

## *Listeria monocytogenes* Scott A의 세포상태에 따른 열 저항성

이신호\* · 손수정  
효성여자대학교 식품가공학과

### Heat Resistance of Vegetative and Starved *Listeria monocytogenes* Scott A

Lee, Shin Ho\* and Soo-Jeong Son  
Department of Food Science and Technology,  
Hyosung Women's University, Hayang 713-702, Korea

**Abstract** — Survival and heat resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A in various nutritional environments and cell type on stainless steel were determined. Viable cell of *L. monocytogenes* Scott A was most rapidly decreased in phosphate buffer among various media such as NSM (30 g TSB/1 l D.W.), LNM (2 g TSB/1 l D.W.) and phosphate buffer (pH=7) during incubation at 21 and 35°C but survived for 15 days at 21°C. Vegetative and starved *L. monocytogenes* Scott A were survived after heat treatment for 5 min at 65°C while not detected at 72°C. Attached single cell of *L. monocytogenes* Scott A on stainless steel slide was not detected after heat treatment for 5 min at 65°C. Surface-adherent microcolony of *L. monocytogenes* Scott A was survived after heat treatment for 3 min at 72°C but not detected after heat treatment for 5 min at 72°C. Heat resistance of starved cell was higher than that of vegetative cell and surface-adherent microcolony was more resistant to heat than attached single cell.

*Listeria monocytogenes*는 토양, 물, 하수, 동물, 원유, 생선, 채소 등 자연계에 널리 분포되어 있으며 가축의 유방염, 임산부의 유산 및 뇌막염 등의 원인균으로 치사율이 매우 높은 병원성 미생물로 알려져 있다(1-3). Schlech(4)에 의해 1981년 Canada에서 성인과 신생아에게 발병한 listeriosis가 *L. monocytogenes*에 오염된 식품의 섭취에 기인된 것이 밝혀진 후 구미 각국에서 식품 오염에 의한 listeriosis 발생과 이에 관한 연구가 진행되고 있다(5-7). 병원성 미생물이나 부패 미생물은 식품의 제조 환경이나 가공기계에서 발견되고 있으며(8) 영양 성분이 적은 상태에서도 성장하여 biofilm을 형성하여(9, 10) 열처리나 antibacterial agent에 강한 내성이 있어 식품 위생학적 측면에서 많은 문제점을 일으킬 수 있다(10-12).

본 연구에서는 식품 제조환경에서 *L. monocytoge-*

*nes*의 오염을 최소화하고 사멸 방안을 모색코저 *L. monocytogenes*의 세포 상태에 따른 열저항성을 비교 검토하였다.

#### 재료 및 방법

##### 사용균주 및 성장배지

미국 University of Georgia 식품가공학과에서 분양 받은 *Listeria monocytogenes* Scott A를 사용하여 tryptic soy agar(TSA, Difco) slant에 접종하여 24시간 배양 후 4°C에 보관하면서 사용하였다. 성장배지는 nutrient sufficient media(NSM : 30 g TSB/1L D.W.)와 low nutrient media(LNM : 2 g TSB/1L D.W.) 그리고 0.1 M phosphate buffer(PB : pH 7)를 사용하였다.

##### Cell의 조제

*L. monocytogenes* Scott A를 TSA에 접종하여 35°C에서 24시간 배양한 세포를 vegetative cell(정상

**Key word:** *Listeria monocytogenes*, heat resistance, starved cell, surface-adherent microcolony, attached single cell

\*Corresponding author

세포)로, 배양 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 phosphate buffer에 현탁시킨 후 21°C에서 7일간 배양하여 membrane filter(Whatman, 0.45 μm)로 농축시킨 세포를 'starved cell(영양결핍세포)로 사용하였다. Adherent microcolony의 조제는 Lee와 Frank 방법(10)으로 세척한 stainless steel slide(2×5 cm, type 304, finish No. 4)를 TSB가 담긴 25×180 mm 시험관에 넣어 멸균한 다음 24시간 배양한 *L. monocytogenes*를 접종하여 21°C에서 2일간 배양한 후 slide를 멸균 phosphate buffer로 세척하여 새로운 배지에 옮겨 21°C에서 2일간 반복배양으로 총 8일간 배양하여 조제하였으며(10) vegetative adherent microcolony를 pH 7의 phosphate buffer에서 7일간 배양하여 starved adherent microcolony로 사용하였다. Attached single cell은 정상세포 배양액과 영양결핍세포 배양액에 각각 멸균 stainless steel slide를 넣어 21°C에서 4시간 배양한 후 멸균 phosphate buffer로 세척하여 사용하였다.

