pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 31, No. 6, pp. 406~413 (2016)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2016.31.6.406

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

축산식품 중 전처리 방법에 따른 식중독균 회수율 분석

김종희 · 김현욱 · 함준상 · 김부민 · 오미화*
농촌진흥청 국립축산과학원

Analysis of the Recovery Rate of Food-borne Pathogens according to Sample Preparation Methods in Animal Origin Foods

Jong-Hui Kim, Hyoun Wook Kim, Jun-Sang Ham, Bu-Min Kim, and Mi-Hwa Oh*
National Institute of Animal Science, Rural Development Administration, Wanju 55365, Republic of Korea
(Received September 2, 2016/Revised September 19, 2016/Accepted September 28, 2016)

ABSTRACT - This study was performed to evaluate and establish a sample preparation method for the detection of food-borne pathogens in animal origin foods. Ham, yogurt, and Korean beef inoculated with *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, and *Salmonella* Typhimurium, were tested for the effects of diluent composition, processing time, and proportion of diluent to sample. The diluents used were peptone water (PW), Saline solution (SS), Butterfield's phosphate buffered dilution water (BPD), and Buffered peptone water (BPW). The processing time periods considered for the samples were 30, 60, 90, 120, and 300 sec, and the proportions of diluent to samples tested were 1:2, 1:4, 1:9, and 1:19. Yogurt and beef showed the highest number of bacteria when treated with BPW ($p < 0.05$). However, ham showed no significant difference between the treatments with four different diluents. Optimum proportions of diluent to ham, yogurt, and beef were 1:9, 1:2, and 1:4, respectively. The processing time of 120 sec was chosen as optimum, because it showed the best recovery rate in all sample types. In this manner, detection of food-borne bacteria with the selected optimal conditions was indicated by a recovery rate of more than 85%. These data suggest that an appropriate diluent composition and diluent volume should be used depending on the type of sample, which would thereby increase the accuracy of detecting food-borne bacteria in animal origin foods.

Key words : Food-borne Pathogens, sample preparation methods, animal origin foods

국민소득의 증가와 식생활의 서구화로 현대인들의 축산식품 소비가 꾸준히 증가하고 있고, 최근 외국산 축산물의 국내 유입이 급증함에 따라 국내에 유통되고 있는 축산물 및 축산 가공품의 미생물학적 안전성에 대한 사회적 관심이 크게 증가하고 있다[1]. 농림축산식품부 통계자료에 의하면 우리나라 1인당 연간 육류소비량은 1990년 19.7 kg에서 2014년 51.4 kg으로 2.6배 이상 증가하였다[2]. 식육을 비롯한 대부분의 축산식품은 우수한 고단백 영양식품인 반면에 미생물 오염이 매우 용이하여 쉽게 부패 및 변질되는 특징이 있다. 또한 동물의 분변에 존재하는 균에 의하여 직·간접적으로 오염되기 쉬우며, 이로 인해 인수공통전염병의 전파가능성도 높다[3]. 따라서 축산물 및 그 가공품 중 식중독균에 대한 정확한 정량 분석개발이 절대적으로 필요하다.

2015년 식품의약품안전처 통계자료에 따르면 *Staphylococcus aureus, Salmonella spp*., *Escherichia coli* O157:H7를 통한 식중독 발병환자는 우리나라 식중독 발병환자의 42.9%를 차지하는 것으로 보고되었다[4]. 유해미생물에 의한 식중독을 예방하기 위해서는 신속 정확하게 세균의 존재 여부와 그 양을 분석하는 것이 중요하다. 이런 이유로 생화학적, 면역학적, 분자생물학적 원리에 기초한 다양한 분석법이 개발 되었다[5,6]. 이러한 분석법의 정확성과 신뢰도를 결정짓는 중요한 요인 중 하나가 시료 전처리 기술임에도 불구하고 이에 대한 연구는 미미한 실정이다. 유제품 및 식육을 포함한 식품 중 식중독균의 분석은 이를 저해할 수 있는 환경적 요소 즉, 식품 성분과 온도, pH, 토착미생물 등에 의해 큰 영향을 받으므로 정확하게 예측하기 힘들다[7,8]. 특히 축산식품의 경우 지방이나 결체조직 등 복잡하고 다양한 매트릭스로 구성되어 있으며, 축산가공품의 경우 다

*Correspondence to: Mi-Hwa Oh, National Institute of Animal Science, Rural Development Administration, Wanju 55365, Republic of Korea
Tel: 82-63-238-7379, Fax: 82-63-238-7397
E-mail: moh@korea.kr

양한 식품첨가물이 식중독균 검출을 방해할 수도 있다[9]. 따라서 식중독균의 손상을 최소화하고 정확한 정량분석을 위해서는 식품의 종류에 적합한 전처리 방법의 확립이 필요하다. 외국에서는 유제품 (우유, 치즈) 및 햄, 소고기에서 효율적인 세균 회수를 위해 배지의 종류, 배지의 pH 및 온도 조절 등의 연구가 진행된 바 있다[7,10,11].

