

## 고온 및 저온처리와 자외선조사에 의한 *Campylobacter jejuni*의 살균효과

김치경 · 임선희 · 윤만석 · 오학식 · 조민기\*

충북대학교 자연과학대학 미생물학과

\*한림대 의대 미생물학교실

## Disinfection effects of heat- and cold-treatment and UV-irradiation on *Campylobacter jejuni*

Kim, Chi-Kyung, Sun-Hee Lim, Man-Seok Yun, Hak-Shik Oh, and Min-Ki Cho\*

Department of Microbiology, Chungbuk National University, and

\*Department of Microbiology, Hanlim College of Medicine

**ABSTRACT:** *Campylobacter jejuni* was studied for its disinfection by heat-and cold-treatment and UV-irradiation. When *C. jejuni* was treated by heat, no viable cell was found after 10 min treatment at 55°C, whereas small fraction of cell population was survived after 60 min treatment at 45°C and 50°C. When they were treated by cold temperature for 30 days, no cell was survived at -23°C, but about 4 log of the cells were survived at both temperature of 4°C and -40°C. When the organisms were UV-irradiated, their survival rates were proportionally varied to the distance of irradiation. The scanning electron microscopic studies of *C. jejuni* cells treated by the disinfecting agents revealed that shapes of the cells were deformed from spiral rod into spherical form. The heat-treated cells showed rough and damaged surface on the scanning electron micrographs. In the heat-treated cells, some proteins of high molecular weight appeared to become accumulated in the electrophoretic analysis. The DNAs extracted from the cells treated with the physical agents showed some differences in agarose gel electrophoresis, comparing those of normal cells.

**KEY WORDS** □ *Campylobacter jejuni*, disinfection, heat- and cold-treatment, UV-irradiation.

*Campylobacter jejuni*는 인체에서 설사질환을 유발시키는 병원세균으로, 이들은 오염된 음식물이나 물을 통하여 전파된다고 Bokkenheuser와 Maserthal(1981), Doyle(1981), Voget 등(1982)이 보고한 바 있다. 그러므로 이 세균으로 오염된 음식물이나 물을 효율적으로 살균처리하는 방법을 찾아내고 인위적인 살균방법에 의한 살균작용을 연구하는 것은 *C. jejuni*에 의한 설사질환을 예방할 수 있는 방법을 강구하는데 절대적으로 필요한 일이라 생각된다.

*C. jejuni*가 음식물을 통하여 전파된다고 한다면 식품 가공과정에서 널리 이용되는 고온이나 저온 그리고 자외선 같은 물리적 방법에 의한 살균작용을 연구하는 것은 큰 의미가 있는 것이다. 그동안 food borne 미생물에 대한 고온처리(Doyle, 1981; Palumbo, 1984), 저온처리(Smith와 Palumbo, 1982)

의 살균효과에 관해서는 많이 보고 되었으나, *C. jejuni*에 대한 보고는 많지 않다. 미생물에 대한 heat injury에 관해서도 *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Streptococci*, *Pseudomonads*, 효모, 곰팡이 등에서 주로 연구되었으며(Busta, 1975; Smith와 Palumbo, 1982), *C. jejuni*에 대한 heat injury에 대한 연구는 Palumbo(1984)가 보고했을 뿐이다. 또 식당 및 병원에서 뿐만 아니라 상하수의 살균처리에도 이용되고 있는 자외선에 의한 미생물의 살균작용에 대해서는 DNA에 thymine dimer를 유발시키는 기작이 널리 알려져 있지만, *C. jejuni*를 재료로 한 자외선 살균효과에 대한 보고는 아직 없었다.

그러므로 본 연구에서는 고온 및 저온처리 그리고 자외선 처리와 같은 물리적 방법으로 *C. jejuni*에 대한 살균효과를 연구하였다. 또 이와같이 살

균처리된 *C. jejuni* 세포의 형태 및 구조적 변화를 주사 전자현미경으로 관찰하고, 그들의 단백질 및 DNA의 변화를 전기영동 방법으로 비교 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 시험세균 및 배양

본 실험에 사용한 *C. jejuni*는 Oxoid manual(1981) 및 조 등(1983)의 방법에 따라 Butzler's agar media를 사용하여 닭의 내장으로부터 분리하였으며, 순수 분리된 세균은 42°C의 candle jar와 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. *C. jejuni*를 agar plate에 도말하여 상기의 방법으로 배양한 후 0.1M phosphate buffer (pH 7.3)에 현탁하여 3번 이상 세척한 후 세균 농도를 10<sup>7</sup>~10<sup>8</sup> cells/ml로 조정하여 살균처리 실험에 사용하였다.

