J. Fd Hyg. Safety 13(3), 294 - 298(1998)

감마선 조사에 의한 우육오염 포자세균의 제거

김 성 · 육홍선 · 최 청* · 김정옥** · 변명우†

*한국원자력연구소 방사선식품공학연구실, *영남대학교 식품가공학과, **세종대학교 가정학과*

Elimination of Spore Bacteria in Beef by Gamma Irradiation

Sung Kim, Hong-Sun Yook, Cheong Choi*, Jeung-Ok Kim and Myung-Woo Byun†**

Dept. of Food Irradiation, Korea Atomic Energy Research Institute, Taejeon 305-600, Korea

**Dept. of Food Science and Technology, Yeungnam University, Kyeongsan 712-749, Korea*

***Department of Home Economics, King Sejong University, Seoul 133-747, Korea*

ABSTRACT — The effect of gamma irradiation on the survival of spore bacteria was investigated in frozen cells (-18°C) with 0.1 M phosphate buffer and inoculated cells in beef. In the case of the frozen cells at log phase, the radiation D_{10} and $12D_{10}$ values were 0.29 kGy and 3.48 kGy in *Bacillus subtilis*, 0.39 kGy and 4.68 kGy in *Bacillus cereus* and 0.46 kGy and 5.52 kGy in *Clostridium perfrigens*. And inactivation factors were 6.52~10.34 and 10.87~17.24 at the dosage of 3 kGy and 5 kGy, respectively. The radiosensitivity of inoculated cells in beef showed the D_{10} value of 0.59~0.76 kGy, the $12D_{10}$ value of 7.08~9.12 kGy, and inactivation factors of 3.95~8.47. The radiosensitivity of the frozen cells was higher than that of inoculated cells in beef.

Key words □ *Bacillus subtilis, Bacillus cereus, Clostridium perfrigens*, Beef, Gamma irradiation, Radiosensitivity

*B. subtilis, B. cereus*와 *C. perfrigens*는 endospore를 형성하는 것이 특징이며, 이들 포자는 열처리,[1,2] 항산화제 처리,[3] 이온화 방사선 조사[4] 및 병용처리[5] 등에 저항력이 대단히 강하고 특히 식품의 열처리시 여러가지 문제점을 일으킨다. *Bacillus* spp.의 포자 병원균은 호냉성, 호열성균들이 있고, 강력한 단백질 및 전분질 분해력이 있어 식품의 부패에 관여하며, *B. cereus*는 최저 7°C의 낮은 온도에서도 저장유통시 성장을 계속 유지하는 저온성 미생물로 간주되고 있는데 이는 식품의 cold chain 유통시 일정한 저장온도를 유지하지 않기 때문이다.[6,7] 이러한 포자형성 병원균은 대부분의 식품중 가금류, 육류 및 그 가공품, 곡류, 어패류, 유류 및 유제품 등에 많이 존재하며,[8-12] 육류 및 육류 가공품과 가금육에서 증식하여 식중독을 유발시키는 enterotoxin을 생산한다.[13-17] *C. perfrigens*에 의해 생성된 독소는 오염된 음식물 섭취와 독소의 소화관 내벽에서 흡착으로 인해 발생되며, 특히 이들 포자 병원성균은 육류를 가공하는데 이용되는 온도에서 생존할 수 있으며 건조, 가열 등에 아주 강한 내성을 나타내어 외부환경이 적절하면 다시 발아하여 영양세포로 된다. 따라서 식중독의 주요 발생원인은 적절히 조리된 식품의 냉장 실패와 대용량으로 조리된 식품에서 흔히 발견되며, 특히 육류와 가금류의 생식품에 있는 포자는 조리시에도 생존하여 식품이 냉장온도 이상에서 유지된다면 생장과 복제가 일어나기 시작한다. 포자 형성 세균의 주요 오염원은 상업적인 생산품에서 전반적으로 병원균의 수가 특별히 높고 포장기에 넣어야 하는 매우 열악한 주입 환경위생과 그 고객 및 규제하는 검사자들 때문이다. 그래서 날고기의 포자 생성균이 높게 오염된 경우 HACCP-type 프로그램의 마지막 '확실한 안전성' 처리로 냉동처리 방법인 감마선 조사는 매우 효과적인 것으로 알려져 있다.[18-21]

