pISSN 1229-1153 *J. Fd Hyg. Safety*
Vol. 28, No. 3, pp. 279~285 (2013)
http://dx.doi.org/10.13103/JFHS.2013.28.3.279

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

농산물 중 식중독세균 검출을 위한 전처리법 확립

김세리[1] · 최송이[1] · 서민경[1] · 이지영[2] · 김원일[1] · 윤요한[3] · 류경열[4] · 윤종철[1] · 김병석[5]*

[1]농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부 유해생물팀, [2]경인지방식품의약품안전청 수입관리과
[3]숙명여자대학교 식품영양학과, [4]농촌진흥청 연구정책국 연구성과관리과, [5]농촌진흥청 국립농업과학원 기획조정과

Establishment of Sample Preparation Method to Enhance Recovery of Food-borne Pathogens from Produce

Se-Ri Kim[1], Song-Yi Choi[1], Min-Kyoung Seo[1], Ji-Young Lee[2], Won-Il Kim[1], Yohan Yoon[3], Kyoung Yul Ryu[4], Jong-Cul Yun[1], and Byung-Seok Kim[5]*

[1]*Department of Agro-Food Safety, NAAS, RDA*
[2]*Import Management Division, Gyeongin Regional Food & Drug Administration*
[3]*Department of Food &Nutrition, Sookmyung Women's University*
[4]*R&D Evaluation Division, Research Policy Bureau, RDA*
[5]*Planning & Coordination Division, NAAS, RDA*

(Received July 1, 2013/Revised September 3, 2013/Accepted September 12, 2013)

ABSTRACT - To establish sample preparation method for detection of food-borne pathogens from lettuce, perilla leaves, cucumber, pepper, and cherry tomato, the influences of diluent composition, processing time, and proportion of diluent to sample were examined. Each produce was inoculated with 6.0 log CFU/cm^2 of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, and *Bacillus cereus*. Each produce was treated with 0.1% peptone water, and D/E neutralizing broth. Processing time of produce was 30, 60, 90, and 120s, and the proportion of diluent to sample was 2 : 1, 4 : 1, 9 : 1, and 19 : 1. The number of bacteria after treatment of D/E neutralizing broth was higher than that of 0.1% peptone water ($P < 0.05$). In cherry tomato, the population of *S*. typhimurium recovered from treated with D/E broth was higher than that recovered from treated with 0.1% peptone water by 1.05 log CFU/cm^2 ($P < 0.05$). No difference in numbers of pathogens was observed in processing time. Optimum proportion of diluent to perilla leaf, iceberg lettuce, cucumber, green pepper, and tomato was 9 : 1, 4 : 1, 2 : 1, 2 : 1, and 2 : 1, respectively. These data suggest that D/E neutralizing broth should be recommend as diluent, and the diluent volume applied to produce should be determined in proportion to produce surface area per weight (g).

Key words: Foodborne pathogen, Sample preparation method, Produce

최근 국민소득증가와 생활수준향상으로 건강에 대한 관심이 커져 조리하지 않고 바로 섭취하는 농산물의 소비가 대폭 증가하고 있다[1]. 비가열 농산물은 여러 가지 생리기능성이 유지되는 장점이 있으나 농산물에 존재하는 미생물은 제어되지 않는 문제가 있다[2]. 특히 엽채류는 표면적이 넓고 생산 과정 중 주변환경과 접촉 빈도가 높아 유해미생물에 오염되기 쉬우며 최근에는 엽채소의 섭취로 인한 식중독발생이 국내외적으로 보고되고 있다. 미국의 경우 1996년부터 2008년까지 농산물과 관련된 식중독이 82건 발생하였으며 그 중 엽채소와 관련된 사고는 28건이었다[3]. 엽채류에 의한 식중독사고의 예로는 미국에서 2006년에 *Escherichia coli* O157:H7에 오염된 시금치가 원인이 되어 발생한 식중독 사고를 들 수 있으며 이 사고로 199명 이상의 환자가 발생하였고 3명이 사망하였다[4]. 그 외에도 영국에서 발생한 *Salmonella* Thompson에 오염된 상추로 인한 식중독과 덴마크에서 발생한 *Salmonella* Anatum에 의해 오염된 바질에 의한 식중독 등이 있다[5]. 또한 국내에서는 농산물이 직접적인 원인이 되어 식중독이 발생한 사례가 많이 보고되고 있지는 않지만 농산물에서 *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* spp. 등이 검출되었다는 보고가 있어 국내에서도 농산물의 유해미생물 관리가 시급하다[6,7].