**열저항성 검사**

정상세포와 영양결핍 세포 배양액을 각각 2 ml gold band ampoule (Wheaton Co.)에 분주하여 밀봉한 후 65와 72°C의 water bath에서 각각 1, 3, 5분간 열처리한 후 얼음물에 즉시 냉각하여 대조구와 생균수를 비교 측정하였으며 adherent microcolony와 attached single cell의 열저항성은 상기와 같은 방법으로 조제한 slide를 멸균 phosphate buffer에 넣어 65, 72°C에서 열처리 후 대조구와 생균수를 비교 측정하였다. Stainless steel slide 표면상의 생균수 측정은 scrape and swab 방법을 사용한 Lee 와 Frank의 방법 (10)으로 시료를 채취한 후 적정 희석하여 pour plate method로 tryptic soy agar에 접종하여 35°C에서 48시간 배양 후 나타난 colony수를 계측하였다.

**결과 및 고찰**

***L. monocytogenes* Scott A의 생존**

NSM와 LMN 그리고 PB에 균일한 농도로 *L. monocytogenes*를 접종하여 21, 35°C에서 15일간 배양하면서 생균수의 변화를 측정한 결과는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 영양성분이 충분한 NSM에서의 생존이 LMN과 PB에서 보다 높은 수준을 보이고 있으며 21°C에서는 NSM과 LMN에서 접종 8일까지 생균수가 감소하지 않은 반면 35°C에서는 접종 1일 이후 감

