pub. Co. Inc. Lancaster, Basel
16. Beuchat LR (1996) Pathogenic microorganism associated with fresh produce. *J Food Prot*, 59, 204 216
17. Asplund K, Nurmi E (1991) The growth of *Salmonella* in tomatoes. *Int Food Microbiol*, 13, 177-182
18. Beuchat LR, Brackett RE (1991) Behavior of *Listeria monocytogenes* inoculated into raw tomatoes and processed tomato products. *Appl Environ Microbiol*, 57, 1367-1371
19. Oyarzabal OA, Nogueira MC, Gombas DE (2003) Survival of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* in juice concentrate. *J Food Prot*, 66, 1595-1598
20. Stewart CN (2001) The utility of green fluorescent protein in transgenic plants. *Plant Cell Rep*, 20, 376-382
21. Hu W, Cheng CL (1995) Expression of *Aequorea* green fluorescent protein in plant cells. *FEBS Lett*, 369, 331-334
22. Halfill MD, Richards HA, Mabon SA (2001) Expression of GFP and Bt transgenes in *Brassica napus* and hybridization with *Brassica rapa*. *Theor Appl Genet*, 103, 659-667
23. Cardoza V, Stewart CN (2003) Increased Agrobacterium mediated transformation and rooting efficiencies in canola (*Brassica napus* L.) from hypocotyl segment explants. *Plant Cell Rep*, 21, 599-604
24. Kim YS, Kim MY, Kang TJ, Kwon TH, Jang YS, Yang MS (2005) Expression of the green fluorescent protein (GFP) in tobacco containing low nicotine for the development of edible vaccine. *J Plant Biotechnol*, 7, 97-103
25. Galperin M, Patlis L, Ovadia A, Wolf D, Zelcer A, Kenigsbuch D (2003) A melon genotype with superior competence for regeneration and transformation. *Plant Breed*, 122, 66-69
26. Hojberg O, Schneider U, Winteler HV, Sorensen J, Hass D (1999) Oxygen-sensing reporter strain of *Pseudomonas fluorescens* for monitoring the distribution of low-oxygen habits in soil. *Appl Environ Microbiol*, 65, 4085-4093
27. Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) A simple and rapid method for plant DNA preparation. Version II. *Plant Mol Biol Rep*, 1, 19-21
28. Statistical Analysis Systems Institute (1995), SAS Institute, Inc. Cary, NC, USA.

29. Rodriguez, O, Castell Perez ME and Moreira, RG (2007) Effect of sugar content and storage temperature on the survival and recovery of irradiated *Escherichia coli* K-12 MG1655. LWT-Food Scitechnol, 40, 690-696
30. Cho JI, Ha SD, Kim KS (2004) Inhibitory effects of temperature, pH, and potassium sorbate against natural microflora in strawberry paste during storage. Korean J Food Sci Technol, 36, 355-360
31. Abadias M, Usall J., Anguera M, Solsona C, Vinas I (2008) Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. Int J Food Microbiol, 123, 121-129
32. Jaquette CB, Beuchat LR (1998) Combined effects of pH, nisin and temperature on growth and survival of psychrotrophic *Bacillus cereus*. J Food Prot, 61, 563-570
33. Graham AF, Mason DR, Peck MW (1996) Predictive model of the effect of temperature, pH, and sodium chlorine on growth from spores of non proteolytic *Clostridium botulinum*. Food Microbiol, 31, 69-85
34. Yang YJ (1996) Physiological responses of strawberry fruit affected by storage temperature. Industrial Science Research Institute Sangmyung University, Seoul, Korea. p5-13
35. Flessa S, Lusk DM, Harris LJ (2005) Survival of *Listeria monocytogenes* of fresh and frozen strawberries. Int J Food Microbiol, 101, 255-262
36. Yu YM, Youn YN, Hua QJ, Cha GH, Lee YH (2009) Biological hazard analysis of paprikas, strawberries and tomatoes in the markets. J Food Hyg Safety, 24, 174-181
37. Kukasik J, Bradley ML, Scott TM, Dea M, Koo A, Hsu WY, Bartz JA, Farrah SR (2003) Reduction of poliovirus 1, bacteriophages, *Salmonella* Montevideo and *Escherichia coli* O157:H7 on strawberries by physical and disinfectant washes. J Food Prot, 66, 188-193

(접수 2012년 4월 25일 수정 2012년 7월 2일 채택 2012년 11월 14일)