유통 중인 축산물에 대한 *Salmonella* 오염도 분석 및 분리균의 유전체특성 분석

Monitoring of *Salmonella* contamination level during livestock food distribution and whole genome sequencing of food isolates

곽승해, 김진희, 박미정, 오세욱*

Seung-Hae Gwak, Jin-Hee Kim, Mi-Jung Park, Se-Wook Oh*

국민대학교 식품영양학과

Department of Food and Nutrition, Kookmin University, Seoul 02707, Korea

Ⅰ. 서론

살모넬라는 Enterobacteriaceae에 속하는 rod-shaped gram-negative 세균이다. 살모넬라는 *Salmonella enterica*와 *Salmonella bongori*의 2개의 속으로 나누어지는데, *S. enterica*는 type culture로 이후 2,600 serotype을 포함하는 6개의 subspecies로 나누어진다(Su, L.H., 2007). 살모넬라는 포자를 형성하지 않으며, peritrichous flagella를 가지는 운동성이 있는 균주이다. 살모넬라는 유기물의 산화, 환원 과정을 통하여 에너지를 얻는 chemotrophs이며, 편성혐기성이기 때문에 산소의 유무와 상관없이 ATP를 생산할 수 있다(Fàbrega, A. 2013). 살모넬라는 intracelluar pathogen으로 동물에서 사람으로, 그리고 사람에서 동물로 전달될 수 있는 인수공통균이다(Jantsch, J., 2011). 대부분의 식중독은 사람의 변이나 동물의 변에 의해 오염된 식품을 섭취함으로서 발생한다. 살모넬라의 serotype은 typhoidal과 nontyphoidal의 2개의 그룹으로 나누어지는데, nontyphoidal serotype이 좀 더 흔한 편으로 심각하지 않은 식중독을 유발하지만, *S. typhi*와 *S. paratyphi* A를 포함하는 typhoidal serotype은 사람에게만 질병을 유발한다(Ryan, I.K.J., 2004).

연구자에 의하면 2008년~2012년 5년간 국내 축산식품에서 식중독발생과 가장 연루된 원인균은 살모넬라로 5년간 23건이 발생하였다고 하였다(윤기선, 2015). 살모넬라 식중독을 일으키는 원인식품은 대부분 축산식품으로 다른 식품에 비해 부패 및 변질이 쉽고 또한 분변에 존재하는 살모넬라에 의해 직접적 또는 간접적으로 오염되기 쉽다(Lund, B.M., 2000). 그중에서도 계란이 9건으로 가장 많았다고 하였으며 축산식품에서 또한 계란이 주요 원인이 된다는 사실은 전 세계적으로 발생하는 식중독의 경향도 비슷하였다고 하였다(우용구, 2007).

따라서 본 원고에서는 축산식품 유통 과정 중 살모넬라 오염 가능성이 높은 것으로 추정되는 식품군의 선발과 대

* Corresponding author: Se-Wook Oh
Department of Food and Nutrition, Kookmin University
Tel: +82-910-5778 Fax: 02-910-5249 E-mail: swoh@kookmin.ac.kr

상 식품에 대한 모니터링 및 분리균주에 대한 확인방법 및 분자유전학적 정보를 축적하기 위한 유전체 분석 방법에 대하여 기술하고자한다.

II. 본론

1.유통과정 중 살모넬라균 주요 오염 가능 식품

계란이나 닭과 오리와 같은 가금류는 사람의 주요 영양 공급원으로서 높은 가치를 갖지만 동시에 살모넬라균의 주요 매개체이다. 국내에서는 가금류와 같은 축산물의 안전성 확보를 위하여 Hazard Analysis Critical Control Point(HACCP) 프로그램을 도입하여 2003년 7월 1일 이후 닭 도축장 전체 및 일부 사육 농가에 대해 적용하고 있다. 그렇지만 HACCP 인증 후 위생 상태의 개선 여부를 검증하는 제도가 부재하고, 도축장을 제외한 작업장 내 위해요소 지정이 자율적으로 운영됨에 있어 가금 유래 식중독 발생의 통제가 어려울 수도 있는 실정이다.

