J. Fd Hyg. Safety 12(4), 304 - 309(1997)

Escherichia coli O157:H7 균주의 열저항성에 미치는 예비열처리 및 Ascorbate의 효과

권오진† · 김덕진* · 김순희** · 변명우

*한국원자력연구소 식품공학부, *대구대학교 식품공학과, **김천전문대학 식품가공과*

Effects of Preheating and Ascorbate on Heat Resistance of *Escherichia coli* O157:H7

Oh-Jin Kwon†, Duk-Jin Kim*, Soon-Hee Kim and Myung-Woo Byun**

Dept. of Food Irradiation, Korea Atomic Energy Research Institute, Taejon 305-353, Korea

**Dept. of Food Engineering, Taegu University, Kyungbuk 713-714, Korea*

***Dept. of Food Processing and Technology, Kimchon College, Kimchon 740-200, Korea*

ABSTRACT — A study was undertaken to determine the thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 as influenced by the effects of temperature, time, suspension medium and ascorbate. Tryptic soy broth was more heat resistant than phosphate buffer (pH 7.1), with D values of 1.52~1.68 min at 60°C and 1.51~1.63 min at 70°C compared with 1.52~1.65 min at 60°C and 1.26~1.61 min at 70°C for phosphate buffer as suspension medium. *E. coli* O157:H7 was completely inhibited within 30 min when small inoculum (10^6 CFU/m*l*) was heated at 70°C. When *E. coli* O157:H7 was preheated at 48°C for 60 min in phosphate buffer before heating, D values were 1.28~1.60 min at 60°C, and 1.13~1.56 min at 70°C, showing that preheating increases the heat resistance of the strain. Phosphate buffer containing ascorbate (0.001 M) was enhanced the thermal inactivation of the strain when inoculated as large inoculum (10^9 CFU/m*l*), while ascorbic acid was no effect at low cell concentrations (10^6 CFU/m*l*).

Key words □ *E. coli* O157:H7, thermal inactivation, D value, ascorbate

Escherichia coli O157:H7(이하 O157) 균주는 설사나 복통을 일으키는 병원성 대장균의 일종이다. 대장균은 원래 위나 소장에서 소화해 내지 못하는 섬유소를 발효시키고 다른 병원균의 침입을 막는 유익한 균이지만 이것이 일정한 진화과정, 특히 유전자 돌연변이를 통해 인간에게 질병을 일으키게 된 것이 병원성 대장균이다.[1-3] 또한, O157 균주는 일반 대장균과 모양, 크기 및 유전형질까지 유사하고 이 균주에 의한 질환은 다른 설사유발 세균에 비해 잠복기가 길고 동시에 배설 균수가 어떤 시점을 지나면 급격히 감소하기 때문에 검출에 어려움이 있다.[4-7] 초기증상은 복통을 동반한 점액성분이 적은 설사를 일으키고 그 후 1~2일이 지나면 혈변증상이 나타나지만 통상의 성인 경우에는 발병 후 4~8일이 지나면 자연적으로 치료된다.[8] 그러나 5세 이하의 유아나 기초질환을 포함한 고령자는 초기증상부터 간혹 용혈성요독증(hemolytic uremic syndrome, HUS)으로 악화될 가능성이 매우 높다. 또한 HUS에 의해 적혈구가 파괴됨에 따른 용혈성빈혈, 신기능저하에 의한 요독증증상, 혈소판 파괴에 의한 출혈 등을 볼 수 있고 더 심해지면 뇌의 장해가 시작되고 때때로 중추신경증상을 수반하여 사망에 이르게 할 수 있다.[9-11] 이와같은 관점에서 O157 균주는 지금까지의 식중독과는 달라 본 균주에 의한 감염은 매우 심각한 사회문제의 하나로 이를 예방하기 위한 조치는 식품산업에서 매우 중요한 과제로 되어 있다.[12-15] O157 균주를 포함한 대장균은 포자를 형성하는 세균은 아니므로 열에 약하여 80°C에서 5분 정도로 가열하면 완전히 사멸되므로 식품의 조리시에는 내부온도가 최소한 70°C 이상 유지하도록 하는 것이 필요하다. 또한, 외부의 이화학적 자극(stress)이나 식품중의 수분함량, 수용성 당, 염, pH, 지방, 단백질 등에 따라 미생물의 열저항성이 달라지므로 살균시 이에 따른 처리온도 및 시간을 조절할 필요가 있다.[16]

† Author to whom correspondence should be addressed.