### 고온 및 저온처리

*C. jejuni*에 대한 고온처리는 palumbo(1984)의 방법을 일부 변형하여 0.1M phosphate buffer(pH 7.3)에 세균을 현탁하여 45°C, 50°C, 55°C에서 각각 5분, 10분, 15분, 30분, 60분동안 처리하였다. 또한 저온처리는 Stern과 Kotula(1982)의 방법을 일부 변형하여 0.1M phosphate buffer(pH 7.3)에 *C. jejuni*를 현탁하여 멸균된 screw cap tube 6개의 10ml씩 넣어 4°C, -23°C, -40°C에서 30일간 보관하면서 5일마다 시료를 1개씩 회수하여 얼음물에서 녹인 후 저온의 영향을 조사하였다.

### 자외선 처리

*C. jejuni*에 대한 자외선처리는 0.1M MgSO<sub>4</sub> 용액에 *C. jejuni*를 10<sup>7</sup>~10<sup>8</sup> cell/ml 되도록 현탁하여 Schwartz와 Beckwith(1969)의 방법에 따라 자외선 등(Gemicidal UV lamp, 삼공살균기 제작사)으로부터 10cm, 30cm, 50cm 되는 거리에서 3초, 7초, 10초, 15초동안 각각 처리하였다.

### 살균처리에 의한 *C. jejuni*의 형태 및 구조상의 변화

상기한 방법으로 살균처리를 한 후 *C. jejuni*는 김 등(1986)의 방법에 따라 생존세균수를 측정하였고, 세포의 형태 및 구조상의 변화를 주사 전자현미경으로 관찰하였다. Ng 등(1985)의 방법에 따라 세균을 tooth pick로 Butzler's agar media(Oxoid)에 점 찍종하여 36~48시간 배양한 후 단일 colony를 agar block과 함께 절단하여 0.1M phosphate buffer로 만든 2.5% glutaraldehyde 용액에서 4시간동안 전고정한 다음 0.1M phosphate buffer로 3번 세척한 후 0.1M phosphate buffer로 만든 1%

의 OsO<sub>4</sub> 용액에서 6시간 후 고정하였다. 이를 25, 50, 75, 90, 95, 100%의 ethanol에서 각각 20분씩 연속적으로 탈수시킨 후 시료를 critical point dryer로 건조시켜 SEM(Hitachi, model S-507)으로 관찰하였다.

### 단백질 및 DNA의 전기영동

살균처리에 따른, *C. jejuni*의 단백질에 대한 변화를 관찰하기 위해서 정상적인 *C. jejuni*와 고온 및 저온처리 그리고 자외선 처리를 한 *C. jejuni*로부터 Silhavy 등(1984)의 방법에 따라 단백질을 추출하여 SDS-polyacrylamide gel(10%)에서 80V로 12시간 전기영동한 후 coomassie brilliant blue R250으로 30~60분간 염색하고 destaining solution으로 탈색하여 관찰하였다.

또한 DNA에 대한 영향을 비교 분석하기 위해서 살균처리된 *C. jejuni*를 Barnes(1977)의 방법에 따라 cracking buffer(50 mM NaOH, 0.5% SDS, 5mM EDTA와 0.025% bromocresol green)에 현탁하여 68°C에서 60분동안 incubation한 후 원심분리하였다. DNA가 포함되어 있는 상층액을 0.7% agarose gel에서 80V, 40mA로 2시간 전기영동한 후 transilluminator하에서 DNA band를 관찰하는 동시에 spectrophotometer(Beckman, DU-65)를 이용하여 220~360nm에서 Hayatsu 등(1971)의 방법으로 흡광도를 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### *C. jejuni*의 생존율에 대한 영향