*Corresponding author: Byung-Seok Kim, Planning & Coordination Division, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, 249, Sedun-dong, Gwonseon-gu, Suwon-si, Gyeonggi-do 441-707, Korea
Tel: 82-31-290-0512, Fax: 82-31-290-0105
E-mail: kim2000@korea.kr

유해미생물에 의한 식중독을 예방하기 위해서는 신속 정확하게 세균의 존재 여부를 분석하는 것이 중요하다. 이런 이유로 생화학적・면역학적・분자생물학적 원리에 기초한 다양한 진단기술들이 개발되어왔다. 진단기술들의 정확성을 결정짓는 요인 중 하나가 시료 전처리이다[8]. 하지만 시료 전처리가 분석에서 중요한 부분을 차지함에도 불구하고 이에 대한 부분에 대한 연구는 아직 미흡한 실정이다. 특히 농산물은 식품과 달리 중량당 표면적, 표면의 성질, pH 등이 다양하여 FDA메뉴얼이나 식품공전상에서 추천하는 25 g의 시료에 225 ml의 전처리 용액을 가하여 균질화하는 방법을 일률적으로 적용하기 어렵다[8,9]. 또한 농산물을 대상으로 식중독균을 분석하기 위한 전처리법은 분석기관, 연구자마다 전처리용액, 전처리기기(stomacher, pulsyfier, sonication, handshaking, rubbing), 전처리시간, 전처리용액과 시료의 비율 등을 다양하게 적용하고 있어 연구결과를 국가간, 실험실간 비교하는데도 어려움이 있다[10-13]. 이에 Burnett[8] 등은 농산물의 표면특성, 내부 구성물질, pH등에 따라 그룹을 나누고 그룹별로 전처리방법을 표준화하는 것이 필요하다고 보고하였다.

따라서 본 연구에서는 농산물 중 식중독세균 분석의 정확성을 제고하고 전처리법을 표준화하기 위하여 표면의 성질과 pH가 서로 다른 농산물 5종 (들깻잎, 양상추, 오이, 고추, 토마토)을 대상으로 최적의 전처리용액, 전처리시간, 전처리용액과 시료의 비율을 결정하고자 수행하였다.

재료 및 방법

균주 준비

엽채류와 과채류의 전처리법에 확립에 사용된 균주는 *E. coli* O157:H7 (ATCC 43889), *Salmonella* Typhimurium (ATCC 19585), *B. cereus* (ATCC 10876), *S. aureus* (ATCC 23235), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111)를 사용하였다. 각 균주는 시료 중 존재하는 background microflora의 생육을 억제하고자 대상 균주를 rifampicin 저항성을 유도하였다. Rifampicin 저항성 유도는 tryptic soy agar (TSA; Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England)에서 배양 균주 1 loop 취하여 50 μl/ml의 rifampicin (R; Biosesang, Sungnam, Gyeonggi, Korea)이 함유된 7 ml의 luria bertani broth (LB, Oxoid, England)에 접종하고 37°C, 24시간 진탕배양하였다. 이후 50 μl/ml의 rifampicin이 함유된 luria bertani agar (LA; Oxoid, England)에 접종하고 37°C, 24시간 배양하여 얻었다. Rifampicin 저항성균는 20% glycerol을 함유하는 TSB-R에 현탁하여 −70°C에서 보관하였다. 사용 시에는 상온에서 해동한 후 10 μl를 취하여 7 ml의 TSB-R에 넣은 후 *E. coli* O157:H7, *S.* Typhimurium, *S. aureus*는 37°C, *B. cereus*, *L. monocytogenes*는 30°C에서 18시간 동안 배양하고 4,500 × g, 15분간 원심분리한 후 5 ml의 0.1% peptone water에 2번 세척한 후 최종 *E. coli* O157:H7, *S.* Typhimurium, *S. aureus L. monocytogenes*는 $O.D_{600}$ 1, *B. cereus*는 $O.D_{600}$ 2가 되게 phosphate buffered saline (PBS; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)에 현탁하였다. 이후 10배 희석하여 생균수가 10^8 CFU/ml이 되게 조정하였다.

시료 준비

전처리법 확립을 위한 농산물은 깻잎, 양상추, 오이, 고추, 토마토를 대상으로 하였고 이들 시료는 경기도 수원에 위치한 마트에서 구입하였다. 양상추는 외엽과 중심부를 제거한 후 멸균된 수술용 메스로 5 × 5 cm로 절단한 것 8장 (무게 20 g, 면적 200 cm^2), 들깻잎은 4장 (무게 8.5 g, 면적 450 cm^2), 오이는 3.5 ~ 4.0 cm 지름의 것을 35 g (면적 47 cm^2)이 되게 절단한 것, 고추는 무게 15 g 2개 (면적 11.3 cm^2), 방울토마토는 무게 10 g 3개 (면적 70 cm^2)를 본 연구에 사용하였다. 각 시료는 증류수로 5분 세척, 30분 물빼기 한 후 마이크로핏펫으로 1.5 μl/cm^2로 표면에 접종하였다. 이후 후드에서 1시간동안 건조시켰다.

