

## *E. coli* O157:H7에 의한 녹즙 저장 환경에서의 미생물학적 오염도 조사

임은섭<sup>1</sup> · 구옥경<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>과학기술연합대학원대학교, <sup>2</sup>한국식품연구원 식품안전연구단

## Contamination of Green Vegetable Juice by *E. coli* O157:H7 during Storage

Eun Seob Lim<sup>1</sup> and Ok Kyung Koo<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>University of Science and Technology

<sup>2</sup>Research Group of Food Safety, Korea Food Research Institute

**Abstract** The market for green vegetable juice (GVJ) is growing owing to the increasing demand for healthy food; however data on the safety and quality of GVJ are poorly reported. The objective of this study was to investigate the change in microbial community in GVJ during storage and its contamination by *E. coli* O157:H7. The microbial community was analyzed via culturable and non-culturable methods at 5, 10, and 25°C for different storage times. In the non-culturable method, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) was used. The initial bacterial concentration was  $2.92 \times 10^5$  CFU/mL, which exceeded the limit prescribed by the Korean Food Hygiene law. The results of the DGGE analysis indicated that the microbial community during storage was diverse and the spoilage lactic acid bacteria were prevalent at a later stage. Other bacteria such as *Rahnella*, *Citrobacter*, *Pseudomonas*, and *Cyanobacteria* were identified. Thus, the results strongly emphasize the need to pay attention to GVJ production safety, especially with respect to temperature control, in order to prevent the growth of foodborne pathogens such as *E. coli* O157:H7 and other spoilage bacteria.

**Keywords:** *E. coli* O157:H7, green vegetable juice, *Angelica keiskei*, denaturing gradient gel electrophoresis

## 서 론

병원성 대장균(pathogenic *Escherichia coli*)은 주로 익히지 않은 고기나 과일, 채소 등으로부터 감염되는 병원균으로 인체에 감염 시 위장염, 이질, 용혈성 요독성 증후군, 요로감염증, 패혈증, 폐렴, 뇌수막염 등을 일으킨다(1). 이 병원균은 최근 전 세계적으로 많은 집단식중독을 일으키고 있으며(1), 우리나라에서 또한 병원성 대장균이 원인으로 밝혀진 식중독 발생건수가 2013년 기준 31건, 발생환자 수는 1,089명으로 노로바이러스 다음으로 가장 많은 식중독의 원인이 되는 미생물로 지목되고 있다(2).

병원성 대장균에는 여러 종류가 있는데 그 중에서 장출혈성 대장균(Enterohemorrhagic *E. coli*, EHEC)이 특히 많은 집단식중독 사고를 일으키며, 대표적으로 *E. coli* O157:H7이 이에 해당된다(1). 이러한 장출혈성 대장균은 독성이 강하여 날것으로 섭취하는 과일, 채소류와 이를 생것으로 이용하여 만든 주스류에 오염되었을 경우 식중독을 일으킬 가능성이 높아 현행법상 이러한 비가열 식품에서는 불검출(zero tolerance)을 원칙으로 하고 있다(3). 과일주스의 경우 대부분이 pH 3.3-4.6의 낮은 pH 범위를 가지므로 미생물 증식이 억제되는 반면, 녹즙류는 주로 채소류에 의한

제조로 pH 5.5-6.2 정도의 더 높은 pH 범위를 가지므로 상대적으로 과일주스보다 미생물 증식에 유리할 수 있다(4-6).

녹즙이란 가열하지 않은 녹색 채소의 잎이나 열매를 잘게 잘 단하여 뺀아서 즙으로 만든 것으로 과채류가 가진 영양분을 우리 몸이 흡수하기 쉽게 가공한 것이다(4). 가열과정이 생략되므로 활성효소, 바이타민 등의 영양분 손실은 방지할 수 있지만, 제조 공정 중 별도의 가열 살균을 하지 않는다는 것은 그만큼 미생물에 의한 오염의 가능성이 높아진다는 것을 의미하며, 이에 원료의 수확부터 제조공정, 유통까지의 위생관리가 더욱더 철저해야 함을 의미한다.

일부 만성 질환자의 식이요법에서 시작한 녹즙은 신선초, 케일 등이 각종 성인병 질환 예방에 효과가 있는 것으로 알려지면서 건강기능식품이라는 인식이 생기게 되었다. 최초 녹즙은 1990년대 녹즙기의 보급으로 가정에서 자가제조 형태의 대중화가 이루어졌다. 하지만 일반가정에서 오염되지 않은 유기농 원료를 구하기가 쉽지 않고, 매일 신선한 채소로 즙을 내는 번거로움이 있었다. 1994년에는 녹즙기의 첫가루 검출 파동으로 녹즙에 대한 수요가 급감하였지만, 이는 또한 위생적인 원료공급과 제조법의 도입이 가능한 기업중심의 녹즙산업이 발전하는 계기가 되었다. 이후 제한된 유통기한과 제조시설의 한계, 녹즙 특성에 맞지 않는 식품규격으로 인한 녹즙산업의 과도기를 지나, 축적된 노하우와 HACCP, KGMP 등과 같은 위생 제조시설의 발전, 녹즙에 대한 규격의 재정비와 건강 지향적 트렌드의 확대, 그리고 이에 부응하려는 기업의 노력이 더해져 제품의 다양성이 증가하였으며, 품질이 비약적으로 향상되었다. 그 결과 녹즙산업은 매년 30%이상의 고성장을 이루었고, 2002년에는 1,000억 원대의 시장규모를

\*Corresponding author: Ok-Kyung Koo, Korea Food Research Institute, Seongnam, Gyeonggi 13539, Korea  
Tel: +82-31-780-9370  
Fax: +82-31-780-9876  
Email: okoo@kfri.re.kr, http://www.kfri.re.kr  
Received March 30, 2015; revised April 30, 2015;  
accepted April 30, 2015

형성하게 되었다. 이후 지속적인 연구가 더해져 녹즙의 질병 예방과 치료 차원에서 과학적 규명이 이루어지고 있으며, 오늘날에는 녹즙의 섭취가 하나의 대체요법으로까지 자리를 잡고 있다(4).