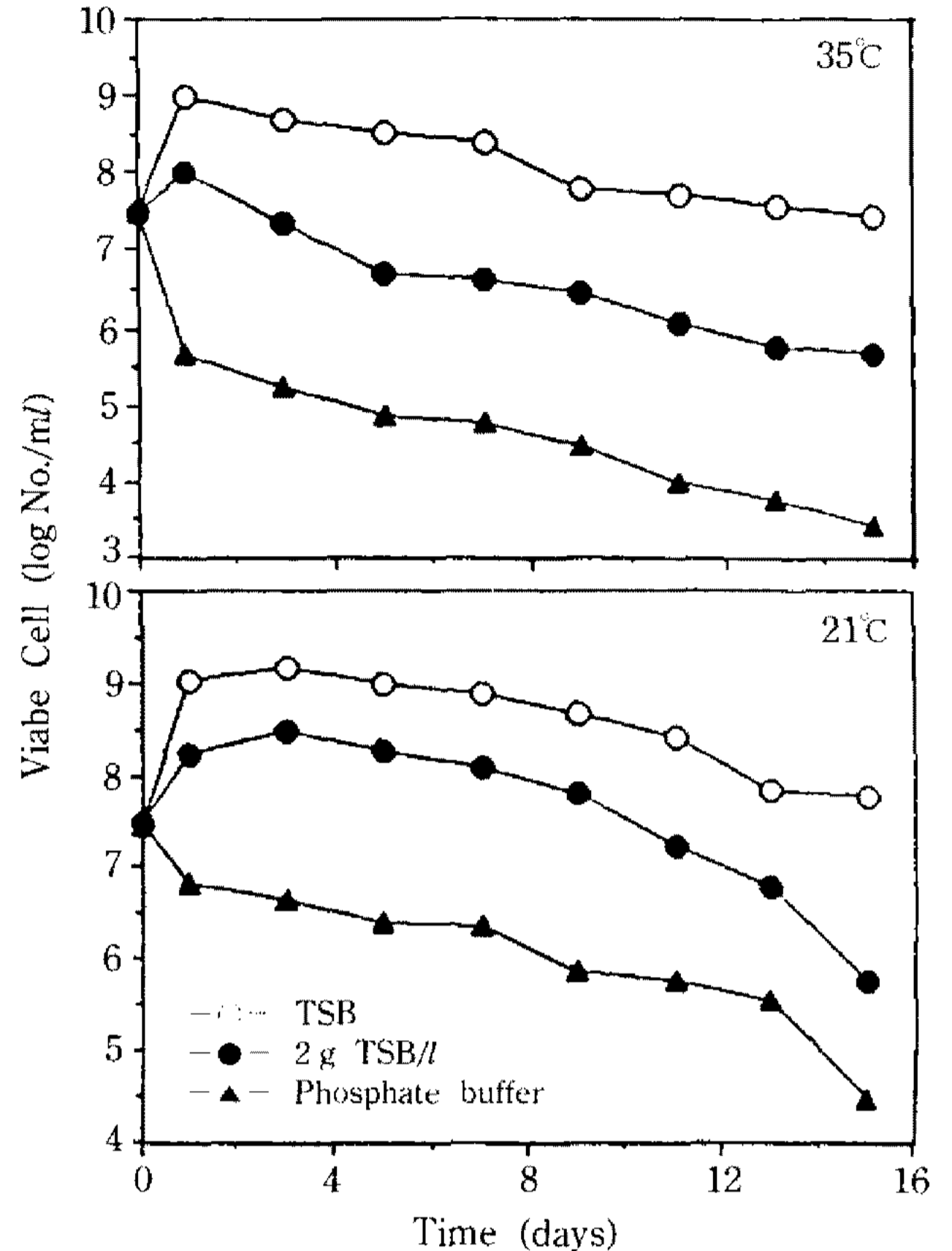


Fig. 1. Survival of *Listeria monocytogenes* Scott A in various media at 21 and 35°C.

소하는 경향을 나타내었다. 특히, 영양결핍 상태인 PB에서도 접종 15일까지 21°C에서 10<sup>4</sup> CFU/ml, 35°C에서 10<sup>3</sup> CFU/ml의 수준으로 생존하는 경향을 보여 *L. monocytogenes* Scott A는 영양이 결핍된 환경에서도 상당기간 생존가능할 것으로 사료되었다.

**정상세포(vegetative cell)와 영양결핍 세포(starved cell)의 열저항성**

*L. monocytogenes* Scott A의 정상세포와 영양 결핍세포의 열저항성은 Table 1에서 보는 바와 같이 65°C에서 1, 3, 5분간 열처리시 영양결핍세포의 log reduction이 각각 0.31, 0.88, 2.07인데 비해 정상세포의 경우 1.03, 2.11, 3.10으로 영양결핍 세포가 정상세포에 비해 열저항성이 강한 경향을 나타내었다. 72°C에서도 이와 유사한 경향을 나타내었으며 5분간 열처리시 정상세포와 영양결핍세포 공히 생균이 검출되지 않았다. Garayzabal 등은(13) 69~73°C에서 원유를 살균처리 후 냉장온도에서 저장한 결과 46.6%의 살균유에서 *L. monocytogenes*가 분리되었다고 보고하였고 Ryser(14)는 살균 탈지유에 10<sup>4</sup>~10<sup>5</sup> CFU/ml의 *Listeria*를 접종하여 57.2°C에서 30분간

**Table 1. Heat inactivation of vegetative and starved *Listeria monocytogenes* Scott A at 65°C and 72°C**

		Time(min)			
		0	1	3	5
65°C	A <sup>a</sup>	7.61±0.09 <sup>b</sup>	6.58±0.35 (1.03) <sup>c</sup>	5.50±0.08 (2.11)	4.51±0.24 (3.10)
	B	6.25±0.42	5.94±0.43 (0.31)	5.37±0.15 (0.88)	4.18±0.35 (2.07)
72°C	A <sup>a</sup>	7.61±0.09 <sup>b</sup>	5.89±0.13 (1.72)	1.82±0.35 (5.79)	ND <sup>d</sup>
	B	6.25±0.42	4.93±0.45 (1.32)	1.86±0.44 (4.39)	ND

<sup>a</sup>A=vegetative cells, B=starved cells, <sup>b</sup>mean log no./m/± standard deviation. N=4, <sup>c</sup>log reduction, <sup>d</sup>none detected

cooking하여 제조한 cottage cheese에서도 *L. monocytogenes*가 검출되었다고 보고하였다. 영양결핍 세포는 일반적으로 영양결핍화 과정중 외부 환경으로 부터 영양 성분을 섭취 이용할 수 없으므로 세포내 복합체(endocellular polymer)에 의해 대사가 이루어진다(15). 영양결핍화 과정중의 물리적 구조적 변화는 세포질 밀도(cytoplasmic density)가 감소하여 전반적으로 세포의 크기가 작아진다(16). 이러한 영양 결핍화 과정중의 변화는 영양 결핍상태에서 생존을 가능케 하여 외부환경의 변화에 대한 내성이 증가되어 영양 결핍세포가 정상세포에 비해 열저항성이 강한 것으로 판단되었다.

