pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 35, No. 4, pp. 334~340 (2020)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2020.35.4.334

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

증균배지 및 DNA 추출법 개량을 통한 *Listeria monocytogenes*의 검출기법 개선 연구

이지연[1] · 서영은[2] · 윤요한[2,3]*

[1]동의대학교 식품영양학과, [2]숙명여자대학교 식품영양학과, [3]숙명여자대학교 위해분석연구센터

Improvement of the Detection Technique of *Listeria monocytogenes* through Modification of the Enrichment Medium and DNA Extraction Buffer

Jeeyeon Lee[1], Yeongeun Seo[2], Yohan Yoon[2,3]*

[1]*Department of Food & Nutrition, Dong-eui University, Busan, Korea*
[2]*Department of Food and Nutrition, Sookmyung Women's University, Seoul, Korea*
[3]*Risk Analysis Research Center, Sookmyung Women's University, Seoul, Korea*

(Received August 11, 2020/Revised August 17, 2020/Accepted August 18, 2020)

ABSTRACT - In this study we developed an enrichment medium and lysis buffers to detect *Listeria monocytogenes* in meat and processed meat products under various lysis conditions. The enrichment efficiency of *L. monocytogenes* medium listed in the Food Standards was compared, and thus, Listeria Enrichment Broth (LEB) was modified by adding supplements such as carbon source and minerals. The lysis buffers were developed to extract *L. monocytogenes* DNA quickly and efficiently under various lysis conditions. *L. monocytogenes* was most rapidly grown in LEB containing 0.1% pyruvate and 0.1% ferric citrate. A lysis buffer mixed with 0.5% or 1% N-lauroylasrcosine sodium salt, 0.5 N NaOH and 0.5 M EDTA for 30 min at room temperature was found to be the best in terms of DNA purity and yield. These results indicate that developed enrichment medium and lysis buffer can be used to detect *L. monocytogenes* in meat and processed meat products rapidly and efficiently.

Key words : *Listeria monocytogenes,* Detection, Enrichment medium, DNA extraction buffer

*Listeria monocytogenes*는 치사율이 20-30%로 매우 높은 그람양성의 식중독 세균으로 식육 및 식육가공품, 치즈, 아이스크림 등을 포함한 다양한 축산식품에서 검출되는 세균이다[1-5]. *L. monocytogenes*는 저온에서도 증식 가능한 저온성 세균이기 때문에, cold chain을 통해 식육 및 식육가공품이 유통될 때 *L. monocytogenes*가 증식할 수 있다[6,7]. 이미 유통된 식품에서 *L. monocytogenes*가 검출될 경우 리콜(recall)을 해야하는데 리콜에 따른 경제적 손실이 발생할 수 있으며, 이미 유통된 식품을 섭취함으로써 식중독 발생 가능성이 존재할 수 있다[8]. 따라서 식육 및 식육가공품이 유통되기 전 제품 내에서 *L. monocytogenes*의 존재유무를 빠르게 파악하여 제품의 유통차단을 통한 유통비용의 절감, 노동력 낭비 등을 막고, 국민 건강을 보호해야 한다.

우리나라 식품공전에 따르면 증균배양, 분리배양 및 확인시험의 단계를 통해 *L. monocytogenes*를 검출하고 있다[9]. *L. monocytogenes*를 검출하고자 하는 시료의 종류마다 증균배양 시 사용되는 배지의 종류가 약간 다른데, 식육 및 식육가공품은 Listeria Enrichment Broth, PALCAM Broth, UVM Modified Listeria Enrichment Broth를 일차적으로 사용하여 *L. monocytogenes*를 증균하고 있다. 식품공전에 따르면 식육 및 식육가공품에서 *L. monocytogenes*를 증균하는데 소요되는 절대적인 시간은 최소 46시간인 것으로 확인되었다. 확인시험에서는 β-hemolysin을 나타내고 catalase 및 motility 양성, CAMP test 결과에서 *Staphylococcus aureus* ATCC25923 양성이며 *Phodococcus equi* ATCC6939에서 음성, mannitol과 xylose는 비분해하며, rhamnose는

