pISSN 1229-1153 *J. Fd Hyg. Safety*
Vol. 27, No. 3, pp. 277~284 (2012)

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

시기별 엽채류의 미생물 오염도와 유통 조건 조사 - 들깻잎과 상추를 중심으로 -

김원일 · 정향미 · 김세리 · 박경훈 · 김병석 · 윤종철 · 류경열[1]*
농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부 유해생물팀, [1]농촌진흥청 연구정책국 연구성과관리과

Investigation of Microbial Contamination Levels of Leafy Greens and Its Distributing Conditions at Different Time - Focused on Perilla leaf and Lettuce -

Won-Il Kim, Hyang-Mi Jung, Se-Ri Kim, Kyeong-Hun Park, Byung Seok Kim, Jong-Chul Yun, and Kyoung-Yul Ryu[1]*
Microbial Safety Team, Department of Crop Life Safety, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-707, Korea
[1]R&D Performance Evaluation & Management Division, Research Policy Bureau, RDA, Suwon 441-707, Korea
(Received February 29, 2012/Revised April 20, 2012/Accepted June 13, 2012)

ABSTRACT - The objective of this study was to investigate and evaluate microbial contamination levels of leafy greens (perilla leaf and lettuce) and its distributing conditions at different seasons (Feb, May, Aug, and Nov of the year 2011) in order to provide insight into any potential health hazards associated with consumption of these commodities. Leafy greens were collected from a farm located in Geumsan, Chungnam and wholesale markets (WM) and traditional markets (TM) located in Suwon. At the same time, temperature and relative humidity fluctuations experienced by the leafy greens during distribution from the farm to the distribution center were measured by a data logger. The contamination levels of perilla leaf and lettuce were determined by analyzing total plate count. Coliform groups, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* were determined. The contamination levels of total aerobic bacteria, coliform groups and *B. cereus* in both vegetables sampled during May and August found to be higher than those sampled during February and November. *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* were not detected in the vegetables analyzed in this study. There were no significant trends between samples at WM and TM in the contamination levels. Relative humidity of vegetables distributed from the farm to the distribution center showed over 90% during distribution regardless of measured seasons. In the case of background microflora on leafy greens, the density was significantly increased at 20, 30 and 37°C during storage of 24h. *E. coli* O157:H7 and *B. cereus* inoculated on the leaves also showed similar increases in the storage tests. The microbial contamination levels determined in this study may be used as the fundamental data for microbial risk assessment.

Key words : distribution, leafy greens, lettuce, perilla leaf

서 론

국민들의 생활 수준 향상 등으로 인해, 건강에 대한 관심이 고조되면서 별도의 조리과정 없는 즉석섭취(Ready-To-Eat) 신선 엽채류의 소비량이 계속해서 증가하고 있다[1,2]. 그러나 전 세계적으로 식중독을 일으키는 병원성 미생물이 오염된 엽채류 섭취에 따른 식중독사고가 발생하고 있어 소비자들이 우려하고 있기도 하다[3,4]. 병원성 미생물은 엽채류의 생산과정에서 토양, 관개용수, 야생동물, 곤충 등에 의해 오염될 수 있고, 수확, 수확 후 처리, 가공, 포장 등의 처리과정 중에서도 교차오염이 일어날 수 있다[5]. 또한 엽채류에 오염된 병원성미생물은 유통 및 보관 과정 중에 증식이 가능하여[6-8] 그 위해성이 커질 수 있다. 미생물

*Correspondence to: Kyoung-Yul Ryu, R&D Performance Evaluation & Management Division, Research Policy Bureau, RDA, Suwon 441-707, Korea
Tel: 82-31-299-1964, Fax: 82-31-290-1969
E-mail: kyryu@korea.kr

생장에 직접적인 영향을 미치는 일반적인 요인은 온도, 수분, pH, 염농도, 산소농도, 영양분 등이 있는데, 이 중 온도와 수분은 다른 요인에 비해 비교적 인위적으로 조절하는 것이 용이하고, 작물의 신선도 유지에 있어서 중요한 요인이다. 최근에는 농산물에 존재하는 부패균, 병원성미생물 등의 미생물 생장을 억제하여 안전성을 확보하고 신선도를 오래 유지하기 위해 농산물의 저장 및 유통분야에서 저온저장기술, CA (Controlled Atmosphere), MA (Modified Atmosphere) 저장기술 등이 사용되고 있다[9]. 이러한 유통 및 저장 방법들은 학교급식과 같은 대량 수요처에 공급되는 경우에 이용되고 있지만, 시설 설치와 유지에 대한 경제적 부담 등으로 인해 학교급식 식재료 등 일부를 제외하고는 적극적으로 활용되고 있지 않은 실정이다.