**Attached single cell과 adherent microcolony의 열저항성**

새척상태가 완전하지 않은 가공기계표면에 부착된 세포를 attached single cell이라 하고 이들이 기계표면에 생존하여 polysaccharide등의 물질을 매개로 capsule 형태의 microcolony를 형성한 세포를 adherent microcolony라하며 이들은 가공기계표면에서 biofilm을 형성하게 된다(9, 10, 17). *L. monocytogenes* Scott A를 stainless steel slide에 부착시킨 attached single cell의 65와 72°C 에서 열저항성은(Table 2) 영양결핍 세포의 attached single cell이 65°C 에서 1, 3, 5분 열처리 후 log reduction은 각각 1.39, 2.87, 3.93이었고 정상세포의 경우 2.01, 3.45, 4.65를 나타내었다. 72°C 에서 3분 이상 열처리한 경우 영양결핍 세포와 정상세포 공히 검출되지 않았다. Adherent microcolony의 열저항성은(Table 3) 65°C 에서 1, 3, 5분간

**Table 2. Heat inactivation of attached single cell of vegetative and starved *Listeria monocytogenes* Scott A at 65°C and 72°C**

		Time(min)			
		0	1	3	5
65°C	A <sup>a</sup>	4.86±0.06 <sup>b</sup>	2.85±0.07 (2.01) <sup>c</sup>	1.41±0.02 (3.45)	0.21±0.02 (4.65)
	B	4.45±0.02	3.12±0.03 (1.39)	1.64±0.04 (2.87)	0.58±0.02 (3.93)
72°C	A <sup>a</sup>	4.86±0.06 <sup>b</sup>	0.77±0.15 (1.72)	ND <sup>d</sup> (5.79)	ND
	B	4.45±0.02	1.80±0.03 (2.65)	ND	ND

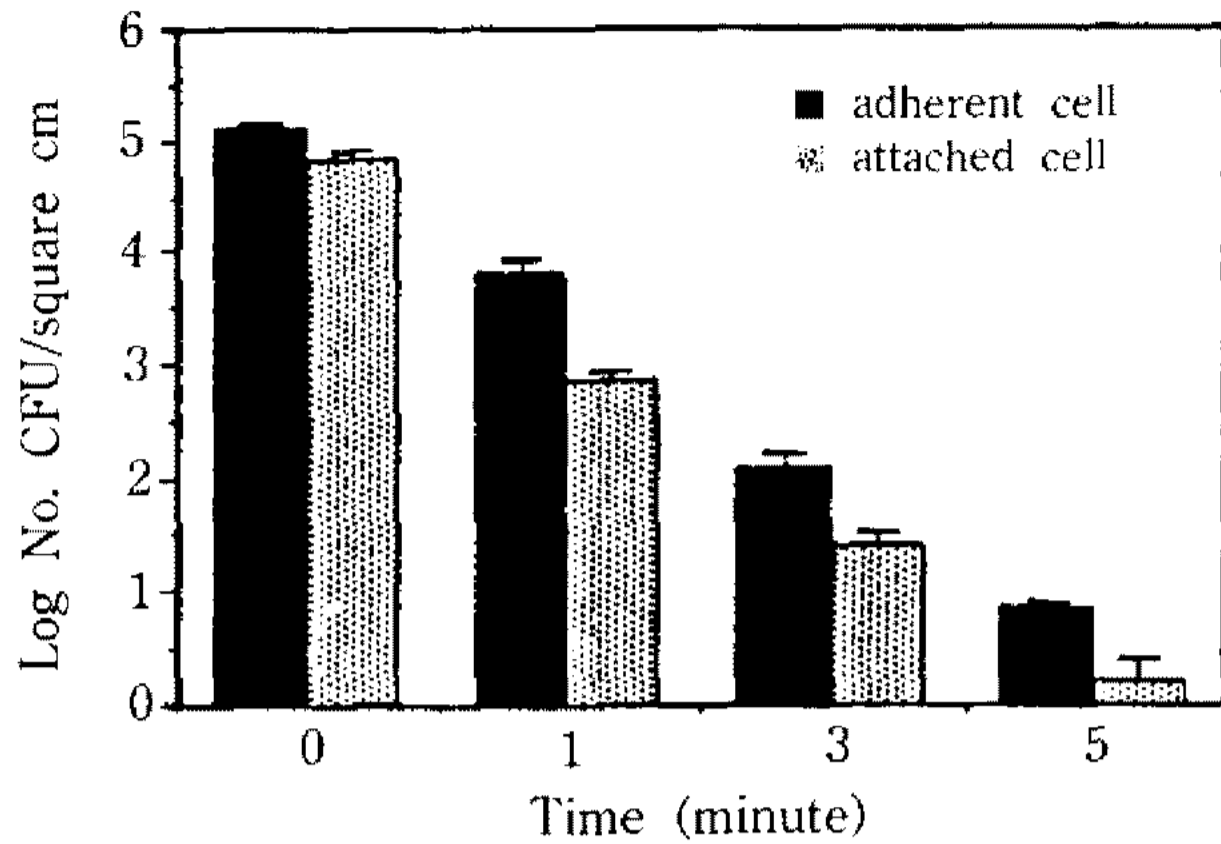
<sup>a</sup>A=vegetative cells, B=starved cells, <sup>b</sup>mean log no./square cm± standard deviation. N=4, <sup>c</sup>log reduction, <sup>d</sup>none detected