본 연구는 쇠고기의 안전 저장 및 유통기반을 확립하기 위하여 일반적으로 방사선 저항성이 매우 높다고 알려진 호기성의 *Bacillus subtilis*와 *Bacillus cereus* 및 혐기성인 *Clostridium perfrigens*의 포자세균에 대한 감마선을 조사하여 그들의 방사선 감수성을 시험하였다.

† Author to whom correspondence should be addressed.

재료 및 방법

공시균주 및 배지

시험에 사용된 균주는 한국미생물보존센터로 부터 구입한 포자 병원성균인 *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* KCCM 40133 및 *Clostridium perfringens* ATCC 13124를 사용하였다. 배지로는 Nutrient broth(NB, Difco)와 nutrient agar(NA, Difco)를 사용하였다.

배양시간별 균체증식

공시균주를 각각 사면배지에 수회 계대배양 후 동일한 액체배지 10 m*l*에 1백금이를 접종한 후 30~37°C에서 24시간 진탕배양(150 rpm)하여 활성화하였다. 활성화된 배양액 1 m*l*를 새로운 액체배지 100 m*l*에 접종하여 30~37°C에서 진탕배양하면서 배양시간별로 1 m*l*를 무균적으로 채취하여 Butterfield's phosphate buffer(0.1 M KH_2PO_4 adjusted to pH 7.2 with NaOH, 이하 buffer)로 희석하고 평판배지에 0.1 m*l*를 평판도말하여 생성된 colony의 수로 균체 증식을 조사하였다.

균주의 배양과 현탁액의 조제

공시균주를 각각의 사면배지에 24시간 수회 계대배양 후 이것을 동일한 액체배지 100 m*l*에 1 백금이를 접종하여 *B. subtilis*와 *B. cereus*는 30°C에서 20시간 진탕배양(150 rpm)하였으며, *C. perfringens*는 37°C에서 gaspak jar에서 혐기배양하였다. 배양한 현탁액 1 m*l*를 새로운 액체배지 100 m*l*에 접종하고 8시간 진탕배양시켜 대수기의 세포를 얻었다. 이 세포 현탁액을 Johnson 등[22]의 방법에 의해 4°C에서 10분간 원심분리(9,000×g)하여 얻은 포자를 멸균된 냉 buffer로 3회 세척, 원심분리하여 포자의 최종 농도가 10^7~10^9 CFU/m*l*가 되도록 조절하여 사용하였으며 포자현탁액은 동결세포(-18°C)와 우육접종 실험에 사용하였다.

우육의 균 접종 및 방사선 조사

시험에 사용된 시료는 도체 후 24시간 경과된 우육(bovine. M. *Semitendinosus*, 80% 살코기)로 대전지역 도축장에서 구입한 후 50±0.05 g씩 분할하였다. 분할된 시료는 stomacher 400(Tekmar Co., Cincinnati, OH) polyethylene bag에 넣어 함기포장한 후 10 kGy 선량의 감마선을 조사하였다. 살균된 시료는 clean bench내에서 각 시료 무게당 1% (10^7~10^9 CFU/m*l*) 첨가량의 균주를 접종하였다. 감마선 조사는 포자 현탁액의 경우 5.0 m*l*를 멸균시험관(1.0×10 cm)에 넣고 -18°C에서 10시간 동결하여 그 온도를 유지하면서 방사선 조사를 실시하였고, 또한 우육에 균주를 접종한 시료는 실온 상태에서 방사선 조사를 실시하였다. 방사선 조사는 선원 10만 Ci, ^{60}Co 감마선 조사시설을 이용하여 분당 25 Gy의 선량율로 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 및 3.0 kGy의 흡수선량을 얻도록 하였으며, 흡수선량 확인은 ceric cerous dosimeter(USA)를 사용하였고 흡수선량 오차는 ±2 Gy였다.