국외의 경우에는 농산물의 안전성 확보를 위해 유통과정에서 유해미생물의 증식 및 위해성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있고, 이를 이용하여 농산물의 유통 환경의 중요성을 강조하고 있는데[10,11], 우리나라에서는 이에 대한 연구가 부족한 실정이다. 따라서 본 연구는 생산과정에서 오염되는 미생물을 완전히 제거하기는 어렵고 세척 외에 별도의 가열처리과정 없이 생식하는 주요 다소비 엽채류인 상추와 들깻잎에 대해 생산지에서 판매 전 단계까지 시기별로 유통조건을 조사하여 효율적으로 유통환경을 관리할 수 있는 기초적 자료를 제공하고자 한다. 또한 생산지와 판매지에서 수집한 상추와 들깻잎 시료의 위생지표세균 및 병원성미생물 오염도를 조사하였고, 각 작물의 잎을 여러 온도조건하에서 일정 시간 동안 보관한 후, background microflora와 인위적으로 접종한 병원성미생물의 밀도 변화를 관찰하였다. 이러한 결과들은 상추와 들깻잎의 미생물위해성평가(MRA)의 기초 자료로 활용될 수 있고, 엽채류의 유통조건 관리의 중요성을 제고하여 소비자에게 농산물 안전성에 대한 가치있는 정보를 제공할 수 있을 것으로 기대한다.

재료 및 방법

상추와 들깻잎 시료 수집

상추(*Lactuca sativa* cv. Seonpung)와 들깻잎(*Perilla frutescens* Brit. var. *japonica* Hara) 시료를 생산지 1지점(충청남도 금산군 추부면 소재), 대형마트 4지점(경기도 수원시 소재), 재래시장 3지점(경기도 수원시 소재)에서 수집하였다. 시료 수집시기는 2, 5, 8, 11월로 시기를 달리하였으며, 각 시기별로 상추와 들깻잎 시료를 각각 1지점 생산지에서 10점씩 총 20점, 4지점 대형마트에서 3점씩 총 24점, 3지점 재래시장에서 3점씩 총 18점을 같은 지점에서 수집하였다. 시료수집과 분석 과정에서 교차오염과 미생물 밀도 변화를 최소화하기 위하여 멸균된 장갑을 착용하여 폴리에틸렌 재질의 bag에 시료를 담은 후, 즉시 ice box에 보관하여 실험실로 이송하였다. 시료분석은 수집 후 6시간 이내에 실시하였다.

들깻잎 유통 온 · 습도 조건 조사

엽채류의 유통 온·습도 조사대상은 충청남도 금산군 추부면 소재의 생산농가에서 수확되어 경기도 여주군 여주읍 소재의 물류센터로 수송되는 들깻잎의 유통경로를 선정하였다. 유통과정의 온·습도 측정을 위해 온습도기록장치(WatchDog 450, Spectrum Technologies Inc., IL, USA)를 이용하였고, 이 장치는 작물의 수확을 거쳐 포장상자에 동봉되어 포장, 유통, 적재과정의 온·습도를 측정당일 오전 9시부터 다음날 오전 9시까지 30분 간격으로 24시간 동안 기록하였다. 들깻잎의 유통과정 온·습도 측정시기는 시료의 수집시기와 동일하게 하였으며, 측정 당일에 처음 수확되는 들깻잎을 기준으로 수확, 포장, 유통과정의 온·습도를 측정하였다. 위의 측정은 3반복 검정하였다.

위생지표세균 및 식중독세균 오염도 조사

수집한 들깻잎과 상추 시료의 호기성세균, 대장균군/대장균, *Bacillus cereus*를 정량적으로 분석하였고, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*를 정성적으로 분석하였다. 정량적 분석을 위해 각 작물 시료 5 ± 1 g을 stomacher bag에 넣고 1:10(w/v) 비율로 0.1% peptone water를 더해 Stomacher Bag Mixer 400(Interscience, France)에서 2분간 처리하였다. 호기성세균수 측정을 위해 stomacher로 균질화한 희석용액 1 mL을 취해 건조배지(Aerobic Count Plant, 3M, Minn, USA)에 분주한 후 30ºC 배양기에서 48시간 동안 배양하여 colony 수를 산정하였다. 대장균 및 대장균군(Coliform/*E. coli*)의 밀도 측정을 위해 희석용액 1 mL를 취해 건조배지(Coliform/*E. coli* Count Plate, 3M, USA)에 분주한 후 37ºC 배양기에서 24시간 동안 배양하여 대장균군 및 대장균으로 의심되는 colony의 수를 계수하였다. *B. cereus*의 정량적 검정을 위해 stomacher로 균질화한 희석용액을 0.25 mL씩 4개의 Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar 배지(MYP, OXOID, UK)에 각각 분주하여 도말하였다. 30ºC 배양기에서 24시간 동안 배양한 후 *B. cereus*로 추정되는 colony의 수를 세었다. 보다 정확한 세균동정을 위해 시료당 5개의 추정되는 colony를 MYP에 계대배양한 후 Nutrient Agar(NA, BD, USA) 배지를 이용해 순수분리 하였다. 분리된 균주는 *B. cereus* Detection Kit(JS-BC050, Jinsung Uni-tech, Korea)을 이용한 *groEL*, *ces*, *cry*1 유전자 유무를 판별해서 *B. cereus* 진위를 검정하였다. 검정방법은 각 균주의 chromosomal DNA를 boiling 방법으로 추출하여 template DNA를 얻었다. Micro-tube에 master mixture(멸균수 14.875, buffer 2.5, dNTP 0.5, *cry*1 forward primer 1, *cry*1 reverse primer 1,

