

최 종
연구보고서

오염발생예측 시스템 및 추적기술을 이용한
축산물작업장에서의
Microbial Hazards Exposure Model 개발

Development of Microbial Hazards Exposure Model (MHEM)
using contamination estimation and tracing contaminants
in pork processing plants

연구기관
강원대학교

농 립 부

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “오염발생예측 시스템 및 추적기술을 이용한 축산물작업장에서의 Microbial Hazards Exposure Model (MHEM) 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005년 11월 14일

주관연구기관명 : 강원대학교
주관연구책임자 : 홍 종 해
세부연구책임자 : 홍 종 해
연 구 원 : 박 석 기
연 구 원 : 이 성 모
협동연구기관명 : 한국보건산업진흥원
협동연구책임자 : 천 석 조
연 구 원 : 박 경 진
협동연구기관명 : 동국대학교
협동연구책임자 : 최 원 상

요 약 문

I. 제 목

오염발생예측 시스템 및 추적기술을 이용한 축산물작업장에서의 Microbial Hazards Exposure Model (MHEM) 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구는 Microbiological risk assessment 원리를 활용하고, 포장돈육 작업환경조건에서 *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*를 실험대상 위해미생물로 정하여, (1) 작업장 위해미생물 오염의 역학적인 규명, (2) 작업조건에서 미생물 오염을 실시간으로 예측하는 오염발생 예측 시스템 Microbial Hazard Exposure Model(MHEM) 개발, (3) MRA 연구 활성화에 필요한 신속검출 및 정량화 기술개발을 목적으로 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 오염발생 특성 분석과 오염원 추적

포장돈육 가공장은 중부지역에 위치한 중소형가공장(80~100두/일 처리) 2곳과 대형가공장(600~800두/일 처리) 2곳을 선정하여 실험대상으로 하였다. 원료도체 입고에서부터 포장육 공정 완료시까지의 전 과정에 대한 원료도체, 돈육, 시설 및 장비, 환경에서 *Listeria*, *Salmonella* 균을 분리하고 RAPD 방법으로 오염의 특성을 분석하여, 위해미생물 오염원을 규명함으로써 근본적인 오염방지 대책을 마련하는데 필요한 자료를 제공하고자 하였다.

1) 공정조건 분석

포장돈육 가공시간은 15~25분 정도이나 작업상황에 따라서는 2시간 이상 소요되는 경우도 있었다. 예냉실의 도체 온도는 평균 5.4℃였으나 1.0~8.1℃의 온도범위를

보였다. 작업실 온도는 평균 18℃에 15~25℃로 변화폭이 심하였다. 예냉실 온도관리는 HACCP 적용 이후 큰 어려움이 없을 것으로 예상되지만, 가공시간과 작업실 온도관리는 포장돈육 공정에서 변이 발생 소지가 높고 최종제품에서의 미생물 오염에 중요한 영향인자로 작용하므로 이들을 주요 controlling factor(CF)로 선정하였다.

2) 포장돈육 가공장의 오염발생 특성

(1) *Listeria* spp. 분리율과 혈청형

전체 782건의 시료에서 344건(44.0%)의 *Listeria* spp.가 분리되었고, *L. innocua* 210건(26.9%), *L. monocytogenes* 115건(14.7%), *L. welshmeri* 19건(2.4%)으로 분류되었다. 원료도체에서의 *Listeria* spp. 오염율은 22.7%, 가공중육에서는 35.2%, 최종육에서는 51.6%로 공정진행에 따라서 오염이 증가하고 있었다. 작업장내에서 돈육과 직접 접촉하는 장비인 도마, 칼, 장갑, 발골기, 박피기, 컨베이어벨트 등에서는 46.3%, 바닥과 벽 등의 환경에서는 54.7%가 검출되었다. 분리된 115건의 *L. monocytogenes* 혈청형은 serotype 1이 109건(94.8%)으로 대부분을 차지하였다.

(2) *Salmonella* spp. 분리율

전체 782건의 시료중 16건(2.0%)의 *Salmonella* spp.가 분리되었고, 도체 및 가공육에서 5건(2.0%), 작업환경에서 11건(2.1%)이 분리되었다. 포장돈육 가공장에서의 *Salmonella* 오염율이 낮은 이유는 *Salmonella* 오염발생이 주로 분변오염과 관련되는데 비해 포장돈육 가공장 작업환경은 분변오염 발생 가능성이 낮은 작업조건이기 때문이다. 따라서 fingerprinting 기법을 이용한 오염원을 추적하기에는 분리균주 수가 적어서 지표균으로 활용하기에는 적합하지 않은 것으로 판단되었다.

(3) 작업전·중의 *Listeria* spp. 오염발생 양상

작업전에 이미 시설 및 장비에서 많은 오염이 검출되므로 작업전 세척소독 상태는 미흡한 것으로 파악되었다. 살균처리 공정이 없는 포장돈육 공정에서는 작업이 진행됨에 따라 교차오염으로 오염이 확대되어, 최종육에서의 오염수준이 높아지는 주요 원인으로 작용하고 있었다. 따라서 SOP에 준한 철저한 세척소독 실시가 중요하였다. 많은 가공장에서는 종사자가 작업중에 alcohol 분무기를 사용하여 사용중인 시설 및 장비를 소독하고 있지만, 그 효과에 대해서는 신뢰할 만한 근거를 찾기 어려웠다. 그 보다는 작업전의 철저한 세척소독이 더 근본적으로 관리되어야 할 사항

으로 파악되었다. 작업장의 *L. innocua* 분리율은 *L. monocytogenes*보다 더 높았으며, 또한 같은 시료에서 동시에 검출되기도 하였지만, *L. monocytogenes*와 *L. innocua* 각각의 특징적인 오염양상을 나타내지는 않았다.

(4) HACCP 지정전·후의 *Listeria* spp. 오염수준 비교

최종육의 오염수준은 HACCP 지정작업장 16.7%, 비지정작업장 38.9%로 여전히 높아 HACCP 효과를 의심하게 하는 결과를 보였다. 도체의 오염은 근본적인 원인개선이 이루어지지 않아 오염이 반복되고 있었으며, 시설 및 장비와 환경에서의 오염 역시 제대로 관리되지 못하였다. 도체반입이 CCP로 설정되어 있지만, 모든 도축장이 HACCP 지정 작업장이므로 도체 반입시 입고검사는 거의 이루어지지 않았다. 특히 운송 중에 발생하는 오염에 대해서는 감시방법에 언급되지 않고 있다. 가공장 모두 세척·소독에 관한 위생관리 수칙을 갖고 있으나, 이를 제대로 준수하지 않거나 형식적인 작업으로 인하여 세척소독 효과에 대한 엄격한 관리가 요구되었다. 세척·소독관리는 CCP로 설정할 필요는 없지만, 제대로 관리되지 않는다면 CCP로 설정하여 관리를 강화할 필요성이 인정된다. 잘 계획된 HACCP 프로그램도 제대로 운영되지 않으면 HACCP 적용의 의미가 반감된다는 점도 본 실험을 통하여 확인할 수 있었다.

3) RAPD typing 결과를 이용한 가공장내 오염원 추적

Primer DG 122와 DG 107을 사용하여 *L. monocytogenes* 115균주를 분석한 결과 35종의 RAPD composite type이 관찰되었다. 가장 많이 분리되는 composite type은 Lm25로 50개의 분리주가 이 type에 속했으며 공정내 모든 시료에서 검출되었다. 분리주 *L. innocua*는 전체 210건이었고, 55종의 RAPD composition type이 관찰되어 *L. monocytogenes* 경우보다 더 다양한 composite type을 보였다. 가장 두드러진 composite type은 Li65로 77개의 분리주가 속했으며, 장비와 환경에서 가장 많이 검출되어 작업환경 내에 상존하는 균주로 추정되었다.

Composite type의 흐름을 분석해 보면 최종 포장돈육의 오염발생은 두 가지 경로로 정리된다. 첫 번째는 원료도체에 오염된 외부유입 균주는 공정이 진행되면서 오염이 확대되어 최종돈육에 이르는 전공정에서 동일한 composite type이 검출되고

있으며, 두 번째는 작업환경에 상존하는 오염균은 작업과정에서 교차오염 발생으로 최종돈육을 오염시키고 있었다.

가공장내에 상존하는 위해미생물은 규정에 따른 세척소독의 철저한 준수와 시설 및 장비의 위생적인 관리 및 사용으로 그 오염을 대폭 낮출 수 있다고 판단된다. 더 중요한 국내 가공장의 현실적인 문제는 오염된 원료도체의 유입이라고 하겠다. 원료도체로 인한 위해미생물 유입은 살균처리공정이 없는 포장돈육 공정의 안전성 관리에 치명적인 영향을 미치기 때문이다. 이미 국내 도축장은 HACCP을 적용하고 있으므로 대부분의 원료도체 오염은 도축장 반출 이후 가공장에 운송되는 과정에서 발생된다. 운송과정에 작업장과 냉동차량간 현수장치의 높이나 위치 등이 맞지 않아 도체 취급시 오염발생이 많으므로, 운송과정의 위생적인 관리대책이 시급하다고 하겠다. 또한 오염원 추적에는 *L. monocytogenes*만으로는 미흡하였고 *L. innocua*를 지표균으로 병행함으로써 더 좋은 결과를 얻을 수 있었다.

2. Exposure assessment와 오염발생 예측시스템(MHEM)개발

Microbial risk assessment 원리를 기본적으로 활용하되 포장돈육 가공장에서 *Salmonella* spp.와 *L. monocytogenes*를 실험대상으로 하여, 작업현장 조건에 따른 위해미생물 오염을 실시간으로 예측하는 오염발생 예측시스템을 개발하였다.

1) 오염발생 예측을 위한 기초 모델 개발

(1) Frame-work 모델 작성

원료도체 입고에서부터 최종육 저장까지의 연속된 경로를 대상으로 하되 작업장 공정조건 분석에서 나타난 CF를 중심으로 하고 원료도체의 초기오염수준단계(node 1), 포장돈육 공정에서의 성장 및 교차오염단계(node 2), 포장 후 유통되기 직전의 저장과정에서의 성장 단계(node 3)의 총 3개의 node로 구성하였다.

(2) 오염 전이율(TR) 분석 및 모델 개발

포장돈육 공정에서의 오염 전이율 분석은 *Salmonella*와 *Listeria* 균이 돈육 및 식품접촉면(스테인리스스틸, 컨베이어벨트, 도마)으로의 부착을 분석과 접촉 후 잔류 및 생존가능성에 대한 전이율 분석으로 구분하여 실시하였다. 부착율은 공정과정에

서 발생하는 돈육과 돈육, 돈육과 식품접촉면과의 부착상태를, 전이율은 원료도체간, 돈육간, 그리고 돈육, 종사자, 식품접촉면 상호간의 전이상태를 실험하였다. 이 결과를 바탕으로 독립변수로는 시간과 온도를, 종속변수는 전이율로 하는 2차 회귀모델을 산출하였고, 이 모델은 Microbial Hazard Exposure Model 개발에 이용하였다.

(3) 공정내 *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*의 생존 및 잔류 분석

포장돈육 가공공정에서 직접 분리한 *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* 야생균주를 이용하여 성장실험(온도; 0, 5, 10, 15, 20 °C, 시간; 0, 1, 2, 3, 18, 48, 120시간)을 실시하였고, 이 결과를 Gompertz equation에 접목하여 포장돈육 공정조건에서 이들 균의 생존 및 잔류를 추정하는 성장예측모델을 작성하였다. 이 모델 역시 최종적으로 MHEI에 이용하였다.

2) 오염발생 예측시스템(Microbial Hazard Exposure Model)개발 및 평가

(1) Exposure simulation model 및 오염발생 예측용 소프트웨어 핵심기술 개발

돈육 및 포장돈육 공정에서의 위해미생물의 오염수준을 추정하기 위한 예측용 소프트웨어 핵심기술은 3개의 node로 구성되었고, CF를 바탕으로 입력변수와 출력변수를 포함하고 있다. 최초 입력변수로는 원료도체에서 위해미생물의 오염수준과 작업장 온도와 작업시간을 사용하였고, 최종 출력변수로는 포장 후 냉장저장 중 이들 위해미생물의 생존율로 함으로써 출고되는 최종제품에의 오염수준을 추정할 수 있도록 구성하였다. 이 모델은 전이율모델, 성장예측모델 그리고 입력변수에 대한 확률분포모델들을 포함하고 있으며, 각각의 단계에서 이용된 수식과 입력변수는 Excel spreadsheet 프로그램으로 작성하여 simulation을 수행할 수 있도록 하였다.

(2) 포장돈육 가공장에 대한 Microbial Hazard Exposure Model 적용

개발된 Microbial Hazard Exposure Model을 이용하여 포장돈육 공정에 대한 simulation을 수행하였다. 최종 저장돈육에서의 *Salmonella* spp. 오염수준 변화는 공정을 거치면서 큰 변화가 없는 것으로 나타났다. *L. monocytogenes*는 초기오염수준, 포장 후 오염수준, 최종 저장 후 오염수준 간에 많은 변화가 있었으며, 오염된 미생물은 저장기간 중에 약 30% 정도 성장하는 것으로 나타났다. 이는 포장돈육 공정에서 *L. monocytogenes*가 *Salmonella* spp.보다 더 많이 오염될 수 있거나 성장할 수 있음을 의미하고 있다. Simulation 결과를 바탕으로 한 민감도 분석에서 *Salmonella*

spp.는 민감도 수준이 낮았고 입력변수 간에 큰 차이가 없어 영향력이 낮았다. 반면 *L. monocytogenes*는 원료도체의 초기오염수준, 냉장저장시간, 가공시간이 상대적으로 높은 상관관계를 보여 이들 인자가 포장돈육 공정에서 위해미생물 관리의 critical control point에 해당되는 것으로 파악되었다. *Salmonella* spp.는 HACCP 적용 및 비적용작업장간의 공정별 그리고 최종돈육에서 뚜렷한 오염수준의 차이는 나타나지 않았다. 그러나 *L. monocytogenes*는 원료도체로부터 포장돈육에 이르기까지 전반적으로 HACCP 적용작업장에서 현저히 낮게 오염된 것으로 나타났다. 이는 작업장간의 위생관리 상태와 이로 인한 오염수준의 차이에 기인하는 것으로 판단된다.

(3) Microbial Hazard Exposure Model 평가

본 모델은 입력변수의 제한성이라는 현실적인 한계에도 불구하고, 영향력이 큰 변수인 초기오염수준, 작업장 온도, 작업시간을 이용하여 최종 포장돈육에서 *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*의 오염수준을 실시간 예측을 가능하게 한다. 따라서 포장돈육 가공장의 안전성 관리에 활용 가능하며, 또한 본 모델은 포장돈육 공정에 대한 위해요소 평가와 관리에도 이용 가능할 것이다.

3. 위해미생물의 분류, 신속검출 및 정량화 기술개발

Listeria spp.와 *Salmonella* spp.를 대상으로 현장에서 활용 가능한 typing 및 검출, 정량방법을 개발하기 위해서 fingerprinting 기법을 보완하고 신속검출 및 신속정량방법을 개발하였다. ERIC fingerprinting, Ribotyping-PCR, RAPD, SSCP, PFGE 등의 방법을 비교함으로써 fingerprinting 방법을 보완하였다. *Listeria*의 경우 RAPD를 단독으로 행할 경우는 ERIC fingerprinting이나 Ribotyping-PCR보다 분리력이 뛰어나 typing에 적합한 것으로 판단되었으나, 비교에 사용한 *Listeria* 표준균주 13종을 모두 구별하지는 못하였다. 그러나 DG122 (Lis 11)를 이용한 RAPD 결과와 Ribotyping-PCR 결과를 병행하여 사용하거나, DG107과 DG122를 이용하여 각각 RAPD를 한 결과를 composite하면 13가지 *Listeria*를 모두 구별할 수 있었다. *Salmonella* 경우도 RAPD, ERIC, ribotyping-PCR, SSCP 등을 단독으로 행할 경우는 57가지 표준균주를 모두 구별하지는 못하였다. 그러나 primer 1 또는 primer A를 사용하여 RAPD를 행한 결과와 ERIC을 composite하면 표준균주 57가지를 모두 구별할 수 있었다. 검출방법 개발에서 *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp.를 특이하

게 검출하는 유전자로는 *hlyA*, *invA*를 각각 이용하였다. 오염된 *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp.를 신속히 정량하는 방법으로는 competitive PCR을 이용하였다. Copy 수를 알고 있는 standard DNA와 돈육으로부터 분리한 *L. monocytogenes* DNA 또는 *Salmonella* DNA를 함께 증폭시켜 전기영동을 행함으로써 오염된 *L. monocytogenes* 또는 *Salmonella*의 colony forming unit를 약 5시간 이내로 추산할 수 있었다. *L. monocytogenes* 경우 *hlyA* gene을 cloning하여 148 bp를 delete하여 standard로 사용하였다. *L. monocytogenes*에 오염된 돈육 추출물 0.1g으로부터 검출할 수 있는 한계는 약 860 colony forming unit이었다. *Salmonella* 경우는 *invA* gene을 cloning하여 82 bp를 delete하여 standard로 사용하였고, 오염된 돈육 추출물 0.1 g으로부터 검출할 수 있는 한계는 약 700 colony forming unit이었다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 오염원 추적기술 활용

Fingerprinting에 의한 genotype 확인은 동종의 오염미생물을 세분화해주므로 작업장내 오염원 추적에 매우 유용하다. 생산제품의 특성과 작업조건에 적합한 주요 오염미생물을 선정하고 분자생물학적인 분석을 한다면, 작업장 오염의 근본원인을 진단하고 이를 예방하는 조치가 가능하여 식품안전관리에 크게 기여할 것이다. 업계에서는 HACCP 컨설팅, 현장 위해분석 및 진단에 즉시 활용 가능할 것으로 보인다.

2. 오염발생예측 시스템 활용

○ 작업조건에 따른 controlling factor 선정과 자료입력으로 최종제품에서의 위해 미생물 오염수준 예측이 가능하며, 입력 자료의 정확성 제고에 따라 개발된 모델에서 산출되는 결과 값의 신뢰성도 높아진다.

○ 축산식품 생산현장의 작업조건별 변수를 선정하고, 입력자료를 산출하여 본 연구에서 개발된 오염발생예측 시스템에 적용하면, 최종생산품에서의 오염수준 및 위해발생 가능성을 예측할 수 있다.

○ Sensitivity 분석과 scenario 분석을 수행하면, 공정상의 영향력 있는 부분 혹

은 critical control point 선정과 위생관리기준 설정에 과학적인 자료를 제공하므로, HACCP system의 유용성 평가에 활용 가능하다.

3. 기업화 추진방안

○ Fingerprinting을 이용한 오염원 추적기술은 안전관리 팀을 운영하는 기업체가 자사 작업장의 위생상태, 오염의 흐름 진단 및 평가에 활용하도록 권장한다.

○ MHEM 모델의 핵심기술을 프로그래밍 언어(C 언어 등)를 이용 산업용 소프트웨어로 개발한다.³

Summary

1. Patterns of contamination and tracing the sources.

This study was performed to characterize the patterns of contamination and to trace the fundamental sources of contamination of *Listeria* spp. and *Salmonella* spp. in pork processing plants using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). Samples were collected from carcass, pork on processing, surfaces of equipment and environment from two small plants (80~100 carcasses processing/day) and two large plants (600~800 carcasses).

1) Survey on the procedure condition in pork processing plant

The results of survey showed that processing time was a minimum of 15 minutes and usually 25 minutes, but it took two hours in some case. The temperature of inner pork carcass appeared 5.4°C as a mean value, including a minimum of 1.0°C and maximum of 8.1°C. The processing room temperature was 18°C as a mean value, including minimum 15°C and maximum 25°C. Processing time, processing room temperature which showed high variability were selected as controlling factors.

2) Isolation rate of *Listeria* spp. and *Salmonella* spp.

A total of 782 samples were collected from carcass, pork during procedure, surfaces of hands, equipment and environment. Of the 244 *Listeria* spp. isolates, *L. innocua*, *L. monocytogenes*, and *L. welshimeri* was 26.91%, 14.7%, 2.4% respectively. *Listeria* spp. were found in the carcass 22.7%, pork on processing 35.3%, final pork 51.5%, equipments 46.3%, and environments 54.7%. Serotype 1 was a dominant type (94.8%) of the *L. monocytogenes* isolates. Isolation rate of *Salmonella* spp. was 2.0% which was too low to characterize patterns of contamination and to conduct DNA fingerprinting to trace the

contamination source.

The contamination of equipments and environments before operation due to ineffective washing and disinfection activity, easily disseminated microorganisms through out the processing line during procedure and affected the safety of final pork.

When we compared HACCP plants and non-HACCP plants, the contamination rate of *Listeria* spp. in final pork was 16.7% in HACCP plant and 38.9% in non-HACCP plant. This high prevalence required more stringent HACCP audit and HACCP system to be used widely.

3) Tracing the source of *Listeria* spp. using RAPD

Contamination of microorganisms such as *Listeria* and *Salmonella* is a threat in pork processing plants, because no killing steps during the procedure. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis performed to investigate the origin and routes of *Listeria* contamination, showed 35 composite types of *L. monocytogenes* and 55 composite types of *L. innocua*. It was found that the first source of *Listeria* contamination was incoming pork carcass contaminated during transportation from slaughterhouse to processing plant. It required more strict inspection for incoming carcasses. The second source of contamination was the remaining *Listeria* strains throughout the processing environments. The remaining strains of *L. monocytogenes* and *L. innocua* throughout the processing line revealed that the sanitation standard operating procedure should be implemented to minimize the risk of colonization in the workplace. When we used *L. innocua* together with *L. monocytogenes* during RAPD genotyping, we could get useful information to figure out the patterns of contamination.

2. Exposure assessment and development of Microbial Hazard Exposure Model

This study was performed to develop a model system which can be utilized to predict and estimate a real-time prediction of the contamination level of *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* in pork processing plants by the application of Microbiological Risk Assessment.

1) Development of primary models

(1) Construction of framework model

On the base of CF, framework was designed as a series of unit operations that included the initial contamination level of cold storage pork after slaughtering (node 1), the growth and cross-contamination during processing (node 2) and the growth and the contamination level of cold storage pork after packing.

(2) Transfer rate and response surface regression model

Adherence rate to pork and to contact surfaces (stainless steel and Conveyor belt) and probability rate of survival and growth were examined for measuring the transfer rate for *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* in pork processing plant. Adherence rates were tested from pork to pork and from pork to contact surfaces. Probability rate of survival and growth were examined for carcasses, pork on procedure, and the composite of pork, employee, pork contact surface. Based on this results, we could determine time and temperature as an independent variables and design a surface regression model using a transfer rate as a dependent variable.

(3) Estimation of survival and growth

Model was developed to predict the survival and growth of *Salmonella* spp., and *L. monocytogenes* in pork. Experimental conditions for model development was full 5-by-7 factorial arrangements of temperature (0, 5, 10, 15, and 20°C) and time (0, 1, 2, 3, 18, 48, and 120 hr). Gompertz value and Growth kinetic were calculated based on growth data. From them, Response surface analysis equation for predictive growth was produced.

2) Development of Microbial Hazard Exposure Model

(1) Exposure simulation model and development of software hard core

Software hard cores for the estimation of hazardous microbial contamination level in pork processing plant constitute three nodes in accordance with framework model. The initial input variables included the microbial contamination level during cold storage of pork carcass, the temperature of the processing room, and processing time. The output was the prediction of contamination level during cold storage after packing. This hard cores included transfer rate model, growth predictive model, and probability distribution functions. Input variables were constructed to Excel spreadsheet as an exposure simulation model

(2) Application of Microbial Hazard Exposure Model in pork processing plant

The MHEM simulated with @RISK and compared the contamination level of *Salmonella* spp. with *L. monocytogenes* for initial contamination of carcass, processing procedure, and storage steps in pork processing plant. Contamination level for *L. monocytogenes* during procedure was fluctuated but not for the *Salmonella*. This results showed that *L. monocytogenes* could grow better than *Salmonella* spp. Sensitivity analysis showed that *Salmonella* spp. had low correlation coefficients and did not show much difference of the parameters. But *L. monocytogenes* had high correlation coefficients at the initial contamination level, cold storage time, and processing time. Therefore, these factors were considered as Critical Control Point. We compared the contamination level of *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* between HACCP and non-HACCP plant. The level of *Salmonella* contamination was not much different between them, but *L. monocytogenes* was contaminated less in HACCP plant.

(3) Evaluation of Microbial Hazard Exposure Model

MHEM was good enough for real-time estimation of contamination level of *Salmonella* spp., and *L. monocytogenes* in pork processing plants using only

initial contamination level, processing room temperature, and processing time. Also, this tool could be applied for the risk evaluation of the hazard factors identified during procedure and their control.

3. Development of molecular typing, detection and enumeration method

We compared molecular typing methods for the differentiation of *Listeria* spp and *Salmonella* spp. The results typed by RAPD were compared with those obtained by ERIC, ribotyping and SSCP. As for *Listeria* spp., the discriminatory power of RAPD typing was the best of the methods examined. RAPD typing with two different primers for 13 *Listeria* spp. reference strains did not differentiate all 13 reference strains. Composite of two separate RAPD (lis 11 and primer 6) results or RAPD (lis 11)/ribotyping-PCR differentiated all 13 *Listeria* spp. reference strains. As for *Salmonella* spp., the RAPD had the greatest discriminatory power of the methods examined, and was the single most discriminatory. RAPD typing did not differentiate all 57 reference strains. Combination of two different typing methods generally increased the discrimination of salmonella strains. Discrimination using a combination of RAPD (primer 1 or primer A) and ERIC was the most discriminatory and could differentiate all 57 *Salmonella* strains. For the specific detection of *Listeria monocytogenes*, we chose *hlyA* gene of *L. monocytogenes* encoding 58 kDa listeriolysin O which has been tested for the specific detection of *L. monocytogenes* in various foods. For the specific detection of *Salmonella* spp., *invA* was chosen. Competitive PCR was used to develop a direct enumeration of *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. in pork. Known amount of competitor DNA was coamplified with *L. monocytogenes* or *Salmonella* spp. total DNA isolated from artificially inoculated pork. Since the relative amounts of cPCR products generated from amplification reflect the relative initial levels of the two different kinds of DNA, the colony forming unit (cfu) of microorganism could be easily estimated by comparing the intensity of the two bands after electrophoresis. The

hlyA gene was cloned and was 148-bp deleted to produce *L. monocytogenes* competitor DNA. As for the *L. monocytogenes*, the detection limit achieved was 860 cfu per 0.1 g of pork. The *invA* gene was cloned and was 82-bp deleted to produce *Salmonella* spp. competitor DNA. As for the *Salmonella* spp., the detection limit was 700 cfu per 0.1 g of pork.

Contents

Chapter 1. Introduction	21
Chapter 2. Global situation of MRA research	27
Chapter 3. Patterns of contamination and tracing the sources	33
1. Survey on the procedure condition in pork processing plant	34
2. Materials and methods	39
3. Characterization of <i>Listeria</i> and <i>Salmonella</i> contamination	45
4. Tracing the source of <i>Listeria</i> spp. using RAPD	66
Chapter 4. Exposure assessment and predictive microbial model	85
1. Construction of framework model	86
2. Transfer rate and response surface regression model	89
3. Estimation of survival and growth	125
Chapter 5. Development of Microbial Hazard Exposure Model	140
1. Exposure simulation model and development of software hard core	140
2. Application of Microbial Hazard Exposure Model	146
3. Evaluation of Microbial Hazard Exposure Model	164
Chapter 6. Development of molecular typing, detection and enumeration method	170
1. Complementary measures for RAPD typing for differentiation of hazard microorganism	171
2. Development of rapid detection and enumeration method	191
Chapter 7. Accomplishment and contribution of research results	210

Chapter 8. Application plan for research results	214
Chapter 9. Foreign information collected during this research	216
Chapter 10. References	217

목 차

■ 요약문 / 2
■ Summary / 10
■ Contents / 16

제1장 서론 / 21

제1절 연구개발의 필요성	21
제2절 연구개발의 목표	22
제3절 연구개발의 내용	24

제2장 국내외 기술개발 현황 / 27

제1절 해외의 관련연구	27
1. MRA/Exposure assessment	27
2. MRA/QRA 최근 연구동향	28
3. Molecular typing과 정량화 분석 기술	29
제2절 국내의 관련연구	30
제3절 현 기술상태의 취약성	30
제4절 본 연구결과의 의미	31

제3장 작업장의 오염발생 특성 및 오염원 분석 / 33

제1절 공정조건 분석	34
1. 포장돈육 작업공정 분석	34
2. 작업환경 분석	37
제2절 실험재료 및 방법	39
1. 실험대상 작업장 선정	39

2. 시료채취 및 방법	40
3. <i>Listeria</i> 분리 및 동정	40
4. <i>Salmonella</i> 분리 및 동정	41
5. DNA 분리 정제	41
6. RAPD-polymerase chain reaction(PCR) 조건	44
제3절 포장돈육 가공장의 오염발생 특성	45
1. 포장돈육 가공장에서 <i>Listeria</i> spp.의 분리율	45
2. 혈청형별 <i>Listeria monocytogenes</i> 의 분포	47
3. 포장돈육 가공장에서 <i>Salmonella</i> spp.의 분리율	50
4. 작업전·중의 <i>Listeria</i> spp. 오염발생 양상	54
5. HACCP 지정전·후의 <i>Listeria</i> spp. 오염수준 비교	60
제4절 포장돈육 가공장의 오염원 추적	66
1. <i>L. monocytogenes</i> 의 RAPD typing	66
2. <i>Listeria innocua</i> 의 RAPD typing	73
3. RAPD typing 결과를 이용한 가공장내 오염원 추적	79
제4장 Exposure assessment와 오염발생 예측모델 개발 / 85	
제1절 Frame-work 모델 작성	86
1. 입력변수 선정	86
2. Frame-work 모델 구성	86
3. Frame-work 모델 활용	87
제2절 Controlling factor에서의 오염 전이율(TR) 분석	89
1. 서론	89
2. 실험적 접근방법	89
제3절 공정내 위해미생물 생존 및 잔류 분석	125
1. 서론	125
2. 실험적 접근 방법	125
3. 결과	129

제5장 오염발생예측시스템(Microbial Hazards Exposure Model) 개발 및 평가 / 140

제1절 오염발생 예측용 소프트웨어 핵심기술 개발	140
1. 모델 핵심기술 구성 개요	140
2. 확률분포 모델 선정	140
3. 핵심기술 구성	141
제2절 포장돈육가공장에 대한 Microbial Hazard Exposure Model 적용....	146
1. 적용 방법론	146
2. 모델을 이용한 <i>Salmonella</i> , <i>L. monocytogenes</i> 오염수준 평가	147
3. HACCP 지정작업장과 비지정 작업장의 <i>Salmonella</i> , <i>L. monocytogenes</i> 오염수준 비교	161
제3절 Microbial Hazard Exposure Model 평가	164
1. 모델 검증	164
2. 모델 평가	166
3. 모델 활용	168

제6장 위해미생물의 분류, 신속검출 및 정량화 기술 개발 / 170

제1절 위해미생물의 molecular typing을 위한 fingerprinting 기술보완	171
1. 재료 및 방법	171
2. <i>Listeria</i> 특성분석을 위한 molecular typing 방법의 상호보완	175
3. <i>Salmonella</i> 특성분석을 위한 molecular typing 방법의 상호보완 ...	181
제2절 위해미생물의 신속검출 및 정량화 기술개발	191
1. 재료 및 방법	191
2. 돈육에서의 <i>L. monocytogenes</i> 검출	196
3. 돈육에서의 오염된 <i>Salmonella</i> 검출	200
4. Competitive PCR을 이용한 돈육에서 <i>L. monocytogenes</i> 정량	206
5. Competitive PCR을 이용한 돈육에서 <i>Salmonella</i> 정량	208

제7장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 / 210

제8장 연구개발결과의 활용계획 / 214

제9장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 / 216

제10장 참고문헌 / 217

제1장 서론

제1절 연구개발의 필요성

우리나라의 식중독 발생은 2001년 6,406명에서 2004년 10,388명 발생으로 지속적으로 증가하고 있다. 축산물 및 가공품으로 인한 식중독 발생은 1995년 20건 660명의 환자발생에서 1998년 30건 858명으로 증가하였으나, 이후 2000년대의 식약청 자료에는 원인식품별 분석 자료가 미흡하여 축산식품이 원인식품에서 차지하는 비중을 정확히 알 수는 없다. 그러나 국민소득 증가에 비례하여 축산물 소비가 지속적으로 증가하고 있으므로, 소비와 비례하여 식중독 발생의 위험에 노출될 가능성 역시 높다고 하겠다. 따라서 축산물의 안전성 확보는 국민건강 보호차원에서 사회적으로 매우 중요한 과제인 것이다(식품의약품안전청, 1998; 2005).

축산물은 특성상 부패와 변패가 쉽고 오염된 위해미생물의 생존에 좋은 조건을 갖추고 있어 국제 교역에서 신속한 통관과 유통이 요구된다. WTO 체제하에서 시장이 개방되면서 국제교역상의 안전성 확보를 위하여 국제식품규격위원회(Codex, CAC)는 SPS 협정문에 언급된 바와 같이 식품의 안전성관리를 위한 HACCP system 적용을 요구해 왔다. 이와 함께 소비자측면에서의 종합적인 안전성 여부를 평가하기 위한 '식품의 안전성 평가에 관한 객관적인 자료'를 요구하게 되었고, 오염물질 중 특히 오염미생물은 매우 dynamic하여 Microbial Risk Assessment(MRA)에 의한 체계적인 안전성 평가의 필요성이 제기되었다(Codex, 1993).

HACCP system은 가장 합리적인 안전성 관리방법으로 인정되어 전세계적으로 확대적용되고 있다. 그러나 현장 적용시 기술적 보완이 요구되는 부분이 노출되고 있다. (1) 선행요건프로그램 계획시 작업환경에 근본적으로 잠재된 위해미생물의 규명이 철저하지 못하여 환경유래 미생물에 대한 오염예방 조치가 미흡하며(Pritchard, 199; Rovik, 1997), (2) 작업장에 발생 가능한 위해요인 분석시 주로 문헌고찰, 현장경험, 단순한 실험결과를 이용하므로 Critical Control Point(CCP) 결정과정이 주관적이고 과학적인 논리가 결여되는 부분이 대표적으로 지적된다(한국보건산업진흥원, 2001). 치명적인 위해 가능성이 있음에도 불구하고 발생빈도가 낮으면 종합적인 위

해도 평가순위가 낮아져 CCP 적용대상에서 제외되므로, 여전히 HACCP system에 의한 안전성 관리의 허점으로 존재하게 되는 것이다.

그 보완책으로는 (1) 선행요건 프로그램 계획시 작업장 환경조건을 분자역학적인 방법으로 오염원을 규명하고 차단하여 근본적인 예방조치 방법을 설정하는 것 (Dauphin, 2001; Senczk, 2000) (2) MRA의 exposure assessment 개념으로 작업장의 위해미생물 오염을 정량적으로 분석하고 그 결과를 이용하여 위해발생 예측 시스템을 공정에 적용함으로써 HACCP system의 안전관리 기능을 더욱 강화시키는 것이 제안되고 있다(Buchanan, 1997; Jaykus, 1996).

본 연구의 실험대상 작업장은 포장돈육 가공장으로 생산되는 제품은 대부분 소비자에 그대로 공급되는 부분육 형태이므로, 생산 돈육의 위생상태는 소비자에서 직접적인 영향을 미치는 매우 중요한 장소이다. 근래 들어 냉장육 소비가 증가하면서 냉장육류의 안전성 관리가 강화되어야 한다는 점에서 더욱 그러하다(농림부·수의과학검역원, 2001).

현재 포장돈육 가공장에 대한 HACCP system은 자율 적용되고 있으며, 대부분의 축산물종합처리장내의 가공장은 HACCP system을 적용하고 있다. 반면, 다수의 중소규모 포장돈육 가공장 역시 불이익을 받지 않기 위해서 HACCP 업소로 지정 받았으나, 처음 계획된 HACCP system 프로그램의 준수상태는 미흡한 수준이다.

따라서 본 연구는 포장돈육 가공장의 위해미생물 오염특성을 분석하고, Microbial Hazard Exposure Model(MHEM)을 개발하여 오염원 추적, 오염발생 예측 및 정량적 위험평가를 수행함으로써, 축산물 작업장에서 실질적인 안전성 확보 효과를 얻을 수 있는 방법을 제시하고자 한다.

제2절 연구개발의 목표

본 연구는 Microbiological risk assessment 원리를 활용하고, 축산물작업장(포장돈육) 작업환경조건에서 *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*를 실험대상 위해미생물로 정하여,

- (1) 작업현장 조건에 따라서 미생물 오염을 실시간으로 예측하는 미생물학적 위

해요인 발생 예측시스템을 개발하고, (2) 단위작업장에 대한 exposure assessment 및 오염원의 역학적인 규명으로 궁극적으로 Microbial Hazard Exposure Model(MHEM)을 개발하며, (3) 아울러 MRA 연구 활성화에 필요한 식중독 세균을 보다 쉽게 신속히 정량화 분석하는 기술 개발을 목적으로 한다.

단계별 세부목표는 다음과 같다.

<1 단계> 작업장의 exposure assessment와 오염발생요인 분석

- 공정조건 분석 및 Frame-work 모델 작성
- Controlling factor에서의 *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* 오염 전이율 (TR) 분석
- 작업환경, 원료육, 공정단계, 완제품에서 *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* 오염도 분포 및 분포특성 분석
- *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* 오염의 역학적 특성분석을 위한 fingerprinting 기술보완

<2 단계> 오염발생 예측모델 개발 및 오염원 특성분석

- *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*의 오염전이율(TR) 예측 model 초안 작성
- 공정내 *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*의 생존 및 잔류 분석
- 검출된 *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* 특성분석과 오염원 추적
- 작업장 위해미생물 exposure simulation model 초안 작성
- *L. monocytogenes* 신속검출 및 정량화 기술개발

<3 단계> 오염발생 예측 시스템 및 Microbial Hazard Exposure Model 개발

- *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* 오염발생예측용 소프트웨어핵심기술 개발
- 축산물작업장의 Microbial Hazard Exposure Model 개발
- *Salmonella* spp. 신속검출 및 정량화 기술개발

제3절 연구개발의 내용

1. 공정조건 분석 및 Frame-work 모델 개발 (주관, 제1세부)
 - 가. 위해요인 자료수집, 오염수준 평가
 - 나. Controlling factor(CF) 분석 및 선정
 - 다. 선정된 CF에 따른 작업장의 Frame-work 모델작성

2. CF에서 *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* 오염전이율(TR) 분석 (제1세부)
 - 가. CF 조건에서 *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*의 전이율 실험
 - 나. 시간, 온도 등 각 조건별 요인실험
 - 다. TR에 관여하는 CF 요인 등을 이용하여 TR model 작성

3. 공정내 *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*의 생존 및 잔류 분석 (제1세부)
 - 가. 작업환경조건에서 *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* 생존 및 증식 실험

4. 원료도체, 공정중육, 최종육, 작업환경에서의 *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* 오염도 분포 및 분포특성 분석 (주관)
 - 가. Frame-work model 및 작업동선을 고려한 monitoring 지점 결정
 - 나. 가공공정상에서 오염된 *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* 오염분포 분석
 - 다. 분리균의 동정 및 동결보존

5. 검출된 *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* 특성분석과 오염원 추적 (주관)
 - 가. 검출된 *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*에 대한 RAPD 분석
 - 나. 공정순서에 따른 오염의 흐름과 Composite genotype의 관련성 분석
 - 다. 시료채취 부위 및 결과에 대한 동질성 및 재현성 확인

6. 작업장 위해미생물 exposure simulation model 초안 작성 (제1세부)
 - 가. 공정단계에서의 *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* exposure simulation model 작성

나. Exposure assessment를 이용한 CCP/CL 분석

- Sensitivity analysis
- Scenario analysis 및 CL 결정

7. *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* 오염발생 예측용 소프트웨어 핵심기술 개발 (제1세부)

가. 관리조건별 발생예측용 모델 개발

나. 오염 전이율(TR) 분석결과를 바탕으로 오염전이 예측모델 개발

다. CF에 따른 Response Surface Model (RSM) 개발

라. TR, RSM 및 모니터링 결과에 따른 작업공정별 발생예측 model 확정

- *Salmonella* exposure model, *L. monocytogenes* exposure model 작성

마. 개발된 exposure simulation model의 MS Excel-added 프로그램화

8. 작업장 Microbial Hazard Exposure Model 개발 (주관)

가. Model 검증을 위한 monitoring 실험

- 작업전·중, HACCP 지정/미지정 작업장의 오염수준 비교분석
- Genotype의 분포특성과 오염원 추적

나. 포장육 HACCP system의 CCP 보완, 운영상의 문제점 제시

다. 작업장 Microbial Hazard Exposure Model 작성

9. *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*의 fingerprinting 기술 보완 (제2세부)

가. Fingerprinting을 위한 template DNA제조조건 개선

나. Primer design 및 반응조건 확립

다. Molecular typing method들의 조건확립 실험

- RAPD, ribotyping, repetitive PCR, SSCP

라. PCR 반응에 대한 inhibitor 유무 test

10. *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* 신속검출 및 정량화 기술개발 (제2세부)

가. Competitive-PCR시 standard로 사용하기 위한 Target sequence의 cloning

나. Cloned target DNA의 modification ; 특정 제한효소의 제거 등

다. 정량적 PCR을 위한 Primer design ; BLAST이용

라. Template DNA 제조기술 개발

마. Competitive-PCR 기술 개발

- 작업환경, 원료육, 공정단계, 최종제품에서의 PCR inhibitor 유무조사, 정량분석

제2장 국내외 기술개발 현황

제1절 해외의 관련연구

1. MRA/Exposure assessment

1983년부터 미국의 National Academy of Science/National Research Council는 수인성병원균에 대한 Microbial Risk Assessment(MRA)를 수행하였지만, 자료의 부족 등의 이유로 정확한 risk를 추정하지 못하고 4단계 연구접근 방법에 대한 기초지식을 제공하는데 그쳤다.

1995년 National Advisory Committee on Microbiological Criteria for foods (NACMCF)는 육류 및 가금류에서의 병원성미생물 오염예방을 위한 MRA 기술개발의 중요성을 제기하였고, MRA 개념에 대한 통일을 이루자고 하였다. 이에 Codex에서는 1995년 병원성 미생물 등 식품의 규격·기준 설정에 대한 Risk Analysis의 도입을 권고하였고(FAO/WHO, 1995), 이 원칙과 지침은 2000년 Codex 총회에서 최종적으로 승인되었다.

이후 축산선진국에서는 HACCP 도입과는 별도로 과학적인 위해평가에 근거한 안전성 관리를 강화하기 위해서 작업장내 위해관리 기준설정을 위한 Predictive microbiology 기술개발과 특정식품의 종합적 위해성을 평가하기 위한 MRA 연구를 진행하고 있다(David, 1998; McNab, 1997; Notermans, 1997; Peggy, 1997; Richard, 1997).

이러한 기술개발에는 다음과 같은 자료가 요구되는데, (1) 원재료내의 식품매개병원체의 수준과 빈도, (2) 여러 환경내에서 병원체의 성장과 존재 특성, (3) 환경내 오염특성과 식문화로 인한 인체의 위해성 분석이며, 주로 축산물 수출국을 중심으로 이 분야의 관련 연구가 진행중이다.

그러나 세계각국 공통적으로 MRA를 위한 기초자료가 매우 부족하여 특정 식품에서 특정 위해미생물을 대상으로 하는 연구조차 아직은 미진한 상태에 있다.

2. MRA/QRA 최근 연구동향

현재 정량적 위험평가는 국제적으로 그 개념 및 구조가 정형화되어가고 있는 추세이다. 대부분의 외국에서는 국가적인 차원에서 연구가 진행 중에 있고, 자국의 실정에 맞게 원칙과 구조를 정형화시키고 있으며(Nortermans, 1996), MRA를 제도권하에 두어 식품관련 미생물학적 위해요인을 좀더 과학적이고 체계적으로 관리하기 위한 연구를 진행하고 있다.

Codex - 식품의 국제교역 증가는 식품매개 병원성균의 광범위한 전달로 인한 위해를 증가시키고 있어 위해평가를 위한 Risk assessment 이용이 국제사회에서 요구되고 있다. 특히 SPS협정에 따라 WTO 회원국에 대해서 식품중 위해요인에 대한 기준 설정시 과학적인 Risk assessment의 수행을 요구하고 있다.

Codex는 식품에서의 미생물학적 위해요인에 대한 QRA방법론 개발을 위하여 2000년 6월 식품위생분과 32차 Codex Committee에서 'Joint FAO/WHO expert consultation on Microbiological Risk Assessment(JEMRA)'를 구성하였다.

연구의 활성화와 표준안 작성을 위하여 Codex 전문가그룹에서는 계란의 *Salmonella enteritidis*, 가금류의 *Salmonella* spp., Ready-to-eat food의 *L. monocytogenes* 등에 대한 MRA model을 개발하였고, MRA 모델개발 대상 식품과 병원체를 제시하고 있다(박, 2001).

미국 - 1997년에 공고된 대통령의 Food Safety Initiative는 식품안전 목표를 달성하는데 있어 MRA의 중요성을 인식하게 하였다. 또한 식품안전 관리책임이 있는 모든 연방기관들에게 Inter-agency Risk Assessment Consortium을 설립하게 하였다.

이 컨소시엄은 Predictive Microbial Model과 기타 다른 MRA도구들을 개발하기 위해 연구를 장려함으로써 MRA 분야를 발전시키는데 크게 공헌하였다. 미국 정부는 처음으로 farm-to-table에 정량적인 MRA방법을 포함하는 계란 및 난제품에서의 *Salmonella enteritidis*의 risk assessment를 완료하였다. 또한 ground beef에서의 *E. coli* O157:H7, 즉석식품(RTE)에서의 *L. monocytogenes*, 최근에는 굴에서의 *Vibrio parahaemolyticus*에 대한 정량적 MRA를 수행하였다(OECD, 2000).

기타 국가 - EU는 Scientific Steering Committees라는 기구를 중심으로 MRA를 발전시키고 있으며, 캐나다는 식품검사청(CFIA)내의 독립위원회로 Decision-Making Framework (DMF), Risk Analysis Framework(RAF)를 설치 MRA를 연구 운영하고 있다. 기타 호주, 일본은 Codex 및 외국의 MRA 방법 및 결과를 그대로 혹은 보완하여 활용하고 있다(OECD, 2000).

3. Molecular typing과 정량화 분석 기술

Molecular typing 기술을 이용하여 식중독 발생지역의 역학조사를 수행한 경우는 많다(Laconcha, 1998, Soto, 2001). 최근에는 병원성미생물을 대상으로 가공공장에서의 MRA를 분석하기 위한 목적으로 이용된 예들도 보고가 되고 있다(Destro, 1996). Fingerprinting의 경우 RAPD fingerprinting을 이용하여 다른 장내세균으로부터 구별하고자 하는 시도 등이 있으나 아직은 초기 연구단계에 머물러 있다(Jin, 2000).

정량분석의 경우는 실험실 차원에서 real-time PCR 등을 이용하여 행한 예들이 있으나(Nogva 등 2000), 아직 이를 이용하여 MRA에 활용했다는 보고는 없으며 고가장비가 요구되는 방법이므로 field에서 직접 이용하기에는 문제가 있을 것으로 예상된다.

제2절 국내의 관련연구

환경중의 화학물질 및 독성학 분야의 risk assessment는 많은 연구가 진행되어 왔으나, 미생물을 위해요인으로 하는 MRA의 국내 연구는 관심있는 일부 연구자를 중심으로 진행중이지만 매우 미미한 실정이다. 기본개념의 정립 및 기본원칙 그리고 용어사용도 아직 통일되지 않은 상태이다.

정부는 국제적으로 식품안전과 MRA의 관련성을 인식하고 있으며, 식약청의 경우 위해분석 전담팀을 구성하여 운영하는 등 본격적인 업무를 시작하고 있다. 농림부는 가축질병과 관련하여 해외에서 수입되는 축산물 관리에 적용하기 위한 risk factor 분석용 프로그램을 연구 중에 있다.

이와 같이 아직은 MRA 방법을 활용한 HACCP 적용연구, predictive microbiology 방법을 이용한 오염예측방법 개발 등의 연구는 시작조차 되지 못하고 있다. MRA 연구에 큰 도움이 되는 위해미생물에 대한 정량적분석방법 개발은 여러 시도가 있었지만 현장 활용에 여전히 어려움이 많으며, competitive-PCR을 활용하려는 시도는 본 연구팀의 pilot-test로 가능성이 확인되는 정도이다(Choi, 2000; 2001; 2003).

오염원 추적을 위한 fingerprinting 기법의 활용은 역학적 연구에 적합성이 인정되어 관련분야에서 활용되고 있으며, 축산물작업장에서의 CCP 유효성 확인에도 적용되고 있다. 아직은 재현성 문제가 있지만 반복된 실험으로 이러한 문제도 어느 정도 극복 가능한 것으로 본 실험에서 확인되었다(임, 2003).

제3절 현 기술상태의 취약성

그 동안 국내외에서 보고된 MRA에 관한 연구결과는 대부분 위해 예측치를 산출하기 보다는 산출하는 방법론적인 접근에 제한되고 있다. 그 이유로는 위생분야의 기초조사 자료가 매우 부족하여 위해와 관련된 많은 입력변수들이 확인되지 않아 변이성(variability)과 불확실성(uncertainty)을 보완하지 못하기 때문이다. 그러나 FAO/WHO는 risk assessment의 국제적인 protocol 개발을 추진하고 있으며, 국제표

준안이 마련되면 MRA 연구가 좀 더 활발해 질 것으로 예상된다.

우리나라의 축산업계 기반이 축산선진국에 비하여 상대적으로 열세하므로 그 결과 farm-to-table에 이르는 위험분석을 위한 정량적 기초자료 수집은 매우 어려운 실정이다. 따라서 national baseline study와 같은 정책적인 실태조사를 지속적으로 운영할 필요가 있다. 차후 MRA와 같은 과학적 근거에 입각한 안전성 확보의 국제 경쟁에서 뒤지는 결과를 초래할 수 있기 때문이다.

특정 위해미생물에 대한 정량적 분석방법의 연구는 활성화된 분야는 아니며, 필요성에 따라 개발 여지가 많다. MRA 연구가 더욱 확대되려면 좀 더 쉬운 오염미생물에 대한 정량적 분석방법 개발이 필수적이기 때문이다.

미생물에 대한 fingerprinting 기술은 이미 일상적인 수준이지만 환경유래 오염원 규명을 위한 위생분야에서의 실제 활용은 시작단계이다. 앞으로 역학적 추적방법과 함께 분리된 세균에 대한 정확하고 신뢰성 있는 특성구분이 가능해진다면, 식품관련 작업장에 대한 미생물학적 진단에 매우 긴요하게 활용될 수 있을 것이다.

제4절 본 연구결과의 의미

일반적인 MRA 모델 개발은 farm-to-table의 전과정에 대한 적용이지만, 앞에서 기술한바와 같이 아직은 정량적 자료가 매우 미흡하여 실질적이고 신뢰성 있는 결과를 얻기 어려운 실정이다. 이러한 상황은 미국 등 대부분 국가에서 공통된 문제점이다.

본 연구는 MRA 기법 중 exposure assessment 방법을 단위 작업장에 적용함으로써, 좀 더 가시적이고 현장에서 활용 가능한 결과를 얻고자 하였다. 작업환경조건을 분석하고 주요 controlling factor를 설정하여 관련인자와 미생물 성장과의 관계를 simulation하여 오염발생을 예측하였다. 또한 작업공정에서 발생하는 cross-contamination을 고려하여 돈육과 식품접촉 대상과의 부착율, 전이율 실험을 하고 그 영향을 고려하고 있다. 이러한 실험적 연구는 외국에서도 찾기 어려운 큰 인내가 요구되는 실험으로 다른 식품 및 축산물 작업장에 대한 실험설계 및 자료 활용에 크게 도움이 될 것이다. 또한 MRA의 불확실성을 줄이는 중요한 연구로 이 분

야 타 연구의 선도적인 역할을 할 것이다.

미생물의 fingerprinting은 이미 많이 사용되기 시작한 기술이지만, 작업장 오염원 추적에 위한 분자역학적인 접근은 그다지 많지 않다. HACCP 작업장의 critical control point가 비효율적으로 설정되는 경우가 있어 유효성 검증이 필요한데, 이러한 실험적인 방법은 유효성 평가에 결정적인 자료를 제시해 주므로, 보다 개선된 HACCP 프로그램을 운영할 수 있게 해준다. 특히 본 연구에서 선택한 RAPD 방법은 재현성 문제가 지적되지만, 오염원 분석시 3-4회 반복되는 작업공정에 대한 시료 분석을 수행하면 오염원 규명이 가능함을 확인할 수 있었다. PFGE 보다 장비가 저렴하고 작업자체가 단순하므로 대부분의 실험실에 사용이 가능하다는 큰 장점이 있다. 한편으로, 정량적 검사와 신속검사방법 개발은 초기 오염수준에 따른 변수가 있어 쉽지 않으며, 오염수준이 낮은 작업장에 적용할 수 있는 수준이 되려면 이 분야의 전문적인 연구가 필요한 것으로 판단되었다.

종합적으로 개발된 MEHM은 작업환경조건중의 관련성 큰 factor를 이용하여 오염발생을 실시간으로 예측하는 방법으로, 최종제품의 오염수준이 다음 단계에 민감한 영향을 줄 수 있는 RTE 식품생산 공정에서는 매우 효과적인 통제방법으로 판단된다. 이러한 실용적인 접근은 국내외적으로 찾아보기 어려운 연구로 파악되었다.

제3장 작업장의 오염발생 특성 및 오염원 분석

*Salmonella*는 인체에 위해성이 가장 큰 인수공통질병의 원인균이며, 가축의 장내 정상균총으로도 존재하면서 도축과정에서 비위생적인 작업에 의해서 원료도체를 오염시킨다. *Listeria monocytogenes*는 환경내 편재되어 있는 저온성 세균으로 도축장에서의 오염발생보다는 축산물가공장의 작업환경에서 주요 오염원으로 작용한다. 특히 5°C이하의 저온에서도 생존 및 증식이 가능하므로 축산물 저온유통에서 중요하게 관리되어야 할 위해미생물이다.

