J. Fd Hyg. Safety 13(4), 365 - 369(1998)

Trisodium phosphate와 Cetylpyridinium chloride의 *E. coli* O157:H7 및 *Listeria monocytogenes*에 대한 살균 작용

강길진†
식품의약품안전청, 광주지방청

Effects of Trisodium Phosphate and Cetylpyridinium Chloride on *E. coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*

Kil-Jin Kang†
Korea Food & Drug Administration, Kwangju 506-050, Korea

ABSTRACT — The *in vitro* effects of trisodium phosphate and cetylpyridinium chloride on *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes* were investigated. The trisodium phosphate and cetylpyridinium chloride was bactericidal toward *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes*. The killing effects of the 1×10^{-2} M trisodium phosphate on *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes* were 30~40%, 40~50%, respectively. The killing effects of the 5×10^{-7} M cetylpyridinium chloride on *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes* were 90~95%, 95~99%, respectively. The killing effects of the trisodium phosphate was 10^5 times that of the cetylpyridinium chloride. Factors effecting the bactericidal action of trisodium phosphate and cetylpyridinium chloride were investigated and the action depended on temperature and pH.

Key words □ Trisodium phosphate, Cetylpyridinium chloride, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, Bactericidal action

식품의 안전성과 shelf life를 높이기 위해서는 식품을 가공하는 동안 미생물의 오염을 방지하는 것이 매우 중요하다. 특히, 최종적으로 이용하는 사람에 의한 미숙한 조작(부적정한 온도 조작, 조리의 불충분 등)은 식품 기원 질병을 유발하는 facter를 제공한다.[1]

식품류(식육 등)의 미생물 오염방지를 위하여 화학적 처리법이 사용되고 있는데, 닭고기에 10% trisodium phosphate의 처리는 살모넬라균과 캠필로백터균의 균수를 감소시킨다고 하였다.[2,3] Trisodium phosphate(TSP, Na_3PO_4)는 미국 FDA에서 식품첨가물로서 GRAS(generally recognized as safe)로 분류하였으며, USDA에서는 가금류의 가공에 사용을 허용하고 있다.[4,5] 가금류에 항미생물제로서 TSP는 자주 이용되고 있으나 그 보다 살균작용이 뛰어난 cetylpyridinium chloride에 대한 연구는 미비하다. Cetylpyridinium chloride(CPC, 1-hexadecyl pyridinium chloride, $C_{21}H_{38}NCl$)는 4원소 암모늄화합물로서 구강청결제로 사용되고 있으며 살모넬라균에 대하여 살균작용이 있는 것으로 보고되어 있다.[6-8]

† Author to whom correspondence should be addressed.

TSP와 CPC는 주로 살모넬라균에 대한 연구[2,6-8,14,15]가 대부분이며 *E. coli* O157:H7과 *L. monocytogenes*에 대한 연구는 거의 없다. *E. coli* O157:H7과 *L. monocytogenes*는 식품에 의해 전염되는 식품 질환성 병원성균으로서 전 세계적으로 퍼져 있는 식중독균이다. *E. coli* O157:H7는 동물기원 식품과 관련된 병원균으로 설정되어 있으며,[9] 또한, *L. monocytogenes*도 최근 식품산업과 깊은 관련이 병원균으로 부상되고 있다.[10] *E. coli* O157:H7은 verotoxin을 생산하고 용혈성 요독증, 출혈성 장염 및 심부전증 등을 유발하며,[9,11] *L. monocytogenes*는 임산부의 유산, 패혈증, 수막염 등을 유발하는 식중독균이다.[12]

따라서 본 연구에서는 TSP와 CPC의 *E. coli* O157:H7과 *L. monocytogenes*에 대한 살균작용에 대하여 검토하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 시약

실험에 사용한 균주는 국립보건원에서 분양 받은 *E. coli* O157:H7(ATCC 43890)과 *L. monocytogenes*(ATCC 15313)

를 사용하였다.

Trisodium phosphate(TSP)와 cetylpyridinium chloride(CPC)는 Sigma사 제품을 사용하였다.

균 배양과 현탁액의 조제

균주를 tryptic soy agar(Difco사) 배지에 3회 계대 배양후 tryptic soy broth(Difco사) 100 m*l*에 1백금이 접종하여 35°C에서 24시간 진탕 배양(180 rpm)한 다음 균현탁액 1 m*l*를 다시 tryptic soy broth 100 m*l*에 접종하고 진탕 배양하여 대수증식기의 세포 현탁액을 실험에 사용하였다.