따라서 본 연구에서는 축산식품 중 식중독균 분석의 정확성을 제공하기 위한 최적 전처리법을 확립하기 위하여 대표적 축산식품인 햄, 발효유, 소고기를 대상으로 전처리 용액, 균질화 시간, 전처리 용액과 시료의 비율에 따른 영향을 비교 분석하였다.

Materials and Methods

균주 및 배지

본 실험에 사용한 *Staphylococcus aureus* (KCCM 12256)는 한국미생물보존센터(KCCM, Seoul, Korea)에서 분양 받았으며, *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 43890), *Salmonella* Typhimurium (ATCC 19585)는 American type culture collection (ATCC, Baltimore, MD, USA)에서 분양 받아 사용하였다. 각 균주는 tryptic soy agar (TSA; Difco, BD, USA)에 접종하고, tryptic soy broth (TSB; Difco, BD, USA)에서 37°C, 24시간 배양하였다. 한편 상재균이 확인된 시료는 각 균주의 항생제 저항성을 유도하여 사용하였다. 저항성 유도는 tryptic soy agar (TSA; TSA; Difco, BD, USA)에서 배양 균주 1 loop 취하여 rifampicin (R; Sigma-Aldrich, ≥97%, USA) 50 μL/mL이 함유된 luria bertani broth (LB, Difco, BD, USA) 7 mL에 접종하고, 37°C, 24시간 진탕배양하였다. 이후 rifampicin 50 μL/mL이 함유된 luria bertani agar (LA; Difco, BD, USA)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 TSB-R 5 mL에 접종한 후 37°C에서 18시간 동안 배양하고, 최종 OD_{600} = 1이 되게 생리식염수용액에 희석하여 생균수가 10^7 CFU/mL이 되게 조정하였다.

시료 및 전처리 용액

전라북도 전주에 위치한 마트에서 구입한 햄, 요거트, 국내산 소고기 시료를 사용하였다. 햄은 슬라이스 햄(10 × 10 cm)을, 요거트는 플레인 요거트, 소고기는 곱게 갈은 것을 사용하였다. 또한 목표 식중독균의 정확한 회수를 위해 햄, 발효유 및 소고기의 상재균을 확인하였다. 가공식품인 햄은 상재균이 없는 제품을 선정하여 사용하였으며, 발효유에서는 10^9 CFU/mL 수준의 유산균으로 예상되는 상재균을 확인하였으나, 식중독균 증식배지인 TSA 배지에 발효유와 식중독균을 함께 배양하였을 때 성장하는 시간의 차이로 인해 식중독균의 계수에는 영향을 주지 않음을 확인할 수 있었다. 한편, 비가공 식품인 소고기의 경우 10 CFU/g 수준의 상재균이 검출되었다(data not shown). 따라서 햄과 발효유에서는 표준균주를 소고기의 경우 항생제 저항성 유도균을 사용하였다. 세 가지 시료의 각 10 g에 균주 배양액(OD_{600} = 1) 100 μL를 표면에 접종하였으며, 이 후 15분간 상온에 방치하였다.

전처리 용액은 0.1% Peptone water (PW; MB cell, Seoul, Korea), 0.9% Saline solution (SS; HAPS DW-9, HUKO FS CO., LTD, Korea), 0.1% Butterfield's phosphate buffered dilution water (BPD), 2% Buffered peptone water (BPW; Difco, BD, USA)을 121°C에서 15분 멸균 후 사용하였다. BPD를 조제하기 위해 NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g, $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 1.15 g, KH_2PO_4 0.2 g를 1,000 mL 증류수에 녹여 1N NaOH를 첨가한 뒤 pH 7.2로 조정하여 멸균한 후 사용하였으며, PW, SS, BPW는 제조자의 제조방법에 따랐다.