*Correspondence to: Yohan Yoon, Department of Food and Nutrition, Sookmyung Women's University, Seoul 04310, Korea
Tel: +82-2-2077-7585, Fax: +82-2-710-9479
E-mail: yyoon@sookmyung.ac.kr

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution,and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

분해하는 경우 *L. monocytogenes* 양성으로 보고 있다. 이러한 생화학적 시험법으로 *L. monocytogenes*를 확인할 경우 하루 이상의 시간이 소요된다. 증균배양과 확인시험만으로 최소 3일 이상의 시간이 필요한데[9,10], *L. monocytogenes*의 오염 여부를 확인할 때까지 제품의 유통을 보류한다면 상업적인 관점에서 3일은 판매 제품의 품질을 저하시킬 뿐만 아니라 시험 완료시까지의 저장고 공간 확보의 어려움, 유통 지연으로 인한 경제적 이익 감소 등의 문제가 발생할 가능성이 높다. 따라서 증균배양 시간을 줄이고, 적은 시간이 소요되는 빠른 확인시험법이 필요한데, 그것의 대안으로 증균배지의 개량과 conventional polymerase chain reaction (PCR)을 활용한 확인시험이 있다[11,12]. 증균배지는 일반적인 배지보다 특정 세균, 본 연구에서는 *L. monocytogenes*의 증식을 용이하게 하고, 다른 세균들의 성장을 억제시키기 위해 다양한 성분들을 일정 비율로 첨가한 것인데[13], 이러한 효과를 보완할 수 있는 성분들을 추가해준다면 동일한 시간 내에 *L. monocytogenes*의 증식 효율을 높일 수 있을 것으로 기대된다. Conventional PCR의 경우 DNA 추출과 유전자 증폭 및 전기영동 등의 과정을 거치는데, 대략 2-4시간 정도가 소요되는 기법이다. 그러나 현재 시중에 유통되고 있는 DNA 추출 관련 kit들은 비전문가가 사용하기에 어려워 산업 현장에 적용하기에 부적절하며, 비싼 가격 등의 단점이 있다.

따라서 본 연구에서는 증균배지를 개발하여 *L. monocytogenes*의 증균 효율을 높이며, 현장에서의 사용 용이성이 있고 저렴한 DNA 추출과 관련된 각종 buffer 및 이에 맞는 세포 용해 조건을 개발함으로써 *L. monocytogenes*의 검출기법을 개선하고자 하였다.

Materials and Methods

L. monocytogenes 균액 준비

3개의 *L. monocytogenes* 균주(*L. monocytogenes* ATCC13932, ATCC51174, ATCC BAA-839)의 단일집락을 10 mL의 tryptic soy broth에 0.6% yeast extract이 첨가된 배지(TSBYE; Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)에 접종하여 30°C에서 24시간 배양하였다. 배양액 중 0.1 mL을 취하여 새로운 10 mL의 TSBYE에 접종하여 30°C에서 24시간 배양하였다. 배양액을 모두 동량으로 혼합하여 원심분리(1,912×*g*, 15분, 4°C)하고, 상층액을 버린 뒤 30 mL의 phosphate buffered saline (PBS)을 가하여 균체를 현탁시켜 세척하였다. 동일 조건에서 한 번 더 원심분리한 후 상층액을 버리고 30 mL PBS로 재현탁시켜 균액을 준비하였다.

증균배지 별 *L. monocytogenes* 증균 효율 확인

식품공전에 등재되어 있는 *L. monocytogenes* 증균배지 3종(Listeria Enrichment Broth (LEB; Becton, Dickinson and Company), UVM-modified Listeria Enrichment Broth (UVM-LEB; Becton, Dickinson and Company), PALCAM Broth (PB; MB cell; Log Angeles, CA, USA))을 배지 제조법에 따라 제조하였다. *L. monocytogenes* 현탁액을 9 mL의 PBS로 십진희석하여 3-4 Log CFU/mL의 접종액을 준비하였다. 각 증균배지 10 mL에 *L. monocytogenes*를 0.1 mL씩 접종하여 30°C에서 배양하였다. 배양액을 0, 3, 6, 9, 12시간마다 tryptic soy agar에 0.6% yeast extract를 첨가한 배지(TSAYE; Becton, Dickinson and Company)에 평판도말한 뒤 30°C에서 24시간 배양하였다. 배양 후 집락을 계수하고 증균배지에 따른 시간 별 *L. monocytogenes* 증균 속도를 통해 증균배지 별 증균 효율을 확인하였다. 이를 3회 반복하여 실험하였다.