포장육 공정에서의 미생물 오염은 chilling과 cutting 과정에서 많이 발생하며, 특히 cutting 공정에서의 비위생적인 작업으로 인한 오염이 증가하는 것으로 보고되었다. 이것은 가공장의 cold and wet 환경조건에서 *Listeria*와 같은 저온성 세균의 생존과 증식이 가능하기 때문인 것으로 알려져 있다 (Elzen, 1993; Johnson, 1990).

작업장에 잠재된 위해미생물 오염원 규명을 위한 역학적 추적조사는 오염원 근절에 필수적인 정보를 제공해 준다. HACCP system도 이러한 자료에 근거하면 선행요건에서의 control point 선정과 critical control point 선정 및 관리에 신뢰성을 가질 수 있으며, 결과적으로 HACCP system의 완성도를 높일 수 있다.

위해미생물에 대한 serotyping은 역학적 목적에 충분한 정보를 주지 못하며, phage typing도 모든 균주를 typing할 수 없을 뿐만 아니라 일부 소수의 실험실에서만 수행할 수 있다는 단점이 있다. 최근에는 필요한 분별력 있는 정보를 얻기 위하여 molecular typing이 많이 시도되고 있으며, 이러한 분별력은 작업장 내 오염의 흐름을 파악하는데 도움이 되는 자료를 제공해 준다. 근래에 발표되는 오염원 추적과 fingerprinting 활용 논문에서는 도축·도계장에서부터 수산물, 육류, 낙농제품 등 다양한 여러 종류의 가공장을 대상으로 하고 있으며, *Salmonella* spp.와 *Listeria monocytogenes*가 많은 비중을 차지하고 있다 (Destro, 1996; Gaya, 1998; Pritchard, 1995; Rorvik, 1997; Samelis, 1999).

분자유전학적 기법에 의한 세균의 분류 기법은 오염세균의 동일한 혈청군내에서의 이질성 확인까지도 가능하게 하므로 과학적인 오염원 분석을 가능하게 하였다. 이러한 방법으로는 겔 전기영동분석에 의한 염색체 DNA 분석, Pulse-field gel

electrophoresis (PFGE), Random Amplified Polymorphic DNA(RAPD), Repetitive PCR fingerprinting, Single-stranded conformation polymorphism(SSCP), 재조합 DNA probe를 이용한 Southern blot hybridization과 16S ribosomal RNA sequence를 분석하는 ribotyping 등이 있다.

여러 DNA fingerprinting 방법 중에서 RAPD 방법은 전통적인 PCR에 비해 무작위로 배열된 짧은 primer를 이용해서 genomic DNA를 증폭함으로써 DNA polymorphism을 찾아내는 방법이다(Williams, 1990). 장비가 저렴하고 사용이 용이하고 신속하여 소량의 DNA로도 확인 가능하며, 또한 DNA sequence에 대한 정보가 필요 없다는 것도 장점이다. 본 실험방법은 제2협동 연구팀에서 분리력을 높이는 실험을 수행하여 *Listeria* spp.의 subtyping에 유용함을 확인하였고, 따라서 오염원 추적을 위한 RAPD 분석은 제2협동 연구팀의 기술 지도를 받아 수행하였다.

본 연구는 포장돈육 가공장을 원료도체 입고에서부터 공정순서에 따라서 원료도체 보관, 공정과정, 최종육 포장의 세부분으로 구분하고, 도체 및 돈육, 돈육과 직접 접촉이 있는 시설 및 장비, 작업환경에서 *Listeria*와 *Salmonella*를 검출하고, 오염 특성을 분석하여 오염원을 분석하였다. 또한 작업전·중의 세척·소독 상태와 HACCP 지정업체와 비지정업체간의 오염수준을 비교하여 효과에 대한 비교와 개선방안을 제시하였다.

제1절 공정조건 분석

1. 포장돈육 작업공정 분석

포장돈육 가공장 공정도는 <Fig. 3-1, Table 3-1>과 같다. 포장돈육 공정은 2분도체의 상태로 입고되는데 가공장의 입지조건에 따라서 원료도체는 다음의 2가지 유형으로 운반된다. 축산물종합처리장에 위치하는 포장돈육 가공장은 도축공정으로부터 원료도체가 현수상태로 보내져 예냉실에 입고 보관되며, 별도의 독립건물에 위치하는 중소규모 가공장은 원료도체가 냉장차량으로 운반되어 작업장에 입고된다. 따라서 포장돈육 공정의 시작은 원료도체 입고에서부터 시작된다. 입고된 원료도체는

먼저 3분도체로 절단되고 발골, 정형, 포장 등의 공정을 거쳐 최종적으로 냉장 또는 냉동보관 후 출고된다.

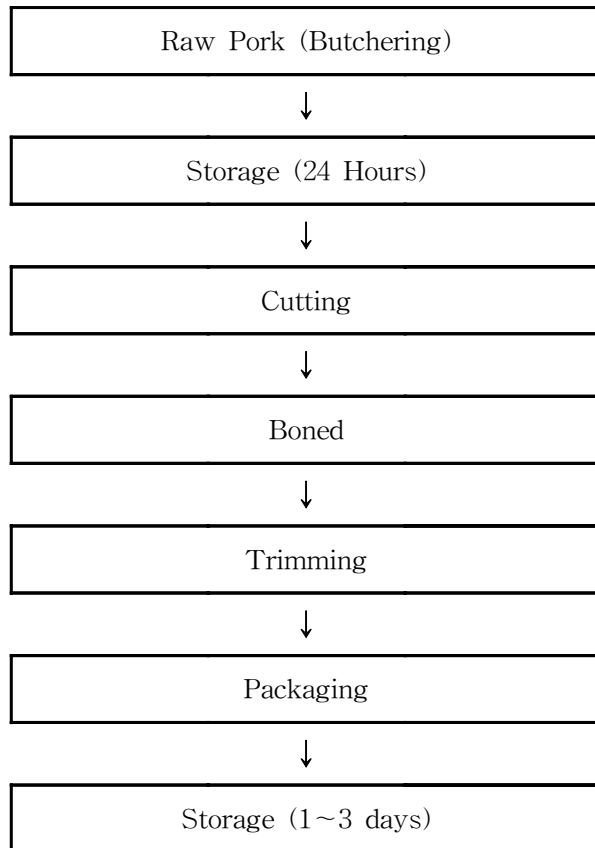


Fig. 3-1. Flow diagram of pork processing procedure.

Table 3-1. Major function of pork processing plant by procedure

Processing	Description
Pork slaughter (2분도체)	<ul style="list-style-type: none"> - 냉각과 취급상의 편의를 위하여 2분할 - 등뼈의 정중선 절단 - 세척(고압 세척수 또는 10~20ppm 염소수 이용) - 신선도유지(냉각감량의 감소방지)
Storage (예냉)	<ul style="list-style-type: none"> - 온도 -4~0℃, 상대습도 90% 정도의 예냉실에서 24시간 보관 - 지육온도 0~5℃유지 - 도축간 거리: 10cm
출고	<ul style="list-style-type: none"> - 가공실 온도: 15℃ 이하 유지
3분도체	<ul style="list-style-type: none"> - 앞다리, 몸통, 뒷다리 분리 - 앞다리 분리: 5갈비뼈와 6갈비뼈사이 - 뒷다리 분리: 장골분리
발골 (뼈빼기)	<ul style="list-style-type: none"> - 앞다리 부위 전완골 제거, 가슴뼈 및 갈비연골 제거, 갈비 제거, 목뼈 제거, 목심분리, 상완골 좌우측내기, 주걱뼈 제거, 상완골 제거, - 몸통부위 복지방 제거, 횡경막 분리, 안심 분리, 갈비뼈 제거 및 예비처리, 갈비뼈 제거, 등심과 삼겹분리, 등뼈, 허리뼈 제거 - 뒷다리 부위 하퇴골 제거, 천미추 제거, 좌골 절개, 좌골 제거, 대퇴골 제거, 무릎뼈 제거
정형	<ul style="list-style-type: none"> - 앞다리부위 정형(안쪽, 바깥쪽) - 몸통부위 정형: 등심부위 정형, 삼겹살부위 정형, 안심 정형 - 뒷다리부위 정형
포장	<ul style="list-style-type: none"> - 정형된 부분육 PE 포장 (최종제품의 중량)
냉장보관	<ul style="list-style-type: none"> - 유통형태별: 0~2℃의 냉장 또는 - -40℃에서 급냉 후 -20℃ 냉동보관

2. 작업환경 분석

가. 포장돈육 공정에 대한 규정

축산물가공장HACCP적용매뉴얼의 포장육 HACCP 일반모델에 의하면, 포장돈육 가공공정에서의 미생물학적 위해요인에 대한 관리기준은 주로 온도, 교차오염, 시간 등으로 원료도체 온도관리는 냉장은 $-2\sim 5^{\circ}\text{C}$, 냉동은 -18°C 이하, 도체간 간격 유지 관리는 10 cm이상 이격이 필요하며, 반입 후 3일 이내 처리하여야 하며 또한 돈육온도는 $0\sim 5^{\circ}\text{C}$ 로 포장공정 작업장은 15°C 이하로 유지되는 것으로 규정되어 있다.

나. 포장돈육 공정의 환경요인 분석

포장돈육 공정의 환경요인을 파악하기 위하여 HACCP 지정작업장과 비지정작업장 1곳씩을 선정하여, 작업실 온도 및 돈육의 온도 등 가공조건은 시료채취를 할 때 함께 측정하였다. 공정시간은 예냉이 끝난 도체가 가공실에 반입되어 포장될 때까지의 시간을 측정했고, 작업실의 온도는 작업중 작업실에 비치된 온도계로 측정했으며 돈육의 내부온도는 원료도체, 절단 및 발골공정, 정형 및 포장공정의 3단계에서 측정하여 최소, 최대 및 중간 값을 조사하였다.

가공공정의 환경요인에 대한 조사 결과는 <Table 3-2>와 같다. 공정시간은 짧은 경우에는 15분, 보통 25분 정도 소요되나 일부 도체의 경우 2시간 이상까지 소요되는 것도 있었다. 도체의 온도는 낮은 경우는 1.0°C , 평균 5.4°C 였으며, 최대 8.1°C 에 이른 경우도 있었다. 가공장 온도는 최저 15°C , 평균 18°C 최대 25°C 까지 도달했다.

HACCP 지정작업장과 비지정작업장간의 가공중 온도변화를 data logger로 측정한 결과는 <Fig 3-2>와 같다. HACCP 지정작업장의 경우 원료도체 온도는 5°C 이하이며 가공실 온도는 작업이 진행됨에 따라 높아지기는 했지만 15°C 이하를 유지하였다. 비지정작업장의 경우 도체의 표면온도가 5°C 를 초과했으며 가공실 온도 역시 작업이 진행됨에 따라 높아져 20°C 에 도달하는 경우도 있어, HACCP 비지정작업장이 지정작업장보다 온도 관리에 문제가 있는 것으로 조사되었다.

Table 3-2. Changes of processing time and room temperature in pork processing plant during procedure

	Min.	Mean	Max.
Processing time(min)	15	25	120
Carcass temperature(°C)	1.0	5.4	8.1
Processing room temp.(°C)	15	18	25

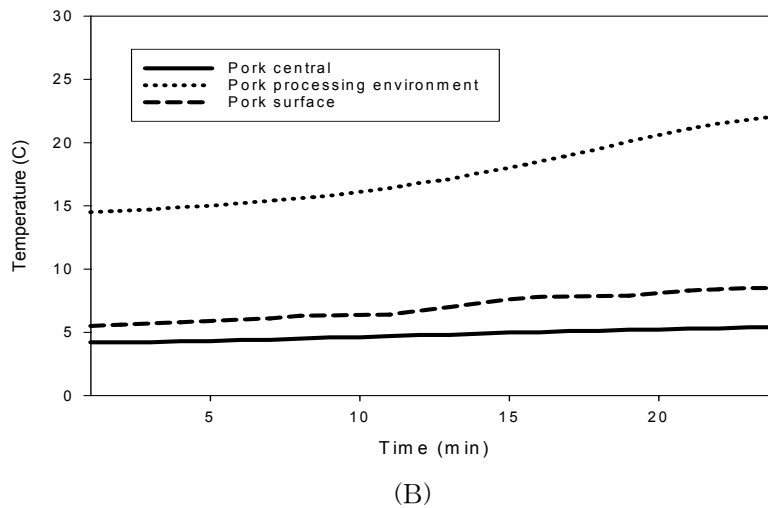
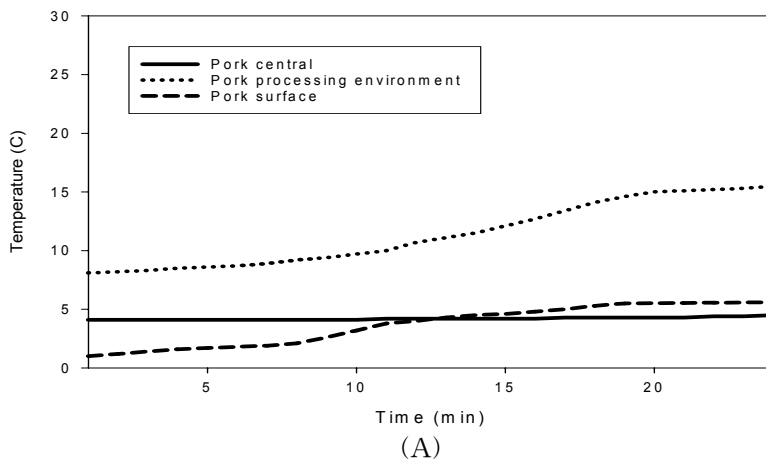


Fig. 3-2. Temperature changes of pork carcass and processing room in HACCP and non-HACCP plant.

제2절 실험재료 및 방법

1. 실험대상 작업장 선정

본 연구실험에 협조 가능한 중부지역 소재 중소형 및 대규모 포장돈육 가공장 4 곳을 선정하였다. 가공장의 규모는 <Table 3-3>과 같다. 가공장 A, C는 하루 처리 약 800~1,000두 정도로 3개 라인을 운영하는 종합축산물처리장내에 위치하고 있으며, 도축 완료 후 원료도체는 즉시 현수상태로 예냉실로 보내지는 중견업체이었다. 가공장 D는 규모는 작지만 도축장내에 위치하여 실험대상 작업장으로 선정하였으나, 운영주체가 수시로 바뀌고 위생관리 상태가 매우 부실하여 1차년도 monitoring만 실시하였다. 가공장 B는 2차년도부터 D 가공장을 대신하는 소규모 작업장으로 선정하였으며, 도축장과는 별도의 독립건물에 위치하여 도체는 작업이 있는 당일 새벽 냉장차량으로 운송되었다. HACCP 전·후의 위생수준 비교실험에는 실험이 진행되는 과정에 HACCP 업소로 지정된 가공장 A, B를 대상으로 하여 자연스럽게 비교가 가능하였고, 또한 본 실험이전에 이미 지정받은 가공장 C는 지정받은 후 상당한 기간이 경과한 가공장의 실태 분석에 활용하였다.

Table 3-3. General information of pork processing plants cooperated for this study

Plant	A	B	C	D
Carcasses processed/day	800~1,000	80~100	800~1,000	60~80
Carcass supply	Connection line from LPC	Transport by cold storage vehicle	Connection line from LPC	Connection line from slaughter-house
HACCP certification	2005. 1.	2004. 6.	2001. 12.	Excluded after 1st year due to financial difficulties

2. 시료채취 및 방법

가공장의 위생실태를 파악하기 위한 monitoring 실험은 각 작업장을 대상으로 필요에 따라서 4~8회 실시하였다. 작업공정 분석과 frame-work model 설정과 함께 예비실험을 통하여 원료도체, 공정중 돈육 및 최종육, 장비 및 환경에 대한 시료채취 부위를 정하였고, pilot test를 거쳐서 오염실태 분석과 오염원 추적을 위한 실험을 수행하였다. 작업전·후의 오염실태 비교 실험은 모든 작업장이 HACCP 지정받은 후인 3차년도에 집중적으로 실시하여 Sanitation Standard Operating Procedure (SSOP)에 의한 일정성 있는 위생관리가 이루어지는 상태에서의 비교를 하였다. 또한 HACCP 지정 전·후의 위생수준 비교에는 실험진행 중에 지정받은 가공장 A, B를 대상으로 비교 하였다.

원료도체, 작업대, 칼, 칼갈이, 면장갑, 발골기, 박피기, 벨트, 벽, 바닥에서의 시료채취는 30 ml의 buffered peptone water(BPW, Oxoid Ltd., Basingstoke, Hants., England)에 적신 2 × 2 inch gauze로 각 시료부위를 swab하여 무균적으로 채취하였다. 가공중 돈육인 발골육, 부분육, 최종육은 25 g씩을 각 공정에서 채취하였다. 시료는 4℃를 유지하며 6시간 내에 실험실로 운반하였고, 돈육시료는 225 ml의 BPW와 혼합한 후 stomacher 400(Seward Ltd., Thetford, Norfolk, UK)으로 2분간 균질화하여 실험에 사용하였다.

3. *Listeria* 분리 및 동정

Listeria 분리 및 동정은 미국 FDA 방법에 준하여 다음 방법으로 실시하였다. BPW액으로 균질화시킨 시료 1 ml를 listeria enrichment broth(LEB, Difco Co., Detroit, MI, USA) 9 ml에 접종한 후 30℃ 48시간 배양하였다. 배양액을 선택배지인 oxford agar(OXA, Oxoid)와 PALCAM agar(Merck, KGaA 64271 Darmstadt, Germany)에 획선 도말하여 35℃에서 48시간 배양한 후 집락 모양이 진한 갈색 또는 검은색 환으로 둘러싸여 있는 집락을 각 선택배지에서 선발하여 triptic soy agar(TSA, Difco)에 35℃ 24시간 순수 배양하였다. 분리균은 blood agar(Komed, Co., Sungnam, Kyunggido, Korea)에서 β -hemolysis를 판별하며 Gram 염색한 후 그람양성 단간균을 선택하여 catalase 효소 반응 시험, 25℃에서 48시간 운동성을 확

인하였으며, API-Listeria kit(Biomérieux, 69280 Marcy l'Etoile, France)로 동정하였다<Fig. 3-3>.

혈청형 확인은 *L. monocytogenes* 분리 균주를 TSA(Difco)에 접종한 다음 35℃에서 24시간 배양한 후 배양된 균을 fluorescent antibody buffer(FA buffer, Difco)에 부유하여 McFarland No. 3로 균액의 농도를 조절하였고, 80~100℃에서 1시간 동안 가열하였다. 가열한 후 3000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 제거한 다음 남아있는 buffer로 재부유시켜 항원으로 사용하였다. 항혈청(poly, type 1, type 4, Difco)을 0.8% 멸균 생리 식염수(saline solution)를 이용하여 1:20으로 희석한 후 동량의 항원과 slide agglutination test를 실시하여 75% 이상 응집반응을 보인 것을 양성으로 판정하였다.

4. *Salmonella* 분리 및 동정

채취한 시료를 BPW로 균질화시키고 35℃에서 24시간 증균한 뒤, selenite cystein broth(SC, Difco)에 1ml 접종 후 35℃에서 24시간 배양하고, 선택배지에 도말하여 35℃에서 24시간 배양하여 확인하였다. 선택배지로는 Brilliant Green agar(BGA, Difco), Salmonella Shigella agar(SS, Difco), MacConkey agar(Difco) 3가지를 사용하였다. BGA에서는 무색환의 분홍색 집락을, SS에서는 무색환의 검은색 집락을, MacConkey에서는 무색 집락을 선택하였다. 선택배지에서 의심되는 균이 분리되지 않은 경우 SC broth에서 35℃ 48시간 더 배양한 후 다시 선택배지에 도말하였다. 선택된 집락은 Triple Sugar Iron agar(TSI, Difco)와 Lysine Iron agar(LIA, Difco)에 계대접종하여 35℃에서 24시간 배양한 후, TSI에서 alkaline slant/acid butt의 결과를 나타내고 LIA에서 alkaline slant/alkaline butt를 나타내는 균주를 확인하고, API 20E kit를 사용하여 최종적으로 *Salmonella* spp.를 동정하였다<Fig 3-4>.

5. DNA 분리 정제

DNA 분리 정제는 제2 세부과제의 연구결과를 토대로 공동으로 실험을 진행하였다. 분리한 *Listeria* 균체로부터 DNA를 분리하기 위해 guanidine thiocyanate/

phenol/chloroform method를 사용하였다. 약 0.5 ml의 *Listeria* 배양액에 0.25 ml의 solution D(4 M guanidine thiocyanate, 0.025 M sodium citrite, 0.5 % sarcosyl)와 0.5 ml의 phenol-chloroform(1:1)을 첨가하여 약 1시간 정도 tumbling시키고 원심 분리하여 수용액층을 회수한 후 DNA를 isopropanol로 침전시켰다. 얻어진 pellet을 70% ethanol로 세척한 후 건조시켜 증류수에 녹인 다음 PCR에 사용하였다.

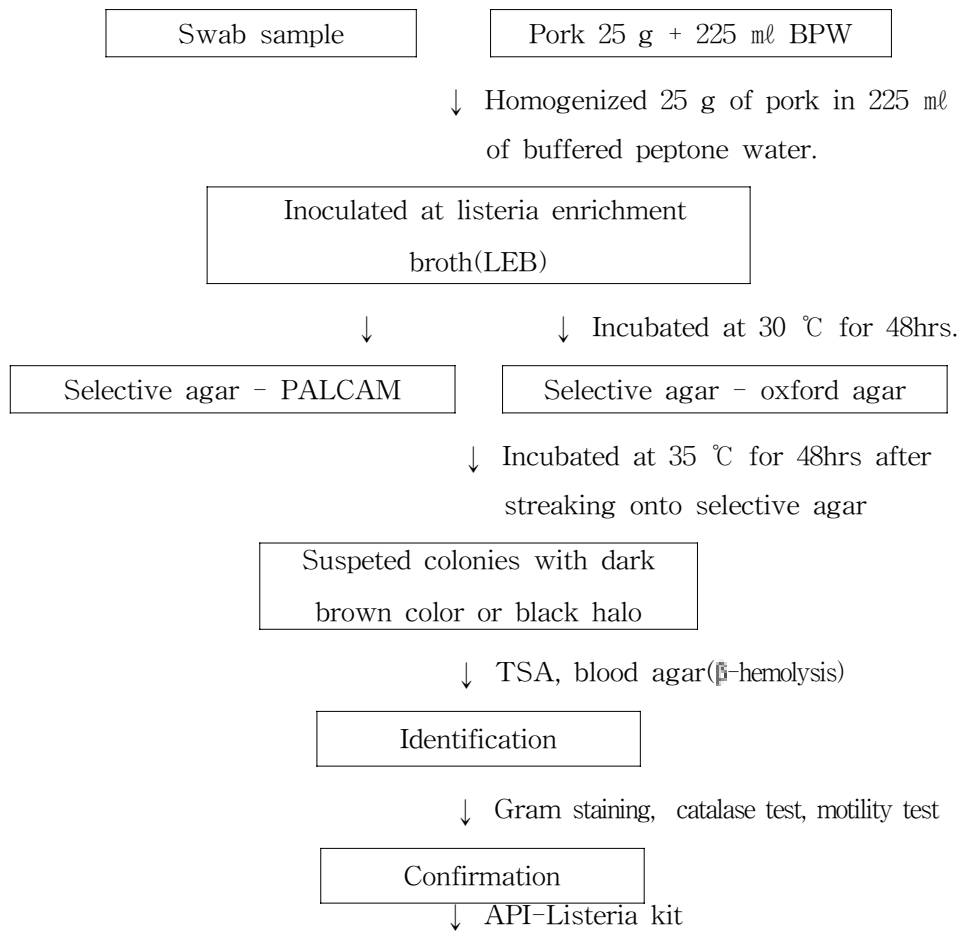


Fig. 3-3. Isolation method of *Listeria* species.

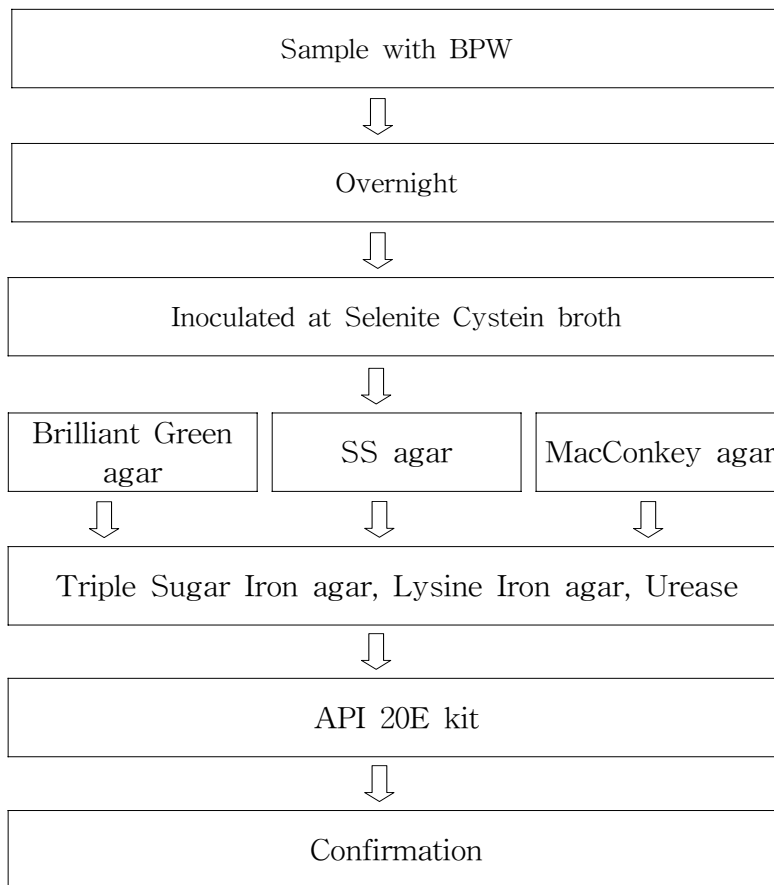


Fig. 3-4. Isolation method of *Salmonella* spp.

6. RAPD-polymerase chain reaction(PCR) 조건

RAPD에 사용한 primer로는 제2 협동과제에서 수행한 primer의 재현성과 분리력 비교실험을 한 결과 31가지 중 가장 분별력이 좋았던 것으로 밝혀진 DG 122 primer (5'-AGCCAGGTCA-3')와 DG 107 primer(5'-CCCGTCAGCA-3')를 선택하였다.

각각의 PCR 반응액에는 10 mM Tris-HCl(pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 μM dNTPs, 2.5 units Taq DNA polymerase, 100 pmol primer와 DNA template가 함유되도록 하되 총 부피는 50 μl가 되도록 하였다. 각 시료는 thermocycler (Perkin-Elmer 2400, Foster, CA)에서 증폭 cycle을 시작하기 전에 94°C에서 5분간 DNA를 변성시킨 후 cycle로 진입하게 하였으며 45 cycle을 종료한 후 72°C에서 7분간 연장반응 시킨 후 반응을 종료하였다. 각 cycle은 94°C에서 1분간 denaturation, 35°C에서 2분간 annealing, 72°C에서 2분간 extension을 실시하였다. 증폭된 PCR 산물은 loading buffer(30% glycerol, 0.25% bromophenol blue)와 혼합후 10 mg/ml ethidium bromide을 첨가한 2.0% agarose gel을 TAE buffer상에서 전기영동을 실시한 후 UV transilluminator를 사용하여 분석하였다. 분별패턴은 각 primer 별로 DG 122를 사용한 genotype과 DG 107를 이용한 genotype으로 분류 후 combine하여 판단하였다.

제3절 오염발생 특성분석

1. 포장돈육 가공장에서 *Listeria* spp.의 분리율

전체 782건의 시료에서 344건(44.0%)의 *Listeria* spp.가 분리되었고, 분리된 *Listeria*는 *L. innocua* 210건(26.9%), *L. monocytogenes* 115건(14.7%), *L. welshmeri* 19건(2.4%) 순이었다 <Table 3-4>.

가공장 A의 220건 시료에서 분리된 103건(46.8%)의 *Listeria* 분포는 *L. monocytogenes* 55건(53.4%)으로 가장 많았고, *L. innocua* 43건(41.7%), *L. welshmeri* 5건(4.9%) 순이었다. 원료도체에서 2건의 *L. monocytogenes*가 분리되었고, 최종육에서는 *L. monocytogenes* 8건, *L. innocua* 5건이 분리되었다. 장비에서는 *L. monocytogenes* 33건, *L. innocua* 17건, *L. welshmeri* 2건이 분리되었고, 환경시료에서는 *L. innocua* 17건, *L. monocytogenes* 8건, *L. welshmeri* 1건이 분리되었다. 모든 시료에서 *L. monocytogenes*가 지속적으로 검출되고 있으며, 특히 장비의 *L. monocytogenes* 오염수준은 다른 가공장보다 높아 세척소독 준수가 요구되었다.

가공장 B는 182건의 시료에서 124건(68.7%)의 *Listeria* 균이 분리되어 오염도가 가장 높았으며, 그 대부분이 *L. innocua* 100건(80.6%)으로 *L. monocytogenes* 24건(19.4%)에 비해서 오염 비중이 높았다. 특히 장비의 오염이 가장 많았고(65건), 다음이 환경(13건)이었다. 장비와 환경오염은 작업후의 세척소독 미흡이 원인인데, 실제로 이 가공장은 세척소독 지침서가 없어 관리가 부실하였다.

가공장 C는 220건 시료분석 결과 20건(11.1%)만 검출되어 다른 가공장에 비해서 오염이 낮았다. *L. innocua* 13건, *L. monocytogenes* 2건의 분포를 보인 반면 *L. welshmeri*는 5건이 검출되었다. *L. welshmeri*는 장비와 환경에서 주로 검출되었다.

가공장 D는 200건의 시료에서 97건(48.5%)의 *Listeria* 균이 분리되었다. *L. innocua* 54건, *L. monocytogenes* 34건이 검출되었고, *L. welshmeri*는 9건이 검출되었다. 도체를 제외한 모든 시료에서 3가지 strain이 모두 검출되어 오염원이 다양한 것으로 추정된다.

작업장간의 오염수준에 차이는 있지만 공정이 진행되면서 최종육에서 오염이 증가하는 공통점이 나타나는데, 이는 포장돈육 공정 특성상 살균처리과정이 없어 작업장에 오염균이 유입되면, 공정이 진행되면서 교차오염이 발생하여 오염이 확산되기 때문으로 판단된다. 이러한 결과는 허 등(1997), 안 등(1998) 등이 보고한 최종단계에

서의 오염 증가와 일치하며, 작업장 세척과 소독에도 불구하고 *Listeria*균이 공정과정의 시설 및 작업도구에 지속적으로 생존하여 교차오염을 유발한다는 Rorvik(2000), Fenlon(1996)의 보고와도 관련된다.

포장돈육 가공장으로의 오염균 유입은 도체, 종업원, 작업용 운송수단 등 매개체가 다양하므로 완전차단은 현실적으로 어렵다. 따라서 작업장내의 교차오염 발생을 감소시킬 수 있는 예방조치로 많은 HACCP 작업장에서는 작업중에 종업원의 손(장갑), 칼, 칼갈이, 도마에 대해서, 수시로 알코올 스프레이를 하고 있었다. 작업자의 손(장갑), 작업장비에 의한 미생물 오염을 가중시킬 수가 있으므로 소독한 칼을 사용하고 손(장갑)을 세척하는 등의 위생적인 작업행위는 필요하지만(Rahkio, 1996), 작업중에 칼, 칼갈이, 면장갑에 대해 알코올 분무기 소독의 효과에 대해서는 검증이 필요하다고 판단된다.

장비와 작업환경에서의 *Listeria* 분리율이 50% 이상으로 높은 근본적인 이유는 작업전·후의 세척과 소독이 엄격히 지켜지지 않는데 일차적인 원인이 있다. 이미 HACCP 지정을 받은 가공장 C는 위생관리 기준서에 준하여 체계적인 관리가 이루어지므로 타 가공장에 비하여 상대적인 오염수준이 낮은 것이 좋은 예이다. 반면에 세척과 소독을 하여도 오염균이 존재할 여지가 많은 시설 및 장비의 구조적인 문제도 오염에 영향을 미친다. *Listeria*는 스테인리스, 플라스틱, 울퉁불퉁한 표면, 마멸에 의한 손상부위, 고무에 잘 부착할 수 있는 생태학적, 생리적 특성을 가지고 있으므로, 작업대, 칼, 칼갈이, 면장갑에 부착하여 생존할 가능성이 높은 특성을 갖고 있기 때문이다(Chasseignaux, 2002). 특히 박피기와 컨베이어벨트에는 돈육조각이나 기름때가 남아 *Listeria*가 존재할 가능성이 높는데, 이러한 시설은 구조적으로 세척과 소독이 용이하지 않아 잔류유기물이 효과적으로 제거되지 못하므로 계속 오염원으로 작용할 수 있다.

환경시료에서 나타나는 높은 분리율은 작업장 바닥이나 벽의 균열과 파손이 많아 물이 고이고 이로 인하여 *Listeria*의 생존을 가능하게 하는 biofilm을 형성하게 하기 때문이다(Chavant, 2002; Poulsen, 1999). 따라서 이러한 부분은 세척 소독으로도 제거되지 못하므로 선행요건에서 요구하는 대로 정비되어야 한다. 바닥과 벽의 오염은 돈육과 직접적인 접촉을 하지는 않지만 간접적인 오염원으로 존재하면서 작업장 세척 소독시 세척액이 튀어 오염을 확산시키는 원인으로 작용할 우려가 있으므로, 작업장 세척 소독 SOP에 포함되어 정기적으로 관리되어야 한다.

이와 같이 시설장비 및 작업환경에 대한 세척과 소독은 최종육의 오염에 직접적

인 영향을 미칠 수밖에 없다. 또한 오염수준이 낮더라도 냉장유통과정에서 보관기간이 길어질수록 저온성 세균 증식이 가능하므로 여전히 위해발생 가능성이 존재한다. 따라서 유통조건에 따른 오염수준, 유통기간 설정 등의 관리가 필요한 것으로 판단된다.

2. 혈청형별 *Listeria monocytogenes*의 분포

포장돈육 가공장 4곳에서 분리된 115건의 *L. monocytogenes* 혈청형 분포는 <Table 3-5>와 같다. Serotype 1이 109건(94.8%), type 4는 6건(5.2%)이었다.

시료채취부위별로는 원료도체, 가공중육, 환경에서 검출된 *L. monocytogenes*는 모두 type 1이었고, type 4는 최종육과 장비에서 각각 3건이 확인되었다. 축산물종합처리장내에 위치한 가공장 A, C에서는 type 1만이 분리되었고, 가공장 B에서는 최종육과 장비에서 type 4가 5건 검출되었고, 가공장 D에서는 장비에서 1건의 type 4가 확인되었다.

다른 연구자의 조사결과와 비교해보면 안 등(1998)이 돈육 가공장에서의 분리한 균주의 혈청형은 1/2a를 포함한 1과 4b가 가장 많았고, 이 등(2000)은 가축 사육장과 작업장 폐수로부터 분리한 *L. monocytogenes*의 93.1%가 type 1이었다. 또한 Byun 등(2001)이 국내 식육에서 검출한 *L. monocytogenes*의 75%가 type 1이었다는 보고를 참고하면, 국내에 분포하는 *L. monocytogenes*의 serotype은 type 1에 편중되어 있다고 판단된다. Serotype 1이 식품에서 가장 많이 분리되는 것은 강한 침입력과 관련되는 것으로 해석된다(Schonberg, 1989).

사람 listeriosis의 90% 이상이 4b, 1/2a, 1/2b 세가지 혈청형에 의한 것이며 이중 4b에 의한 발생이 많은 것으로 조사되었으며, 혈청형 1/2a, 1/2b이 속하는 serotype 1은 주로 식육에서 발견되고 있다(Jay 1996; Swaminathan, 1995). Serotype 1이 주로 검출되는 국내 축산물작업장도 여전히 listeriosis를 유발하는 혈청형 1/2a, 1/2b의 상존 가능성이 있으므로 작업장 위생관리 강화의 필요성이 인정된다.

포장육 64건에서 listeriosis를 유발하는 *L. monocytogenes*가 14건(21.9%) 검출되므로, 유통 및 판매조건에서 증식된다면 위험이 커질 우려가 존재한다. 그럼에도 불구하고 국내 식중독 발생통계에 *Listeria* 식중독이 보고 되지 않는 것은 역학조사에서 *Listeria*는 원인균 조사대상에 포함되지 않기 때문인 것으로 판단된다(식약청,

2005). 미국의 식중독 발생보고에 의하면, listeriosis는 *Campylobacter*, *Salmonella*에 의한 식중독보다 발생율은 낮지만 치명율이 매우 높아 사망자 수는 salmonellosis에 의한 사망자 수와 동일한 수준으로 그 심각성을 알려주고 있다. 이에 따라서 미국은 *L. monocytogenes*에 대한 국가차원의 risk assessment를 실시하는 등 주요 위생관리 대상으로 정하고 있다(Walls, 2005). 우리나라도 국제적으로 관심이 높아가는 *Listeria* 균에 대한 주요 식품에서의 오염상태 monitoring과 식중독 환자에서의 역학 조사를 꾸준히 실시하여 실태 파악과 함께 적절한 위생관리조치가 필요하다고 판단된다.

Table 3-4. Distribution of *Listeria* spp. contamination in pork processing plants

Plant	Sampling point	N	<i>Listeria</i> spp.	%	<i>Listeria</i> spp.		
					LM	LI	LW
A	Carcass	22	2	9.1	2	0	0
	Pork on processing	30	10	33.3	4	4	2
	Final pork	24	13	54.2	8	5	0
	Equipment	104	52	50.0	33	17	2
	Environment	40	26	65.0	8	17	1
	Total	220	103	46.8 (100)	55 (53.4)	43 (41.7)	5 (4.9)
B	Carcass	22	10	45.5	4	6	0
	Pork on processing	24	9	37.5	0	9	0
	Final pork	16	11	68.8	4	7	0
	Equipment	88	72	83.0	7	65	0
	Environment	32	22	68.8	9	13	0
	Total	182	124	68.7 (100)	24 (19.4)	100 (80.6)	0
C	Carcass	12	1	8.3	0	1	0
	Pork on processing	24	2	8.3	1	1	0
	Final pork	12	3	25.0	0	2	1
	Equipment	108	10	9.3	0	7	3
	Environment	24	4	16.7	1	2	1
	Total	180	20	11.1 (100)	2 (10.0)	13 (65.0)	5 (25.0)
D	Carcass	32	7	21.9	3	4	0
	Pork on processing	24	15	62.5	4	10	1
	Final pork	12	6	50.0	2	3	1
	Equipment	100	51	51.0	17	29	5
	Environment	32	18	56.3	8	8	2
	Total	200	97	48.5 (100)	34 (35.0)	54 (55.7)	9 (9.3)
Total	Carcass	88	20	22.7	9	11	0
	Pork on processing	102	36	35.2	9	24	3
	Final pork	64	33	51.6	14	17	2
	Equipment	400	185	46.3	57	118	10
	Environment	128	70	54.7	26	40	4
	Total	782	344	44.0 (100)	115 (33.4)	210 (61.0)	19 (5.5)

N: Number of sample, LM: *L. monocytogenes*, LI: *L. innocua*, LW: *L. welshimeri*
 Sampling point: 1)pork sample - processing pork(de-boned, dressed), cut-meat 2)swab sample - carcass, equipment(boning machine, skinning machine, working tables, conveyer belt, knives, sharpener, gloves), environment(floor, wall).

Table 3-5. Serotype of *L. monocytogenes* isolated from pork processing plants

Sampling point	A		B		C		D		Total	
	1	4	1	4	1	4	1	4	1	4
Carcass	2	0	4	0	0	0	3	0	9	0
Pork on processing	4	0	0	0	1	0	4	0	9	0
Final pork	8	0	1	3	0	0	2	0	11	3
Equipment	33	0	5	2	0	0	16	1	54	3
Environment	8	0	9	0	1	0	8	0	26	0
계	55	0	19	5	2	0	33	1	109	6

a: Number of samples positive/number of samples tested(%)

Sampling point: 1)pork sample - processing pork(de-boned, dressed), cut-meat
2)swab sample - carcass, equipment(boning machine, skinning machine, working tables, conveyer belt, knives, sharpener, gloves), environment(floor, wall)

3. 포장돈육 가공장에서 *Salmonella* spp.의 분리율

전체 782건의 시료중 16건(2.0%)의 *Salmonella* spp.가 분리되었고, 도체 및 가공육에서 5건(2.0%), 작업환경에서 11건(2.1%)이 분리되었다<Table 3-6>. 종합축산물 처리장내에 위치하는 가공장 A, C 중에서 가공장 A에서는 *Salmonella*가 검출되지 않았으나, 같은 규모의 가공장 C에서는 2건(1.1%)이 검출되었다. 소규모 작업장인 가공장 B, D에서는 각각 7건(3.8%), 3건(1.5%)이 검출되었다. 이와 같이 포장돈육 가공장에서의 *Salmonella* 오염은 2.0% 수준으로 낮았다. *Salmonella* 오염은 주로 분변오염과 관련되는데, 포장돈육 가공장 작업환경은 분변오염의 발생 가능성이 낮으며, 실험에서도 오염분포의 특징에 따른 오염원을 추적하기에는 분리균주 수가 적었다.

시료채취부위별 *Salmonella* 오염실태는 <Table 3-7>와 같다. 원료도체 오염은 가공장 D에서만 2건이 검출되었는데, 이 가공장은 도축장과 같은 건물내에 위치하므로 도체가 현수되어 예냉실로 운송됨에도 불구하고 오염이 발생되었다. 따라서 도축과정에서의 오염발생이 근본적인 원인으로 추정되었다. 가공중 육의 오염은 가공장 C에서 1건, 최종육 오염은 가공장 A, C에서 각각 1건씩이었다. 장비오염은 9건으로 가장 많았으며, 가공장 A, B에서만 검출된 것으로 작업 전·후의 시설 및 장비의 세척, 소독, 보관 등 위생관리의 영향인 것으로 판단되었다. 시설 및 운영관리가 상대적으로 양호한 축산물종합처리장내 위치한 가공장 A, C의 최종육에서도 *Salmonella*가 검출되고 있음을 보면, 시설 및 장비도 잘 갖추어야 하지만 HACCP system 같은 과학적이고 체계적인 위생관리가 더욱 중요함을 알려주고 있다.

최종생산육인 포장돈육의 *Salmonella* 양성을 3.1%는 근래에 보고된 미국내 소매점에서의 평균 9.6% 오염수준(Duffy, 2001)이나, 스페인 가공장 포장육의 4.46%(Pala, 2004), 네덜란드 소매점 판매단계의 오염 수준 5-40%(Berend, 1998)에 비하면 낮은 것으로 나타났다. 비록 이러한 자료들이 서로 각 지역의 대표성이 결여되어 있지만, 근래 도축장에 대한 HACCP system 의무적용 이후 안전에 대한 관심이 높아진 결과 보여진다. 특히 Berends(1998)는 HACCP 비적용 포장돈육 작업장에 대한 risk factor 분석에서 교차오염의 원인이 부적절한 세척소독과 또한 이들 오염된 장비와 도구들을 사용하기 때문인 것으로 분석하고 있다. 이는 매우 중요한 지적으로 일단 오염된 원료도체가 유입되면 아무리 위생관리를 잘 하여도 불과 10% 밖에 교차오염을 줄이지 못하며, 90% 이상의 교차오염이 발생한다고 지적하고 있으며 원료도체 오염관리의 중요성을 부각시켜주고 있다.

검출된 16건의 *Salmonella*에 대한 serotype으로는 오염원 규명에 필요한 오염양상을 파악할 수 없었다. 그러나 *Sal. typhimurium* 2건이 검출되어 salmonellosis 유발 식중독균의 존재를 확인할 수 있었다. 나머지 species는 salmonellosis 발생과 관련성이 낮은 *Sal. rissen* 3건, *Sal. benin* 1건, *Sal. tsevie* 1건이었고, 9건은 정확히 분류되지 않았다. *Salmonella* serotyping은 모든 실험실에서 가능한 실험이 아니며, 고가의 비용이 드는데 비하여 결과의 활용성이 낮아 검출율이 낮은 포장돈육 가공장의 오염 특성을 지속적으로 분석하기에는 적합하지 않은 것으로 판단되었다.

Table 3-6. Distribution of *Salmonella* spp. contamination from pork processing plants

Plant	Number of sample			<i>Salmonella</i> positive (%)			
	Pork	Environment	Total	Pork	Environment	Total	
A	1st	17	36	53	0	1	1
	2nd	17	36	53	0	0	0
	3rd	21	36	57	1	2	3
	4th	21	36	57	0	0	0
	sub-total	76	144	220	1 (1.3)	3 (2.1)	4 (1.8)
B	1st	11	30	41	0	4	4
	2nd	11	30	41	0	0	0
	3rd	20	30	50	0	3	3
	4th	20	30	50	0	0	0
	sub-total	62	120	182	0	7 (5.8)	7 (3.8)
C	1st	12	33	45	0	0	0
	2nd	12	33	45	0	0	0
	3rd	12	33	45	2	0	2
	4th	12	33	45	0	0	0
	sub-total	48	132	180	2 (4.2)	0	2 (1.1)
D	1st	17	33	50	2	0	2
	2nd	17	33	50	0	0	0
	3rd	17	33	50	0	0	0
	4th	17	33	50	0	1	1
	sub-total	68	132	200	2 (2.9)	1 (0.8)	3 (1.5)
Total	254	528	782	5 (2.0)	11 (2.1)	16 (2.0)	

Table 3-7. Isolation and serotype of *Salmonella* spp. by sampling point from pork processing plants

Plant	Sampling point	No. of Sample	<i>Salmonella</i> positive (%)	Serotype
A	Carcass	22	0	
	Pork on procedure	30	0	
	Final pork	24	1 (4.2)	unknown (1)
	Equipment	104	3 (2.9)	unknown (3)
	Environment	40	0	
	Total	220	4 (1.8)	
B	Carcass	22	0	
	Pork on procedure	24	0	
	Final pork	16	0	
	Equipment	88	6 (6.8)	<i>Sal. rissen</i> (1), <i>Sal. benin</i> (1), unknown (4)
	Environment	32	1 (3.1)	<i>Sal. tsevie</i> (1)
	Total	182	7 (3.8)	
C	Carcass	12	0	
	Pork on procedure	24	1 (4.2)	<i>Sal. typhimurium</i> (1)
	Final pork	12	1 (8.3)	<i>Sal. typhimurium</i> (1)
	Equipment	108	0	
	Environment	24	0	
	Total	180	2 (1.1)	
D	Carcass	32	2 (6.3)	<i>Sal. rissen</i> (2)
	Pork on procedure	24	0	
	Final pork	12	0	
	Equipment	100	0	
	Environment	32	1 (3.1)	unknown (1)
	Total	200	3 (1.5)	
Total	Carcass	88	2 (2.2)	<i>Sal. rissen</i> (2)
	Pork on procedure	102	1 (1.0)	<i>Sal. typhimurium</i> (1)
	Final pork	64	2 (3.1)	<i>Sal. typhimurium</i> (1), unknown (1)
	Equipment	400	9 (2.3)	<i>Sal. rissen</i> (1), <i>Sal benin</i> (1), unknown (7)
	Environment	128	2 (1.6)	<i>Sal. tsevie</i> (1), unknown (1)
	Total	782	16 (2.0)	

4. 작업전 · 중의 *Listeria* spp. 오염발생 양상

작업전과 작업중의 가공장 *Listeria* spp. 오염의 변화양상은 <Table 3-8, 3-9, 3-10>과 같다. 가공장 D는 앞에서 언급한 바와 같이 업소의 사정으로 지속적인 협조가 어려워 대상에서 제외하였고, 따라서 가공장 A, B, C 3곳을 대상으로 하였다.

가공장 A - 1차 실험에서 작업전 시료에서는 *Listeria* spp.가 검출되지 않았으며, 작업중에도 칼갈이와 바닥에서만 1건씩 검출되어 위생관리수준이 양호함을 알 수 있었다. 그러나 3개월 후 실시한 2차 실험에서는 작업전의 경우 벨트, 발골기, 바닥을 제외한 대부분의 장비 및 환경시료에서 *Listeria* spp.가 검출되었고, 작업중에도 오염이 더 증가하여 작업대, 박피기의 오염증가, 벨트 오염 등으로 오염이 확대되었음을 알 수 있었다. 그 원인으로 추정되는 사실은 1차 실험시기는 HACCP 지정 후 2개월이 경과되지 않은 시점으로 계획된 HACCP을 잘 준수하고 있어 오염이 낮았고, 2차 실험은 그 후 3개월이 경과된 시점이어서 관리자나 종업원들의 HACCP 준수의식이 조금 저하된 시점과 연관되는 것으로 해석되었다.

가공장 B - 가공장 B는 가공장 A, C와 달리 원료도체를 냉장차량으로 공급받아 작업을 하므로 도체오염의 우려가 높은 작업조건이었다. 대부분의 국내 포장육 가공장이 이러한 형태이므로 좀 더 정확한 오염실태를 파악하기 위하여 타 작업장과 달리 4차례의 실험을 실시하였고, 도체검사를 위한 시료수도 더 늘렸다. 본 가공장은 1차 실험실시 6개월 이전에 이미 HACCP 업소로 지정받은 상태이었다. 예상한 대로 원료도체의 오염이 발견되었는데, 3차의 경우만 제외하면 항상 오염이 발생되고 있었다. 또한 공정중 돈육과 최종육에서도 지속적으로 오염이 검출되었다. 작업환경의 경우 3차 실험을 제외하고는 특히 작업전의 작업대와 칼 및 칼갈이 오염이 문제점으로 지적되었다. 결론적으로, 가공장 B의 *Listeria* spp. 오염은 원료도체의 오염과 작업대, 칼 및 칼갈이에 상존하는 오염을 통해서 작업공정에 확산되는 오염의 흐름이 형성되고 있었다. HACCP 지정업소임에도 불구하고 작업전 · 중의 오염관리가 제대로 이루어지지 않았으나, 3차의 실험결과를 보면 HACCP을 준수하여 제대로 운영하면 위해미생물 오염관리가 가능할 수 있음을 보여주었다.

가공장 C - 1차 실험에서는 작업전 · 중의 오염도에 차이가 없었으나, 2차 실험에서는 이미 작업전의 작업대, 칼갈이, 발골기가 오염된 상태로 남아 있어 작업후의 세척소독이 규정대로 준수되지 않았음을 알 수 있었다. 작업이 진행되면서 오염은 작업대, 칼, 칼갈이, 운송벨트, 박피기, 바닥으로 확대되었고, 다행히 최종육에서는 오염

이 검출되지 않았으나, 오염된 장비를 통한 오염발생 가능성이 존재함을 확인할 수 있었다.

포장돈육 공정에는 살균과정이 없으므로 많은 가공장은 alcohol spray를 종업이 사용하도록 하고 있지만, 본 실험결과에 의하면 그 효과에 대해서는 신뢰할 근거를 찾기 어려웠다. 공정중의 alcohol 소독보다는 원료도체의 오염방지 그리고 작업전의 철저한 세척소독이 더 중요한 관리사항인 것으로 파악되었다.

모든 작업장에서 작업전보다 작업중 시료에서 오염이 더 높으며, 이러한 현상은 공정상의 살균처리 과정이 없는 포장돈육 가공장의 경우 당연한 결과이다. 검출된 *Listeria* 균의 대부분을 차지하는 *L. monocytogenes*와 *L. innocua* 중에서 어떠한 균이 오염과 더 관련되는지 변화를 분석한 자료는 <Table 3-11>와 같다. *L. monocytogenes*와 *L. innocua* 모두 작업전 오염이 존재하는 경우 작업중에 오염이 확대되었다. 특히 도체, 장비에서 작업전 오염이 있는 경우 공정이 진행되면서 오염이 더욱 많이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. *L. monocytogenes*와 *L. innocua*간의 오염 확대와 관련된 특징적인 차이점은 찾아볼 수 없었는데, 이는 작업공정(도체의 발골부터 포장까지)에 소요되는 시간이 약 1-2시간 이내이므로 균 증식에 의한 영향을 받기보다는, 작업공정이 진행되면서 교차오염의 영향으로 공정내 오염이 확대되기 때문인 것으로 판단된다. 이와 같이 *L. monocytogenes*와 *L. innocua*는 공정내 오염양상에서 각각의 특징적인 발생양상을 보이는 것이 아니고 (1) 원료 도체의 오염에 의한 가공장내 유입, (2) 작업환경내 상존이라는 두 가지 오염발생 과정이 복합적으로 섞여서 공존하고 있었다. *Listeria* 균은 배양과정에서 비병원성인 *L. innocua*가 *L. monocytogenes*보다 더 우세하게 성장하므로, 작업장 시설 및 장비와 환경에서의 *L. innocua* 분리율은 *L. monocytogenes*보다 더 높거나 같은 시료에서 동시에 검출되기도 한다(Aguado, 2004; Gravani, 1999; Greenwood, 1991), 따라서 가공장 위생관리는 listeriosis를 유발하는 *L. monocytogenes*에만 초점을 맞출 것이 아니라 비병원성균이지만 더 많은 오염수준을 보이는 *L. innocua*를 지표균으로 병행하여 활용하는 것이 효과적인 것으로 파악하였다.

Table 3-8. Changes of contamination level of *Listeria* spp. before and during procedure in plant A

Source	Sampling point	N	Before			After		
			1st 03/28	2nd 06/27	Total	1st 03/28	2nd 06/27	Total
Pork	Carcass	10	0	0	0	0	1	1
	Pork on processing	6	NA	NA	NA	0	3	3
	Final pork	3	NA	NA	NA	0	1	1
	sub-total	19	0	0	0	0	5	5
Environ- ment	Work table	6	0	1	1	0	6	6
	Knives, sharpner	6	0	2	2	1	1	2
	Gloves	4	0	1	1	0	1	1
	Conveyor belt	6	0	0	0	0	2	2
	Boning machine	1	0	0	0	0	0	0
	Skinning machine	3	0	1	1	0	3	3
	Wall	4	0	2	2	0	1	1
	Floor	4	0	0	0	1	0	1
	sub-total	34	0	7	7	2	14	16

HACCP certification ; 2005. 1.