이에 본 연구에서는 식품에 오염된 O157 균주에 의한 질병을 예방하고자 가열에 의한 살균처리시 예비열처리 및 ascorbate 첨가가 균주의 열저항성에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

공시균주

실험에 사용한 균주는 Iowa State University(Iowa Pork Industry Center, USA)에서 분양받은 *E. coli* O157:H7(ATCC 43894) 균주를 사용하였다.

균주의 배양과 현탁액의 조제

균주를 tryptic soy agar(TSA, Difco Laboratories, Detroit, Mich.)의 사면배지에 24시간 계대배양 후 이것을 tryptic soy broth(TSB, Difco) 100 m*l*에 1 백금이를 접종하여 37°C에서 24시간 진탕배양(150 rpm)한 다음 배양액 1.0 m*l*를 다시 새로운 100 m*l*의 TSB 배지에 접종하고 16시간 진탕배양시켜 정지기(stationary phase)의 영양세포를 얻었다. 이 영양세포 현탁액을 4°C에서 10분간 원심분리(9,000×g)하여 얻은 균체를 멸균된 Butterfield's phosphate buffer(0.1 M KH_2PO_4 adjusted to pH 7.1 with NaOH, 이하 buffer)로 2회 세척, 재원심분리하여 균 현탁액으로 사용하였다.

가열처리의 효과

O157 균주에 대한 가열처리의 효과는 원심분리한 균체를 미리 멸균된 buffer 혹은 TSB 배지에 희석한 5.0 m*l*를 멸균 screw cap tube(Ø16.5×65 mm)에 넣고 60°C와 70°C에서 0, 2.5, 5, 10, 20분 및 30분간 가열처리한 후 얼음물로 5°C까지 재빨리 냉각한 다음 멸균된 냉 buffer로 적절히 희석하여 TSA 배지가 들어 있는 평판에 0.1 m*l*씩 접종하여 spreader로 도말하고 37°C에서 24시간 배양한 후 생성된 집락을 계수하여 조사하였다. 이때 각 실험의 결과는 3회 반복하여 평균값으로 나타내었다.

예비열처리의 효과

균 현탁액 5.0 m*l*를 멸균된 screw cap tube에 넣고 48°C에서 60분간 예비열처리한 다음 60°C와 70°C에서 0~30분간 각각 가열처리한 후 TSA 평판배지에서 생성된 집락을 계수하여 예비열처리가 균주의 열저항성에 미치는 효과를 조사하였다.

Ascorbate 첨가효과

균 현탁액에 L(+)-ascorbate를 0.001 M 되게 첨가한 후 그 5.0 m*l*를 멸균된 screw cap tube에 넣고 60°C와 70°C에서 0~30분간 가열처리하였다. 가열처리한 접종관을 적절히 희석하여 상기와 같은 방법으로 생성된 집락의 수로 ascorbate가 균주의 열저항성에 미치는 효과를 조사하였다. 이때 L(+)-ascorbate는 buffer에 완전히 용해시켜 0.22 μm millipore filter(Millex-GV)로 여과하여 사용하였다.

결과 및 고찰

가열처리의 효과

Fig. 1은 buffer 및 TSB 배지의 초기 접종균수를 10^6 CFU/m*l*(small inoculum) 및 10^9 CFU/m*l*(large inoculum)으로 달리하여 60°C와 70°C에서 각각 가열처리 후 생존곡선을 나타낸 것이며, 이들 생존곡선으로부터 얻어진 D값은 Table 1과 같다. O157 균주는 buffer에서 60°C, 5~30분간 가열처리시 약 3~4 log cycles의 균수가 감소하였으며 초기 접종균수에 관계없이 균수의 감소율이 일정하였다. 70°C에서 30분간 가열처리시는 접종균수가 large inoculum 일때는 약 10^5 CFU/m*l*(99.99% kill) 정도의 균수가 생존하였으나 small inoculum 일때는 30분간의 가열처리로서 균주를 완전사멸시켰다. 이러한 결과는 *S. enteritidis*를 불활성화 하기 위해 초기 접종균수(10^3~10^8 CFU/m*l*)를 달리한 열감수성[17]과 *C. botulinum* spore의 접종균수(10^5~10^9 CFU/m*l*)에 따른 방사선 감수성의 보고[18]와 유사하였다. 그러나 TSB 배지에서의 가열처리는 70°C, 30분처리에서도 완전사멸이 되지 않아 buffer에서 보다 약간 열저항성이 증가하였다. D값은 buffer에서 처리시는 1.52~1.65분(60°C)와 1.26~1.61분(70°C)로, TSB에서는 1.52~1.68분(60°C)