하지만, 기업의 녹즙 품질이 많이 개선되었다 하더라도 가열과정이 생략되는 만큼 병원성 대장균 등에 의한 식중독 발생의 가능성은 여전히 남아있으며, 이에 안전한 식품유통과 섭취를 위한 예방적 차원에서의 연구의 필요성이 있을 것으로 판단된다.

이에, 본 연구는 시중의 신선초를 주재료로 하는 녹즙을 구매하여 평판계수법과 denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)를 이용한 저장온도와 저장시간별 미생물 커뮤니티 변화와 병원성 대장균 접종시의 생존양상을 분석하였으며, 그 결과를 바탕으로 녹즙의 미생물 오염으로 인한 잠재적 위험성을 평가하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 녹즙시료

본 실험에서 사용된 녹즙시료는 유기신선초(*Angelica keiskei*)를 당일 착즙한 시중의 녹즙 제품을 구입하여 사용하였다. 녹즙은 아이스팩상에 냉장상태로 제공받은 후 실험 전까지 4°C 냉장저장고에 2-3시간 정도 보관하였다.

### 미생물 접종과 정량분석

녹즙에서의 병원성 대장균의 변화를 보기 위하여 3가지 계통의 병원성 대장균(*E. coli* O157:H7 ATCC 43889, ATCC 43895, NCCP 11091)을 사용하여 접종하였다. 각각의 대장균은 tryptic soy broth (TSB, Merck, Darmstadt, Germany)에서 37°C, 16-18시간 증균 배양한 후, 각 균주를 동량씩 섞어 cocktail을 확보한 뒤, 희석하여 녹즙시료 1 mL당 10<sup>4</sup> CFU를 접종하였다. 시료는 저장 온도 5, 10, 25°C별 *E. coli* O157:H7를 접종한 것과 접종하지 않은 것을 준비하고, 저장일수, 또는 저장시간별로 각각의 agar 플레이트에 도말하여 37°C, 24시간 배양 후 계수하였다. 사용된 agar 플레이트는 *E. coli* O157:H7 정량분석을 위한 Cefixime과 Tellurite (Oxoid, Hampshire, England)를 첨가한 Sorbitol MacConkey Agar (Acumedia, Lansing, MI, USA)와 총 호기성 세균의 정량 분석을 위한 R2A (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)를 사용하였다. R2A는 식물, 수질 속 다양한 세균 분리에 적합하기에 선정하여 실험에 사용하였다(7). 실험은 모두 세 번씩 반복하였다.

### 시료의 genomic DNA추출 및 증합효소 연쇄 반응(PCR)

각 병원성 대장균 접종유무, 보관온도, 보관기간에 따른 시료를 1 mL씩 취하여 원심분리(9,500×g, 5 min, 20°C)한 후, 상층액을 따라버리고, PowerFood Microbial DNA Isolation kit (MO BIO, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA의 16S rRNA 유전자 증폭을 위하여 1차 PCR에는 GC clamp가 없는 341F (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3')와 518R (5'-TACCGCGCTGCTGG-3') 프라이머를 사용하였으며, DNA 주형(template)은 추출한 DNA의 농도를 NanoVue (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)로 확인하여 증합효소 연쇄 반응시에 모든 시료가 동일한 양이 되도록 첨가하였다. 증합효소 연쇄 반응시 Takara Ex Taq™ Version 2.0 (Takara, Shiga, Japan) 12.5 μL에 DNA 주형 100 ng, forward와 reverse 프라이머(10 pM)를 1 μL씩 넣고 나머지는 멸균수를 첨가하여 총 부피가 25 μL가 되도록 제조하였다. 2차 PCR은 GC clamp가 달린 341F (5'-CGCCGCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGCACGGCAGCAG-3')와

518R (5'-ATTACCGCGCTGCTGG-3') 프라이머를 이용하여 진행하였다. PCR은 PTC-2000 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Quebec, Canada)으로 수행하였으며, 95°C에서 2분 (initial denaturation), 94°C에서 1분 (denaturation), 58°C에서 45초 (annealing), 72°C에서 2분 (extension)을 30회 반복하였고, 72°C에서 7분간 최종 extension을 실시하였다. PCR 산물의 존재와 분자량을 확인하기 위해서 TAE 완충용액(buffer) (40 mM Tris-HCl, 40 mM acetate, 1.0 mM EDTA)에 0.8%의 농도로 아가로스(agarose)를 첨가하여 녹인 후에 Staining STAR (DyneBio, Seongnam, Korea)을 첨가하여 젤을 제조하고, 시료를 loading dye와 섞어 loading한 후, 100 V에서 15분간 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 후 Gel Doc™ EZ Imager (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 DNA 밴드를 확인하였다.

### Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

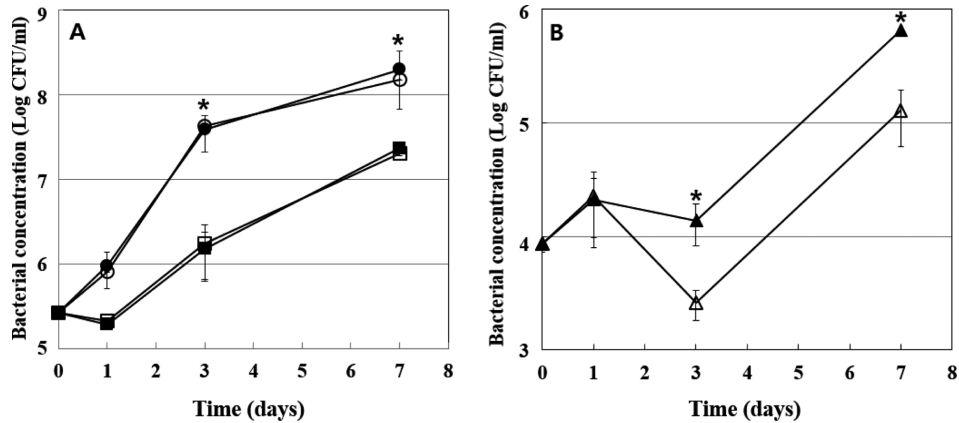
DGGE 분석은 Koo 등(8)의 방법을 바탕으로 진행하였다. PCR을 이용하여 증폭된 DNA는 Bio-Rad DCode™ Universal Mutation Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 분석하였으며, 42-60%, 또는 43-58%의 gradient urea deionized formamide (urea, Duchefa, haarlem, Netherland; formamide, Amresco, OH, USA)의 8% acrylamide 젤(acrylamide:bisacrylamide =37:1)을 TAE 완충용액상에 제조하였다. 이어서 PCR을 완료한 시료를 loading dye와 섞어 loading한 후, 60 V, 59°C에서 16시간 전기영동 하였다. 전기영동이 완료되면 젤을 Staining STAR (DyneBio)로 염색한 후, Gel Doc™ XR+Imaging System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 DNA 밴드를 확인하였다.

### 젤 DNA추출과 염기서열 분석

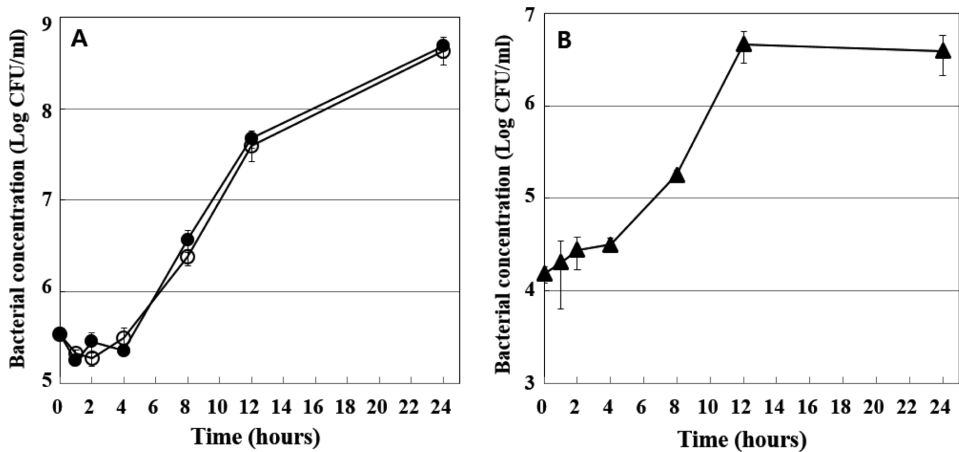
DGGE 전기영동 후 polyacrylamide 젤에서 DNA 밴드의 분리를 확인하고, 단일한 DNA 밴드를 잘라내어 DNA를 용출하였다. 순도 높은 DNA를 확보하기 위해 각각의 DNA 용출시료를 다시 한 번 GC clamp가 부착된 341F와 518R 프라이머를 사용하여 위에 언급된 방법으로 PCR을 진행하고, 위와 같은 방법으로 DGGE를 진행한 후, 다시 젤로부터 DNA를 용출하였다. DNA 용출방법은 다음과 같다. 먼저 잘라낸 젤을 잘게 분쇄한 후, 300 μL의 TE buffer (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0)를 첨가하고, 잘 섞은 후 65°C에서 15분간 방치한다. 이 후 Spin-X Centrifuge Tube Filter (Corning, Tewksbury, MA, USA)에 옮겨 18,500×g으로 5분간 원심분리 한 후, 필터를 버리고, 남은 시료에 10 M NH<sub>4</sub>OAc 100 μL, 20 mg/mL, Glycogen 3 μL, 100% EtOH 1 mL을 넣고 섞어준다. 이를 -70°C에서 16시간 방치하고, 4°C에서 18,500×g으로 15분간 원심분리 해준 후 상층액을 따라 버린다. 이렇게 생긴 pellet은 -18°C에 보관해둔 70% EtOH로 2회 세척해준다. 마지막으로 증류수 5.0 μL로 pellet을 회복시켜준다. 이 시료는 Macrogen (Seoul, Korea)에 염기서열 분석을 의뢰하였으며, 그 결과는 BLAST search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 프로그램을 이용하여 Genebank (NCBI, Bethesda, MD, USA)의 16S rRNA 염기서열과 비교하여 동정하였다.

### 통계적 분석

통계적 분석은 각 3번씩 반복한 실험결과와 평균을 Student *t*-test에 근거하여 IBM SPSS Statistics 20 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA)를 이용하여 유의수준 *p*<0.05에서 비교하였다.