Table 3-9. Changes of contamination level of *Listeria* spp. before and during procedure in plant B

Source	Sampling point	N	Before procedure					During procedure				
			1st 12/09	2nd 12/16	3rd 02/22	4th 07/06	total	1st 12/09	2nd 12/16	3rd 02/22	4th 07/06	total
Pork	Carcass	-	*3/7	1/8	0/10	0/10	4/35	4/7	3/8	0/10	10/10	17/35
	Pork on processing	-	NA	NA	NA	NA	NA	1/8	5/8	0/6	5/6	11/28
	Final pork	-	NA	NA	NA	NA	NA	0/6	4/6	1/3	2/3	7/18
	sub-total	-	3/7	1/8	0/10	0/10	4/35	5/21	12/22	1/19	17/19	35/81
Environ-ment	Work table	7	1	3	0	4	8	3	5	1	4	13/28
	Knives, sharpner	7	1	1	0	3	5	4	3	0	1	8/28
	Gloves	4	0	0	0	4	4	2	0	0	1	3/16
	Conveyor belt	2	0	0	0/1	1/1	1/6	0	0	0/1	1/1	1/6
	Boning machine	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1/3
	Skinning machine	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	3/4
	Wall	4	0	0	0	0	0	2	0	2	2	6/16
	Floor	4	1	4	0	0	5	3/5	4	0	3	10/17
sub-total	30	3	8	0/29	12/29	23/118	14/31	13/30	4/29	14/29	45/118	

* *Listeria* spp. positives / number of sample

HACCP certification ; 2004. 6.

Table 3-10. Changes of contamination level of *Listeria* spp. before and during procedure in plant C

Source	Sampling point	N	Before procedure			During procedure		
			1st	2nd	total	1st	2nd	total
			03/06/17	05/07/01		03/06/17	05/07/01	
Pork	Carcass	10	0	0	0	0	0	0
	Pork on processing	6	NA	NA	NA	0	0	0
	Final pork	3	NA	NA	NA	0	0	0
	sub-total	19	0	0	0	0	0	0
Environ-ment	Work table	7	0	4	4	0	1	1
	Knives, sharpner	6	0	2	2	0	1	1
	Gloves	8	0	0	0	0	0	0
	Conveyor belt	4	0	0	0	0	1	1
	Boning machine	1	0	1	1	0	0	0
	Skinning machine	3	0	0	0	0	1	1
	Wall	3	0	0	0	0	0	0
	Floor	3	0	0	0	1	2	3
	sub-total	34	0	7	7	1	6	7

HACCP certification : 2001 12.

Table 3-11. Incidence of *L. monocytogenes* and *L. innocua* before and during procedure in pork processing plants

Source	Sampling point	Plant	Before procedure			During procedure		
			*LM	**LI	Total	LM	LI	Total
Pork	Carcass	A	0	0	0	0	1	1
		B	2	2	4	14	3	17
		C	0	0	0	0	0	0
	Pork	A	-	-	-	0	4	4
		B	-	-	-	9	9	18
		C	-	-	-	0	0	0
Environ- -ment	Equip- -ment	A	2	3	5	4	10	14
		B	5	¹⁾ 13	18	9	²⁾ 20	29
		C	0	7	7	0	4	4
	Environ- -ment	A	1	1	2	1	1	2
		B	1	4	5	2	14	16
		C	0	0	0	1	2	3

*** LM : *Listeria monocytogenes*. LI : *Listeria innocua*.

¹⁾ Includes 2 cases (from work table) of *Listeria welshimeri*.

²⁾ Includes 1 case (from knife) of *Listeria welshimeri*.

5. HACCP 지정전·후의 *Listeria* spp. 오염수준 비교

HACCP 지정전·후의 비교실험은 가공장 A와 B를 대상으로 하였다. 가공장 A는 2005년 1월에 가공장 B는 2004년 6월에 지정 받았으며, 가공장 C는 본 연구 시작 이전인 2001년 12월에 이미 HACCP 지정을 받은 업소로 지정후의 비교에 실험자료를 활용하였고, 가공장 D는 공장 운영상의 문제로 실험대상에서 제외하였다.

지정전·후의 *Listeria* 오염의 변화는 <Table 3-12, 3-13, 3-14>과 같다. 시료채취 부위별 오염수준은 조금씩 낮아졌지만, 여전히 높은 검출율을 보이고 있다. 특히 최종육의 오염수준이 가공장 A 16.7%, 가공장 B 38.9%로 HACCP의 실효성을 의심하게 하는 결과를 보였다.

이미 앞에서 지적한 도체의 오염은 근본적인 원인이 개선되지 않아 HACCP 지정 이후에도 오염이 반복되고 있으며, 장비와 환경에서의 오염 역시 제대로 통제되지 못하고 있었다. 도체 오염의 경우 축산물종합처리장내에 위치한 가공장 A에서도 HACCP 지정 전·후 모두에서 여전히 오염이 발생되었고, 차량으로 운송되는 가공장 B의 경우는 더욱 심각한 문제로 지적되었다. 이러한 문제점은 두 가공장 모두 입고검사를 정밀히 하지 않기 때문으로 판단된다. 도체반입이 CCP로 설정되어 있지만, 모든 도축장이 HACCP 지정 작업장이므로 도체 반입시의 검사는 거의 이루어지지 않았다. 특히 앞에서 지적한 바와 같은 운송 및 취급과정에서 발생하는 오염에 대해서는 감시방법에 언급되지 않고 있다. 여기서 주요 관리사항은 냉동차량의 세척소독 상태, 운송중의 온도유지, 도체 현수상태, 바닥적재 여부, 차량에서 가공장으로 운반시 종업원의 위생적인 취급상태 등이 된다.

또 한 가지는 앞에서 지적한 바와 같이 가공장 모두 세척·소독에 관한 위생관리 수칙을 갖고 있었으나, 이를 제대로 준수하지 않아 여전히 오염된 시설 및 장비에 의한 교차오염이 발생되고 있었다. 세척·소독관리는 CCP로 설정할 필요는 없지만, 제대로 관리되지 않는다면 CCP로 설정하여 관리를 강화할 필요성도 인정된다. 이 경우는 critical limit 설정시 신속히 확인할 수 있는 방법이 모색되어야 할 것이다.

예냉실과 가공장 작업실의 온도상태는 <Table 3-15>와 같다. 축산물가공장 HACCP 적용매뉴얼에는 예냉실 온도를 $-2\sim 5^{\circ}\text{C}$ 로 설정하고 있으며, 대부분의 가공장은 대체로 온도 기준을 준수하는 편이었다. 그러나 가공장 B는 HACCP 지정 후에도 여전히 관리가 이루어지지 않았다. 작업실(가공실) 온도의 경우 control point로 15°C 이하 유지로 되어있지만, 실제로 많은 가공장에서는 잘 지켜지지 못하고 있었

는데, 그 이유로는 작업 시작직전에 냉방시설을 가동하고 있어 작업실 온도가 기준 온도가 되려면 일정시간이 경과되어야 하기 때문이었다.

HACCP 지정업소가 과연 제대로 HACCP 프로그램을 운영하려는 의지가 있느냐 여부는 매우 심각하게 검토되어야 할 사항이다. 대부분 영세한 업소에서 영업주가 HACCP 업소로 지정받는 목적은 영업상의 불이익을 당하기 않기 위한 것으로, 안전성 확보를 통한 소비자 건강보호는 형식적인 목표일 뿐이다. 따라서 지정 후 시간이 흐를수록 HACCP 운영은 제대로 관리되지 못하는 실정이다..

가공장 모두 약 6개월 경과 후 *Listeria* 검출 수준은 HACCP 지정 이전으로 돌아가고 있음이 확인되었다<Table 8-13, 8-14>. 가공장 A 경우 지정 직후에는 위생 관리가 매우 양호한 수준으로 나타나는데, 약 6개월 경과시 오염이 이전수준으로 증가하여 HACCP 준수가 미흡함을 간접적으로 확인할 수 있었다. 가공장 B는 6개월 경과시 오염수준이 높게 나타나고 있어 HACCP 운영상태가 미흡하였다. 그러나 3차 실험결과와 같이 HACCP 프로그램을 준수하면 안전한 제품생산이 가능함을 보여주고 있다.

공정상의 살균처리 과정이 없는 제품생산 공정에 대한 위해분석은 실험적으로 가공장내 오염원을 추적하고 CCP를 설정하는 것이 CCP 설정의 타당성을 평가하는 방법이 된다. 또한 이렇게 잘 계획된 HACCP 프로그램도 제대로 운영되지 않으면 HACCP 적용의 의미가 반감된다는 점도 본 실험을 통하여 확인할 수 있었다.

Table 8-12. Comparison of contamination level of *Listeria* spp. before and after certification of HACCP

Plant	Sampling point	Before HACCP		After HACCP	
		certification (%)		certification (%)	
		N	<i>Listeria</i> positive	N	<i>Listeria</i> positive
A	carcass	22	2 (9.1)	20	1 (5.0)
	pork	54	23 (42.6)	18	18 (22.2)
	equipment	144	52 (36.1)	52	14 (26.9)
	environment	40	23 (57.5)	16	2 (12.5)
B	carcass	22	10 (45.5)	35	17 (48.6)
	pork	40	20 (50.0)	46	18 (39.1)
	equipment	88	72 (81.8)	85	29 (34.1)
	environment	32	22 (68.8)	32	16 (50.0)

Table 8-13. Changes of contamination level of *Listeria* spp. before and after certification of HACCP - plant A

Source	sampling point	Before HACCP					After HACCP				
		1st	2nd	3rd	4th	sub	1st	2nd	sub		
		N	2003/ 11/06	2003/ 12/09	2004/ 06/15	2004/ 06/29	total (%)	N	2005/ 03/28	2005/ 06/27	-total (%)
Pork	carcass	-	0/5	0/5	0/6	2/6	2/22 (9.1)	10	0	1	1 (5.0)
	pork on processing final	-	1/6	0/6	3/9	6/9	10/30 (33.3)	6	0	3	3 (25.0)
	pork	-	1/6	1/6	5/6	6/6	13/24 (54.2)	3	0	1	1 (16.7)
	sub-total	-	2/17	1/17	8/21	14/21	25/76 (32.9)	19	0	5	5 (6.6)
Environment	work table	6	1	0	6	6	13 (54.2)	6	0	6	6 (50.0)
	knives/ sharpner	6	1	0	5	4	10 (41.7)	6	1	1	2 (16.7)
	gloves	4	1	0	4	3	8 (50.0)	4	0	1	1 (12.5)
	conveyor belt	6	3	0	3	6	12 (50.0)	6	0	2	2 (16.7)
	boning machine	1	0	0	0	1	1 (25.0)	1	0	0	0
	skinning machine	3	2	0	3	3	8 (66.7)	3	0	3	3 (50.0)
	wall	4	0	2	2	4	8 (50.0)	4	0	1	1 (12.5)
	floor	6	3	4	6	5	15 (62.5)	4	1	0	1 (12.5)
	sub-total	36	11	6	29	32	75 (52.1)	34	2	14	16 (23.5)

HACCP certification ; 2005. 1.

Table 8-14. Changes of contamination level of *Listeria* spp. before and after certification of HACCP - plant B

Source	sampling point	N	Before HACCP				Total (%)	After HACCP				Total (%)
			1st	2nd	3rd	4th		1st	2nd	3rd	4th	
			2003/ 11/13	2003/ 12/04	2004/ 04/16	2004/ 05/08		2004/ 12/09	2004/ 12/16	2005/ 02/22	2005/ 07/06	
Pork	carcass	-	*5/5	5/5	0/6	0/6	10/22 (45.5)	4/7	3/8	0/10	10/10	17/35 (48.6)
	pork on processing final pork	-	3/4	2/4	2/8	2/8	9/24 (37.5)	1/8	5/8	0/6	5/6	11/28 (39.3)
	sub-total	-	10/11	8/11	7/20	5/20	30/62 (48.34)	5/21	12/22	1/19	17/19	35/81 (43.2)
Environment	work table knives/sharpner	7	5	7	6	5	23 (82.1)	3	5	1	4	13/28 (46.4)
	gloves	4	4	4	1	3	12 (75.0)	2	0	0	1	3/16 (18.8)
	conveyor belt	2	2	2	2	2	8 (100.0)	0	0	0/1	1/1	1/6 (16.7)
	boning machine	1	1	1	1	0	3 (100.0)	0	0	0	1	1/3 (33.3)
	skinning machine	1	1	1	1	1	4 (100.0)	0	1	1	1	3/4 (75.0)
	wall	4	2	0	3	1	6 (37.5)	2	0	2	2	6/16 (37.5)
	floor	4	4	4	4	4	16 (100.0)	3/5	4	0	3	10/17 (58.8)
	sub-total	30	25	24	23	22	94/120 (78.3)	14/31	13/30	4/29	14/29	45/118 (38.1)

**Listeria* spp. positive / number of sample
HACCP certification ; 2004. 6.

Table 8-15. Changes of processing room temperature in pork processing plants

(1) Plant A

		1차	2차	3차	4차	5차	6차
		03/11/6	03/12/9	04/6/15	04/6/29	05/3/28	05/6/27
Pre-cooling room	before work	-	-	-	-	5	3
	during work	3	2	3	1	5	1
Processing room	before work	-	-	-	-	9	20
	during work	15	18	15	17	12	16

(2) Plant B

		1st	2nd	3rd	4th	5th	6th	7th	8th
		03/11/13	03/12/4	04/4/16	04/5/8	04/12/9	04/12/16	05/2/22	05/7/6
Pre-cooling room	before work	-	-	-	-	9	7	5	10
	during work	2	2	12	13	7	6	5	18
Processing room	before work	-	-	-	-	12	13	9	11
	during work	12	12	14	15	12	13	10	18

(3) Plant C

		1st	2nd	3rd	4th	5th
		03/3/18	03/3/25	03/5/27	03/6/17	05/7/1
Pre-cooling room	before work	-	-	-	4	9
	during work	2	3	3	3	7
Processing room	before work	-	-	-	18	20
	during work	14	14	16	17	13

(4) Plant D

		1st	2nd	3rd	4th
		03/3/11	03/4/9	03/5/13	03/6/10
Pre-cooling room	before work	-	-	-	-
	during work	2	3	3	6

Processing	before work	-	-	-	-
room	during work	9	14	17	20

제 4절 포장돈육 가공장의 오염원 추적

1. *L. monocytogenes*의 RAPD typing

포장돈육 가공장에서 분리된 총 115개의 *L. monocytogenes* strain을 primer DG 122와 DG 107을 사용하여 분석한 결과 35종의 RAPD composition type이 관찰되었다<Table 3-16>. 가장 많이 분리되는 composite type은 Lm25로 50개의 분리주가 속했으며 모든 시료에서 검출되었다. 다음은 Lm3 6개, Lm1 5개, Lm2, Lm14 4개 순이었고 나머지는 1~3개의 분리주가 속하여 4개 가공장을 종합하여 볼 때는 특징적인 오염양상을 파악하기 어려웠다.

가공장별 RAPD type의 분포는 <Table 3-17, 3-18, 3-19, 3-20>와 같다. Composite type Lm25는 가공장 A와 B, Lm4는 가공장 B와 D, Lm16은 가공장 B와 C에서 공통적으로 존재하는 분리주이지만, 3개 가공장 이상에서 공통적으로 존재하는 type은 없었다. 각 가공장별 사용하는 원료도체의 생산 도축장이 서로 다르고, 작업장간 서로 1시간 이상의 거리로 교류가 거의 없었기 때문인 것으로 판단되었다. 그러나 한 가지 특징적인 사항은 가공장 B는 가공장 A가 속하는 축산물종합처리장의 도축장으로부터 가끔씩 원료 도체를 공급받고 있었으며, 그로 인하여 동일한 composite type Lm25가 가공장 A는 42건, 가공장 B는 8건으로 가장 많이 분류되는 것으로 해석되었다.

가공장 A는 55건의 *L. monocytogenes* 분리주에서 10종의 composite type이 관찰되었다. Composite type Lm25에는 가장 많은 42개의 분리주가 속하여 주 오염균이었고, 모든 시료에서 검출되는바 오염된 원료도체의 유입으로 공정과정에서 오염이 확산된 것으로 추정되었다. 나머지 type에는 각각 1~2개씩의 분리주가 속하였고 1건을 제외하고는 장비와 환경에서 발견되므로 이미 다양한 경로로 가공장내에 유입되어 상존하는 균으로 해석되었다.

가공장 B는 24건의 *L. monocytogenes* strain에서 12종의 RAPD composition이 관찰되었다. Lm25에는 8개의 분리주가 속했으며, 나머지 type은 모두 3개 이하의 분리주가 관찰되었다. Lm25는 장비 및 환경내에서만 검출되어 가공장내 상존하는 주요 균주로 추정되었다. 여러 가공장에서 공통적으로 검출되고 분리력이 높은 균들은 돈육이나 가공장에서의 적응력이 다른 균주에 비해서 높고 증식과 생존력이 좋은 균

주(Vogel, 2001)이므로, Lm25의 경우 국내 여러 포장돈육 가공장이나 식육에서 공통적으로 상재하는 균일 가능성이 높다고 판단되었다.

가공장 C는 2건의 분리주만 검출되어 타 작업장에 비하여 전반적인 위생관리 수준이 양호하였다. 이는 타 작업장보다 일찍 HACCP을 도입한 효과로 해석할 수 있었다. 가공장 D는 34건의 *Listeria* 분리주에서 14종의 composite type이 관찰되었고, Lm3 6건, Lm1 5건, Lm2, Lm14 각각 4건, 나머지는 3건 이하의 분리주가 속하였다. 가공장내에서 분리된 균주에서 다양한 type이 관찰된다는 점은 현재에도 다양한 오염원에 의해서 오염이 유입되거나 혹은 가공장내에 유입된 오염균이 제거되지 못하여 상존하면서 오염이 누적된 결과로 해석된다.

가공장내에 상존하는 오염균 제거는 위생관리기준에 따른 세척·소독의 철저한 준수와 장비의 위생적인 관리 및 사용으로 오염을 대폭 낮출 수 있다고 판단된다. 국내 가공장의 현실적인 문제는 가공장에 유입되는 원료도체의 오염이라고 할 수 있다. 이미 국내 도축장은 HACCP을 적용하고 있으므로 대부분의 오염은 도축장 반출 이후 가공장에 운반되는 과정에서의 발생되는데, 비위생적인 도체 취급은 현장에서 쉽게 확인할 수 있다. 대부분의 기공장이 축산물종합처리장 밖에 별도의 건물에 위치하므로, 운송과정에 작업장과 냉동차량간 현수장치의 높이나 위치 등이 맞지 않아 도체 취급시 오염발생이 많기 때문이다. 운송과정의 위생적인 관리대책이 마련되어야 할 것이다.

Table 3-16. Distribution of *L. monocytogenes* RAPD genotype isolated from pork processing plants

Primer		Composite type	Sero-type	Sampling point					
DG107	DG122			Carcass	Pork on processing	Final pork	Equip-ment	Environ-ment	
1	1	Lm1	*(5)	1	1	-	-	4	-
2	1	Lm2	(4)	1	2	1	-	-	1
3	2	Lm3	(6)	1	-	2	-	2	2
4	2	Lm4	(3)	1	1	-	-	2	-
5	3	Lm5	(1)	1	-	-	-	1	-
3	4	Lm6	(2)	1	-	-	-	-	2
3	5	Lm7	(1)	1	-	-	-	-	1
6	6	Lm8	(1)	1	-	1	-	-	-
3	7	Lm9	(2)	1	-	-	1	1	-
3	8	Lm10	(1)	1	-	-	1	-	-
3	9	Lm11	(1)	1	-	-	-	1	-
7	10	Lm12	(1)	4	-	-	-	1	-
8	11	Lm13	(3)	1	-	-	-	3	-
9	12	Lm14	(4)	1	-	-	-	2	2
10	13	Lm15	(1)	1	-	1	-	-	-
7	14	Lm16	(2)	1	1	-	-	-	1
4	5	Lm17	(1)	1	-	-	-	1	-
10	7	Lm18	(2)	1	-	-	-	2	-
10	15	Lm19	(2)	1	-	-	-	1	1
10	8	Lm20	(1)	1	-	-	-	-	1
10	11	Lm21	(1)	1	-	-	-	-	1
10	2	Lm22	(1)	1	1	-	-	-	-
10	5	Lm23	(1)	1	-	-	-	1	-
10	16	Lm24	(3)	1	1	-	-	-	2
2	17	Lm25	(50)	1	2	4	7	27	10
11	17	Lm26	(2)	1	-	-	1	1	-
12	18	Lm27	(3)	4	-	-	2	1	-
12	19	Lm28	(1)	4	-	-	1	-	-
13	19	Lm29	(1)	4	-	-	-	1	-
2	20	Lm30	(1)	1	-	-	-	-	1
14	21	Lm31	(1)	1	-	-	-	1	-
2	22	Lm32	(2)	1	-	-	-	2	-
11	22	Lm33	(2)	1	-	-	-	1	1
2	23	Lm34	(1)	1	-	-	1	-	-
2	24	Lm35	(1)	1	-	-	-	1	-

* (): Number of isolates.

Table 3-17. Contamination patterns of *L. monocytogenes* RAPD genotype - plant A

Plant	No. of isolates	Primer		Composite type	Sero-type	Sampling point				
		DG107	DG122			Carcass	Pork on processing	Final pork	Equip-ment	Environ-ment
A	55	4	5	Lm17 *(1)	1	-	-	-	1	-
		10	7	Lm18 (2)	1	-	-	-	2	-
		10	15	Lm19 (2)	1	-	-	-	1	1
		10	8	Lm20 (1)	1	-	-	-	-	1
		10	11	Lm21 (1)	1	-	-	-	-	1
		2	17	Lm25 (42)	1	2	4	7	25	4
		2	22	Lm32 (2)	1	-	-	-	2	-
		11	22	Lm33 (2)	1	-	-	-	1	1
		2	23	Lm34 (1)	1	-	-	1	-	-
2	24	Lm35 (1)	1	-	-	-	1	-		

*(): Number of isolates.

Table 3-18. Contamination patterns of *L. monocytogenes* RAPD genotype - plant B

Plant	No. of isolates	Primer		Composite type	Sero-type	Sampling point					
		DG107	DG122			Carcass	Pork on processing	Final pork	Equip-ment	Environ-ment	
B	24	4	2	Lm4	*(1)	1	1	-	-	-	-
		7	14	Lm16	(1)	1	1	-	-	-	-
		10	2	Lm22	(1)	1	1	-	-	-	-
		10	5	Lm23	(1)	1	-	-	-	1	-
		10	16	Lm24	(3)	1	1	-	-	-	2
		2	17	Lm25	(8)	1	-	-	-	2	6
		11	17	Lm26	(2)	1	-	-	1	1	-
		12	18	Lm27	(3)	4	-	-	2	1	-
		12	19	Lm28	(1)	4	-	-	1	-	-
		13	19	Lm29	(1)	4	-	-	-	1	-
		2	20	Lm30	(1)	1	-	-	-	-	1
		14	21	Lm31	(1)	1	-	-	-	1	-

*(): Number of isolates.

Table 3-19. Contamination patterns of *L. monocytogenes* RAPD genotype - plant C

Plant	No. of isolates	Primer		Composite type	Sero-type	Sampling point				
		DG107	DG122			Carcass	Pork on processing	Final pork	Equip-ment	Environ-ment
C	2	10	13	Lm15 *(1)	1	-	1	-	-	-
		7	14	Lm16 (1)	1	-	-	-	-	1

*(): Number of isolates.

Table 3-20. Contamination patterns of *L. monocytogenes* RAPD genotype - plant D

Plant	No. of isolates	Primer		Composite type	Sero-type	Sampling point				
		DG107	DG122			Carcass	Pork on processing	Final pork	Equip-ment	Environ-ment
D	34	1	1	Lm1 *(5)	1	1	-	-	4	-
		2	1	Lm2 (4)	1	2	1	-	-	1
		3	2	Lm3 (6)	1	-	2	-	2	2
		4	2	Lm4 (2)	1	-	-	-	2	-
		5	3	Lm5 (1)	1	-	-	-	1	-
		3	4	Lm6 (2)	1	-	-	-	-	2
		3	5	Lm7 (1)	1	-	-	-	-	1
		6	6	Lm8 (1)	1	-	1	-	-	-
		3	7	Lm9 (2)	1	-	-	1	1	-
		3	8	Lm10 (1)	1	-	-	1	-	-
		3	9	Lm11 (1)	1	-	-	-	1	-
		7	10	Lm12 (1)	4	-	-	-	1	-
		8	11	Lm13 (3)	1	-	-	-	3	-
		9	12	Lm14 (4)	1	-	-	-	2	2

*(): Number of isolates.

2. *Listeria innocua*의 RAPD typing

분리주 *L. innocua*는 전체 210건이었고, *L. monocytogenes*와 마찬가지로 primer DG 122와 DG 107을 사용하여 분석한 결과 55종의 RAPD composition type이 관찰되었고, 이는 *L. monocytogenes*의 composite type보다 더 다양한 구성을 보였다 <Table 3-21>. 가장 두드러진 composite type은 Li65로 77개의 분리주가 속했으며, 그 다음이 Li84 16개, Li40 7개, Li64, Li79 6개, Li46, Li52, Li72 5개 순이었다. Li65는 장비와 환경에서 가장 많이 검출되었고, Li84는 벽 및 바닥과 같은 작업환경에서 주로 검출되었다.

작업장간에 공통적으로 분리되는 composite type은 <Table 3-22, 3-23, 3-24, 3-25>와 같다. 가공장 A와 B는 Li46, Li65, Li82, Li90의 4종에서 일치하고 있으나, 공통적으로 검출빈도가 높은 균주는 없었다. Li84는 가공장 A, Li65는 가공장 B의 주요 오염균주이었다. 가공장간의 1~3주의 공통균주는 발견되었으나, 검출빈도가 낮아 공통적으로 상존하는 균주라고 단정할 수는 없었다.

가공장 A의 경우 43건의 *L. innocua* 분리주에서 11종의 type이 분류되었고, Li84에 가장 많은 16개의 분리주가 속하였는데, 도체에서 *L. innocua*가 검출되지 않는 것으로 보아 작업환경에 상존하는 균주로 추정되었다. 가공장 B는 100건의 분리주에서 17종의 composite type이 확인되었고, Li65에 가장 많은 75건의 분리주가 속하였다. Li65는 도체 및 작업환경내 모든 시료에서 검출되는 것으로 보아, 가공장 B의 주요 오염균임을 알 수 있었다. 나머지 다양한 type은 오염원의 다양성을 보여주고 있다.

가공장 C는 13건 4종의 type이 검출되어 *L. monocytogenes*의 2건 검출에 비하면 상대적으로 오염수준을 잘 나타내고 있으나, 오염 특징을 파악할만한 수준을 아니었다. 축산물종합처리장내에 위치하는 가공장임에 불구하고 *L. monocytogenes*에서 파악되지 않았던 도체의 오염이 발견되므로, 도축장 도체 및 도축 후 현수장치로 운송하는 과정에 대한 원인규명이 필요하였다.

가공장 D는 54건의 분리균주에서 29종의 매우 다양한 composite type이 확인되었다. 이는 *L. monocytogenes*의 경우와도 동일한 현상으로 다양한 오염원과 관련되고 있다. 다른 가공장과는 달리 원료도체 오염 *L. innocua*의 composite type에서 서로 다른 4가지가 관찰되는데, 이것은 도체를 공급하는 도축장과 운송과정에서의 오염과 관련된 것으로 판단되었다.

Table 3-21. Distribution of *L. innocua* RAPD genotype isolated from pork processing plants

Primer		Composite type	Sampling point				
DG107	DG122		Carcass	Pork on processing	Funeral pork	Equipment	Environment
15	25	Li36 *(1)	1	-	-	-	-
19	25	Li37 (1)	-	-	-	1	-
15	26	Li38 (4)	-	-	-	2	2
16	26	Li39 (3)	1	-	-	1	1
18	26	Li40 (7)	1	1	2	3	-
19	26	Li41 (1)	-	-	-	1	-
20	26	Li42 (1)	-	1	-	-	-
21	26	Li43 (1)	-	-	-	1	-
27	26	Li44 (1)	-	-	-	-	1
28	26	Li45 (1)	-	-	1	-	-
30	26	Li46 (5)	-	-	2	3	-
16	27	Li48 (2)	-	-	-	2	-
20	27	Li49 (1)	-	1	-	-	-
37	27	Li50 (1)	-	-	-	1	-
38	27	Li51 (1)	-	-	-	1	-
39	27	Li52 (5)	-	1	1	3	-
15	28	Li53 (1)	-	-	-	1	-
17	28	Li54 (1)	-	-	-	1	-
15	29	Li55 (1)	-	-	-	-	1
18	30	Li56 (2)	-	1	-	-	1
19	30	Li57 (3)	1	1	-	1	-
20	30	Li58 (2)	-	-	-	1	1
23	30	Li59 (1)	-	1	-	-	-
24	30	Li60 (1)	-	-	-	1	-
25	30	Li61 (1)	-	-	-	-	1
26	30	Li62 (2)	-	-	-	1	1
27	30	Li63 (1)	-	-	-	1	-
28	30	Li64 (6)	1	1	-	3	1
30	30	Li65 (77)	6	7	6	50	8
33	30	Li66 (3)	-	-	-	2	1
37	30	Li67 (1)	-	-	-	-	1
39	30	Li68 (2)	-	1	-	-	1
18	31	Li69 (1)	-	-	-	1	-
20	31	Li70 (1)	-	1	-	-	-
21	31	Li71 (2)	-	-	-	2	-
29	31	Li72 (5)	-	-	1	3	1
15	32	Li73 (1)	-	1	-	-	-
18	32	Li74 (7)	-	2	-	5	-
19	32	Li75 (1)	-	-	-	1	-
21	32	Li76 (2)	-	-	-	1	1
22	32	Li77 (1)	-	-	-	-	1
28	32	Li78 (2)	-	1	-	1	-
30	32	Li79 (6)	-	-	-	3	3
17	33	Li80 (3)	-	-	1	2	-
25	34	Li81 (2)	-	-	-	-	2
30	35	Li82 (3)	-	-	1	1	1
31	35	Li83 (1)	-	1	-	-	-
39	35	Li84 (16)	-	1	2	5	8
30	36	Li85 (3)	-	1	-	2	-
30	37	Li86 (1)	-	-	-	1	-
32	38	Li87 (1)	-	-	-	1	-
34	39	Li88 (2)	-	-	-	2	-
35	39	Li89 (2)	-	-	-	2	-
30	40	Li90 (3)	-	-	-	2	1
39	40	Li91 (3)	-	-	-	2	1

*(): Number of isolates.

Table 3-22. Contamination patterns of *L. innocua* RAPD genotype - plant A

Plant	No. of isolates	Primer		Composite type	Sero-type	Sampling point				
		DG107	DG122			Carcass	Pork on processing	Final pork	Equip-ment	Environ-ment
A	43	16	26	Li39 *(1)	-	-	-	-	-	1
		30	26	Li46 (3)	-	-	2	1	-	-
		39	27	Li52 (5)	-	1	1	3	-	-
		30	30	Li65 (2)	-	-	-	-	-	2
		39	30	Li68 (2)	-	1	-	-	-	1
		28	32	Li78 (1)	-	1	-	-	-	-
		30	32	Li79 (6)	-	-	-	3	-	3
		30	35	Li82 (2)	-	-	-	1	-	1
		39	35	Li84 (16)	-	1	2	5	-	8
		30	40	Li90 (2)	-	-	-	2	-	-
		39	40	Li91 (3)	-	-	-	2	1	

*() ; number of isolates.

Table 3-23. Contamination patterns of *L. innocua* RAPD genotype - plant B

Plant	No. of isolates	Primer		Composite type	Sero-type	Sampling point				
		DG107	DG122			Carcass	Pork on processing	Final pork	Equip-ment	Environ-ment
B	100	30	26	Li46 *(2)	-	-	-	2	-	
		37	27	Li50 (1)	-	-	-	1	-	
		38	27	Li51 (1)	-	-	-	1	-	
		20	30	Li58 (2)	-	-	-	1	1	
		25	30	Li61 (1)	-	-	-	-	1	
		30	30	Li65 (75)	6	7	6	50	6	
		33	30	Li66 (3)	-	-	-	2	1	
		37	30	Li67 (1)	-	-	-	-	1	
		25	34	Li81 (2)	-	-	-	-	2	
		30	35	Li82 (1)	-	-	1	-	-	
		31	35	Li83 (1)	-	1	-	-	-	
		30	36	Li85 (3)	-	1	-	2	-	
		30	37	Li86 (1)	-	-	-	1	-	
		32	38	Li87 (1)	-	-	-	1	-	
		34	39	Li88 (2)	-	-	-	2	-	
		35	39	Li89 (2)	-	-	-	2	-	
		30	40	Li90 (1)	-	-	-	-	1	

*() ; number of isolates.

Table 3-24. Contamination patterns of *L. innocua* RAPD genotype - plant C

Plant	No. of isolates	Primer		Composite type	Sero-type	Sampling point				
		DG107	DG122			Carcass	Pork on processing	Final pork	Equip-ment	Environ-ment
C	13	28	26	Li45 *(1)	-	-	1	-	-	
		28	30	Li64 (6)	1	1	-	3	1	
		29	31	Li72 (5)	-	-	1	3	1	
		28	32	Li78 (1)	-	-	-	1	-	

*() ; number of isolates.

Table 3-25. Contamination patterns of *L. innocua* RAPD genotype - plant D

Plant	No. of isolates	Primer		Composite type	Sero-type	Sampling point				
		DG107	DG122			Carcass	Pork on processing	Final pork	Equip-ment	Environ-ment
D	54	15	25	Li36 *(1)	1	-	-	-	-	-
		19	25	Li37 (1)	-	-	-	-	1	-
		15	26	Li38 (4)	-	-	-	-	2	2
		16	26	Li39 (2)	1	-	-	-	1	-
		18	26	Li40 (7)	1	1	2	3	-	-
		19	26	Li41 (1)	-	-	-	-	1	-
		20	26	Li42 (1)	-	1	-	-	-	-
		21	26	Li43 (1)	-	-	-	-	1	-
		27	26	Li44 (1)	-	-	-	-	-	1
		16	27	Li48 (2)	-	-	-	-	2	-
		20	27	Li49 (1)	-	1	-	-	-	-
		15	28	Li53 (1)	-	-	-	-	1	-
		17	28	Li54 (1)	-	-	-	-	1	-
		15	29	Li55 (1)	-	-	-	-	-	1
		18	30	Li56 (2)	-	1	-	-	-	1
		19	30	Li57 (3)	1	1	-	-	1	-
		23	30	Li59 (1)	-	1	-	-	-	-
		24	30	Li60 (1)	-	-	-	-	1	-
		26	30	Li62 (2)	-	-	-	-	1	1
		27	30	Li63 (1)	-	-	-	-	1	-
		18	31	Li69 (1)	-	-	-	-	1	-
		20	31	Li70 (1)	-	1	-	-	-	-
		21	31	Li71 (2)	-	-	-	-	2	-
		15	32	Li73 (1)	-	1	-	-	-	-
		18	32	Li74 (7)	-	2	-	-	5	-
		19	32	Li75 (1)	-	-	-	-	1	-
		21	32	Li76 (2)	-	-	-	-	1	1
		22	32	Li77 (1)	-	-	-	-	-	1
		17	33	Li80 (3)	-	-	-	-	1	2

*(): number of isolates.

3. RAPD typing 결과를 이용한 가공장내 오염원 추적

포장돈육 4개 작업장별 각 4차례의 시료채취를 각각 구분하여 RAPD composite type의 분포를 작성하고 오염의 흐름을 분석한 결과는 <Table 3-26, 3-27, 3-28, 3-29>와 같다.

가공장 A - 3차 및 4차 시료에서 검출된 *L. monocytogenes* 분리균주의 composite type Lm25는 공정상의 오염 흐름을 잘 보여주고 있다. 제 4차 시료의 경우 오염된 원료 도체로부터 Lm25이 가공장내로 유입되고, 공정 흐름에 따라서 시설 및 장비에 의해서 교차오염이 발생하고 가공중 돈육뿐 아니라 최종 포장육에까지 오염이 이르고 있다. 제 3차 시료에서는 도체에서 Lm25가 검출되지 않았으나, 장비 및 포장돈육에서 검출되고 있어 장비를 오염시키는 균들은 가공장내 상존하는 균으로 추정되거나 아니면 도체에 오염되어 유입되었으나 5~6건의 원료도체 시료에서 포착되지 못한 경우로 해석될 수 있다. 1차 및 2차의 오염특징은 뚜렷하지 않았으나, *L. innocua* composite type을 활용하면 type Li46, Li79는 가공장내에 상존하는 오염균으로 해석되었다. 또한 *L. innocua* 경우도 1, 2차와 3, 4차 분리균의 composite type에 차이가 발견되는데, 그 이유로는 1, 2차 시료채취 시점에는 작업장 운영이 정상적으로 이루어졌으나, 그 후 경영권 문제로 인하여 영업주가 바뀌는 과정에 위생관리가 제대로 이루어지지 못한 것으로 알려졌으며, 그 영향으로 3, 4차의 시료에서 많은 균이 검출되었고, 또한 이전과 다른 특징을 갖는 분리균으로 나타나고 있었다. 3, 4차의 경우 *L. monocytogenes*에서 처럼 composite type의 오염 흐름이 잘 나타나는데, Li84의 경우 비록 도체에서는 검출되지 않지만 장비와 환경에서 공통적으로 오염이 나타나 가공장 상재균임을 알려주고 있으며, Li52 역시 2차례의 시료에서 장비에 오염원으로 존재하고 있음을 알 수 있었다.

가공장 B - *L. monocytogenes* 경우 1, 2차 실험에서는 특징적인 면이 나타나지 않았고, 3, 4차 실험에서 Lm25가 장비 및 환경에 상존하는 오염균으로 추정되었다. 그러나 *L. innocua* 오염의 경우 1~4차에 걸린 실험에서 고르게 검출되었으며, 오염원 추적에는 *L. monocytogenes* 보다 더 유용한 결과를 얻을 수 있었다. 1, 2차에서 *L. monocytogenes*에서 파악되지 않았던 오염경로가 명확히 나타나고 있는데, Li65는 도체 오염부터 가공장내 장비, 환경과 공정중 부분육 모두에서 확인되고 있다. 3, 4차 실험에서 Li65는 도체에서 검출되지 않았지만, 장비, 환경, 가공중 돈육에서 검출되고 있어 이미 작업장내에 상존하는 균임이 확인되었다. 즉, 오염된 도체에서 Li65

가 유입되었고 세척 및 소독의 미흡으로 가공장내에 상존하면서 장비 및 환경을 오염시키고 이로 인한 교차오염으로 가공중 돈육을 오염시키고 있음을 확인할 수 있었다.

가공장 C - 이 가공장은 HACCP 지정업소로 이미 SSOP를 수행하고 있어 위생 관리가 잘 이루어지고 있었다. 따라서 오염원 추적을 해야 할 가공장은 아니지만, 1차 실험에서 검출된 *L. innocua* Li64는 오염상황을 잘 보여주고 있다. 도체오염으로 인하여 가공장내에 유입되어 장비와 환경, 교차오염에 의한 가공중 돈육을 오염시키고 있음이 확인되었다. 2-4차에서는 검출되지 않아 세척·소독에 의한 관리가 이루어지고 있음을 알 수 있지만, 3차 실험의 바닥에서 검출되어 제거가 쉽지 않음을 알려주고 있다.

가공장 D - 이 가공장은 가공장 B와 같이 오염균이 가장 많이 검출되는 작업장으로 위생관리가 부실하였다. 또한 RAPD composite type이 가장 다양하게 분류되어 오염이 여러 경로로 발생하는 것으로 해석되었다. *L. monocytogenes* 경우 1차에서 Lm1, Lm2가 도체부터에서 전 가공장을 오염시키고 있었고, 2차에서는 Lm3이, 3차에서는 다양한 type이 작업환경에 존재하고 있는 것으로 확인되었다. *L. innocua*는 오염은 1차는 Li38, 2차는 Li40가 주 오염균이 었으나, 3-4차는 Li57, Li74 등이 주 오염원인 것 같으나 오염의 흐름을 파악할 수 없을 정도로 다양한 오염원이 존재하였다.

*Listeria*는 배양과정에서 비병원성인 *L. innocua*가 *L. monocytogenes*보다 더 우세하게 성장하므로, 작업장 시설 및 장비와 환경에서의 *L. innocua* 분리율은 *L. monocytogenes*보다 더 높거나 같은 시료에서 동시에 검출되기도 한다(Aguado, 2004; Gravani, 1999; Greenwood, 1991). 따라서 *L. innocua*는 비병원성균이지만 포장돈육 가공장내 *Listeria* 오염원 추적에 매우 유용한 지표균임을 확인할 수 있었다.

이상의 결과를 종합해 보면 최종 포장돈육의 오염발생은 두 가지 경로로 정리된다. 첫 번째는 오염된 원료도체의 유입이 오염원이며, 두 번째는 작업환경에 상존하는 오염균이 오염원으로 작용하여 작업과정에 교차오염 발생으로 최종육을 오염시키는 것이다. 또한 오염원 분석을 위해서는 *L. monocytogenes*만으로는 미흡하였고 *L. innocua*를 지표균으로 병행하여 활용하는 것이 더 좋은 결과를 얻을 수 있었다.

Table 3-26. Distribution of RAPD composite type of *L. monocytogenes* and *L. innocua* isolated from plant A

Source	Sampling point	<i>L. monocytogenes</i>				<i>L. innocua</i>			
		1st	2nd	3rd	4th	1st	2nd	3rd	4th
Carcass		-	-	-	Lm25(2)	-	-	-	-
Pork on processing	boned	-	-	-	Lm25(4)	-	-	Li68, Li84	Li84
	cut meat	-	-	-	-	Li78	-	-	Li52
Final pork		-	-	Lm25(4)	Lm25(3), Lm34	Li46	Li46	Li84	Li52, Li84
Equip-ment	boning machine	-	-	-	Lm25	-	-	-	-
	skinning machine	Lm18, Lm19	-	Lm25	Lm25(3)	-	-	Li52, Li84	-
	working table	Lm17	-	Lm25(3), Lm33	Lm25(3), Lm35	-	-	Li84, Li91	Li84, Li91
	conveyor belt	Lm18	-	Lm25	Lm25(4)	Li79(2)	-	Li82, Li84	Li52, Li90
	knives	-	-	Lm25	Lm25(2)	-	-	-	-
	sharpner	-	-	Lm25(3)	Lm25	Li46	-	-	Li90
	golves	-	-	Lm25, Lm32	Lm25, Lm32	Li79	-	Li52, Li84	-
Environ-ment	wall	-	-	-	Lm25	-	Li65, Li79	Li84	Li68, Li82, Li84
	floor	Lm20	Lm19, Lm21	Lm33	Lm25(3)	Li39, Li79	Li65, Li79	Li84(4), Li91	Li84(2)

() ; number of isolates.

Table 3-27. Distribution of RAPD composite type of *L. monocytogenes* and *L. innocua* isolated from plant B

Source	Sampling point	<i>L. monocytogenes</i>				<i>L. innocua</i>			
		1st	2nd	3rd	4th	1st	2nd	3rd	4th
Carcass		Lm4,Lm16, Lm22	Lm24	-	-	Li65(2)	Li65(4)	-	-
Pork on processing	boned	-	-	-	-	Li65	Li65	Li83	-
	cut meat	-	-	-	-	Li65(2)	Li65	Li85	Li65(2)
Final pork		-	-	Lm26,Lm27(2), Lm28	-	Li65(2)	Li65	Li82	Li65(3)
Equip- ment	boning machine	-	-	-	-	Li65	Li65	Li65	-
	skinning machine	-	-	-	-	Li65	Li65	Li66	Li65
	working table	-	-	Lm25,Lm27	-	Li46(2), Li65(3)	Li65(7)	Li85(2),Li86, Li87	Li50,Li65(3), Li88
	conveyor belt	-	-	-	-	Li65(2)	Li65(2)	Li65(2)	Li65(2)
	knives	-	-	Lm29	Lm26,Lm31	Li65(3)	Li65(2)	Li65,Li66	Li65
	sharpner	Lm23	-	-	-	Li65(2)	Li65(3)	Li88,Li89	Li51Li65(2)
	golves	-	-	-	Lm25	Li65(4)	Li65(3),Li58	Li89	Li65(2)
Environ- ment	wall	Lm24	-	Lm25,Lm30	Lm25	Li65	-	Li66	-
	floor	-	Lm24	Lm25(3)	Lm25	Li61,Li65, Li81(2)	Li65(2), Li58	Li67	Li65(2), Li90

() ; number of isolates.

Table 3-28. Distribution of RAPD composite type of *L. monocytogenes* and *L. innocua* isolated from plant C

Source	Sampling point	<i>L. monocytogenes</i>				<i>L. innocua</i>			
		1st	2nd	3rd	4th	1st	2nd	3rd	4th
Carcass		-	-	-	-	Li64	-	-	-
Pork on processing	boned	-	-	-	-	Li64	-	-	-
	cut meat	Lm15	-	-	-	-	-	-	-
Final pork		-	-	-	-	Li45, Li72	-	-	-
Equip- ment	boning machine	-	-	-	-	-	-	-	-
	skinning machine	-	-	-	-	Li64, Li72	-	-	-
	working table	-	-	-	-	Li64, Li78	-	-	-
	conveyor belt	-	-	-	-	-	-	-	-
	knives	-	-	-	-	Li72(2)	-	-	-
	sharpner	-	-	-	-	Li64	-	-	-
	golves	-	-	-	-	-	-	-	-
			-	-	-	-	-	-	-
Environ- ment	wall	-	-	-	-	Li72	-	-	-
	floor	-	-	-	Lm16	Li64	-	Li64	-

() ; number of isolates.

Table 3-29. Distribution of RAPD composite type of *L. monocytogenes* and *L. innocua* isolated from plant D

Source	Sampling point	<i>L. monocytogenes</i>				<i>L. innocua</i>			
		1st	2nd	3rd	4th	1st	2nd	3rd	4th
Carcass		Lm1, Lm2(2)	-	-	-	Li36, Li39	Li40	Li57	-
Pork on processing	boned	-	-	Lm8	-	-	Li40, Li56	Li49, Li57	Li74
	cut meat	Lm2	Lm3	Lm3	-	-	-	Li42, Li70	Li59, Li73, Li74
Final pork		-	-	Lm9, Lm10	-	-	-	-	Li40(2), Li80
Equip- ment	boning machine	-	-	Lm13	-	-	-	-	-
	skinning machine	-	-	Lm14	-	Li38	-	Li74	-
	working table	-	-	-	-	Li48(2)	-	Li40, Li57, Li74(2)	Li60, Li71, , Li80(2)
	conveyor belt	Lm1	Lm3	Lm4, Lm9, Lm13(2)	Lm14	Li38, Li39	Li40	Li43, Li74	Li41, Li69
	knives	Lm1(2)	Lm4	-	-	-	-	Li75	Li71
	sharpner	Lm1	Lm5	Lm3	-	-	Li40	-	Li62
	golves	-	-	Lm12	-	Li53, Li54	Li37	Li74, Li76	Li63
Environ- ment	wall	Lm2	Lm3, Lm6	-	-	Li38	-	-	-
	floor	-	Lm3, Lm6, Lm7	Lm14(2)	-	Li38, Li55 Li56	-	Li76, Li77	Li44, Li62

() ; number of isolates.

제4장 Exposure assessment와 오염발생 예측 모델 개발

작업장에서의 미생물오염관리는 지표세균을 중심으로 수행되어 왔다. 특정 위해미생물을 대상으로 하는 정량적 분석에는 인적, 물적, 시간적 제한성으로 어려움이 많았기 때문이다. 그러나 PCR, Immunoassay 등 분석기술의 발달로 직접적인 위해미생물 측정이 가능해지면서 정량적 위험평가에 기초하는 위생관리의 필요성이 강조되고 있다.

Exposure assessment는 MRA의 두 번째 단계로 hazard identification의 자료에 기초하여 특정 위해미생물에 대한 위험(risk)을 양적으로 평가하는 과정인데, 단위 작업장에 적용하면 최종 출하제품에 대한 위험을 정량적으로 예측 평가하는데 이용될 수 있다. 이를 위해서는 작업공정에 존재하는 위해미생물의 특성, 원부재료의 특성, 작업환경조건에 잠재된 각종 변수들의 영향력을 분석하고 영향인자(Controlling Factor)를 설정하여 predictive microbiology 방법을 이용하면 실시간 위생관리가 가능해 진다(Notermans, 1997; David, 1998; Peggy, 1997). 여기에는 위해미생물의 성장과 소멸 등의 변이성(variability)과 자료 출처의 다양성, 검사방법의 민감도와 특이도 등 다양한 변수의 불확실성(uncertainty)이 고려되어야 하는데(Serra, 1999), 다행히도 여러 변수간의 복잡한 관계는 Monte Carlo Simulation과 같은 확률적 분석기술을 이용하고 @RISK 등의 software 프로그램을 이용하면 분석이 가능하다(Jordan, 1999; McNab 1997).

본 연구는 포장돈육 가공장에서 *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*를 위해미생물로 선정하여, 공정조건에 따라서 위해미생물 오염을 실시간으로 예측하는 오염발생 예측시스템을 개발하였다.

제1절 Frame-work 모델 작성

1. 입력변수 선정

입력변수는 작업공정에 대한 controlling factor(CF)로서 최종생산물의 *Salmonella, L. monocytogenes*의 오염수준에 영향을 미칠 수 있는 인자 중에서 선정되었다. 연구초기에 예상되었던 인자로는 1차요인(온도, 시간, pH, Aw 등)과 2차요인(초기균수, 소독제 사용농도, 작업환경(바닥, 벽, 배수구, 벨트 등), 작업도구(작업대/도마, 칼, 절단기, 칼갈이, 박피기 등), 종업원 손(장갑) 등이었다. 하지만 현장에서의 작업조건 및 발생수준에 대한 모니터링 분석 결과 작업장의 온도와 작업시간이 포장돈육 공정 중에서 변이가 가장 크고 최종제품에 대한 *Salmonella, L. monocytogenes* 등 병원성미생물의 오염에 중요한 영향인자로 나타났다. 또한 전이율 및 성장예측모델 개발과 관련하여 작업실 온도와 작업시간을 최종적인 CF로 선정하였다.

2. Frame-work 모델 구성

포장돈육 공정에서의 *Salmonella, L. monocytogenes* 오염수준 추정을 위한 frame-work model 구성은 <Fig. 4-1>과 같다. 본 모델은 도축 후 냉장된 돈육의 입고에서부터 유통되기 직전의 냉장 저장까지의 연속된 경로로서 도축된 냉장돈육에서의 초기오염수준 단계(node 1), 돈육 포장공정에서의 성장 및 교차오염단계(node 2), 포장 후 유통되기 직전의 저장 단계에서의 성장 단계(node 3)로 총 3개의 node로 구성하였다.

Node 1 - 냉장돈육에서의 초기오염수준 단계이며, 초기 오염수준에 대한 모니터링 결과인 정성적인 자료를 입력변수

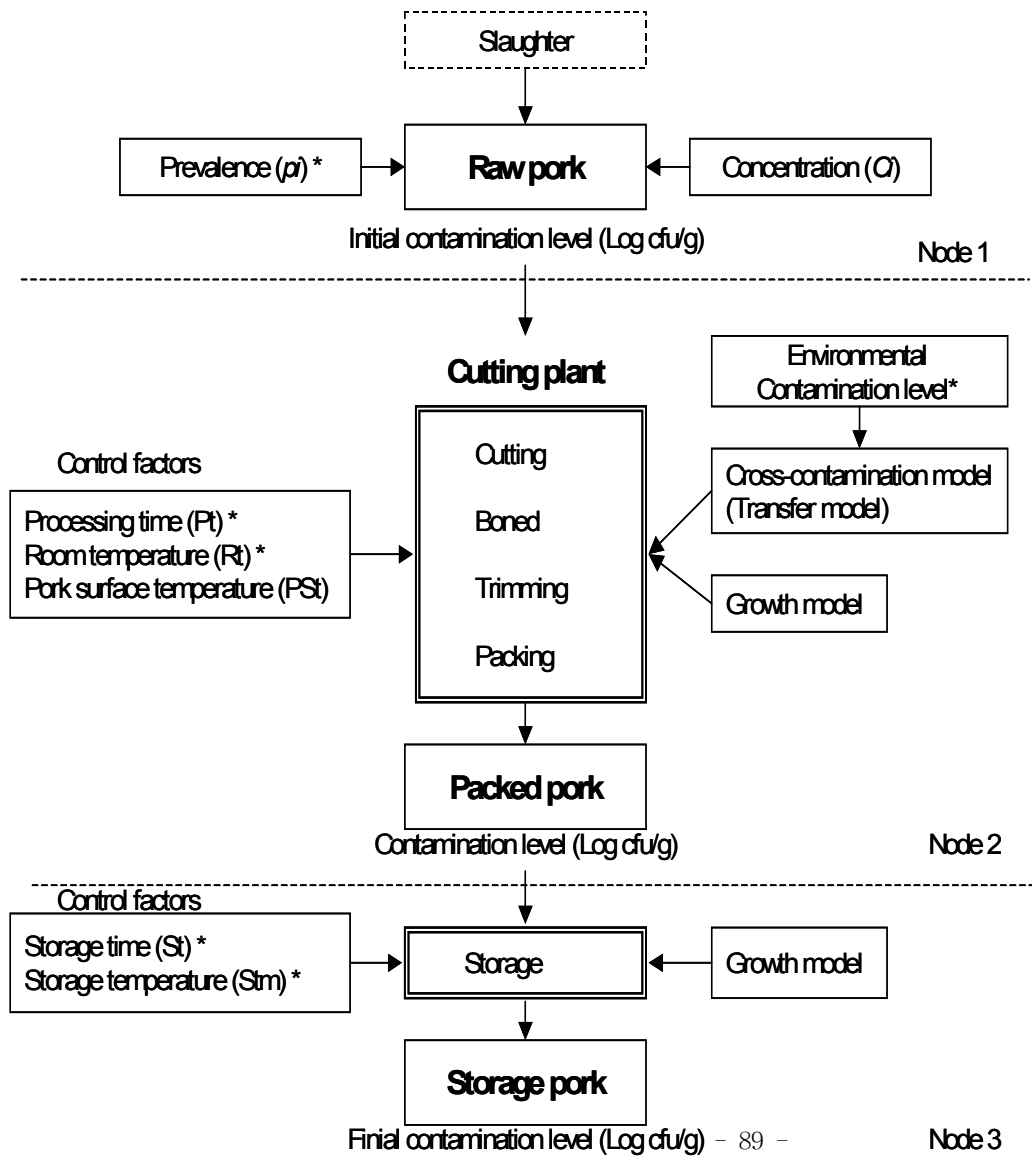
로 하였다.