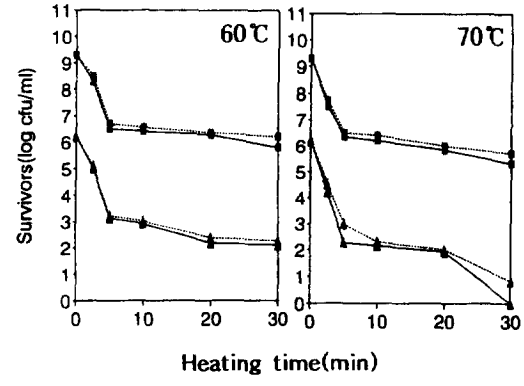

Fig. 1. Survivor curves of *Escherichia coli* O157:H7 heated at 60°C and 70°C.
▲-▲, small inoculum; ■-■, large inoculum; (—), Butterfield's phosphate buffer; (···), tryptic soy broth.

Table 1. D values of *Escherichia coli* O157:H7 heated at 60°C and 70°C in various conditions

Heating temp.	Conditions		D value (min)[1]	
			Buffer[3]	TSB[4]
60°C	Preheating (1 hr at 48°C)			
	--- with	large inoculum[2]	1.60±0.03[5a]	
		small inoculum[2]	1.28±0.01[a]	
	--- without	large inoculum	1.65±0.03[a]	1.68±0.01[a]
		small inoculum	1.52±0.01[a]	1.52±0.01[a]
	Containing L(+)-ascorbate (0.001 M)		1.59±0.01[a]	
70°C	Preheating (1 hr at 48°C)			
	--- with	large inoculum	1.56±0.02[b]	
		small inoculum	1.13±0.01[a]	
	--- without	large inoculum	1.61±0.02[b]	1.63±0.03[b]
		small inoculum	1.26±0.03[a]	1.51±0.01[a]
	Containing L(+)-ascorbate (0.001 M)		1.48±0.04[b]	

[1]D value, time in minutes required to destroy 90% of the population.
[2]Large inoculum of *E. coli* O157:H7=10^9 CFU/m*l*; small inoculum=10^6 CFU/m*l*.
[3]Butterfield's phosphate buffer (pH 7.1).
[4]Tryptic soy broth.
[5]Heat treatment D value±standard error.
[a]Determined from the least-squares regression of the logarithms of survival values from 0 to 5 min.
[b]Determined from the least-squares regression of the logarithms of survival values from 2.5 to 5 min.

와 1.51~1.63분(70°C)로 각각 나타났다(Table 1). 본 결과로 볼 때 식품에 오염된 O157 균주를 가열처리로서 살균할 때 초기균수나 그 성분조성에 따라 처리온도 및 시간을 달리할 필요가 있다고 생각된다. 한편 Schaffner 등[17]이 *Salmonella enteritidis*의 D값이 60°C에서 3.06분으로 보고한것과 비교해 보면 본 공시균주인 O157 균주는 열에 대해 매우 감수성이 높게 나타났다. Ahmed 등[19]은 meat에 오염된 *E. coli* O157:H7 균주의 D값이 60°C에서 0.38~0.55분, Kim 등[20]은 *Listeria monocytogenes*의 D값이 62°C에서 4.3~7.7분으로 각각 보고하였다.

예비열처리의 효과

가열처리전 50°C 이하의 mild 온도에서 예비열처리는 *L. monocytogenes*,[21] *S. typhimurium*,[22] *E. coli*[23] 및 *S. thompson*[24] 등의 병원성 세균들에 대해 열저항성을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 이에 본 연구에서는 60°C와 70°C에서 가열처리전 48°C에서 60분간의 예비열처리가 병원성 대장균인 O157 균주의 열저항성에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 3). 70°C에서 30분 처리시에는 약 10^1 CFU/m*l*의 균수가 생존하여 예비열처리가 없었을 경우 완전사멸된 것과 비교해 예비열처리가 O157 균주의 열저항성을 증가시켰으나 60°C에서는 효과가 없었다. D값은 60°C에서는 1.28~1.60분으로, 70°C에서는 1.13~1.56으로 나타났다(Table 1). 이와같은 결과로서 70°C 이상의 온도에서 오염된 O157 균주를 제거시에는 예비열처리가 균주의 열저항성을 증가시켜 그 제거에 방해가 됨을 알 수 있었으나 초기균수의 감소에는 도움이 되는 것으로 나타났다. 한편, Fig. 2는 예비열처리 온도인 48°C가 균주의 생존에 미치는 영향을 조사한 결과로서 180분간의 가열처리로서 1 log cycle 이내의 균수가 감소되어 균주의 생존에는 거의 영향을 미치지 못하였