증균배지 개발을 통한 *L. monocytogenes* 증균 효율 향상 비교

증균배지 3종 중 증균 효율이 뛰어나고 사용빈도가 높은 증균배지(LEB)를 선택하여 배지의 성분을 개량함으로써 증균배지를 개발하였다. 증균배지 개발에 사용된 성분은 탄소원으로써 pyruvate, 질소원으로써 cysteine, 미량 무기질로써 ferric citrate, iron chloride ($FeCl_2$), thiamine hydrochloride, buffer로써 3-morpholinopropane-1-sulfonic acid (MOPS), 항생제로써 polymyxin B가 일정 농도로 사용되었다(Table 1). *L. monocytogenes* 현탁액을 9 mL의

Table 1. Supplements and concentrations added to *L. monocytogenes* enrichment medium

Components		Concentration (%)
Carbon source	Pyruvate	0.1, 0.2, 0.4
Nitrogen source	Cysteine	0.1, 0.2
Mineral	Ferric citrate	0.05, 0.1
	Iron chloride ($FeCl_2$)	0.1, 0.2
	Thiamine hydrochloride	0.0005, 0.001
Buffer	3-morpholinopropane-1-sulfonic acid (MOPS)	0.5, 1.0
Antibiotic	Polymyxin B	100 IU/mL, 1,000 IU/mL

Table 2. Ingredients and concentrations of ingredients in lysis buffer

Ingredients	Concentration
NaOH	0.05 N, 0.1 N, 0.5 N
Sodium dodecyl salt (SDS)	0.25%, 0.5%
Ethylenediamine-N, N, N', N'-tetraaectic acid (EDTA)	0.5 M, 1 M
N-lauroylsarcosine sodium salt (NLS sodium salt)	0.5%, 1%

PBS로 십진희석하여 3-4 Log CFU/mL의 접종액을 준비하였다. 일정 농도의 성분을 첨가한 각각의 증균배지 10 mL과 일반 증균배지(LEB; control) 10 mL에 0.1 mL의 *L. monocytogenes*를 접종하여 30°C에서 배양하였다. 12시간 뒤 배양액을 꺼내어 0.1% buffered peptone water (Becton, Dickinson and Company)로 적절히 십진희석하고 TSAYE에 평판도말 하였다. 평판도말한 배지를 30°C에서 24시간 동안 배양한 후 집락을 계수하고, 개발 증균배지와 LEB의 증균 효율을 비교하였다. 이를 3회 반복하여 실험하였다.