전처리 용액에 따른 회수율 비교

전처리 용액에 따른 식중독균 회수율을 비교하기 위하여 식중독균(10^7 CFU/mL)이 접종 된 햄, 발효유, 소고기 각 10 g에 각 전처리용액(PW, SS, BPD, BPW) 90 mL를 멸균된 stomacher bag에 넣어 stomacher (Elmex SH-IIM, Tokyo, Japan)를 이용하여 120초 동안 균질화한 다음 1 mL을 취하여 saline solution 9 mL로 10배씩 단계 희석하였다. 각 희석 농도에 대하여 100 μL씩 TSA 또는 TSA-R agar에 접종한 후 37°C에서 24시간 배양한 후 형성된 colony를 계수하였다.

균질화 시간에 따른 회수율 비교

균질화 시간에 따른 식중독균 회수율을 분석하기 위해 전처리 용액에 따른 회수율 실험에서 가장 높은 회수율을 보인 처리용액을 선택하였다. 즉, 햄은 BPD 그리고 발효유와 소고기는 BPW를 사용하였다. 접종된 햄, 발효유, 소고기 각 10 g과 멸균된 BPD 또는 BPW 90 mL를 멸균된 stomacher bag에 넣어 stomacher를 이용하여 30초, 60초, 90초, 120초, 300초간 균질화시켰다. 이후 시료 1 mL를 취하여 생리식염수 9 mL로 희석한 후 각 희석농도에 대하여 100 μL씩 TSA 또는 TSA-R agar에 접종한 후 37°C에서 24시간 배양한 후 형성된 colony를 계수하였다.

시료와 전처리 용액의 비율에 따른 회수율 비교

시료 중량과 전처리용액의 비율을 결정하기 위하여 식중독균이 접종된 각 시료를 stomacher bag에 넣고 멸균된 BPD 또는 BPW를 무게의 1:2, 1:4, 1:9, 1:19 비율로 넣은 다음 stomacher로 120초간 균질화 시킨 후 시료 1 mL를 취하여 생리식염수 9 mL로 희석한 후 각 희석농도에 대

하여 100 μL씩 TSA 또는 TSA-R agar에 접종한 후 37°C에서 24시간 배양한 후 형성된 colony를 계수하였다.

통계처리

모든 실험은 3반복으로 수행되었으며 관찰된 실험결과는 SPSS version 16.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) 프로그램의 ANOVA procedure를 이용하여 분석하였다. 각각의 처리군이 통계적으로 유의성을 나타내는 경우에($p < 0.05$) 평균값은 Duncan's multiple range tests를 통하여 다중비교를 하였다.

Results and Discussion

식중독균 회수율 최적화를 위한 전처리용액 비교분석

축산식품 가공기준 상 축산식품의 미생물 검사에서는 전처리용액으로 BPD를 일반적으로 사용하고, SS와 PW, BPW를 상황에 따라 사용할 수 있다[12]. 따라서 본 연구에서는 위 네 가지를 전처리 용액으로 사용하여 용매에 따른 축산식품에서 식중독균의 회수율을 비교하였다. 그 결과 Table 1과 같이 축산식품 종류, 식중독균 및 전처리 용액에 따라 회수율의 차이가 있었다($p < 0.05$). 축산식품별로는 소고기에서 27.1~98.8%(평균 73.5%)로 가장 높은 회수율을 보였으며, 발효유와 햄은 각각 19.1~81.0%(평균 50.7%), 11.5~51.3%(평균 33.6%)로 낮은 회수율을 나타내었다. 가공식품의 다양한 첨가물과 식품에 본래 존재하는 상재균 수가 많은 경우에 목표 미생물의 분리가 어렵다는 보고[13]에 따라, 가공식품인 햄의 염지처리 및 합성 보존제, 그리고 발효유에 존재하는 많은 유산균 수가 식중독균의 회수과정에 영향을 주었을 것으로 사료된다.