Node 2 - 공정에서의 성장 및 교차오염단계로, 작업장의 온도, 작업시간을 입력변수로 하였다. 이들 온도를 바탕으로 돈육의 표면 온도를 추정할 수 있는 response surface equation, 교차오염을 추정할 수 있는 전이율(transfer)모델과 이들 온도 및 시간에서 성장 및 생존을 예측할 수 있는 성장예측모델을 내부 모델로 정하였다.

Node 3 - 이 단계는 포장 후 유통되기 직전의 냉장 저장단계에서의 성장단계이며, 냉장실 온도, 저장시간을 입력변수로 하였다. 내부 모델로는 이들 온도 및 시간에서 성장 및 생존을 예측할 수 있는 성장예측모델로 정하였다.

3. Frame-work 모델 활용

Frame-work model은 원료단계, 포장 후 단계, 냉동저장단계에서 *Salmonella*, *L. monocytogenes*의 오염수준을 파악할 수 있는 exposure simulation 모델(핵심기술) 개발의 기초로 활용되었다.



* Input variables

Fig. 4-1. Frame-work design of model simulating the probability of contamination level for *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* of raw pork in pork processing plant.

제2절 Controlling factor에서의 오염전이율(TR) 분석

1. 서론

포장돈육 공정에서의 작업조건 및 발생수준에 대한 모니터링 분석결과를 토대로 작업실 온도와 작업시간이 중요변수로 나타나 이를 controlling factor(CF)로 선정하였으며, 이 CF를 바탕으로 돈육 포장육 공정에서의 *Salmonella*와 *Listeria monocytogenes*의 오염 전이율 (transfer ratio: TR) 분석을 실시하였다.

오염 전이율이란 식품 또는 돈육자체 및 종사자를 포함하는 식품제조 환경으로부터 식품 또는 돈육으로의 위해미생물의 이행정도를 나타내는 것이다. 이는 식품제조환경에서의 GMP에 대한 과학적인 근거 및 정량적인 기준을 제시하는데 이용되는 것은 물론 추후 식육 또는 식품에서의 microbial risk assessment 수행시 중요하게 이용 가능할 것으로 보인다.

2. 실험적 접근방법

가. 돈육에서의 *Salmonella*, *L. monocytogenes* 오염전이율 분석

포장돈육 공정에서의 *Salmonella*과 *L. monocytogenes*의 오염전이를 분석은 (1) 초기에 균이 돈육 및 식품접촉면으로의 부착 가능성과 그 수준을 분석하기 위한 부착을 분석, (2) 돈육과 접촉 후 접촉된 조직에서의 잔류 및 생존가능성과 그 수준을 분석하기 위한 전이를 분석으로 구분하여 실시하였다. 부착을 및 전이를 실험은 실험실에서의 작업장 환경조건을 갖추어 실시하였다.

나. 재료 및 시험균주

1) 재료

(1) 돈육

전이를 분석에 사용한 돈육은 서울지역의 일반 시장에서 판매되는 삼겹살(fat meat)과 안심(red meat)을 구입하여 사용하였다. 돈육은 냉장육을 구입하였으며 구입된 돈육은 냉장온도($5 \pm 1^\circ\text{C}$)를 유지한 아이스박스로 운반하였다. 운반한 돈육을 가능한 빠른 시간에 일정한 크기(5 cm × 5 cm × 2 cm)로 절단하고, 멸균팩으로 포장하여 5°C (Sanyo MIR- 533, Sanyo Co., Japan)로 보관하여 실험에 사용하였다.

(2) 식품접촉면

식품접촉표면으로는 작업장에서 작업환경의 식품접촉면을 고려하여 작업대의 스테인리스 스틸(Type STS304), 지육운반용 컨베이어벨트(SL type), 절단용 도마(polyethylen 수지, 항균제 첨가)를 선정하였고, 스테인리스 스틸과 컨베이어벨트는 포장돈육 가공공정중 사용하고 있는 것과 동일한 재질의 것을 사용하였다.

2) 시험균주 및 배양

전이를 분석에 사용된 시험균주는 표준균주와 포장돈육 가공공정에서 직접 분리한 야생균주를 사용하였다. 표준균주는 KCCM(Korean Culture Center of Microorganisms)에서 분양받은 *Salmonella typhimurium* IFO 14193(이하 표준균주로 칭함)과 *Listeria monocytogenes* ATCC 15313(이하 표준균주로 칭함)을 사용하였다. 실험에 사용한 야생균주는 포장돈육 가공작업장에서 분리·동정한 *Salmonella* spp.와 *Listeria monocytogenes* KL 101(1/2a)을 사용하였다.

이들 균주들을 10% glycerol를 첨가한 tryptic soy broth(TSB)에 넣어 -70℃ 급속냉동고(VWR 4503C, VWR Co., USA)에 동결보존 하였고, 사용시에는 냉장온도에서 녹인 후 TSB에 접종하여 *Salmonella*는 35℃에서 24시간, *L. monocytogenes*는 25℃에서 24시간 전 배양을 하고, tryptic soy agar(TSA)에 도말 후 24시간 배양하였다. TSA에 생육한 균을 백금이를 사용하여 멸균생리식염수에 현탁하고, 4℃에서 10,000×g로 5분간 원심분리하여 cell pellet를 얻었다. 이를 salt peptone(0.85% NaCl, 0.05% Bacto peptone)으로 2회 세척한 후 0.1% peptone water 3ℓ에 용해시켜 활성배양액을 제조하였다. Colorimeter(DR100 Colorimeter, HACH Co., USA)를 이용하여 제조된 배양액의 균수를 $5.0 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^8$ cfu/ml로 조절하여 사용하였다.

3) 전처리

(1) 돈육

실험에 사용된 돈육은 포장돈육 가공공정 환경에 맞추기 위하여 5℃에서 24시간 보관한 후 사용하였다. 돈육은 시험균의 활성배양액을 직접적으로 접종하여 다른 돈육에 전이를 시킬 수 있는 돈육(base tissue; source, 돈육-S)과 돈육-S에 접종된 시험균이 전이될 돈육(contact tissue; destination, 돈육-D)으로 구분하였다. 이때 돈육-S와 돈육-D는 사전에 돈육의 표면에 부착되어 있는 오염미생물을 제거하기 위하여 70% EtOH(Junsei Chemical, Japan)로 살균처리 하였다.

(2) 식품접촉면

식품접촉면으로 사용되는 스테인리스 스틸과 컨베이어벨트는 절단, 세척 및 살균과정으로 전처리 하였으며, 도마와 칼

은 절단과정이 제외된 세척과 살균처리과정 통해 전처리 하였다. 특히, 스테인리스 스틸과 컨베이어벨트는 실험 전에 각각 20 mm × 70 mm × 1 mm로 절단하고, 스테인리스 스틸은 1N-NaOH(Yakuri Pure Chemicals, Japan)용액에 24시간 침지하여 1차 세척하고, 컨베이어벨트는 6시간 침지하여 1차 세척하였다. 1차 세척 후 스테인리스 스틸과 컨베이어벨트를 증류수로 충분히 세척하여 잔존되어 있는 NaOH용액을 제거하였다.

식품접촉면에 잔매(grease)를 제거하기 위한 2차 세척에는 acetone(Junsei Chemical, Japan)을 사용하여 1시간 침지하고, 증류수로 세척하여 실온에서 건조하였다. 2차 세척이 끝난 식품접촉면 중 스테인리스 스틸은 고압증기멸균기(HICLAVE™ HVE-50, Hirayama Co., Japan)에서 121℃, 15분 멸균하고, 컨베이어벨트는 70% EtOH에 담가두어 살균처리하여 사용하였다.

도마는 polyethylene 수지로 된 플라스틱(430 mm × 375 mm × 13 mm)으로 된 것으로 항균성분이 함유된 항균도마를 사용하였으며, 칼은 스테인리스 스틸(Type STS 410)로 된 칼날이 160 mm의 TwinGourmet(Henckels, German) 일반 육류절단용을 사용하였으며, 세척과 살균과정은 컨베이어 벨트와 같은 방법으로 전처리 하였다.

(3) 종사자

Polyethylene glove(PE, Korea)와 cotton glove(면 100%, Korea)는 70% EtOH로 살균처리하고, clean bench에서 UV 조사하며 제공된 clean bench 순환공기로 장갑의 표면에서 수분이 완전히 제거될 때까지 건조하여 사용하였다. 손(bare hand)은 70% EtOH를 분무하고 비비면서 clean bench의 깨끗한 공기로 실온에서 손표면의 수분이 완전히 제거될 때까지 건조하여 실험에 임하였다.

다. 부착물 분석

1) 재료

(1) 돈육

돈육은 표준균주와 야생균주간의 비교와 삼겹살과 안심 즉, 지방함량이 가장 많은 삼겹살과 가장 적은 안심부위를 선정하여 부착율을 비교하였다. 노출온도는 예냉실의 일반적인 상한선인 10℃로 설정하였고, 접촉시간은 예냉실에서 작업전 대기시간을 기준으로 당일입고 후 초반작업인 2시간, 대기 후 6시간, 익일작업인 24시간으로 구분하여 설정하였다.

(2) 식품접촉면

작업환경의 식품접촉면을 고려하여 돈육, 작업대의 스테인리스 스틸, 지육운반용 컨베이어벨트를 선정하였으며, 접촉온도와 시간조건은 돈육에서의 접촉조건과 동일하게 설정하였다.

2) 실험방법

시험용 돈육을 일정한 크기(5 cm × 5 cm × 2 cm)로 절단하여 5℃에서 24시간 보관한 돈육을 10℃ 배양기(Incubator MIR 252, Sanyo Electric Co., Japan)에서 70% EtOH에 침지하여 주름진 곳도 살균되도록 100 rpm으로 5분간 진탕배양기(Shaking Incubator, Jeil Scientific IND. CO., Korea)에서 배양하면서 살균처리하여 멸균증류수로 3회 세척하였다. clean bench의 제공된 공기로 실온에서 30분 동안 돈육표면의 수분이 완전히 제거될 때까지 건조시킨 후, 건조된 돈육을 *Salmonella* spp.와 *L. monocytogenes* 배양액에 각각 침지하였다.

포장돈육 공정을 고려하여 유동성 접촉과 비유동성 접촉 상황을 실험실적으로 재현하기 위하여 진탕조건(70 rpm)과 정지조건으로 나누어 실험하였다. 진탕조건의 경우 공정작업의 예냉실을 고려하여 돈육 부위별, 시험균주별로 스테인리스 스틸, 컨베이어벨트에서의 부착율을 조사하였다. 이때 접촉온도 조건은 예냉실을 고려한 10℃로 고정하고 접촉시간은 예냉실에서 포장돈육 가공작업으로의 대기시간을 고려하여 2, 6, 24시간으로 설정하였다. 정지조건의 경우 접촉온도는 진탕조건과 동일하게 설정하였으나 접촉시간은 예냉실에서 하루 저장되는 조건을 반영하여 24시간으로 한정하였다.

시험균 배양액에 침지한 후 돈육을 생리식염수로 3회 세척하고, clean bench내에서 제공된 공기로 돈육표면에 세척으

로 잔류수분을 건조시켰다. 건조된 돈육을 자동증량측정기(Delta Dilutor, iuL instruments, Spain)를 사용하여 생리식염수로 10배 희석하고, stomacher(Mastercator Silver panoramic, iuL instruments, Spain)로 30초 균질화하여 각 시험균주의 생균수를 측정하였다.

라. 전이율 분석

1) 재료

(1) 돈육

삼겹살과 안심을 선정하고 야생균주를 접종하여 돈육 부위별로 전이율을 비교하였다. 접촉조건은 예냉실 온도범위내로 5, 10℃로 설정하였고, 작업물량을 고려하여 작업시간을 입고즉시 처리는 30분, 작업시 적재되어 나중에 처리되는 60분, 120분의 접촉시간에 노출하여 실험하였다.

(2) 식품접촉면

작업환경의 식품접촉면은 돈육, 작업대의 스테인리스 스틸, 지육운반용 컨베이어벨트를 선정하였고, 분석은 돈육의 전이율 분석과 동일한 조건으로 실시하였다. 전이율 분석의 온도 및 시간조건은 <Table 4-1>과 같고, 반응표면 회귀분석(Response Surface method; RSM)은 <Table 4-2>의 조건으로 실시하였다.

예냉실에서 돈육표피로부터 돈육표피로의 전이율은 <Table 4-3>의 온도와 시간을 factor로 하는 실험조건에 따라 전이율을 분석하였고, RSM은 <Table 4-4>와 같은 조건으로 실시하였다.

Table 4-1. Level of independent variables in experimental design for trend

analysis of transfer rate from pork to pork, conveyor belt & stainless steel, vice versa, in pork processing room

Variables	Symbols	Level		
Time (min)	X ₁	30	60	120
Temperature (°C)	X ₂	5	10	

Table 4-2. Fractional factorial design by RSM computer program for trend analysis of transfer rate from pork to pork, conveyor belt & stainless steel, vice versa, in pork processing room

Treatment	Time (min)	Temperature (°C)
1	30	5
2	30	10
3	60	5
4	60	10
5	120	5
6	120	10

Table 4-3. Level of independent variables in experimental design for trend

analysis of transfer rate from skin to skin in pork precooling room

Variables	Symbols		Level	
Time (hr)	X ₁	2	6	24
Temperature (°C)	X ₂	0	5	

Table 4-4. Fractional factorial design by RSM computer program for trend analysis of transfer rate from skin to skin in pork precooling room

Treatment	Time (hr)	Temperature (°C)
1	2	0
2	2	5
3	6	0
4	6	5
5	24	0
6	24	5

2) 실험방법

사전에 살균 건조된 돈육(S)에 시험균용액 0.1 ml를 표면에 spreading한 후 clean bench 내의 제공된 깨끗한 공기로 돈육표면의 물기가 마르도록 실온에서 건조하였다. 이 돈육(S)를 petridish 바닥에 넣고 또 다른 살균·건조된 돈육(D)를 직접 접촉시키고, 고기가 포개어 있음을 가정하여 300 g 정도의 무게를 올려놓고 압력을 가하여 접촉하게 하였다.

포장돈육 가공공정이 이루어지는 작업실은 돈육이 포장육으로 되기 위해 절단, 발골, 정형하는 행위가 일어나며, 이때 돈육과 작업실 온도를 고려하여 5, 10°C로 설정하였고, 접촉시간은 작업물량을 고려하여 30, 60, 120분으로 설정하였다. 즉 작업장에 대한 전이율을 작업장의 위생 및 환경조건에 따라 돈육에서 돈육, 돈육에서 스테인리스 스틸, 돈육에서 컨베이어벨트 및 역으로 스테인리스 스틸에서 돈육, 컨베이어벨트에서의 돈육으로의 전이율을 각각 5, 10°C에서 30, 60, 120분 동안 측정하였다.

2분도체를 보관하는 예냉실은 S고리에 걸려있는 상태로서 돈육의 피부조직사이에 접촉이 일어나며, 이때 예냉실의 환

경조건에 맞추어 온도는 0, 5℃에서, 시간은 예냉 후 즉시 포장공정으로 이동하는 경우(2시간), 잠시대기의 경우(6시간), 익일 출고의 경우(24시간)으로 고려하여 설정하였다.

전이되어 배양 완료된 돈육(D)을 약하게 부착된 것을 제거할 목적으로 멸균수로 3회 세척하고, clean bench의 제공된 깨끗한 공기로 표면의 물기가 마르도록 실온에서 건조하였다. stomacher bag에 돈육 무게 대비 10배 희석 멸균수를 돈육과 함께 넣고 30초간 stomaching한 후 계측하였다.

마. 종사자의 전이율 분석

1) 재료

(1) 돈육

전이율 분석과 같은 방법으로 돈육(안심)을 전처리하여 포장돈육 작업조건을 고려하여 돈육 표면온도를 10℃로 유지하고, 작업시 종사자와의 접촉시간을 고려하여 실온(15~20℃)에서 5분간 접촉시킨 후 전이율을 조사하였다.

(2) 식품접촉면

공정에서 종사자의 작업환경을 고려하여 칼과 도마를 선정하여 종사자 장갑(손 등)으로부터 칼, 도마로의 전이율을 비교하는 분석을 실시하였다. 도마 표면온도는 작업장 관리기준인 5℃로 설정하였고, 1회 작업 소요시간을 고려하여 5분간의 접촉시간이 일어나는 것을 설정하여 전이율을 조사하였다.

(3) 종사자

전이율과 같이 작업환경의 식품접촉면을 고려하여 polyethylene glove (PG), 면장갑(cotton glove), 맨손(bare hand)을 선정하여 칼, 도마에서 종사자로, 종사자에서 칼, 도마로 전이율의 정도를 비교하기 위한 분석을 실시하였다. 작업 소요시

간을 고려하여 5분간의 접촉 후 전이율을 조사하였다.

2) 실험방법

종사자 관련 실험은 지원자 중에서 건강한 사람을 선정하여 손에 어떠한 질병도 없음을 사전에 확인하였다. 돈육 처리는 돈육 포장공정의 방법에 따라 돈육 표면온도 10℃, 도마 표면온도는 5℃를 유지하였다. 종사자 오염 전이율 분석을 위한 실험과정은 전반적으로 부착물 실험과 유사하지만, 돈육에서 도마, 칼, PG, 면장갑 및 맨손으로의 접촉방법은 달리하였다. 즉, 사전에 살균 건조된 돈육 표면에 시험균용액 1 ml를 골고루 접종하여 clean bench의 깨끗한 공기로 표면의 물기가 마르도록 실온에서 15분간 건조하였다.

종사자를 통한 전이율 분석은 돈육 포장공정에서와 동일한 작업조건 및 방법으로 돈육 → 도마 → 칼 → 장갑(PG, 면장갑 및 맨손), 장갑(PG, 면장갑 및 맨손) → 칼 → 도마 → 돈육으로의 전이율을 분석하였다. 돈육에서 장갑으로의 전이율의 경우, 돈육 포장공정 작업시 PG, 면장갑 및 맨손으로 칼을 이용하여 작업이 이루어지므로 참여자는 멸균처리된 폴리에틸렌 도마에서 시험균용액이 접종된 돈육(5 cm × 5 cm × 2 cm)을 ①PG + 면장갑, ②면장갑, ③PG, ④맨손으로 멸균된 칼을 이용하여 각각 작은 조각(1 cm × 1 cm × 1 cm)으로 절단하면서 5분동안 접촉하였다. 작업이 끝난 후 도마는 1 ml 멸균수로 10 cm × 10 cm를 2회 세척하여 2 ml 채취하고, 또한 표면을 강하게 swabbing(8 ml)한 후 세척과 swabbing 용액을 혼합(10 ml)하여 시험용액으로 하였다.

①, ②, ③, ④에서의 모든 맨손은 멸균수 100 ml가 들어 있는 stomacher bag에서 2분간 행구어 그 용액을 시험용액으로 하였다. 면장갑은 멸균수 100 ml가 들어 있는 stomacher bag에 넣고 stomaching한 것을 시험용액으로 하였으며, PG는 멸균수 100 ml를 채우고 2분 정도 흔든 후 PG안의 내용물과 PG를 stomacher bag에 넣고 stomaching한 것을 시험용액으로 하였고, 사용된 칼은 칼 전체를 swabbing한 것을 시험용액으로 하였다.

장갑(손 등)으로부터 돈육으로의 전이율 분석은 맨손 → 칼 → 도마 → 돈육의 경우, 맨손에 시험균용액을 접종 후 도마, 면장갑, PG, 돈육으로의 전이율을 분석한 것으로, 1 ml 시험균용액을 한쪽 맨손에 떨어뜨린 후 양손으로 비비고, 약 10분 동안 건조시킨 후 멸균처리된 polyethylene 도마에서 ①PG + 면장갑(면장갑을 낀위에 PG를 겹쳐 착용), ②면장갑, ③

PG, ④맨손 순으로 사전에 살균처리된 돈육을 칼을 이용하여 작은 조각(1 cm × 1 cm × 1 cm)으로 절단하면서 접촉하였다. 도마, 맨손, 면장갑, PG, 칼에 대한 시료채취는 돈육 → 도마 → 칼 → 맨손의 경우와 같은 방법으로 실시하였다. 돈육을 작은 조각(1 cm × 1 cm × 1 cm)으로 절단하면서 실시한 것은 Dickson(1990)의 전이율 연구와 같은 방법으로 수행하고 비교하기 위함이었다.

부착율 및 전이율 분석과정을 마친 모든 시료는 완전하게 부착되지 않은 균을 제거하기 위하여 균수 측정전에 증류수로 3회 이상 세척을 실시한 후, 세척이 완료된 시료를 이용하여 sampling 하였다. sampling은 돈육의 경우는 stomaching 하여 얻었으며, 스테인리스 스틸과 컨베이어벨트는 전체를 swab하여 시료를 얻었다. 각각의 시료로부터 시험용액 0.1 ml을 취하여 배지에 도말 하였으며, 이는 3회 이상 반복하여 실시하였다.

바. 오염 전이율 모델 개발

1) 부착율 및 전이율

돈육 및 스테인리스 스틸, 컨베이어벨트 등에서의 접촉된 *Salmonella*와 *L. monocytogenes*의 부착율은 제공된 조직(source)의 초기균수에 대하여 부착 후 잔류(destination)된 균수의 비율로, 전이율은 초기균수에 대하여 전이(destination)된 균수의 비율로 다음 식에 의해 산출하였다.

$$\text{Adherence rate(\%)} = (\text{CFU adhered on destination} / \text{CFU on source}) \times 100$$

$$\text{Transfer rate(\%)} = (\text{CFU transferred on destination} / \text{CFU on source}) \times 100$$

2) 2차 회귀모형

독립변수로는 시간과 온도를, 종속변수를 부착율 및 전이율로 하여 5개의 선정된 조건에서 실험을 실시하였다. 이때 2개의 독립변수에 대한 2차 회귀모형은 다음과 같이 하였다.

$$Y = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_3X_1^2 + \beta_4X_2^2 + \beta_5X_1X_2$$

여기서 Y는 종속변수로 부착율 및 전이율이고, X₁과 X₂는 독립변수로, 즉, 시간(X₁)과 온도(X₂)이며, β는 계수이다.

3) 반응표면 회귀분석

부착율 및 전이율에 대한 경향을 분석하기 위하여 실험계획에 따라 분석한 결과를 바탕으로 반응표면 회귀분석을 실시하였으며, 이는 statistical analysis system(SAS) 프로그램 8.0을 이용하여 분석하였다.

4) 유의성 검증

포장돈육 가공장에서 분리한 *Salmonella* spp. 및 *L. monocytogenes* 야생균주를 이용하여 산출한 전이율을 각 그룹별 평균과 표준편차를 산출하고, ANOVA분석을 실시하여 그룹간 유의성을 검증하였다.

5) 모델 검증

조건별 전이율 실험에 의한 결과값(observed value; X_o)과 예측값(predicted value; X_p)을 이용하여 상대오차(relative error; RE)을 산출하여 검증하였고, RE는 다음 식에 의하여 산출하였다. 모델의 정확성 평가는 상대오차 절대값 평균(mean absolute relative error; MARE)을 산출하여 비교하였다.

$$RE = (X_p - X_o) / X_o$$

3. 오염부착율 및 전이율 분석과 예측모델 개발

가. 오염부착율 분석

1) 돈육에서 돈육으로의 부착율

Salmonella - 안심부위에서 표준균주는 접촉 2시간 경과 후 2.30%의 부착율을, 6시간 후 16.40%, 24시간 후에는 100% 부착을 보였다<표 4-5>. 이에 비해 야생균주는 2시간 경과시 이미 24.90%의 높은 부착율을 보였고, 6시간 후 27.48%, 24시간 후 100%로 나타나 야생균주 *Salmonella*가 시간경과에 따른 부착율이 높았고 특히 초기 부착율이 매우 높았다. 삼겹살의 경우도 같은 경향으로 야생균주 부착율이 높았으며, 안심과 삼겹살간의 부위별 부착율 차이는 없었다.

L. monocytogenes - 표준균주와 야생균주는 모두 초기(2시간)에 약 65~79%의 부착율을 나타냈다<표 4-6>. 안심과 달리 삼겹살의 경우는 야생균주에서 약간 높은 부착율을 나타냈으며(통계적으로는 유의하지 않음), 특히 6시간에는 두 균

주 모두 돈육의 안심과 삼겹살 부위에 100% 부착율을 보였다. 표준균주와 야생균주 모두 부착율 곡선에서 매우 급상승을 나타내었고, *Salmonella*는 이에 비하여 비교적 완만한 상승으로 나타났다.

*Salmonella*와 *L. monocytogenes* 모두 표준균주보다 야생균주의 부착율이 대체로 높아 야생균주의 적응력이 높은 것으로 판단되었다. 삼겹살보다 안심에서의 부착율이 높은 것으로 나타났는데(p<0.05), 이는 근육내 수분함량의 부분적인 차이로 인하여 지방조직보다 살코기조직으로부터 전이율이 높다는 Dickson 등(1990)의 실험결과를 참고하면 삼겹살의 지방 성분이 균주의 부착을 저해하는 것으로 사료된다.

Table 4-5. Adherence rate of *Salmonella* spp. in pork at 10°C
(Log₁₀ CFU/surface)

pork type	<i>Salmonella</i>	Initial inoculum	Contact time		
			2 hr	6 hr	24 hr
Red meat	Standard	6.28	4.68 (2.30)	5.51 (16.40)	6.42 (100.00)
	Wild-type	6.91	6.27 (24.90)	6.32 (27.48)	7.81 (100.0)
Fat meat	Standard	6.28	4.86 (3.43)	4.92 (4.21)	6.56 (100.0)
	Wild-type	6.91	6.23 (24.80)	6.31 (26.87)	7.70 (100.0)

* (): Adherence rate (%)

Table 4-6. Adherence rate of *L. monocytogenes* in pork at 10°C
(Log₁₀ CFU/surface)

Pork type	<i>Listeria monocytogenes</i>	Initial inoculum	Contact time		
			2 hr	6 hr	24 hr
Red meat	Standard	6.34	6.29 (74.52)	6.58 (100.00)	7.77 (100.00)
	Wild-type	6.44	6.34 (79.22)	6.95 (100.00)	7.69 (100.0)
Fat meat	Standard	6.34	6.13 (70.21)	6.69 (100.00)	8.10 (100.0)
	Wild-type	6.44	6.27 (65.09)	6.87 (100.00)	8.28 (100.0)

* (): Adherence rate (%)

포장돈육의 공정흐름을 살펴보면 도축장에서 2분도체로 예냉실에 입고되어 S고리에 매달려 보관된다. 이때 작업자의 이동, 도체의 입출고 등으로 지속적인 움직임과 접촉상황이 발생되므로, 유사한 상황을 조성하기 위하여 돈육을 shaking(70 rpm)하고 부착율을 비교하였다<Table 7, 8>. *Salmonella* spp.의 경우 shaking을 실시한 안심과 삼겹살부위에 대하여 표준균주와 야생균주에서, 그리고 non-shaking의 야생균주 모두 24시간 접촉 후 100%의 부착율을 나타냈다. 그러나 non-shaking의 표준균주에서는 돈육의 안심과 삼겹살부위에서 모두 3.80%, 야생균주는 13.2%, 25.7%의 낮은 부착율을 나타냈다.

*L. monocytogenes*의 경우는 shaking 여부와 상관없이 24시간 접촉 후 부위별 돈육이나 표준균주와 야생균주 모두

100% 부착율을 보였다. 돈육 부위별, 균주별 부착율의 차이는 통계적으로 유의하지 않았으나, 대체로 shaking 조건에서 부착율이 약간 높았고, *L. monocytogenes*가 *Salmonella* 보다 부착율이 높았다. 박테리아의 물질표면 부착 연구에서 *Listeria*가 *Salmonella*보다 부착율이 높다는 Sinde 등(2000)의 연구결과는 본 연구와 비슷하여, 실험실적 조건보다는 실제 작업장내의 오염발생이 더 높다는 예상을 할 수 있다. 예냉실에서의 오염발생은 도축장에서 입고될 때 이미 오염된 원료 도체를 통하여 전이와 부착이 일어나므로, 도축장에서 예냉실로 입고되는 원료도체에 대한 위생관리의 중요성을 확인 할 수 있었다.

Table 4-7. Adherence rate of *Salmonella* spp. in shaking and non-shaking condition of pork at 10°C

(Log₁₀ CFU/surface)

<i>Salmonella</i>	Contact time 24 hr							
	Non-shaking				Shaking			
	Standard		Wild-type		Standard		Wild-type	
Initial inoculum	5.42		5.73		6.28		6.91	
Meat type	Red meat	Fat meat	Red meat	Fat meat	Red meat	Fat meat	Red meat	Fat meat
Adherence	4.00 (3.80)	4.00 (3.80)	4.85 (13.2)	5.14 (25.7)	6.42 (100.0)	6.56 (100.0)	7.81 (100.0)	7.70 (100.0)

* (): Adherence rate (%)

Table 4-8. Adherence rate of *L. monocytogenes* in shaking and non-shaking

condition of pork at 10°C

		Contact time 24 hr							
		Non-shaking				Shaking			
Organisms		Standard		Wild-type		Standard		Wild-type	
Initial inoculum		5.38		5.64		6.34		6.44	
Meat type	Red	Fat	Red	Fat	Red	Fat	Red	Fat	
	meat	meat	meat	meat	meat	meat	meat	meat	
Adherence		6.47	6.47	6.47	6.47	7.77	8.10	7.69	8.28
		(100.0)	(100.0)	(100.0)	(100.0)	(100.0)	(100.0)	(100.0)	(100.0)

(Log₁₀ CFU/surface)

* (): Adherence rate (%)

2) 돈육에서 컨베이어벨트와 스테인리스 스틸로의 부착율

표준균주와 야생균주를 이용한 접촉시간별 컨베이어벨트, 스테인리스 스틸에 대한 부착율은 <Table 4-9, 4-10>과 같다.

Salmonella - 컨베이어벨트의 부착율은, 표준균주의 경우 초기균수 log 6.51에서 2시간 후에는 1.34% 증가율을 나타냈으나, 6시간 및 24시간 후에는 0.60%, 0.33%로 오히려 부착율이 감소하였다. 그러나 야생균주의 경우 접촉 2시간 후 부착율은 32.04%로 증가하였고, 24시간 후에는 100% 부착율을 보였다. 본 연구 결과, 컨베이어벨트에 대한 부착율은 야생균주가 표준균주보다 월등히 높게 나타났다. 반면 스테인리스 스틸의 경우 표준균주는 초기균수 log 6.51에서 2시간 경과 후 log 1.99(0%)에서 24시간 후에는 log 4.78 (1.59%)로 나타나 시간이 지남에 따라 증가하는 경향으로 나타내었다. 야생균주의 *Salmonella* 부착율은 접촉 2시간 후 log 3.75(0.17%)로 증가하였으며, 6시간 후에는 log 5.23(5.01%)로 표준균주의 24시간 부착율보다 높았고, 24시간 후에는 100%의 부착율을 보였다. 즉, 스테인리스 스틸에서의 부착율은 야생균주가 표준균주 보다 현저하게 높았다.

L. monocytogenes - 컨베이어벨트의 부착율은 표준균주의 경우 초기균수 log 6.67에서 2시간 경과 후 log 3.89(0.15%)의 부착율을 보였으며, 6시간(1.11%) 및 24시간(0.19%) 후에도 부착율이 크게 증가하지는 않았다. 그러나 야생균주는 접촉 2시간 후에 log 5.04(4.34%)를 보였고, 6시간(6.77%) 및 24시간(28.55%) 후에는 스테인리스 스틸에 비해서는 낮은 수준이지만 증가하는 경향이였다. 컨베이어벨트에 대한 부착율도 야생균주가 표준균주보다 높게 나타났다. 반면, 스테인리스 스틸의 경우, 표준균주 초기균수 log 6.67에서 2시간 경과 후 log 5.12로 2.63%의 부착율을 나타내었으나 6시간 및 24시간 후에는 각각 log 4.23(0.33%), log 4.30(0.39%)로 나타나 시간이 경과함에 따라 감소하였다. 반면에 야생균주는 접촉 2시간 후에는 표준균주보다 낮은 log 1.99(0.0%)였으나 6시간 후에는 log 5.67(18.53%), 24시간 후에는 log 5.79(24.42%)로 증가하였다. 결론적으로 *L. monocytogenes*와 *Salmonella* spp. 모두 표준균주보다 야생균주가 더 높은 부착율을 보였다 ($p < 0.05$).

Table 4-9. Adherence rate of *Salmonella* spp. on the surfaces of conveyor belt and stainless steel

(Log₁₀ CFU/surface)

	<i>Salmonella</i>	Initial inoculum	Contact time		
			2 hr	6 hr	24 hr
Conveyor belt	Standard	6.51	4.69 (1.34)	3.82 (0.60)	4.15 (0.33)
	Wild-type	6.55	5.93 (32.04)	5.23 (5.14)	6.97 (100.0)
Stainless Steel	Standard	6.51	1.99* (0.00)	2.99* (0.00)	4.78 (1.59)
	Wild-type	6.55	3.75 (0.17)	5.23 (5.01)	7.01 (100.0)

* Detection limit value
(): Adherence rate (%)

Table 4-10. Adherence rate of *L. monocytogenes* on the contact surfaces of conveyor belt and stainless steel

(Log₁₀ CFU/surface)

		<i>Listeria monocytogenes</i>	Initial inoculum	Contact time		
				2 hr	6 hr	24 hr
Conveyor belt	Standard	6.67	3.89 (0.15)	4.72 (1.11)	3.99* (0.19)	
	Wild-type	6.41	5.04 (4.34)	5.23 (6.77)	5.83 (28.55)	
Stainless Steel	Standard	6.67	5.12 (2.63)	4.23 (0.33)	4.30 (0.39)	
	Wild-type	6.41	1.99* (0.00)	5.67 (18.53)	5.79 (24.42)	

* Detection limit value
(): Adherence rate (%)

Midelet 등(2002)은 표면에 접촉하게 되어 식품으로 전이될지 모르는 미생물의 수는 접촉표면의 미생물 농도, 재질에 의하여 미생물의 부착력에 좌우된다고 보고했다. 실제로 예냉실 체류가 2~6시간정도 체류시간이 길어지면 오염도가 높아 지므로 선입선출과 일일작업량 및 작업대기 재고량 조정 등의 시스템적 관리가 요구되며, 이러한 점을 감안하여 포장돈육 가공작업실에서 스테인리스 스틸보다 컨베이어벨트에 대한 오염관리가 더 요구되는 것으로 판단된다.

L. monocytogenes Scott A와 우유가공 환경으로부터 검출한 야생균주를 대상으로 각각 3가지의 온도(4℃, 18℃, 30℃)에서의 스테인리스 스틸에 대한 부착율을 측정한 Norwood 등(2001)의 연구결과에서 최적의 부착율은 18℃이었고, Scott A 균종보다 야생균주의 부착력이 큰 것으로 보고되었다. 이 결과는 본 연구에서 야생균주가 표준균주보다 부착력이 더 크다는 것과 비슷한 경향을 나타내었다. 또한 Herald 등(1988) 등이 실험한 *L. monocytogenes*의 스테인리스 스틸 표면에

대한 부착율은 표준균주 야생균주 모두 35℃(18~24시간), 21℃(36시간), 10℃(2~3일)에서 배양한 결과 모든 조건에서 모두에서 세포가 부착되었다는 보고와 같았다. 결론적으로 *L. monocytogenes*는 모든 표면 유형에 부착할 수 있으며 소수성이 더 강한 물질에 많이 부착되는데, 식품가공장에서 사용하는 식품접촉면으로 가장 소수성이 높은 것이 컨베이어벨트 재료인 polytetrafluorethylene이었고, 다음으로 rubber, stainless steel이었다. 따라서 작업환경조건에서 오염발생과 생존 가능성이 높으므로 포장돈육 가공장의 세척 소독은 매우 중요한 control point임을 이해할 수 있다.

Shaking에 따른 *Salmonella*와 *L. monocytogenes*의 컨베이어벨트와 스테인리스 스틸에서의 부착율은 <Table 4-11, 4-12>과 같다.

Salmonella - Non-shaking의 경우 표준균주 초기균수 log 5.42에서 24시간 경과 후 스테인리스 스틸에 대한 부착율은 3.34% 였으나 컨베이어벨트에서는 100% 부착율을 나타냈으며, 야생균주는 스테인리스 스틸과 컨베이어벨트 모두 100% 부착율을 보였다. 반면, shaking의 경우 표준균주는 24시간 경과 후 컨베이어벨트는 0.33%, 스테인리스 스틸은 1.59%의 부착율을 나타내었고, 야생균주는 스테인리스 스틸과 컨베이어벨트 모두 100%의 부착율을 보여 표준균주에 비하여 shaking에서도 부착율이 매우 높았다.

L. monocytogenes - non-shaking의 경우 *Salmonella*와는 달리 표준균주와 야생균주 모두 스테인리스 스틸과 컨베이어벨트에 대하여 24시간 경과 후 2.33~7.21%로 매우 낮은 부착율을 나타내었다. shaking의 경우, 표준균주는 컨베이어벨트에서 0.19%, 야생균주는 28.55%의 부착율을 보였다. 스테인리스 스틸은 표준균주 0.39%, 야생균주 24.42%로 컨베이어벨트와 스테인리스 스틸에 대하여 각각 야생균주가 표준균주에 비하여 부착력이 높게 나타났다. 즉, 균주별로 shaking에 따른 컨베이어벨트와 스테인리스 스틸의 부착율은 전반적으로 shaking의 경우가 non-shaking에 비해 약간 높은 전이율을 나타내었다. 이러한 결과는 물리적으로 shaking에 의해 시간당 접촉면적이 넓어지고, 육표면의 표면장력이 물리적 충격에 의하여 약해지게 되어 균의 부착율이 높아지는 것으로 사료된다.

3) 돈육에서 도마로의 부착율

5℃에서 24시간 동안의 돈육에서 도마로의 부착율을 분석하기 위하여 돈육 부위별, 균주별로 부착율을 조사한 결과는 <Table 4-13>와 같으며, 모든 균주 및 모든 부위에서 부착되지 않은 것으로 나타났다.

Table 4-11. Adherence rate of *Salmonella* spp. on the contact surfaces of conveyor belt and stainless steel in shaking and non-shaking condition of pork at 10℃

(Log ₁₀ CFU/surface)								
Contact time 24 hr								
Organisms	Non-shaking				Shaking			
	Standard		Wild-type		Standard		Wild-type	
Initial inoculum	5.42		5.73		6.51		6.55	
Type	ConV	SS	ConV	SS	ConV	SS	ConV	SS
Adherence	5.49 (100.0)	3.99 (3.34)	5.97 (100.0)	6.04 (100.0)	4.15 (0.33)	4.78 (1.59)	7.70 (100.0)	7.81 (100.0)

(): Adherence rate (%)

ConV: Conveyor belt, SS: Stainless steel

Table 4-12. Adherence rate of *L. monocytogenes* on the contact surfaces of conveyor belt and stainless steel in shaking and non-shaking

condition of pork at 10°C

(Log₁₀ CFU/surface)

		Contact time 24 hr							
		Non-shaking				Shaking			
Organisms	Standard	Wild-type		Standard		Wild-type			
Initial inoculum	5.14	5.61		6.67		6.41			
Type	ConV	SS	ConV	SS	ConV	SS	ConV	SS	
Adherence	3.99*	3.99*	4.21	3.99*	3.99*	4.30	5.83	5.79	
	(4.21)	(4.21)	(7.21)	(2.33)	(0.19)	(0.39)	(28.55)	(24.42)	

* Detection limit value

(): Adherence rate (%)

ConV: Conveyor belt, SS: Stainless steel

Table 4-13. Adherence rate of *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* on cutting board exposed to 5°C

(Log₁₀ CFU/surface)

Contact time 24 hr							
Organisms	<i>Salmonella</i> spp.				<i>L. monocytogenes</i>		
	Standard	Wild-type		Standard	Wild-type		
Initial inoculum	5.12	5.54		5.41	5.13		
Adherence	-	-	-	-	-	-	-
	(0.00)	(0.00)	(0.00)	(0.00)	(0.00)	(0.00)	(0.00)

*(): Adherence rate (%)

Mafu 등(1990)은 폴리프로필렌 표면에 박테리아가 자리 잡으면 부착이 시작되는데, 초기 가역적 단계중에 박테리아는 약한 인력으로 표면에 붙어 있다가 물리적 화학적 힘이 표면의 박테리아 세포를 비가역적으로 붙들면 좀 더 견고한 결합이 발생하고, 일부 힘에는 부착된 세포와 바이오필름 매트릭스 형성에 의한 exopoly- saccharides가 형성되며 *L. monocytogenes*가 20분 또는 1시간과 같이 짧은 접촉시간 후 두 가지 온도(4°C, 20°C)에서 모든 표면 유형에 부착할 수 있다고 보고하여, 본 연구결과와 차이가 있었다. 이러한 차이는 본 연구의 조건으로는 미생물 활동이 매우 제한되는 낮은 온도인 5°C라는 조건과 연구에 사용된 도마가 항균재질로 구성된 것이기 때문인 것으로 사료된다.

나. 작업과정 중 종사자 전이율

1) 돈육으로부터 종사자 및 식품접촉면으로의 전이율

Polyethylene glove를 착용한 경우는 전이에 의한 오염이 발생되지 않았으며, 면장갑, 맨손작업시 오염 전이율은 면장갑에서 가장 높았다<Table 4-14, 4-15>. 면장갑속의 맨손으로도 전이가 일어나, *Salmonella* 0.07%, *L. monocytogenes* 0.08%의 전이율을 나타냈고, 돈육에서 면장갑으로의 오염 전이율은 *Salmonella* 38.80%, *L. monocytogenes* 100.0%이었다. *Salmonella*의 작업중 전이율은 돈육에서 도마 1.66~1.97%, 돈육에서 칼 0.2~1.99%, 돈육에서 장갑(손)은 3.11~2.51%로 나타났다.

2) 종사자로부터 돈육 및 식품접촉면으로의 전이율

작업과정중 종사자의 장갑(손)에서 도마, 칼, 돈육으로 *Salmonella* spp.와 *L. monocytogenes*의 오염 전이율은 도마 0.02~0.0012%, 칼 0.44~0.0011%, 돈육 0.21~0.0011%로 매우 낮게 나타났다<Table 4-16, 4-17>.

Table 4-14. Transfer rate of *Salmonella* spp. from pork to worker in pork processing plant by various gloves and hand

(Log₁₀ CFU/surface)

	Initial inoculation to pork	Cutting board	Knife	Glove	Bare hand
Polyethylene glove	7.72	5.94 (1.66)	5.01 (0.20)	6.21 (3.11)	0.00 (0.00)
Cotton glove	7.66	5.91 (1.79)	5.96 (1.99)	7.25 (38.80)	4.48 (0.07)
Bare hand	7.77	6.07 (1.97)	5.95 (1.50)	-	5.90 (1.35)

(): transfer rate(%)

Table 4-15. Transfer rate of *L. monocytogenes* from pork to worker in pork processing plant by various gloves and hand
(Log₁₀ CFU/surface)

	Initial inoculation to pork	Cutting board	Knife	Glove	Bare hand
Polyethylene glove	7.37	5.94 (3.79)	5.19 (0.67)	5.54 (1.51)	0.00 (0.00)
Cotton glove	7.48	5.94 (2.90)	5.02 (0.35)	7.64 (100.00)	4.36 (0.08)
Bare hand	7.63	5.85 (1.68)	5.63 (1.00)	-	6.03 (2.51)

(): transfer rate(%)

Table 4-16. Transfer rate of *Salmonella* spp. from worker's hands to food contact surfaces in pork processing plant

(Log₁₀ CFU/surface)

Initial inoculation		Cutting board	Knife	Pork
Polyethylene glove		4.11 (0.02)	5.47 (0.44)	5.15 (0.21)
Cotton glove	7.82	3.00 (0.0015)	3.12 (0.0020)	3.89 (0.0118)
Bare hand		3.00 (0.0015)	3.00 (0.0015)	4.08 (0.0181)

(): transfer rate(%)

Table 4-17. Transfer rate of *L. monocytogenes* from worker's hands to food contact surfaces in pork processing plant

(Log₁₀ CFU/surface)

Initial inoculation		Cutting board	Knife	Meat
Polyethylene glove		3.65 (0.047)	5.13 (0.141)	4.72 (0.055)
Cotton glove	7.98	3.40 (0.0026)	3.00 (0.0011)	4.69 (0.052)
Bare hand		3.07 (0.0012)	3.00 (0.0011)	3.00 (0.0011)

(): transfer rate(%)

다. 돈육 및 기계, 기구로의 전이율

1) 예냉실 조건에서 원료도체간 표면의 전이율 및 예측모델

0℃ 조건에서 도체간 *Salmonella*의 전이율은 2시간 후 0.12%를 나타냈으나 6시간 후에는 0.10%, 24시간 후에는 0.06%로 시간이 지나감에 따라 감소하는 경향을 나타내었다. *L. monocytogenes*도 *Salmonella*와 비슷한 경향을 보였다. 또한 *Salmonella*와 *L. monocytogenes* 모두 0℃와 5℃ 상태에서는 차이가 거의 없었다. *Salmonella*의 평균 전이율은 0.085%로 *L. monocytogenes*의 평균 전이율 0.066%에 비하여 다소 높았으나 통계적으로 유의하지 않았다($p>0.05$)<Table 4-18>.

온도와 시간을 독립변수로 적용한 작업장에서의 *Salmonella* 전이율에 대한 2차 회귀식은 <Table 4-19>와 같으며, 이식을 바탕으로 분석한 예냉실에서 돈육표피로부터 돈육표피로의 *Salmonella* spp. 전이율에 대한 경향은 초기에 전이율은 상대적으로 높았지만 시간이 경과하면서, 온도가 상승함에 따라 전이율은 상대적으로 낮아지는 경향을 나타냈다<Fig. 4-2(A)>.

L. monocytogenes 전이율에 대한 2차 회귀식은 <Table 4-20>과 같으며, 전이율에 대한 경향분석 결과는 <Fig. 4-2(B)>과 같다. 초기에는 전이율이 상대적으로 높았지만 시간경과와 온도상승에 따라서 전이율은 상대적으로 낮아지는 경향이었으며, 이후 일정시간 및 온도가 상승하면서 다시 높아지는 경향을 보였다.

Table 4-18. Transfer rate of *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* from pork carcass to carcass during precooling storage

Bacteria	Treatment	Time(hr)	Temperature(°C)	N	Transfer rate(%)	
					Mean	SD
<i>Salmonella</i> spp.	1	2	0	8	0.12	0.13
	2	2	5	8	0.09 ^a	0.03
	3	6	0	8	0.10	0.09
	4	6	5	8	0.13 ^b	0.07
	5	24	0	6	0.06	0.02
	6	24	5	12	0.05 ^a	0.02
<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	1	2	0	8	0.11 ^a	0.03
	2	2	5	8	0.09	0.04
	3	6	0	7	0.02 ^b	0.01
	4	6	5	8	0.09	0.07
	5	24	0	12	0.03 ^b	0.003
	6	24	5	12	0.05	0.01

Different letters within columns indicate a significant difference in transfer rates ($P<0.05$)

Table 4-19. Model of transfer rate of *Salmonella* spp. from pork carcass to carcass during precooling storage by RSM program

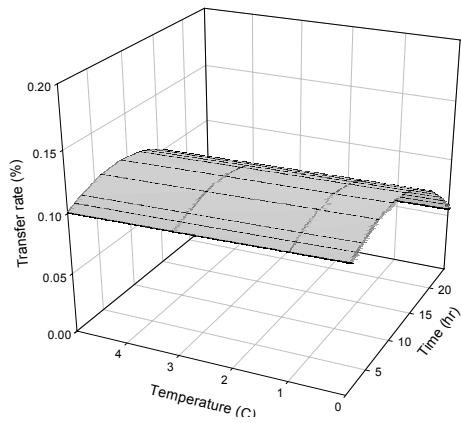
Dependent variables	The second order polynomial
Transfer rate (TR)	$\text{TR} = 0.101202 + 0.004226 \times X_1 - 0.000895 \times X_2$ $- 0.000255 \times X_1^2 - 0.000008638 \times X_1 \times X_2$

X₁: Time(min), X₂: Temperature(°C)

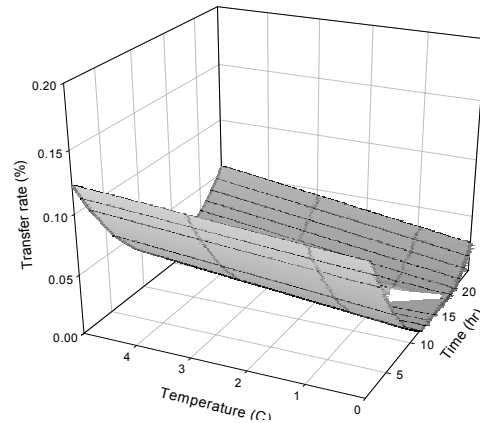
Table 4-20. Model of transfer rate of *L. monocytogenes* from pork carcass to carcass during precooling storage by RSM program

Dependent variables	The second order polynomial
Transfer rate (TR)	$\text{TR} = 0.122906 - 0.016417 * X_1 + 0.003045 * X_2$ $+ 0.000515 * X_1^2 - 0.000136 * X_1 * X_2$

X₁: Time(min), X₂: Temperature(°C)



(A)



(B)

Fig. 4-2. Response surface transfer rate of *Salmonella* spp. (A), *L. monocytogenes* (B) from pork carcass to carcass during precooling storage by time and temperature as independent variables.

2) 포장돈육 공정에서 돈육간 전이율 및 예측모델

포장돈육 공정에서 돈육에서 돈육으로의 *Salmonella* 전이율 평균값은 5°C에서 30분 후에는 0.39%를 나타냈으나 24시간 후에는 0.19%로 낮아졌으며, *L. monocytogenes*의 평균 전이율은 30분 후에서 120분으로 시간이 경과하면서 0.2%에서 0.42%로 증가하였다. *Salmonella*와 *L. monocytogenes*의 평균 전이율은 각각 0.303%, 0.284%로 나타났으나 통계적으로 유의하지 않았다 ($p > 0.05$) <Table 4-21>. 온도와 시간을 독립변수로 하여 가공장에서의 *Salmonella*와 *L. monocytogenes*의 전이율에 대한 2차 회귀식은 <Table 4-22, 4-23>와 같다. 전이율 경향은 *Salmonella* 경우 초기에는 상대적으로 높았으나,

시간이 경과함에 따라서 그리고 온도가 상승함에 따라 전이율은 낮아지다가 일정시간 및 온도 상승에 따라 다시 약간 높아지는 경향을 나타냈다<Fig. 4-3(A)>. *L. monocytogenes*의 경우는 시간경과에 따라 전이율이 높아졌으며, 온도가 상승하면서 전이율이 더 빨리 높아졌다<Fig. 4-3(B)>.

Table 4-21. Transfer rate of *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* from pork to pork in pork processing plant

Bacteria	Treatment	Time(min)	Temperature (°C)	N	Transfer rate(%)	
					Mean	SD
<i>Salmonella</i> spp.	1	30	5	8	0.39	0.45
	2	30	10	10	0.74 ^a	0.62
	3	60	5	16	0.14	0.08
	4	60	10	8	0.10 ^b	0.04
	5	120	5	4	0.19	0.09
	6	120	10	4	0.18 ^b	0.04
<i>Listeria monocytogenes</i>	1	30	5	8	0.02 ^a	0.02
	2	30	10	12	0.15 ^a	0.14
	3	60	5	16	0.16 ^a	0.17
	4	60	10	16	0.44 ^b	0.33
	5	120	5	16	0.42 ^b	0.39
	6	120	10	16	0.36 ^b	0.30

Different letters within columns indicate a significant difference in transfer rates ($P<0.05$)

Table 4-22. Model for transfer rate of *Salmonella* spp. from pork to pork in pork processing plant by RSM program

Dependent variables	The second order polynomial
Transfer rate (TR)	$\text{TR} = 0.748337 - 0.022325 \times X_1 + 0.071528 \times X_2$ $+ 0.00163 \times X_1^2 - 0.000848 \times X_1 \times X_2$

X₁: Time(min), X₂: Temperature(°C)

Table 4-23. Model for transfer rate of *L. monocytogenes* from pork to pork in pork processing plant by RSM program

Dependent variables	The second order polynomial
Transfer rate (TR)	$\text{TR} = -0.786164 + 0.017933 \times X_1 + 0.068667 \times X_2$ $- 0.000066025 \times X_1^2 - 0.000602 \times X_1 \times X_2$

X₁: Time(min), X₂: Temperature(°C)

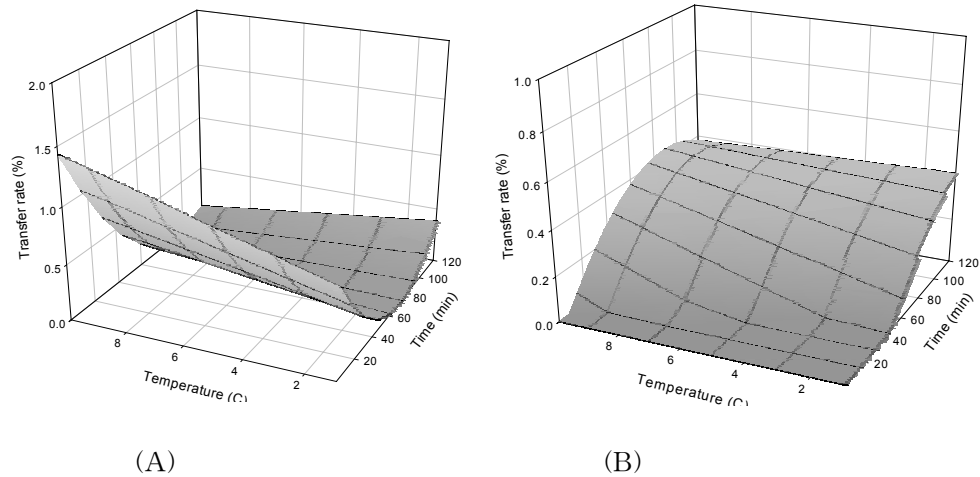


Fig. 4-3. Response surface transfer rate of *Salmonella* spp. (A), *L. monocytogenes* (B) from pork to pork in pork processing plant by time and temperature as independent variables.