groEL forward primer 1, *groEL* reverse primer 1, *ces* forward primer 1, *ces* reverse primer 1, *Taq* polymerase 0.125 uL) 24 uL와 template DNA 1 uL를 분주한 후 중합효소연쇄반응 장비(C1000™ Thermal Cycler, Biorad, USA)를 이용하여 특이 염기서열을 증폭하였다. 반응조건은 1. 95ºC에서 2분, 2. 95ºC에서 20초, 3. 61ºC에서 20초, 4. 72ºC에서 20초, 5. 72ºC에서 2분으로 하였고 2번에서 4번 과정은 30 cycle로 설정하였다. 반응 후 증폭산물의 전기영동을 통하여 target gene인 *cry*1(138bp), *groEL*(250bp), *ces*(405bp)의 band 유무를 판별하였다. 판별된 *B. cereus* 수를 최초에 측정하였던 추정 colony의 수에 대입해 최종 세균수를 산정하였다. *S. aureus, L. monocytogenes, E. coli, E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp.의 정성적 검정을 위해 각 세균의 선택적 증균배지인 Baird-Parker(BP, OXOID, UK), Fraser Listeria(OXOID, UK), E. coli(EC, OXOID, UK), modified E. coli(mEC, OXOID, UK), Rappaport-Vassiliadis R-10(RV, OXOID, UK)를 사용하였다. 각 엽채류 시료 5 ± 1 g을 stomacher bag에 넣고 1:10(w/v) 비율로 각각의 증균용액을 더해 37ºC 배양기에서 24시간 동안 증균배양하였다. 증균용액을 각 세균의 선택배지인 BP, Oxford agar, Eosin-Methylene Blue agar(EMB, OXOID, UK), Sorbitol Macconkey agar(SMA, OXOID, UK), Xylose lysine deoxycholate agar(XLD, OXOID, UK)에 멸균된 백금이를 사용하여 분리, 배양하였으며 각 세균의 생장에 적절한 온도의 배양기에서 배양하였다. 배양한 후, 각 선택배지별로 병원균으로 의심되는 균주를 육안으로 선별하고 colony를 NA배지에 순수분리하였다. 정확한 동정을 위해 VITEK® 2(BIOMERIEUX, France)를 이용해 최종 분석하였다.

들깻잎과 상추의 보관온도에 따른 위생지표세균과 식중독 세균의 밀도 변화 조사

들깻잎과 상추의 보관온도에 따른 세균 밀도 변화의 실내 검정을 위해 시중에 판매되고 있는 시료를 구입하여 실험에 사용하였다. 각 시료가 가지고 있는 호기성세균수와 인위적으로 접종한 *E. coli* O157:H7, *B. cereus*의 수를 보관하기 전 초기의 밀도와 각 온도별로(5, 10, 20, 30, 37ºC) 24시간 동안 보관한 후의 밀도를 측정하였다. 호기성세균수 검정은 시료구입 직후 위에서 서술한 호기성세균수 측정법을 따라 초기 오염도를 검정하고, 플라스틱 상자에 시료를 담아 각 온도별로 24시간 동안 보관한 후 같은 방법으로 호기성세균수 변화를 조사하였다. *E. coli* O157:H7과 *B. cereus*는 선택적 검정을 위해 rifampicin (50 ug/mL) 내성 균주를 제작하여 사용하였다. *E. coli* O157:H7과 *B. cereus*는 rifampicin(50 ug/mL)을 함유한 TSB 배양액에 24시간 동안 배양한 후, 세균현탁액을 1.5 mL centrifuge tube에 분주하여 12,000 × g 조건으로 10분간 원심분리하였다. 상등액을 제거한 후 Minimal Broth Davis without Dextrose(BD, USA) 용액을 1 mL 첨가하여 희석한 후 다시 위와 같은 조건으로 원심분리하였다. 이와 같은 과정을 세 차례 반복한 후 상등액을 제거한 균주 pellet에 0.25 mL의 최소배지(MB)를 첨가하여 엽채류 표면에 접종한 후에도 세균의 생장에 영향을 줄 수 있는 배지성분을 제거한 접종 균주를 준비했다. 물리적, 생리적 장해가 없는 건전한 들깻잎과 상추를 선별하여 잎 표면에 세균 현탁액을 10 uL씩 열 군데에 spotting하였다. 한 잎 당 총 100 uL의 세균 현탁액을 접종하였고 접종한 잎은 stomacher bag에 넣은 후 플라스틱 상자(30 × 20 cm)에 넣었다. 접종 후 각 세균의 초기 밀도 측정을 위해 stomacher 처리를 거쳐 TSA(rifampicin 50 ug/mL 첨가) 배지를 이용한 평판도말법을 통해 세균수를 측정하였고, 각 온도(5, 10, 20, 30, 37ºC)의 배양기에 24시간 동안 보관한 처리구에 대해 같은 방법으로 세균수를 측정하였다. 위의 과정을 3반복 진행하였다.

통계적 분석

들깻잎과 상추의 유통단계별 위생지표세균의 오염도와 보관온도에 따른 세균 밀도 변화 검정으로부터 얻은 결과값에 대해 일원배치분산분석(one-way ANOVA)법으로 평균간의 차이를 비교하였고, 분산분석 결과가 유의한 수준일 경우($p < 0.05$), LSD법으로 다중검정을 실시하였다. 위의 분석은 SAS 9.2 소프트웨어(SAS Institute Inc., USA)를 사용하여 실시하였다.