FAO/WHO는 2002년 닭고기나 계란과 같은 가금류나 가금류 생산물을 통하여 발생한 식중독 사례가 유럽에서 발생한 식중독의 약 26%에 달하며, 이 중 77.1%가 살모넬라가 원인이라고 하였다. 2009년 미국의 CDC(Centers for Disease Control and Prevention)가 발표한 '원인별 식중독 발생건수 및 10만명 당 발생건수'에 대한 통계자료에 따르면 1위가 살모넬라로 7,039건으로 발생건수가 높게 나타났으며, 사망자수도 살모넬라에 의한 salmonellosis가 가장 많음으로 추정되고 있다. 또한 6,371개의 시료에서 분리한 살모넬라의 혈청형을 분석하였을 때, 사람에서 분리한 상위 20종의 식중독 관련 살모넬라 중 9개의 살모넬라가 가금류 유래 살모넬라와 일치하며, *S. enteritidis*와 *S.* Typhimurium이 살모넬라 식중독의 35.2%를 차지하는 것으로 나타났다.

외국 뿐 아니라 국내에서도 가금류 외 식육이나 축산가공물에서 역시 살모넬라 검출율이 높으며, 이에 대한 원인으로는 도축장에서 발생하는 동물 배설에 의함 오염 뿐 아니라 포장 및 판매 과정 중의 외부 오염 및 취급도구에 의한 2차 오염으로 생각되고 있다. 예로서 분쇄가공육의 경우, 가공 및 유통공정이 대부분 15℃ 이하에서 유지되는 것이 원칙이나 업체의 규모와 같은 다양한 원인에 따라 그 이상의 온도환경에서 작업이 이루어지며, 가공 중 환경과 식육 사이에 식중독 균의 오염 가능성을 완전히 제거할 수 없어 냉장유통만으로 미생물에 대한 오염을 관리하는 것이 매우 어려운 실정이다. 도축 및 가공 과정에서 발생하는 식육의 불가피한 오염은 유통과정에서 유통 온도 및 기간에 따라서 질병의 발생 위험의 증가로 이어질 수 있다. 특히 국내의 계란과 같은 생란의 유통구조는 질병의 발생에 매우 취약한 구조로, 제대로 표시되지 않은 유통기한이나 복잡한 유통구조, 상온에서의 유통과정이 살모넬라로 인한 식중독 발병 위험을 높이는 원인이 될 수 있다.

선행 연구 자료 및 문헌 조사 결과, 국내에 축산식품 유통구조는 살모넬라의 발생에 취약하며, 유통과정중 살모넬라의 주요 오염 가능 식품으로는 포장육(닭), 포장육(오리), 분쇄가공육(돼지), 생란, 알가공품(전란액 등)이 가능할 것으로 판단된다.

표 1. 시료에서 분리한 살모넬라균의 혈청형 비교

Rank	Human	Poultry
1	Typhimurium	Heidelberg
2	Enteridis	Kentucky
3	Newport	Typhimurium
4	Heidelberg	Enteridis
5	Javiana	Seftenberg
6	I 4,(5), 12i:-	I 4,(5), 12i:-
7	Montevideo	Montevideo
8	Muenchen	Mbandaka
9	Saintpoul	Thompson
10	Braenderup	Schwarzengrund
11	Oranienberg	Agona
12	Mississippi	Braenderup
13	Infants	Infants
14	Paratyphi B var	Muenchen
15	Thompson	Klombu
16	Agona	Anatum
17	Typhi	Worthington
18	Hartford	Ohio
19	Stanley	Uganda
20	Berta	Hader

(출처 : Centers for Disease Control and Prevention in U.S. 2005)

2. 살모넬라 분석 방법

축산식품에서 살모넬라를 분석하는 방법으로 우선 선택배지를 사용하는 것이 황금률(golden rule)이다. 그러나 선택배지를 이용하는 방법은 시간이 비교적 많이 걸리며, 특히 위양성 가능성이 높아 PCR 방법이나 16S rRNA 염기서열을 이용하는 방법이 보편적으로 타당하다고 생각된다. 가장 많은 분자생물학적 정보는 whole genome sequencing에서 얻을 수 있지만 비교적 시간과 비용이 많이 소요된다.