처리용매에 따른 회수율 비교

처리용매에 따른 회수율을 비교하기 위하여 식중독균이 접종된 양상추, 들깻잎, 오이, 고추, 토마토를 stomacher백에 넣고 0.1% peptone water, D/E broth를 각각 100, 225, 50, 120, 70 ml의 0.1% peptone water를 가한 다음 stomacher로 1분간 균질화시킨 후 1 ml을 취하여 9 ml의 0.1% peptone water로 희석하였다. 각 희석농도에 대하여 200 μl씩 TSA-R agar에 접종한 후 *E. coli* O157:H7, *S.* Typhimurium, *S. aureus*는 37°C, *B. cereus*, *L. monocytogenes*는 30°C에서 24-48시간 배양한 후 집락을 계수하였다.

처리시간에 따른 회수율 비교

전처리 시간에 따른 회수율을 비교하기 위한 대상 식중독은 처리용매에 따른 식중독균 회수율 실험에서 회수율이 가장 높은 *S. aureus*와 회수율이 가장 낮은 *S.* Typhimurium을 대상으로 하였다. 처리시간에 따른 회수율 비교를 위하여 먼저 접종된 양상추, 들깻잎, 오이, 고추, 토마토를 stomacher백에 넣고 D/E broth를 각각 100, 225, 50, 120, 70 ml을 가한 다음 stomacher로 30초, 60초, 90초, 120초간 균질화 시켰다. 이후 1 ml의 검액를 취하여 9 ml의 0.1% peptone water로 희석한 후 각 희석농도에 대하여 200 μl씩 TSA-R agar에 접종한 후 37°C, 24-48시간 배양한 후 집락을 계수하였다.

시료중량과 전처리용액의 비율에 따른 회수율 비교

농산물은 중량 당 면적의 편차가 식품보다 월등이 크다. 따라서 전처리용액 비율을 결정하기 전에 농산물의 무게 당 면적을 서로 비교하였다. 대상 농산물은 들깻잎, 양상추, 오이, 고추, 방울토마토이며 들깻잎과 양상추는 한 장씩 엽면적계(Li-3100C, Li-Cor, Lincoln, NE, USA)에 올려 측정하였고 오이는 필링하고 그것을 종이위에 올려 똑같이 그린다음 그린 그림을 엽면적계에 올려 측정하였다. 또한 고추와 토마토는 2조각으로 세로로 절단한 후 종이 위에 올려놓고 그린다음 그린 그림을 엽면적계에 올려놓고 측정하였다.

시료 중량과 전처리용액의 비율을 결정하기 위하여 *S. aureus*와 *S.* Typhimurium이 접종된 각 시료를 stomacher bag에 넣고

D/E broth를 무게의 1 : 2, 1 : 4, 1 : 9, 1 : 19를 가한 다음 stomacher로 1분간 균질화 시킨 후 1 ml의 시료를 취하여 9 ml의 0.1% peptone water로 희석한 후 각 희석농도에 대하여 200 μl씩 TSA-R agar에 접종한 후 37°C, 24-48시간 배양한 후 집락을 계수하였다.

통계처리

모든 실험은 3반복으로 수행되었으며 관찰된 실험결과는 SAS 통계 프로그램(version 9.1, SAS Institute, NC, USA)의 ANOVA procedure를 이용하여 분석되었다. 각각의 처리군이 통계적으로 유의적으로 나타나는 경우에($p < 0.05$) 평균값은 Tukey test를 통하여 다중비교를 하였다.

결과 및 고찰

처리 용매 및 처리시간에 따른 농산물에서 병원성 미생물의 회수율 비교

처리 용매에 따른 농산물에서 병원성 미생물의 회수율 비교 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다. 농산물 종류, 처리용매 및 식중독균에 따라 회수율의 차이가 있었다($P < 0.05$). 농산물별로는 양상추에서 17.8% ~ 129.2%로 가장 높았고, 방울토마토에서 0.9% ~ 75.0%로 가장 낮았다. 또한 식중독세균별로는 *S. aureus*, *L. monocytogenes*가 *S.* Typhimurium, *E. coli* O157:H7보다 높은 회수율을 보였다. 이렇게 낮은 회수율의 원인은 식중독균들이 농산물과의 결합강도, 농산물 중의 essential oil, 페놀성물질 등의 항균물질, 균주 접종 후 건조에 의한 사멸이라고 보고하고 있다[8,9,14,15]. Kim[15] 등은 낮은 회수율의 원인을 구명하고자 농산물의 구성 성분과 접종 후 건조과정이 회수율에 미치는 영향을 조사하였다. 이를 위하여 Kim[15] 등은 양상추, 고추, 오이, 들깻잎, 방울토마토 추출물에 *E. coli* O157:H7, *S.* Typhimurium, *B. cereus*, *S. aureus*, 및 *L. monocytogenes*을 각각 접종하여 농산물의 성분이 회수율에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 방울토마토 외에 다른 농산물 추출물은 회수율에 영향을 미치지 않았고 방울토마토 추출물에서 식중독세균이 약간 감소하여 방울토마토의 낮은 pH가 회수율에 영향을 미친다고 보고하였다[15]. 또한 5종의 농산물에 5종의 식중독세균을 접종한 후 상대습도 40%와 90%에 농산물을 저장하면서 접종 후 건조가 회