DNA 용해 버퍼 및 용해조건에 따른 DNA 추출 효율성 확인

DNA의 추출 과정에서 필요한 버퍼는 용해버퍼(lysis buffer), 세척버퍼(washing buffer), 용출버퍼(elution buffer)로 대표된다. 용해버퍼는 sodium dodecyl salt (SDS), ethylenediamine-N, N, N', N'-tetraaectic acid (EDTA), N-lauroylsarcosine sodium salt (NLS sodium salt), NaOH를 적절한 농도로 단일 또는 혼합하여 제조 및 사용하였고(Table 2), 세척버퍼는 20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl (pH 7.5), 80% ethanol을 혼합하여 사용하였다. 용출버퍼는 DNase free water를 사용하였다. *L. monocytogenes* 현탁액을 원심분리(1,912×*g*, 15분, 4°C)하고 상층액을 제거하였다. 균체를 용해시키기 위해 다양하게 제조된 용해버퍼를 1 mL 가한 뒤 강하게 현탁시키고 새로운 e-tube에 옮겨 담았다. 용해조건은 총 세 가지로, 99°C에서 15분, 99°C에서 30분, 실온에서 30분으로 하여 용해버퍼에 담긴 균체를 용해시켰다. Column (Hyundai micro Co., LTD, Seoul, Korea)에 용해액을 넣고 원심분리(8,000×*g*, 1분, 4°C)하고 하단의 용액(flow-through)를 버렸다. Column에 0.6 mL의 세척버퍼를 가한 뒤 동일 조건으로 원심분리(8,000 ×*g*, 1-2분, 4°C)하고 flow-through를 버렸다(2회 반복). 새로운 e-tube에 column을 끼워 넣고 0.2 mL의 용출버퍼를 가한 뒤 실온에 1분간 방치하였다가 원심분리(8,000 ×*g*, 2분, 4°C)하여 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA의 순도(260/280 ratio)와 수율(ng/μL)은 Take 3 (BioTeck Instruments Inc., Winooski, VT, USA)를 이용하여 측정하였다. 추출된 DNA의 순도와 수율이 적합한지 확인하기 위해서 상용화된 DNA 분리 및 정제 키트 2종(KIT1, KIT2)을 이용하여 추출된 DNA의 순도 및 수율과 비교하였다. 이를 3회 반복하여 실험하였다.

Results and Discussion

개발 증균배지 별 *L. monocytogenes*의 증균 효율

증균배지 별 *L. monocytogenes* 증균 효율을 살펴보았을 때, 증균 효율은 LEB와 UVM-LEB에서 비슷하게 나타났다. PB는 증균 효율이 매우 낮은 것으로 확인되었다(data not shown). 따라서 증균배지 3종 중 증균 효율이 뛰어나고 사용빈도 높은 LEB를 성분개량 증균배지로 선정하였다.

LEB에 성분과 농도를 달리 첨가하여 개발 증균배지를 제조하였다. 단일성분을 첨가한 개발 증균배지 15종과 혼합성분을 첨가한 개발 증균배지 5종을 제조하여 개발 증균배지 별 *L. monocytogenes*의 증균 효율을 분석하였다. 단일성분을 첨가한 개발 증균배지의 *L. monocytogenes* 증균 효율 분석 결과, 0.1% pyruvate 또는 0.1% ferric citrate를 첨가하였을 때 control 대비 0.6 Log CFU/mL 더 증균되었다. 또한 0.2% pyruvate 또는 0.001% thiamine hydrochloride를 첨가했을 때는 control 대비 0.3 Log CFU/mL 더 증균되었다. 반면 polymyxin B가 100 IU/mL, 1,000 IU/mL 첨가된 증균배지에서는 *L. monocytogenes*가 control 대비 0.5 Log CFU/mL, 1.7 Log CFU/mL 감소된 것을 확인하였다(Table 3). 단일성분 중에서 *L. monocytogenes*의 증균 효율을 높인 성분(pyruvate, iron chloride, ferric citrate, thiamine hydrochloride)을 혼합하여 5종의 개발 증균배지를 제조하고, 개발 증균배지 별 *L. monocytogenes*의 증균 효율을 분석하였다. 그 결과, 0.1% pyruvate과 0.1% ferric citrate를 혼합하여 첨가하였을 때 가장 증균 효율이 우수하였으며, control 대비 0.8 Log CFU/mL 더 증균되었음을 확인하였다. 0.1% pyruvate과 0.05% ferric citrate를 혼합하여 첨가하였을 때에는 단일성분 첨가 시와 차이가 없었다(0.6 Log CFU/mL 증가) (Table 4). 일반적으로 *L. monocytogenes*는 철을 이용하는 성질을 가지고 있어 철이 함유된 배지에서 증식 및 생존이 용이하다[10,14].