식중독균별로는 *S.* Typhimurium가 *S. aureus, E. coli* O157:H7보다 높은 회수율을 보였다. 그람 양성균인 *S. aureus*가 그람 음성균인 *S.* Typhimurium, *E. coli* O157:H7에 비하여 두꺼운 peptidoglycan 층을 가지고 있어 회수되는 과정에서의 스트레스에 저항성이 클 것으로 예상되었으나[14] 본 연구에서는 차이를 볼 수 없었다. 전처리용액에 따른 회수율을 비교한 결과, 햄에서는 BPD로 처리하였을 때가 전반적으로 높은 경향을 보였으나, 유의차는 없었다($P > 0.05$). 반면, 발효유에서는 BPW처리시 유의적으로 가장 높은 회수율($p < 0.05$)을 보였으며, 소고기에서는 PW에서만 유의적으로 낮았을 뿐($p < 0.05$), BPW와 BPD, SS에서 유의차를 보이지 않았다. 발효유에서 BPW가 월등히 높은 회수율을 보인 이유는 산성의 성질을 가지고 있는 발효유에서 BPW가 다른 전처리 용액보다 높은 pH 안정성을 부여하여 식중독균의 생육을 저해하지 않고 일부는 회복시키는 역할을 한 것으로 사료된다[10]. 실제로 발효유의 초기 pH 4.3에서 PW, SS, BPD처리 후 pH는 각각 4.5, 4.4, 5.6 이었으나, BPW 처리 후 pH 6.6으로 중화되는 것을 확인하였다. 비슷한 결과를 보인 연구로 JIANG[10] 등은 우유와 치즈에서 열 손상된 *Salmonella* spp.와 *Escherichia coli*, *L. monocytogenes*의 회복 및 증식을 돕기 위해 BPW와 UPB (Universal preenrichment broth), TSB (Trypticase soy broth), LB (Nutrient broth)의 배지에서 생장속도를 비교하였다. 그 결과 BPW에서 *Salmonella* spp.와 *Escherichia coli*가 24시간 만에 10^2에서 $10^{8\text{-}9}$ CFU/mL로 증가하였으며, 이는 비교 배지 중 가장 높은 수준이었다. 한편, Kim[16] 등은 농산물 중 식중독균 전처리법을 표준화하기 위해 농산물 5종(양상추, 들깻잎, 오이, 고추, 토마토)에 *E. coli* O157:H7, *S.* Typhimurium, *S. aureus*, *B. cereus*, *L. monocytogenes*를 접종하여 회수율을 조사하였다. 그 결과 본 연구에서와 같이 농산물 종류, 처리용매 및 식중독균에 따라 회수율에 차이를 보였다고 보고한 바 있다.

따라서 최적 전처리 용액은 시료에 따라 달리 하는 것이 효과적이다. 본 연구에서는 이상의 결과에 따라 햄은 BPD, 발효유와 소고기는 BPW를 사용함이 가장 적합한 것으로 판단하여 이하의 실험에 적용하였다.

식중독균 회수율 최적화를 위한 균질화 시간 비교분석

축산식품의 미생물 오염은 발단이나 경로가 다양하기 때문에 식육내부 또는 표면에 미생물의 분포가 일정하지 않다[15]. 따라서 정확한 균질화 과정은 미생물의 고른 분포를 통한 정확한 정량을 위해서 필수적이다. 축산식품의 균질화 시간에 따른 축산식품 중 식중독균 회수율을 비교한 결과는 Table 2와 같다. 축산식품 종류, 식중독균 및 균질화 시간에 따라 회수율의 차이가 있었다($p < 0.05$). 햄의 경우 균주와 관계없이 120초에서 62.1~76.2%로 가장 높은 회수율을 보였고, 발효유의 경우 *E. coli* O157:H7와 *S. aureus*의 경우 90초와 120초에서 가장 높은 회수율을 보였으며($P < 0.05$), *S.* Typhimurium의 경우에는 30초에서 유의적으로 낮았을 뿐($P < 0.05$), 60-300초 사이에는 유의차가 없었다($p > 0.05$). 소고기에서는 *E. coli* O157:H7 경우에만 30초에서 유의적으로 낮은 회수율을 보였으며($P < 0.05$), 60~300초 사이의 유의차가 없었다($p > 0.05$). 반면 *S. aureus*는 120초에서 가장 높은 회수율을 보였으며($p < 0.05$), *S.* Typhimurium는 90~300초가 30~60초보다 유의적 높은 회수율을 나타냈다($p < 0.05$). 위의 결과를 종합적으로 검토하였을 때 균질화시간은 시료 및 균주에 관계없이 120초가 적합할 것으로 사료된다. 이는 식품공전법에서 식품 중 미생물 검사규격의 시료 균질화시간과도 일치한다[12].

식중독균 회수율 최적화를 위한 시료와 전처리용액 비율 비교분석

축산물 또는 축산가공품은 식품가공업자에 따라 제품의 형태가 다양하다. 식품공전법에서 제시한 시료 25 g을 취해서 225 mL의 전처리용액을 가할 경우[12] g당 표면적이 큰

Table 1. Effect of diluent composition on recovery of *E. coli* O157:H7, *S. aureus*, *S.* Typhimurim from animal origin foods