**Fig. 1.** Concentration of total aerobic bacteria and *E. coli* O157:H7 in green vegetable juice on day 0, 1, 3 and 7 at 5 and 10°C. Total aerobic bacteria (A) at 5°C with (□) and without (■) *E. coli* O157:H7, at 10°C with (○) and without (●) *E. coli* O157:H7. *E. coli* O157:H7 count (B) at 5°C (△) and 10°C (▲). Asterisk represents significant difference between each temperature group at the same storage time (days) at  $p < 0.05$ .



**Fig. 2.** Concentration of total aerobic bacteria and *E. coli* O157:H7 in green vegetable juice for 0, 1, 2, 4, 8, 12 and 24 hours at 25°C. (A) Total aerobic bacteria with (○) and without (●) *E. coli* O157:H7. (B) *E. coli* O157:H7 count at 25°C (▲).

## 결과 및 고찰

### 세균수의 정량적 분석

녹즙 샘플에 대한 저장온도, 저장시간, *E. coli* O157:H7 접종 유무에 대한 정량분석 결과는 Fig. 1, 2와 같다. 저장시간이 경과함에 따라 총 호기성 세균수가 증가하였으며, 모든 온도조건에서 *E. coli* O157:H7의 접종 유무에 따른 총 호기성 세균수는 비슷한 결과를 나타내었다. 그 증가 정도는 온도가 높을수록 컸으며, 저장시간에 따른 총 호기성 세균수 증가를 비교해보면, 7일째에는 5°C의 경우 *E. coli* O157:H7 접종 샘플은  $2.01 \times 10^7$  CFU/mL, 미접종 샘플은  $2.31 \times 10^7$  CFU/mL까지 총 호기성 세균수가 증가하였으며, 10°C의 경우 *E. coli* O157:H7 접종 샘플은  $1.47 \times 10^8$  CFU/mL, 미접종 샘플의 경우  $1.97 \times 10^8$  CFU/mL까지 총 호기성 세균수가 증가하였다. 25°C에는 24시간 배양 후 *E. coli* O157:H7 접종 샘플의 경우  $4.28 \times 10^8$  CFU/mL, 미접종 샘플에서는  $4.86 \times 10^8$  CFU/mL의 총 호기성 세균수를 보였다. 접종한 *E. coli* O157:H7 수를 분석한 결과를 보면, 5°C와 10°C에서는 1일까지는 그 수가 증가하다가 3일째에는 감소하였으며, 이후 7일째는 증가하는 경향을 보였고, 그 최종 균수는 5°C의 경우  $1.28 \times 10^5$  CFU/mL, 10°C의 경우  $6.50 \times 10^5$  CFU/mL을 보였다. 위 결과는 Gabriela 등 (2010)의 *E. coli* O157:H7을 시금치에 접종한 실험에서 4°C와

10°C에 저장한 결과(7)와 유사한 경향을 나타내는데, 이는 온도, 다른 균과의 경쟁 등에 의한 스트레스가 균의 회복에 영향을 주었을 것으로 생각된다. 이는 5°C와 25°C에서의 초기균수 감소경향에서도 비슷하게 설명될 수 있다. 반면에 25°C에서의 *E. coli* O157:H7수 변화를 보면, 12시간까지는 그 수가 지속적으로 증가하다가 그 이후부터 생장이 둔화되고 서서히 감소하는 결과를 보였다. 5°C, 10°C와는 다르게 균수가 감소 후 증가하는 경향성은 보이지 않는데, 이는 25°C는 온도 등의 요인에 의한 환경적 스트레스가 적었기 때문일 것으로 생각된다. 12시간 이후의 *E. coli* O157:H7의 성장둔화 양상은 DGGE젤의 밴드에서 보이는 젓산균류(*Weissella*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*)의 증가와 관련성이 있다고 생각된다. 젓산균류는 성장함에 따라 특정 항균성 물질을 생성하는데, *Weissella*가 속한 Lactobacillales의 경우 pediocin, vercin 등의 bacteriocin을(9), *Leuconostoc*의 경우 acetate, diacetyl production 등의 항균물질을 만든다(10). 따라서, Fig. 3C에서 12시간 이후로 밴드 세기(intensity)의 증가가 현저한 젓산균들(*W. confusa* 등)이 만드는 항균성 물질이 *E. coli* O157:H7의 성장을 억제하는데 영향을 주었을 것이라 생각된다. 반면, 10°C에서도 저장기간이 3일 경과한 이후에 다양한 젓산균들이 보이니(Fig. 3B), Bacterial concentration (Fig. 1B)을 보면 *E. coli* O157:H7을 억제하지 못하는 것으로 보이는데, DGGE젤 상 젓산균 밴드가 25°C보