결과 및 고찰

시기별 들깻잎의 유통 온 · 습도

우리나라의 생산지에서 판매지까지의 엽채류 유통은 각 작물별로 독립적으로 유통되는 형태가 아니라, 대부분 상자단위로 여러 가지 농산물과 함께 이송된다. 상추의 경우, 대부분 생산지에서 도매상을 거쳐 소매상과 소비자에게 판매되는 경로를 가진다. 또한 생산지에서 직접 대형유통업체나 대량수요처로 납품되는 경로가 있다[12]. 본 실험에서는 생산지로부터 직접 대형유통업체로 유통되는 경로의 유통 온・습도를 조사하였다. 조사대상인 충청남도 금산군 추부면 소재의 생산농가에서 작물이 수확, 포장되어 유통차량에 적재하기 전까지의 시간은 약 7-8시간 정도 소요되었으며, 경기도 여주군 여주읍 소재의 물류센터로 수송되기까지 약 4시간 30분 정도 소요되었다. 물류센터에 이송된 작물은 대부분 익일 오전 중에 각 판매처로 이송되어 판매가 이루어졌다. 수확 및 포장 전 단계에서 들깻잎의 상대습도는 34.6-87.7% 범위의 수치를 보였고, 포장된 시점 이후부터는 79.5-100.0% 범위의 수치를 나타냈다(Fig. 1). 또한 상대습도는 24시간 중, 20시간이 넘는

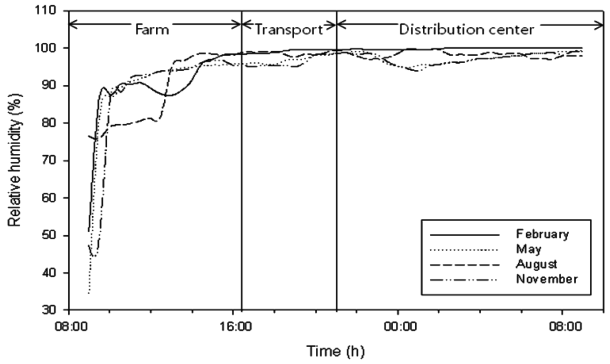

Fig. 1. Relative humidity profile from the farm to the distribution center. Data represent the average Relative humidity of three replications.

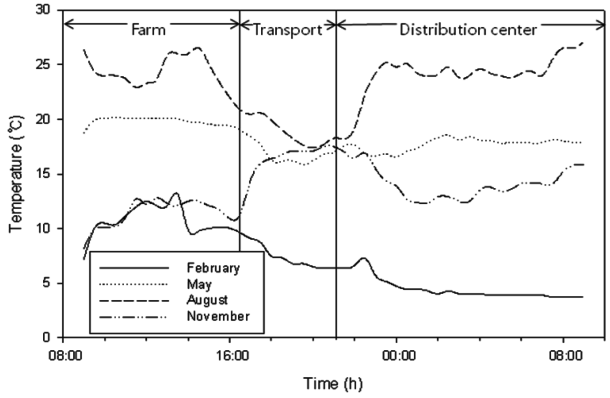

Fig. 2. Temperature profile from the farm to the distribution center. Data represent the average temperature of three replications.

시간 동안 상대습도 90%가 넘는 수치를 나타내었다. 각 조사시기의 들깻잎의 수확 및 유통 상대습도는 94.0-96.3%의 범위로 시기별로 유의한 차이를 보이지 않았다. 이와 같이 비교적 높은 상대습도를 나타내는 것은 엽채류 자체가 0.97-1.00 a_w 범위의 비교적 높은 수분활성도를 가지는 특성과 작물의 생산 및 품질유지와 판매기한 연장을 위하여 취급과정 중 작물 표면에 인위적으로 물을 살포하는 등 생산자와 판매자의 의도적 행위에 따른 결과인 것으로 생각된다. 작물의 높은 상대습도 유지는 품질유지와 판매기한 연장에 대해 큰 효과가 있지만, 건조에 약한 미생물이 생존 또는 증식하는데 있어 유리한 환경을 제공하는 것이다. FDA의 자료에는 세균의 종류에 따라 생장에 있어 요구되는 최소한의 수분활성도(a_w)는 다르지만, *S. aureus*를 제외한 대부분의 식중독 세균의 생장을 위한 최소 수분활성도는 0.92-0.98 a_w 범위이다[13].

들깻잎의 수확 및 유통 온도는 2월, 5월, 8월, 11월에 각각 3.7-13.2, 16.1-20.2, 17.4-27.1, 8.2-17.5°C의 범위로 나타났다(Fig. 2). 조사시기별 평균값은 각각 7.0, 18.2, 23.2, 13.7°C이고, 5월과 8월에는 들깻잎을 이송하는 단계에서 약 4시간 동안 유통차량의 냉장시스템 가동으로 인해 실외 온도보다 상대적으로 낮게 유지되기도 하지만, 시기별 들깻잎의 수확 및 유통 온도는 실외온도와 비슷한 수치로 나타났다. Koseki와 Isobe[5,14] 등은 iceberg 상추 표면에 접종한 *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp.가 15°C 이상의 온도조건하에서 24시간 이내에 생장이 이루어지며, 25°C에서는 24시간 이내에 병원균들의 밀도가 2 Log CFU/g 이상 증가하는 것을 확인하였다. 또한, 이들 병원균들이 10°C 조건하에서도 40시간 이후부터 생장이 이루어진다고 보고하였다. 이처럼 수확 및 수확 후 처리 단계에서 식중독세균에 오염된 엽채류가 판매지로 이송된다고 가정하였을 때, 유통조건이 적절히 관리되지 않으면 짧은 시간 안에 그 위해성이 커질 수 있고, 유통시간이 길면 길수록 더욱더 철저한 온도관리가 이루어져야 한다고 할 수 있다.