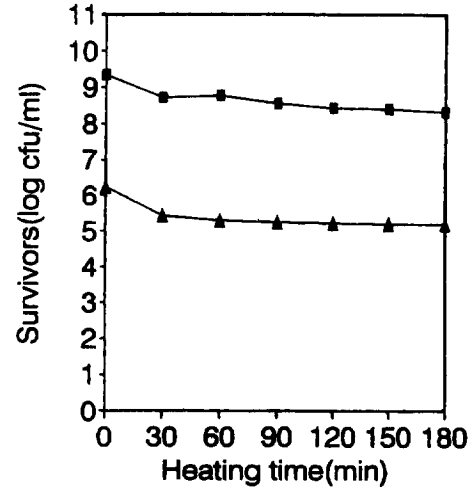

Fig. 2. Survivor curves of *Escherichia coli* O157:H7 heated at 48°C.
▲-▲, small inoculum; ■-■, large inoculum.

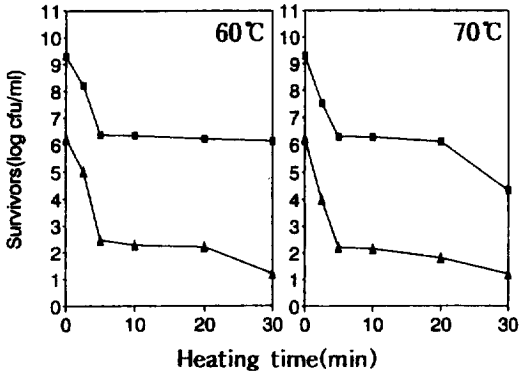

Fig. 3. Effect of preheating (1 hr at 48°C) on the survival of *Escherichia coli* O157:H7 heated at 60°C and 70°C.
▲-▲, small inoculum; ■-■, large inoculum.

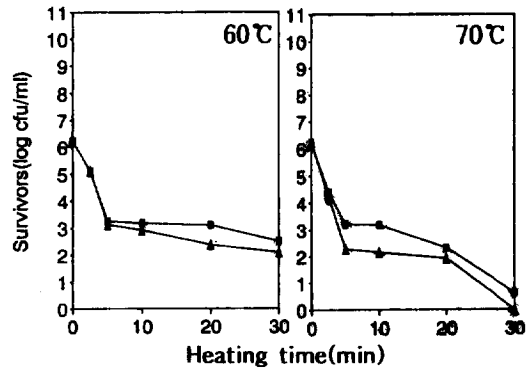

Fig. 4. Effect of heat plus L(+)-ascorbate on survival of *Escherichia coli* O157:H7. Cells were heated at 60°C and 70°C in phosphate buffer (pH 7.1) containing (■) 0.001 M L(+)-ascorbate or (▲) no additions.

다. Fedio와 Jackson[21]은 *Listeria monocytogenes*로, Tsuchido 등[23,25]은 *E. coli* K-12로 각각 예비열처리하여 균주의 열저항성을 현저히 증가시켰다.