3) 포장공정에서 돈육에서 식품접촉면으로 전이율 및 예측모델

포장공정에서 돈육에서 컨베이어벨트로의 *Salmonella* 전이율 평균값은 5℃에서 30분 후에는 0.064%를 나타냈으나 120분 후에는 0.052%로 낮아졌으며, 10℃에서는 전이율이 더 감소하였다. 반면, *L. monocytogenes*의 경우, 5℃에서 30분 후에는 0.015%의 전이율을 나타냈으나 120분 후에는 더욱 감소하여 0.002%를 나타내었고 10℃에서는 더 감소하는 경향을 보였다<Table 4-24>.

한편, 돈육에서 스테인리스 스틸로 *Salmonella* spp. 전이율의 평균값은 5℃에서 30분 후에는 0.045%를 나타냈으나 120분 후에는 0.015%로 낮아졌다. 10℃에서의 전이율 감소는 큰 변화가 없었다. *L. monocytogenes*의 경우, 5℃에서는

0.013%에서 0.003%로 낮아졌지만, 10℃에서는 0.004%에서 0.009%으로 도리어 증가 추세를 보였다. *Salmonella*와 *L. monocytogenes*의 평균 전이율은 각각 0.063%, 0.009%로서 *Salmonella*가 *L. monocytogenes* 보다 더 높게 나타났다($p < 0.0001$)<Table 4-25>.

Table 4-24. Transfer rate of *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* from pork to conveyor belt in pork processing room

Bacteria	Treatment	Time (min)	Temperature (°C)	N	Transfer rate(%)	
					Mean	SD
<i>Salmonella</i> spp.	1	30	5	6	0.064	0.052
	2	30	10	2	0.035 ^{ab}	0.0007
	3	60	5	10	0.136	0.132
	4	60	10	12	0.067 ^a	0.033
	5	120	5	12	0.052	0.027
	6	120	10	11	0.013 ^b	0.007
<i>Listeria monocytogenes</i>	1	30	5	8	0.015	0.006
	2	30	10	3	0.006	0.004
	3	60	5	10	0.015	0.022
	4	60	10	10	0.006	0.006
	5	120	5	7	0.002	0.001
	6	120	10	3	0.00007	0.00003

Different letters within columns indicate a significant difference in transfer rates ($P < 0.05$)

Table 4-25. Transfer rate of *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* from pork to

stainless steel in pork processing room

Bacteria	Treatment	Time (min)	Temperature (°C)	N	Transfer rate(%)	
					Mean	SD
<i>Salmonella</i> spp.	1	30	5	8	0.045 ^a	0.036
	2	30	10	6	0.031	0.028
	3	60	5	11	0.016 ^b	0.010
	4	60	10	9	0.028	0.020
	5	120	5	12	0.015 ^b	0.007
	6	120	10	12	0.031	0.024
<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	1	30	5	5	0.013 ^a	0.007
	2	30	10	7	0.004	0.002
	3	60	5	11	0.007 ^{ab}	0.004
	4	60	10	10	0.008	0.007
	5	120	5	5	0.0003 ^b	0.0002
	6	120	10	8	0.009	0.006

Different letters within columns indicate a significant difference in transfer rates ($P<0.05$)

포장공정의 돈육에서 컨베이어벨트로의 *Salmonella* 전이율에 대한 2차 회귀식은 <Table 4-26>와 같다. 전이율 경향은 점차 높아지다가 80~90분경 최고점에 이르며, 이후 다시 감소하였다. 온도변화에 대해서는 낮은 온도에서 시간에 따른 변화가 더 컸으며, 높은 온도에서는 경향을 유사했으나 상대적으로 변화의 폭이 작았다<Fig. 4-4(A)>.

돈육으로부터 스테인리스스틸로의 *Salmonella*의 전이율에 대한 2차 회귀식은 <Table 4-27>과 같으며, 이 식을 바탕으로 한 전이율에 대한 경향은 <Fig. 4-4(B)>과 같다. 낮은 온도에서는 초기에는 전이율이 높았지만 시간이 경과하면서 감소하였고, 온도가 상승하면서 전이율은 상대적으로 낮아지다 저점 후 다시 약간 높아지는 경향을 나타냈다.

돈육으로부터 컨베이어벨트로의 *L. monocytogenes* 전이율에 대한 2차 회귀식은 <Table 4-28>과 같다. 전이율 경향은 저온에서는 초기에 높았으나 시간이 지날수록 온도가 상승하면서 전이율은 상대적으로 낮아지는 경향을 나타냈다. 10℃에서는 초기에 전이율이 매우 낮은 상태였다가 60-80분경 약간 상승하다가 시가이 지나면서 다시 감소하였다<Fig. 4-5(A)>.

Table 4-26. Model of transfer rate of *Salmonella* spp. from pork to conveyor belt in pork processing room by RSM program

Dependent variables	The second order polynomial
Transfer rate (TR)	$TR = 0.0233446 + 0.004776 \times X_1 - 0.013865 \times X_2$ $- 0.000034721 \times X_1^2 + 0.000044133 \times X_1 \times X_2$

X₁: Time(min), X₂: Temperature(℃)

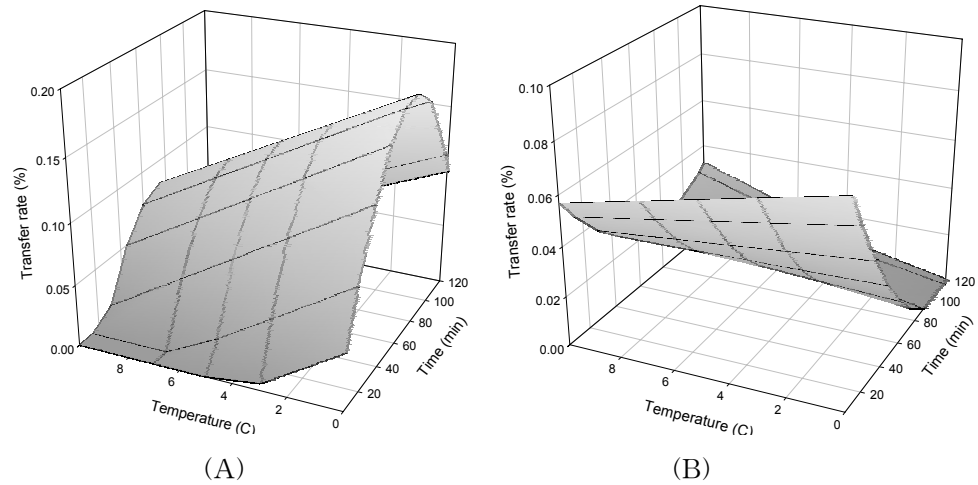


Fig. 4-4. Response surface transfer rate of *Salmonella* spp. from pork to conveyer belt (A), stainless steel (B) in pork processing room according to time and temperature as independent variables

Table 4-27. Model of transfer rate of *Salmonella* spp. from pork to stainless steel in pork processing room by RSM program

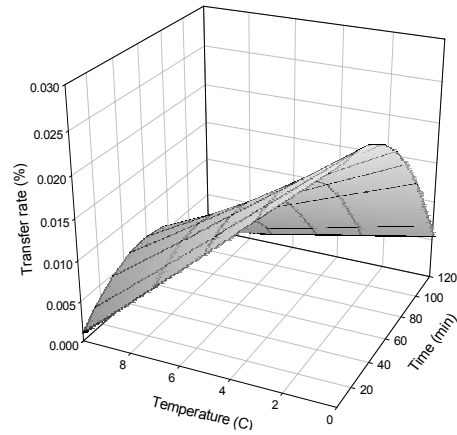
Dependent variables	The second order polynomial
Transfer rate (TR)	$TR = 0.087240 - 0.001573 \times X_1 - 0.002528 \times X_2$ $+ 0.000006758 \times X_1^2 + 0.000051433 \times X_1 \times X_2$

X₁: Time(min), X₂: Temperature(°C)

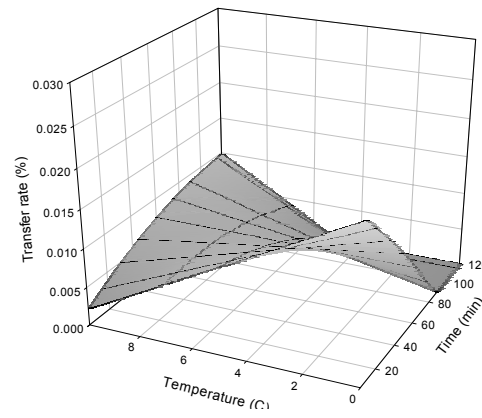
Table 4-28. Model of transfer rate of *L. monocytogenes* from pork to conveyor belt in pork processing room by RSM program

Dependent variables	The second order polynomial
Transfer rate (TR)	$TR = 0.026783 + 0.000036995 \times X_1 - 0.002673 \times X_2 - 0.000001789 \times X_1^2 + 0.000017249 \times X_1 \times X_2$

X₁: Time(min), X₂: Temperature(°C)



(A)



(B)

Fig. 4-5. Response surface transfer rate of *L. monocytogenes* from pork to conveyor belt (A), stainless steel (B) in pork processing room according time and temperature as independent variables.

돈육으로부터 스테인리스 스틸로의 *L. monocytogenes* 전이율에 대한 2차 회귀식은 <Table 4-29>와 같다. 전이율은 처음 0℃에서는 높았다가 시간이 경과하면서 급속히 낮아졌고, 온도가 상승하면서 처음 전이율은 낮았으나 시간 경과에 따라서 상승하는 반비례적인 경향을 보였다 <Fig. 4-5(B)>.

Table 4-29. Model of transfer rate of *L. monocytogenes* from pork to stainless steel in pork processing room by RSM program

Dependent variables	The second order polynomial
Transfer rate (TR)	$TR = 0.021019 - 0.000199 * X_1 - 0.001946 * X_2$ $- 0.000000476 * X_1^2 + 0.000032502 * X_1 * X_2$

X₁: Time(min), X₂: Temperature(°C)

4) 식품접촉면에서 돈육으로의 전이율 및 예측모델

식품접촉면에서 돈육으로의 전이율은 돈육에서 식품접촉면으로의 전이율보다 높게 나타났다 (p<0.001). 식품접촉면에서 돈육으로의 전이율 비교시 컨베이어벨트가 스테인리스 스틸보다 높았으며 (p<0.001), 균종간 비교에서는 *Salmonella* spp. (0.659%)가 *L. monocytogenes* (0.607%) 보다 약간 높았다(p<0.05). 시간별로는 30분 접촉시 가장 높았고, 시간 경과에 따라 감소추세를 보였다 (p<0.001), 온도는 10°C보다 5°C상태에서 약간 높은 전이율을 나타냈다 (p<0.001)<Table 4-30, 4-31>.

Table 4-30. Transfer rate of *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* from conveyor belt to pork in pork processing room

Bacteria	Treatment	Time (min)	Temperature (°C)	N	Transfer rate(%)	
					Mean	SD
<i>Salmonella</i> spp.	1	30	5	8	0.117 ^a	0.065
	2	30	10	8	0.102 ^a	0.073
	3	60	5	12	0.053 ^{ab}	0.019
	4	60	10	12	0.040 ^b	0.023
	5	120	5	12	0.087 ^b	0.084
	6	120	10	12	0.026 ^b	0.007
<i>Listeria monocytogenes</i>	1	30	5	8	0.086 ^a	0.026
	2	30	10	8	0.079 ^a	0.047
	3	60	5	6	0.096 ^a	0.035
	4	60	10	12	0.055 ^{ab}	0.022
	5	120	5	12	0.052 ^b	0.027
	6	120	10	12	0.030 ^b	0.017

Different letters within columns indicate a significant difference in transfer rates ($P < 0.05$)

Table 4-31. Transfer rate of *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* from stainless steel to pork in pork processing room

Bacteria	Treatment	Time (min)	Temperature (°C)	N	Transfer rate(%)	
					Mean	SD
<i>Salmonella</i> spp.	1	30	5	8	0.067 ^a	0.031
	2	30	10	8	0.047	0.030
	3	60	5	12	0.014 ^b	0.006
	4	60	10	12	0.040	0.031
	5	120	5	12	0.055 ^a	0.030
	6	120	10	12	0.030	0.017
<i>Listeria monocytogenes</i>	1	30	5	8	0.119 ^a	0.067
	2	30	10	8	0.133 ^a	0.066
	3	60	5	12	0.057 ^b	0.024
	4	60	10	12	0.042 ^b	0.021
	5	120	5	6	0.010 ^c	0.004
	6	120	10	12	0.065 ^b	0.026

Different letters within columns indicate a significant difference in transfer rates ($P < 0.05$)

컨베이어벨트에서 돈육으로의 *Salmonella* 전이율에 대한 2차 회귀식은 <Table 4-32>와 같다. 초기에 상대적으로 높았지만 시간이 지나면서, 온도가 상승하면서 전이율은 상대적으로 반비례하여 낮아지다가 저온의 경우 저점(약 70분) 통과 후 일정시간이 지나면서 다시 높아지는 경향을 나타냈다<Fig. 4-6(A)>. 스테인리스 스틸에서 돈육으로의 *Salmonella* 전이율 2차 회귀식은 <Table 4-33>과 같다. 초기에는 0~10°C에서 전이율이 높게 나타났으나, 시간경과에 따라 전이율은 조금 낮아지다 일정시간(60~80분) 경과시 다시 높아지는 경향을 보였다 <Fig. 4-6(B)>.

Table 4-32. Model of transfer rate of *Salmonella* spp. from conveyor belt to pork in pork processing room by RSM program

Dependent variables	The second order polynomial
Transfer rate (TR)	$\text{TR} = 0.198648 - 0.003467 \times X_1 + 0.002465 \times X_2$ $+ 0.0000025050 \times X_1^2 - 0.000117 \times X_1 \times X_2$

X₁: Time(min) X₂: Temperature(°C)

Table 4-33. Model of transfer rate of *Salmonella* spp. from stainless steel to pork in pork processing room by RSM program

Dependent variables	The second order polynomial
Transfer rate (TR)	$\text{TR} = 0.087156 - 0.001818 \times X_1 + 0.003083 \times X_2$ $+ 0.000013717 \times X_1^2 - 0.000052519 * X_1 \times X_2$

X₁: Time(min), X₂: Temperature(°C)

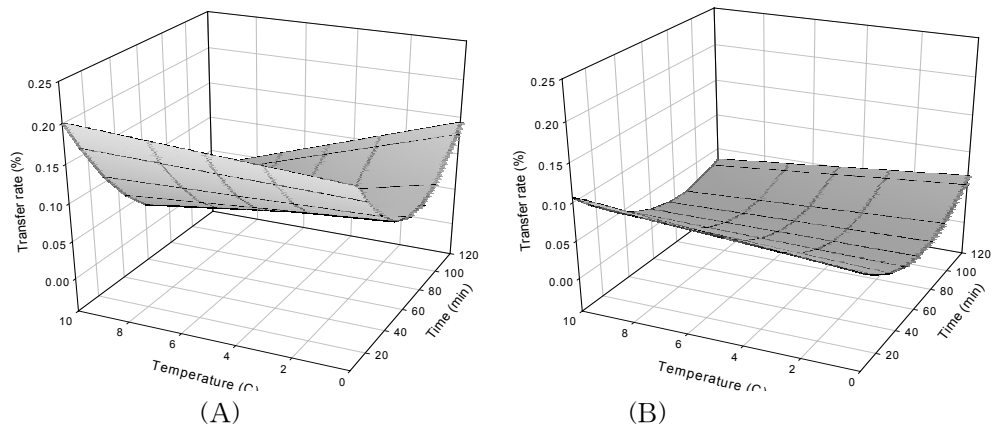


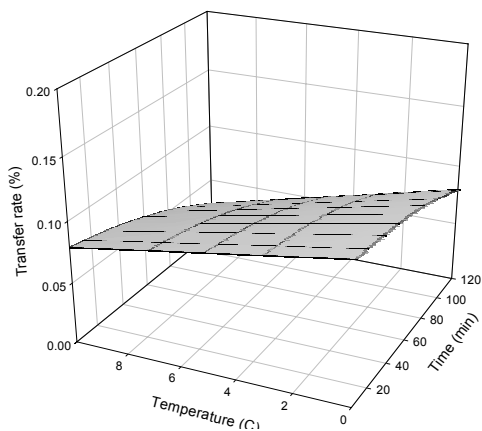
Fig. 4-6. Response surface transfer rate of *Salmonella* spp. from conveyor belt (A), stainless steel (B) to pork in pork processing room according to time and temperature as independent variables

컨베이어벨트로부터 돈육으로의 *L. monocytogenes* 전이율에 대한 2차 회귀식은 <Table 4-34>과 같다. 전이율은 초기에 높았지만 시간경과에 따라 낮아졌고, 온도가 상승하면서 전이율도 상대적으로 낮아지는 경향을 나타냈다 <Fig. 4-7(A)>. 스테인리스 스틸에서 돈육으로의 *L. monocytogenes* 전이율에 대한 2차 회귀식은 <Table 4-35>과 같으며, 초기에는 0~10°C에서 모두 전이율이 높았지만 시간이 지나면서 크게 감소하였다 <Fig. 4-7(B)>.

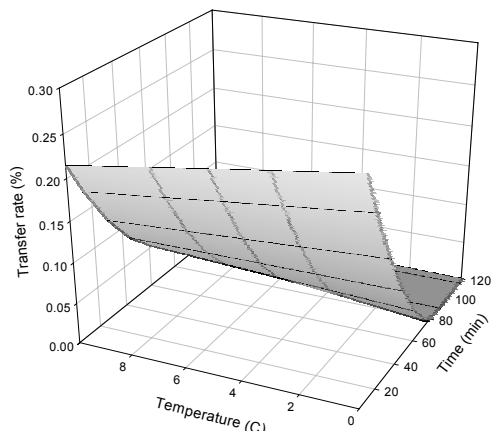
Table 4-34. Model of transfer rate of *L. monocytogenes* from conveyor belt to pork in pork processing room by RSM program

Dependent variables	The second order polynomial
Transfer rate (TR)	$TR = 0.114888 - 0.0000055841 * X_1 - 0.003462 * X_2$ $- 0.0000001966 * X_1^2 - 0.000014626 * X_1 * X_2$

X₁: Time(min), X₂: Temperature(°C)



(A)



(B)

Fig. 4-7. Response surface transfer rate of *L. monocytogenes* from conveyor belt (A), stainless steel (B) to pork in pork processing room with time and temperature as independent variables

Table 4-35. Model of transfer rate of *L. monocytogenes* from stainless steel to pork in pork processing room by RSM program

Dependent variable	The second order polynomial
Transfer rate (TR)	$TR = 0.290920 - 0.005809 * X_1 - 0.005381 * X_2$ $+ 0.000026452 * X_1^2 + 0.000117 * X_1 * X_2$

X₁: Time(min), X₂: Temperature(°C)

라. 모델검증

전이율 실험에 의한 결과값과 모델에 의한 예측값을 이용하여 상대오차(relative error)을 산출한 결과는 <Table 4-36>와 같다. 상대오차 절대값 평균이 0에 근접할수록 모델의 편차는 적게 되는 것으로, 각 모델의 검증 결과에서 컨베이어벨트에서 돈육으로의 전이율이 0.472로 나타나 12가지 예측모델중 가장 신뢰성이 높았으며, 돈육에서 스테인리스 스틸로의 전이율은 5.006으로 가장 높게 나타났다.

Table 4-36. Validation results for response surface models that predict transfer rate of *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes*

Model	Organism	Relative error (%)			
		MARE [®]	median	minimum	maximum
From skin to skin	SAL*	1.067	0.073	- 0.827	16.250
	LMO*	0.930	-0.150	- 0.901	25.894
From pork to pork	SAL	1.271	0.009	- 0.728	8.332
	LMO	4.738	0.396	- 2.409	30.781
From pork to conveyor belt	SAL	3.314	-0.028	- 0.718	58.045
	LMO	2.186	0.218	- 11.873	10.784
From pork to stainless steel	SAL	2.853	0.127	- 0.596	49.809
	LMO	5.006	-0.075	- 0.923	70.381
From conveyor belt to pork	SAL	1.007	0.060	- 0.616	14.809
	LMO	0.472	0.138	- 0.589	2.577
From stainless steel to pork	SAL	0.829	0.396	- 0.690	4.016
	LMO	0.499	0.143	- 0.397	2.171

* SAL: *Salmonella* spp., LMO: *L. monocytogenes*

[®] MARE : Mean absolute relative error

본 연구에서의 전이율과 같은 식품공정 중 교차오염에 대한 모델 개발은 최근에 이르러서야 발전하기 시작했으나 아직 초보단계를 벗어나지 못하고 있는 실정이다. 따라서 개발된 모델에 대한 검증은 다른 model에서 사용한 일반적인 기본원칙과 방법을 활용하여 단순히 모델에 의한 예측값과 실험 결과값만을 비교하였다. 바람직한 모델검증은 다른 문헌의 결과나 모델 개발에 활용되지 않은 다른 실험값을 이용하는 것이지만, 그 상응하는 자료들이 부족하여 현실적으로 불가능하며 따라서 단순비교를 통하여 검증을 시도하였다. 전이율 모델에 대한 실제적인 검증과 신뢰성 제고를 위해서는 이 분야에 대한 좀 더 다양한 연구가 요구된다.

제3절 공정내 위해미생물 생존 및 잔류 분석

1. 서론

본 연구는 돈육 포장 공정에서의 exposure assessment와 냉장돈육의 생산라인에서 병원성미생물의 안전성을 확보하기 위하여 돈육에서 가장 오염되기 쉬운 *Salmonella* spp.와 *L. monocytogenes*를 대상으로 생산현장에서 얻은 균주에 대한 성장 및 감소 정도를 비교하고 돈육포장공정 환경조건에서의 이들에 대한 성장 모델을 개발하는 것이다. 이와 같은 연구 결과는 돈육에서의 *Salmonella* spp.와 *L. monocytogenes*에 대한 QMRA를 수행할 시 생산과정에서의 불확실성을 감소시켜 더욱 정확한 결과를 추정하는데 크게 도움이 될 것이다.

2. 실험적 접근 방법

가. *Salmonella* spp.

1) 시험 균주

오염전이율 분석시 사용한 동일한 표준균주와 야생분리주를 사용하였다.

2) 시험균액의 제조

오염전이를 분석시 사용한 동일한 방법으로 시험균액을 제조 사용하였다.

3) 시료 돈육

냉장돈육 안심을 정육점에서 두께 0.5cm, 가로, 세로 각각 5cm의 크기로 자른 뒤 돈육에 존재하는 자연균총(background flora)을 제거하기 위하여 70% 에탄올로 10℃의 shaking incubator(Jisico Co.)에서 100 rpm으로 1분간 표면 살균처리하였다. 처리 후 clean bench에서 내부공기를 순환시키며 15분 정도 방치하여 표면의 수분을 제거한 후 시료로 사용하였다.

4) 실험 설계 및 균수 측정

포장돈육 공정에서 오염된 *salmonella*가 어느 정도 증식하는지를 알아보기 위한 성장예측모델을 개발하기 위하여 <Table 3-1>의 조사결과에 근거하여 온도와 시간을 주요 변수로 설정하였다. 배양온도는 0, 5, 10, 15, 20 ℃로 하고 배양시간은 0, 1, 2, 3, 18시간까지로 정하였다. 이들 요인에는 factorial design (5×5×3×2)을 적용하였고, 실험은 3회 이상 반복하였다. 표면살균 처리된 돈육을 1ℓ의 시험균액에 침지하여 100 rpm으로 30분 동안 shaking하면서 돈육에 시험균을 접종하였으며, 이 후 표면에 견고하게 접종되지 않은 균을 제거하기 위하여 멸균 증류수를 이용하여 3회 이상 세척하고 clean bench에서 건조시킨 후 실험방법에 따른 조건별로 배양하였다. 이때 일부 돈육은 배양시키지 않고 바로 시험하였으며 이를 계수하여 초기균수를 산정하였다.

각 조건별로 배양한 돈육을 멸균백에 넣고 0.1% BPW로 10배 희석하여 stomacher를 사용하여 균질화 하였다. 각각의 시료로부터 균질화된 용액 100μℓ를 취하여 xylose lysine deoxycholate (XLD) agar (Difco, Becton Dickinson and Company Sparks, USA)표면에 spiral plater를 이용하여 plating한 후 35℃에서 24시간 배양하고 균수를 산출하였다.

5) 성장곡선의 fitting과 parameter 산정 및 모델 검증

야생균주를 접종한 실험에서 성장이 나타난 온도 범위에서만 curve fitting을 실시하였으며, 성장곡선은 PRISM Ver 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)에서 non-linear regression program 중 다음의 Gompertz equation을 이용하여 fitting 하였다.

$$Y=A + C*\exp(-\exp((2.718*\mu/C)*(Lag-X)+1))$$

where A = log initial number of cells, C = difference between initial and final cell numbers, Lag = delay before growth, same units as X, μ = maximum specific growth rate, X = time, and Y = log cell number.

Fitting 결과 산출된 C, μ , and Lag를 이용하여 Gompertz parameter (Buchanan et al, 1990)중 B, M을 산출하고 이를 SAS response surface regression analysis(Statistical Analysis System, ver 8.1, Cary, NC, USA)에 적용하여 B, M에 대한 각각의 response surface model을 생성하였다. 최종적으로 A, C, B, M을 Gompertz function (Buchanan, 1990)에 적용하여 EGR(exponential growth rate, Log(cfu/g)/hr), GT(generation time, hr), LPD(lag phase duration, hr), MPD(Maximum population density, log (cfu/g/hr))와 온도와 시간에 따른 야생분리 *Salmonella*의 성장균수(Log cfu/g)를 산출하였다. 본 연구에서 개발된 모델에 대한 검증은 실험값과 예측값의 비교로 실시하였다. 또한 모든 data는 SAS(Statistical Analysis System, ver 8.1, Cary, NC, USA) GLM 분석에 의하여 통계적인 유의성을 검증하였다(P<0.05).

나. *L. monocytogenes*

1) 시험 균주

오염전이율 분석시 사용한 동일한 표준균주와 야생분리주를 사용하였다.

2) 시험균액의 제조

오염전이율 분석시 사용한 동일한 방법으로 시험균액을 제조 사용하였다.

3) 시료 돈육

Salmonella 시료돈육과 동일한 방법으로 처리하여 사용하였다.

4) 실험설계 및 균수 측정

L. monocytogenes 성장과 관련한 주요 환경인자는 온도와 시간으로 설정하였다. 배양온도는 포장돈육 공정 작업장과 유통중 저장온도를 고려하여 0, 5, 10, 15, 20 °C로 하였고, 배양시간 역시 돈육포장 공정 작업장과 유통중 저장온도를 고려하여 0, 1, 2, 3, 18, 48, 120시간까지로 정하였다. 이들 요인에는 factorial design (5×7×3×2)을 적용하였으며 각각의 실험은 3회 이상 반복하였다.

표면살균 처리된 돈육을 1 L의 시험균액에 침지하여 100 rpm으로 30분 동안 shaking하면서 돈육에 시험균을 접종하였으며, 이 후 표면에 견고하게 접종되지 않은 균을 제거하기 위하여 멸균 증류수를 이용하여 3회 이상 세척하고 clean bench에서 건조시킨 후 실험설계에 따른 조건별로 배양하였다. 이때 일부 돈육은 배양시키지 않고 바로

시험하였으며 이를 계수하여 초기균수를 산정하였다.

각 조건별로 배양한 돈육을 멸균백에 넣고 0.1% buffered peptone water로 10배 희석하여 stomacher로 균질화 하였다. 각각의 시료로부터 균질화된 용액 100 μ L를 취하여 Oxford listeria selective agar 표면에 Spiral Plater를 이용하여 plating한 후 25°C에서 48시간 배양하였고, 균수를 산출하였다. 최종 성장실험결과는 SAS의 ANOVA Duncan 검정 ($P < 0.05$)을 이용하여 통계적인 유의성을 검증하였다.

5) 성장곡선의 fitting과 parameter 산정 및 모델 검증

돈육에서의 *L. monocytogenes* 성장곡선은 실험결과를 바탕으로 Gompertz equation에 의해 생성하였다. Gompertz equation의 변수인 A, C, B, M은 Gauss-Newton iteration을 적용시킨 SAS의 non-linear regression 프로그램으로 산출하였다. 산출된 A, C, B, M을 이용하여 <Table 3-37> 식에 의거 대수성장율 (EGR: exponential growth rate, Log cfu/g/hr), 세대시간(GT: generation time, hr), 잠복기간(LPD: lag phase duration, hr), 최대균수(MPD: maximum population density, Log cfu/g/hr)를 계산하였다. B, M은 SAS의 response surface analysis에 의해 온도에 따른 회귀방정식을 산출하고, 이 회귀방정식을 Gompertz equation에 적용하여 온도와 시간에 따른 *L. monocytogenes*의 성장균수를 산출하였다. 개발된 모델 검증은 Smith-Simpson 등(2005) 등에서 사용한 방법을 이용하여 GT, LPD, EGR에 대한 실험값과 예측값의 비교를 통하여 실시하였다.

Table 4-37. Equations for Gompertz function and derived growth kinetics values

Gompertz's function

$$L(t) = A + C \exp(-\exp(-B(t-M)))$$

$L(t)$ = Log count of bacteria at time (in hours) t [Log(cfu/g)]

A = Asymptotic log count of bacteria as time decreases indefinitely
(i.e., initial level of bacteria [Log(cfu/g)])

C = Asymptotic amount of growth that occurs as t increase indefinitely
(i.e., number of log cycles of growth [Log(cfu/g)])

M = Time at which the absolute growth rate is maximal [hr]

B = Relative growth rate at M [Log(cfu/g)/hr]

Derived Growth Kinetics Equations:

Exponential growth rate (EGR) = BC/e [Log(cfu/g)/hr]

Generation time (GT) = $\text{Log}(2) \exp(1)/BC$ [hr]

Lag phase duration (LPD) = $M - (1/B)$ [hr]

Maximum population density (MPD) = $A + C$

3. 결과

가. 포장돈육 공정조건에서 *Salmonella* spp.의 성장예측 모델

1) 돈육에서의 *Salmonella* spp. 성장

야생균주는 0℃에서는 변화가 없었고($P>0.05$), 15, 20℃에서는 시간이 경과할수록 오히려 감소하는 경향을 나타냈다($P<0.05$). 그러나 5, 10℃의 경우는 약간의 성장을 보였다($P<0.05$) <Table 4-38>. 표준균주는 0℃에서 분리주와 마찬가지로 유의한 성장을 나타내지 않았으며($P>0.05$), 20℃를 제외한 나머지 온도에서 감소를 보였다($P<0.05$). 표준균주를 이용한 실험 결과는 Mann 등(2004)의 결과와 유사하였다. 그러나 야생분리주는 오히려 20℃에서 큰 감소를 나타냈고 5℃와 10℃에서 약간의 성장을 나타냈는데, 이러한 차이는 균주의 차이로 인한 결과로 보여진다.

2) 성장예측 모델

야생분리주의 5℃와 10℃에서의 성장곡선은 non-linear Gompertz equation에 의해 fitting 되었다<Fig. 4-8>. 성장곡선에 대한 R^2 값은 5℃에서는 0.9846이고 10℃에서는 0.9866로 나타나 돈육에서 야생분리주의 성장 data는 non-linear Gompertz equation에 잘 맞는 것으로 나타났다. <Table 4-39>은 growth curve fitting과 Gompertz function에 의해 생성된 야생분리주의 growth parameter 즉, C, EGR, LPD, GT, MPD를 나타낸 것이다. Gompertz C value는 5℃와 10℃간의 차이가 거의 없는 0.72 log cfu/g으로 나타났다. 이는 두 온도 사이의 성장정도에 큰 차이가 없는 것으로 볼 수 있으며 따라서 MPD의 경우도 통계적으로 유의하지 않는 수준($p>0.05$)으로 나타났다. 이는 C와 MPD는 온도의 영향을 거의 받지 않는 것으로 이전에 확인된 Gibson 등(1988)과 Buchanan 등(1990)의 연구와 같은 결과를 보였다. 저온 조건하에서 C value의 값이 아주 낮은 것은 성장이 일어나기는 하지만 아주 낮으며 최대 성장도 1 log cfu/g 이하로 추정되었다. LPD의 경우 온도가 5℃에서보다 10℃에서 더 높은 것으로 나타났으며, <Fig. 4-9>의 predictive model에서는 온도가 증가하면서 LPD는 높아지는 것으로 나타났는데, 이는 사전에 낮은 온도에서 생육했던 야외분리주의 특성으로 보아야 할 것이다. 하지만 EGR과 GT의 경우는 다른 predictive model에서 추정된 것과 유사한 결과를 보였는데, EGR의 경우 온도와 비례하고 GT의 경우 반비례하는 것으로 나타났다. 따라서 환경유래 균주의 경우 LPD는 그 균이 사전에 생육했던 온도 조건에 영향을 받지만 한편으로는 background flora의 영향을 받는 것으로 보고한 John 등(1969)의

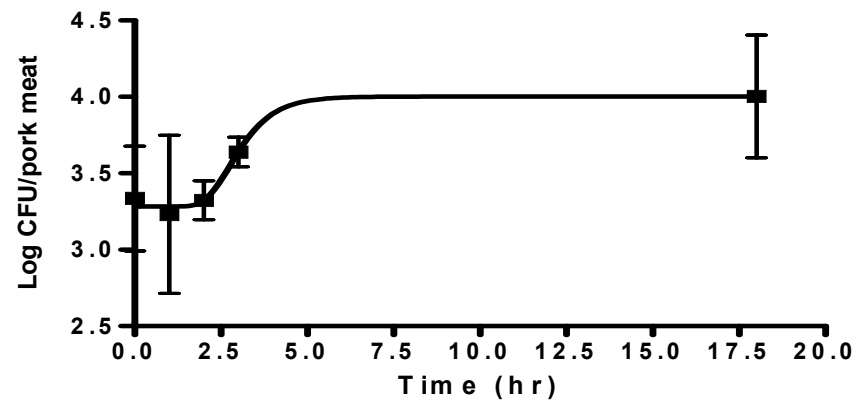
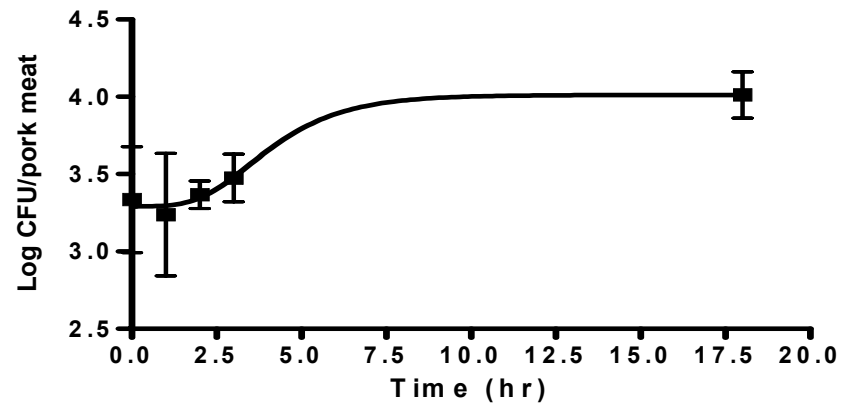
연구결과를 참고한다면, 본 연구의 경우 사전에 background flora를 어느 정도 제거한 상태에서 수행한 결과로 만약 이를 제거하지 않았다면 LPD는 Mann 등(2004)의 비교실험 결과에서와 같이 더욱 감소될 것으로 추정된다.

PMP(Pathogen Modeling Program, Ver 7.0, USDA, ERS)를 이용한 Gibsion 등(1988)의 모델과 비교시 10°C의 경우 LPD 36.1 hr, GT 11.5 hr에 비하여 본 연구에서 사용한 야생분리주는 훨씬 빠른 LPD와 GT를 나타냈는데 이는 표준균주와 야생분리주 그리고 broth와 돈육의 차이로 인한 것으로 볼 수 있다.

<Table 4-40>는 돈육에 접종된 야생분리주에 대한 Gompertz function 중 B와 M값에 대한 response surface regression 분석결과다. 비록 R² 값이 높게 나오지는 않았지만 통계적으로 유의한 것으로 나타났다(P<0.01). 이 반응식을 Gompertz식에 적용시켜 <Fig. 4-9>에서와 같이 특정온도에서 시간에 따른 *Salmonella* spp.의 성장정도를 추정할 수 있는 성장예측모델을 개발하였다. 모델에 대한 검정은 Sarah 등(2005)의 방법을 적용 실험값과 예측값의 비교를 통하여 실시하였다. 그 결과는 <Fig. 4-10>에서 보는 바와 같이 실험값과 예측값이 ±0.5 log cfu/g 내에서 일치하고 있어 개발된 모델의 신뢰성은 높은 것으로 판단된다.

(A)
(B)

Fig 4-8. The Gompertz-fitted growth curves for wild-type *Salmonella* spp. on pork surface exposed to 5°C (A) and 10°C (B). R² for growth curve fits are 0.9846 and 0.9866, respectively. These curves were fitted using the Gompertz function by nonlinear regression of PRISM V 4.0.



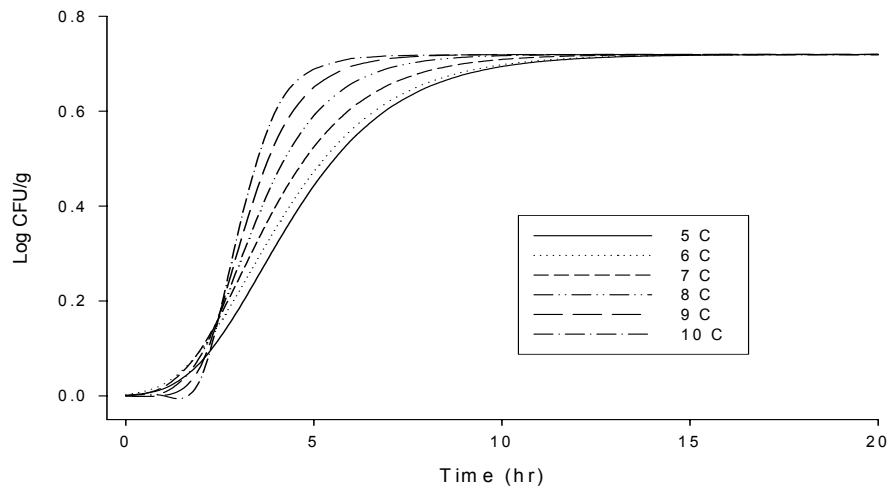


Fig. 4-9. The predicted response surface model of growth for wild-type *Salmonella* spp. on pork surface exposed to 5°C through 10°C.

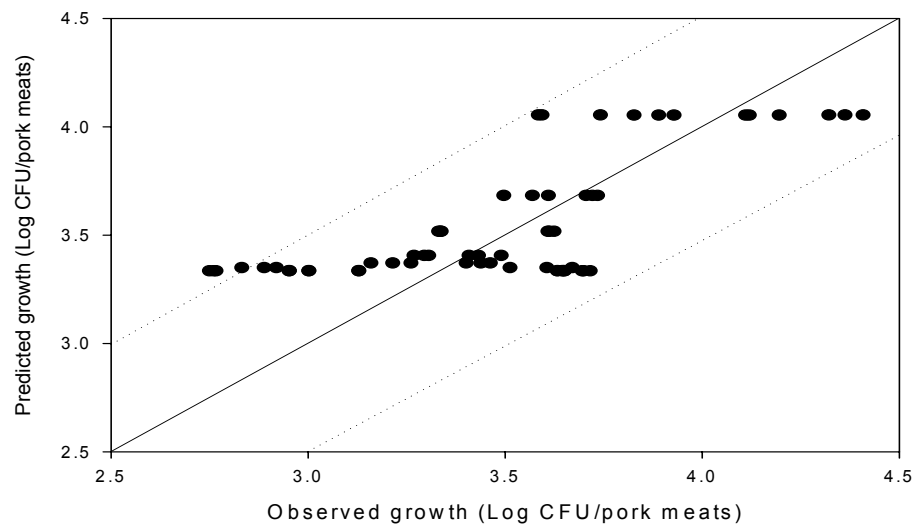


Fig 4-10. Predicted versus observed growth values for wild-type *Salmonella* spp. on pork surface at 5°C and 10°C. Dotted lines represent 0.5 log CFU/pork.

Table 4-38. Difference of reduction and growth of wild-type *Salmonella* spp. and standard type *S. typhimurium* IFO14193 on pork exposed at 0, 5, 10, 15, and 20°C.

Time(h)	Population (log CFU/g) ^a									
	Native type <i>Salmonella</i> spp. KSC101					Standard type <i>S. typhimurium</i> IFO14193				
	0	5	10	15	20	0	5	10	15	20
0	3.34A	3.34A	3.34A	3.34A	3.34A	2.85A	2.85A	2.85A	2.85A	2.85A
1	3.23A	3.24A	3.23A	3.47A	3.42A	2.89A	3.06A	3.07A	3.03A	3.16B
2	3.38A	3.37A	3.33A	3.24B	3.23B	2.80A	2.96A	3.01A	2.94A	3.30B
3	3.48A	3.50B	3.64B	3.27B	3.22B	2.82A	2.57B	2.86A	2.59B	3.28B
18	3.35A	4.01C	4.00C	2.91C	1.96C	2.71A	2.44B	2.35B	2.46B	3.75C

^a Different letters for values in same column indicate statistically significant differences (P<0.05).

Table 4-39. Estimated growth parameters of wild-type *Salmonella* spp. KSC101 inoculated on pork surface (Mean±S.D.)

Temp. (°C)	A* (log cfu/g)	C** (log cfu/g)	Exponential growth rate [log (cfu/g)/hr]	Lag phase duration (hr)	Generation time (hr)	MPD*** (log cfu/g)
5	3.34 ± 0.34	0.72 ± 0.20	0.14 ± 0.04	1.92 ± 1.05	1.12 ± 0.61	4.01 ± 0.13
10	3.34 ± 0.34	0.72 ± 0.66	0.30 ± 0.07	2.04 ± 0.46	0.52 ± 0.87	4.11 ± 0.37

* A: Initial level

** C: The number of log cycles of growth

*** MPD: Maximum population density (=A+C)

Table 4-40. Response surface models for effect of temperatures (T) on B and M values of Gompertz function of wild-type *Salmonella* spp. KSC101 on pork surface

Parameter	B [log (cfu/g)/hr]			M (hr)		
	Estimate	t (F)*	Pr > t , F*	Estimate	t (F)*	Pr > t , F*
Intercept	1.8378	1.50	0.1762	5.7179	3.92	0.0058
T	-0.4849	-1.38	0.2090	-0.5486	-1.31	0.2313
T X T	0.0442	1.89	0.1008	0.0254	0.91	0.3938
R ²	0.8245	16.44*	0.0023*	0.7540	10.17*	0.0085*

나. 포장돈육 공정조건에서 *L. monocytogenes*의 성장예측 모델

1) 돈육에서의 *L. monocytogenes* 성장

돈육에서의 *L. monocytogenes* 성장은 <Table 4-41>에서 보는 바와 같이 20℃를 제외한 대부분의 온도에서는 접종 후 3시간까지는 성장경향을 나타내지 않았으며 일부 온도 범위에서는 약간씩 감소하는 것으로 나타났다. 특히 0℃의 경우는 처음부터 감소하는 것으로 나타났으며, 5℃와 10℃의 경우, 18시간 이후부터는 각각의 온도범위별로 증가하는 경향을 나타냈고, 특히 48시간 이후의 증식은 통계적으로 유의한 수준이었다. 이는 실험에 이용한 야외분리 *L. monocytogenes*가 낮은 온도의 돈육포장 공정에서 유래하였기 때문인 것으로 추정되었다. 본 연구의 실험결과에서와 같이 여러 연구 논문에서 *L. monocytogenes*는 10℃ 이하의 냉장 저장 중인 여러 식육 및 가공식품에서 성장하는 것으로 알려져 있다(Grau, 1988; El-Shenaway, 1988). 따라서 돈육의 저장 및 유통과정에서 냉장온도를 잘 관리하더라도 시간 경과에 따라서 *L. monocytogenes*는 증식이 가능하므로, 돈육 생산단계에서의 안전성 확보와 유통과정상의 위생적인 취급의 중요성이 확인

되었다. 한편 15℃와 20℃의 경우도 18시간 이후부터는 성장이 크게 증가하는 것으로 나타났다.

Table 4-41. The growth of *L. monocytogenes* inoculated on pork during storage at different temperature¹⁾

Time (hr)	Temperature (℃)				
	0	5	10	15	20
0	2.74(0.01) ^A	3.49(0.02) ^A	3.75(0.03) ^A	2.40(0.03) ^A	3.87(0.03) ^A
1	2.71(0.18) ^A	3.50(0.15) ^A	3.53(0.05) ^A	2.58(0.20) ^{AB}	3.84(0.27) ^A
2	2.74(0.10) ^A	3.53(0.09) ^A	3.45(0.07) ^A	2.51(0.16) ^{AB}	3.96(0.08) ^A
3	2.61(0.14) ^B	3.52(0.07) ^A	3.69(0.09) ^A	2.64(0.05) ^B	4.56(0.08) ^B
18	2.62(0.16) ^B	3.57(0.07) ^A	3.65(0.18) ^A	3.99(0.12) ^C	4.91(0.10) ^B
48	2.40(0.15) ^C	4.17(0.06) ^B	4.40(0.14) ^B	4.59(0.05) ^C	
120		5.36(0.05) ^C	5.78(0.04) ^C		

¹⁾ Log cfu/g, Mean(S.D.), different letters within columns indicate a significant difference in microbial counts (P<0.05)

2) 성장예측모델

병원성미생물의 성장에 관한 모델은 probability-based model과 kinetics-based model의 두 가지로 구분된다. Probability-based model은 주로 포자형성균에 적용하며, kinetics-based model은 비포자형성균에 적용한다(Buchanan, 1992). 따라서 비포자형성균인 *L. monocytogenes*에 대해서 kinetics-based model을 사용하였다. Kinetics-based model에는 square root, linear Arrhenius, non-linear Arrhenius model 등이 있으며, 이들 모델 중 square root model이 가장 광범위하게 연구되어 왔다. Square root model은 성장에 관계하는 여러 인자 중에서 온도만을 이용한 것으로, 대상 병원성균의 적정 성장 온도조건에서 growth rate와 lag phase duration만을 산출할 수 있는 단순한 linear model이다(Buchanan, 1993). 위 모델들은 온도 등 단순한 인자만을 이용하는 모델이지만 이들 모델에 비하여 Gompertz equation은 여러 환경인자를 고려하기 위하여 polynomial 또는 response surface regression 등 통계적인 접근을 시도하고 있다. 여기에 best-fit을 나타내기 위한 non-linear regression의 접목으로 여러 다양한 인자들을 동시에 고려하는 모델 생성을 가능하게 해주어 많이 이용되고 있다.

<Table 4-42>는 성장예측모델 생성을 위한 온도에 따른 "best fit"된 Gompertz 값이며 A, C, B, M 값과 이를 통해 산출된 EGR, GT, LPD, MPD 값이다. 0℃의 경우는 성장을 하지 않은 no growth로 나타나 Gompertz 값을 산출할 수 없었다. LPD는 미생물이 새로운 환경에 적응하고 성장을 시작하기 위하여 주위환경에 적응하는 기간으로 볼 수 있다. 본 연구에서 LPD는 5℃에서 가장 높은 43.32 시간을 나타냈고, 온도가 증가할수록 점차 감소하여 20℃에서는 16.5시간을 나타냈다. 이러한 결과는 표준균주를 사전에 5℃에서 pre-incubation시킨 후 다시 5℃ tryptose phosphate broth에서 LPD 값을 측정한 Buchanan 등(1991)의 결과인 36.8±12.0 시간과 어느 정도 유사한 것으로 볼 수 있으나, 20℃에서는 16.57 시간으로 Buchann 등(1991)의 결과인 36.7±3.7 시간보다 낮게 나타났다. 이는 표준균주와 야생균주 그리고 broth와 돈육의 차이로 인한 것으로 사료된다. GT의 경우도 LPD와 마찬가지로 온도조건이 높아질수록 그 값이 점점 낮아지는 경향을 나타냈으며, EGR의 경우는 반대로 온도가 높아질수록 점점 높아지는 경향을 나타냈다. MPD는 온도의 영향을 거의 받지 않는 것으로 확인할 수 있었다. GT, EGR, MPD는 LPD와 달리 broth 에서 표준균주를 이용한 실험결과들과 유사하였다.

Gompertz 값 B와 M을 이용하여 온도를 주요 환경인자로 선정한 surface-response 분석 결과는 <Table 4-43>와 같다. 모델적합성 (R^2)이 M값의 경우 0.9482, B값의 경우는 0.9266 으로 높게 나타났으며, 또한 M, B 값 모두 통계적으로 모두 유의하였다($P < 0.01$). 이 반응식을 Gompertz 식에 적용시켜 특정시간에서 온도변화에 따른 냉장돈육에서의 *L. monocytogenes* 성장예측 모델을 다음과 같이 개발하였다.

$$L(t) = A + C \exp(-\exp(-B(t-M)))$$

A = Initial contamination level

C = MPD - A

MPD = 9 Log cfu/g

B = $0.046687 + (0.018544 \times \text{Temp}) - (0.000260 \times \text{Temp} \times \text{Temp})$

M = $76.563928 - (4.328653 \times \text{Temp}) - (0.073900 \times \text{Temp} \times \text{Temp})$

t = Time

Temp= temperature

일련의 미생물 성장실험결과에 의해 개발된 모델은 기존의 문헌이나 새로운 실험결과들에 의해 그 적합성을 검증하여야 한다. 개발된 모델에 대한 검증방법은 두 가지로 나눌 수 있는데 그 하나는 특정한 조건에서의 미생물 증식 값을 기존의 다른 모델과 비교하는 방법이고 다른 하나는 특정한 조건에서의 개발된 모델의 증식 값과 직접 실험에 의한 결과 값을 비교하는 방법이다. 본 연구에서는 개발된 모델에 대한 검증방법으로 GT, LPD, EGR에 대한 실험값과 예측값을 비교

하였다. 그 결과는 <Fig. 4-11, 4-12, 4-13>에서 보는 바와 같이 실험값과 예측값이 어느 정도 일치하고 있어 모델에 대한 신뢰성이 높은 것으로 판단된다. 즉, GT의 경우 상관계수 (r) = 0.99324, 모델 적합성 (R^2) = 0.9865로, LPD의 경우는 $r = 0.99835$, $R^2 = 0.9967$, EGR의 경우는 $r = 0.99291$, $R^2 = 0.9859$ 로 나타났고 GT, LPD, EGR 모두 통계적으로 유의하였다($P < 0.01$).

Table 4-42. Effect of initial number of *L. monocytogenes* at different temperatures on growth kinetics of pork

Temp. (°C)	Gompertz value ¹⁾				LPD (hr)	EGR (Log cfu/g/hr)	GT (hr)	MPD (Log cfu/g)
	A	C	B	M				
5	3.73 (0.03)	5.27 (0.06)	0.15 (0.03)	50.01 (1.25)	43.32 (0.60)	0.29 (0.05)	28.83 (0.33)	9.00 (0.02)
10	3.75 (0.07)	5.37 (0.05)	0.21 (0.04)	38.15 (1.58)	33.33 (1.04)	0.41 (0.02)	21.17 (1.65)	9.12 (0.05)
15	2.40 (0.14)	5.73 (0.11)	0.28 (0.01)	28.13 (0.17)	24.5 (0.14)	0.58 (0.03)	17.04 (0.22)	8.13 (0.06)
20	3.78 (0.03)	5.55 (0.10)	0.32 (0.04)	19.68 (1.54)	16.57 (0.73)	0.65 (0.05)	14.01 (1.01)	9.28 (0.01)

1) A = Log cfu/g, C = Log cfu/g, B = Log cfu/g/hr, Mean(S.D.), M = hr.

Table 4-43. Effects of temperature on growth of *L. monocytogenes* in pork by Response Surface Model

$$M = 76.563928 - 4.328653 * \text{Temp} - 0.073900 * \text{Temp} * \text{Temp}$$

R² = 0.9482
 F value : 22.47
 Pr > F : 0.0014

Parameter	DF	Estimate	Standard error	t Value	Pr > t
Intercept	1	76.563928	15.074346	5.08	0.0010
Temp	1	-4.328653	2.272186	-1.91	0.0932
Temp*Temp	1	0.073900	0.072718	1.02	0.3393

$$B = 0.046687 + 0.018544 * \text{Temp} - 0.000260 * \text{Temp} * \text{Temp}$$

R² = 0.9266
 F value : 13.14
 Pr > F : 0.0067

Parameter	DF	Estimate	Standard error	t Value	Pr > t
Intercept	1	0.046687	0.101641	0.46	0.6582
Temp	1	0.018544	0.015321	1.21	0.2607
Temp*Temp	1	-0.000260	0.000490	-0.53	0.6103

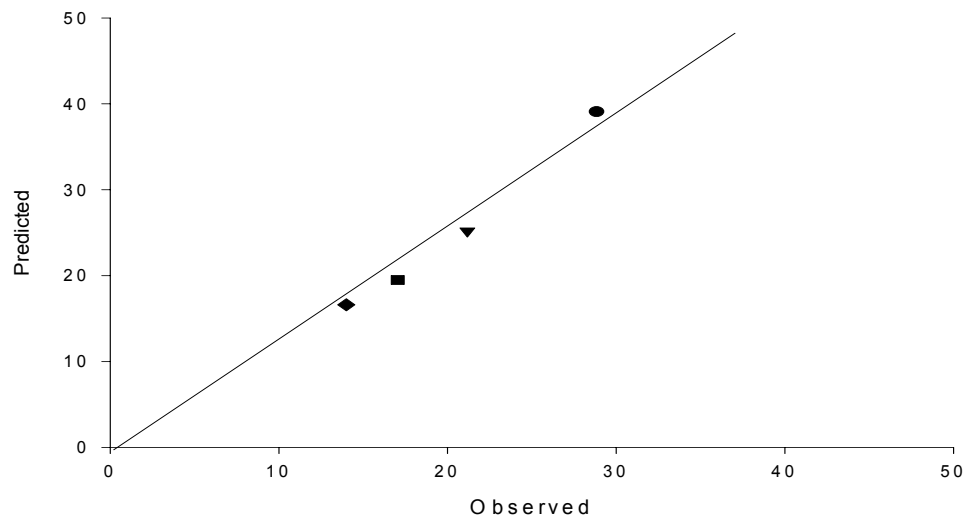


Fig. 4-11. Comparison of observed and predicted GT (hour) for *L. monocytogenes* at various temperatures (●: 5°C, ▼: 10°C, ■: 15°C, ◆: 20°C). $r = 0.99324$, $R^2 = 0.9865$.