고온처리에 의한 *C. jejuni*의 살균효과는 Fig. 1에서와 같이 45°C에서 30분간 처리했을 때 약 3~4log의 세균이 사멸하였으며 60분 후에는 거의 모든 세균이 사멸하였다. 또한 50°C에서는 30~60분 사이에, 그리고 55°C에서는 10분 이내에 7~8log의 세균이 사멸됨으로서 그 살균효과는 45°C에서 보다 훨씬 높았다. Palumbo(1984)는 *C. jejuni*를 열처리할 때 받는 손상을 줄이기 위하여 buffer에 5%의 NaCl나 40%의 sucrose를 넣어줌으로서 세포 내용물질의 유출을 방지할 수 있다고 했으나 본 실험에서는 그러한 조치를 하지 않았다.

저온처리에 의한 *C. jejuni*의 살균효과는 Fig. 2에서와 같다. 8log의 세균을 4°C에서 30일간 처리했을 경우 5log 이상의 세균이 사멸하였다. 그러나 -23°C에서 처리했을 경우에는 4°C에서보다 살균효과가 훨씬 높았으며 30일간의 처리 이후에는 모든 세균이 사멸하였다. -40°C에서는 30일간 처리했을 때 약 4log의 세균만이 사멸하였다.

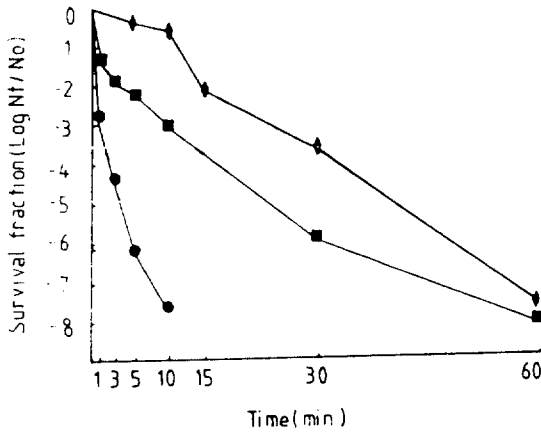


Fig. 1. Disinfection Kinetics of *C. jejuni* by treatment at 45°C (◆), 50°C (■), and 55°C (●)

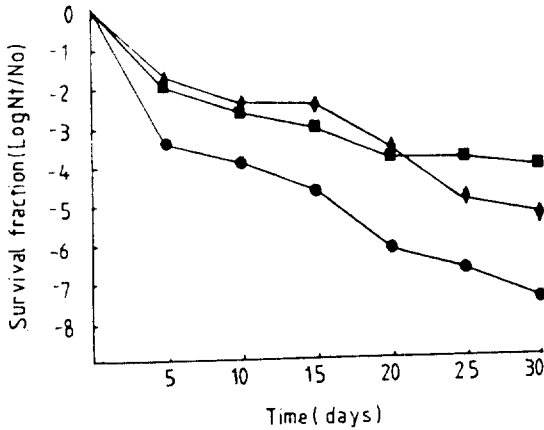


Fig. 2. Disinfection Kinetics of *C. jejuni* by treatment at 4°C (◆), -23°C (●), and -40°C (■).

이와같은 결과는 0.1% peptone에 *C. jejuni*를 현탁하여 4°C와 -15°C로 저온처리하면서 생존율을 측정한 Stern과 Kotula(1982)의 결과와 유사하였다. 또한 이들은 dimethyl sulfoxide(10%)나 glycerol(10%)과 같은 cryoprotective agent를 첨가하면 -15°C에서 14일 후에도 1~2log만 사멸하였음을 보고한 바 있으나 본 실험에서는 cryoprotective agent를 첨가하여 실험하지는 않았다. 또 -40°C에서보다

-23°C에서 *C. jejuni*의 사멸율이 높은 이유는 세균이 서서히 냉동될수록 세포내에 ice crystal이 크게 형성되어 세균의 세포적, 분자적 구조가 파괴된다고 해석한 Stern과 Kotula(1982)의 고찰내용으로 이해할 수 있다.