본 실험에는 순수배양한 *L. monocytogenes*가 이용되었는데, 식육 및 식육가공품에는 다양한 background flora가 존재할 수 있으며, 이들은 *L. monocytogenes*의 성장 및 증식에 영향을 미칠 수 있다. 따라서 본 연구결과를 활용하여 background flora는 억제시키고 *L. monocytogenes*만을

Table 3. Enrichment efficiency of enrichment medium with added single ingredient

Medium	Cell counts (Log CFU/mL)			
	Initial	After 12 h	Increase compared to the initial	Increase compared to LEB
LEB (Control)	0.8±0.2	3.1±0.3	2.3±0.1	-
LEB+0.1% pyruvate	0.4±0.6	3.3±0.3	2.9±0.5	0.6
LEB+0.2% pyruvate	0.5±0.5	3.1±0.6	2.6±0.3	0.3
LEB+0.4% pyruvate	0.5±0.6	2.7±1.2	2.2±0.8	-0.1
LEB+0.1% cysteine	0.8±0.4	2.7±0.4	2.1±0.3	-0.2
LEB+0.2% cysteine	0.7±0.5	2.6±0.4	2.1±0.4	-0.2
LEB+0.05% ferric citrate	0.9±0.1	3.3±0.2	2.5±0.3	0.2
LEB+0.1% ferric citrate	0.9±0.0	3.8±0.1	2.9±0.1	0.6
LEB+0.1% iron chloride	0.5±0.4	3.0±0.4	2.5±0.5	0.2
LEB+0.2% iron chloride	0.5±0.6	2.9±0.4	2.4±0.7	0.1
LEB+0.0005% thiamine hydrochloride	0.9±0.2	2.9±0.4	2.0±0.2	-0.3
LEB+0.001% thiamine hydrochloride	0.6±0.3	3.2±0.2	2.6±0.0	0.3
LEB+0.5% MOPS	0.9±0.3	2.9±0.1	2.1±0.3	-0.2
LEB+1.0% MOPS	0.7±0.5	2.8±0.2	2.1±0.7	-0.2
LEB+100 IU/mL polymyxin B	0.5±0.4	2.3±0.7	1.8±0.3	-0.5
LEB+1,000 IU/mL polymyxin B	0.4±0.4	0.9±0.9	0.5±0.6	-1.7

Data are presented as mean±standard error.

Table 4. Enrichment efficiency of enrichment medium with added mixed components

Medium	Cell counts (Log CFU/mL)			
	Initial	After 12 h	Increase compared to the initial	Increase compared to LEB
LEB (Control)	0.8±0.2	3.1±0.3	2.3±0.1	-
LEB + 0.1% pyruvate + 0.05% ferric citrate	0.7±0.1	3.4±0.1	2.9±0.4	0.6
LEB + 0.1% pyruvate + 0.1% ferric citrate	0.7±0.0	3.7±0.1	3.1±0.1	0.8
LEB + 0.1% pyruvate + 0.1% iron chloride	0.3±0.5	2.4±0.8	2.1±0.5	-0.2
LEB + 0.1% pyruvate + 0.001% thiamine hydrochloride	0.7±0.4	3.1±0.2	2.4±0.2	0.1

Data are presented as mean±standard error.

선택적으로 증균시킬 수 있는 증균배지 개발을 위한 추가 실험이 필요할 것으로 사료된다.

용해버퍼 조성 및 용해조건에 따른 DNA 추출 효율

추출된 DNA의 순도는 1.8±0.2가 적당한 것으로 판단한다[15,16]. 용해버퍼의 조성 및 용해조건에 따라 *L. monocytogenes*의 DNA를 추출한 결과, 0.5% NLS sodium salt에 0.5 N NaOH, 0.5 M EDTA를 이용하여 99°C에서 30분, 실온에서 30분 간 용해시킨 후 DNA를 처리하였을 때 DNA의 순도가 각각 2.00, 1.89로 나타나 순도가 높은 것을 확인하였다(Table 5). 또한 1% NLS sodium salt + 0.5 N NaOH + 0.5 M EDTA를 이용하여 실온에서 30분 간 용해시켰을 때에는 DNA 순도가 1.96으로 나타났다. KIT1로 추출한 DNA의 순도는 2.02, KIT2로 추출한 DNA의 순도는 1.93으로, 본 연구에서 개발된 용해버퍼 및 용해조건과 유사하게 나타난 것을 확인하였다.