들깻잎과 상추의 수집 시기 및 유통단계별 위생지표세균 및 식중독세균 오염도

유통과정 중 작물에 존재하는 미생물의 밀도 변화와 시기별 온도차이에 따른 미생물 밀도 차이를 간접적으로 증명하기 위해 상추와 들깻잎 시료를 생산지와 판매지(대형마트, 재래시장)로 구분하여 수집하였고, 수집 시기를 달리하여 분석하였다. 전체적으로 일반세균은 들깻잎에서 3.91-7.24 Log CFU/g, 상추에서 4.57-7.44 Log CFU/g 밀도로 존재하였다(Table 1-2). 상추의 일반세균수는 평균 6.16 Log CFU/g으로 들깻잎의 일반세균수 평균 5.66 Log CFU/g 보다 조금 높은 것으로 나타났다. Jung 등[15]의 채소류 오염도 조사 연구에서도 이와 유사한 결과를 보이는데, 이러한 차이는 여러 가지 원인 중에서도 특히 들깻잎과 상추의 재배방식과 작물의 형태적, 생리적 특성 차이에 따른 것으로 생각된다. 대장균군/대장균의 오염도는 들깻잎은 1.28-5.23 Log CFU/g, 상추는 N/D-3.52 Log CFU/g 범위로 들깻잎의 오염도 범위가 상추의 오염도 범위보다 비교적 높은 것으로 나타났다. *B. cereus*의 오염도는 들깻잎은 N/D-2.43 Log CFU/g, 상추는 1.23-3.29 Log CFU/g 범위를 보였다. *E. coli*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *S. aureus*, *L. monocytogenes*의 정성적 분석 결과에서는 *E. coli*의 경우 들깻잎과 상추에서 각각 평균 9.7, 8.1%의 검출률을 보이고, *S. aureus*의 경우 각각 5.6, 4.0%의 검출률을 보였다. *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*는 들깻잎와 상추 모두에서 검출되지 않았다(data not shown). 들깻잎과 상추의 일반세균, 대장균군/대장균, *B. cereus* 오염도를 조사시기별(2, 5, 8, 11월)로 비교해보면, 들깻잎의 일반세균과 *B. cereus* 오염도를 제외하고 나머지 모든 경우에서 조사시기별로 미생물 오염도가 다른 것을 확인할 수 있다. 외부 기온이 높은 5월과 8월에는 2월과 11월보다 일반세균, 대장균군/대장균, *B. cereus*의 오염도와 *E. coli*의 검출률이 비교적 높은 것으로 나타났다.

Table 1. Microbiological analysis of perilla leaf samples from different locations in different time

Sampling Time	Sampling Locations (No. of Samples)	Log CFU ± S.D. / g						Percentage (%) of confirmed positive samples	
		Aerobic bacteria		Coliform/*E.coli*		*B. cereus*		*E. coli*	*S. aureus*
Feb	Farm (10)	5.46 ± 0.175^{A}	A**	1.28 ± 0.285^{A}	A	1.40 ± 0.306^{A}	A	10	N/D*
	Wholesale Mart (12)	5.22 ± 0.536^{A}		1.99 ± 0.657^{B}		1.74 ± 0.767^{A}		N/D	8
	Traditional Market (9)	5.60 ± 0.584^{A}		1.75 ± 0.482^{AB}		1.72 ± 1.027^{A}		N/D	N/D
May	Farm (10)	3.91 ± 0.268^{A}	A	1.50 ± 0.707^{A}	AB	1.15 ± 0.212^{A}	A	N/D	N/D
	Wholesale Mart (12)	6.15 ± 0.787^{B}		3.18 ± 0.776^{B}		2.43 ± 1.044^{A}		N/D	N/D
	Traditional Market (9)	5.73 ± 0.443^{B}		2.94 ± 1.163^{B}		1.20 ± 0.173^{A}		56	N/D
Aug	Farm (10)	6.25 ± 0.248^{A}	A	2.37 ± 0.984^{A}	B	N/D	A	N/D	20
	Wholesale Mart (12)	6.33 ± 0.629^{A}		2.80 ± 0.864^{A}		1.58 ± 0.717^{A}		17	8
	Traditional Market (9)	7.24 ± 0.364^{B}		5.23 ± 0.196^{B}		1.48 ± 0.247^{A}		22	11
Nov	Farm (10)	4.73 ± 0.379^{A}	A	1.45 ± 0.639^{A}	A	1.15 ± 0.213^{A}	A	N/D	10
	Wholesale Mart (12)	5.75 ± 0.429^{B}		1.89 ± 0.602^{A}		1.76 ± 0.457^{A}		17	N/D
	Traditional Market (9)	5.52 ± 0.420^{B}		1.56 ± 0.965^{A}		1.79 ± 0.590^{A}		N/D	11