Table 1. Effect of diluent composition on recovery of *E. coli* O157:H7, *S.* Typhimurium, *L. monocytogenes*, *B. cereus*, and *S. aureus* from perilla leaf, iceberg lettuce, cucumber, green pepper, and cherry tomato

Produce	Pathogens	0.1% Peptone water		D/E neutralizing broth	
		Bacteria recovered (log CFU/cm^2[(1)])	Recovery yield (%)	Bacteria recovered (log CFU/cm^2)	Recovery yield (%)
Perilla leaf	*S.* Typhimurium	3.64 ± 0.11a[(2)]	2.2	4.13 ± 0.11b	6.6
	E. coli O157:H7	3.75 ± 0.02a	3.3	4.25 ± 0.12b	10.8
	L. monocytogenes	5.03 ± 0.03a	35.0	5.08 ± 0.07a	40.3
	S. aureus	5.47 ± 0.08a	50.8	5.59 ± 0.06a	68.2
	B. cereus	4.44 ± 0.03a	5.7	5.13 ± 0.04b	27.8
Iceberg lettuce	*S.* Typhimurium	4.72 ± 0.15a	29.1	4.65 ± 0.13a	24.4
	E. coli O157:H7	4.69 ± 0.20a	24.3	4.51 ± 0.27a	17.8
	L. monocytogenes	5.47 ± 0.05a	111.9	5.42 ± 0.11a	99.5
	S. aureus	6.11 ± 0.13a	129.2	5.88 ± 0.10a	96.6
	B. cereus	5.29 ± 0.14a	32.0	5.49 ± 0.09a	49.6
Cucumber	*S.* Typhimurium	4.41 ± 0.10a	12.9	5.08 ± 0.07b	57.9
	E. coli O157:H7	4.11 ± 0.11a	6.4	4.29 ± 0.26a	11.9
	L. monocytogenes	5.24 ± 0.04a	65.4	5.26 ± 0.03a	68.5
	S. aureus	5.99 ± 0.06a	119.2	5.79 ± 0.04a	75.6
	B. cereus	5.17 ± 0.13a	23.9	5.18 ± 0.30a	28.2
Green pepper	*S.* Typhimurium	4.29 ± 0.15a	9.2	4.67 ± 0.10b	23.4
	E. coli O157:H7	4.02 ± 0.15a	5.1	4.30 ± 0.06b	9.4
	L. monocytogenes	5.26 ± 0.06a	69.3	5.37 ± 0.02b	87.4
	S. aureus	5.82 ± 0.08a	82.1	5.75 ± 0.02a	68.8
	B. cereus	4.45 ± 0.09a	4.5	4.80 ± 0.15b	10.4
Cherry tomato	*S.* Typhimurium	3.22 ± 0.21a	0.9	4.25 ± 0.44b	16.2
	E. coli O157:H7	3.50 ± 0.05a	1.5	4.34 ± 0.25b	10.9
	L. monocytogenes	4.15 ± 0.21a	5.6	4.76 ± 0.10b	22.2
	S. aureus	5.80 ± 0.09a	75.0	5.69 ± 0.12a	59.7
	B. cereus	3.97 ± 0.17a	1.6	4.82 ± 0.10b	10.5

[(1)]Data are presented as means ± standard deviations (SD).

[(2)]Means with different letters within a row are significantly different ($P < 0.05$)

Table 2. Effect of treatment time on recovery of *E. coli* O157:H7, *S.* Typhimurium, *L. monocytogenes*, *B. cereus*, and *S. aureus* from perilla leaf, iceberg lettuce, cucumber, green pepper, and cherry tomato