DNA의 수율은 0.1-1 ng/μL이면 conventional PCR을 수행하기에 충분하다고 본다[17,18]. DNA의 수율은 1 M EDTA를 이용해서 99°C에서 15분, 실온에서 30분 간 용해시켰을 때 각각 109.21 ng/μL, 160.73 ng/μL로 우수하게 나타났다. 또한 1% NLS sodium salt + 0.5 N NaOH를 이용해서 99°C에서 30분 간 용해시켰을 때 110.17 ng/μL로 나

Table 5. DNA extraction efficiency according to lysis buffer composition and lysis condition

Lysis buffer	Purity (260/280 ratio)			Yield (ng/μL)		
	99°C, 15min	99°C, 30min	RT[1)], 30min	99°C, 15min	99°C, 30min	RT, 30min
0.05 N NaOH	1.60±0.07	1.66±0.02	1.62±0.02	16.21±2.49	23.67±1.69	103.00±8.50
0.1 N NaOH	1.65±0.01	1.64±0.03	1.68±0.08	14.53±1.68	22.21±3.38	97.63±29.39
0.5 N NaOH	1.77±0.05	1.72±0.01	1.57±0.03	18.27±1.30	20.00±1.27	29.78±0.33
0.05 N NaOH + 0.25% SDS	1.60±0.05	0.62±1.43	1.48±0.04	17.21±5.35	6.68±13.65	46.07±14.01
0.1 N NaOH + 0.5% SDS	1.73±0.42	1.75±0.13	1.63±0.01	9.64±2.21	11.28±2.69	32.81±9.41
0.5 N NaOH + 1% SDS + 0.5 M EDTA	1.25±0.36	1.54±2.32	1.67±0.00	19.24±17.16	0.14±0.29	9.71±3.94
1 M EDTA	2.18±0.10	0.26±0.86	1.74±0.03	109.21±32.17	0.86±1.17	160.73±6.04
0.5% NLS sodium salt + 0.5 N NaOH	1.76±0.17	1.42±0.06	1.58±0.06	8.37±1.65	17.31±6.61	13.90±2.62
1% NLS sodium salt + 0.5 N NaOH	1.70±0.52	2.08±0.03	1.45±0.09	5.83±2.73	110.17±3.00	10.23±2.94
0.5% NLS sodium salt + 0.5 N NaOH + 0.5 M EDTA	2.16±1.05	2.00±0.53	1.89±0.33	10.16±1.02	9.62±8.42	13.90±4.73
1% NLS sodium salt + 0.5 N NaOH + 0.5 M EDTA	2.90±4.93	1.19±0.07	1.96±0.09	0.77±0.74	6.93±1.77	17.44±2.09
KIT1		2.02			139.82	
KIT2		1.93			148.11	

Data are presented as mean±standard deviation.
[1)]Room temperature.

타났다(Table 5). KIT1로 추출한 DNA의 농도는 139.82 ng/μL, KIT2로 추출한 DNA의 농도는 148.11 ng/μL로 본 연구에서 개발된 용해버퍼 및 용해조건보다는 유사하거나 높은 수율의 DNA를 추출한 것으로 확인되었다.

상용화된 kit 두 가지(KIT1, KIT2)를 이용하여 DNA를 추출할 경우와 비교하여 본 연구에서 개발된 용해버퍼 및 용해조건을 이용하여 DNA를 추출할 경우 발생하는 이점은 크게 두 가지가 있다. 첫 번째, DNA 추출에 소요되는 비용이 매우 저렴하다. 한 시료의 DNA를 추출할 때 대략적인 가격을 살펴보면, 본 연구의 방법을 이용할 경우 KIT1과 KIT2보다 1/3 이상 저렴한 가격으로 DNA를 추출할 수 있다. 두 번째, DNA 추출에 소요되는 시간이 짧다. 본 연구의 방법을 이용할 경우 1시간 내로 DNA 추출이 가능하나, KIT1과 KIT2를 이용할 경우 최소 80분, 최대 160분의 시간이 소요된다.