미생물 생육시험

감마선 조사 후 동결된 포자 현탁액은 실온에서 해동하고 buffer로 희석하였으며, 균주접종 후 감마선 조사된 우육은 clean bench내에서 멸균 해부칼로 4등분하여 각 절편의 중앙에 1 cm^2 공간크기의 멸균된 stainless templet를 놓고 loop로 육의 표면을 긁어 모은 후 다시 면봉으로 닦아내어 (scraping & swabbing method) 동일 buffer 용액 10 m*l*가 들어있는 시험관에 넣어 voltex mixer로 1분간 균질화한 후 동일 buffer로 적절히 희석하였다. 희석된 각 시험액은 NA 평판배지를 이용하여 30°C에서 24시간 배양하였으며, *C. perfringens*는 37°C에서 gaspak jar에서 혐기배양하였다. 배양후 30~300개의 colony가 나타난 각각 희석배수의 3개 평판상의 CFU를 평균하였다. Colony count는 Micro Count™ (IPI. Imaging products, International Inc.)를 이용하였다.

통계분석

공시균주의 포자에 대한 감수성은 CFU/g의 대수로서 나타내었다. 각 시험구의 희석배수 3개 평판계수에 대한 평균(N) CFU 값은 3번의 제로선량 평균값(N_0)으로 나누어 생존균수값은 N/N_0로 나타내었다. $\log_{10}$ 생존균수값($\log_{10} N/N_0$)은 그 이후 계산을 위해 사용하였으며 D_{10}값(90% 생존포자 균수의 감소를 나타내는 kGy선량)은 log 생균수값의 직선 회귀의 역 기울기로 나타내었다.

결과 및 고찰

배양시간별 균체 증식

공시균주의 배양시간별 증식양상은 Fig. 1과 같다. *B. subtilis, B. cereus* 및 *C. perfrigens*는 배양 6시간 이후부터 균수가 약 10^8 CFU/m*l* 정도로 급격히 증가하여 18시간대에 최대균수를 나타내었다. 본 결과로 세 균주의 대수기는 12시간, 정지기는 18시간으로 하였고 후기 대수기의 포자를 다음 실험에 적용하였다.

동결균체의 방사선 감수성

포자형성 균주들의 동결세포에 대한 방사선의 감수성은 Fig. 2의 생존곡선과 이들 생존 곡선으로 부터 D_{10} 및 $12D_{10}$ 값과 2와 3 kGy에서의 불활성화 계수(n)를 계산하여 Table

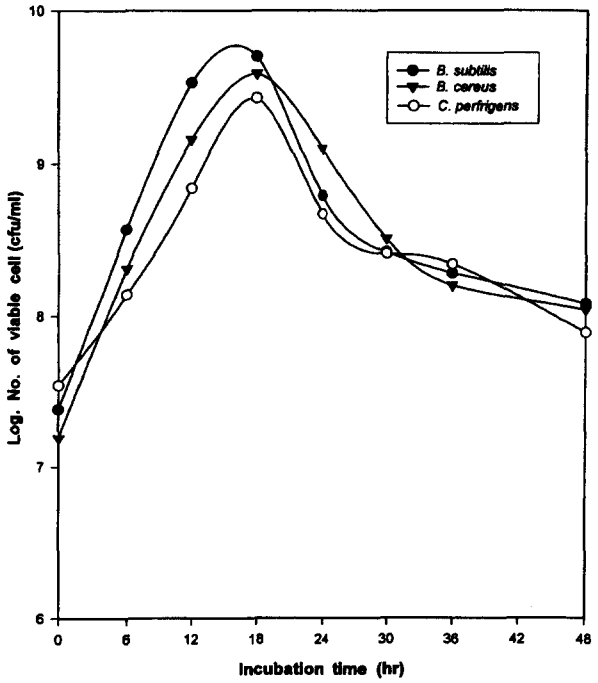

Fig. 1. Cell growth curves of spore forming bacteria according to cultivation time at 30~37°C in medium.