*C. jejuni*에 대한 자외선의 살균효과는 Fig. 3에서와 같이 10cm 거리에서 3초동안 처리했을 때에는 약 4~5log 정도의 세균이 사멸하였고 7초동안 처리했을 경우 모든 세균이 사멸하였다. 또한 자외선 등으로부터의 조사 거리가 멀어질수록 살균효과는 낮았으며 30cm, 50cm 거리에서 7초동안 처리했을 경우 각각 약 5log, 8log의 세균이 사멸하였다. 이와같이 *C. jejuni*에 대한 자외선의 높은 살균효과는 Butler 등(1986)이 보고한 바와 같이 *E. coli*와 *Yersinia*보다 *C. jejuni*가 자외선에 더 민감하다는 연구결과와 일치되는 것이다.

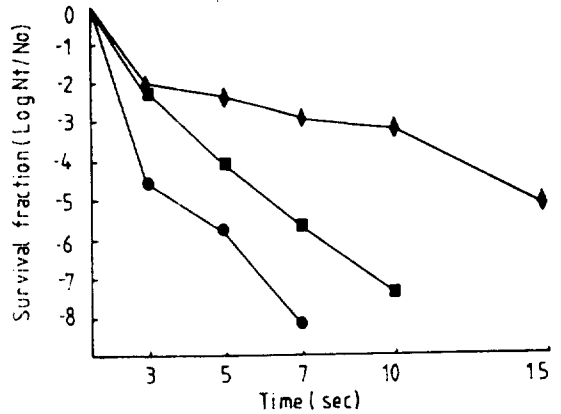


Fig. 3. Disinfection Kinetics of *C. jejuni* by UV-irradiation at 10cm(●), 30cm(■), and 50cm(◆) distances.

세포형태 및 구조의 변화

정상적인 *C. jejuni*와 살균처리한 *C. jejuni*의 형태를 SEM으로 비교 관찰한 결과는 Fig. 4에서와 같다. 정상세포들(A)은 전형적인 나선간균이었으나 50°C에서 60분간의 고온처리에 의하여 사멸된 *C. jejuni* 세포들(B)은 모두 구형으로 변화하였으며 그 표면은 매우 거칠고 부분적으로 일그러져 있었다. 또한 자외선으로 처리한 *C. jejuni*의 경우(C), 대부분의 세포들은 구형 또는 부정형으로 변화였고 세포표면이 부분적으로 파괴되어 일그러진 세포도 발견되었다. 이때 시료는 Ng 등(1985)의 방

법에 따라 단일 colony를 agar block과 함께 떼어 내어 colony의 표면세포를 그대로 살균처리하였기 때문에 시료 준비과정중의 인위적인 손상은 없었다고 생각된다. Rollins와 Colwell(1986)은 사멸된 구형의 *C. jejuni*를 TEM으로 관찰한 결과 cell envelope가 변형되어 ghost cell이 관찰되었다고 보고하였는데 이는 세포가 사멸되면서 세포형태가 구형으로 변형된 본 실험의 결과를 뒷받침 해주는 것이다.

#### 단백질에 대한 영향

정상적인 *C. jejuni*와 살균처리한 *C. jejuni*로부터 protein을 전기영동한 결과는 Fig. 5와 같다. 50°C에서 1시간 처리한 세포의 단백질(Lane C와 D)은 정상세포의 단백질에 비하여 비교적 분자량이 큰 2종의 단백질이 다량 나타났다. 그러나 자외선 처리한 세포나 저온 처리한 세포의 경우 전기영동 방법으로는 정상세포의 단백질과 비교해 볼 때 큰 차이를 발견할 수 없었다. 그러므로 고온 처리한 *C. jejuni*에서 나타난 이 단백질은 고온처리에 의