TSP와 CPC의 살균력 측정

E. coli O157:H7과 *L. monocytogenes*의 살균력 측정은 20 mM tris-HCl buffer(pH 7.4)로 균량을 $1\sim4\times10^7$ CFU/m*l*로 한 다음 각 농도의 TSP와 CPC를 혼합하여 37°C에서 30분간 반응 시켜 반응액 1 m*l*를 취하여 냉희석액으로 100배 희석하여 반응을 정지시키고 이 액에 대하여 생균수를 측정하여 살균정도를 측정하였다. 이때 희석액의 조성은 KH_2PO_4 1.35%, $NaHPO_4 \cdot 12H_2O$ 3.65%, NaCl 1%, gelatin 0.003%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.025%(pH 7.0)으로 하였다.[13]

결과 및 고찰

TSP와 CPC의 살균작용

E. coli O157:H7과 *L. monocytogenes*에 대한 TSP와 CPC의 살균작용을 검토한 결과는 Table 1과 같다. TSP와 CPC을 각 농도별로 첨가하여 *E. coli* O157:H7과 *L. monocytogenes*을 함께 37°C에서 30분간 반응시켰을 때의 생존율로서 살균작용을 조사하였다.

Table 1. The bactericidal action of trisodium phosphate and cetylpyridinium chloride on *E. coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*

Concn. (M)	Survival (%)	
	E. coli O157:H7	*Listeria monocytogenes*
Trisodium phosphate		
5×10^{-2}	10~30	10~30
1×10^{-2}	60~70	50~60
3×10^{-3}	90~100	90~100
1×10^{-3}	100	100
Cetylpyridinium chloride		
5×10^{-6}	0	0
1×10^{-6}	0~1	0~1
5×10^{-7}	5~10	1~5
1×10^{-7}	50~70	40~60

E. coli O157:H7 and *Listeria monocytogenes* ($1\sim4\times10^7$ CFU/m*l*) were incubated with trisodium phosphate and cetylpyridinium chloride in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) for 30 min at 37°C. The survival of the control without the reagent is represented as 100%. The values are the range of variation in three experiments.

TSP는 5×10^{-2} M 농도에서 *E. coli* O157:H7과 *L. monocytogenes*에 대하여 10~30%의 생존율을 보여 70~90%의 살균효과를 보였으며, 1×10^{-2} M 농도에서도 각각 30~40%, 40~50%의 살균 효과를 보였다. 그리고 3×10^{-3} M 농도에서는 거의 사멸되지 않았다. 살모넬라균과 캠필로박터균은 TSP 10% 농도에서 사멸되는 것으로 알려져 있는데,[2,3] 이것은 *E. coli* O157:H7과 *L. monocytogenes*가 5×10^{-2} M에서 사멸되는 것과 비교하면 약 5배나 더 높은 농도였다.

CPC는 5×10^{-7} M 농도에서 *E. coli* O157:H7에 대한 생존율이 5~10%, *L. monocytogenes*에 대한 생존율이 1~5%을 보여 각각 90~95%, 95~99%의 살균효과를 보였다. 그리고 1×10^{-7} M 농도에서는 각각 50~70%, 40~60%의 생존율을 보였다. *E. coli* O157:H7는 *L. monocytogenes*에 비하여 CPC에 대한 저항력이 10% 정도 강하였다.