Produce	Pathogens	Treatment time (s)	Bacteria recovered (log CFU/cm$^{2(1)}$)	Recovery yield (%)
Perilla leaf	*S. aureus*	30	4.86 ± 0.03a$^{(2)}$	28.3
		60	4.79 ± 0.05a	23.4
		90	4.76 ± 0.03a	22.1
		120	4.81 ± 0.02a	25.0
	S. Typhimurium	30	3.40 ± 0.06a	0.8
		60	3.40 ± 0.12a	0.9
		90	3.46 ± 0.03a	1.0
		120	3.44 ± 0.08a	0.9
Iceberg lettuce	*S. aureus*	30	5.02 ± 0.03a	60.6
		60	4.95 ± 0.08a	51.9
		90	5.04 ± 0.06a	64.0
		120	5.03 ± 0.06a	62.5
	S. Typhimurium	30	5.12 ± 0.05a	49.8
		60	5.09 ± 0.09a	46.9
		90	5.15 ± 0.09a	56.1
		120	5.21 ± 0.03a	61.8
Cucumber	*S. aureus*	30	4.71 ± 0.07a	63.3
		60	4.72 ± 0.08a	61.3
		90	4.77 ± 0.08a	74.9
		120	4.80 ± 0.08a	75.7
	S. Typhimurium	30	4.36 ± 0.30a	13.6
		60	4.24 ± 0.06a	7.7
		90	4.24 ± 0.07a	7.6
		120	4.33 ± 0.06a	9.3
Green pepper	*S. aureus*	30	4.88 ± 0.12a	38.3
		60	4.92 ± 0.02a	40.1
		90	4.88 ± 0.05a	37.2
		120	4.87 ± 0.07a	35.5
	S. Typhimurium	30	5.00 ± 0.02a	40.0
		60	5.00 ± 0.04a	39.7
		90	5.01 ± 0.02a	41.4
		120	4.98 ± 0.04a	37.8
Cherry tomato	*S. aureus*	30	4.45 ± 0.15a	23.8
		60	4.44 ± 0.19a	24.0
		90	4.39 ± 0.19a	20.4
		120	4.54 ± 0.10a	27.5
	S. Typhimurium	30	3.96 ± 0.05a	3.6
		60	3.96 ± 0.07a	3.6
		90	3.95 ± 0.09a	3.5
		120	3.99 ± 0.07a	3.9

$^{(1)}$Data are presented as means ± standard deviations (SD).
$^{(2)}$Means with different letters within a row are significantly different ($P < 0.05$)

수율에 미치는 영향을 조사하였으며 그 결과 90% 상대습도에서는 2시간동안 세균의 종류, 농산물의 종류와 관계없이 높은 회수율을 보인데 반해 40% 상대습도에서 1시간 내에 들깻잎, 토마토에서 *S.* Typhimurium, *E. coli* O157:H7, *B. cereus*가 2 log CFU/g 정도 사멸하였다[15]. 이렇게 농산물에 따른 회수율의 차이는 농산물종류에 따라 표면에서 건조되는 속도의 차이에 의한 것이라고 Burnett[8] 등은 보고하였다. 또한 *S. aureus*와 *L. monocytogenes*이 *E. coli* O157:H7과 *S.* Typhimurium보다 높은 회수율을 보인 것은 *S. aureus*와 *L. monocytogenes*와 같은 그람양성균은 그람음성균에 비하여 두꺼운 peptidoglycan층을 가

지고 있어 건조 스트레스에 저항성이 큰 것으로 판단된다[16]. 따라서 농산물에 식중독균을 접종하여 실험하는 경우에는 접종 후 건조 스트레스에 대한 부분이 고려되어야 할 것으로 판단된다.

처리 용매에 따른 농산물에서 회수율을 비교한 결과, 양상추에서는 균주에 관계없이 유의차가 없었으며 *S. aureus*는 시료에 관계없이 유의차가 없었으나($P > 0.05$) 오이의 경우 *S.* Typhimurium에서만 D/E broth 처리시 0.67 log CFU/cm^{2}정도 회수율이 높았다($P < 0.05$). 또한 고추의 경우 *S. aureus*를 제외하고 타 세균에서는 약 0.3 log CFU/cm^2 정도 D/E broth 처리시 회수율이 높았으며 토마토의 경우 *S. aureus*를 제외하고 타 세균에서는 0.61 ~ 1.13 log CFU/cm^{2}정도 D/E broth처리시 회수율이 높게 나타났다($P < 0.05$). 토마토의 경우 stomacher 처리후 pH가 4.3 이였으나 D/E broth처리 후 6.25로 pH가 중화되는 것을 확인하였다. 따라서 D/E broth는 건조와 산 스트레스를 받은 세균들을 일부 회복시키는 역할을 하는 것으로 판단된다.

한편, 농산물의 전처리시간에 따른 농산물 중 병원성미생물 회수율을 비교한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같이 시간에 따른 유의차는 없었다. 따라서 시간은 병원성미생물의 회수율에 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다.