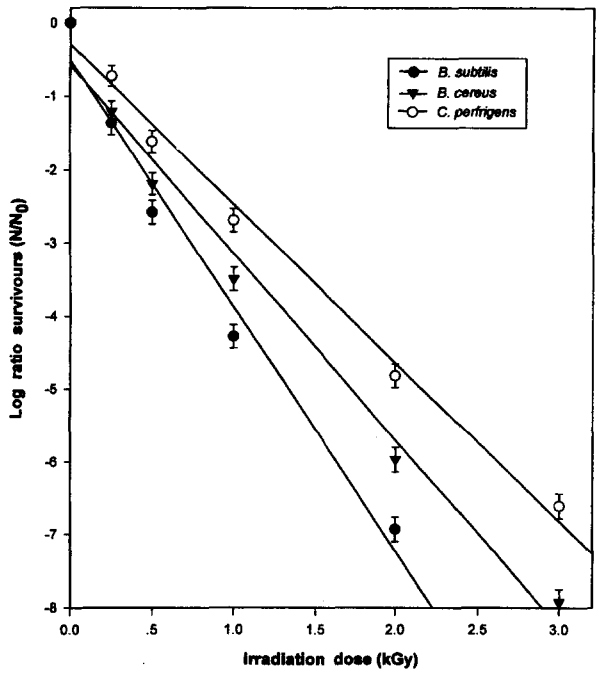

Fig. 2. Radiation survival curves of freezed *B. subtilis*, *B. cereus* and *C. perfrigens* cells in phosphate buffer.

1과 같은 결과를 얻었다. D_{10} 값으로 나타낸 방사선 감수성은 *B. subtilis*가 0.29 kGy, *B. cereus*가 0.46 kGy 및 *C. perfringens*는 0.39 kGy이었으며, 포자를 완전 살균하는데 3~5 kGy 내외의 선량이 요구되었다. 불활성화 계수에 있어서 포자는 3 kGy의 선량으로 6~10 log cycles 정도로 균수를 감소시킬 수 있으며 5 kGy의 조사로 10~17 log cycles 정도의 균수가 감소될 것으로 예상된다.

우육에 접종된 균주의 방사선 감수성

B. subtilis, B. cereus 및 *C. perfringens* 균주를 우육에 접종하고 감마선 조사 후 이들의 생존곡선(Fig. 3)과 이들 생존 곡선으로 부터 D_{10} 및 $12D_{10}$ 값과 3, 5 및 7 kGy에서의 불활성화 계수(n)를 계산한 결과는 Table 2와 같다. *B. subtilis, B. cereus* 및 *C. perfringens*의 유도선량은 Fig. 3에서 보는 바와 같이 무시될 정도였고, D_{10} 값으로 나타낸 방사선 감수성은 *B. subtilis*는 0.59 kGy, *B. cereus*는 0.63 kGy 및 *C. perfringens*는 0.76 kGy이었으며 이들 포자를 완전 살균하는데 7~9 kGy 내외의 높은 선량이 요구되었다.