TSP와 CPC는 *E. coli* O157:H7과 *L. monocytogenes*에 대하여 농도의 차이는 있으나 모두 살균 효과를 보였으며,

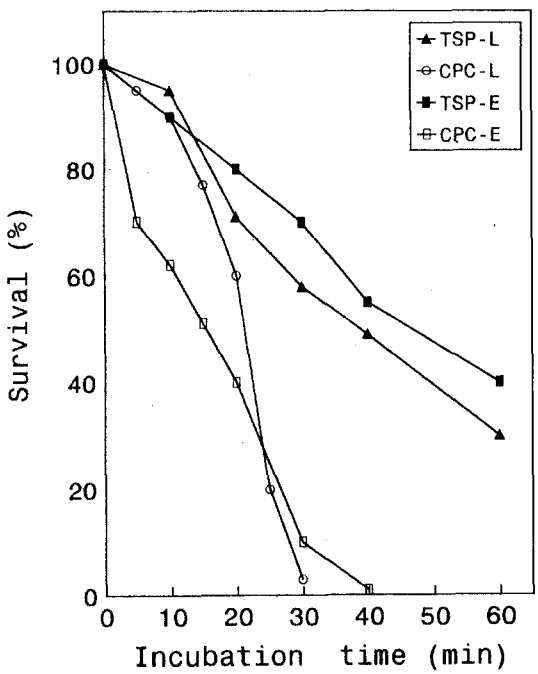

Fig. 1. Killing of *E. coli* O157:H7 (E) and *Listeria monocytogenes* (L) by trisodium phosphate (TSP) and cetylpyridinium chloride (CPC). *E. coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* ($1\sim4\times10^7$ CFU/m*l*) were incubated TSP (1×10^{-2}) and CPC (5×10^{-7}) with in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) at 37°C.

CPC는 TSP에 비하여 10^5배 정도 그 효과가 강하였다.

반응 시간의 영향

TSP와 CPC의 *E. coli* O157:H7과 *L. monocytogenes*와의 반응 시간에 따른 살균효과는 Fig. 1과 같다. TSP는 1×10^{-2} M 농도에서 *E. coli* O157:H7과 *L. monocytogenes*의 생존율은 반응시간이 증가할수록 감소하여 반응 60분에 *E. coli* O157:H7의 생존율은 40%, *L. monocytogenes*의 생존율은 30% 였다.

CPC의 5×10^{-7} M 농도에서 *E. coli* O157:H7과 *L. monocytogenes*의 생존율은 급속한 속도로 감소하여 반응 30분에 *E. coli* O157:H7의 생존율은 10%, *L. monocytogenes*의 생존율은 5% 였다. *E. coli* O157:H7의 살균작용은 *L. monocytogenes*에 비하여 반응 초기에 빠른 속도로 진행되었다.

pH의 영향

E. coli O157:H7과 *L. monocytogenes*에 대한 TSP와 CPC의 살균작용에 있어서 pH의 영향은 Fig. 2와 같다. 두 균이 생육 가능한 pH 6~9 범위[16,17]에서 실험한 결과, TSP는 pH가 높아짐에 따라 *E. coli* O157:H7과 *L. monocytogenes*의 생존율이 급속히 감소하였는데, *E. coli* O157:H7는 pH 6에서 생존율이 100%이고 pH 9에서는 거의 생존할 수 없었으며 *L. monocytogenes*는 pH 6에서 생존율이 80%였으며 pH 8 이상에서는 거의 생존하지 못하였다. 결국 TSP는 산성쪽에서는 살균 작용을 하지 못하였다. TSP의 *E. coli* O157:H7과 *L. monocytogenes*에 대한 살균효과는 *E. coli* O157:H7은 pH 9 이상에서, *L. monocytogenes*는 pH 8 이상에서 그 효과가 컸다.

CPC의 pH에 따른 살균작용에서 *E. coli* O157:H7는 pH 8에서 생존율이 90%이고, pH 7.5에서 10%였으며, *L. monocytogenes*는 pH 9에서 생존율이 100%이고, pH 8에서 20% 였다. 즉, *E. coli* O157:H7는 pH 8 이상, *L. monocytogenes*는 pH 9 이상에서 CPC의 살균효과가 없었다.

CPC의 *E. coli* O157:H7과 *L. monocytogenes*에 대한 살균효과는 pH 7.5 이하에서 그 효과가 컸다.

따라서 실험 농도에서, TSP와 CPC는 *E. coli* O157:H7과 *L. monocytogenes*에 대하여 90% 이상의 살균효과를 얻기 위한 pH는 TSP와 *E. coli* O157:H7은 9 이상, TSP와 *L. monocytogenes*는 8 이상 그리고 CPC와 *E. coli* O157:H7과