Values are expressed as Log CFU per gram ± standard deviation; values are the average of samples from each sampling locations.
Means having different letters (A,B) are significantly different ($P \leq 0.05$).
*N/D : not detected (≤ 10 Log CFU / g), **Means having different letters(A,B) are significantly different between sampling seasons ($P \leq 0.05$)

Table 2. Microbiological analysis of lettuce samples from different locations in different time

Sampling Time	Sampling Locations (No. of Samples)	Log CFU ± S.D. / g						Percentage (%) of confirmed positive samples	
		Aerobic bacteria		Coliform/*E.coli*		*B. cereus*		*E. coli*	*S. aureus*
Feb	Farm (10)	4.93 ± 0.657^{A}	A**	1.18 ± 0.164^{A}	A	1.54 ± 0.469^{A}	A	N/D*	N/D
	Wholesale Mart (12)	5.01 ± 0.825^{A}		1.35 ± 0.494^{A}		2.02 ± 0.792^{A}		N/D	N/D
	Traditional Market (9)	6.01 ± 0.296^{B}		1.30 ± 0.426^{A}		1.35 ± 0.371^{A}		N/D	N/D
May	Farm (10)	6.56 ± 0.452^{A}	B	1.40 ± 0.348^{A}	AB	2.18 ± 0.510^{A}	B	10	N/D
	Wholesale Mart (12)	7.44 ± 0.246^{B}		1.97 ± 0.602^{A}		3.25 ± 0.671^{AB}		N/D	N/D
	Traditional Market (9)	6.74 ± 0.376^{A}		3.09 ± 0.890^{B}		2.67 ± 0.624^{B}		33	N/D
Aug	Farm (10)	6.35 ± 0.148^{A}	B	1.67 ± 0.523^{A}	B	1.92 ± 0.379^{A}	AB	N/D	N/D
	Wholesale Mart (12)	7.11 ± 0.363^{B}		3.52 ± 0.654^{B}		2.16 ± 1.063^{A}		33	N/D
	Traditional Market (9)	6.59 ± 0.258^{A}		3.03 ± 1.067^{B}		3.29 ± 0.468^{B}		11	N/D
Nov	Farm (10)	4.57 ± 0.460^{A}	AB	N/D	A	1.23 ± 0.288^{A}	A	N/D	40
	Wholesale Mart (12)	6.55 ± 0.284^{B}		1.23 ± 0.288^{A}		1.90 ± 0.508^{A}		8	8
	Traditional Market (9)	6.02 ± 1.242^{B}		1.15 ± 0.213^{A}		1.92 ± 0.109^{A}		N/D	N/D

Values are expressed as Log CFU per gram ± standard deviation; values are the average of samples from each sampling locations.
Means having different letters (A,B) are significantly different ($P \leq 0.05$).
*N/D : not detected (≤ 10 Log CFU / g), **Means having different letters (A,B) are significantly different between sampling seasons ($P \leq 0.05$).

또한, 미생물 오염도를 생산지, 대형마트, 재래시장으로 구분하여 비교해보면, 생산지보다 대형마트이나 재래시장에서 비교적 높은 오염도를 나타내는 것을 알 수 있다. 이것은 엽채류가 생산지에서 수확되어 소비자에게 유통되는 동안 온도, 습도 등의 환경적 요인이 미생물 생장에 유리한 범위로 조성될 경우, 엽채류에 존재하는 미생물의 밀도가 증가할 수 있다는 것을 간접적으로 증명하는 것이다. Koseki와 Isobe[5]는 *E. coli* O157:H7의 온도별 생장예측모델을 개발하여, 이것을 실제 상추가 유통되는 온도에 적용하여 병원균의 생장을 예측하였는데, 유통온도가 병원균의 최저생장한계점 이하로 유지되지 않을 경우에는 유통과정에서 상추의 병원균 밀도가 증가한다는 것을 증명하였다.