Sample	Pathogens	Diluent	Initial bacterial (log CFU/g)	Bacterial recovered (log CFU/g[(1)])	Recovery yield (%)
Ham	*Escherichia coli* O157:H7	PW	7.29	6.97 ± 0.04[a]	47.52
		BPW	7.34	6.98 ± 0.03[a]	43.64
		SS	7.40	6.93 ± 0.07[a]	33.73
		BPD	7.27	6.98 ± 0.06[a]	51.34
	Staphylococcus aureus	PW	7.26	6.92 ± 0.23[a]	42.4
		BPW	7.25	6.89 ± 0.20[a]	35.2
		SS	7.28	6.92 ± 0.25[a]	33.5
		BPD	7.25	6.93 ± 0.42[a]	45.3
	Salmonella Typhimurium	PW	7.04	6.54 ± 0.17[a]	17.6
		BPW	7.23	6.64 ± 0.02[a]	20.0
		SS	6.99	6.46 ± 0.11[a]	11.5
		BPD	7.08	6.59 ± 0.07[a]	20.9
Yogurt	*Escherichia coli* O157:H7	PW	7.18	7.07 ± 0.11[ab]	77.7
		BPW	7.19	7.10 ± 0.02[a]	80.98
		SS	7.01	6.86 ± 0.05[ab]	70.55
		BPD	7.29	6.78 ± 0.05[b]	30.76
	Staphylococcus aureus	PW	7.18	6.64 ± 0.16[b]	29.14
		BPW	7.37	7.25 ± 0.07[a]	75.14
		SS	7.01	6.29 ± 0.10[b]	19.09
		BPD	6.99	6.18 ± 0.18[c]	15.46
	Salmonella Typhimurium	PW	7.01	6.67 ± 0.16[b]	46.08
		BPW	7.09	7.05 ± 0.03[a]	90.24
		SS	6.91	6.63 ± 0.20[c]	51.63
		BPD	6.98	6.31 ± 0.11[c]	21.18
Beef	*Escherichia coli* O157:H7	PW	7.09	6.93 ± 0.06[b]	68.56
		BPW	7.10	7.08 ± 0.03[a]	95.47
		SS	7.14	7.01 ± 0.05[a]	74.21
		BPD	7.15	7.01 ± 0.02[a]	68.56
	Staphylococcus aureus	PW	7.28	7.04 ± 0.07[a]	57.19
		BPW	7.15	7.02 ± 0.03[a]	74.76
		SS	7.26	7.09 ± 0.02[a]	68.14
		BPD	7.10	7.08 ± 0.04[a]	96.03
	Salmonella Typhimurium	PW	7.05	6.48 ± 0.21[b]	27.08
		BPW	7.16	7.15 ± 0.06[a]	98.83
		SS	6.83	6.67 ± 0.07[b]	69.65
		BPD	7.01	6.93 ± 0.06[a]	83.99

[1)]Value are mean ± SD (n = 3); [abc]Values with different superscripts within the same column are significantly different by ANOVA with Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

시료의 경우에는 전처리 용액이 충분히 접촉하지 못하여 시료에 붙은 미생물이 전처리용액 속으로 분리되지 못할 수 있으며, 반대로 발효유와 같이 액체와 같은 물성을 가진 시료는 지나치게 희석되는 문제가 발생할 수 있다[14]. 따라서 신뢰할 수 있는 식중독균 정량 분석을 위해서는 시료의 종류에 따라 전처리용액의 최적 비율을 적용하는 것이 중요하다.

이에 따라 최적의 전처리 용액과 축산식품의 비율을 결정하고자 크기 및 물성이 다른 축산식품 3종에 대하여 전처리 용액과 시료의 비율에 따른 식중독균의 회수율을 비

Table 2. Effect of processing time on recovery of *E. coli* O157:H7, *S. aureus*, *S.* Typhimurim from animal origin foods