전처리 용액과 농산물의 비율에 따른 병원성미생물 회수율 비교

농산물은 농산물의 무게에 따른 표면적을 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 들깻잎은 55.4 cm^2/g, 양상추는 12.0 cm^2/g, 오이는 1.0 cm^2/g, 고추는 3.4 cm^2/g, 토마토는 1.8 cm^2/g 으로 g 당 면적이 10 ~ 20배 이상 차이가 있어 농산물은 식품과 달리 g당 표면적에 차이가 크다는 것을 알 수 있다. 식품공전법[17]으로 25 g을 취해서 225 ml의 전처리용액을 가할 경우 들깻잎과 같이 표면적이 큰 시료는 전처리용액과 충분히 접촉하지 못하여 부착된 미생물이 전처리용액 속으로 분리되지 못하고, 토마토와 같이 면적이 적은 시료는 지나치게 희석되는 문제가 발생할 수 있다. 따라서 농산물 중 식중독세균 분석을 위한 시료 전처리시 시료와 전처리 용액의 최적 비율을 적용하는 것이 분석의 정확성과 효율성을 높일 수 있다.

따라서 최적의 전처리 용액과 농산물의 비율을 결정하고자 농산물 5종에 대하여 전처리 용액과 농산물의 비율에 따른 병원성 미생물의 회수율을 비교하였다. 그 결과 Table 3에서 보는 바와 같이 들깻잎과 D/E broth의 비율을 1 : 2, 1 : 4, 1 : 9, 1 : 19로 각각 처리하였을 때 회수된 *S. aureus*의 수는 4.08, 4.31, 4.71, 4,71 log CFU/cm^2, *S.* Typhimurium수는 2.78, 3.08, 4.04, 3.89 log CFU/cm^{2}로 1 : 9까지는 희석비율이 증가할수록 회수된 세균의 농도가 높아지는 경향이 있었다. 또한 양상추의 경우는 시료와 D/E broth의 비율이 1 : 2, 1 : 4, 1 : 9, 1 : 19일 때 회수된 *S. aureus*의 수는 4.90, 5.34, 5.31, 5.27, 이었고, *S.* Typhimurium은 4.79, 5,14, 5.15, 5.29 log CFU/cm^{2}로 양상추의 경우는 1 : 4, 1 : 9, 1 : 19 처리 간에 유의적인 차이는 없었다($P > 0.05$). 한편, 오이, 고추, 토마토와 같이 g 당 표면적이 적은 농산물은 처리간 회수된 세균수의 유의적인 차이가 없었다 ($P > 0.05$). 따라서 시료와 전처리용액의 최적의 비율은 들깻잎 1 : 9 양상추 1 : 4, 오이, 고추, 토마토는 1 : 2로도 충분할 것으로 보인다.

요 약

본 연구는 농산물 중 식중독세균 검출을 위한 시료 전처리법을 확립하기 위하여 전처리용액, 전처리 시간, 전처리용액과

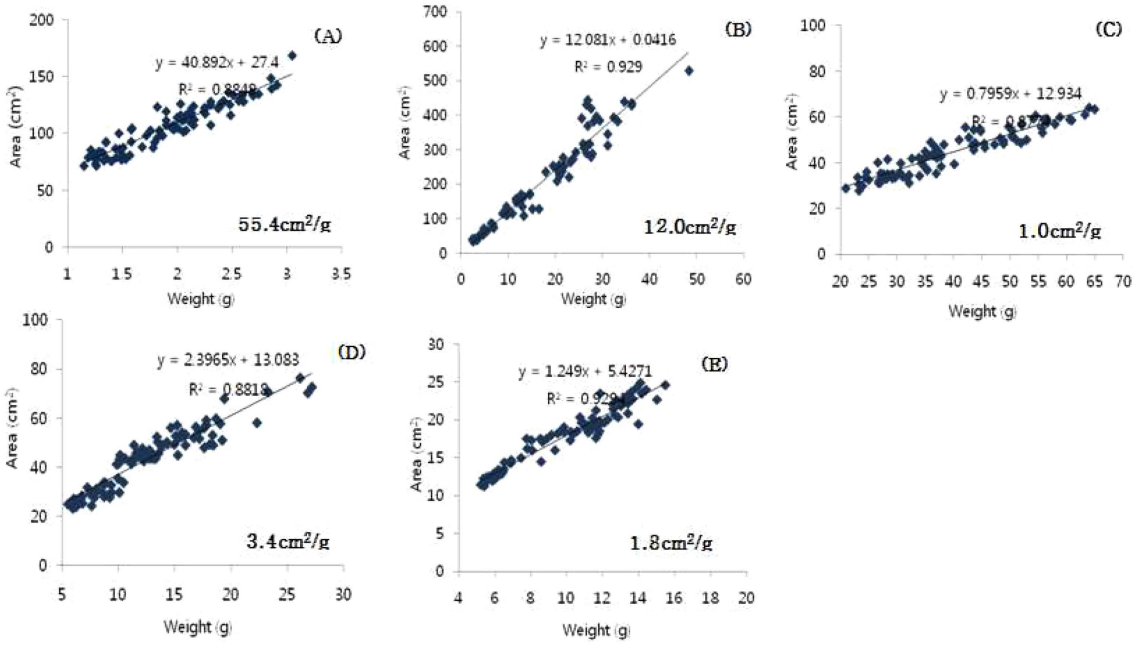

Fig. 1. Relationship of weight versus surface area of perilla leaf (A), iceberg lettuce (B), cucumber (C), green pepper (D), and cherry tomato (E).