들깻잎과 상추의 보관온도에 따른 background microflora 및 식중독세균 밀도 변화 조사

들깻잎과 상추의 유통 및 보관온도에 따른 미생물 밀도 변화에 대해 실내 검정을 실시하였다. 검정 대상 세균으로 본래 존재하는 background microflora와 *E. coli* O157:H7과 *B. cereus*를 인위적으로 접종하였다. 들깻잎과 상추의 초기 background microflora의 밀도는 각각 4.70, 5.89 Log CFU/g이고, 인위적으로 접종한 *E. coli* O157:H7, *B. cereus*의 초기균수는 들깻잎에 각각 3.14, 2.10 Log CFU/g, 상추에 각각 2.93, 2.10 Log CFU/g 농도로 접종하였다. 5, 10, 20, 30, 37°C의 일정한 온도조건에서 24시간 동안 보관하였을 때, background microflora의 밀도가 들깻잎은 20°C, 상추는 30°C 이상의 온도에서 유의한 증가를 보였다(Table 3-4). 들깻잎의 background microflora는 20°C 조건하에서 초기 밀도에 비해 0.77 Log CFU/g 증가하였고, 30°C 조건에서는 0.64 Log CFU/g, 37°C 조건에서는 1.15 Log CFU/g 증가하였다. 상추의 background microflora 밀도는 30, 37°C 보관온도에서 초기 오염 밀도에 비해 각각 0.38, 0.39 Log CFU/g 증가하는 것을 나타냈다. *E. coli* O157:H7의 밀도도 들깻잎과 상추에서 모두 20, 30, 37°C의 보관온도에서 유의한 증가를 나타냈다. 들깻잎의 경우, 20, 30, 37°C 온도에서 각각 1.63, 2.65, 2.97 Log CFU/g 증가하였고, 상추의 경우는 각각 1.00, 2.35, 2.99 Log CFU/g 증가하였다. *B. cereus*의 밀도는 들깻잎과 상추에서 30, 37°C의 보관온도에서 밀도가 증가하는 것을 보였는데, 들깻잎에서 0.69, 1.32 Log CFU/g, 상추에서 0.72, 0.4 Log CFU/g 밀도로 초기접종농도보다 증가하였다. 이와 같은 결과는 각 작물의 유통온도가 20°C 이상인 조건에서는 24시간 내에 식중독세균을 포함한 일반미생물의 밀도가 증가하는 것을 직접적으로 설명해준다. Cho 등[8]은 양상추의 온도별 저장 중 미생물의 품질변화를 검정하였는데, 이 연구결과에 따르면 호기성 일반세균의 경우 15°C의 온도조건으로 3일 동안 보관하였을 때 초기균수에 비해 약 3 Log CFU/g 증가하고, 5일 동안 보관하였을 때 5 Log CFU/g 정도 증가한다고 보고하였다. 또한 Kim과 Cha[16] 및 Kim[17] 등은 10°C와 같은 낮은 온도조건에서 엽채류를 보관하더라도 시간이 지남에 따라 작물의 호흡률, 부생균에 의한 조직의 와해 등으로 인해 총균수와 대장균군수가 다소 증가하므로 4°C의 조건으로 엽채류를 보관하면 품질유지기

Table 3. Changes of microbial density in perilla leaf depending on the storage temperature for 24 hours *in vitro*

Storage temperature (°C)		Log CFU / g		
		Background microflora	*E. coli* O157:H7	*B. cereus*
0	Initial density	$4.70 \pm 0.196^{A*}$	3.14 ± 0.278^{A}	2.10 ± 0.174^{A}
5		5.03 ± 0.024^{AB}	2.82 ± 0.072^{A}	2.00 ± 0.000^{A}
10		5.01 ± 0.215^{AB}	2.86 ± 0.310^{A}	2.10 ± 0.174^{A}
20		5.47 ± 0.833^{BC}	4.77 ± 0.275^{B}	2.20 ± 0.174^{A}
30		5.34 ± 0.117^{BC}	5.79 ± 0.308^{C}	2.79 ± 0.252^{B}
37		5.85 ± 0.115^{C}	6.11 ± 0.104^{C}	3.42 ± 0.399^{C}

*Means having different letters (A,B) are significantly different between storage temperature ($P \leq 0.05$).

Table 4. Changes of microbial density in the lettuce depending on the storage temperature for 24 hours *in vitro*

Storage temperature (°C)		Log CFU / g		
		Background microflora	*E. coli* O157:H7	*B. cereus*
0	Initial density	$5.89 \pm 0.059^{A*}$	2.93 ± 0.201^{A}	2.10 ± 0.174^{AB}
5		5.86 ± 0.251^{A}	2.84 ± 0.179^{A}	1.43 ± 1.251^{A}
10		5.88 ± 0.101^{A}	2.98 ± 0.193^{A}	1.33 ± 1.155^{A}
20		6.12 ± 0.135^{AB}	3.93 ± 0.545^{B}	2.10 ± 0.174^{AB}
30		6.27 ± 0.196^{B}	5.28 ± 0.109^{C}	2.82 ± 0.201^{BC}
37		6.28 ± 0.272^{B}	5.92 ± 0.177^{C}	3.82 ± 0.105^{C}

*Means having different letters (A,B) are significantly different between storage temperature ($P \leq 0.05$).

한을 늘리고 동시에 안전성을 확보할 수 있다고 보고하였다. 이상의 실험결과를 종합하여 볼 때 엽채류의 유통조건 관리가 적절하게 이루어지지 않을 경우에는 엽채류에 존재하는 미생물이 유통 및 소비과정 중에 증식할 수 있는 가능성이 있다고 판단된다. 아울러 본 연구의 엽채류 미생물 품질조사 자료는 엽채류의 미생물위해성평가(MRA)의 기초자료로 활용될 수 있을 것이며 향후에는 수확 및 유통단계에서의 엽채류 미생물 교차오염 방지 연구, 엽채류 유통 온·습도 관리 방법 연구 등이 이루어져야 할 것으로 판단된다.