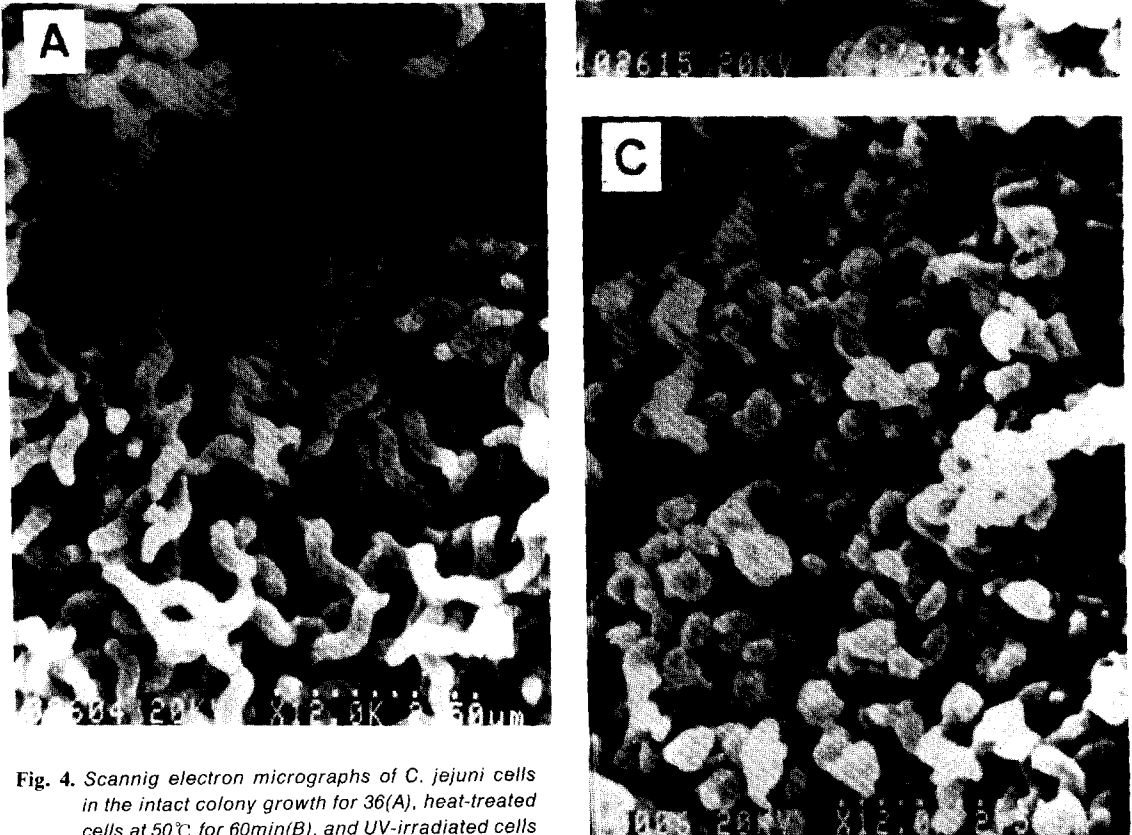


Fig. 4. Scanning electron micrographs of *C. jejuni* cells in the intact colony growth for 36(A), heat-treated cells at 50°C for 60min(B), and UV-irradiated cells for 10sec. at 30cm(C).

하여 단백질이 변성된 것이라고 할 수도 있겠으나 heat-induced protein일 가능성 또한 없지 않은 것이다.

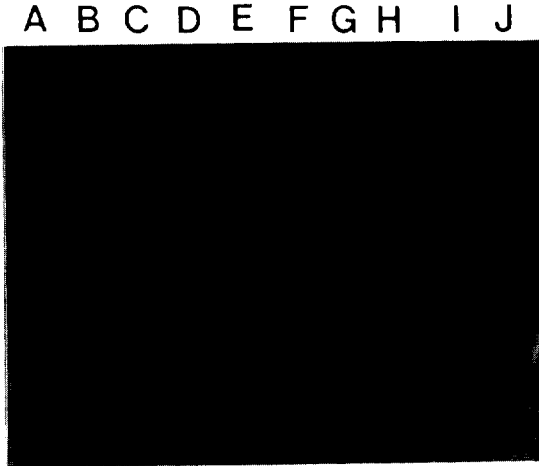


Fig. 5. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of proteins of normal and disinfected *C. jejuni* cells. Lane A, B, and I untreated cells; C and D, heat-treated cells; E and F, UV-irradiated cells; G and H, cold-treated cells; J, human serum albumin (60KD).