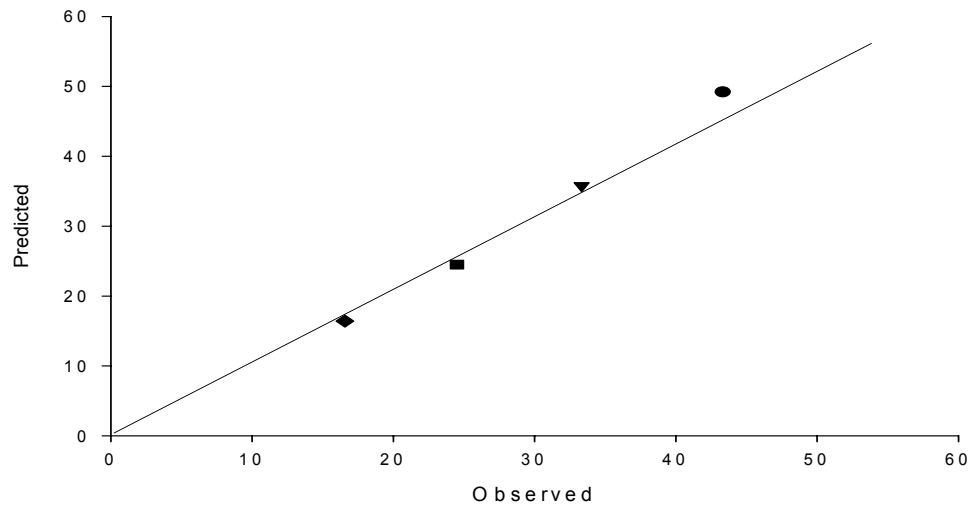


Fig. 4-42. Comparison of observed and predicted LPD (hour) for *L. monocytogenes* at various temperatures (●: 5°C, ▼: 10°C, ■: 15°C, ◆: 20 °C). $r = 0.99835$, $R^2 = 0.9967$.

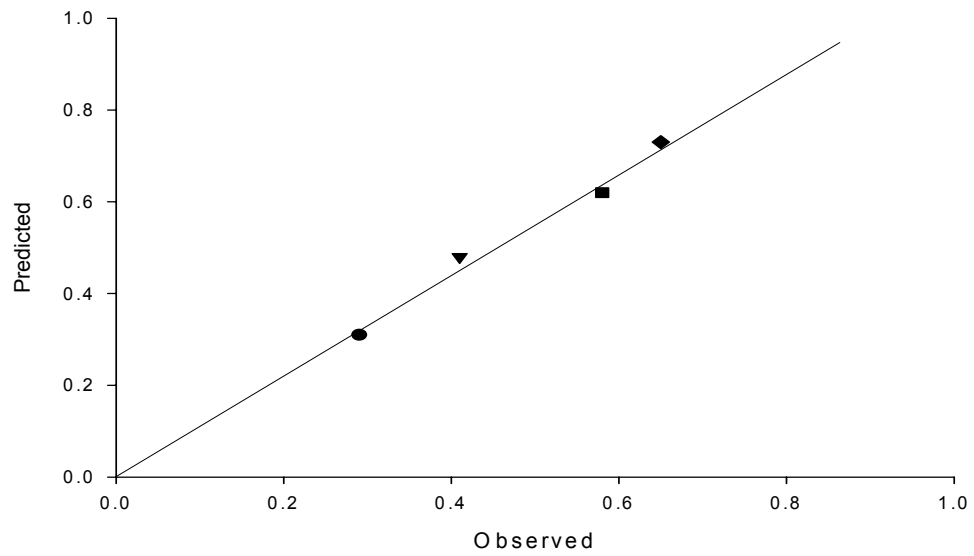


Fig. 4-43. Comparison of observed and predicted EGR (Log cfu/g/hr) for *L. monocytogene* at various temperatures (●: 5°C, ▼: 10°C, ■: 15°C, ◆: 20°C). $r = 0.99291$, $R^2 = 0.9859$.

제5장 오염발생 예측 시스템(Microbial Hazard Exposure Model)개발 및 평가

제1절 오염발생 예측용 소프트웨어 핵심기술 개발

1. 모델 핵심기술 구성 개요

돈육 및 포장돈육공정에서의 *Salmonella, L. monocytogenes* 오염수준 추정을 위한 예측용 소프트웨어 핵심기술 개요는 frame-work model과 같다. 앞서 제4장 제1절에서 설명한 바와 같이 본 모델은 도축 후 냉장된 돈육의 입고에서부터 유통되기 직전의 냉장 저장까지의 연속된 경로로서 도축된 냉장돈육에서의 초기오염수준 단계(node 1), 돈육 포장공정에서의 성장 및 교차오염단계(node 2), 포장 후 유통되기 직전의 저장단계에서의 성장단계(node 3)로 총 3개의 node로 구성되어 있다.

2. 확률분포 모델 선정

각각의 단계에서 이용된 수식과 입력변수는 Excel (Microsoft@Excel 2000, Microsoft Corp., Redmond, WA, USA) spreadsheet 프로그램으로 작성하였으며, 본 모델은 확률분포 모델 이론을 기본적으로 적용한 stochastic 모델로서 Monte Carlo simulation에 의하여 분석되었다. 또한 입력 값과 출력 값은 본 모델에 존재할 수 있는 불확실성과 다양성을

나타내기 위하여 확률분포의 개념으로 표현되었다. 각각의 node에서 이용된 확률분포모델은 이용 가능한 자료를 바탕으로 @RISK (Version 4.5, Palisade, Newfield, NY, USA)에서 fitting을 거쳐 최종적으로 선정하였다.

확률분포 모델은 분석 및 조사결과에서 존재할 수 있는 불확실성과 변이성을 최소화하기 위해 사용되었으며, 본 연구에서는 실험 및 조사결과에 따라 조건별 혹은 특성에 따라 변형하여 다음과 같은 확률분포 모델을 이용하였다.

Beta distribution - Beta 분포는 시행의 수 n 가운데 성공으로 기록된 수를 r 로 표시할 때, 어떤 사건의 발생할 확률을 결정하는데 사용되는 확률분포로 본 연구에서는 돈육중의 *Salmonella*, *L. monocytogenes*의 발생수준을 추정하기 위하여 이용하였다.

Normal distribution - 정규분포는 평균 (μ)과 표준편차 (σ)를 구할 수 있는 자료의 범위내에서 사용되었으며 format는 normal (μ, σ) 이다. 본 연구에서는 돈육포장 공정 및 저장 중 돈육온도를 추정하기 위하여 이용하였다.

Triang distribution - Triang 분포는 범위 ($a \sim c$)와 범위 (b)내의 most likely value가 추정될 수 있는 경우에 사용되는 분포로 format은 triang (minimum, most likely, maximum)이다. 실제적인 조사결과나 실험결과에 의한 것보다는 전문가의 의견을 반영할 경우에 사용하였다. 본 연구에서는 가공실의 온도, 가공시간을 추정하기 위하여 이용하였다.

Poisson distribution - Poisson 분포는 발생 가능성이 낮은 사건 사이의 시간 T 에서의 사건 발생 수를 모델화하기 위해 사용되는 확률분포로 지수분포에서 λ 가 사건사이의 평균시간이라면 $\lambda = T/\beta$ 로 하여 format은 poisson (λ)이다. 본 연구에서는 돈육중 *Salmonella*, *L. monocytogenes*의 오염농도를 추정하기 위하여 이용하였다

3. 핵심기술 구성

Frame-work module에서의 입력변수 중 controlling factor(CF)선정은 현장에서의 작업조건 및 발생수준에 대한 오염수준 분석을 토대로 결정하였다. 1차 적인 조건으로 작업장 온도와 작업시간이 포장돈육 공정중에서 변이가 가장 크고 최종제품에 대한 *Salmonella, L. monocytogenes* 등 병원성미생물의 오염에 중요한 영향인자로 나타나 이들을 CF로 선정하였다. 이들 CF를 바탕으로 입력변수와 출력변수를 포함하는 핵심 모델을 작성하였다<Table 5-1>. 이 핵심모델에는 포장공정에서 원료돈육의 *Salmonella, L. monocytogenes* 초기 오염수준과 작업장 온도와 작업시간을 입력변수로 하였고, 출력변수로는 포장 후 *Salmonella, L. monocytogenes*의 성장률을 출력변수로 하여 최종제품에의 오염수준을 추정할 수 있도록 구성하였다. 이 핵심모델을 바탕으로 각 단계에서 필요로 하는 자료와 확률분포모델 및 성장예측모델에 대한 배열을 나타내어 최종적으로 시뮬레이션을 수행할 수 있는 포장돈육 공정에서의 *Salmonella, L. monocytogenes* 발생에 대한 exposure-simulation model(소프트웨어 핵심기술)을 작성하였다.

Node 1 - 이 단계는 냉장돈육에서의 초기오염수준 단계로 입력변수로는 초기 오염수준에 대한 모니터링에 대한 결과이며, 모니터링 결과에 있어 정량적인 자료 도출의 어려움으로 인하여 정성적인 자료를 입력변수로 하였다. 초기 오염수준에 대한 모니터링에 대한 결과는 제3장에서 제시한 결과를 이용하였다. 돈육에서의 *Salmonella, L. monocytogenes* 초기 오염수준에 대한 확률분포모델은 beta 분포를 사용하였다. 모니터링 결과와 beta 분포의 결과는 바탕으로 다음 식에 의거 정량적인 값으로 전환하였다.

$$QL = -LN(1-Beta(p+1, n-p+1))/V$$

QL: Quantitative level

LN: Natural logarithms

Beta: Beta distribution

p: the number of positive samples

n: the number of total samples

V: sample volumes

전환된 정량적인 값은 현실에 존재할 수 있는 불확실성을 최소화하기 위하여 poisson 분포를 통해 최종적인 원료돈육에서의 오염수준을 산출하였다.

Node 2 - 이 단계는 포장돈육공정에서의 성장 및 교차오염단계로 작업장의 온도, 작업시간을 입력변수로 하였다. 작업장에서의 작업장 온도와 시간은 작업공정 및 환경에 대한 조사결과(제3장 제1절)를 바탕으로 작업장 온도의 경우는 최소, 평균, 최대값을 산출하였고 확률분포모델로는 이 값들을 이용할 수 있는 triang distribution으로 선정하였다. 그리고 이들 온도를 바탕으로 돈육의 표면 온도를 추정할 수 있는 response surface equation을 작성하였으며 그 식은 다음과 같이 설정하였다

$$PSt = 6.043 + 1.087tm - 0.019tm^2$$

PSt: 돈육표면 온도

tm: 작업장 온도

작업시간의 경우는 평균과 표준편차를 산출하여 normal 분포를 이용하였다. 포장돈육 공정에서 발생하는 작업환경유래 전이율모델(제4장 제2절)의 결과를 바탕으로 돈육에서 돈육으로, 돈육에서 스테인리스스틸 또는 컨베이어벨트로, 그리고 역으로 이들 스테인리스스틸 또는 컨베이어벨트에서 돈육으로의 교차오염만을 포함하였다. 돈육에서의 *Salmonella*, *L.*

monocytogenes 초기 오염수준에서와 마찬가지로 환경오염의 경우도 확률분포모델은 beta 분포를 사용하였으며 2장 2절에서 제시한 모니터링 결과를 바탕으로 beta 분포의 결과를 node 1에서 이용된 식에 의거 정량적인 값으로 전환한 후 불확실성을 최소화하기 위하여 poisson 분포를 통해 최종적인 환경유래오염수준을 산출하였다. 그리고 작업장 온도 및 작업시간 조건에서 성장 및 생존을 예측할 수 있는 성장예측모델(제4장 제3절)을 이용하여 성장의 정도를 추정하였다. 최종적으로 node 1에서의 초기오염수준, node 2에서의 환경유래 오염수준과 성장정도를 합하여 포장돈육에서의 최종 오염수준을 산출하였다.

Node 3 - 이 단계는 포장 후 유통되기 직전의 냉장 저장과정에서의 성장단계로 입력변수는 저장시의 온도, 저장시간으로 하였다. 저장고에서의 온도와 시간은 작업공정 및 환경에 대한 조사결과(제3장 제1절)를 바탕으로 저장 온도의 경우는 최소, 평균, 최대값을 산출하였고 확률분포모델로는 이 값들을 이용할 수 있는 triang distribution으로 선정하였으며, 저장시간의 경우는 평균과 표준편차를 산출하여 normal 분포를 이용하였다. 내부 모델로는 이들 저장온도 및 시간에서 성장 및 생존을 예측할 수 있는 성장예측모델 (제4장 제3절)을 이용하여 최종적인 성장의 정도를 추정하였으며 node 2의 최종결과(포장 후 오염수준)과 성장의 결과를 합하여 저장된 돈육에서의 *Salmonella*, *L. monocytogenes*의 최종 오염수준을 산출하였다.

표 5-1. Description and distribution of variables for *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* of the Microbial Hazard Exposure Model for pork in pork processing plant

Variables	Definition	Unit	Distribution/Model
-----------	------------	------	--------------------

Raw pork			
<i>Pi</i>	Prevalence of SAL, LMO in pork		Beta(p+1, n-p+1) ^{a)}
<i>Ci</i>	Concentration of SAL, LMO in pork	cfu/g	$= -\text{LN}(1-Pi)/V^b)$
<i>CL</i>	Contamination level of SAL, LMO in pork	cfu/g	Poisson (<i>Ci</i>) (node 1)
Cutting plant			
<i>t</i>	Processing time	Hour	Triang(0.15, 0.42, 2.0)
<i>tm</i>	Room temperature	°C	Normal(14.5, 4.1)
<i>Pst</i>	Pork surface temperature	°C	$6.043+1.087tm-0.019tm^2$
Environmental contamination			
<i>Pe</i>	Prevalence of SAL, LMO in environment		Beta(p+1, n-p+1) ^{c)}
<i>Ce</i>	Concentration of SAL, LMO in environment	cfu/cm ²	$= -\text{LN}(1-Pe)/V^b)$
<i>CLe</i>	Contamination level of SAL, LMO in environment	cfu/cm ²	Poisson (<i>Ce</i>)
<i>Ep</i>	Cross-contamination (Transfer model)	%	Poisson (<i>CLe</i> × Formula () ^{d)})

(Continued)

Variables	Definition	Unit	Distribution/Model
Growth during processing			
Gp	Growth model	Log cfu/g	Formula () ^{e)}
Packed pork			
Pf	Contamination level of SAL, LMO in packed pork	Log cfu/g	$CL+Ep+Gp$ (node 2)
Storage			
St	Storage time	Day	Triang(1.0, 1.5, 3.0)
Stm	Storage temperature	°C	Normal(2, 5)
Growth during storage			
Gs	Growth model	Log cfu/g	Formula () ^{e)}
Storage pork			
Sf	Contamination level of SAL, LMO in packed pork	Log cfu/g	$Pf+Gs$ (node 3)

a) Beta distribution on initial contamination, p: the number of positive samples, n: the number of total samples. b) LN: Natural logarithms, V: sample volumes. c) Beta distribution on environmental contamination, p: number of positive samples, n: number of total samples. d) Transfer model. e) Growth predict model.

제2절 포장돈육 가공장에 대한 Microbial Hazard Exposure Model 적용

1. 적용 방법론

개발된 Microbial Hazard Exposure Model(MHEM)에 대한 포장돈육 가공장에 대한 적용은 simulation을 이용하였으며, simulation 결과를 바탕으로 민감도와 시나리오 분석을 실시하였다. 한편으로는 HACCP 지정작업장과 비지정 작업장의 *Salmonella*, *L. monocytogenes* 오염수준을 비교하기 위하여 입력변수를 각각의 작업장에 맞추어 입력한 후 최종적인 오염수준을 비교하였다.

Simulation 구동방법 - Simulation 구동은 @RISK를 이용하였으며, sampling type은 Median Latin Hypercube sampling을, generator seed는 random방법을 선택하여 이용했고, iterations(반복시행 횟수) 10,000 이상의 결과를 최종 시뮬레이션 결과로 이용하였다. Simulation 결과가 도출된 후 그 결과를 바탕으로 @RISK를 이용하여 민감도 분석과 시나리오 분석을 실시하였다.

민감도(Sensitivity) 분석 - 민감도 분석은 개발된 simulation 모델의 입력변수 중에서 최종결과에 가장 크게 영향을 미치는 입력변수를 선정하는 과정이다. 본 연구에서의 최종결과는 포장된 돈육에서의 *Salmonella*, *L. monocytogenes*의 발생수준이며, 이에 따른 입력변수는 simulation 모델에 있는 distribution/model을 이용하였다. 민감도 분석에는 correction 분석결과를 선정하였고, 민감도 분석의 최종결과는 돈육포장공정에서의 CCP 결정에 이용되었다.

시나리오(Scenario) 분석 - 시나리오 분석은 민감도분석의 결과를 바탕으로 입력변수의 변화에 따라 최종적인 결과인 포장 또는 저장된 돈육에서의 *Salmonella, L. monocytogenes*의 오염 수준이 어느 정도로 변화하는지를 파악하여 입력변수의 한계를 결정하고 이를 한계기준 설정에 이용하기 위하여 실시하였다. 시나리오의 구성은 우선적으로 민감도분석에서 크게 영향을 미치는 인자로 결정된 작업시간, 작업장온도, 돈육의 초기 오염농도의 변화로 이루어졌으며, 각각 입력변수의 한계값 내에서 변화를 유도, 이에 따른 최종 돈육에서의 *Salmonella, L. monocytogenes*의 오염수준의 변화를 관찰하였다. 이러한 시나리오 분석의 최종결과는 포장돈육 공정에서의 Critical Limit 결정에 이용되었다.

2. 모델을 이용한 포장돈육공정의 *Salmonella, L. monocytogenes* 오염수준 평가

개발된 Microbial Hazard Exposure Model을 실제 일반 포장돈육공정의 환경조건에 따라 적용하여 *Salmonella*과 *L. monocytogenes* 오염수준을 추정하였다.

가. 공정별 오염수준 평가

1) 초기 오염수준

이들 초기오염 수준에 대한 추정은 주관과제의 모니터링 결과(제3장 제3절)를 바탕으로 하였다. 포장돈육공정 중 원료도체로부터의 *Salmonella* 오염수준 즉, 초기오염수준에 대한 추정결과는 <Fig. 5-1>과 같다. 평균 오염수준은 -3.27 Log cfu/g, 최소 (5th percentile) 오염수준은 -4.31 Log cfu/g, 최대 (95th percentile) 오염수준은 -2.54 Log cfu/g의 범위를 갖는 것으로 추정되었다. 한편 동일한 공정에서의 *L. monocytogenes* 오염수준에 대한 추정결과는 <Fig. 5-2>와 같다. 평균 오염수준은 -1.77 Log cfu/g, 최소 (5th percentile) 오염수준은 -1.95 Log cfu/g, 최대 (95th percentile) 오염수준은

-1.60 Log cfu/g의 범위를 갖는 것으로 추정되었으며, 냉장에서 성장할 수 있는 *L. monocytogenes*의 오염수준이 더 높은 것으로 나타났다.

2) 포장돈육 작업환경에서의 오염수준

작업환경(사용장비, 컨베이어 벨트, 바닥 등)에서의 이들 병원성균에 대한 오염수준은 주관과제의 모니터링 결과(제2장 2절)를 바탕으로 하였으며, 업체의 시설이나 규모, HACCP 시행여부에 상관없이 전체자료를 모집단으로 하여 입력하였다.

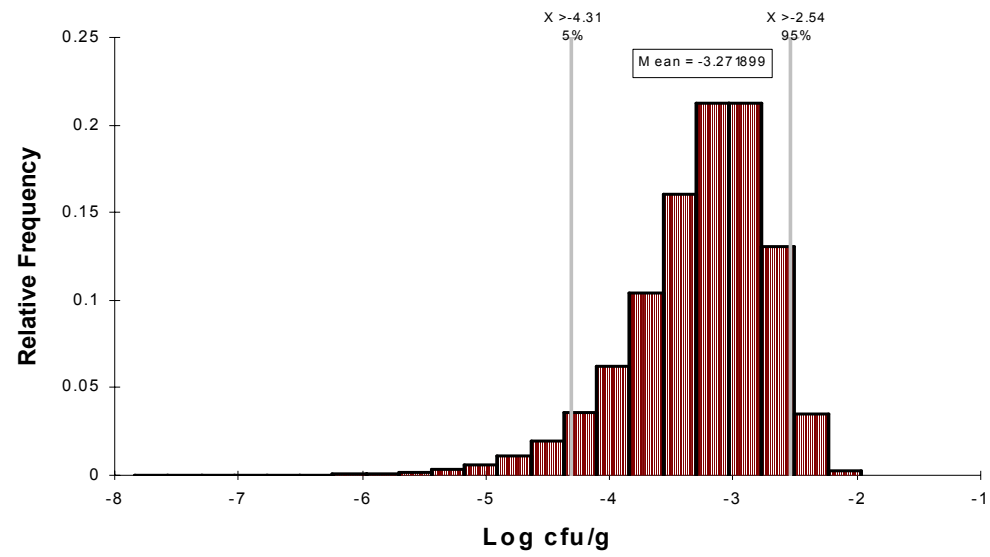


Fig. 5-1. The result of simulated initial contamination level of *Salmonella* spp. in pork processing plant.

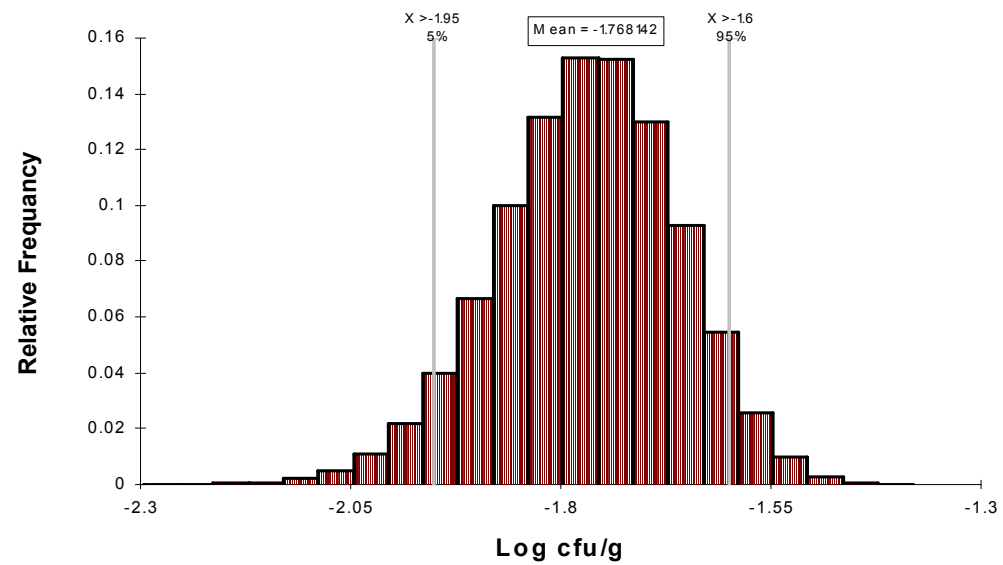


Fig. 5-2. The result of simulated initial contamination level of *L. monocytogenes* in pork processing plant.

따라서 이 결과는 특정업체에 대한 추정이 아닌 전반적인 우리나라 포장돈육 공정에 대한 추정이라고 볼 수 있다. 이러한 환경에서의 오염은 전이율 모델(제3장 2절)을 통해 돈육에서 돈육으로 그리고 주변 환경으로부터 돈육 또는 다른 주변 환경으로 전이를 고려하였다. 그러나 주변 환경조건의 변수는 매우 다양하며 이 모두를 실험적으로 활용하기에는 현실적으로 불가능하므로, 전이율 모델에서 큰 영향력이 있는 것으로 확인된 컨베이어 벨트와 스테인리스 스틸만을 고려하였다. 따라서 이러한 추정결과는 어느 정도의 불확실성을 내포하고 있으며, 추후 오염인자를 좀더 포괄적으로 고려하는 모델 개발이 필요한 것으로 보인다.

포장돈육공정에서의 주요 환경오염수준에 대한 추정은 *Salmonella*의 경우는 <Fig. 5-3>과 같다. *Salmonella*의 경우 평균 오염수준은 -2.98 Log cfu/g , 최소 (5th percentile) 오염수준은 -3.28 Log cfu/g , 최대 (95th percentile) 오염수준은 -2.72 Log cfu/g 의 범위를 갖는 것으로 추정되었으며 돈육 자체의 오염수준보다 약간 높은 것으로 나타났다. *L. monocytogenes* 오염수준에 대한 추정결과는 <Fig. 5-4>와 같다. 평균 오염수준은 -2.03 Log cfu/g , 최소 (5th percentile) 오염수준은 -2.14 Log cfu/g , 최대 (95th percentile) 오염수준은 -1.93 Log cfu/g 의 범위를 갖는 것으로 추정되었으며 *Salmonella*과 달리 돈육 자체의 오염수준보다는 약간 낮은 것으로 나타났으나, *Salmonella*과 비교시 그 오염수준은 약간 높은 것으로 나타났다.

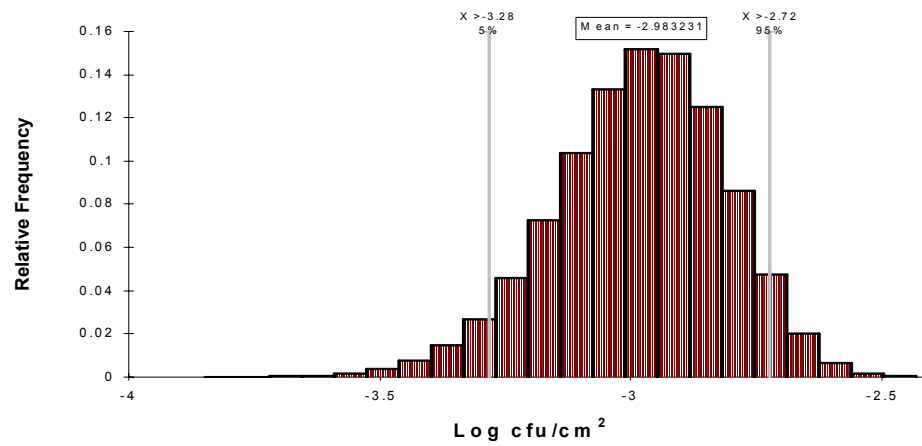


Fig. 5-3. The result of simulated environmental contamination level of *Salmonella* spp. in pork processing plant.

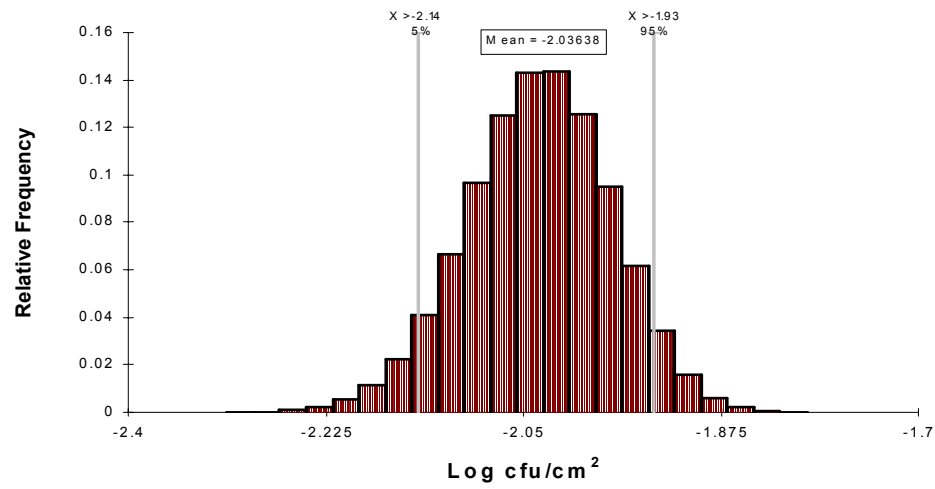


Fig. 5-4. The result of simulated environmental contamination level of *L. monocytogenes* in pork processing plant.

3) 포장된 돈육에서의 오염수준

포장된 돈육의 경우 원료 도체로부터의 오염과 주변 환경에서의 오염 그리고 이들 환경에서의 성장이 최종 포장돈육에서의 오염수준에 영향을 미치는 것으로 볼 수 있다.

포장된 돈육에서의 *Salmonella*의 오염수준은 <Fig. 5-5>에서와 같이 평균 오염수준은 -3.28 Log cfu/g , 최소 (5th percentile) 오염수준은 -6.05 Log cfu/g , 최대 (95th percentile) 오염수준은 -2.05 Log cfu/g 의 범위를 갖는 것으로 추정되었다. 이러한 결과는 원료도체나 주변 환경에서의 오염수준보다 약간 낮은데, 이는 포장공정 환경에서의 *Salmonella* 성장은 사실상 상당히 적은 것으로 볼 수 있다.

한편 *L. monocytogenes* 오염수준은 <Fig. 5-6>과 같으며 추정결과를 보면 평균 오염수준은 -2.55 Log cfu/g , 최소 (5th percentile) 오염수준은 -13.03 Log cfu/g , 최대 (95th percentile) 오염수준은 0.00 Log cfu/g 의 범위를 갖는 것으로 추정되었다. 이러한 결과는 *Salmonella*와 비교시 오염수준은 약간 높았고, 최대오염수준은 훨씬 더 높게 나타나고 있어, 현재의 포장공정 환경에서 *L. monocytogenes*는 *Salmonella*과 달리 성장 가능성을 보여주고 있다. 한편 더 많은 추정 범위를 가지고 있는 것으로 나타난 *L. monocytogenes*의 경우 즉 최종 포장 돈육에서의 *L. monocytogenes*의 오염수준은 *Salmonella*보다 온도나 시간 등 작업환경조건과 연관된 control factor에 더 많은 영향을 받는 것으로 해석되었다.

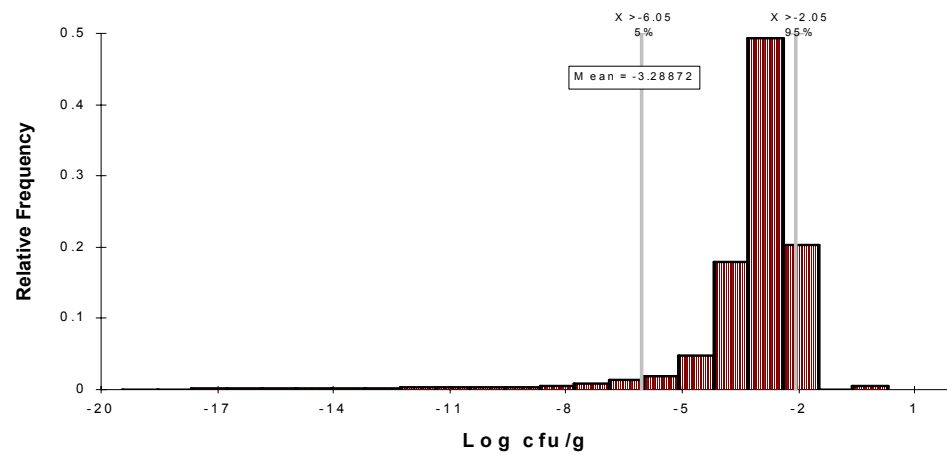


Fig. 5-5. The result of simulated contamination level of *Salmonella* spp. on pork after packing in pork processing plant.

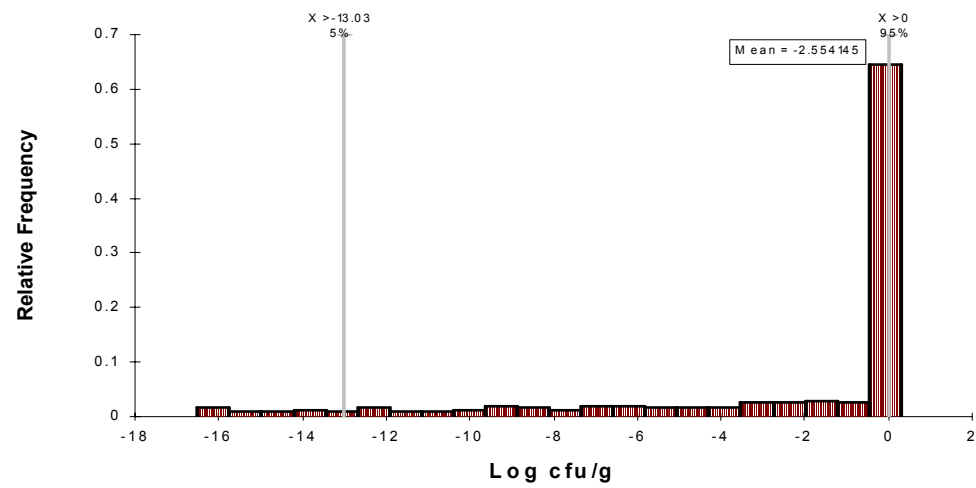


Fig. 5-6. The result of simulated contamination level of *L. monocytogenes* on pork after packing in pork processing plant.

4) 냉장 저장된 돈육에서의 오염수준

포장완료 후 냉장 저장된 돈육에서의 *Salmonella*이나 *L. monocytogenes*의 오염수준에 가장 영향력 있는 인자는 저장시간 및 온도조건이다. 저장환경에 따른 돈육에서의 오염수준에 대한 추정치는 *Salmonella*의 경우는 <Fig. 5-7>과 같다. *Salmonella*의 오염수준은 평균 -3.22 Log cfu/g , 최소 (5th percentile) 오염수준은 -6.02 Log cfu/g , 최대 (95th percentile) 오염수준은 -1.89 Log cfu/g 의 범위를 갖는 것으로 추정되었다. 이러한 결과는 포장된 돈육에서의 오염수준보다 약간 높은 것으로, 이는 포장 후 저장 기간 중에 어느 정도의 성장이 있음을 나타내는 것이다. *L. monocytogenes* 오염수준은 <Fig. 5-8>과 같으며 추정결과를 보면 평균 오염수준은 -2.23 Log cfu/g , 최소 (5th percentile) 오염수준은 -13.03 Log cfu/g , 최대 (95th percentile) 오염수준은 1.00 Log cfu/g 의 범위를 갖는 것으로 추정되었다. 이러한 결과 역시 *Salmonella*와 같이 포장 후 저장기간 중에 어느 정도의 성장이 있었음을 보여주고 있다.

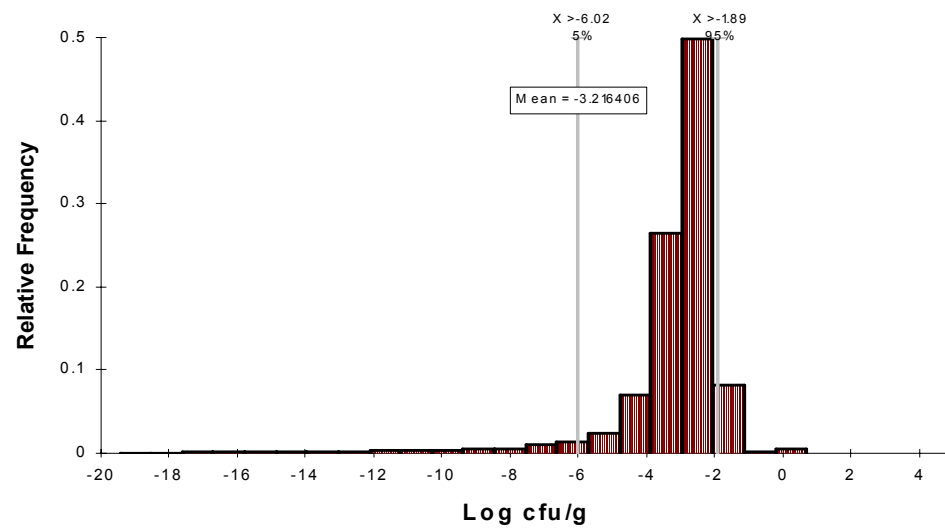


Fig. 5-7. The result of simulated contamination level of *Salmonella* spp. on pork during storage after packing in pork processing plant.

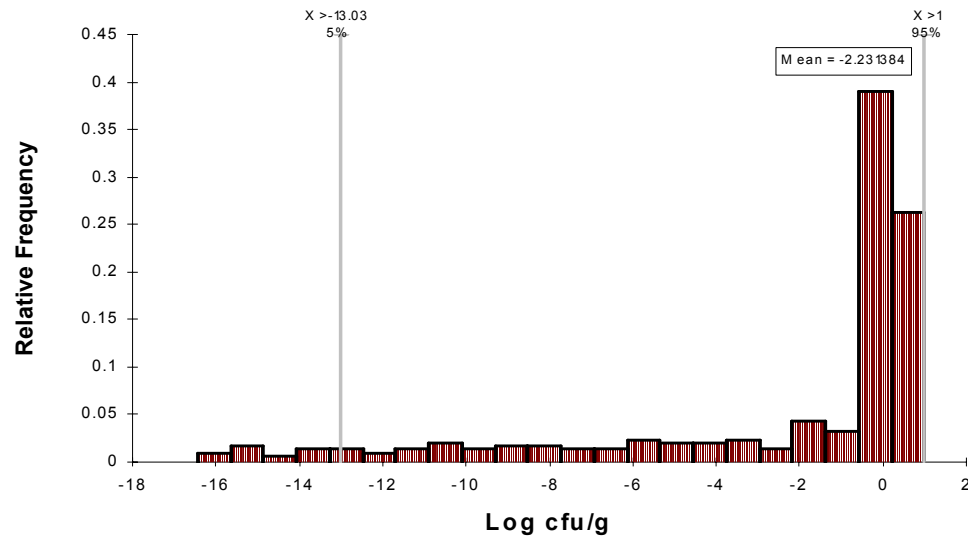


Fig. 5-8. The result of simulated contamination level of *L. monocytogenes* on pork during storage after packing in pork processing plant.

나. 공정별 오염수준 비교

공정별 *Salmonella*의 오염발생을 누적시킨 형식으로 나타낸 것은 <Fig. 5-9>와 같다. 최종 저장된 돈육에서의 오염수준은 초기의 오염수준보다 약간의 증가가 있기는 하지만 거의 비슷한 경향을 나타내고 있으며, 특히 포장된 돈육과의 비교 시 일부 증가가 있기는 하지만 그 정도는 아주 작은 것으로 약 10% 정도가 증가하는 것으로 나타났다.

한편으로 초기 오염수준의 약 20%는 오히려 감소하는 것으로 나타났다. <Fig. 5-10> 역시 *L. monocytogenes*에 대한 오염수준 또는 발생수준의 정도를 비교하기 위하여 누적시킨 형식으로 나타낸 것이다. *Salmonella*과 달리 초기오염수준, 포장 후 오염수준, 최종 저장 후 오염수준 간에 많은 편차가 있는 것으로 나타났다. 초기오염수준의 약 30% 정도는 공정이 진행되면서 오히려 감소하는 것으로 나타났으며, 포장오염수준의 약 30% 정도도 저장기간 중에 성장하는 것으로 나타났는데 이는 돈육 포장공정에서 *L. monocytogenes*가 *Salmonella*보다 더 많이 오염될 수 있거나 성장할 수 있음을 나타내는 것이다.

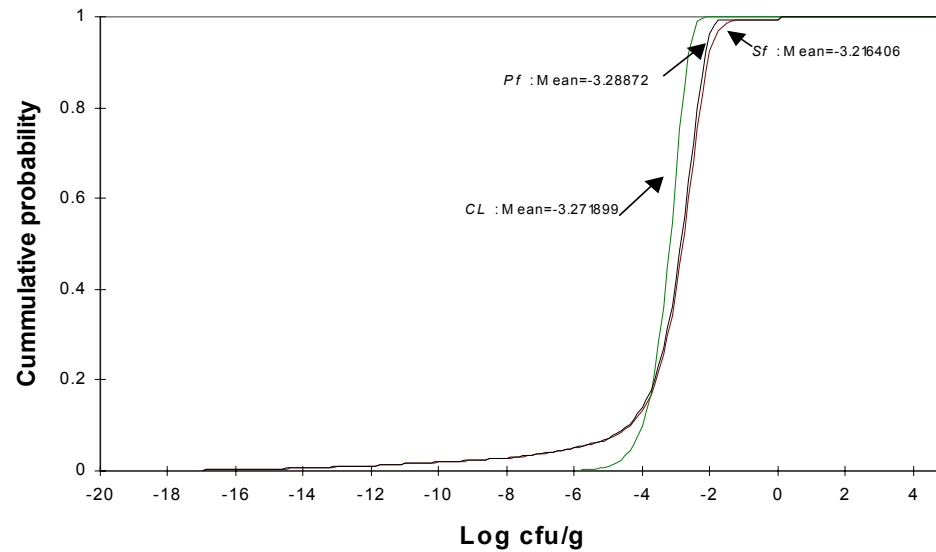


Fig. 5-9. Comparing of contamination level of *Salmonella* spp. for initial(CL), packed(Pf) and stored(Sf) pork in pork processing plant.

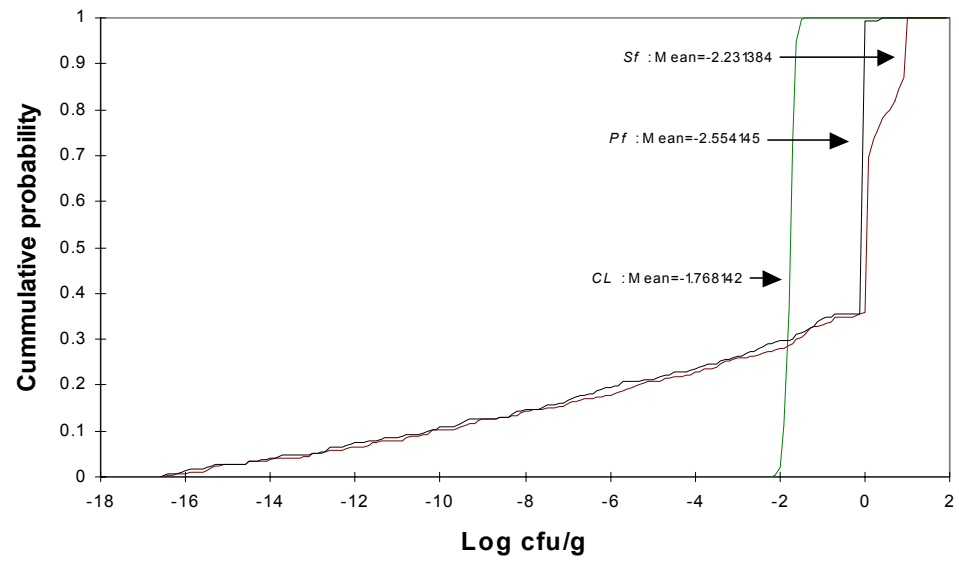


Fig. 5-10. Comparing of contamination level of *L. monocytogenes* for initial(CL), packed(Pf) and stored(Sf) pork in pork processing plant.

다. 민감도 분석

민감도 분석은 개발된 exposure simulation model의 입력변수 중에서 최종결과에 가장 크게 영향을 미치는 입력변수를 선정하는 과정이다. 본 연구에서의 최종결과는 돈육에서의 *Salmonella*과 *L. monocytogenes*의 오염수준이며, 이에 따른 입력변수는 exposure simulation model에 있는바와 같이 원료도체의 초기 오염수준, 환경 오염수준, 작업장의 온도, 작업시간, 교차오염의 정도, 냉장저장온도 및 시간이다. 민감도는 -1~1 사이의 값을 가지며, 1 또는 -1에 근접할수록 영향력이 크다.

1) *Salmonella* spp.

@RISK를 이용한 exposure simulation model의 포장돈육공정에 대한 *Salmonella* 민감도 분석결과는 <Table 5-2>와 같다. 포장돈육 공정에서 최종 냉장 저장된 돈육에 대한 *Salmonella*의 오염수준에 대하여 교차오염의 상관계수가 0.029로 가장 높았고 다음이 초기오염수준 0.013, 냉장저장 시간 0.009, 가공시간 0.008, 냉장저장온도 0.006, 환경오염수준 0.004, 가공실 온도 0.002 순이었다. 교차오염이 가장 높게 나타난 것은 *Salmonella*의 전이율이 상대적으로 *L. monocytogenes* 보다 높아 이러한 결과가 나타난 것으로 추정된다. 하지만 *Salmonella*의 경우 전체적으로 민감도 수준이 아주 낮고 입력변수 간에 큰 차이가 없는 것으로 나타났다.

2) *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes 민감도 분석결과는 <표 5-3>과 같다. 공정 후 냉장 저장된 돈육에 대한 *L. monocytogenes* 오염수준에 대하여 원료도체의 초기오염수준이 상관계수 0.322로 가장 높고 다음이 냉장저장시간 0.271, 가공시간 0.175, 가공실 온도 0.077, 냉장저장온도 0.052, 환경오염수준 0.029, 교차오염이 0.013 순이었다. 교차오염이 *Salmonella*에 비하여

가장 낮게 나타난 것은 *L. monocytogenes*의 전이율이 상대적으로 *Salmonella*보다 낮아 이러한 결과가 나타난 것으로 추정된다. 전반적인 상관계수는 *Salmonella*에 비하여 상대적으로 아주 높게 나타났는데 이는 초기 원료도체나 환경에서의 오염수준이 *Salmonella*보다 높고 또한 저온에서 성장이 가능한 *L. monocytogenes*의 특성 때문인 것으로 사료된다.

Table 5-2. Correlation coefficient for sensitivity risk factors affecting the final contamination level of *Salmonella* spp. on pork during procedure in pork processing plant.

Rank	Parameter	correlation coefficient
1	Cross-contamination	0.029
2	Initial contamination level	0.013
3	Storage time	0.009
4	Processing time	0.008
5	Storage temperature	0.006
6	Environmental contamination level	0.004
7	Processing room temperature	0.002

Table 5-3. Correlation coefficient for sensitivity risk factors affecting the final contamination level of *L. monocytogenes* on pork during procedure in pork processing plant.

Rank	Parameter	correlation coefficient
1	Initial contamination level	0.322
2	Storage time	0.271
3	Processing time	0.175
4	Processing room temperature	0.077
5	Storage temperature	0.052
6	Environmental contamination level	0.029
7	Cross-contamination	0.013

라. 시나리오 분석

시나리오 분석은 민감도 분석의 결과를 바탕으로 영향력 있는 입력변수의 변화에 따라 최종 결과인 냉장돈육에서의 *Salmonella*, *L. monocytogenes*의 오염수준이 어떻게 변화하는지를 파악하는데 이용할 수 있다.

1) *Salmonella* spp.

*Salmonella*의 경우 앞서 민감도 분석결과 민감도 수준이 아주 낮고 입력변수 간에 큰 차이가 없는 것으로 나타나 현재의 포장돈육공정에 있어서 입력변수들이 최종 냉장돈육에서의 *Salmonella*의 오염수준에 크게 영향을 미치지 않는 것으로 나타나 *Salmonella*의 경우는 시나리오 분석을 실시하지 않았다.

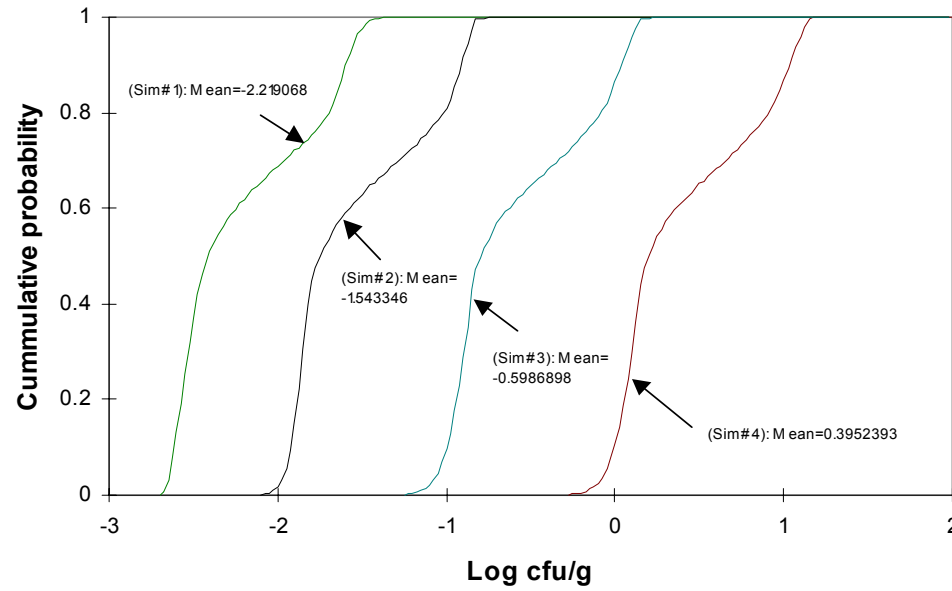
2) *Listeria monocytogenes*

*L. monocytogenes*의 경우 앞서 민감도 분석결과 돈육의 초기오염수준, 냉장저장시간, 가공시간이 상대적으로 높은 상관계수로 나타나 돈육포장공정에서 *L. monocytogenes* 관리를 위한 Critical Control Point로 볼 수 있다.

(1) 초기오염수준

냉장돈육에서의 *L. monocytogenes*의 최종오염수준에 대한 초기오염 균수의 영향을 확인하기 위하여 exposure simulation 모델에서 이들 입력변수를 인위적으로 변화시켜 냉장돈육에서의 *L. monocytogenes*의 최종적인 오염수준을 비교하였다. 다른 조건은 그대로 유지하면서 초기오염 균수를 각각 -3, -2, -1, 0 Log cfu/g으로 입력하여 냉장돈육에서의 *L. monocytogenes*의 최종오염수준을 추정하였으며 <Fig. 5-11>과 같다. 초기오염 균수를 -3 Log cfu/g으로 설정할시 최종냉장 포장된 돈육에서의 평균 오염수준은 -2.22 Log cfu/g, -2 Log cfu/g으로 설정할시는 -1.54 Log cfu/g, -1 Log

cfu/g으로 설정할시는 -0.60 Log cfu/g , 0 Log cfu/g 으로 설정할시는 0.40 Log cfu/g 으로 나타났다. 초기오염 균수가 -3 Log cfu/g 와 -2 Log cfu/g 사이의 간격이 다른 초기오염수준간의 간격보다 작게 나타는 것은 초기오염수준간의 영향정도가 다른 입력수준보다 작음을 나타내는 것이다. 전체적으로 각 입력변수에 따른 차이가 다른 시나리오 분석 <Fig. 5-12, 5-13, 5-14>보다도 큰 차이를 나타내므로 민감도 분석에서와 같이 가장 중요한 control point는 초기오염수준임을 다시 한번 보여주고 있다. 초기오염수준은 최대한 그 오염수준을 낮게 관리하여야 하는 것이 당연한 것이다. 그러나 본 연구 결과만으로 *L. monocytogenes* 최종오염의 정량적인 기준을 제시하기는 현실적이지 못한 것으로 판단되었다.



FiFig. 5-11. Comparing of simulation

result of contamination level for *L. monocytogenes* in cold stored pork by initial contamination level (Sim#1: -3, Sim#2: -2, Sim#3: -1, Sim#4: 0 log cfu/g).

(2) 냉장저장시간

냉장 돈육에서의 *L. monocytogenes*의 최종적인 오염 수준에 대한 냉장저장시간의 영향을 확인하기 위하여 exposure simulation 모델에서 이들 입력 변수를 인위적으로 변화시켜 냉장돈육에서의 *L. monocytogenes*의 최종적인 오염 수준을 비교 분석 하였다. 초기오염수준에 대한 시나리오 분석에서와 같이 다른 조건은 그대로 유지하면서 냉장저장시간을 각각 0.5, 1, 2, 3, 5일로 입력하여 냉장 돈육에서의 *L. monocytogenes*의 최종적인 오염 수준을 추정하였으며, 그 결과는 <Fig. 5-12>와 같다. 냉장저장시간을 0.5일로 설정할시 냉장돈육의 최종 평균오염수준은 -1.492 Log cfu/g 이며, 1일로 설정할 경우는 -1.468 Log cfu/g , 2일로로 설정할 경우는 -1.315 Log cfu/g , 3일로 설정할 경우는 -1.012 Log cfu/g , 5일로 설정할 경우 0.911 Log cfu/g 로 나타났다. 냉장저장시간을 0.5일과 1일간에는 큰 차이가 없었으나 나머지 냉장저장기간간에는 큰 차이가 나타나므로 냉장저장기간은 1일 이내로 설정하는 것이 바람직한 것으로 나타났다.

(3) 가공시간

냉장 돈육에서의 *L. monocytogenes*의 최종 오염수준에 대한 가공시간의 영향을 확인하기 위하여 exposure simulation 모델에서 이들 입력 변수를 인위적으로 변화시켜 냉장돈육에서의 *L. monocytogenes*의 최종적인 오염 수준을 비교분석 하였다. 초기오염수준에 대한 시나리오 분석에서와 같이 다른 조건은 그대로 유지하면서 가공시간을 각각 0.15, 0.5, 1, 2 시간으로 입력하여 냉장 돈육에서의 *L. monocytogenes*의 최종적인 오염 수준을 추정하였으며, 그 결과는 <Fig. 5-13>과 같다. 가공시간을 0.15시간으로 설정할 경우 냉장돈육에서의 최종 평균 오염수준은 -1.47 Log cfu/g , 0.5 시간으로 설정할 경우는 -1.38 Log cfu/g 이며, 1시간으로 설정할 경우는 -1.30 Log cfu/g , 2시간으로 설정할 경우는 -1.25 Log cfu/g 로 나타났다. 전체적으로 각 입력 변수별로 큰 차이는 없는 것으로 보아 뚜렷한 정량적인 기준을 제시할 수 없는 것으로 보인다. 따라서 가공시간의 경우 업체의 현실을 고려하여 가능한 빠른 시간내에 작업이 이루어지도록 하는 것이 가장 바람직한 위생관리 방법이며, 어떤 정량적인 기준제시는 것은 별 의미가 없는 것으로 판단되었다.