요 약

본 연구는 시기별로 생산지, 판매지(대형마트, 재래시장)에서 수집한 들깻잎과 상추의 미생물 오염도를 분석하고 시기별 유통 온·습도 조사와 보관온도가 대상 작물에 존재하는 미생물 밀도변화에 미치는 영향을 검정하였다. 2월, 5월, 8월, 11월에 충청남도 금산군 추부면 소재의 들깻잎, 상추 생산농가와 경기도 수원시 소재의 대형마트, 재래시장에서 들깻잎, 상추 시료를 수집하여 총호기성균, 대장균군, *B. cereus*의 수를 정량적으로 분석하였고, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *S. aureus*를 정성적으로 분석하였다. 동시에 생산지에서 물류센터로 운송되는 유통 온·습도를 측정하였다. 비교적 기온이 높은 5월, 8월에 수집한 엽채류 시료의 미생물 오염도는 2월, 11월보다 상대적으로 높은 것으로 나타났다. 생산지와 판매지의 미생물 오염도는 생산지에 비해 판매지에서 높게 나타나는 경우가 많았으며 대형마트과 재래시장 간에는 오염도 차이에 있어서 일정한 경향을 보이지 않았다. 조사시기에 상관없이 엽채류가 수확되어 포장된 이후부터는 90% 이상의 높은 상대습도를 보이고, 유통온도는 5월, 8월에 각각 평균 18.2, 23.2ºC로 15ºC 이상으로 유지되는 것으로 나타났다. 엽채류 보관온도에 따른 background microflora, *E. coli* O157:H7, *B. cereus*의 밀도변화는 대부분 20ºC 이상의 온도로 보관될 경우 초기밀도에 비해 유의하게 증가하는 것을 보였다. 따라서 본 연구에서 수행한 엽채류의 미생물 오염도 조사는 엽채류의 미생물위해성평가(MRA)의 활용될 수 있으며, 엽채류 유통환경 조사와 보관온도에 따른 미생물 변화 조사는 엽채류의 유통 및 보관 기준을 설정하는데 있어 기초적인 자료로 활용될 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ007612)과 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(과제번호: PJ007614)의 지원에 의해 이루어진 것입니다. 본 연구가 수행됨에 있어 많은 도움을 주신 충청남도 금산군 추부면의 만인산 농협에 감사드립니다.

참고문헌

1. Burnett, S.L. and Beuchat, L.R.: Human pathogens associated with raw produce and unpasteurized juices, and difficulties in decontamination. *J. Ind. Microbiol. Biot.*, **27**, 104-110 (2001).
2. Tian, J.Q., Bae, Y.M., Choi, N.Y., Kang, D.H., Heu, S. and Lee, S.Y. : Survival and growth of foodborne pathogens in minimally processed vegetables at 4 and 15ºC. *J. Food Sci.*, **77**(1), M48-M50 (2012).
3. Bean, N.H., Goulding, J.S., Daniels, M.T. and Angelo, F.J. : Surveillance for foodborne disease outbreaks-United States. *J. Food Prot.*, **60**, 1265-1286 (1997).
4. Beuchat, L.R. : Difficulties on eliminating human pathogenic microorganisms on raw fruit and vegetables. *Acta Hort.*, **642**, 151-160 (2004).
5. Koseki, S. and Isobe, S. : Prediction of pathogen growth on iceberg lettuce under real temperature history during distribution from farm to table. *Int. J. Fd. Microbiol.*, **104**, 239-248 (2005).
6. Jung, D.S., Kweon, M.R., Auh, J.H., Cho, K.Y., Choi, Y.H., Kook, S.U. and Park, K.H. : Effects of temperature and fluctuation range on microbial growth and quality of foods stored in domestic refrigerator. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **28**, 632-637 (1996).
7. Kim J.G. : A survey of the temperature control of refrigerators and freezers in retail food shops. *Korean J. Environ. Health. Soc.*, **28**, 161-171 (2002).
8. Cho, S.K., Kwon, H.S. and Park, J.H. : Microbe and quality changes of ready-to-eat lettuce during storage at different temperatures. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **39**(12), 1867-1872 (2010).
9. 김경대 : 농산물 저장기술 개발연구 보고서, 농산물이용시험장, pp. 1 (2010).
10. Rediers H., Claes M., Peeters L. and Willems K.A. : Evaluation of the cold chain of fresh-cut endive from farmer to plate. *J. Postharvest Biol. Technol.*, **51**, 257-262 (2009).
11. Robert E.P. : Effect of temperature and relative humidity on fresh commodity quality. *J. Postharvest Biol. Technol.*, **15**, 263-277 (1999).
12. 한국농수산식품유통공사 (http://www.kamis.co.kr/kamis/index.jsp) : 품목별유통실태조사 pp. 11 (2010).
13. FDA : Factors that influence microbial growth (2001) (http://www.fda.gov/food/scienceresearch/researchareas/safepracticesforfoodprocesses/ucm094145.htm).
14. Koseki, S. and Isobe S. : Growth of *Listeria monocytogenes* on iceberg lettuce and solid media. *Int. J. Fd. Microbiol.*, **101**, 217-225 (2005).
15. Jung, S.H., Hur, M.J., Ju, J.H., Kim, K.A., Oh, S.S., Go, J.M., Kim, Y.H. and Im, J.S. : Microbiological evaluation of raw vegetables. *J. Fd. Hyg. Safety.*, **21**, 250-257 (2006).

16. Kim, H.Y. and Cha, J.M. : A study for the quality vegetable dishes without heat treatment in foodservices establishment. *Korean J. Food Cookery Sci.*, **18**, 309-318 (2002).
17. Kim, S.J., Sun, S.H., Kim, G.C., Kim, H.R. and Yoon, K.S. : Quality changes of fresh-cut leafy and condiment vegetables during refrigerated storage. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **40**(8), 1141-1149 (2011).