Table 1. Radiosensitivities of spore froming bacteria at freezed cell (10^8~10^9 CFU/g)

Strain	Growth phase	D_{10} value (kGy)	$12D_{10}$ value (kGy)	Inactivation factor			
				2 kGy	3 kGy	5 kGy	7 kGy
B. subtilis	Log. phase	0.29	3.48	6.90	10.34	17.24	24.14
B. cereus	Log. phase	0.39	4.68	5.13	7.70	12.82	17.95
C. perfrigens	Log. phase	0.46	5.52	4.35	6.52	10.87	15.22

Table 2. Radiosensitivities of spore froming bacteria contaminated beef (10^8~10^9 CFU/g)

Strain	Growth phase	D_{10} value (kGy)	$12D_{10}$ value (kGy)	Inactivation factor			
				2 kGy	3 kGy	5 kGy	7 kGy
B. subtilis	Log. phase	0.59	7.08	3.39	5.08	8.47	11.86
B. cereus	Log. phase	0.63	7.56	3.17	4.76	7.94	11.11
C. perfrigens	Log. phase	0.76	9.12	2.63	3.95	6.58	9.21

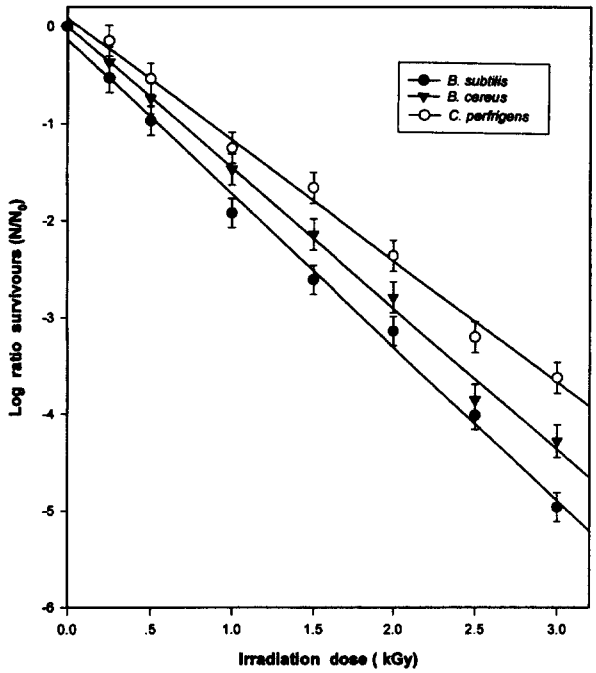

Fig. 3. Radiation survival curves of freezed *B. subtilis*, *B. cereus* and *C. perfrigens* contaminated beef.

본 실험에서 *B. cereus*의 우육 접종시 3 kGy에서 불활성화 계수는 4.76로서 Thayer 등[23]의 조사 전 살균된 우육에 정지기 상태의 *B. cereus*를 접종하여 3 kGy 조사했을 때 -20°C는 4.20 log units로 유사한 결과를 나타났으나, 20°C는 5.72 log unit의 감소를 보여 본 실험과는 약 2 log unit의 차이를 나타냈다. Grant 등[24]은 10^6 CFU/g으로 접종된 로스트 비프와 고깃국물에 2 kGy의 감마선 조사를 했을 때 *B. cereus*의 수가 3~4 log가 감소되었다는 보고와도 유사한 결과를 나타내었다. *C. perfrigens* 경우 우육에 접종한 경우와 동결균체에서의 D_{10} 값은 각각 0.76 kGy과 0.46 kGy로 Grant 등[25]이 보고한 3~4°C의 로스트 비프에서 조사된 *C. perfrigens*의 대수기 생장세포에 대한 D_{10} 값은 0.58 kGy라고 보고한 것과 약간의 차이를 나타내었다. 이는 균 접종시료의 차이와 감마선 조사시 온도에 대한 세포의 영향인것으로 추측된다. 또한 포자균주들의 동결균체와 우육에 접종된 균체들의 조사에 따른 영향은 동결균체에 있어서는 *B. subtilis*가 2.0 kGy에서 1.8×101 CFU/g, *B. cereus*가 3.0 kGy에서 2.0×10^2 CFU/g, *C. perfrigens*가 3.0 kGy에서 6.0×10^1 CFU/g인데 비해 우육에서는 각각 3.0 kGy에서 1.4×10^3 CFU/g, 7.0×10^1 CFU/g, 3.8×10^3 CFU/g 생존한 것과 비교해 볼 때 동결균체에서 방사선 감수성이 더 높게 나타났다. 이러한 결과는 세포자체를 -18°C로 동결하는 과정에서 포자형성균의 세포막에 영향을 미친 것으로 생각된다. 본 실험의 결과로 볼 때 우육에 오염된 포자세균은 3.0 kGy 이상의 선량으로 세균수를 억제할 수 있을 것으로 생각된다. 불활성화 계수에 있어서 포자는 3 kGy의 선량으로 3~5 log cycles 정도로 균수를 감소시킬수 있으므로, 7 kGy의 조사로 9~11 log cycles 정도의 균수가 감소될 것으로 생각된다. 이러한 결과는 국제적으로 건전성이 공인된 10 kGy 이내의 조사선량에서 포자형성균의 완전 살균은 불가능함으로서 낮은 조사선량으로 살균할 수 있는 효과적인 방법, 즉 미생물의 방사선 감수성을 증가시키는 방법의 모색이 필요하다고 하겠다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부의 1998년도 원자력연구개발사업의 일환으로 수행되었으며 이 지원에 감사드립니다.