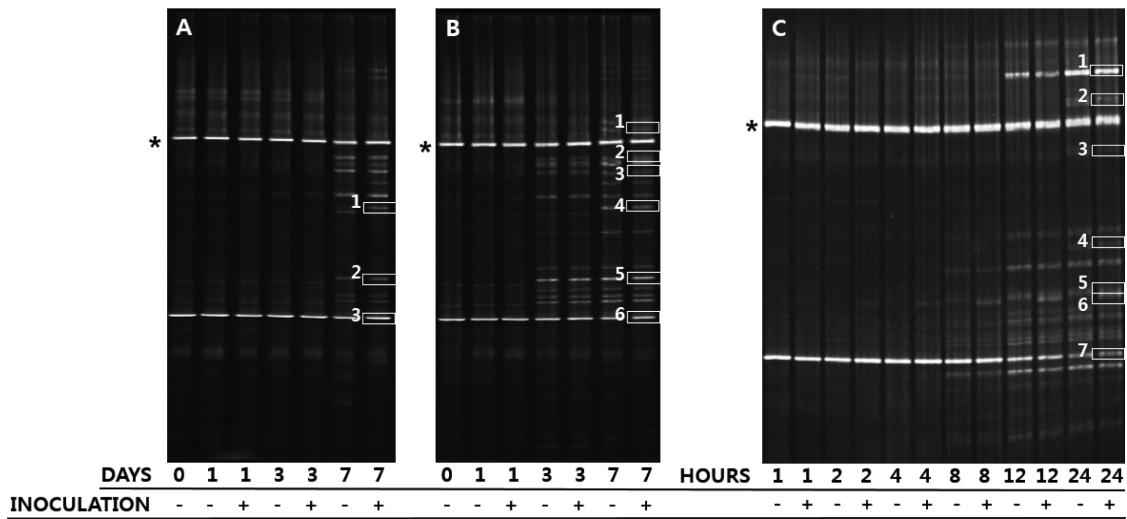


Fig. 3. DGGE profiles of the amplicons of 16S rRNA gene of DNA extracted directly from green vegetable juice during storage at 5°C (A) and 10°C (B) for day 0, 1, 3 and 7 at 25°C (C) for 1, 2, 4, 8, 12 and 24 hours, *E. coli* O157:H7 inoculated (+) and non-inoculated (-).

다 현저히 적은 intensity를 보이는 것으로 보아(Fig. 3B, C) 10°C에서는 젖산균이 *E. coli* O157:H7을 억제할 만큼 충분한 우점종을 차지하지 못했을 것이라고 생각된다.

이 실험에서 설정된 온도조건은 각각 냉장고(5°C), 냉장진열대(10°C), 실온(25°C)을 대표한 값으로써, 실험결과와 실제 보관 상태를 연결지어보면, 녹즙을 보관시에 그 온도가 높을수록 균수가 기하급수적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었고, 냉장보관(5°C)을 하더라도 저장 1일까지는 미생물 증식의 양상이 보이지 않았지만 그 이후로는 대수적으로 균수가 증가하는 경향을 보이므로 이에 보관과 섭취에 주의를 기울일 필요가 있다고 판단된다. 또한 실온(25°C)에서는 4시간 이후로 역시 총 호기성 세균수가 대수적으로 증가하므로 이 이상을 실온에 방치하지 않는 것이 녹즙의 안전한 섭취에 도움이 될 것으로 판단된다. 또한 병원성 대장균에 오염됐을 경우, 냉장과 냉장진열대 온도에서는 3일 이후, 실온에서는 4시간 이후부터 병원성 대장균의 수가 급증하게 되므로 이에 보관상 주의를 기울일 필요가 있다고 생각된다. 현행 법상 「식품의 기준 및 규격」에서 정하는 가열하지 아니한 제품 또는 가열하지 아니한 원료 함유의 과일채소류음료의 경우 그 총 균수 제한이 1.0×10<sup>5</sup> CFU/mL 이하로 설정되어 있으며(3), 이 제품의 경우 보관 초기부터 그 수를 초과했으므로 녹즙제조시 더욱 철저한 제조공정, 유통상의 주의가 필요할 것으로 보인다.

DGGE 방법에 의한 미생물의 분포조사

녹즙 샘플의 저장온도, 저장시간, *E. coli* O157:H7 접종 유무에 대한 DGGE 분석결과는 Fig. 3과 Table 1과 같다. DGGE 결과는 모든 온도 조건에서 시간이 지날수록 더 다양한 미생물 분포를 보이는 것으로 확인됐다. 그 중 5°C와 10°C에서는 *E. coli* O157:H7의 접종 유무에 따른 차이는 없었고, 10°C의 경우가 좀 더 짧은 시간 안에 다양한 미생물분포를 보였다. DGGE젤 상에 나타난 밴드를 시퀀싱한 결과를 보면(Table 1) 두 저장온도에서 공통적으로 *Rahnella aquatilis*와 *Pseudanabaena* sp.가 나타났으며, 10°C에서는 젖산균류(*Leu. lactis*, *Lb. sakei*, *W. soli*)가 추가로 나타났다. 25°C의 결과를 보면, 병원성 대장균의 접종유무에 따라 다른 결과를 보이는 밴드(Fig. 3C)가 관찰됐고, 밴드를 시퀀싱한 결과 *E. coli* O157:H7로 확인됐다. 그 외에 10°C보다 더 많은 종류의 젖산균류가 확인됐고, 역시 공통적으로 *Pseudanabaena* sp.