표 2. Real-time PCR 프라이머 및 프로브 염기서열

gene	primer/probe	nucleotide sequence(5'→3')
invA	invA-F	5'-GAA TCC TCA GTT TTT CAA CGT TTC-3'
	invA-R	5'-CGA ATT GCC CGA ACG TGG CGA-3'
	invA-P	5'-FAM - CTC TTT CGT CTG GCA TTA TCG ATC AGT ACC AG - BHQ1-3'

① 배지를 이용한 방법

오염도 조사를 위해 시료는 식품공전에 등재된 시료 채취방법 '축산물의 가공기준 및 성분규격'의 '축산물 시험방법'에 따라 검사시료를 채취하고, 미생물 시험법에 따라 일반세균 및 살모넬라를 검출한다. 살모넬라는 시료액 25 mL(g)에 225 mL의 BPW를 첨가하여 36±1℃에서 18~24시간 배양한 후 이 배양액을 2종류의 증균배지, 즉 10 mL의 TT broth 또는 SC broth에 1 mL를 첨가함과 동시에 10 mL의 RV broth에 0.1 mL를 첨가하여 각각 36±1℃ 및 42±0.5℃에서 20~24시간 동안 증균배양한다. 증균배양액을 MacConkey agar(Oxoid, England)와 XLD agar (Oxoid, England)에 접종하여 37℃에서 24시간 배양한 후, MacConkey agar에서는 회백색집락을, XLD agar에서는 중앙에 흑색의 집락을 취하여 PCR로 확인시험한다.

② Real-time PCR을 이용한 방법

배지에서 분리 배양된 살모넬라 의심집락은 분자생물학적 시험법을 활용하여 확인 시험한다. 분자생물학적 시험법은 다음과 같은 '축산물의 가공기준 및 성분규격'의 '식중독균에 대한 분자생물학적 시험법'의 '살모넬라 시험법'에 따라 실시한다.

PCR 반응조건은 50℃에서 2분간 유지 및 95℃에서 10분간 방치하여 최초 변성이 일어나게 한 후, 95℃에서 15초간 변성시키고, 60℃에서 1분간 유전자 결합 및 신장반응이 일어나는 것을 1회로 하여 총 40회의 증폭반응을 한다. 이후 결과 확인은 증폭곡선이 확인되는 경우 살모넬라가 검출된 것으로 판정한다. 다만, 음성대조군에서 증폭곡선이 확인되거나 양성대조군에서 증폭곡선이 확인되지 않을 경우 재시험하여야 한다.

③ 16S rRNA를 이용한 방법

16S rRNA 유전자는 모든 세균에 존재하며, 각각의 세균에 따라 고유한 염기서열이 존재하고 매우 잘 보존(conserved)되어 있기 때문에 세균들을 종 수준으로 구분할 수 있다. 16S rRNA는 약 1,500bp 정도의 염기로 구성되어있으며, 차이가 클수록 서로 다른 균종, 차이가 적을수록 진화론적으로 가까운 균종이라는 원칙이 적용된다. 이러한 16S rRNA 염기서열 분석은 세균의 ribosomal RNA 유전자 염기서열을 분석하여 GeneBank Database의 자료와의 상동성을 비교하여 미생물을 분류 및 동정할 수 있다.

④ 분리균에 대한 유전체 분석

유통중 축산식품에서 분리된 살모넬라는 차세대염기서열분석(Next Generation Sequencing; NGS)을 활용하여 전장유전체를 분석할 수 있다. 현재 대표적인 축산관련 유해균인 살모넬라의 유전체정보가 여러 국가 및 기관의 연구를 통해 밝혀져 있어, 이를 활용하여 분석한다. NGS 데이터에서 contig의 assembly를 위해서는 optical mapping을 이용해 정확도를 높일 수 있다.