**Table 3. Heat inactivation of adherent microcolonies of vegetative and starved *Listeria monocytogenes* Scott A at 65°C and 72°C**

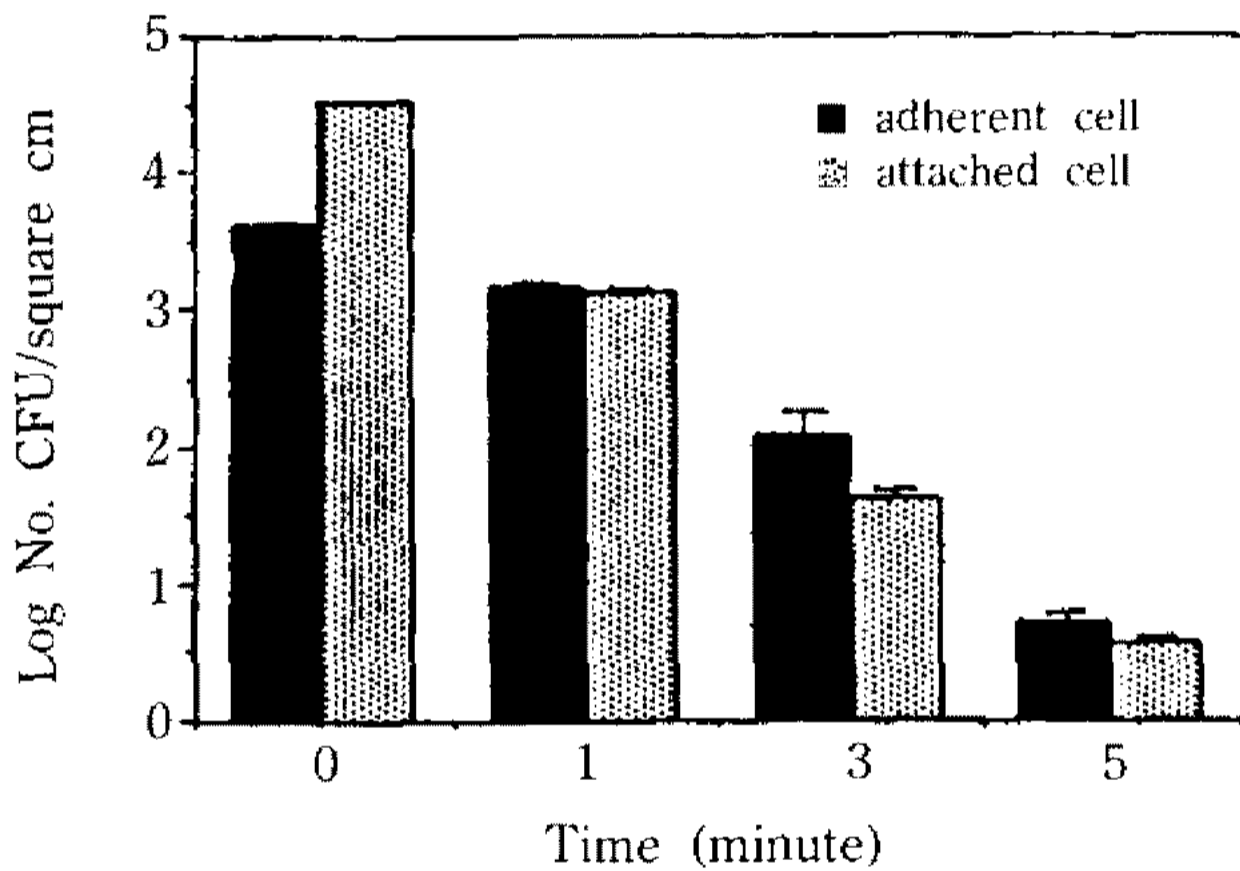
		Time(min)			
		0	1	3	5
65°C	A <sup>a</sup>	5.13±0.03 <sup>b</sup>	3.79±0.15 (1.34) <sup>c</sup>	2.07±0.12 (3.06)	0.88±0.04 (4.26)
	B	3.62±0.03	3.16±0.04 (0.46)	2.08±0.18 (1.54)	0.72±0.05 (2.90)
72°C	A <sup>a</sup>	5.03±0.09 <sup>b</sup>	1.64±0.03 (3.39)	0.70±0.08 (4.33)	ND <sup>d</sup>
	B	3.53±0.07	2.09±0.03 (1.44)	0.34±0.10 (3.19)	ND