Table 1. Sequence information of bands obtained from denaturing gradient gel electrophoresis

Band	16S rRNA sequence results	BLAST similarity, %	GenBank accession no.
A-1	<i>Pseudomonas fragi</i>	100	NR_113578.1
A-2	<i>Rahnella aquatilis</i>	100	NR_074921.1
A-3	<i>Pseudanabaena</i> sp.	92	NR_102446.1
B-1	<i>Weissella soli</i>	100	NR_025642.1
B-2	<i>Leuconostoc lactis</i>	98	NR_113255.1
B-3	<i>Lactobacillus sakei</i>	97	NR_075042.1
B-4	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	100	NR_074834.1
B-5	<i>Rahnella aquatilis</i>	100	NR_074921.1
B-6	<i>Pseudanabaena</i> sp.	92	NR_102446.1
C-1	<i>Weissella confusa</i>	100	NR_113258.1
C-2	<i>Leuconostoc citreum</i>	100	NR_074694.1
C-3	<i>Leuconostoc lactis</i>	99	NR_113255.1
C-4	<i>Lactococcus lactis</i>	100	NR_103918.1
C-5	<i>Citrobacter freundii</i>	100	NR_117752.1
C-6	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	99	NR_074891.1
C-7	<i>Pseudanabaena</i> sp.	92	NR_102446.1

이 확인됐으며 10°C에서 발견된 *W. confusa*가 확인됐다. *E. coli* O157:H7 접종유무, 저장온도, 저장시간에 관계없이 모든 샘플에서 높은 강도로 발견된 두 개의 밴드가 있었는데, 그 중 하나는 *Pseudanabaena* sp. (Fig. 3; A-3, B-6, C-7)로 사이아노박테리아의 한 종류임을 확인 할 수 있었으나, 다른 하나(Fig. 3; \*)의 경우 NCBI에서 uncultured bacterium isolate DGGE gel (GenBank: KF031439.1)에 대한 결과만을 확인할 수 있었는데, 그 시료가 오이의 잎 표면이었다. 녹즙 원료가 채소류 중 하나인 신선초인것을 감안하면, 위 밴드에 해당하는 세균은 식물의 잎에서 우점종을 차지하는 세균일 것으로 추측할 수 있다.

위 DGGE 결과를 종합해보면, 정량 분석법 결과와 유사하게 온도가 높을수록 더 많은 미생물류가 더 빠른 시간 내에 나타나는 것을 확인할 수 있었고, 이에 온도에 따른 녹즙의 저장에 주

의를 기울일 필요가 있다고 판단되었다. 또한 집중한 *E. coli* O157:H7의 경우 5°C, 10°C에서 정량 분석법에서는 나타났으나 DGGE젤 상에서는 나타나지 않았는데, 이는 농도에 대한 요소가 주요한 작용을 한 것으로 보인다. 초기의 *E. coli* O157:H7의 낮은 농도로 인해 증폭되었어도 다른 시료에 비해 상대적으로 확인이 불가능하였거나, 식품 내 존재 미생물이므로 PCR을 통한 증폭에 한계를 보였을 가능성도 있었을 것으로 판단된다.

다음은 DGGE 결과와 밴드 시퀀싱 결과를 통해 녹즙 내 존재하는 미생물들의 저장기간 중의 우점종을 확인하고 각각의 위해성을 평가하고자 한다. *R. aquatilis*는 주로 물에서 많이 발견되는 균으로, 본 실험의 녹즙시료는 작물 재배시의 용수나 처리시의 세척수로부터 오염이 되었을 가능성이 있을 것으로 생각된다. 이 세균은 사람에게 기회감염성을 띠는 균으로, 면역력이 감소되었을 경우 병증을 일으킬 가능성이 있다(11). 임상적으로는 폐렴증, 요로감염증, 수술시 창상감염 등을 일으키는 것으로 보고되어있다(12-14). 이 균은 내냉성으로, 4°C의 비교적 낮은 온도에서도 잘 자라므로, 5°C와 10°C에서 시간이 지날수록 DGGE젤 상에서 우점종을 차지하는 것을 확인할 수 있다. 따라서 위 균이 식품에 오염되면, 냉장보관을 하더라도 그 수가 쉽게 증가하므로 면역력이 약해진 사람은 그 취급에 주의가 필요할 것으로 보인다. *Pseudomonas* sp.의 경우 4°C에서 43°C까지의 넓은 성장온도범위를 가진다. 따라서 DGGE젤 상에서 *R. aquatilis*와 마찬가지로 5°C와 10°C에서 생장한 것을 확인할 수 있다. 이 균은 자연계에 널리 분포하는 균으로, 인간이나 동물, 식물에 병원성을 가지기도 하며(15), 또 식물 생육촉진 근권세균(Plant-growth-promoting rhizobacteria)으로 불리며 식물생장에 이로운 영향을 주기도 한다(16). 10°C의 DGGE 젤 상에서 발견된 *P. brassicacearum*의 경우 흙과 여러 농작물의 근권에서 분리되고 된 것(16)을 확인할 수 있었으며, 따라서, 위 균은 녹즙에 쓰이는 원료작물의 생장 중 흙으로부터 오염되었을 것으로 추정할 수 있다. *Citrobacter*는 젓당(lactose)을 발효하는 균으로 *E. coli*와 같이 장내세균과(Enterobacteriaceae)에 속하며 콜로니의 형태 또한 *E. coli*와 유사하다(15). 25°C DGGE 결과에서 보인 *Citrobacter freundii*의 경우 포유류, 새 등을 포함한 다양한 동물에서 발견되고, 흙, 물, 하수, 식품 등에 존재하며, 임상환자에게도 분리되는 기회감염, 2차 감염성 병원균이다(15). 따라서 위 결과로 말미암아 역시 면역력이 약해진 사람의 경우 그 취급에 주의가 필요하다고 생각할 수 있다. 사이아노박테리아는 산소를 발생하는 광영양성 자가영양 생물로 엽록소를 포함하는 틸라코이드라는 구조를 가진다. 이 균은 생장에 바이타민류가 필요하지 않고, 공기 중 질소를 고정 가능한 종이 많이 존재한다. 지상, 담수, 해수 모두 넓게 분포하며, 보통 극한의 환경에의 저항성을 가지고 있다(17). DGGE젤 상 발견된 *Pseudanabaena* sp.은 사이아노박테리아의 한 종류로, 녹즙 시료상 병원성 대장균 집중유무와 상관없이 모든 온도, 모든 시간대에 우점종을 차지한 것은 위와 같은 특성이 작용한 결과라고 생각된다.