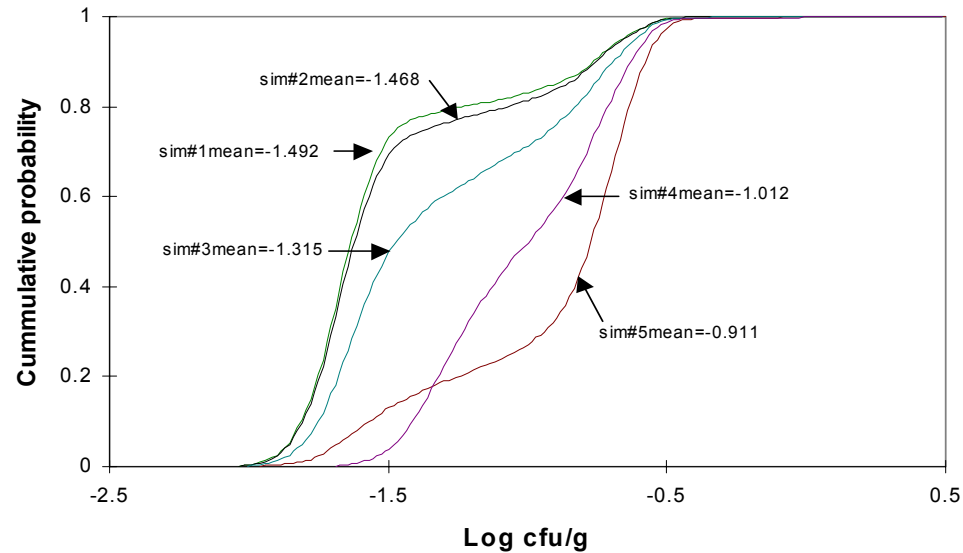


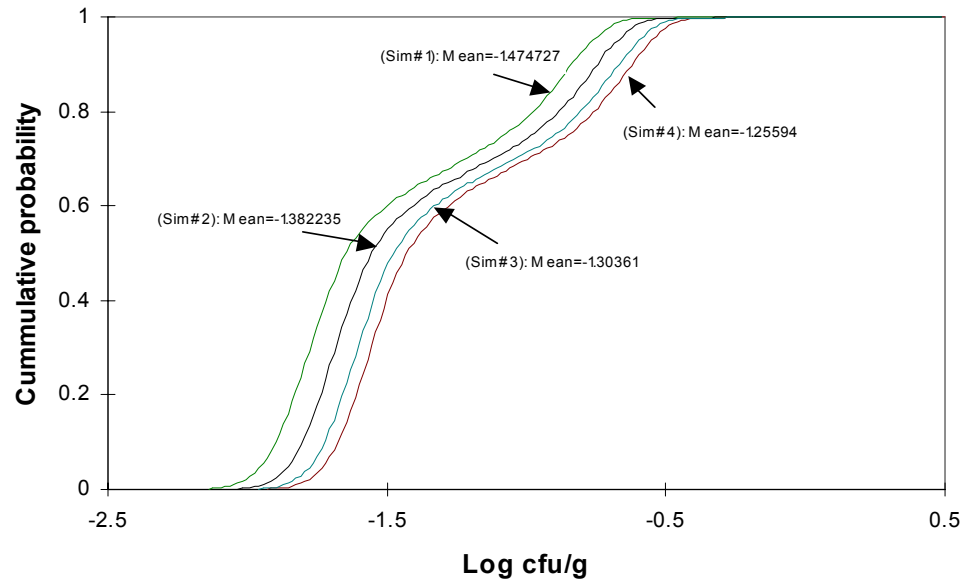
Fig. 5-12. Comparing of simulation result of contamination level for *L. monocytogenes* in cold stored pork by storage time (Sim#1: 0.5, Sim#2: 1, Sim#3: 2, Sim#4: 3, Sim#4: 5 day)

Fig. 5-13. Comparing of simulation result of contamination level for *L. monocytogenes* in cold stored pork by processing time (Sim#1: 0.15, Sim#2: 0.5, Sim#3: 1, Sim#4: 2 hour).

3. HACCP 지정작업장과 비지정 작업장의 *Salmonella*, *L. monocytogenes*

오염수준 비교

개발된 MHEM을 이용한 HACCP 지정작업장과 비지정 작업장의 오염수준 및 작업공정에 대한 *Salmonella*, *L. monocytogenes* 오염수준을 비교하였다. *Salmonella*의 경우 Fig. <5-14, 5-15>에서 보는바와 같이 HACCP 적용



작업상태 오염수준이 약간 낮은 수준이지만 HACCP 비적용 작업장간의 각 공정별 그리고 최종 냉장돈육에서 뚜렷한 오염수준의 차이는 볼 수 없었다. 반면 *L. monocytogenes*의 경우는 <Fig. 5-16, 5-17>에서와 같이 HACCP 적용 작업장에서 원료도체로부터 포장된 돈육으로의 오염수준간 차이가 HACCP 비적용 작업장에 비하여 현저히 낮은 수준으로 나타났는데, 이는 작업장에 대한 위생관리수준의 차이에 기인되는 것으로 보여진다.

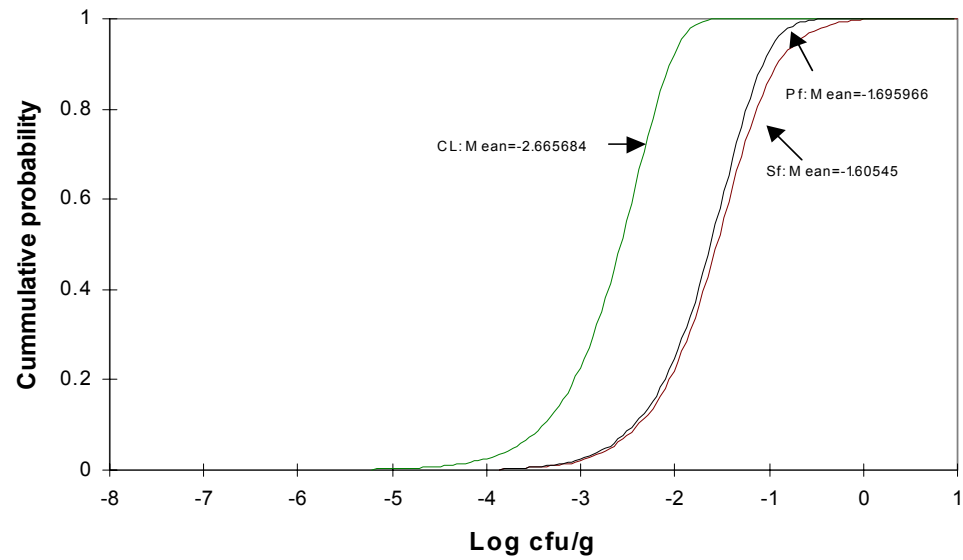


Fig. 5-14. Comparing of contamination level of *Salmonella* spp. for initial(CL), packed(Pf) and stored(Sf) pork in HACCP pork processing plant.

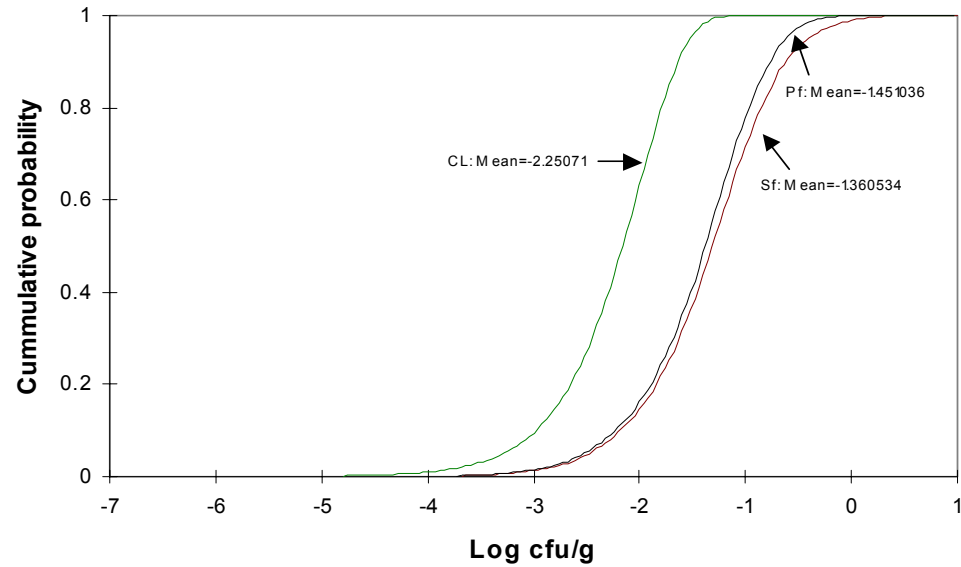
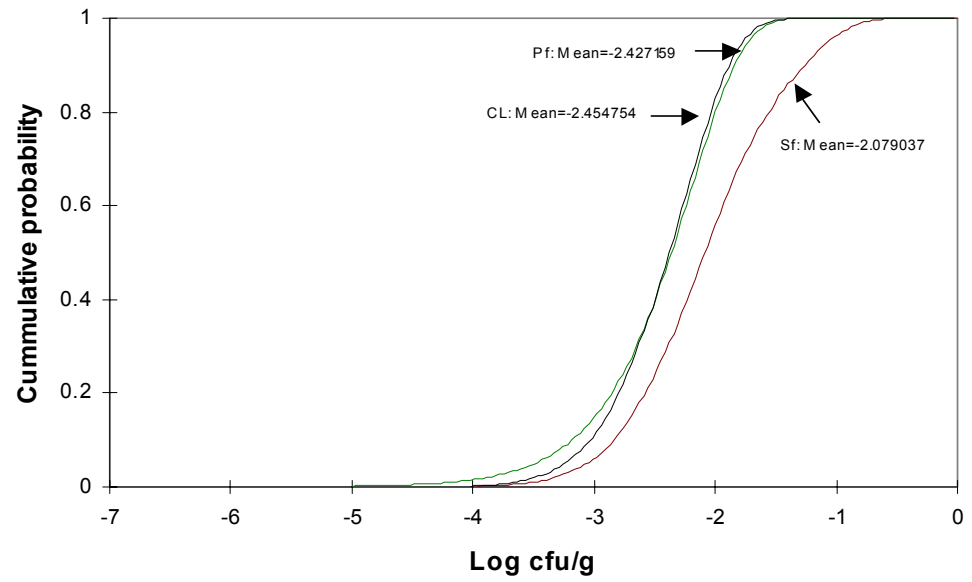


Fig. 5-15. Comparing of contamination level of *Salmonella* spp. for initial(CL), packed(Pf) and stored(Sf) pork in non-HACCP pork processing plant.

Fig. 5-16. Comparing of contamination level of *L. monocytogenes* for initial(CL), packed(Pf) and stored(Sf) pork in HACCP pork processing plant.



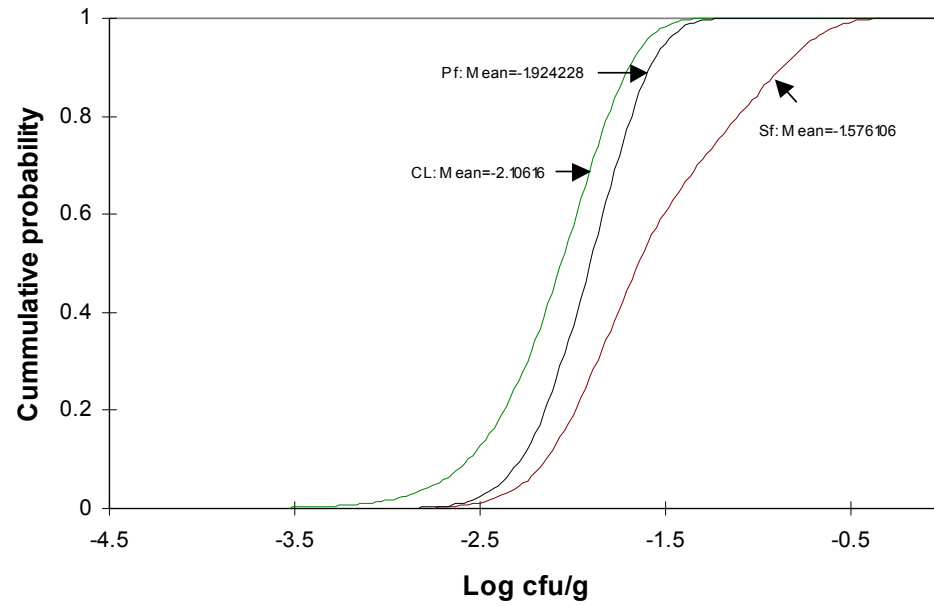


Fig. 5-17. Comparing of contamination level of *L. monocytogenes* for initial(CL), packed(Pf) and stored(Sf) pork in non-HACCP pork processing plant.

제3절 Microbial Hazard Exposure Model 평가

1. 모델 검증

Microbial Hazard Exposure Model과 같은 MRA 모델에 대한 유효성 검증은 모델개발에 이용되지 않은 정보나 자료를 이용하여 평가하는 것이 주관을 배제하는 방법의 하나이다. 따라서 본 연구에서는 모델로부터 추정된 예측값과 모델 개발에 이용되지 않은 실험값을 이용, 서로 비교를 통해 검증을 실시하였으며 그 결과는 <표 5-4, 5-5>와 같다.

Table 5-4. Comparing of predicted values from MHEM and observed values for incidence of *Salmonella* spp. in packed pork

Predicted		Observed	
Range	Log cfu/g	Cases	Log cfu/g
5%	-6.05	1	-2.13
mean	-3.28	2	-1.81
median (50%)	-2.85	3	-2.29
95%	-2.05	4	-2.06
Maximum	0.30	Total	-2.42

Table 5-5. Comparing of predicted values from MHEM and observed values for incidence of *L. monocytogenes* in

packed pork

Predicted		Observed	
Range	Log cfu/g	Cases	Log cfu/g
5%	-13.03	1	-1.62
mean	-2.56	2	-2.13
median (50%)	0.00	3	-2.29
95%	0.00	4	-1.54
Maximum	0.30	Total	-2.01

비교자료로 활용된 실험값은 주관과제의 모니터링 결과 중 돈육포장공정에서 최종 포장된 돈육에 대한 검사결과로 이 자료는 모델 개발에 이용되지 않은 자료이다. 이 자료는 정성적인 오염수준을 나타내므로 다음의 식을 이용하여 정량적으로 전환 하였다.

$$QL = -LN(1-Beta(p+1, n-p+1))/V$$

QL: Quantitative level

LN: Natural logarithms

Beta: Beta distribution

p: the number of positive samples

n: the number of total samples

V: sample volumes

평균치를 비교할 때 *Salmonella*의 경우 실험값이 $-2.42 \log \text{ cfu/g}$ 로 모델에 의한 예측값은 $-3.28 \log \text{ cfu/g}$ 으로 낮게 추정되었다. 그러나 <Fig 5-5>(5장 제2절)에서 보는 바와 같이 빈도수에서는 -2 와 $-3 \log \text{ cfu/g}$ 사이가 가장 큰 빈도수 나타내고 있어 예측값과 실험값이 어느 정도 일치한다고 판단된다. *L. monocytogenes*의 경우 실험값은 $-2.01 \log \text{ cfu/g}$ 모델에 의한 예측값은 $-2.56 \log \text{ cfu/g}$ 으로 *Salmonella* 경우와 마찬가지로 낮게 추정되었다. 이 역시 <Fig. 5-6>(5장 제2절)에서 보는 바와 같이 빈도수에서는 $0 \log \text{ cfu/g}$ 에서 상대적으로 높은 분포를 보이지만, 전반적으로 -2 와 $0 \log \text{ cfu/g}$ 사이가 가장 큰 분포를 보이며, 이 분포를 실험값에 대한 전체 값뿐만 아니라 case별로 얻은 실험값과 비교시 예측값과 실험값이 어느 정도 일치하는 것으로 볼 수 있다. 따라서 본 연구에서 개발된 MHEM 모델은 실험값과 일치하는 경향을 보이고 있다.

또 다른 평가방법으로는 전체 모델에 이용된 내부 확률분포 모델이나 예측모델에 대한 검증으로 전체 모델을 평가하는 경우이다. 이는 <Table 5-1>(제5장 제1절)에 제시한 핵심기술 중에 이용된 확률분포 모델의 적정 사용여부에 대한 검증, 성장예측모델이나 전이율 모델에 대한 과학적 검증을 통해 전체 모델에 대한 검증을 하는 방법이지만, 중간과정인 simulation에 대한 평가를 할 수 없는 취약점이 있다. 그러나 예측 값과의 비교를 위한 실험 값(유사한 조건에서 조사된 다른 문헌의 실험결과 등)이 부족할 경우에 이용될 수 있는 방법이다. 본 연구에서 제시한 MHEM 모델의 경우 각각의 세부 모델에 대해서는 이미 과학적인 방법으로 검증을 완료하였다. 따라서 실험값에 대한 비교 검증과 내부모델에 대한 검증결과 본 연구에서 개발된 MHEM은 현장에서의 활용 가능성이 충분한 것으로 판단된다.

한편으로 MRA의 경우 그 결과는 수학적 그리고 확률적 개념을 가지고 있으며, 또 다른 측면에서는 정량적이 아닌 정성적인 부분도 존재한다. 따라서 앞서 지적한 실험값과의 비교방법이나, 내부적으로 이용된 세부모델 검증을 통하여 전체 모델을 검증하는 방법은 적당하지 못한 것으로 지적되기도 한다.

따라서 최근에는 모델 개발에 참여하지 않은 제 3자에 의한 검증방법이 제기되고 있다. 이는 앞서 제시된 2가지 방법 및 결과에 추가적으로, 식품관련분야의 전문적인 지식과 경험을 갖고 있는 모델개발 및 MRA 전문가를 활용하여 식품생산 환경에 존재할 수 있는 여러 가지 인자를 종합적으로 검토하여 모델의 타당성을 결정하는 것이다. 그러나

아직은 국내외적으로 MRA 분야 연구의 미흡함과 전문가 부족으로 이 방법의 활용은 시기상조로 보인다.

2. 모델 평가

식품제조 공정내에서 오염미생물을 실험적으로 분석하는 데는 많은 시간과 노력이 요구되며, 얻어지는 결과를 실시간 위생관리에 활용할 수 없다. 미생물학적 위해요소를 실시간으로 관리할 수 있는 방법의 하나로 영향인자(Controlling Factor: 온도, 시간, Aw, pH 등)를 활용하는 방법이 있다. QMRA 분야가 그 새로운 영역으로 그 활용이 확대되고 있다. QMRA의 목적은 식품의 원재료에서 제조, 유통, 보관, 판매, 소비까지의 전 과정에서 오염미생물의 변화를 예측함으로써 이들 미생물을 효과적으로 제어하고자 하는데 있다. 1980년대 이후 이론적으로 발전되기 시작하면서, 1990년대 들어 활발히 응용되고 있으며 최근에는 식품내 병원성미생물의 성장 및 사멸을 예측하는 수학적 모델 개발에 활용되고 있다. 현재까지 개발된 QMRA모델 중 아직 완전한 것은 없지만 어떤 특정 조건하에서는 활용성이 인정된다. 특히 HACCP과 MRA의 exposure assessment에서 QMRA의 활용이 매우 중요하게 인식되고 있다. 작업장 조건에 따라 변하는 식품에서의 미생물 오염수준을 예측하기 위해서는 오염미생물에 대한 정량적 위해성평가에 예측미생물학적 접근이 반드시 필요하며, 이를 위해서는 작업장 환경조건 및 작업조건에 따른 오염미생물의 오염전이율과 성장 및 사멸을 수학적으로 기술할 수 있는 모델이 개발되어야 한다. 따라서 본 연구에서는 QMRA를 활용한 포장돈육 작업환경조건에서 *Salmonella*, *L. monocytogenes*를 대상으로, 작업현장 조건에 따른 이들 병원성미생물의 발생 및 오염수준을 실시간으로 예측할 수 있고, 분석·평가할 수 있는 Model개발을 목표로 하였다.

본 연구의 결과인 MHEM은 입력변수로서 초기 오염수준, 작업장의 온도, 작업시간을 이용하여 최종 포장된 *Salmonella*, *L. monocytogenes*의 오염수준을 예측할 수 있는 모델이며, 더 나아가 저장온도 및 저장시간을 입력할 경우에는 저장 후의 냉장돈육에서의 위해 미생물의 오염수준을 예측하는데 활용 가능한 모델이다 <Fig. 5-1>. 본 MHEM은 국내 최초로 식품공정을 대상으로 exposure assessment 기법을 적용하였다는 데서 그 의의를 찾을 수 있다.

MHEM은 기존의 병원성 미생물 모니터링보다 훨씬 수월하고 간편하게 작업장의 온도와 작업시간 만으로도 공정내 오염미생물의 오염수준을 평가할 수 있을 뿐만 아니라 공정에서의 적정한 관리온도와 관리시간을 제시할 수 있을 것으로 보인다.

한편으로 본 연구에서 개발된 MHEM 모델은 몇 가지의 한계를 지니고 있다. 우선 연구초기에 예상되었던 중요한 관리인자로서 1차 요인으로는 온도, 시간, pH, Aw 등을 선정하였으나, 모델개발시 온도와 시간만을 고려하고 pH 나 Aw 등은 고려하지 않았다. 이들 인자의 변화가 거의 없을 것으로 가정하였기 때문이다. 그러나 좀더 정확한 결과를 보기 위해서는 돈육에서의 이러한 인자에 대한 영향평가가 필요할 것으로 보인다. 또 다른 관리인자로 초기균수, 소독제 사용농도, 작업환경(바닥, 벽, 배수구, 벨트 등), 작업도구(작업대/도마, 칼, 절단기, 칼갈이, 박피기 등), 종업원 손(장갑) 등을 선정하였으나, 상관관계의 변수가 너무 많아 전이에 대한 가정을 돈육에서 돈육으로, 돈육에서 스테인리스 스틸 또는 컨베이어 벨트로, 그리고 역으로 이들 스테인리스 스틸 또는 컨베이어 벨트에서 돈육으로의 전이율 만을 포함한 점이다. 물론 이들 요인이 공정중 돈육의 교차오염에 가장 큰 영향을 미치겠지만, 종사자 및 작업장 실내 공기 등에서의 오염전이도 모델화하여 적용하여야 할 것으로 보인다.

3. 모델 활용

개발된 MHEM 모델을 이용하면 축산식품업계에서 직접적인 미생물분석을 수행하지 않고도 작업공정조건(작업온도와 작업시간 등)에 따른 최종제품에서의 *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* 오염수준을 실시간으로 예측할 수 있다. 또한 대상공정에서의 적정한 관리온도와 관리시간을 찾아낼 수 있다<Fig. 5-2(A)>. 이는 곧 HACCP의 CCP설정과 Critical Limit의 유효성을 확인시켜 주므로<Fig. 5-2(B)> 축산식품업계의 위생수준 향상과 축산물 안전성 강화에 기여할 것으로 보인다. 또한 향후 MHEM 모델의 핵심기술을 프로그래밍 언어를 이용 소프트웨어로 개발 한다면 이는 우리나라 모든 돈육공정에서 이용 가능할 뿐만 아니라 다른 축산식품관련 작업장 및 특정 위해미생물에 대한 맞춤형 모델 개발도 가능할 것으로 보인다.

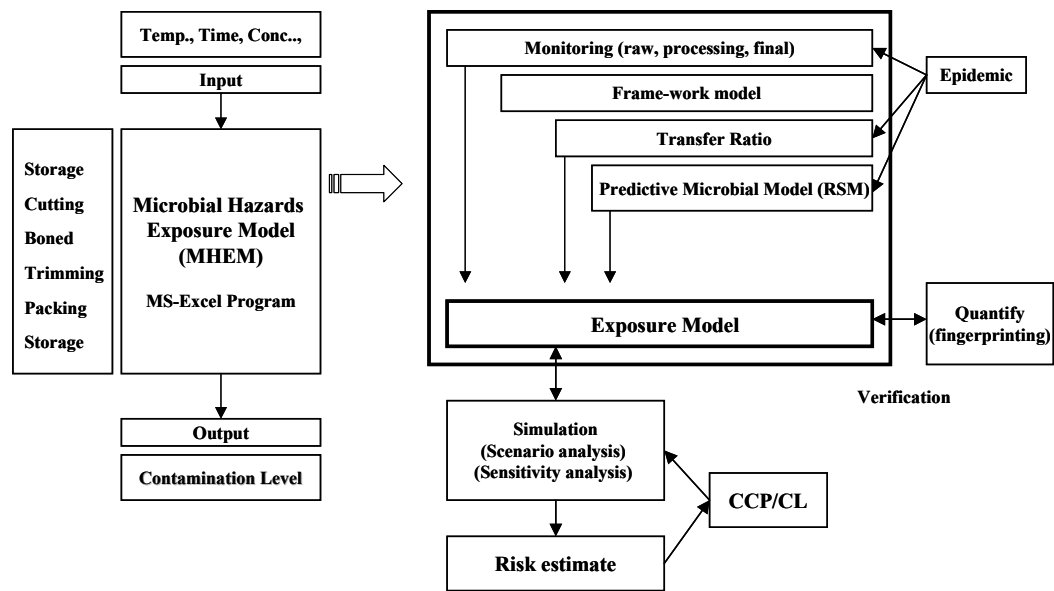


Fig. 5-1. Basic scheme of MHEM model application.

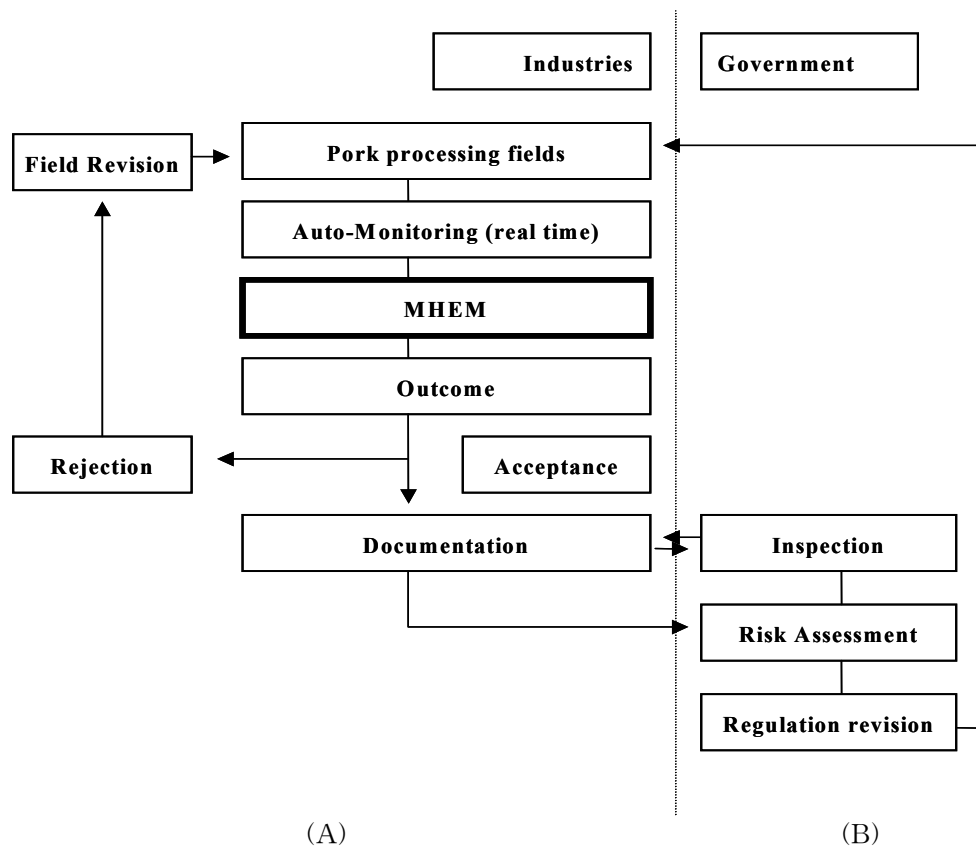


Fig. 5-2. Application of MHEM model.

제6장 위해미생물의 분류, 신속검출 및 정량화 기술 개발

식품관련 미생물학적 위해요인 관리 역사는 상당히 길다. 하지만 대부분 지표미생물을 중심으로 위생관리 수준, 살균·멸균의 적절성 등을 판단하였고 위해미생물에 대한 정량적 평가에는 어려움이 있었다. 그러나 실험실 기법이 꾸준히 발전하여 위해미생물 검사의 정확성이 높아지고 정량적 평가가 가능하게 되었으며, 나아가 위해발생 가능성을 추정할 수 있는 확률적 개념이 적용된 정량적 위험평가 (Quantitative Microbial Risk Assessment) 방법이 개발되고 있다.

특정 위해미생물에 대한 정량적 실험이 필요한 이유는 Microbial Risk Assessment (MRA)의 기초 자료가 바로 특정 위해미생물의 정량적 오염상태에 근거하기 때문이다. MRA 수행을 위해서는 farm-to-table에 이르는 다양한 과정에서 위해미생물에 대한 정량적인 실험실 분석이 요구된다. 그러나 특정 위해미생물에 대한 정량적 분석에서 특히 많은 시료를 분석함에 있어 기술적, 시간적인 어려움이 있어 MRA 수행에 걸림돌이 되고 있다. 일반적으로 사용되는 정량적 실험인 평판배지법이나 MPN 방법은 선택배지에서 세균을 배양한 뒤 생화학적, 생리학적 분석과 항체를 이용한 확인 작업을 거치므로 통상 1주일 내외의 장시간의 기간이 소용되며, 또한 많은 인원이 투입되어야 하기 때문이다.

그러나 현장을 대상하는 실험은 단시간 내에 많은 시료를 처리해야 하므로, 기존의 정량실험으로는 MRA 분야 연구의 활성화에 걸림돌이 되고 있다. 이런 문제점을 극복하기 위해 최근 많이 시도되고 있는 분자생물학적 방법들 예로 PCR에 의한 일반적인 신속 검출법은 단지 세균의 감염 유무만을 확인할 뿐 정량화하지는 못한다. 이를 보완한 real time-PCR 등의 방법은 정량화가 가능하다고 하지만 고가의 detection system을 구입해야 하므로 실제로 현장에서 쉽게 활용하기 어렵다. 따라서 현장에서 싸고 쉽게 활용할 수 있으며, 기존 방법보다 검출률도 높고 시간단축도 가능한

기술개발이 절실히 요구되어, 본 연구에서는 competitive-PCR을 이용하여 정량화하는 방법을 개발하였다.

제1절 위해미생물의 molecular typing을 위한 fingerprinting 기술보완

1. 재료 및 방법

가. 표준균주

본 실험에 사용된 *Listeria* 균주는 총 13종의 표준균주 <Table 6-1>이며 이중 7종은 *Listeria monocytogenes*이었다. 이들은 국립수의과학검역원에서 분양받아 TSBY 배지 (Tryptic soy broth에 0.6% yeast extract를 첨가한 배지) 또는 Brain Heart Infusion 배지 (BHI)에서 배양한 후 사용하였다. 또한 *Salmonella* 균주는 국립보건연구원과 서울시보건환경 연구원에서 총 57종의 표준균주 <Table 6-5>를 분양받아 LB배지 (tryptone 1%, yeast extract 0.5%, NaCl 1%)에서 배양하여 사용하였다.

나. Primers

본 실험에 사용한 primer는 <Table 6-2>에 정리하였다.

다. DNA 분리 및 정제

미생물 균체로부터 DNA 분리를 위해서 guanidinetiocyante/phenol/chloroform 방법을 사용하였다. 이를 간략히 기술하면 약 0.5 ml의 균체 배양액에 0.25 ml의 solution D (4M guanidine thiocyanate, 0.025M sodium citrate, 0.5% sarcosyl)와 0.5 ml의 phenol-chloroform (1:1)을 첨가하여 약 1시간 정도 현탁시키고 원심분리하여 수용액층을 회수한 후 DNA를 isopropanol로 침전시켰다. 얻어진 pellet을 70% ethanol로 세척한 후 말려서 증류수에 녹여 polymerase chain reaction (PCR)에 사용하였다.

Table 6-1. *Listeria* spp. strains used in this study^a

Serial number	Species	Strains	Serotypes	Isolation
1	<i>L.monocytogenes</i>	ATCC19113	3	human
2	<i>L.monocytogenes</i>	ATCC19114	4a	
3	<i>L.monocytogenes</i>	ATCC19115	4b	human
4	<i>L.monocytogenes</i>	ATCC19117	4d	sheep
5	<i>L.monocytogenes</i>	ATCC19118	4e	chicken
6	<i>L.monocytogenes</i>	HPB#410	1/2a	
7	<i>L.monocytogenes</i>	ATCC35152		guinea pig
8	<i>L.ivanovii</i>	ATCC19119		sheep
9	<i>L.innocua</i>	ATCC33090	6a	cow brain
10	<i>L.welshimeri</i>	ATCC35897	6b	decaying plant
11	<i>L.seeligeri</i>	ATCC35967		soil
12	<i>L.grayi</i>	ATCC19120		chinchilla feces
13	<i>L.murrayi</i>	ATCC25401		corn stalks and leaves

^aSource: Adapted from Choi and Hong (2003).

라. PCR의 조건

각각의 PCR 반응액에는 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 μM dNTPs, 2.5 units *Taq* DNA polymerase, 10 pmol primer와 DNA template가 함유되도록 하되 총 부피는 50 μ가 되도록 하였다. 각 시료는 thermocycler (perkin-Elmer 2400, Foster, CA)에서 증폭 cycle을 시작하기 전에 94°C에서 5분간 DNA를 변성시킨 후 cycle로 진입하게 하였다.

Table 6-2. Primers used in this study

Primers	Sequences (5'-3')	T _m value (°C)	Reference
DG99 (OPL02)	TGGGCGTCAA	28.9	Mare et al. 2001
DG100 (OPL03)	CCAGCAGCTT	28.9	Mare et al. 2001
DG107(primer 6)	CCCCTCAGCA	33.0	Chansiripornchai et al. 2000
DG109 (Rib-F)	TTGTACACACCGCCCGTCA	55.8	Kostman et al. 1992
DG110 (Rib-R)	GGTACCTTAGATGTTTCAGTTC	46.5	Kostman et al. 1992
DG111 (ERICR)	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC	55.8	Millemann et al 1996
DG112 (ERIC2)	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	56.9	Millemann et al 1996
DG113 (PB1)	GGAAGTCTGCTA	24.8	Giovannacci et al 1999
DG114 (PB4)	AAGGATCAGC	24.8	Giovannacci et al 1999 Byun et al 2001
DG115 (HLWL74)	ACGTATCTGC	24.8	Giovannacci et al 1999 Byun et al 2001
DG116 (OPM01)	GTTGGTGGCT	28.9	Gravesen et al 2000
DG117 (OPM13)	GAGGGTGGCGGTTCT	53.3	Martinez et al 2003
DG118 (P-2)	GTTTCGCTCC	28.9	Martinez et al 2003
DG119 (UBC155)	CTGGCGGCTG	37.1	Detro et al 1996
DG120 (UBC127)	ATCTGGCAGC	28.9	Detro et al 1996
DG121 (Lis5)	GCTGGAGTCA	28.9	Giovannacci et al 1999
DG122 (Lis11)	AGCCAGGTCA	28.9	Giovannacci et al 1999

1) Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD)와 Ribotyping

각 cycle은 94°C 1분, 35°C 2분, 72°C 2분으로 하였고, 45 cycle후 72°C에서 7분간 extension시킨 후 반응을 종료하였다.

2) Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) fingerprinting

각 cycle은 94°C 45초, 55°C 45초, 72°C 45초로 하였고, 30 cycle후 72°C에서 7분간 extension시킨 후 반응을 종료하였다.

3) Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)

각 cycle은 94°C 45초, 52°C 45초, 72°C 45초로 하였고, 30 cycle후 72°C에서 7분간 extension시킨 후 반응을 종료하였다.

마. PCR 결과의 분석

SSCP와 pulsed field gel electrophoresis (PFGE)를 제외한 PCR후 증폭된 DNA조각은 agarose gel을 이용하여 전기영동하여 분리한 후 ethidium bromide로 염색하고 사진을 찍어 band pattern을 비교하였다. SSCP는 mini-protein II electrophoresis unit (BIO-RAD, Hercules, CA, USA)를 이용하여 분석하였다. PCR후 시료를 formamide의 농도가 95%가 되게 조정된 것을 끓는 물에서 5분간 처리한 후 얼음에서 식힌 다음 10% polyacrylamide gel (150 V 약 4시간)을 이용하

여 분리하였다. 전기영동후 gel은 plusOne silver stain kit (pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)를 이용하여 염색한 후 band pattern을 비교하였다.

바. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

PFGE를 위해 genomic DNA를 *L. monocytogenes* 의 경우 *Xho* I 또는 *Hind* III로 살모넬라의 경우는 *Bam*H I 또는 *Hind* III로 잘라준 후 FIGE Mapper Field Inversion system (Bio-Rad)을 이용하여 전기영동 하였다. genomic DNA는 CHEF bacterial genomic DNA plug kit (Bio-Rad)를 사용하여 준비하였다.

사. Data 분석

discrimination index는 다음 식을 이용하여 계산하였다 (Hunter, 1998).

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s n_j(n_j-1)$$

여기서 D는 numerical index of discrimination, N은 사용된 균주 총수, s는 RAPD type의 수, n_j 는 *j* type에 속하는 균주의 숫자를 의미한다.

2. *Listeria*의 특성분석을 위한 molecular typing 방법의 상호보완

가. ERIC fingerprinting

ERIC fingerprinting을 위해서는 DG111 (ERICR)과 DG112 (ERIC2) primer를 사용하였고 <Table 6-2>의 13종의 *Listeria* 표준균주를 9가지 유형으로 분리할 수 있었다 <Fig. 6-1>. 그러나 7가지 *L. monocytogenes*중 3가지가 동일한

유형을 보였고 *L. innocua*, *L. grayi*, *L. murrayi*를 구별하지 못하였다.

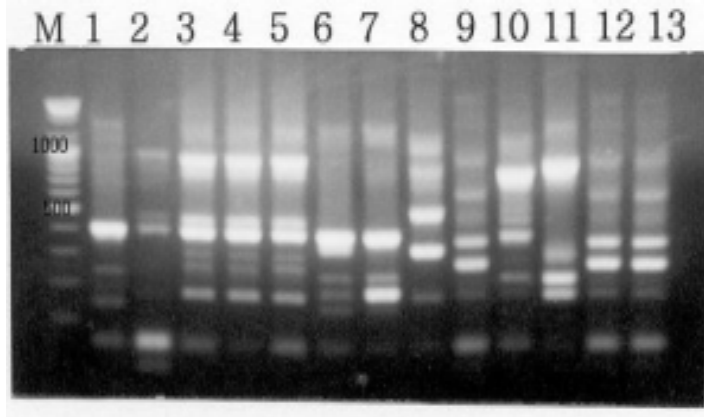


Fig. 6-1. ERIC-PCR performed with 13 different *Listeria* spp. strains. Lane M, 100-bp DNA ladder as a standard. Each strain was noted as number in Table 3-1.

나. Ribotyping-PCR

Ribotyping-PCR을 위해서는 DG109 (Rib-F)와 DG110 (Rib-R) primer를 사용하였고 <Table 6-2>, 13종의 *Listeria* 표준균주를 7가지 유형으로 분리할 수 있었다 <Fig. 6-2>. 검사한 *L. monocytogenes*중 ATCC 19114와 ATCC 19115가 동일 유형이었고, ATCC 19117과 19118 역시 동일유형이었다. *L. monocytogenes* HPB#410, *L. monocytogenes* ATCC 35152, *L. ivanovii*, *L. seeligeri* 역시 동일한 유형을 보였다.

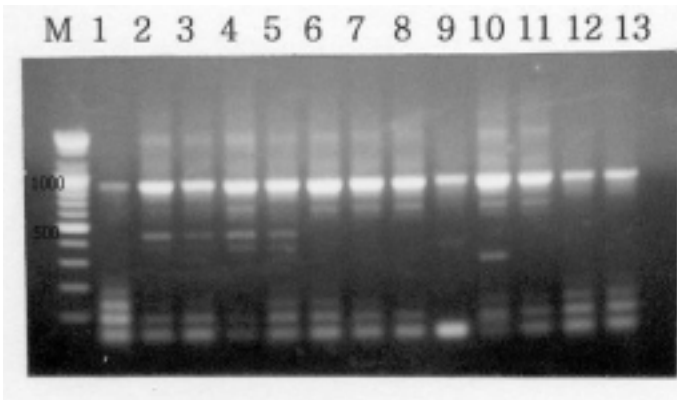


Fig.6-2. Ribotype-PCR performed with 13 reference *Listeria* spp. strains. Lane M, 100-bp ladder as a size standard. Each strain was noted as a number in Table 6-1.

다. RAPD

RAPD 분석은 한 개의 primer를 이용하여 임의의 DNA조각을 증폭하는 것이다. 이때 만들어지는 여러 형태의 DNA pattern을 이용하여 *Listeria*를 분류할 수 있다. RAPD typing은 분리력에 있어 현재 알려진 많은 typing 방법중 가장 분리력이 좋은 것으로 알려진 PFGE와 비슷한 것으로 보고 되었고 (Kerouanton, 1998), 고도의 정제도와 손상되지 않은 DNA 그리고 고가의 장비를 요구하는 PFGE에 비해 장비가 싸고 상대적으로 쉽게 이용할 수 있는 기술이다. *Listeria*균들을 효과적으로 RAPD typing 할 수 있는 primer들을 염선하기 위하여 리스테리아 표준균주 13종을 대상으로 총 31가지 primer들의 RAPD 분리력을 비교하여 보았고 이중 DG122에 의한 결과를 예로 제시하였다 <Fig. 6-3>.

모든 RAPD 분석은 최소한 2회 이상 실시하여 결정하였고 대부분의 경우 동일기기, 동일 조건 하에서는 RAPD

pattern은 재현성이 있었다. 그러나 동일 균주와 동일 primer라 하더라도 이미 보고된 다른 group의 RAPD pattern과는 차이를 보이는 것도 있었다 (Byun, 2001). 이는 PCR 조건이 약간 다르기 때문인 것으로 판단된다. 비록 1가지 primer만으로 모든 *Listeria* 표준균주들을 분리할 수는 없었지만 몇 가지 primer를 이용하여 RAPD를 행한 후 이를 종합해서 판단하면 사실상 모든 *Listeria* 표준균주들을 쉽게 분리할 수 있었다. 사용된 primer들 간의 분리력은 매우 차이가 있었고 총 31가지 primer중 비교적 분리가 나은 14가지 primer의 분리력을 분석한 결과를 <Table 6-3>에 정리하였다.

이중 DG107 (primer 6)은 살모넬라의 RAPD에 적용해 본 바는 있으나(Chansiripornchai, 2000) *L. monocytogenes*의 RAPD에는 적용해 본 바가 없었다. 본 연구결과 DG107도 *L. monocytogenes*의 RAPD typing에 좋은 결과를 보여주어 장차 *L. monocytogenes*의 RAPD 분석에 이용될 것이 기대된다. 그러나 이미 *Salmonella*의 RAPD typing에 사용된 primer들 중에 primer 1, 2, 3, 4, 5 (Chansiripornchai, 2000), OPL12 (Mare, 2001), OPB-6, OPB-17 (Lin, 1996), S (Williams, 1990), OPS-19 (Lacsoncha, 1998), OPG04, OPG08, OPG10, OPH04, OPH13 (Milleman, 1996) 등은 DNA segment의 amplification이 되지 않거나 된다 하더라도 band가 희미하거나 분리력이 좋지 않아 *L. monocytogenes*의 RAPD에는 적합하지 않았다.

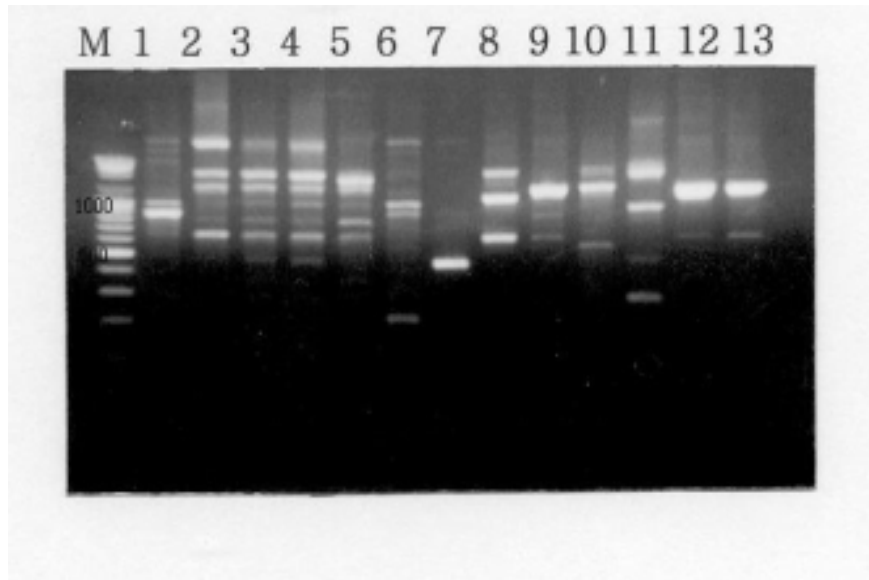


Fig.6-3. RAPD performed with 13 reference *Listeria* spp. strains. Lane M, 100-bp DNA ladder as a size standard. Each strain was noted as number in Table 6-1.

Table 6-3. RAPD typing results of *Listeria* spp.

#	RAPD profiles														Cumulative
Listeria spp. ^a	DG99	DG100	DG107	DG112	DG113	DG114	DG115	DG116	DG117	DG118	DG119	DG120	DG121	DG122	RAPD profiles
1	A1	B1	C1	D1	E1	F1	G1	H1	I1	J1	K1	L1	M1	N1	1
2	A2	B2	C2	D2	E2	F2	G2	H2	I2	J2	K2	L2	M2	N2	2
3	A2	B3	C3	D3	E2	F3	G3	H3	I3	J2	K3	L3	M3	N3	3
4	A2	B3	C4	D3	E2	F3	G3	H4	I3	J2	K4	L3	M3	N3	4
5	A3	B2	C5	D3	E2	F4	G4	H5	I2	J2	K5	L4	M4	N4	5
6	A4	B4	C6	D4	E1	F5	G5	H6	I4	J1	K6	L5	M5	N5	6
7	A5	B4	C6	D5	E3	F5	G6	H7	I4	J1	K7	L6	M6	N6	7
8	A6	B5	C7	D6	E4	F6	G7	H8	I5	J3	K8	L7	M7	N7	8
9	A7	B6	C8	D7	E5	F7	G8	H9	I6	J4	K9	L8	M8	N8	9
10	A8	B7	C9	D8	E6	F8	G9	H10	I7	J5	K10	L9	M9	N9	10
11	A9	B8	C10	D9	E7	F9	G10	H11	I8	J6	K11	L10	M10	N10	11
12	A7	B6	C11	D7	E8	F7	G8	H9	I6	J4	K9	L11	M8	N8	12
13	A7	B6	C11	D7	E9	F7	G8	H9	I6	J7	K9	L8	M11	N11	13
Dvalue	0.923	0.923	0.974	0.923	0.910	0.935	0.948	0.961	0.935	0.871	0.961	0.974	0.974	0.974	

^aThe numbers are the strain numbers given in Table 6-1.

본 실험에서 비교해 본 primer들 중 DG112 (ERIC2), DG113 (PB1), DG114 (PB4), DG115 (HLWL74), DG116 (OPM-1), DG117 (OPM-13), DG118 (P-2), DG119 (UBC115), DG120 (UBC127), DG121 (Lis5), G122 (Lis11)는 이미 다른 연구자들이 야외분리 *L. monocytogenes* spp.의 RAPD를 위해 적용한 바 있으며(Byun, 2001; Destro, 1996; Giovannacci, 1999; Kerouanton, 1998; Martinez, 2003), 이를 본 실험에서 사용한 primer의 명칭과 결부시켜 요약하면 <Table 6-4>와 같다. 이 결과를 분석해 보면 야생균주의 경우 검사한 총 균주수에 비해 RAPD pattern수가 현저히 적은데 이는 같은 균주가 반복 분리되었기 때문으로 보인다. Discrimination index만으로 primer의 분리력을 비교하면 DG107, DG120, DG121 그리고 DG122가 분리력이 가장 낮고 DG116과 DG119가 다음으로 좋으며 DG118이 가장 나쁜 것으로 나타났다. 그러나 실제로 이를 typing에 적용할 경우를 가정하면 band scoring의 난이도가 discrimination index만큼 중요한 판단기준으로 작용할 것으로 보인다. 특히 DG115과 DG119의 경우는 discrimination index는 DG107, DG120, DG121, DG122에 비해 떨어지지만 band가 명확하면서도 band의 숫자도 적당하여 리스테리아의 RAPD typing에 매우 유용한 primer라고 판단되었다. 따라서 discrimination index, band의 숫자, band scoring 난이도 등을 종합적으로 고려할 때 DG107 (primer 6), DG115 (HLWL74), DG119 (UBC155), DG120 (UBC127), DG121 (Lis5), DG122 (Lis11)가 나머지 25개 primer들 보다 나은 primer로 판단되었다. 요약하면 본 연구에서는 표준 13균주를 이용하여 primer들의 performance를 비교해 본 결과 primer에 따라 9-11개의 RAPD pattern이 얻어졌을 수 있는 6개 primer를 선별하였다.

라. PFGE

표준 13균주 중 *L. monocytogenes* 7균주를 이용하여 genomic DNA를 뽑아 *Hind* III 또는 *Xho* I으로 자른 다음 PFGE를 행하였다. 그러나 앞서 비교한 다른 방법들에 비해 시간이 많이 걸리고 실제로 field에서 사용하기에는 고난도의 기술을 요구하여 비교대상에서 제외하기로 하였다.

마. Typing 방법들의 분리력 비교

비교한 3가지 방법은 D값에 있어 2가지 RAPD가 모두 0.9743, ERIC fingerprinting이 0.9230, ribotyping-PCR이 0.8846으로 RAPD가 ERIC fingerprinting 과 ribotyping-PCR에 비해 높은 D값을 보였다 <Table 6-4>.

Table 6-4. Typing of the 13 *Listeria* spp. strains

# <i>Listeria</i> spp. ¹⁾	ERIC	Ribotyping	RAPD (DG122)	RAPD (DG107)	Composite ²⁾					
					1	2	3	4	5	6
1	i	a	A1	B1	a1	b1	c1	d1	e1	f1
2	ii	b	A2	B2	a2	b2	c2	d2	e2	f2
3	iii	b	A3	B3	a3	b3	c3	d3	e3	f3
4	iii	c	A3	B4	a4	b4	c3	d4	e4	f4
5	iii	c	A4	B5	a5	b5	c4	d5	e5	f4
6	iv	d	A5	B6	a6	b6	c5	d6	e6	f5
7	v	d	A6	B6	a7	b7	c6	d7	e6	f6
8	vi	d	A7	B7	a8	b8	c7	d8	e7	f7
9	vii	e	A8	B8	a9	b9	c8	d9	8	f8
10	viii	f	A9	B9	a10	b10	c9	d10	e9	f9
11	ix	d	A10	B10	a11	b11	c10	d11	e10	f10
12	vii	g	A8	B11	a12	b12	c8	d12	e11	f11
13	vii	g	A11	B11	a13	b13	c11	d12	e11	f11
D value	0.9230	0.8846	0.9743	0.9743						

¹⁾ The numbers are the strain numbers given in Table 6-1.

²⁾ Composite procedures are (1) RAPD (DG122) and ribotyping-PCR; (2) RAPD (DG107) and RAPD (DG122); (3) RAPD (DG122) and ERIC; (4) RAPD (DG107) and ERIC; (5) RAPD (DG107) and ribotyping-PCR; (6) ERIC and ribotyping-PCR.

이들 방법 중 단일방법으로 13가지 *Listeria* 표준균주 모두를 분리할 수 있는 방법은 없었다. 그러나 RAPD (DG122)와 ribotyping-PCR 2가지를 종합하거나 (composite 1) 2가지 RAPD 결과를 종합하여 판단할 경우 (composite 2)는 13가지 유형으로 모두 분리할 수 있었다<Table 6-4>. 반면 RAPD (DG122)와 ERIC fingerprinting의 결과를 종합할 경우 (composite 3), DG107을 이용한 RAPD와 ribotyping-PCR을 종합한 경우 (composite 5), 그리고 ERIC fingerprinting과 ribotyping-PCR을 종합한 경우 (composite 6)에는 RAPD를 단독으로 실시한 것과 마찬가지로 11가지 유형으로만 분리할 수 있었다. 또한 RAPD (DG107)와 ERIC fingerprinting을 종합할 경우 12가지 유형으로 분리할 수 있었다 (composite 4).

결론적으로 *Listeria*균의 경우 각 방법을 단독으로 행할 경우는 RAPD가 ERIC fingerprinting이나 ribotyping-PCR 보다 분리력이 뛰어나 typing에 더 적합한 것으로 판단되나 이 역시도 13가지를 모두 다른 유형으로 분리하지는 못했다. 그러나 RAPD를 ribotyping-PCR과 병행하여 사용하거나 2가지 primer를 이용하여 각각의 RAPD를 행한 후 이를 종합적으로 판단할 경우는 13가지를 모두 다른 유형으로 분리하는 것이 가능하였다. 따라서 야생균주를 이용한 typing에는 2가지 RAPD를 종합하거나 DG122를 이용한 RAPD와 Ribotyping-PCR 결과를 종합해서 판단하는 것이 유용할 것으로 판단된다.

3. *Salmonella*의 특성분석을 위한 molecular typing 방법의 상호보완

최근 분자생물학적 기술을 *Salmonella*의 분류에 적용하고 있다. PFGE, RAPD, ERIC, SSCP, hybridization, Ribotyping-PCR등이 여기에 속한다. 특히 RAPD fingerprinting과 ERIC fingerprinting, ribotyping-PCR과 SSCP를 이용하여 역학조사를 성공적으로 수행한 바 있으므로 (Giovannacci, 1999; Helmuth, 1994; Kerouanton, 1996; Kostman, 1992; Lehner, 1999; Martin, 1997; Millemann, 1996; Tsen, 2000), 이들 분자생물학적 기술을 이용한 방법들을 비교해보고 또 서로 보완이 가능한 지 살펴보았다. 효과적인 typing방법을 찾기 위해 총 57가지의 역학적으로 서로 관련이 없는 *Salmonella* 표준균주를 사용하여 4가지 분류방법을 비교하여 보았다.