<sup>a</sup>A=vegetative cells, B=starved cells, <sup>b</sup>mean log no./square cm± standard deviation. N=4, <sup>c</sup>log reduction, <sup>d</sup>none detected

열처리 후 log reduction은 정상세포의 경우 각각 1.34, 3.06, 4.26이었으며 영양결핍 세포의 경우 0.46, 1.54, 2.90을 나타내었으며 72°C 에서 5분간 열처리 후 생존수는 공히 검출되지 않았다. Adherent microcolony에 있어서도 영양결핍세포가 열저항성이 강한 경향을 나타내었다. 정상세포와 영양결핍세포의 adherent microcolony와 attached single cell의 열저항성의 비교는 Fig. 2와 3에서 보는 바와 같이 solid 표면에 단지 부착되어 있는 attached single cell의 열저항성에 비해 adherent microcolony가 강한 경향을 나타내었다. Lee 와 Frank(10)는 200 ppm의 hypochlorite에 *L. monocytogenes*의 adherent microco-



**Fig. 2. Heat inactivation of adherent and attached cell of vegetative *Listeria monocytogenes* Scott A at 65°C.** Adherent cell: surface adherent microcolony on stainless steel slide. Attached cell: attached single cell on stainless steel slide. The cells were prepared by the method described in Material and Methods.



**Fig. 3. Heat inactivation of adherent and attached cell of starved *Listeria monocytogenes* Scott A at 65°C.**

lony가 attached single cell에 비해 내성이 강하였다고 보고하였다. 이러한 결과는 adherent microcolony는 고체 표면에 생존하면서 biofilm을 형성하면서 polysaccharide 등의 물질을 매개로 capsule 물질의 형성과 lipoteichoic acid의 축적(18)으로 열처리 등의 외부환경에 강한 내성을 나타낸 것(9, 10)에 기인된 것으로 판단되었다. 식품 제조시 비위생적인 처리로 *L. monocytogenes*의 오염은 식품자체의 오염 뿐만 아니라 식품 가공기계표면에 오염되어 adherent microcolony를 형성할 경우 열처리등 외부 환경에 대한 내성이 강해져 식품 위생상 심각한 문제를 유발할 위험이 있으므로 이에 대한 세심한 주의가 요구되며 가공 기계표면에 오염된 *L. monocytogenes*의 사멸방법에 대한 보다 효율적이고 경제적인 연구가 광범위

하게 수반되어야 할 것으로 판단되었다.