Busta(1975)는 *Staphylococcus lactis*에 저온 처리하였을 때 membrane proteinase가 불활성화 된다고 보고하였고 또 Scheie(1973)는 *E. coli*를 55°C로 처리하였을 때 colony 형성 능력을 잃었으며 세포벽의 outer membrane에 있는 단백질이 변성되어 peptidoglycan층이 약해졌다고 보고하였다. 본 실험에서는 고온 및 저온처리했을 때 소멸되었거나 변화된 단백질의 band를 발견할 수 없었다.

**DNA에 대한 영향**

정상적인 *C. jejuni*와 살균처리한 *C. jejuni*로부터 순수 분리한 DNA를 전기영동한 결과는 Fig. 6과 같다. 55°C에서 60분간 처리한 세포로부터 추출한 DNA(Lane B)는 모두 파괴되어 gel상에서 확인할

수 없었으나 정상적인 *C. jejuni*에서 순수 분리한 DNA를 55°C에서 60분간 처리한 시료(Lane C)에서는 처리하지 않은 세포로부터 분리한 DNA(Lane A)와 큰 차이가 없었다. 또한 spectrophotometer를 이용하여 DNA의 흡광도를 측정된 결과, 정상적인 *C. jejuni*에서 추출한 DNA는 2.6의 흡광도를 나타냈지만 열처리한 세포의 DNA는 그 흡광도가 0.7로 크게 감소하였다.

이와같은 결과는 열처리를 할 때에 세포내에 있는 nuclease가 DNA를 파괴했기 때문이라는 Marmur와 Doty(1959)의 보고에 의하여 뒷받침된다. 또한 자외선에 의한 DNA의 영향을 조사한 결과는 자외선을 처리한 후 분리한 DNA(Lane D)나 처리하지 않은 세포로부터 DNA를 분리하여 자외선을 조사한 경우(Lane E)사이에는 뚜렷한 차이가 없었으나, 260nm에서의 흡광도는 2.3으로 정상적인 DNA의 흡광도보다 감소하였음을 확인하였다.

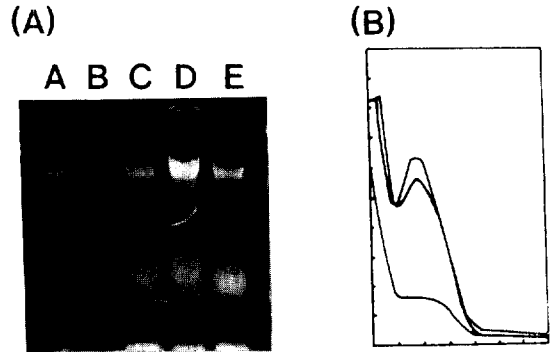


Fig. 6. Agarose gel electrophoresis(A) and spectrophotographs(B) of the DNAs isolated from the untreated and treated *C. jejuni*(Lane A, B and D) and the naked DNAs treated after isolation (Lane C and E) A, DNAs isolated from the untreated normal cells; B, DNAs isolated from the heat-treated cells at 55°C for 60min; D, DNAs isolated from the UV-irradiated cells from 30cm for 60min; E, naked DNAs UV-irradiated at 30cm for 60min.

**적 요**

*Campylobacter jejuni*에 대하여 고온 및 저온처리 그리고 자외선조사 등 물리적 방법에 의한 살균효과를 연구한 결과 45°C와 50°C에서 60분간 열처리하였을 때에는 *C. jejuni*의 survival fraction의 약 -7.64~-8.12이었으나 55°C에서 10분간 열처리했을 때의 survival fraction은 -7.63이었다. 4°C와 -40°C에서 30일간 처리하였을 때 *C. jejuni*의 survival fraction이 각각 -5.39과 -4.13이었으나 -23°C에서는 -7.5나 되었다. 10cm 거리에서 7초동안 자외선을 조사했을 때 *C. jejuni*의 survival fraction은 -8.15이었으나 30cm와 50cm에서 7초동안 처리하였을 때에는 각각 -5.63과 -3.23의 survival fraction을 나타냈

다. 또 고온과 자외선치리에 의하여 사멸된 *C. jejuni* 세포는 나선간균에서 구형으로 변하면서 세포표면에 많은 손상이 일어났음을 주사 전자현미경으로 확인할 수 있었다. *C. jejuni*의 단백질은 50°C로 처리한 시료를 전기영동한 결과 분자량이 큰 2개의 band가 나타났다. *C. jejuni*의 DNA는 고온치리에 의하여 완전히 파괴되었으나 순수 분리한 후 열처리한 DNA는 대조군과 큰 차이가 없었다. 또 자외선치리를 받은 DNA는 부분적인 파괴가 일어났음을 전기영동 방법과 spectrophotometry 방법을 이용하여 확인할 수 있었다.