국문요약

포자형성 세균인 *Bacillus subtilis, Bacillus cereus* 및 *Clostridium perfrigens*의 -18°C 동결균체와 우육에 접종한 균체의 감마선 조사에 의한 방사선 감수성을 조사하였다. 동결균체의 D_{10}과 $12D_{10}$ 값으로 나타낸 방사선 감수성은 *Bacillus subtilis*가 0.29 kGy와 3.48 kGy, *Bacillus cereus*가 0.39 kGy와 4.68 kGy, *Clostridium perfrigens*가 0.46 kGy와 5.52 kGy를 나타 내었으며, 3 kGy와 5 kGy에서의 불활성화계수는 6.52~10.34 및 10.87과 17.24였다. 이에 반해 우육에 접종시킨 균체는 D_{10}값이 0.59~0.76 kGy, $12D_{10}$값은 7.08~9.12 kGy, 불활성화계수는 3.95~8.47 범위로 동결균체에 비해 방사선 감수성이 낮음을 알 수 있었다.

참고문헌

1. Condon, S. and Sala, F.J.: Heat resistance of *Bacillus subtilis* in buffer and foods of different pH. *J. Food Prot.*, **55**, 605-608 (1992).
2. Wescott, T.M., Fairchild, T.M. and Foegeding, P.M.: *Bacillus cereus* and *Bacillus stearothermophilus* spore inactivation in batch and continuous flow system. *J. Food Sci.*, **60**, 446-450 (1995).
3. Al-Jalay, B., Blank, G., McConell, B. and Al-Khayat, M.: Antioxidant activity of selected spices used in fermented meat sausage. *J. Food Prot.*, **50**, 25-27 (1987).
4. Niemand, J.G., Van der Linde, H.J. and Holzapfel, W.H.: Radurization of prime beef cuts. *J. Food Prot.*, **44**, 677-682 (1981).
5. Matsuyama, A., Thornley, M.J., and Ingram, M.: The effect of freezing on the radiation sensitivity of vegetative bacteria. *J. Appl. Bacteriol.*, **27**, 110-117 (1964).
6. Meer, R.R., Baker, J., Bodyfelt, F.W. and Griffiths, M. W.: Psychrotrophic *Bacillus* spp. in fluid milk products: a review. *J. Food Prot.*, **54**, 969-979 (1991).
7. Turner, B.E., Foegeding, P.M., Larick, D.K. and Murphy, A.H.: Control of *Bacillus cereus* spores and spoilage microflora in sous vide chicken breast. *J. Food Sci.*, **61**, 217-219 (1996).
8. Kamer, J.M. and Gilbert, R.J.: *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In: Doyle, M.P. (Ed.) Foodborne bacterial pathogens. Marcel Dekker, New York, 191-234 (1989).
9. Harmon, S.M. and Kautter, D.A.: Incidence and growth potential of *Bacillus cereus* in ready-to-serve foods. *J. Food Prot.*, **54**, 372-374 (1991).
10. Greenberg, R.A., Tompkin, R.B., Bladel, B.O., Kittaka, R.S. and Anellis, A.: Incidence of mesophilic *Clostridium* spores in raw pork, beef and chicken in processing plants in the United States and Canada. *Appl. Microbiol.*, **14**, 789-793 (1966).
11. Kreiger, R.A., Snyder, O.P. and Pflug, I.J.: *Clostridium botulinum* ionizing radiation D-value determination using a micro food sample system. *J. Food Sci.*, **48**, 141-145 (1983).