최종적으로 DNA의 순도와 현장 적용 가능성, DNA 추출 방법의 신규성과 경제적 측면을 고려하여 용해버퍼 및 용해조건을 선정하였다. 그 결과, 0.5% NLS sodium salt + 0.5 N NaOH + 0.5 M EDTA 또는 1% NLS sodium salt + 0.5 N NaOH + 0.5 M EDTA를 용해버퍼로 이용하여 실온에서 30분 간 용해시키는 것이 DNA를 순도 높게 적절한 수율로 추출해내는 것으로 나타나 이를 DNA 추출 방법으로 선정하였다.

Conclusion

결론적으로 LEB에 0.1% pyruvate과 0.1% ferric citrate를 첨가한 증균배지가 기존 LEB에 비하여 동일 시간 내에(12시간) *L. monocytogenes*를 더 증균시켜 증균 효율을 높이는 것으로 확인되었다. 또한 *L. monocytogenes*의 DNA 추출 시 개발된 용해버퍼 및 용해조건을 활용한다면 순도 높고 적절한 수율의 DNA를 단 시간에 저렴한 가격으로 추출해낼 수 있다. 따라서 본 연구에서 개발된 증균배지와 DNA 추출법을 결합한다면, 식육 및 식육가공품에 오염된 *L. monocytogenes*를 식품공전법을 사용하였을 때 보다 신속하게 검출할 수 있을 것으로 사료된다.

Acknowledgement

본 결과물은 농림축산식품부의 재원으로 농림식품기술

기획평가원의 농축산물 안전생산·유통관리기술개발사업의 지원을 받아 연구되었음(118104-2).

국문요약

기존의 *L. monocytogenes* 증균배지를 개량함으로써 증균배지를 개발하여 *L. monocytogenes*의 증균 효율을 높이며, DNA 추출에 사용되는 용해버퍼 및 용해조건을 개발함으로써 식육 및 식육가공품에서 *L. monocytogenes*를 효율적이고 신속하게 검출하고자 하였다. 식품공전에 등재되어 있는 *L. monocytogenes* 증균배지의 증균 효율을 비교하였으며, Listeria Enrichment Broth (LEB)가 가장 우수한 증균 효율을 보였다. LEB에 탄소원, 질소원, 미네랄 등 다양한 성분을 첨가하여 증균배지를 개발하였으며, 그 결과 LEB에 0.1% pyruvate, 0.1% ferric citrate를 첨가한 개발 증균배지에서 *L. monocytogenes*가 가장 빠르게 증균되었다. *L. monocytogenes*의 DNA를 신속하고 효율적으로 추출하기 위해 용해버퍼와 용해조건을 개발하였으며, 그 결과 0.5% 또는 1% N-lauroylsarcosine sodium salt에 0.5 N NaOH와 0.5 M EDTA가 혼합된 용해버퍼를 이용하여 실온에서 30분 간 *L. monocytogenes* 세포를 용해시키는 것이 DNA의 순도와 수율, 신규성과 경제적 측면에서 가장 우수한 것으로 확인되었다. 결론적으로 본 연구에서 개발된 증균배지 및 DNA 추출법을 활용한다면 식육 및 식육가공품에서 *L. monocytogenes*를 보다 신속하게 검출할 수 있을 것이다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Jeeyeon Lee https://orcid.org/0000-0002-5885-6835
Yeongeun Seo https://orcid.org/0000-0003-4986-9770
Yohan Yoon https://orcid.org/0000-0002-4561-6218