살모넬라의 경우, *S. bongori* (유전체 크기; 4.45Mb),

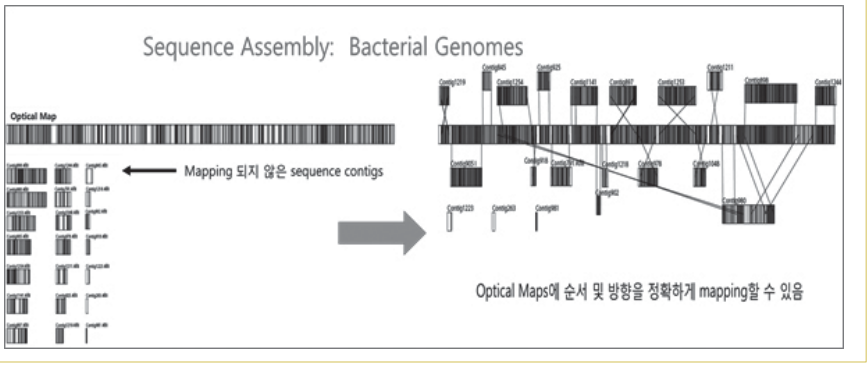


Fig. 1. NGS 데이터의 정확하고 빠른 assembly를 위해 제한효소 map을 활용한 Optical Mapping 개념도.

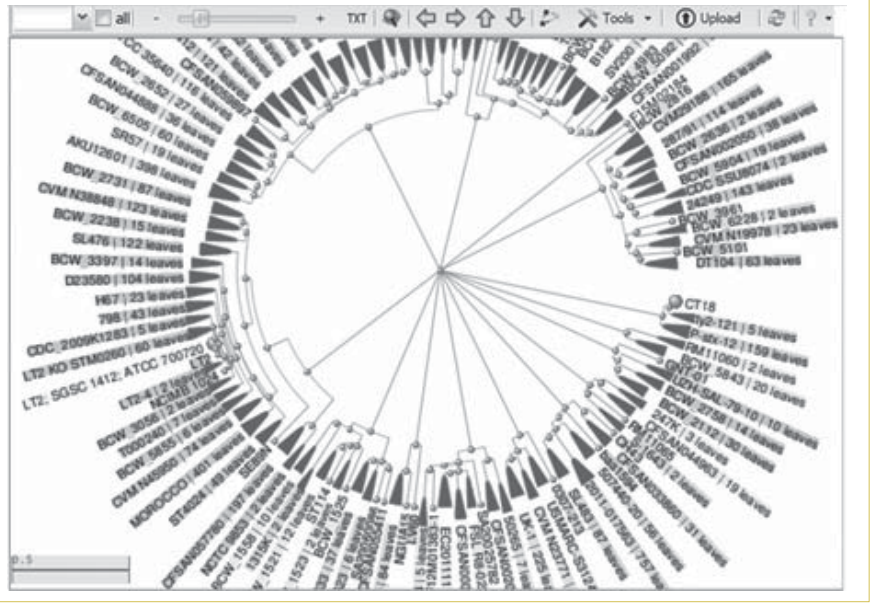


Fig. 2. *Salmonella enterica* strain들의 유사성 분석

S. enterica (유전체 크기 4.78Mb)에 대한 전장유전체염기서열(whole genome sequencing) 정보 및 이들의 아종 또는 strain에 대한 특정 부분 염기서열 정보가 밝혀져 있어 이를 활용하여 assembly를 할 수 있다. 전장유전체 분석은 우선적으로 분리균에 대한 정확한 species 및 strain의 확인이 가능하다. Subspecies들의 taxonomy에 대한 자료 또한 이용 가능하여 해당 subspecies들의 유사성 및 특이성에 대한 유전체 분석을 할 수 있다(Fig 2)