Ascorbate 첨가효과

일반적으로 ascorbate는 육색의 안정화를 위한 목적으로 첨가되고 있으며 또한, nitrosamine 생성억제 및 antibotulinal 효과 등이 보고되고 있다.[26] 이에 본 실험은 균현탁액에 0.001 M L(+)-ascorbate를 첨가하여 가열처리 온도 및 시간에 따른 O157 균주의 불활성화 효과를 조사하였다. Ascorbate 무첨가에서는 70°C에서 30분 처리시 O157 균주가 완전히 불활성화되었으나 첨가시는 약 10^1 CFU/m*l* 정도의 균수가 생존하여 열감수성을 증가시키지 못하였다(Fig. 4). D값은 60°C에서 1.59분, 70°C에서 1.56분으로 나타났으며 이는 접종균수의 농도를 10^9 CFU/m*l*(large inoculum)로하여 ascorbate 무첨가일 경우에 비해서는 열감수성이 증가되었다(Table 1). 이상의 결과로서 ascorbate는 비교적 높은 온도(70°C)와 초기 오염균수가 적을때(small inoculum)는 균주의 저해효과가 나타나지 않음을 알 수 있었다. Mackey와 Seymour[27]는 ascorbate가 mild 온도(25~52°C)와 병용처리될 때 강한 항균활성을 나타내고 처리온도가 높을 때는 균주의 불활성화가 상승되지 않는다고 보고하였으며, Myrvik와 Volk[28] 및 Zimmerman[29]는 ascorbate 처리시 균 현탁액의 농도가 10^7 CFU/m*l* 정도가 되어야만 증식억제 혹은 살균작용에 효과적이라고 보고하였다. 본 결과를 실제 식품에 적용할 때 그 성분조성에 따라 다소 차이는 있을 수 있지만 초기 오염균수가 많을 때($10^{7\sim9}$ CFU/m*l*) ascorbate와 70°C 이하의 온도를 병용처리하면 O157 균주를 억제시킬 수 있을 것으로 생각된다. Abdul-Raouf 등[30]은 54°C에서 가열처리시 acetic, citric 및 lactic acid를 첨가하여 *E. coli* O157:H7의 감수성을 증가시켰으며, Moats 등[31]은 sodium citrate, casein과 glutathione으로 *Salmonella anatum*을 55°C에서 가열처리시 감수성을 증가시켰다.

감사의 글

본 논문은 1997년도 대구대학교 학술연구비 지원으로 한국원자력연구소와 공동으로 수행된 연구결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

국문요약

본 연구는 병원성 대장균인 O157 균주에 대해 가열처리방법을 달리하여 불활성화 효과를 조사하였다. Phosphate buffer(pH 7.1)에서 가열처리할 때 D값은 60°C에서 1.52~1.65분, 70°C에서 1.26~1.61분으로 나타났으며 tryptic soy broth에서는 60°C에서 1.52~1.68분, 70°C에서 1.51~1.63분으로 나타났다. Phosphate buffer에서 초기 접종균수를 10^6 CFU/m*l*(small inoculum)으로 하였을 경우, 70°C에서 30분간의 처리로서 균주가 완전사

멸되었다. 48°C에서 60분간 예비처리한 후 60°C에서 D값은 1.28~1.60분, 70°C에서 1.13~1.56분으로 나타나 균주의 열저항성이 증가되었다. Ascorbate(0.001 M)를 첨가할 때 접종균수가 10^9 CFU/ml(large inoculum)인 경우 균주의 억제효과가 있었으나 접종균수가 10^6 CFU/ml인 경우에는 효과가 없었다.