Sample	Pathogens	Processing time (s)	Bacterial recovered (log CFU/g[1)])	Recovery yield (%)
Ham	*Escherichia coli* O157:H7	30	6.23 ± 0.09[b]	76.23
		60	6.75 ± 0.22[a]	82.57
		90	6.59 ± 0.14[ab]	80.55
		120	6.83 ± 0.10[a]	76.23
		300	5.76 ± 0.16[c]	70.43
	Staphylococcus aureus	30	5.16 ± 0.06[c]	58.03
		60	5.51 ± 0.08[b]	61.88
		90	5.40 ± 0.02[b]	60.71
		120	6.42 ± 0.11[a]	62.06
		300	5.49 ± 0.06[b]	61.71
	Salmonella Typhimurium	30	5.46 ± 0.14[b]	63.87
		60	5.48 ± 0.06[b]	64.16
		90	5.40 ± 0.05[b]	63.21
		120	6.49 ± 0.09[a]	64.25
		300	5.37 ± 0.02[b]	62.90
Yogurt	*Escherichia coli* O157:H7	30	6.50 ± 0.14[ab]	20.30
		60	6.71 ± 0.04[b]	32.69
		90	7.12 ± 0.24[a]	83.76
		120	7.14 ± 0.08[a]	89.10
		300	6.25 ± 0.17[c]	11.32
	Staphylococcus aureus	30	6.98 ± 0.03[b]	40.11
		60	6.83 ± 0.11[c]	28.67
		90	7.16 ± 0.08[a]	61.16
		120	7.17 ± 0.12[a]	62.43
		300	7.00 ± 0.05[b]	42.23
	Salmonella Typhimurium	30	6.51 ± 0.08[b]	26.29
		60	6.91 ± 0.10[a]	66.40
		90	7.01 ± 0.05[a]	91.60
		120	7.01 ± 0.09[a]	71.27
		300	6.92 ± 0.05[a]	67.21
Beef	Escherichia coli O157:H7	30	6.75 ± 0.08[b]	61.90
		60	6.94 ± 0.02[a]	90.28
		90	6.90 ± 0.06[a]	81.94
		120	6.95 ± 0.02[a]	92.36
		300	6.95 ± 0.03[a]	93.40
	Staphylococcus aureus	30	6.99 ± 0.11[d]	46.76
		60	7.03 ± 0.01[cd]	51.18
		90	7.13 ± 0.04[bc]	64.14
		120	7.28 ± 0.05[a]	90.36
		300	7.19 ± 0.03[ab]	72.67
	Salmonella Typhimurium	30	6.86 ± 0.08[b]	54.89
		60	6.85 ± 0.05[b]	53.13
		90	7.06 ± 0.11[a]	85.96
		120	7.08 ± 0.04[a]	91.23
		300	7.09 ± 0.04[a]	93.48

[1)]Value are mean ± SD (n = 3); [abc]Values with different superscripts within the same column are significantly different by ANOVA with Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

Table 3. Effect of proportion of diluent to sample on recovery of *E. coli* O157:H7, *S. aureus*, *S.* Typhimurim from animal origin foods

Sample	Pathogens	Sample : diluent (g : mL)	Bacterial recovered (log CFU/g[(1)])	Recovery yield (%)
Ham	*Escherichia coli* O157:H7	1:2	6.20 ± 0.10[b]	68.94
		1:4	6.73 ± 0.06[a]	77.53
		1:9	6.83 ± 0.10[a]	71.35
		1:19	7.12 ± 0.09[a]	84.43
	Staphylococcus aureus	1:2	5.72 ± 0.10[b]	66.29
		1:4	6.53 ± 0.15[a]	80.89
		1:9	6.42 ± 0.11[a]	72.18
		1:19	6.45 ± 0.57[a]	75.74
	Salmonella Typhimurium	1:2	6.25 ± 0.15[b]	70.07
		1:4	6.12 ± 0.22[b]	70.00
		1:9	6.49 ± 0.09[a]	75.95
		1:19	5.88 ± 0.07[c]	76.04
Yogurt	*Escherichia coli* O157:H7	1:2	7.11 ± 0.03[a]	81.48
		1:4	7.06 ± 0.04[a]	73.50
		1:9	6.61 ± 0.04[b]	25.85
		1:19	6.50 ± 0.15[b]	20.09
	Staphylococcus aureus	1:2	7.25 ± 0.02[a]	74.58
		1:4	7.12 ± 0.04[a]	56.50
		1:9	6.72 ± 0.09[b]	22.03
		1:19	6.49 ± 0.12[c]	13.14
	Salmonella Typhimurium	1:2	7.07 ± 0.01[a]	95.12
		1:4	7.04 ± 0.03[a]	88.89
		1:9	6.97 ± 0.02[b]	75.07
		1:19	6.94 ± 0.03[b]	70.46
Beef	*Escherichia coli* O157:H7	1:2	7.39 ± 0.02[a]	93.23
		1:4	7.37 ± 0.06[a]	88.60
		1:9	7.21 ± 0.03[b]	61.60
		1:19	7.14 ± 0.04[c]	51.50
	Staphylococcus aureus	1:2	7.20 ± 0.05[b]	47.25
		1:4	7.40 ± 0.09[a]	76.26
		1:9	7.17 ± 0.06[b]	45.25
		1:19	6.93 ± 0.06[c]	25.86
	Salmonella Typhimurium	1:2	7.33 ± 0.03[a]	82.19
		1:4	7.40 ± 0.06[a]	95.04
		1:9	7.18 ± 0.08[b]	58.02
		1:19	7.21 ± 0.03[b]	62.60