## 요 약

*Listeria monocytogenes* Scott A의 성장 조건에 따른 생존과 세포의 상태에 따른 열저항성을 검토한 결과 NSM(30 g TSB/1l D.W.), LMN(2 g TSB/1l D.W.) 그리고 phosphate buffer에서의 *L. monocytogenes* Scott A의 생존은 phosphate buffer에서 다른 배지에서보다 급격히 감소하였으나 15일간 생존이 가능하였으며 35°C 보다 21°C 에서 생존이 더 양호하였다. 정상세포(vegetative cell)와 영양결핍세포(starved cell)의 열저항성은 65°C 에서 5분간 열처리 후 생존하였으나 72°C 에서 5분 처리 후 검출되지 않았다. Attached single cell의 열저항성은 65°C 에서 5분 처리 후 거의 사멸하였고 adherent microcolony는 72°C 에서 3분간 열처리에 도 완전히 사멸하지 않았으며 5분간 처리 후 완전 사멸하였다. 영양결핍세포는 정상세포보다, adherent microcolony는 attached single cell보다 열저항성이 강한 경향을 나타내었다.

## 참고문헌

- Liewen, M.B. and M.W. Plautz. 1988. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in raw milk in Nebraska. *J. Food Prot.* **51**: 840-841.
- Faber, J.M., G.W. Sanders and M.A. Johnston. 1989. A survey of various foods for the presence of *L. monocytogenes* species. *J. Food Prot.* **52**: 456-458.
- Weagant, S.D., P.N. Sado, K.G. Colburn, J.D. Torrkelson, F.A. Stanley, M.H. Krane, S.C. Shields and C.F. Thayer. 1987. The incidence of *Listeria* species in frozen seafood products. *J. Food Prot.* **51**: 655-657.
- Schelch, W.F., P.M. Lavigne, R.A. Botolussi. 1983. Epidemic listeriosis: Evidence of transmission by food. *New England J. Medicine.* **308**: 203-206.
- Gray, M.L., A.H. Killinger. 1966. *Listeria monocytogenes* and listeric infection. *Bacteriol. Rev.* **30**: 309-338.
- Anonymous. 1987. Listeriosis outbreak associated with mexican style cheese in California. *Morbid. Mortal. Weekly Report* **34**: 57-59.
- Gitter, M., R. Bradley and P.H. Blampied. 1980. *Listeria monocytogenes* infection in bovine mastitis. *Vet. Res.* **107**: 380-393.
- Cox, L.J. 1989. *Listeria* spp in food processing

- non-food and domestic environments. *Food Microbiol.* **54**: 2492-2499.
9. Frank, J.F. and R.A. Koffi. 1990 Surface-adherent growth of *L. monocytogenes* associated with increased resistance to surfactant sanitizer and heat. *J. Food Prot.* **53**: 550-554.
  10. Lee, S.H. and J.F. Frank. 1992. Inactivation of surface-adherent *L. monocytogenes* by hypochlorite and heat. *J. Food Prot.* **54**: 1-4.
  11. Lee, S.H. and J.F. Frank. 1991. Effect of growth temperature and media on inactivation of *Listeria monocytogenes* by chlorine. *J. Food Safety.* **11**: 65-70.
  12. Lechevallier, M.W. and R.G. Lee. 1988. Inactivation of biofilm bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 2492-2499.
  13. Garayzabal, J.F.F. 1987. Survival of *Listeria monocytogenes* in raw milk treated in a pilot plant size pasteurizer. *J. Appl. Bacteriol.* **63**: 533-537.
  14. Ryser, E.T., E.H. Marth and M.P. Doyle. 1985. Survival of *L. monocytogenes* during manufacture and storage of cottage cheese. *J. Food Prot.* **48**: 746-750.
  15. Postgate, J.R. and J.R. Hunter. 1962. The survival of starved bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **29**: 233-263.
  16. Boylen, C.W. and M.H. Mulks. 1978. The survival of Coryneform bacteria during periods of prolonged nutrient starvation. *J. Gen. Microbiol.* **105**: 323-334.
  17. Armstrong, D. 1983. *Listeria monocytogenes*. In Principles and practices of infectious disease. 2nd ed. p.1177. John Wiley and Sons. New York.
  18. Hammond, S.M., P.A. Lambert and A.N. Rycroft. 1981. Walls of gram-positive bacteria. pp. 29-56. In The bacterial cell surface. Kapitan Szabo publ., Washington, D.C.

(Received March 22, 1993)