Table 3. Effect of proportion of sample to diluent on recovery of *E. coli* O157:H7, *S.* Typhimurium, *L. monocytogenes*, *B. cereus*, and *S. aureus* from perilla leaf, iceberg lettuce, cucumber, green pepper, and cherry tomato

Produce	Pathogens	Sample : diluent (g : ml)	Bacteria recovered (log CFU/cm$^{2(1)}$)	Recovery yield (%)
Perilla leaf	*S. aureus*	1 : 2	4.08 ± 0.04a$^{(2)}$	7.5
		1 : 4	4.31 ± 0.10b	12.8
		1 : 9	4.71 ± 0.15c	32.9
		1 : 19	4.71 ± 0.02c	31.9
	S. Typhimurium	1 : 2	2.78 ± 0.23a	0.1
		1 : 4	3.08 ± 0.07a	0.1
		1 : 9	4.04 ± 0.21b	1.4
		1 : 19	3.89 ± 0.05b	0.8
Iceberg lettuce	*S. aureus*	1 : 2	4.90 ± 0.06a	18.0
		1 : 4	5.34 ± 0.09b	48.6
		1 : 9	5.31 ± 0.04b	45.9
		1 : 19	5.27 ± 0.05b	41.1
	S. Typhimurium	1 : 2	4.79 ± 0.12a	14.7
		1 : 4	5.14 ± 0.18b	35.3
		1 : 9	5.15 ± 0.10b	34.2
		1 : 19	5.29 ± 0.15b	50.2
Cucumber	*S. aureus*	1 : 2	5.01 ± 0.03a	37.0
		1 : 4	4.89 ± 0.10a	27.7
		1 : 9	4.80 ± 0.06a	22.2
		1 : 19	4.79 ± 0.07a	21.6
	S. Typhimurium	1 : 2	4.69 ± 0.13a	9.8
		1 : 4	4.70 ± 0.01a	9.7
		1 : 9	4.57 ± 0.08a	7.4
		1 : 19	4.64 ± 0.09a	8.6
Green pepper	*S. aureus*	1 : 2	5.27 ± 0.09a	50.0
		1 : 4	5.17 ± 0.09a	40.5
		1 : 9	5.17 ± 0.10a	40.5
		1 : 19	5.14 ± 0.15a	37.4
	S. Typhimurium	1 : 2	4.80 ± 0.03a	18.8
		1 : 4	4.77 ± 0.11a	18.0
		1 : 9	4.71 ± 0.01a	15.4
		1 : 19	4.75 ± 0.09a	17.0
Cherry tomato	*S. aureus*	1 : 2	4.60 ± 0.04a	24.6
		1 : 4	4.58 ± 0.02a	23.6
		1 : 9	4.45 ± 0.03a	17.6
		1 : 19	4.70 ± 0.04a	31.6
	S. Typhimurium	1 : 2	4.72 ± 0.14a	9.6
		1 : 4	4.59 ± 0.10a	7.6
		1 : 9	4.87 ± 0.10a	14.4
		1 : 19	4.61 ± 0.16a	7.8

[(1)]Data are presented as means ± standard deviations (SD).
[(2)]Means with different letters within a row are significantly different ($P < 0.05$)

시료의 비율에 따른 회수율을 비교하였다. 이를 위하여 양상추, 들깻잎, 오이, 고추, 방울토마토에 *E. coli* O157:H7, *S.* Typhimurium, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. cereus*를 6.0 log CFU/cm^{2}로 접종하고 0.1% 펩톤수와 D/E broth로 처리하였다. 또한 처리시간은 30, 60, 90, 120초, 시료와 전처리용액의 비율은 1 : 2, 1 : 4, 1 : 9, 1 : 19로 각각 처리하였다. 그 결과, D/E broth로 처리하였을 때 0.1% 펩톤수로 처리하였을 때에 비하여 전반적으로 식중독균의 회수율이 높았다($P < 0.05$). 특히 방울토마토의 경우, D/E broth로 처리한 구의 *S.* Typhimurium의 수는 0.1% 펩톤수로 처리한 구 보다 1.05 log CFU/cm^2 높았다($P < 0.05$). 또

한 들깻잎, 양상추, 오이, 고추, 토마토와 전처리용액의 최적 비율은 1 : 9, 1 : 4, 1 : 2, 1 : 2, 1 : 2였다. 한편, 처리시간에 따른 회수율의 유의적인 차이는 없었다. 따라서 본 연구 결과를 통해 볼 때 농산물 중 식중독균 검출을 위한 전처리용액은 D/E broth가 적절한 것으로 판단되며 표면적에 따라 시료와 전처리용액의 비율을 결정하는 것이 분석의 정확성을 높일 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업인 농식품 중 유해미생물 안전관리기반기술 개발(과제번호 : PJ009533)의 지원에 의해 이루어진 것임.