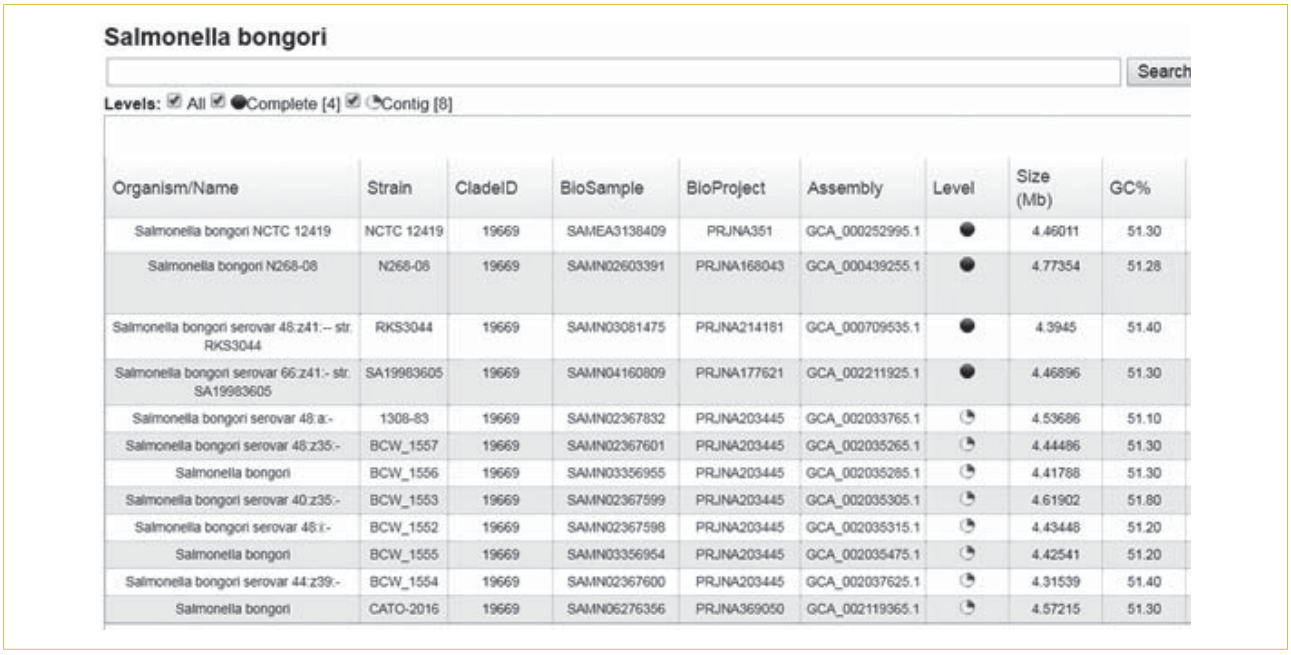
또한 유전체 분석을 위한 유용한 data base들을 이용하여 이 들 각각의 유해균에 대한 genome size, 유전자수, annotation 등 필요한 정보를 얻을 수 있다(Fig 3).

Ⅲ. 결론

축산식품에서 식중독을 유발하는 대표적인 식중독균은 살모넬라이다. 국내 유통 중인 축산식품에 대한 위해평가를 위해서는 우선적으로 오염가능성이 높은 축산식품에 대한 정확한 모니터링 결과가 필요하다. 따라서 살모넬라 매개체로서 포장육(닭), 포장육(오리), 분쇄가공육(돼지), 생란, 알가공품(전란액 등)에 대한 오염도 분석이 우선적으로 이루어져야 한다. 배지를 이용한 살모넬라 분리는 많은 false-positive 균이 존재할 수 있으므로, 분리균에 대한 PCR과 realtime PCR로 presumptive strain에 대한 screening이 진행되어야 한다. 이후 16S rRNA 염기서열을 이용한 최종 확인이 진행되어야 한다. 분리균은 오염경로 분석, evolution 및 변이 특성을 파악하기 위한 분자생물학적 정보를 확보하기 위해 whole genome sequencing이 이루어져야 향후 살모넬라에 대한 체계적인 관리가 가능할 것으로 생각된다.