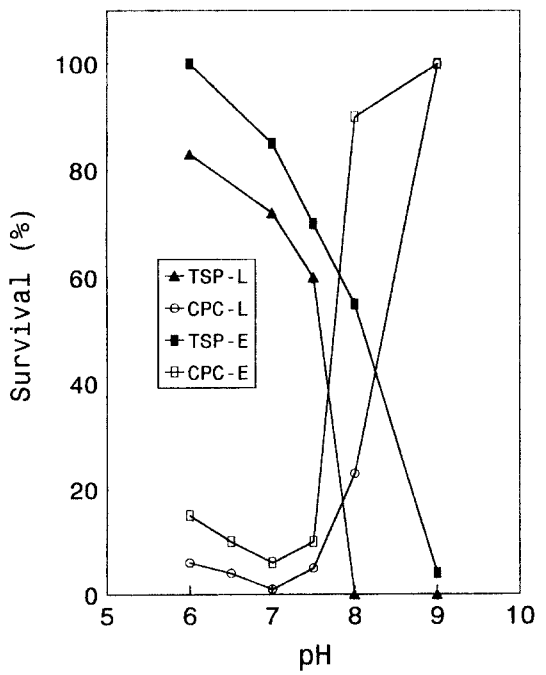

Fig. 2. Effect of pH on killing of *E. coli* O157:H7 (E) and *L. monocytogenes* (L) by trisodium phosphate (TSP) and cetylpyridinium chloride (CPC). *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes* ($1\sim4\times10^7$ CFU/ml) were incubated TSP (1×10^{-2}) and CPC (5×10^{-7}) with in 20 mM Tris-HCl buffer for 30 min at 37°C.

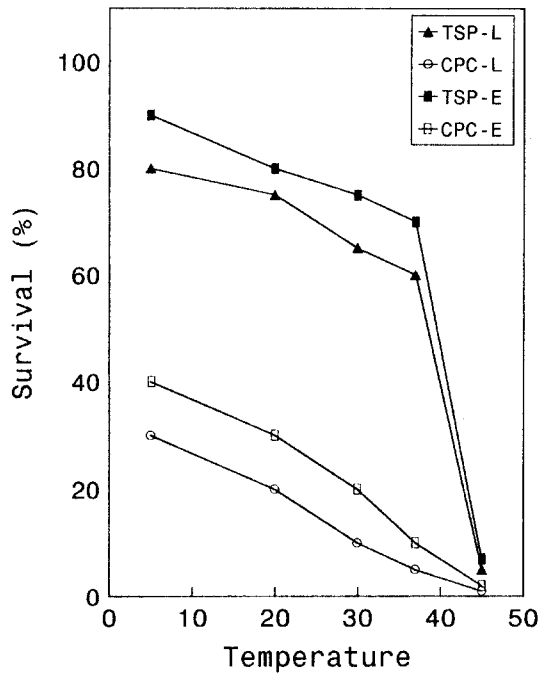

Fig. 3. Effect of temperature on killing of *E. coli* O157:H7 (E) and *L. monocytogenes* (L) by trisodium phosphate (TSP) and cetylpyridinium chloride (CPC). *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes* ($1\sim4\times10^7$ CFU/ml) were incubated TSP (1×10^{-2}) and CPC (5×10^{-7}) with in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) for 30 min.

*L. monocytogenes*는 7.5 이하였다.

반응 온도의 영향

E. coli O157:H7과 *L. monocytogenes*에 대한 TSP와 CPC의 살균작용에서 온도의 영향은 Fig. 3과 같다. 두 균이 생육 가능한 온도[16,17]에서 실험한 결과, TSP와 CPC는 모두 반응 온도가 낮을수록 *E. coli* O157:H7과 *L. monocytogenes*에 대한 살균 효과가 낮았다.

TSP는 37°C 이상에서 *E. coli* O157:H7과 *L. monocytogenes*에 대한 살균 효과가 나타났으며, 각 반응 온도에서 TSP의 살균 효과는 *E. coli* O157:H7이 *L. monocytogenes* 보다 다소 낮았다.

CPC의 살균 효과는 온도가 높을수록 살균효과가 컸으며 낮은 온도(5°C)에서도 60%의 사멸율을 보였다. 각 반응 온도에서 CPC의 살균효과는 *E. coli* O157:H7이 *L. monocytogenes* 보다 더 낮았다.

TSP와 CPC는 실험한 농도에서 *E. coli* O157:H7과 *L. monocytogenes*에 대하여 90% 이상의 살균효과를 얻기 위한 반응 온도는 *E. coli* O157:H7과 *L. monocytogenes* 모두 TSP와는 43°C 이상 그리고 CPC와는 37°C 이상이었다.