참고문헌

1. Gunzer, F., Bohm, H., Russmann, H., Bitzan, M., Aleksic, S. and Karch, H.: Molecular detection of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H7 in patients with hemolytic-uremic syndrome, *J. Clin. Microbiol.*, **30**, 1807-1810 (1992).
2. Wells, J.G., Davis, B.R., Wachsmuth, I.K., Riley, L.W., Remis, R.S., Sokow, R. and Morris, G.K.: Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype, *J. Clin. Microbiol.*, **18**, 289-302 (1993).
3. Pudden, D., Tuttle, N., Korn, D., Carlson, J., Carter, A. and Hockin, J.: Hemorrhagic colitis in a nursing home-Ontario, *Can. Dis. Weekly Rep.*, **11**, 169-170 (1985).
4. Padhye, N.V. and Doyle, M.P.: Rapid procedure for detecting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in food, *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 2693-2698 (1991).
5. Kim, M.S. and Doyle, M.P.: Dipstick immunoassay to detect enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in retail ground beef, *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 1764-1767 (1992).
6. Farmer, J.J. and Davis, B.R.: H7 antiserum-sorbitol fermentation medium: a single tube screening medium for detecting *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis, *J. Clin. Microbiol.*, **22**, 620-635 (1985).
7. March, S.B. and Ratnam, S.: Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis, *J. Clin. Microbiol.*, **23**, 869-872 (1986).
8. Thompson, J.S., Hodge, D.S. and Borczyk, A.A.: Rapid biochemical test to identify verotoxin-positive strains of *Escherichia coli* serotype O157, *J. Clin. Microbiol.*, **28**, 2165-2168 (1990).
9. Pai, C.H., Kelly, J.K. and Meyers, G.L.: Experimental infection in infant rabbits with verotoxin-producing *Escherichia coli*, *Infect. Immun.*, **51**, 16-23 (1986).
10. Xin-He, L., Xu, J. and Lin, B.: Experimental infection of specific-pathogen-free mice with enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, *Microbiol. Immunol.*, **35**, 301-310 (1991).
11. Ratnam S., March, S.B., Ahmed, R., Bezanson, G.S. and Kasatiya, S.: Characterization of *Escherichia coli* serotype O157:H7, *J. Clin. Microbiol.*, **26**, 2006-2012 (1988).
12. Francis, D.H., Collins, J.E. and Duimstra, J.R.: Infection of gnotobiotic pigs with an *Escherichia coli* O157:H7 strain associated with an outbreak of hemorrhagic colitis, *Infect. Immun.*, **51**, 953-956 (1986).
13. Dickson, J.S.: Control of *Salmonella typhimurium, Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 on beef in a model spray chilling system, *J. Food Sci.*, **56**, 191-193 (1991).
14. Doyle, M.P.: *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods, *Int. J. Food Microbiol.*, **12**, 289-302 (1991).
15. Okrend, A.J.G., Rose, B.E. and Bennett, B.: A screening method for the isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from ground beef, *J. Food Protect.*, **53**, 249-252 (1990).
16. Bradshaw, J.G., Peeler, J.T., Corwin, J.J., Hunt, J.M., Tierney, E.P., Larkin, E.P. and Twedt, R.M.: Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in milk, *J. Food Protect.*, **48**, 743-745 (1985).
17. International Atomic Energy Agency(IAEA): Training manual on food irradiation technology and techniques, 2nd ed., IAEA, Vienna, p.49 (1982).
18. Schaffner, D.F., Hamdy, M.K., Toledo, R.T. and Tift, M. L.: *Salmonella* inactivation in liquid whole egg by thermoradiation, *J. Food Sci.*, **54**, 902-905 (1989).
19. Ahmed, N.M., Conner, D.E. and Huffman, D.L.: Heat-resistence *Escherichia coli* O157:H7 in meat and poultry as affected by product composition, *J. Food Sci.*, **60**, 606-610 (1995).
20. Kim, K.T., Murano, E.A. and Olson, D.G.: Heating and storage conditions affect survival and recovery of *Listeria monocytogenes* in ground pork, *J. Food Sci.*, **59**, 30-32 (1994).
21. Fedio, W.M. and Jackson, H.: Effect of tempering on the heat resistance of *Listeria monocytogenes, Lett. Appl. Microbiol.*, **9**, 157-160 (1989).
22. Mackey, B.M. and Derrick, C.M.: The effect of prior heat shock on the thermoresistance of *Salmonella thompson* in foods, *Lett. Appl. Microbiol.*, **5**, 115-118 (1987).
23. Tsuchido, T., Takano, M. and Shibasaki, I.: Effect of temperature-elevating process on the subsequent isothermal death of *Escherichia coli* K-12, *J. Ferment. Technol.*, **52**, 788-792 (1974).
24. Mackey, B.M. and Derrick, C.M.: Changes in the heat resistance of *Salmonella typhimurium* during heating at

rising temperatures, *Lett. Appl. Microbiol.*, **4**, 13-16 (1987).
25. Tsuchido, T., Hayashi, M., Takano, M. and Shibasaki, I.: Alteration of thermal resistance of microorganisms in a non-isothermal heating process, *J. Antibacterial Antifungal Agents*, **10**, 105-109 (1982).
26. Morgan, A.R., Cone, R.L. and Elgert, T.M.: The mechanism of DNA strand breakage by vitamin C and superoxide and the protective roles of catalase and superoxide dismutase, *Nucleic Acids Research*, **3**, 1139-1149 (1976).
27. Mackey, B.M. and Seymour, D.A.: The bactericidal effect of isoascorbic acid combined with mild heat, *J. Appl. Bacteriology*, **67**, 629-638 (1989).
28. Myrvik, Q.N. and Volk, W.A.: Comparative study of the antibacterial properties of ascorbic acid and reductogenic compounds, *J. Bacteriol.*, **68**, 622-626 (1954).
29. Zimmerman, L.: Toxicity of copper and ascorbic acid to *Serratia marcescens*, *J. Bacteriol.*, **91**, 1537-1542 (1966).
30. Abdul-Raouf, U.M., Beuchat, L.R. and Ammar, M.S.: Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ground, roasted beef as affected by pH, acidulants, and temperature, *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 2364-2368 (1993).
31. Moats, W.A., Dabbah, R. and Edwards, V.M.: Survival of *Salmonella anatum* heated in various media, *Appl. Microbiol.*, **21**, 476-481 (1971).