Ⅳ. 감사의 글

본 연구는 2018년도 식품의약품안전처 용역연구개발과



Salmonella bongori

Search

Levels: All Complete [4] Contig [8]

Organism/Name	Strain	CladeID	BioSample	BioProject	Assembly	Level	Size (Mb)	GC%
Salmonella bongori NCTC 12419	NCTC 12419	19669	SAMEA3138409	PRJNA351	GCA_000252995.1	●	4.46011	51.30
Salmonella bongori N268-08	N268-08	19669	SAMN02603391	PRJNA168043	GCA_000439255.1	●	4.77354	51.28
Salmonella bongori serovar 48:z41:– str. RKS3044	RKS3044	19669	SAMN03081475	PRJNA214181	GCA_000709535.1	●	4.3945	51.40
Salmonella bongori serovar 66:z41:- str. SA19983605	SA19983605	19669	SAMN04160809	PRJNA177621	GCA_002211925.1	●	4.46896	51.30
Salmonella bongori serovar 48:a:-	1308-83	19669	SAMN02367832	PRJNA203445	GCA_002033765.1	◔	4.53686	51.10
Salmonella bongori serovar 48:z35:-	BCW_1557	19669	SAMN02367601	PRJNA203445	GCA_002035265.1	◔	4.44486	51.30
Salmonella bongori	BCW_1556	19669	SAMN03356955	PRJNA203445	GCA_002035285.1	◔	4.41788	51.30
Salmonella bongori serovar 40:z35:-	BCW_1553	19669	SAMN02367599	PRJNA203445	GCA_002035305.1	◔	4.61902	51.80
Salmonella bongori serovar 48:r:-	BCW_1552	19669	SAMN02367598	PRJNA203445	GCA_002035315.1	◔	4.43448	51.20
Salmonella bongori	BCW_1555	19669	SAMN03356954	PRJNA203445	GCA_002035475.1	◔	4.42541	51.20
Salmonella bongori serovar 44:z39:-	BCW_1554	19669	SAMN02367600	PRJNA203445	GCA_002037625.1	◔	4.31539	51.40
Salmonella bongori	CATO-2016	19669	SAMN06276356	PRJNA369050	GCA_002119365.1	◔	4.57215	51.30

Fig. 3. *Salmonella bongori* strain에 대한 전장유전체 해석 정도, Genome size 등 유용한 정보를 보여주는 테이블

제(18162축산선525)의 연구개발비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. Su, L., Chiu, C.: *Salmonella*: clinical importance and evolution of nomenclature. *Chang Gung medical journal*, 30(3), 210-219 (2007).

2. Fàbrega, A., Vila, J.: *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(2), 308-341 (2013).

3. Jantsch J., Chikkaballi D., Hensel M.: Cellular aspects of immunity to intracellular *Salmonella enterica*. *Immunological Reviews*, 240(1), 185-195 (2011).

4. Ryan, I.K.J., Ray, C.G.: Sherris Medical Microbiology. McGraw Hill., pp. 362-368 (2004).

5. 홍수현, 박나윤, 조혜진, 노은영, 고영미, 나유진, 박근철, 최범근, 민경진, 이종경, 문진산, 윤기선: 식중독세균과 주요 축산식품 및 가공품 조합에 대한 위해순위결정. 한국식품위생안전성학회지, 30(1), 1-12 (2015).

6. Lund, B.M., Baird-Parker, T.C., Gould, G.W.: The microbiological safety and quality of food. Aspen Publishers, Inc., Maryland, pp. 361-383 (2000).

7. 우용구: 우리나라 도계장 수거계육의 미생물학적 위생실태 조사. 미생물학회지, 43, 186-192 (2007).