국문요약

가금류 가공 등에서 사용이 허가된 trisodium phosphate(TSP)와 구강 청결제로 사용되면서 안전한 물질로 알려진 cetylpyridinium chloride(CPC)를 이용하여 *in vitro*에서 ***E. coli*** O157:H7 및 ***L. monocytogenes***에 대하여 살균작용을 조사하였다. ***E. coli*** O157:H7 및 ***L. monocytogenes***에 대하여 TSP는 1×10^{-2} M 농도에서 37°C, 30분간 반응으로 각각 30~40%와 40~50%의 살균효과를 보였으며, CPC는 5×10^{-7} M 농도에서 37°C, 30분간 반응으로 각각 90~95%와 95~99%의 살균효과를 보였다. 또한, TSP와 CPC는 온도와 pH에 따라 ***E. coli*** O157:H7 및 ***L. monocytogenes***에 대한 살균작용이 영향을 받았는데, 온도가 높을수록 두 물질 모두 그 살균효과 컸으며, TSP는 pH가 높을수록, CPC는 pH가 낮을수록 살균 효과가 컸다. 이러한 결과로 보아 TSP와 CPC도 ***E. coli*** O157:H7 및 ***L. monocytogenes***의 오염방지를 위하여 사용이 가능할 것으로 본다.

참고문헌

1. Anderson, M.E. and Marshall, R.T.: Reducing microbial populations on beef tissues: Concentration and temperature of an acid mixture, *J. Food Sci.,* **55**, 903-905 (1990).
2. Bender, F.G. and Brotsky, E.: Process for poultry carcasses to control salmomnellae growth. U.S. patent 5,069, 922 (1991).
3. Slavik, M.F., Kim, J.-W., Pharr, M.D., Raben, D.P., Tsai, S. and Lobsinger, C.M. : Effect of trisodium phosphate on Campylobacter attached to post-chill chicken carcasses, *J. Food Prot.,* **57**, 324-326 (1994).
4. Giese, J.: Salmonella reduction process receives approval, *Food Technol.,* **47**, 110-116 (1993).
5. Sugarman, C.: USDA approves poultry disinfection method, Washington Post, Oct. 14, p. A12 (1992).
6. Lattin, D.L., Breen, C.M. Compadre, E.K. Fifer, H. Salari, M.F. Slavik and Engler, P.V.: The use of quaternary ammonium compounds to remove Salmonella contamination from meat products, U.S. patent 5,366,983 (1994).
7. Kim, J.-W., Slavik, M.F. and Li, Y.: Cetylpyridinium chloride (CPC) treatment on poultry skin to reduce attached Salmonella, *J. Food Prot.,* **59**, 322-326 (1996).
8. Li, Y., Xiong, H., Matsler, P.L., Walker, J.T. and Slavik, M.F.: Pre-chill spraying to reduce bacterial contamination in poultry processing, ASAE Paper No. 956131. The American Society of Agricultural Engineering, St. Joseph, M1 (1995).
9. Padhye, N.V. and Doyle, M.P.: *Escherichia coli* O157:H 7:epidemiology, pathogenesis and methods for detection in food, *J. Food prot.,* **55**, 555-565 (1992).
10. Dyle, M.P.: A new generation of foodborne pathogenes, *Diary Food Environ. Sanitation,* **12**, 490-493 (1992).
11. Kang, D.H.: The importance of *Escherichia coli* O157:H7 as foodborne pathogen, *J. Fd Hyg. Safety,* **12**, 367-378 (1997).
12. Robert, E.: Presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in food and water, *Food Technol.,* **42**, 162-164 (1988).

13. Lho, I.-H., Kishikawa, S., Kamesaki, U., Kato, F. and Murata, A.: Effects of iron(II)-ascorbate complex on various bacteria, *Nippon Nogeigaku Kaishi,* **65**, 1761-1768 (1991).
14. Wang, W.-C., Li, Y., Slavik, M.F. and Xiong, H.: Trisodium phosphate and cetylpyridinium chloride spraying on chicken skin to reduce attached *Salmonella typhimurium, J. Food Prot.,* **60**, 992-994 (1997).
15. Breen, P.J., Salari, H. and Compadre, C.M.: Elimination of *Salmonella* contamination from poultry tissues by cetylpyridinium chloride solutions, *J. Food Prot.,* **60**, 1019-1021 (1997).
16. Teo, Y.-L., Raynor, T.J., Ellajosyula, K.R. and Knabel, S.J.: Synergistic effect of high temperature and high pH on the destruction of *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7, *J. Food Prot.,* **59**, 1023-1030 (1996).
17. Palumbo, M.S., Beers, S.M., Bhaduri, S. and Palumbo, S. A.: Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in liquid egg white, *J. Food Prot.,* **59**, 1182-1186 (1996).