12. Franklin, J.G.: Spores in milk: problems associated with UHT processing. *J. Appl. Bacteriol.*, **33**, 180-191 (1970).
13. Lund, B.M.: Foodborne disease due to *Bacillus* and *Clostridium* species. In: Waites, W.M. and Arbuthnott, J.P. (eds.): Foodborne illness pp. 86-96. Hodder and Stoughton, London, (1991).
14. Greenberg, R.A., Tompkin, R.B., Bladel, B.O., Kittaka, R.S., and Anellis, A.: Incidence of mesophilic *Clostridium* spores in raw pork, beef and chicken in processing plants in the United States and Canada. *Appl. Microbiol.*, **14**, 789-793 (1996).
15. Schmidt, C.F., Lechowich, R.V., Folinazzo, J.F.: Growth and toxin production by Type E *Clostridium botulinum* below 400F. *J. Food Sci.*, **26**, 626-630 (1961).
16. Sooltan, J.R.A., Mead, G.C. and Norris, A.P.: Incidence and growth potential of *Bacillus cereus* in poultry meat products. *Food Microbiol.*, **4**, 347-351 (1987).
17. van Netten, P., van de Moosdijk, A., van Hoensel, P., Mossel, D.A.A. and Perales, I.: Psychrotrophic strains of *Bacillus cereus* producing enterotoxin. *J. Appl. Bacterol.*, **69**, 73-79 (1990).
18. Lucke, F.K. and Roberts, T.A.: *Botulinum* control in meat products. In: Hauschild, A. and Dodds, K. (eds.) *Clostridium botulinum*: Ecology and Control in Foods Marcel Dekker, Inc., Amsterdam, New York, (1993).
19. Tisler, J.M.: The food and drug administration's perspective on HACCP. *Food Technol.*, **45**, 125-127 (1991).
20. Beard III, T.D.: HACCP and the home-The need for consumer education. *Food Technol.*, **45**, 119-123 (1991).
21. Tompkin, R.B.: The use of HACCP in the production of meat and poultry products. *J. Food Protect.*, **53**, 795-782 (1990).
22. Johnson, K.M., Nelson, C. and Busta, F.F.: Germination and heat resistance of *Bacillus cereus* from strains associated with diarrheal and emetic food-borne illness. *J. Food Sci.*, **47**, 1268-1271 (1982).
23. Thayer, D.W. and Boyd, G.: Control of enterotoxic *Bacillus cereus* on poultry or red meats and in beef gravy by gamma irradiation. *J. Food Prot.*, **57**, 758-764 (1994).
24. Grant, I.R. and Nixon, C.R.: Patterson, M.F., Effect of low-dose irradiation on growth of and toxin production by *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* in roast beef and gravy. *Int. J. Food Microbiol.*, **18**, 25-36 (1993).
25. Grant, I.R. and Patterson, M.F.: Sensitivity of foodborne pathogens to irradiationin the components of a chilled ready meal. *Food Microbiol.*, **9**, 95-103 (1992).