녹즙시료는 저장기간이 길어짐에 따라 *Weissella*, *Lactococcus*, *Lacobacillus*, *Leuconostoc* 등 다양한 젓산균류가 검출되었다. 젓산균은 발효식품류, 채소류, 사람과 동물의 소화관 등에서 발견되며 일부는 흙으로부터 분리 보고되어있다(18). 위 녹즙에서의 젓산균 발현 양상은 국내에서 이루어진 김치에서의 젓산균 발현 양상에 대한 실험결과와 일부 유사한 경향성을 가지고 있음을 확인할 수 있다. 녹즙 저장 중 10°C에서 *Leu. lactis*와 *Lb. sakei*가 먼저 등장하고 이후 *W. soli*가 등장하는 결과를 보였고, 25°C에서는 *W. confusa*가 등장한 이후 *Leu. citreum*, *Leu. lactis*, *Lac. lactis*가 등장하는 결과를 보였다. 한편, Lee 등(2004)의 PCR-DGGE

를 이용한 김치에서의 발효시간에 따른 젓산균 분포결과를 보면(19), 10°C에서 *W. confusa*가 출현한 후, *Leu. citreum*이 등장하였고, 마지막에 *Lb. sakei*가 등장하였으며, 20°C에서는 *W. confusa*, *Leu. citreum*가 차례로 등장한 후, *Lac. lactis*, *Lb. sakei*가 차례로 등장했다. 이때, 시료의 pH는 시간이 지남에 따라 점차 낮아진 것으로 나타났다. 또한 Choi 등(20)의 polyphasic method를 이용한 김치의 발효시간에 따른 젓산균 분석을 보면(20), 15°C에서 *Leu. citreum*, *W. confusa*, *Lb. sakei*, *Lb. brevis*가 순서대로 출현한 것으로 나타났다. 마지막으로 Cho (2010)의 16s rRNA를 이용한 metagenome분석 결과를 보면(21), 열무 물김치, 동치미 냉면 육수에 대한 25°C에서 32°C 사이에서의 발효시간에 따른 미생물 분포도를 확인한 결과, 역시 발효 초기에 *W. confusa* 또는 *W. cibaria*가 우점종으로 나타났으며, 후기로 갈수록 *Lb. plantarum* 또는 *Lb. sakei*가 우점종을 차지하는 것을 확인할 수 있었다. 마찬가지로 pH는 발효가 진행됨에 따라 낮아지는 결과를 보였다. 이상 연구결과들을 종합해보면 젓산균에 의한 발효 또는 부패의 진행시, 저장온도에 따른 시간차이는 있지만 전반적으로는 초기에 *W. confusa*가 출현하고, 중기에는 *Leu. lactis*, *Leu. citreum* 등이 출현하였으며, 후기에는 *Lb. sakei*가 출현하는 경향을 확인할 수 있었다. 시간이 지날수록 시료의 pH가 감소하는 것을 고려해 볼 때, 이러한 젓산균 분포 경향은 각 젓산균별로 그 생장에 필요한 최적 pH를 요구하기 때문일 것이라 생각된다. 또한 저장온도와 시료에 따라서도 미생물 분포에 차이를 보이는 것으로 보아 온도와 영양조건도 역시 젓산균 분포 변화에 영향을 줄 것이라 판단된다.

## 요 약

본 연구는 건강한 식이에 대한 관심이 늘어나면서 그 수요량이 증가하고 있는 녹즙에 대한 미생물학적 품질평가를 목적으로 실시되었다. 또한 날것으로 섭취하는 과채류의 장출혈성 대장균의 오염으로 인한 집단식중독 사고가 많이 보고되고 있는 상황에서 *E. coli* O157:H7이 녹즙에 오염되었을 경우 보관온도, 보관 시간별 미생물 커뮤니티의 변화를 정량 분석법과 DGGE분석을 통해 확인하여 잠재적인 식중독 위험성을 확인해 보고자 하였다. 정량 분석 결과 초기부터 총 호기성 세균수가 식품위생법상 기준치( $1.0 \times 10^5$  CFU/mL)를 초과한 결과를 보였으며, *E. coli* O157:H7에 대한 세균수 측정결과를 보면 5°C와 10°C에서 균수가 감소하다가 증가하는 경향을 보였다. DGGE결과를 보면 보관 시간이 길고 보관온도가 높을수록 더 많은 미생물 분포도를 보였고, 저장시간이 후반으로 갈수록 부패균인 젓산균이 다수 출현하는 것을 확인할 수 있었다. 이 외에 *Rahnella aquatilis*와 *Citrobacter*, *Pseudomonas* 등의 기회감염성 세균이 검출되었다. 이에, 위 녹즙시료는 잠재적인 식중독의 위험성을 보이므로 제품의 생산, 유통에 더욱 주의를 기울일 필요가 있다고 생각된다. 또한, 제품 구입 후 냉장저장을 하더라도 가능한 한 빠른 섭취가 권장되는 바이다. *E. coli* O157:H7에 위 제품이 오염되었을 경우 냉장과 실온조건 모두에서 세균수가 증가하였고, 특히 실온에 방치하였을 경우 그 증가폭이 크므로, 이에 특히 주의를 기울일 필요가 있다고 생각된다.