[1)]Value are mean ± SD (n = 3); [abc]Values with different superscripts within the same column are significantly different by ANOVA with Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

교하였으며, 그 결과는 Table 3과 같다. *E. coli* O157:H7와 *S. aureus*는 햄과 전처리용액의 비율을 1:4, 1:9, 1:19로 각각 처리하였을 때 회수율의 차이는 없었으나, 1:2비율로 처리했을 때에는 유의적으로 낮은 회수율을 보였고($P < 0.05$), *S.* Typhimurium는 1:9로 처리하였을 때 가장 높은 회수율을 나타냈다($P < 0.05$). 발효유 경우에는 균종과 상관없이 1:2와 1:4 비율에서 유의적으로 높은 회수율을 보였으며($P < 0.05$), 소고기에서 또한 *E. coli* O157:H7와 *S.* Typhimurium는 1:2와 1:4 비율에서 유의적으로 높은 회수율을 보였으나($P < 0.05$), *S. aureus*는 오직 1:4에서 가장 높은 회수율을 나타내었다. 따라서 본 연구 결과 시료와 전처리용액 비율은 햄의 경우 1:9, 발효유는 1:2, 소고기는 1:4가 적합하다고 판단된다.

Table 4. Recovery of *E. coli* O157:H7, *S. aureus*, *S.* Typhimurim on the optimal conditions

Sample	Pathogens	Diluent	Processing time (s)	Sample : diluent (g : mL)	Bacterial recovered (log CFU/g)	Yield (%)
Ham	*Escherichia coli* O157:H7	BPD	120	1:9	7.06 ± 0.07	87.53
	Staphylococcus aureus	BPD	120	1:9	7.06 ± 0.05	94.54
	Salmonella Typhimurium	BPD	120	1:9	6.95 ± 0.06	96.42
Yogurt	*Escherichia coli* O157:H7	BPW	120	1:2	7.09 ± 0.08	88.57
	Staphylococcus aureus	BPW	120	1:2	7.14 ± 0.01	89.39
	Salmonella Typhimurium	BPW	120	1:2	7.12 ± 0.01	95.65
Beef	*Escherichia coli* O157:H7	BPW	120	1:4	7.12 ± 0.03	84.95
	Staphylococcus aureus	BPW	120	1:4	7.19 ± 0.05	85.37
	Salmonella Typhimurium	BPW	120	1:4	7.56 ± 0.06	98.83

최적화 조건에서의 식중독균 회수율 분석

축산식품 중 식중독균 회수를 위한 최적의 전처리 조건을 검토한 연구 결과를 바탕으로 Table 4와 같은 최적 조건을 설정하고, 식중독균의 회수율을 분석하였다. 그 결과 모든 시료에서 식중독균의 회수율이 85%를 상회하였다. *S.* Typhimurium는 시료에 관계없이 가장 높은 회수율을 보였으며, 특히 소고기에서는 약 99%의 회수율을 보여 27%로 가장 낮았던 회수율(Table 1)과 비교하여 약 3.6배 증가함을 확인할 수 있었다.

본 연구의 결과를 통해 축산식품으로부터 식중독균 검출을 위한 전처리 용액 및 시료와 전처리용액의 비율은 시료의 종류에 따라 적절한 것으로 사용하는 것이 식중독균 정량의 정확성을 높일 수 있을 것으로 사료된다.

Acknowledgement

본 연구는 농촌진흥청 연구사업(축산물 중 식중독균 검출을 위한 시료 전처리법 개발, PJ01199301)과 2016년도 농촌진흥청(국립축산과학원) 박사후연수과정 지원사업에 의해 이루어진 것임.

국문요약

본 연구는 축산식품으로부터 식중독균 검출을 위한 시료 전처리법을 확립하기 위해 전처리용액, 균질화 시간, 시료와 전처리용액의 비율에 따른 회수율을 비교하였다. 이를 위하여 햄, 발효유, 소고기에 *E. coli* O157:H7, *S. aureus*, *S.* Typhimurium를 7.0 log CFU/g로 접종하고 PW, SS, BPD, BPW로 처리하였다. 또한 균질화 시간은 30, 60, 90, 120, 300초, 시료와 전처리용액 비율은 1:2, 1:4, 1:9, 1:19로 각각 처리하였다. 그 결과 발효유와 소고기에서는 BPW로 처리하였을 때 전반적으로 식중독균의 회수율이 높았으나($p < 0.05$), 햄의 경우에는 전처리 용액에 따른 유의적 차이는 없다. 전처리용액의 최적 비율은 햄, 발효유, 소고기가 각각 1:9, 1:2, 1:4였으며($p < 0.05$), 균질화 시간은 모든 시료에서 120초로 처리했을 때 유의적으로 가장 높은 회수율이 나타났다($p < 0.05$). 따라서 선정된 최적 전처리 조건에서 식중독균 회수율을 수행한 결과 모든 시료 및 균종에서 85%이상의 높은 회수율을 보였다. 이상의 결과를 종합해 볼 때 축산식품으로부터 식중독균 검출을 위한 전처리 용액 및 시료와 전처리용액의 비율은 시료의 종류에 따라 적절한 것으로 사용하는 것이 식중독균 검출의 정확성을 높일 수 있을 것으로 판단되어진다.