참고문헌

1. KIM, G.H. and Bang, H.Y.: A survey on consumption pattern of minimally fruits and vegetables. *Korean J. Food Culture*, **13**, 267-274 (1998).
2. Choi, J.W., Park, S.Y., Yeon, J.H., Lee, M.J., Chung, D.H., Lee, K.H., Kim, M.G., Lee, D.H., Kim, K.S. and Ha, S.D.: Microbial contamination levels of fresh vegetables distributed in markets. *Korean J. Fd. Hyg. Safety*, **20**, 43-47 (2005).
3. FDA: Guidance for Industry: Guide to Minimize Microbial Food Safety Hazards of Leafy Greens; Draft Guidance. Available from: http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/ProduceandPlanProducts/ucm174200.html. Accessed Jan. **15**, 2010 (2009).
4. CDC: Update on Multi-State Outbreak of *E. coli* O157:H7 Infections From Fresh Spinach, October 6, 2006. Available from: http://www.cdc.gov/ecoli/2006/september/updates/100606.html. Accessed Feb. **20**, 2010 (2006).
5. Patel, J. and Sharma, M.: Differences in attachment of *Salmonella enteric* serovars to cabbage and lettuce leaves. *Int. J. Food Microbiol*. **139**, 41-47 (2010).
6. Kim, S.H., Kim, J.S., Choi, J.P., and Park, J.H.: Prevalence and frequency of food-borne pathogens on unprocessed agaricultural and marine products. *Korean J. Food Sci. Technol*., **38**, 594-598 (2006).
7. Kim, J.S., Bang, O.K. and Chang, H.C.: Examination of microbiological contamination of ready-to-eat vegetable salad. *J. Fd. Hyg. Safety,* **19**, 60-65 (2004).
8. Burnett, A.B. and Beuchat, L.R: Comparison of sample preparation methods for recovering *Salmonella* from raw fruits, vegetables, and herbs. *J. Food Prot.* **64**, 1459-1465 (2001).
9. Food and Drug Administration: Analysis and Evaluation of Preventive Control Measures for the Control and Reduction/Elimination of Microbial Hazards on Fresh and Fresh-Cut Produce. Available at: http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/ResearchAreas/SafePracticesforFoodProcesses/ucm090977.html. Accessed 5 June 2009 (2001).
10. Arthur, L., Jones, S., Fabri, M. and Odumeru, J.: Microbial survey of selected Ontario-grown fresh fruits and vegetables. *J. Food Prot.* **70**, 2864-2867 (2007).
11. Bari, M.L., Sabina, Y., Isobe, S., Uemura, T. and Isshiki. K.: Effectiveness of electrolyzed acidic water in killing *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Enteritidis, and *Listeria monocytogenes* on the surfaces of tomatoes. *J. Food Prot.*, **66**, 542-548 (2003).
12. Thunberg, R.L., Tran, T.T., Bennett, R.W., Matthews, R.N. and Belay, N.: Microbial evaluation of selected fresh produce obtained at retail markets. *J. Food Prot.,* **65**, 677-682 (2002).
13. Zhang, S. and Farber. J.M.: The effects of various disinfectants against *Listeria monocytogenes* on fresh-cut vegetables. *Food Microbiol.*, **13**, 311-321 (1996).
14. Karapimar, M. and Aktug. S.E.: Inhibition of food borne pathogens by thymol, eugenol, menthol and anethole. *Int. J. Food Microbiol*., **4**, 161-166 (1987).
15. Kim, S.R., Yoon, Y., Kim, W.I., Park, K.H., Yun, H.J., Chung, D.H., Yun, J.C. and Ryu, K.Y.: Comparison of Sample Preparation Methods for the Recovery of Food-borne Pathogens from Fresh Produce. *J. Food Prot.*, **75**, 1213-1218 (2012).
16. Takahashi, H., Kuramoto, S. Miya, S. and Kimura. B.: Desiccation survival of *Listeria monocytogenes* and other potential food borne pathogens on stainless steel surfaces is affected by different food soils. *Food Control*, **22**, 633-637 (2011).
17. KFDA: Korean Food code. Korea Food and Drug Administration, Osong, Korea. pp.5-29-34 (2012).