References

1. Chen, Y., Chen, M., Wang, J., Wu, Q., Cheng, J., Zhang, J., Sun, Q., Xue, L., Zeng, H., Lei, T., Pang, R., Ye, Q., Wu, S., Zhang, S., Wu, H., Li, W., Kou, X., Heterogeneity, characteristics, and public health implications of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and pasteurized milk in China. *Front. Microbiol*., **11**, 642 (2020).
2. Demaître, N., Van Damme, I., De Zutter, L., Geeraerd, A.H., Rasschaert, G., De Reu, K., Occurrence, distribution and diversity of *Listeria monocytogenes* contamination on beef and pig carcasses after slaughter. *Meat Sci.*, 108177 (2020).
3. Lee, J., Gwak, E., Lee, H., Ha, J., Lee, S., Kim, S., Oh, M.H., Park, B.Y., Choi, K.H., Yoon, Y., Effects of low $NaNO_2$ and NaCl concentrations on *Listeria monocytogenes* growth in emulsion-type sausage. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.*, **30**, 432-438 (2017).
4. Liu, Y., Sun, W., Sun, T., Gorris, L.G., Wang, X., Liu, B., Dong, Q., The prevalence of *Listeria monocytogenes* in meat products in China: A systematic literature review and novel meta-analysis approach. *Int. J. Food Microbiol.*, **312**, 108358 (2020).
5. Rietberg, K., Lloyd, J., Melius, B., Wyman, P., Treadwell, R., Olson, G., Kang, M.G., Duchin, J.S., Outbreak of *Listeria monocytogenes* infections linked to a pasteurized ice cream product served to hospitalized patients. *Epidemiol. Infect.*, **144**, 2728-2731 (2016).
6. Karyotis, D., Skandamis, P.N., Juneja, V.K., Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in sous-vide processed marinated chicken breast. *Food Res. Int*., **100**, 894-898 (2017).
7. Tangwatcharin, P., Sorapukdee, S., Kongsrirat, K., Sous-vided restructured goat steaks: process optimized by thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* and their quality characteristics. *Food Sci. Anim. Resour.*, **39**, 863-876 (2019).
8. Thangavel, G., Subramaniyam, T., Antimicrobial efficacy of *Leuconostoc* spp. isolated from Indian meat against *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* in Spinach leaves. *Food Sci. Anim. Resour.*, **39**, 677-685 (2019).
9. Ministry of Food and Drug Safety, (2020, July 14). Food standards. Retrieved from http://www.foodsafetykorea.go.kr/foodcode/index.jsp
10. Lee, Y., Yoon, Y., Seo, Y., Kim, S., Ha, J., Lee, J., Choi, Y., Oh, H., Kim, Y., Kang, J., Park, E., Kim, W.I., Lee, S., Combined enrichment and quantitative polymerase chain reaction to improve sensitivity and reduce time of detection of *Listeria monocytogenes* in mushrooms. *Foodborne Pathog. Dis.*, **17**, 276-283 (2020).
11. Delibato, E., Gattuso, A., Minucci, A., Auricchio, B., De Medici, D., Toti, L., Castangnola, M., Cpoluongo, E., Gianfranceschi, M.V., PCR experion automated electrophoresis system to detect *Listeria monocytogenes* in foods. *J. Sep. Sci.*, **32**, 3817-3821 (2009).
12. Furrer, B., Candrian, U., Hoefelein, C., Luethy, J., Detection and identification of *Listeria monocytogenes* in cooked sausage products and in milk by *in vitro* amplification of haemolysin gene fragments. *J. Appl. Bacteriol.*, **70**, 372-379 (1991).
13. Silk, T.M., Roth, T.M., Donnelly, C.W., Comparison of growth kinetics for healthy and heat-injured *Listeria monocytogenes* in eight enrichment broths. *J. Food Prot.*, **65**, 1333-1337 (2002).
14. McLaughlin, H.P., Hill, C., Gahan, C.G., The impact of iron on *Listeria monocytogenes*; inside and outside the host. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **22**, 194-199 (2011).
15. Clark, M.S., 1997. Plant Molecular Biology - A Laboratory

Manual. Springer, Berlin/ Heidelberg, Germany, pp.305-328.
16. Popa, O.P., Murariu, D.U.M.I.T.R.U., Popa, L.O., Comparison of four DNA extraction methods from invasive freshwater bivalve species (Mollusca: Bivalvia) in Romanian fauna. *Trav. Mus. Natl. Hist. Nat. Grigore Antipa*, **6**, 527-536 (2007).
17. Poms, R., Glössl, J., Foissy, H., Increased sensitivity for detection of specific target DNA in milk by concentration in milk fat. *Eur. Food Res. Technol.*, **213**, 361-365 (2001).
18. Thermo Fisher Scientific, (2020, August 11). PCR setup-Six Critical Components to Consider. Retrieved from https://www.thermofisher.com/kr/ko/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-component-considerations.html