## 사 사

본 연구는 1987년도 한국 과학 재단의 연구사업비에 의해서 수행되었으며 이에 깊은 감사를 표하는 바입니다.

## REFERENCES

1. Barnes, W.M. 1977. Plasmid detection and sizing in single colony lysate. *Science*. **195**: 393.
2. Bokkenheuser, V.D., and A.C. Maserthal, 1981. *Campylobacteriosis*: a food borne disease. *J. Food Safty*. **3**: 127-143.
3. Busta, F.F. 1975. Practical implication of injured microorganism in foods. *J. Milk food Technol.* **39**: 465-470.
4. Butler, R.C., V. Lund, and Carlson, 1986. Susceptibility of *Campylobacter jejuni* and *Yersinia enterocolitica* to UV and radiation. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 375-378.
5. 조민기, 정대엽, 염곤, 정연명, 이용우, 이명원, 이복권, 박미연, 오경수, 주영란, 성원근, 김기상, 신석우, 이주원, 1983. 전염성 설사질환에 대한 세균학적 조사연구. 국립보건원 연구 보고서. **20**: 15-39.
6. Doyle, M.P. 1981. *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*: an old pathogen of new concern. *J. Food Prot.* **44**: 480-488.
7. Hayatsu, H., S. Pan, and T. Ukita, 1971. Reaction of sodium hypochlorite with nucleic acids and their constituents. *Chem. Pharm. Bull. Jpn.* **19**: 2189-2192.
8. 김치경, 오학식, 염곤, 조민기, 1986. 하천수에서 *Campylobacter jejuni*의 오염도와 그 생존율에 관한 연구. 한국 육수 학회지. **19**: 39-48.
9. Marmur, J., and P. Doty, 1959. Heterogeneity in deoxyribonucleic acids. *Nature*, London. **183**: 1427-1429.
10. Ng, L.-K., P. Sherburne, and D.E. Taylor, and M.E. Stiles, 1985. Morphological forms and viability of *Campylobacter* species studied by electron microscopy. *J. Bacteriol.* **164**: 338-343.
11. Oxoid Ltd. 1982. Oxoid manual of culture media ingredients and other laboratory services, 5th ed. Oxoid, Hampshire, United Kingdom. **352**: 84-88.
12. Palumbo, S.A. 1984. Heat injury and repair in *Campylobacter jejuni*. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 477-480.
13. Rollins, D.M., and R.R. Colwell, 1986. Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 531-538.
14. Scheie, P. and S. Ehrenspeck, 1973. Large surface blebs on *Escherichia coli* heated to inactivating temperature. *J. Bacteriol.* **114**: 814-818.
15. Schwartz, D.O., and J.R. Beckwith, 1969. Mutagens which cause deletion in *Escherichia coli*. *Genetics*. **61**: 371-379.
16. Silhavy, T.J., M.L. Berman, and L.W. Enquist, 1984. Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. 208-212.
17. Smith, J.C., and S.A. Palumbo, 1982. Microbial injury for the sanitarian. *Dairy Food Sanit.* **2**: 57-63.
18. Stern, J.N., and A.W. Kotula, 1982. Survival of *Campylobacter jejuni* inoculated into ground beef. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 1150-1153.
19. Taylor, D.N., K.T. Medermott, J.R. Little, J.G. Wells, and M.J. Blaser, 1985. *Campylobacter* enteritis from untreated water in the Rocky Mountains. *Ann. Intern. Med.* **99**: 38-40.
20. Voget, R.L., H.E. Sour, T. Barretl, R.A. Feldman, R. I. Dickinson, and L. Witherell, 1982. *Campylobacter* enteritis associated with contaminated water. *Ann. Intern. Med.* **96**: 292-296.

(Received Jul. 21, 1989)