References

1. Hong, S. H., Park, N. Y., Jo, H. J., Ro, E. Y., Ko, Y. M., Na, Y. J. and Moon, J. S.: Risk Ranking Determination of Combination of Foodborne Pathogens and Livestock or Livestock Products. *J. Fd Hyg. Safety*, **30**, 1-12 (2015).
2. MIAFF(Minstry of food, agriculture, forestry and fisheries): Statistics of food, agriculture, forestry and fisheries 2014. (2016).
3. Na, H. M., Bae, S. Y., Koh, B. R. D., Jang, M. S., Sung, C. M., Kim, J. Y. and Kim, Y. H.: Survey in consumers and distribution stages bacteriological analysis for fresh raw beef in Gwangju area, Korea. *Korean Journal of Veterinary Service*, **35**, 313-319 (2012).
4. KFDA: Korea Food and Drug Administration, Osong, Korea. Available from: http://www.foodsafetykorea.go.kr/portal.healthyfoodlife/foodpoisoningStat.do,Accessed on Aug. 24, (2016).
5. Kim, J. S., Lee, G. G., Park, J. S., Jung, Y. H., Kwak, H. S., Kim, S. B. and Kwon, S. T.: A novel multiplex PCR assay for rapid and simultaneous detection of five pathogenic bacteria: *Escherichia coli O157: H7*, *Salmonella, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes,* and *Vibrio parahaemolyticus. J. Food Prot*., **70**, 1656-1662 (2007).
6. Xue, X., Pan, J., Xie, H., Wang, J. and Zhang, S.: Fluorescence detection of total count of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* on water-soluble CdSe quantum dots coupled with bacteria. *Talanta*, **77**, 1808-1813 (2009).
7. Nero, L. A., De Mattos, M. R., de Aguiar Ferreira Barros,

M., Ortolani, M. B. T., Beloti, V. and de Melo Franco, B. D. G.: *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in raw milk produced in Brazil: occurrence and interference of indigenous microbiota in their isolation and development. *Zoonoses Public Health*, **55**, 299-305 (2008).

8. Clavero, M. R. and Beuchat, L. R.: Survival of *Escherichia coli* O157: H7 in broth and processed salami as influenced by pH, water activity, and temperature and suitability of media for its recovery. *Appl. Environ. Microbiol*., **62**, 2735-2740 (1996).
9. Conner, D. E. and Hall, G. S.: Efficacy of selected media for recovery of *Escherichia coli* O157: H7 from frozen chicken meat containing sodium chloride, sodium lactate or polyphosphate. *Food Microbiol*., **11**, 337-344 (1994).
10. Jiang, J., Larkin, C., Steele, M., Poppe, C. and Odumeru, J. A.: Evaluation of universal preenrichment broth for the recovery of foodborne pathogens from milk and cheese. *J. Dairy Sci*., **81**, 2798-2803 (1998).
11. Barkocy-Gallagher, G. A., Berry, E. D., Rivera-Betancourt, M., Arthur, T. M., Nou, X. and Koohmaraie, M.; Development of methods for the recovery of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* from beef carcass sponge samples and bovine fecal and hide samples. *J. Food Prot*., **65**, 1527-1534 (2002).
12. KFDA: Korea Food and Drug Administration, Osong, Korea (2015).
13. Kim, M. H., Kim, W. J., Shin, W. S., Shon, D. H. and Cha, S. K.: Feasibility study on the use of liposomes for detecting food-borne pathogenic bacteria. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour*., **23**, 278-283 (2003).
14. Kim, S. R., Choi, S. Y., Seo, M. K., Lee, J. Y., Kim, W. I., Yoon, Y., and Kim, B. S.: Establishment of sample preparation method to enhance recovery of food-borne pathogens from produce. *J. Fd. Hyg. Safety*, **28**, 279-285 (2013).
15. Animal and Plant Quarantine Agency: Veterinary Research and Quarantine Report (2001).