## 감사의 글

본 연구는 한국식품연구원의 연구비 지원을 받아 수행된 결과로 이에 감사드립니다.

## References

1. Bhunia AK. *Escherichia coli*. pp. 190-196. In: Foodborne Microbial Pathogens. Bhunia AK (ed). Prentice Hall, Bergen County, NJ, USA (2008)
2. Ministry of Food and Drug Safty. Statistical system of food poisoning. Available from: <http://www.mfds.go.kr/e-stat/index.do>. Accessed Mar. 25, 2015.
3. MFDS. Ministry of Food and Drug Safty. Food Standards and Specifications of Revised Notification. Cheongju, Korea. (2015)
4. Shin CK. Present and prospect of fresh vegetable-extract juice industry. *Food Ind. Nutr.* 8: 1-7 (2003)
5. Nirmala SVSG, Reddy VVS. A comparative study of pH modulation and trace elements of various fruit juices on enamel erosion: An *in vitro* study. *J. Indian Soc. Pedod. Prev. Dent.* 29: 205-215 (2011)
6. Stringer SC, Haque N, Peck MW. Growth from spores of nonproteolytic *Clostridium botulinum* in heat-treated vegetable juice. *Appl. Environ. Microb.* 65: 2136-2142 (1999)
7. Lopez-Velasco G, Davis M, Boyer RR, Williams RC, Ponder MA. Alterations of the phylloepiphytic bacterial community associated with interactions of *Escherichia coli* O157:H7 during storage of packaged spinach at refrigeration temperatures. *Food Microbiol.* 27: 476-486 (2010)
8. Koo OK, Mertz AW, Akins EL, Sirsat SA, Neal JA, Morawicki R, Crandall PG, Ricke SC. Analysis of microbial diversity on deli slicers using polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis technologies. *Lett. Appl. Microbiol.* 56: 112-119 (2013)
9. Makarova K, Slesarev A, Wolf Y, Sorokin A, Mirkin B, Koonin E, Pavlov A, Pavlova N, Karamychev V, Polouchine N, Shakhova V, Grigoriev I, Lou Y, Rohksar D, Lucas S, Huang K, Goodstein DM, Hawkins T, Plengvidhya V, Welker D, Hughes J, Goh Y, Benson A, Baldwin K, Lee JH, Díaz-Muñiz I, Dosti B, Smeianov V, Wechter W, Barabote R, Lorca G, Altermann E, Barrangou R, Ganesan B, Xie Y, Rawsthorne H, Tamir D, Parker C, Breidt F, Broadbent J, Hutkins R, O'Sullivan D, Steele J, Unlu G, Saier M, Klaenhammer T, Richardson P, Kozyavkin S, Weimer B, Mills D. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *PNAS* 103: 15611-15616 (2006)
10. Klaenhammer TR. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* 70: 337-349 (1988)
11. Reina J, Lopez A. Clinical and microbiological characteristics of *Rahnella aquatilis* strains isolated from children. *J. Infection* 33: 135-137 (1996)
12. Chang CL, Jeong J, Shin JH, Lee EY, Son HC. *Rahnella aquatilis* sepsis in an immunocompetent adult. *J. Clin. Microbiol.* 37: 4161-4162 (1999)
13. Alballaa SR, Qadri SM, Al-Furayh O, Al-Qatary K. Urinary tract infection due to *Rahnella aquatilis* in a renal transplant patient. *J. Clin. Microbiol.* 30: 2948-2950 (1992)
14. Maraki S, Samonis G, Marnelakis E, Tselentis Y. Surgical wound infection caused by *Rahnella aquatilis*. *J. Clin. Microbiol.* 32: 2706-2708 (1994)
15. Krieg NR. Gram-Negative Aerobic Rods and Cocci. Vol. I, pp. 141-142, Facultatively Anaerobic Gram-Negative Rods. pp. 458-461. In: Bergey's manual of systematic bacteriology. Krieg NR (ed). Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA (1984)
16. Achouak W, Sutra L, Heulin T, Meyer JM, Fromin N, Degraeve S, Christen R, Gardan L. *Pseudomonas brassicacearum* sp. nov. and *Pseudomonas thivervalensis* sp. nov., two root-associated bacteria isolated from *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. *Int. J. Syst. Evol. Microb.* 50: 9-18 (2000)
17. Michael M, John M, David S, David C. Other bacteria. Vol. 13, pp. 560-564. In: Brock Biology of Microorganisms. Michael M, John M, David S, David C (eds). Pearson Education, New York, NY, USA (2012)
18. Magnusson J, Jonsson H, Schnurer J, Roos S. *Weissella soli* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microb.* 52: 831-834 (2002)
19. Lee JS, Heo GY, Lee JW, Oh YJ, Park JA, Park YH, Pyun YR, Ahn JS. Analysis of kimchi microflora using denaturing gradient gel electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol.* 102: 143-150 (2005)
20. Choi IK, Jung SH, Kim BJ, Park SY, Kim JH, Han HU. Novel *Leuconostoc citreum* starter culture system for the fermentation of kimchi, a fermented cabbage product. *A. Van Leeuw. J. Microb.* 84: 247-253 (2003)
21. Cho KM. Manufacturing technology of dongchimi naengmyeon meat broth to enhance health function through fermentation starter isolated from kimchi. Final Report for the Basic Research program of the Nongshim's Youlchon Foundation, Seoul, Korea. pp. 555-626 (2010)