가. RAPD

*Salmonella*의 RAPD를 위해서는 우선 57 균주 중 16 균주를 이용하여 20가지의 primer들의 분리력을 비교하여 (임, 2003) 이중 가장 나은 3가지 primer (OPL-03, primer 1, Primer A) 를 선발하여 다른 fingerprinting방법과의 비교에 사용하였다. 일반적으로 전체과정에는 약 9 시간이 소요되었다. 57 *Salmonella* 표준균주로부터 OPL-03를 사용할 경우 42가지의 RAPD fingerprinting을, Primer 1의 경우는 51가지의 fingerprinting을, 그리고 primer A를 사용할 경우는 54가지의 fingerprinting pattern을 얻을 수 있었다. D value는 각각 0.979, 0.994, 0.996 이었다 <Table 6-5>. 균주에 따라 다르지만 이들 primer로 부터 보통 1-8개의 band가 관찰되었다. 각 band의 크기는 약 400-2000 base의 범위를 보였다 <Fig. 6-4>. 이들 3가지 primer 들은 각각이 증폭하는 부위가 달라 이들로부터 얻어진 결과를 combination할 경우 57가지 균주를 55가지의 pattern으로 분류할 수 있었다<Table 6-5>.

Table 6-5. Molecular typing of the 57 *Salmonella* serotypes

#	Serotypes	Sero- group	RAPD			Ribotyping	ERIC	SSCP	Composite procedure					
			OPL -03	Pr.1	Pr.A				1	2	3	4	5	6
1	<i>S. typhi</i> ATCC19430	D1	A1	B1	C1	I	1	D1	A1	B1	C1	D1	E1	F1
2	<i>S. paratyphi</i> ATCC11511	A	A2	B2	C2	I	2	D1	A2	B2	C2	D2	E2	F2
3	<i>S. enteritidis</i> ATCC4931	D1	A3	B3	C3	I	3	D2	A3	B3	C3	D3	E3	F3
4	<i>S. schottmulleri</i> ATCC10719	B	A4	B4	C4	I	4	D3	A4	B4	C4	D4	E4	F4
5	<i>S. choleraesuis</i> ATCC13312	C1	A5	B5	C5	I	5	D3	A5	B5	C5	D5	E5	F5
6	<i>S. typhimurium</i> ATCC14028	B	A6	B6	C6	I	6	D2	A6	B6	C6	D6	E6	F6
7	<i>S. gallinarum</i> ATCC9184	D1	A7	B3	C7	I	6	D1	A7	B7	C7	D7	E7	F7
8	<i>S. london</i> ATCC8389	E1	A8	B7	C8	I	7	D3	A8	B8	C8	D8	E8	F8
9	<i>S. enteritidis</i> ATCC13076	D1	A9	B3	C9	III	8	D2	A9	B9	C9	D9	E9	F9
10	<i>S. schwarzengrund</i> IVK B01177	B	A10	B8	C10	I	9	D4	A10	B10	C10	D10	E10	F10
11	<i>S. eingedi</i> IVK B01183	C1	A11	B9	C11	I	10	D5	A11	B11	C11	D11	E11	F11
12	<i>S. uppsala</i>	B	A12	B10	C12	I	7	D4	A12	B12	C12	D12	E12	F12
13	<i>S. ohio</i>	C1	A13	B11	C13	I	11	D2	A13	B13	C13	D13	E13	F13
14	<i>S. budapest</i>	B	A14	B12	C14	I	12	D2	A14	B14	C14	D14	E14	F14
15	<i>S. wien</i>	B	A15	B13	C15	I	11	D2	A15	B15	C15	D15	E15	F15
16	<i>S. virginia</i>	C3	A16	B14	C16	I	6	D6	A16	B16	C16	D16	E16	F16
17	<i>S. muenchen</i>	C2	A17	B14	C17	I	13	D7	A17	B17	C17	D17	E17	F17
18	<i>S. cerro</i>	K	A16	B15	C18	III	14	D4	A18	B18	C18	D18	E18	F18
19	<i>S. nigeria</i>	C1	A18	B16	C19	I	15	D3	A19	B19	C19	D19	E19	F19
20	<i>S. blegdam</i>	D1	A19	B3	C20	I	16	D2	A20	B20	C20	D20	E20	F20
21	<i>S. yeerongpilly</i>	E1	A20	B17	C21	I	17	D3	A21	B21	C21	D21	E21	F21
22	<i>S. give</i>	E1	A21	B18	C22	I	18	D8	A22	B22	C22	D22	E22	F22
23	<i>S. hadar</i>	C2	A22	B19	C23	III	19	D9	A23	B23	C23	D23	E23	F23
24	<i>S. essen</i>	B	A19	B20	C22	I	16	D2	A20	B24	C24	D24	E24	F24
25	<i>S. ruanda</i>		A19	B20	C22	I	20	D2	A24	B25	C24	D24	E24	F25
26	<i>S. nieukerk</i>	C4	A23	B21	C24	I	21	D2	A25	B26	C25	D25	E25	F26
27	<i>S. benin</i>	D2	A18	B22	C25	I	22	D3	A26	b27	C26	D26	E26	F27
28	<i>S. sereman</i>	D1	A24	B23	C26	I	23	D10	A27	B28	C27	D27	E27	F28
29	<i>S. kentucky</i>	C3	A16	B24	C27	I	6	D3	A16	B29	C28	D28	E28	F29
30	<i>S. djugu</i>	C1	A25	B25	C28	I	24	D2	A28	B30	C29	D29	E29	F30

Table 6-5. (continued)

#	Serotypes	Sero- group	RAPD			Ribotyping	ERIC	SSCP	Composite procedure ^a					
			OPL-03	Pr.1 ^b	Pr.A ^c				1	2	3	4	5	6
31	<i>S. meleagridis</i>	E1	A16	B26	C29	I	25	D3	A29	B31	C30	D30	E30	F31
32	<i>S. hillindon</i>	D2	A19	B20	C22	I	26	D2	A30	B32	C24	D24	E24	F32
33	<i>S. istanbul</i>	C3	A16	B27	C30	IV	16	D11	A31	B33	C31	D31	E31	F33
34	<i>S. lindenburg</i>	C2	A26	B28	C31	I	27	D5	A32	B34	C32	D32	E32	F34
35	<i>S. derby</i>	B	A27	B29	C32	I	28	D2	A33	B35	C33	D33	E33	F35
36	<i>S. mbandaka</i>	C1	A28	B30	C33	I	29	D2	A34	B36	C34	D34	E34	F36
37	<i>S. haardt</i>	C3	A29	B31	C34	I	30	D3	A35	B37	C35	D35	E35	F37
38	<i>S. schwarzengrund</i>	B	A30	B32	C35	I	31	D4	A36	B38	C36	D36	E36	F38
39	<i>S. stanley</i>	B	A31	B33	C36	I	32	D10	A37	B39	C37	D37	E37	F39
40	<i>S. virchow</i>	C1	A29	B34	C37	I	33	D3	A38	B40	C38	D38	E38	F40
41	<i>S. montevideo</i>	C1	A32	B35	C38	I	34	D4	A39	B41	C39	D39	E39	F41
42	<i>S. weltevreden</i>	B1	A33	B36	C39	I	35	D2	A40	B42	C40	D40	E40	F42
43	<i>S. bareilly</i>	C1	A34	B37	C40	I	36	D3	A41	B43	C41	D41	E41	F43
44	<i>S. rissen</i>	C1	A11	B38	C41	I	37	D5	A42	B44	C42	D42	E42	F44
45	<i>S. senftenberg</i>	E4	A11	B39	C42	I	38	D2	A43	B45	C43	D43	E43	F45
46	<i>S. bardo</i>	C3	A35	B40	C43	I	39	D3	A44	B46	C44	D44	E44	F46
47	<i>S. anatum</i>	E1	A16	B41	C44	I	40	D3	A45	B47	C45	D45	E45	F47
48	<i>S. richmond</i>	C1	A36	B42	C45	I	41	D4	A46	B48	C46	D46	E46	F48
49	<i>S. uganda</i>	E1	A34	B43	C46	II	42	D9	A47	B49	C47	D47	E47	F49
50	<i>S. ahmadi</i>	E4	A30	B44	C47	I	43	D4	A48	B50	C48	D48	E48	F50
51	<i>S. dublin</i>	D1	A37	B45	C48	I	44	D2	A49	B51	C49	D49	E49	F51
52	<i>S. hindmarsh</i>	C3	A16	B46	C49	I	45	D2	A50	B52	C50	D50	E50	F52
53	<i>S. pakistan</i>	C3	A38	B47	C50	I	46	D3	A51	B53	C51	D51	E51	F53
54	<i>S. eingedi</i>	C1	A39	B48	C51	I	47	D10	A52	B54	C52	D52	E52	F54
55	<i>S. braenderup</i>	C1	A40	B49	C52	I	48	D3	A53	B55	C53	D53	E53	F55
56	<i>S. infantis</i>	C1	A41	B50	C53	I	49	D3	A54	B56	C54	D54	E54	F56
57	<i>S. heidelberg</i>	B	A42	B51	C54	I	50	D3	A55	B57	C55	D55	E55	F57
Number of types			42	51	54	4	50	11	55	57	55	55	55	57
D value ^d			0.979	0.994	0.996	0.167	0.993	0.799						

^a Composite procedures are (1) RAPD (OPL-03) and ERIC fingerprinting patterns; (2) RAPD (pr.1) and ERIC; (3) RAPD (OPL-03) and RAPD (Pr.1); (4) RAPD (OPL-03) and RAPD (Pr.A); (5) RAPD (Pr.1) and RAPD (Pr.A); (6) RAPD (Pr.A) and ERIC.

^b Primer 1.

^c Primer A.

^d Simpson's index of diversity.

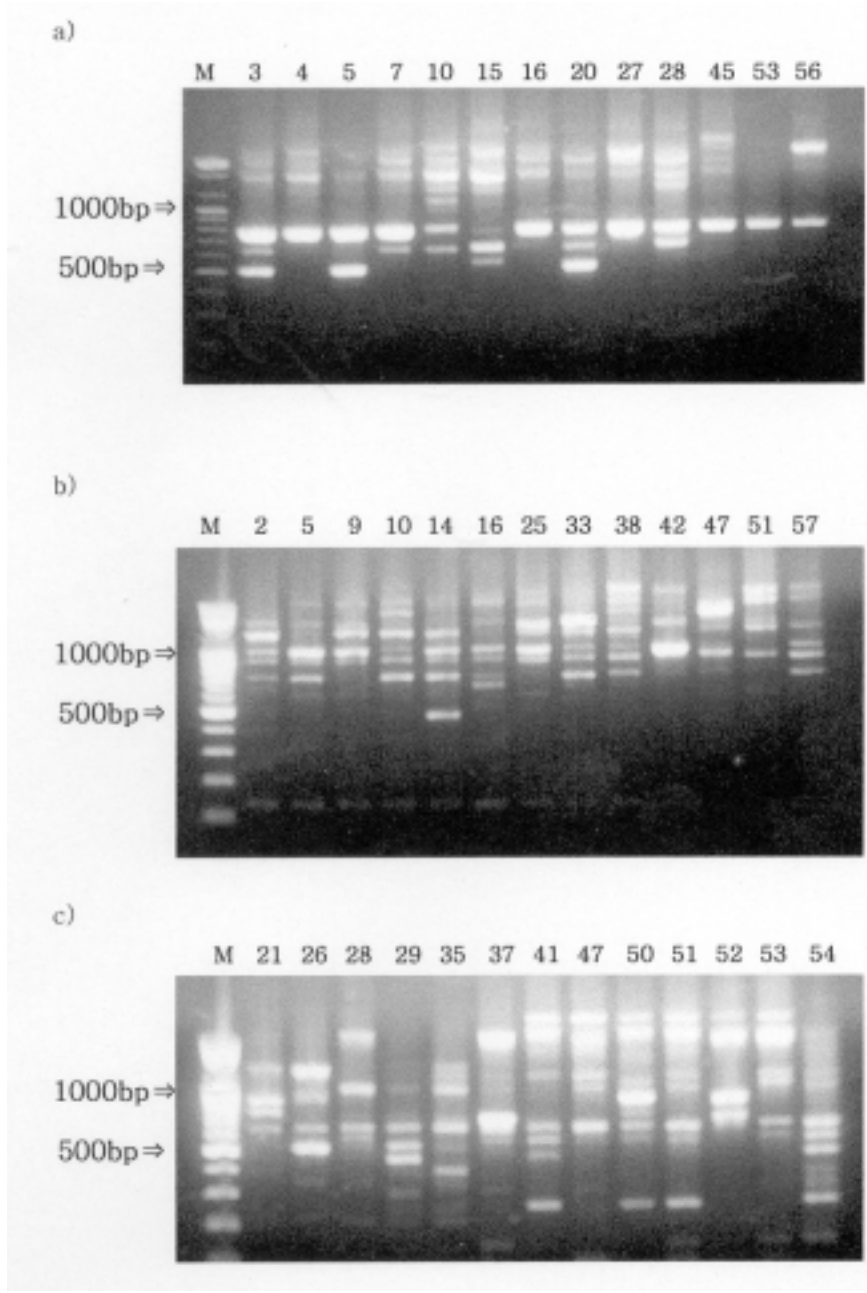


Fig. 6-4. RAPD patterns of *Salmonella* strains with three different primers. (a) primer OPL-03, (b) primer 1, (c) primer A. Lane M, molecular weight marker (100bp ladder). The numbers on each lane are the strain numbers given in Table 6-5.

나. ERIC

ERIC primer로 DNA를 증폭하면 더 높은 온도의 T_m 값을 갖는 2가지 primer를 이용하게 되므로 한 가지 primer를 사용하면서 낮은 온도에서 행하는 RAPD 보다 재현성이 좋을 것으로 기대된다. 보통 전체과정을 수행하는 데 약 6시간이 소요되었다. ERIC을 행하면 57 표준균주로부터 50가지의 ERIC fingerprinting이 얻어졌다 <Table 6-5>. 균주에 따라 6-11개 정도의 band가 얻어졌으며 이중 일부 band는 흐리게 나타났다 <Fig. 6-5>. 얻어진 band들의 크기는 200-1200 base 정도였다. ERIC fingerprinting의 D value는 0.993이었다.

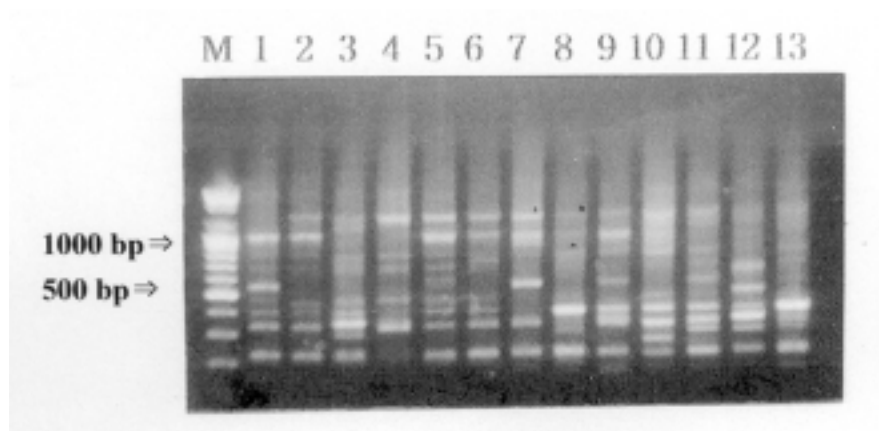


Fig. 6-5. ERIC fingerprinting patterns of *Salmonella* strains. Lane M, molecular weight marker (100bp ladder): lane 1, *S. schottmuelleri*; lane 2, *S. typhimurium* ATCC14028; lane 3, *S. schwarzengrund* IVK B01177; lane 4, *S. ohio*; lane 5, *S. muenchen*; lane 6, *S. blegdam*; lane 7, *S. hadar*; lane 8, *S. ruanda*; lane 9, *S. istanbul*; lane 10, *S. haardt*; lane 11, *S. rissen*; lane 12, *S. senftenberg*; lane 13, *S. braenderup*.

다. Ribotyping-PCR

전체 과정을 수행하는데 약 6시간 정도 걸렸다. 57가지 표준균주로부터 단지 4가지 다른 Ribotyping-PCR pattern이 얻어졌다 <Fig. 6-6>. Ribotyping-PCR의 D value는 0.167이었다 <Table 6-5>. 균주에 따라 2-4개의 band가 얻어졌고 그 band들의 크기는 600-2000bp 정도였다.

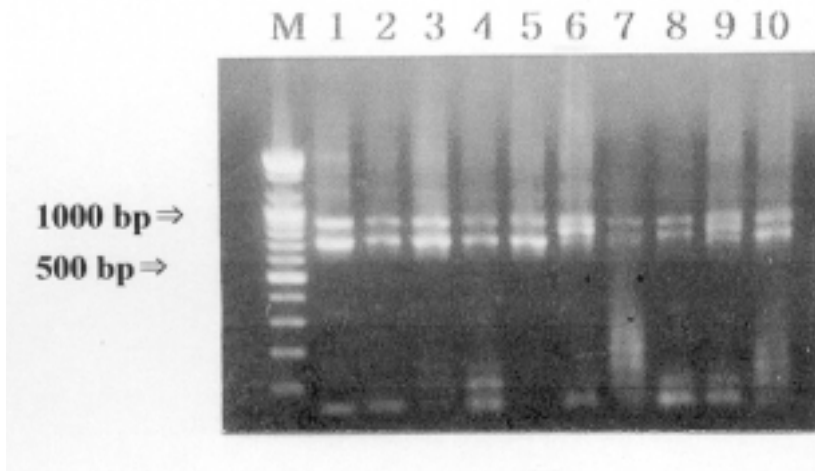


Fig. 6-6. Ribotyping-PCR patterns of *Salmonella* strains. Lane M, molecular weight marker (100bp ladder); lane 1, *S. choleraesuis* ATCC13312; lane 2, *S. essen*; lane 3, *S. hillington*; lane 4, *S. virchow*; lane 5, *S. infantis*; lane 6, *S. give*; lane 7, *S. derby*; lane 8, *S. mbandaka*; lane 9, *S. haardt*; lane 10, *S. richmond*.

라. SSCP

SSCP를 수행하는 데는 보통 10시간 정도가 소요되었다. 증폭 후 1.5% agarose gel에서 확인 시 표준 57균주 모두로부터 예상했던 크기인 284 bp DNA를 확인할 수 있었다 (data not shown). 95% formamide하에서 변성 후 polyacrylamide gel로 분리한 후 silver stain을 행한 결과 표준 57 균주로부터 11가지 다른 SSCP pattern을 관찰할 수 있었다 <Table 6-5, Fig. 6-7>. SSCP에 대한 D value는 0.799였다.

마. Composite analysis

4가지 방법을 비교해 본 결과 <Table 6-5> ribotyping-PCR을 사용했을 때 분리가 잘 되지 않았다. 조사해 본 방법 중에는 primer A를 사용한 RAPD가 가장 분리력이 좋았다. PFGE도 *Salmonella* 표준 14균주를 이용하여 genomic DNA를 *Bam* HI으로 잘라 시도해 보았으나 앞에 비교한 방법들에 비해 기술상의 어려움이 많았고 균주간의 차이 또한 기대와는 달리 명확하지 않았다(data not shown).

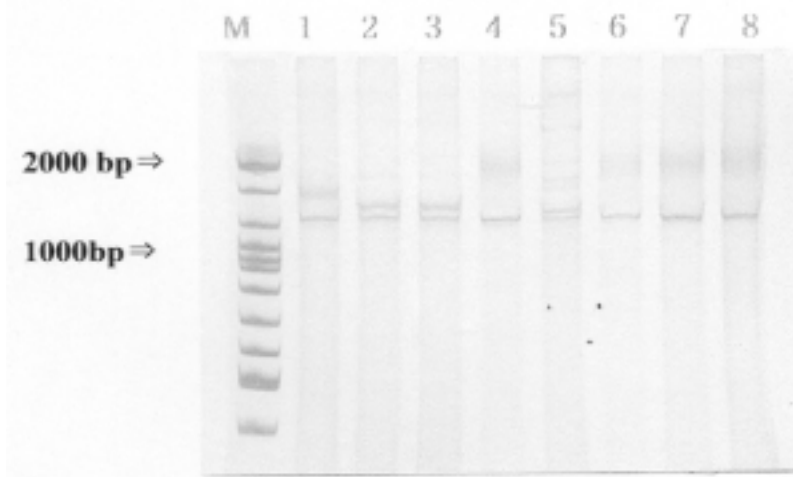


Fig. 6-7. SSCP patterns of *Salmonella* strains. lane M, molecular weight marker (100bp ladder, not treated with formamide and heat); lane 1, *S. typhi*; lane 2, *S. paratyphi*; lane 3, *S. enteritidis* ATCC4931; lane 4, *S. typhimurium*; lane 5, *S. gallinarum*; lane 6, *S. enteritidis* ATCC13076; lane 7, *S. ohio*; lane 8, *S. budapest*.

Martin 등 (1997)은 primer A를 사용한 RAPD가 *Salmonella enterica* G group을 잘 분리한다는 것을 보고한 바 있다. 그러나 RAPD fingerprinting만으로는 57가지 표준균주를 모두 분리할 수는 없었다. 일반적으로 다른 2가지 typing방법을 combination하면 살모넬라 균주들을 더 잘 분리할 수 있었다. Composite 1은 OPL-03를 이용하여 행한 RAPD 결과와 ERIC pattern을 combination한 것으로 55가지의 composite profile이 얻어진 반면 composite 2와 6은 primer 1 또는 primer A를 사용해 얻은 RAPD 결과와 ERIC pattern을 combination한 것으로 57 composite profile을 얻을 수 있었다. 2가지 RAPD fingerprinting pattern을 combination한 composite 3, 4, 5의 경우는 각각 55가지 composite profile을 얻을 수 있었다. 그러나 RAPD와 SSCP를 combine할 경우 단지 48가지 또는 53가지 composite profile만을 얻을 수 있었다 (data not shown). ERIC fingerprinting과 SSCP pattern을 combination하여도 55가지 composite profile이 얻어졌다 (data not shown). 이로부터 primer 1 또는 primer A를 이용하여 RAPD를 한 결과와 ERIC의 결과를 combination하는 것이 가장 균주들 간의 차이를 잘 구분하여 57가지 *Salmonella* 균주를 57가지 type으로 분류할 수 있음을 알 수 있었다.

동일한 fingerprinting pattern을 보이는 균들끼리는 유전적으로도 서로 유사성이 높을 것이라고 생각된다. 그러나 이 같은 유사성도 어떤 방법을 적용하는 지에 따라 다르다고 알려졌다. 이번에 비교한 4가지 typing 방법 간에 직접적인 연관성은 없었다. 이는 RAPD와 ribotyping를 *Proteus mirabilis* 분리주에 적용 시 두 가지 분석방법 간에 완전히 일치했다는 보고 (Bingen, 1993)와 *Legionella pneumophila*에 적용 시 일치율이 매우 높았다는 보고 (Gomez-Lus, 1993)와는 다소 다른 결과이다. 현재로서는 왜 이 같은 차이를 보이는 지 알려진 바는 없으나 균주간의 유전적 차이를 반영하는 것으로 판단된다.

분자생물학적 기술을 이용했을 때 보이는 상이한 연관성은 4가지 다른 기술에 의해 감지되는 유전적 차이를 고려하면 이해가 되는 데 예로 RAPD와 SSCP는 전체 DNA에서 fingerprinting에 사용되는 target 부위가 다르고 ribotyping-PCR은 rDNA 부위를 증폭하고 ERIC의 경우는 repetitive consensus regions을 증폭하기 때문이다. 그럼에도 불구하고 3가지 primer를 사용한 RAPD와 SSCP의 결과는 *S. essen*과 *S. ruanda* 그리고 *S. hillington*가 동일한 RAPD pattern과 SSCP profile을 보였으므로 이들은 유전적으로 매우 연관이 높을 것으로 추정된다. 비교해 본 방법 중 단지 ERIC fingerprinting만이 이들 3가지 균주의 분리를 가능하게 했다. 이들 분자생물학적 방법들은 서로 연관성이 없기 때문에 combination할 경우 분리력을 더 높여주었고 RAPD와 ERIC은 combine할 경우 잇점이 더 많게 된다.

Typing 방법들이 얼마나 더 효율적인지는 discrimination value인 D 값을 계산하면 비교가 가능하다. Hunter 등 (1988)은 D값이 0.9 이상이면 분리력이 좋은 것으로 발표한 바 있다. 이 같은 기준에서 보면 3가지 primer를 사용한 RAPD 나 ERIC typing은 단독으로도 살모넬라의 typing에 유용하다고 판단된다. 비록 ERIC fingerprinting이 조사해본 방법 중에 가장 좋은 방법은 아니지만 57개 표준균주를 50개 pattern으로 분류하여 typing에 유용한 방법이라 판단된다. 그러나 ribotyping-PCR은 상대적으로 낮은 D값을 보여 역학조사 등에 활용하기에는 부적합하다고 판단되었다. 이는 RAPD나 ERIC에 비해 더 잘 보존된 부분을 증폭하기 때문으로 보인다. 그러나 Kerouanton 등 (1996)은 32개의 *S. Dublin* 균주로부터 7가지 ribotyping pattern을 얻었다고 보고하였고 Millemann 등 (1996)은 56개 *S. typhimurium* 균주로부터 ERIC-PCR은 2가지 pattern을 보였으나 ribotyping pattern은 9가지, RAPD는 7가지 pattern을 보였다고 발표한 바 있다. 현재로서는 왜 이 같이 상반된 결과가 나왔는지 명확하지는 않으나 실험실들 간에 사용된 ERIC-PCR의

조건이 다르고 ribotyping 또한 PCR 대신 hybridization을 적용했기 때문에 판단된다.

현재의 연구는 RAPD와 ERIC fingerprinting을 combine하여 사용하면 살모넬라 균주들을 잘 분리할 수 있을 것이라는 것을 보여준다. 그러므로 현장에서도 이 같이 combine하여 사용할 것을 권한다. RAPD와 ERIC은 실제로 수행하기도 쉽고 특별히 훈련받지 않은 실험실에서도 쉽게 수행할 수 있으며 시간이 적게 걸리는 잇점이 있다. Primer 1 또는 primer A를 사용하여 RAPD를 행한 결과와 ERIC의 결과를 combine 하면 *Salmonella*의 오염원을 밝혀내고 분리된 균주들 간의 관련성 또한 규명이 가능할 것으로 판단된다.

제2절 위해미생물의 신속검출 및 정량화 기술개발

1. 재료 및 방법

가. 표준균주

본 실험에 사용된 *Listeria* 균주와 *Salmonella* 균주는 제1장에 기술된 바와 같다 <Table 6-1, 6-5>. *E. coli* S-15 (O26:K60:H46), S-19 (O55:K59:H-), S-22 (O111:K58:H-), S-23 (O114:K90:H32), S-28 (O119:K69:H27), O157:H7 ATCC43894는 수의과학검역원에서 분양받았고 *E. coli* O157:H7 43888과 *Yersinia enterocolitica* 27729은 국립보건연구원에서 *E. coli* K12 (23736)은 한국생명공학연구원 유전자은행실에서 분양받아 사용하였다. *Shigella flexeri* 9199, *Shigella sonnei* 9290, *Staphylococcus aureus* 39와 40은 강원대학교에서 분양받아 사용하였다. 세균수 검사는 *L. monocytogenes*는 TSBY agar에 plating하여 30°C에서 배양한 후 Most Probable Number (MPN)방법으로 산출하였고, *Salmonella*는 LB배지에 희석 배율별로 3 plate씩 깔아 37°C에서 overnight 후 계산하였다.

나. Primers

본 실험에 사용한 primer들은 <Table 6-6>에 정리하였다. *L. monocytogenes*의 경우 *L. monocytogenes*에 특이한 것으로 알려진 (Choi & Hong 2003) *hlyA* 유전자 (GenBank accession number X15127)을 사용하였다. primer design시 primer의 특이성은 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)로 check하였다. *Salmonella*의 경우 *Salmonella*에 특이한 것으로 알려진 (Rahn, 1992) *invA* 유전자 (GenBank accession number AL513382; *S. typhi* CT18)의 특이성을 조사한 후 사용하였다.

Table 6-6. Primers used in this study.

Primers	Sequences (5'-3')	Polarity	T _m value (°C)	Reference
DG69	GTGCCGCCAAGAAAAGGTTA	sense	57.3	Choi & Hong 2003
DG74	CGCCACACTTGAGATAT	antisense	50.4	Choi & Hong 2003, Golsteyn Thomas 등 1991.
DG75	GACCGCAAGGTTGAAACTCA	sense		Choi & Hong 2003
DG76	CAGCCTACAATCCGAACTGA	antisense		Choi & Hong 2003
DG131	GCTGGTCTGAGAGGATGACC	sense	61.4	
DG132	AAGGGCACAACCTCCAAGTC	antisense	59.4	
DG146	GTGAAATTATCGCCACGTTCCGG GCAA	antisense	68.54	
DG147	TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	sense	62.69	
DG158	CGGATCTCATTAATCAACAATA	sense	52.8	
DG159	CTCTTTCGTCTGGCATTATC	antisense	55.3	
DG164	CACGCGGATGAAATCGATAAGT	sense	58.4	
DG165	AGTATACCACGGAGATGCAGTG	sense	60.3	
DG166	AAAGATGGAAATGAATATAT	sense	45.0	
DG167	TCTGGAAGGTCCTGTAGGTTCA	antisense	58.4	
DG168	GCAACTGCTCTTTAGTAACAGC	antisense	58.4	
DG169	CACTTGAGATATATGCAGGAGG	antisense	58.4	
DG170	ATTTCAAATAAACTTGACGGCC	antisense	54.7	
DG171	TTACGGCTTTGAAGGAAGAATT	antisense	54.7	
DG191	CTCCGCCTGCAAGAGCTCAGAC GCCAATCG	sense	73.6	
DG192	CATCTTTCCACTGATATCTTT ACTGCGTTG	antisense	64.0	
DG193	CAACGCAGTAAAGATATCAGT GGAAAGATG	sense	64.0	
DG194	GGGAACTCCTGGGGATCCTCG ATTAAAAGT	antisense	68.1	

다. *L. monocytogenes hlyA* 유전자의 일부가 결실된 plasmid의 제조

원래의 *hlyA* 유전자로부터 148 base가 결실된 DNA를 인위적으로 만들기 위해 우선 *EcoR V* site를 만들었다. *hlyA* 유전자의 *EcoR V* site는 overlap extension 방법으로 만들었다. 이를 간단히 설명하면 다음과 같다. DG191과 DG192 primer쌍을 이용하여 *EcoR V*뿐 아니라 나중에 subcloning에 사용할 *Sac I*가 upstream 쪽에 만들어지게 DNA 조각을 증폭하였다. 또한 DG193과 DG194 primer쌍을 이용하여 *EcoR V*뿐 아니라 subcloning에 사용할 *BamH I*가 downstream쪽에 만들어지게 DNA 조각을 증폭하였다. 증폭한 DNA를 각각 PCRquick-spin™ PCR product Purification kit로 정제한 후 합하여 DG191과 DG194 primer쌍으로 다시 증폭하였다. 증폭된 DNA조각을 *Sac I*과 *BamH I* 효소로 잘라 이를 *EcoR I* site를 미리 없앤 pGEM-4Z plasmid에 cloning하였다 (pGEM-4Z LM). 이후 pGEM-4Z LM을 *EcoR I*과 *EcoR V*로 잘라 Klenow fragment를 이용하여 gap을 매운 후 ligation한 후 이를 대장균 DH5α에 넣어주어 *EcoR I*과 *EcoR V* site가 존재하는 지를 확인하여 screen한 후 DG69를 primer로 하여 sequencing하여 *EcoR I*부터 *EcoR V*간의 DNA가 잘려나간 최종 clone을 얻었다. 최종 clone은 pGEM-4Z LMΔRI-RV라고 명명 <Fig. 6-8>하고 *Listeria monocytogenes* 정량에 사용하였다.

라. *Salmonella invA* 유전자의 일부가 결실된 plasmid의 제조

원래의 *invA* 유전자로부터 base가 결실된 DNA를 인위적으로 만들기 위해 우선 *EcoR V* site를 만들었다. *invA* 유전자의 *EcoR V* site는 overlap extension 방법으로 만들었다. 이를 간단히 설명하면 다음과 같다. DG187과 DG188 primer쌍을 이용하여 *EcoR V*뿐 아니라 나중에 subcloning에 사용할 *EcoR I*가 upstream 쪽에 만들어지게 DNA 조각을 증폭하였다. 또한 DG189와 DG190 primer쌍을 이용하여 *EcoR V*뿐 아니라 subcloning에 사용할 *Hind III* site가 downstream쪽에 만들어지게 DNA 조각을 증폭하였다. 증폭한 DNA를 각각 PCRquick-spin™ PCR product Purification kit로 정제한 후 합하여 DG187과 DG190 primer쌍으로 다시 증폭하였다. 증폭된 DNA조각을 *EcoR I*과 *Hind III* 효소로 잘라 이를 pGEM-4Z plasmid에 cloning하고 sequence를 확인하였다 (pGEM-4Z invRV). 이후 pGEM-4Z invRV를 주형으로 이용하여 overlap extension을 이용하여 *Nru I* site를 만들었다. 즉 DG215

와 DG217 primer 쌍을 이용하여 *Nru* I 뿐 아니라 *Eco* R I site를 upstream에 만들고 DG216과 DG218쌍을 이용하여 *Nru* I 뿐 아니라 *Hind* III site가 downstream에 만들어지게 하였다. 이후 이 2가지 DNA를 이용하여 DG217과 DG218 쌍을 primer로 하여 전체 *hlyA*를 증폭한 후 *Eco*R I과 *Hind* III로 잘라 pGEM-4Z vector에 ligation하여 얻은 콜로니를 PCR를 이용하여 screen한 후 sequencing으로 확인하였다 (pGEM4ZinvRV-Nru). 다시 pGEZ-4ZinvRV-Nru를 *Eco*R V와 *Nru* I으로 유전자의 일부를 잘라낸 후 이를 ligation하여 *hlyA*중 *Eco*R V와 *Nru* I부분이 결실된 plasmid를 얻었고 이를 pGEM-4Zinv Δ RV-Nru라고 <Fig. 6-9>하고 *Salmonella*의 정량에 사용하였다.

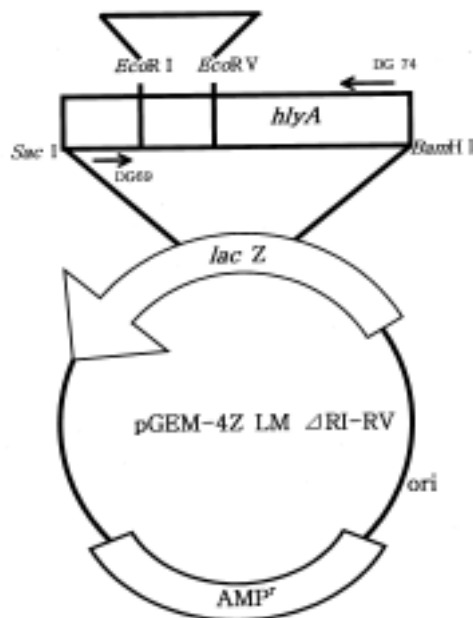


Fig. 6-8. Construction of pGEM-4Z LM Δ RI-RV encoding *L. monocytogenes hlyA* gene. A DNA segment containing *hlyA* gene sequence was amplified by overlap extension for creation of *Eco*RV site and was cloned into pGEM-4Z vector (in which *Eco*RI site has been removed). The resulting plasmid was cleaved with *Eco*RI/*Eco*RV and was gap-filled. The final clone was designated pGEM-4Z LM Δ RI-RV. PCR with primers DG69/DG74 amplifies *L. monocytogenes* specific 488 base sequences.

마. DNA 분리 및 정제

미생물 균체로부터 DNA를 분리하기 위해 guanidiniethiocyanate/phenol/chloroform 방법을 사용하였다. 이를 간략히 기술하면 인위적으로 유해균을 집중시킨 돈육 0.1g에 0.25 ml의 solution D (4M guanidine thiocyanate, 0.025M sodium citrate, 0.5% sarcosyl)와 0.5 ml의 phenol-chloroform (1:1)을 첨가하여 약 1시간 정도 현탁시키고 원심분리하여 수용액 층을 회수한 후 이를 400 μ L의 chloroform으로 1번 더 추출한 후 DNA를 isopropanol로 침전시켰다. 얻어진 pellet을 70% ethanol로 세척한 후 말려서 증류수에 녹여 PCR에 사용하였다.

바. PCR의 조건

각각의 PCR 반응액에는 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 μ M dNTPs, 2.5 units *Taq* DNA polymerase, 10 pmol primer와 DNA template가 함유되도록 하되 총 부피는 50 μ l가 되도록 하였다. 각 시료는 thermocycler (Perkin-Elmer 2400, Foster, CA)에서 증폭 cycle을 시작하기 전에 94°C에서 5분간 DNA를 변성시킨 후 cycle로 진입하게 하였다. 각 cycle은 각 cycle은 94°C 45초, 52°C 45초, 72°C 45초로 하였고 30 cycle후 72°C에서 7분간 extension 시킨 후 반응을 종료하였다.

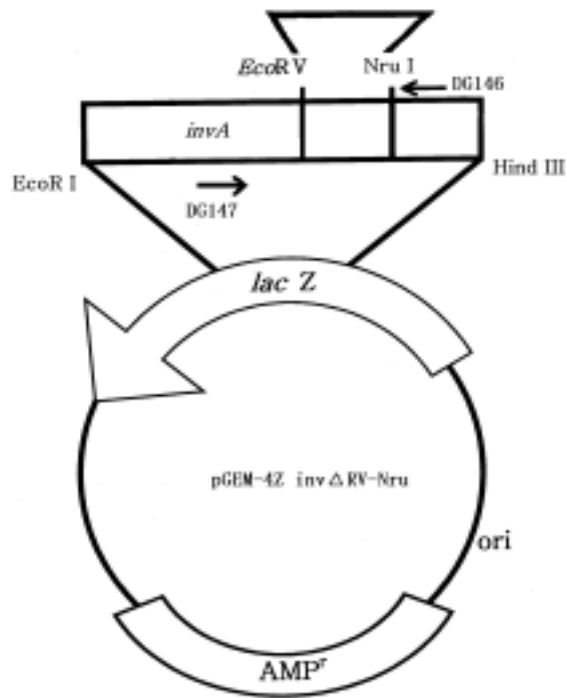


Fig. 6-9. Construction of pGEM-4Z *inv*ΔRV-Nru encoding *Salmonella invA* gene. A DNA segment containing *invA* gene sequence was amplified by overlap extension for creation of *EcoRV* site and *Nru I* site. It was cloned into pGEM-4Z vector. The resulting plasmid was cleaved with *EcoRV/Nru I* and was ligated. The final clone was designated pGEM-4Z *inv*ΔRV-Nru. PCR with primers DG146/DG147 amplifies *Salmonella* specific base sequences.

2. 돈육에서의 *L. monocytogenes* 검출

이미 알려진 listeriolysin O (*hlyA*) 유전자의 염기서열 (GenBank accession number X15127) (Domann, 1989)을 이용하여 10개의 primer를 설계하였다. primer set DG69/DG74는 본 연구진에서 *L. monocytogenes*의 검출에 유용하다고 이미 보고한 바 있는데 (Choi, 2003) *L. monocytogenes*에 특이한 636 bp DNA를 증폭하였다. PCR을 위한 더 나은 primer를 찾기 위해 16 primer set를 사용하여 PCR을 행한

후 band의 강도를 비교하였다. band의 강도는 primer set에 따라 많은 차이를 보였는데 DG69/DG74, DG164/DG168과 DG165/DG171이 다른 primer set에 비해 더 많은 DNA copy를 만들어 진한 band를 관찰할 수 있었다 <Fig. 6-10>. 하지만 검출 한계 등을 비교해 본 결과 이 3가지 primer set간에 큰 차이를 발견할 수 없었고 이미 DG69/DG74 set가 다른 *Listeria*로 부터는 전혀 band를 생성하지 않고 *L. monocytogenes*에 특이한 636 bp band를 생성한다는 잇점이 있으므로 차후의 실험은 DG69/DG74를 사용하여 행하였다.

더 나은 DNA 추출 방법을 찾기 위해 우리는 본 실험실에서 일부 수정한 guanidine thiocyanate-phenol-chloroform 방법과 2가지 시판중인 제품 (G-spin™ Genomic DNA extraction kit와 Wizard Genomic DNA purification system)을 비교하였다. 그러나 3가지 방법 모두 검출한계가 172-430 copy로 제품 간의 차이를 찾지 못했다 <Fig. 6-11>. 그러나 시료의 양과 장차 돈육에 적용할 경우를 고려하여 수정된 guanidine thiocyanate-phenol-chloroform 방법이 가장 나을 것으로 판단되어 차후의 실험은 모두 이 방법을 사용하였다.



Fig. 6-10. Gel electrophoresis profiles obtained with 16 primer sets. For the PCR, the pGEM-4Z LMRI(-) plasmid DNA was used. Lane M, 100-bp DNA ladder; lane 1, DG164/DG167 (636 bp); lane 2, DG164/DG168 (670 bp); lane 3, DG164/DG169 (718 bp); lane 4, DG164/DG170 (748 bp); lane 5, DG164/DG171 (871 bp); lane 6, DG165/DG167 (577 bp); lane 7, DG165/DG168 (611 bp); lane 8, DG165/DG169 (659 bp); lane 9, DG165/DG170 (689 bp); lane 10, DG165/DG171 (812 bp); lane 11, DG166/DG167 (528 bp); lane 12, DG166/DG168 (562 bp); lane 13, DG166/DG169 (610 bp); lane 14, DG166/DG170 (640 bp); lane 15, DG166/DG171 (763 bp); lane 16, DG69/DG74 (636 bp).

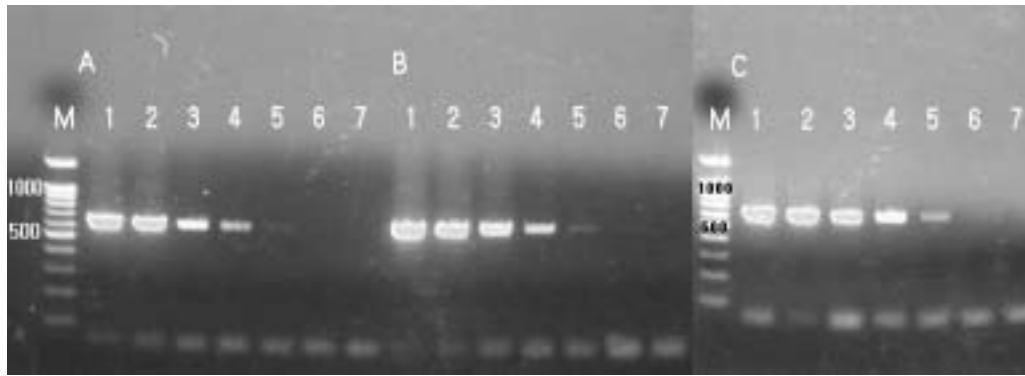


Fig. 6-11. Gel electrophoresis profiles with three *Listeria monocytogenes* template DNA isolation methods. For the PCR, DG69/DG74 primer set was used. The colony-forming units (cfu) were determined by MPN. (A) Modified guanidiniethiocyanate-phenol-chloroform (B) Wizard Genomic DNA purification system (C) G-spinTM Genomic DNA extraction kit (for bacteria). (A) and (B): Lane M, 100-bp DNA ladder; lane 1, 1.72×10^6 cfu *Listeria monocytogenes*; lane 2, 1.72×10^5 cfu; lane 3, 1.71×10^4 cfu; lane 4, 1.72×10^3 cfu; lane 5, 1.72×10^2 cfu; lane 6, 1.72×10 cfu; lane 7, 1.72 cfu (C): Lane M, 100-bp DNA ladder; lane 1, 4.30×10^6 cfu; lane 2, 4.30×10^5 cfu; lane 3, 4.30×10^4 cfu; lane 4, 4.30×10^3 cfu; lane 5, 4.30×10^2 cfu; lane 6, 4.30×10 cfu; lane 7, 4.30 cfu.

검출방법의 민감도 측정을 위해 균질화시킨 돈육 0.1g에 *L. monocytogenes* 8.6×10^6 cfu를 접종하고 이로부터 DNA를 직접 추출한 후 이를 이용하여 PCR을 진행하였다. 검출한계는 돈육 860 cfu/0.1 g이었고 <Fig. 6-12>, 이는 과거에 우유와 돈육에서 관찰된 10^3 cfu와 비슷한 값이었다 (Choi, 2003; Moon, 2003). 3회 반복 실험하였고 재현성이 좋았다. PCR의 cycle수를 50회로 늘리거나 다시 30 cycle을 돌려보아도 sensitivity가 더 나아지지 않았다. BHI 배지로 20배 희석한 후 30°C에서 15시간 배양한 후 동일 실험을 행할 경우 0.1g 돈육으로부터 5 cfu까지도 검출이 가능하였고 <Fig. 6-13> 3번의 시도 중 2번은 1 cfu에 해당하는 양도 검출이 가능하였다. TSBY 배지에서도 같은 결과를 얻을 수 있었다 (data not shown).

요약하면, *hlyA* 유전자를 PCR에 사용함으로써 돈육에 오염된 *L. monocytogenes*를 신속히 (약 5시간 이내) 검출할 수 있었다. 본 연구에서 개발된 방법은 HACCP system의 control point monitoring시 저렴한 비용으로 신속히 현장에서 *L. monocytogenes*를 쉽게 검출할 수 있는 방법임을 제안할 수 있었다.

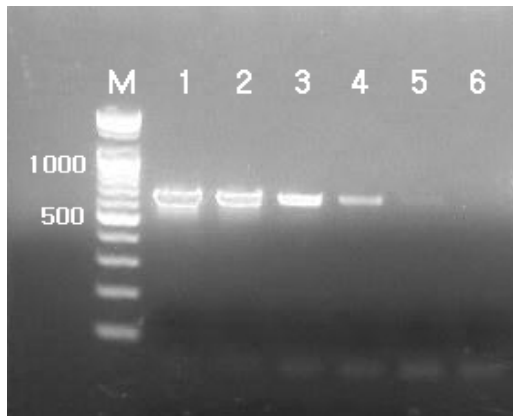


Fig. 6-12. Detection limit of *L. monocytogenes* in pork. 636-bp PCR products were detected from 8.6×10^6 , 8.6×10^5 , 8.6×10^4 , 8.6×10^3 and 8.6×10^2 cfu of *L. monocytogenes* per 0.1 g pork (lane 1-5). No band was detected from 8.6×10 cfu (lane 6) and 8.6 cfu of *L. monocytogenes* per 0.1 g pork.

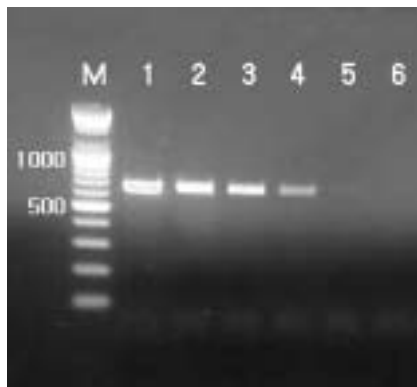


Fig. 6-13. Detection limit after growing in Brain Heart Infusion (BHI). Artificially inoculated pork was diluted 20-fold with BHI and incubated at 30°C for 15 h at 150 rpm. 0.5 ml of cultured broth was taken, and the DNA was extracted and then PCR was performed. The inoculum size was 10^5 (lane 2), 10^4 (lane 3), 10^3 (lane 4), 10^2 (lane 5), 10 (lane 6) cfu *Listeria monocytogenes*. Lane M shows 100-bp DNA ladder as a size standard.

3. 돈육에서의 오염된 *Salmonella* 검출

*Salmonella*의 *invA* 유전자는 *Salmonella*에 특이하다고 이미 보고된 바 있다 (Rahn, 1992). 그러나 과거 본 연구진은 특이하다고 보고된 것들도 실제로 test해 보면 다른 균주들과 비특이적 반응을 보이는 경우가 많아 PCR시 비특이 band를 형성하는 경우를 여러 차례 겪은 바 있다. 따라서 이미 알려진 *S. typhi* CT18의 *invA* 유전자 (GenBank Accession number AL513382) 염기서열을 이용하여 primer DG146/DG147와 DG158/DG159를 설계하였다. 더 나은 DNA 추출 방법을 찾기 위해서 본 실험실에서 일부 수정한 guanidine thiocyanate-phenol-chloroform 방법과 2가지 시판중인 제품 (G-spin™ Genomic DNA extraction kit와 Wizard Genomic DNA purification system)을 primer set DG158/DG159를 이용하여 비교하였다. 그러나 3가지 방법 모두 검출한계가 146-580 copy로 별 차이를 찾지 못했다 <Fig. 6-14, Fig. 6-15>.

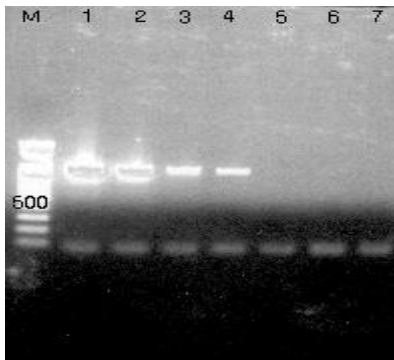


Fig. 6-14. Gel electrophoresis profiles with Wizard Genomic DNA purification system. For the PCR, DG158/DG159 primer set was used. The colony-forming units (cfu) were determined by MPN. Lane M, 100-bp DNA ladder; lane 1, 1.46×10^6 cfu *Salmonella typhimurium*; lane 2, 1.46×10^5 cfu; lane 3, 1.46×10^4 cfu; lane 4, 1.46×10^3 cfu; lane 5, 1.46×10^2 cfu; lane 6, 1.46×10 cfu; lane 7, 1.46 cfu.

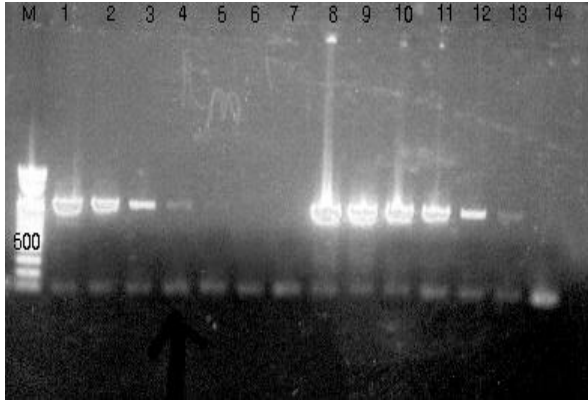


Fig. 6-15. Gel electrophoresis profiles with Modified guanidinethiocyanate-phenol-chloroform and G-spin. Lanes 1-7, guanidinethiocyanate; lanes 8-14, G-spin. For the PCR, DG158/DG159 primer set was used. The colony-forming units (cfu) were determined by MPN. Lane M, 100-bp DNA ladder; lane 1, 5.8×10^5 cfu *Salmonella typhimurium*; lane 2, 5.8×10^4 cfu; lane 3, 5.8×10^3 cfu; lane 4, 5.8×10^2 cfu; lane 5, 5.8×10 cfu; lane 6, 5.8 cfu; lane 7, 0.58 cfu; lane 8, 1.46×10^7 cfu; lane 9, 1.46×10^6 cfu; lane 10, 1.46×10^5 cfu; lane 11, 1.46×10^4 cfu; lane 12, 1.46×10^3 ; lane 13; 1.46×10^2 ; lane 14, 1.46×10

그러나 시료의 양과 장치 돈육에 적용할 경우를 고려하여 수정된 guanidine thiocyanate-phenol-chloroform 방법이 가장 나을 것으로 판단되어 이 방법으로 차후의 실험을 행하였다. 이를 이용하여 대장균 8가지와 *Shigella* 2종, *Yersinia* 1종, *Listeria* 13종과 *Salmonella* 56종을 대상으로 하여 DG146과 147이 생성하는 band의 특이성을 조사하였다. 대장균과 *Shigella*, *Yersinia*의 DNA는 *E. coli* 16S rRNA 유전자에 해당하는 DG131과 DG132를 이용하여 증폭하는 경우 특이 band를 형성하였고 <Fig. 6-16> *Salmonella* 도 같은 크기의 band를 형성하였다 (data not shown).

*Listeria*의 경우도 16S rRNA에 해당하는 DG75와 DG76을 이용하여 증폭 시 421-bp 특이band를 형성하였다 <Fig. 6-17>. 그러나 같은 DNA를 *Salmonella invA*에 해당하는 DG146과 DG147을 이용하여 증폭 시 *Salmonella*만이 모두 예상한 크기의 284 bp band를 생성함 반면 <Fig. 6-18, Fig. 6-19, Fig. 6-20, Fig. 6-21, Fig. 6-22> 나머지 균들 즉 대장균, *Shigella*, *Yersinia*, *Listeria* 등은 284 bp의 특이 band를 전혀 생성하지 않았다. 다만 대장균 중 O119만이 약 450 base의 비특이적 band를 형성하였고 이는 여러 차례의 실험에서도 반복된 결과를 보였다. 이로 미루

어 볼 때 O119의 염기서열 중 DG146과 DG147에 일부 homology를 보이는 부분이 존재하는 것으로 예상되나 증폭되는 band의 크기가 다르므로 쉽게 구별이 가능하다고 사료된다. 따라서 차후의 실험은 DG146과 DG147을 이용하여 행하였다.

검출방법의 민감도를 측정하기 위해 균질화시킨 돈육 0.1g에 $7.0-7.0 \times 10^6$ cfu의 *S. typhimurium*을 인위적으로 접종한 후 이로부터 DNA를 직접 추출한 후 이를 이용하여 PCR을 행하였다. 검출한계는 돼지고기 0.1 g당 700 cfu였으며 <Fig. 6-23>, 이는 과거에 우유와 돈육에서 관찰된 유해 미생물들의 검출한계인 10^3 cfu와 비슷한 값 이었다 (Choi, 2003; Moon, 2003). 실험을 3번을 반복하였고 재현성이 좋았다. PCR의 cycle수를 50회로 늘리거나 다시 30 cycle을 돌려보아도 sensitivity가 더 나아지지 않았다. LB배지로 20배 희석한 후 30 °C에서 15시간 배양한 후 동일 실험을 행할 경우 돈육 0.1g에서 3번의 시도 중 2번은 1 cfu 양까지도 검출이 가능하였다 (data not shown).

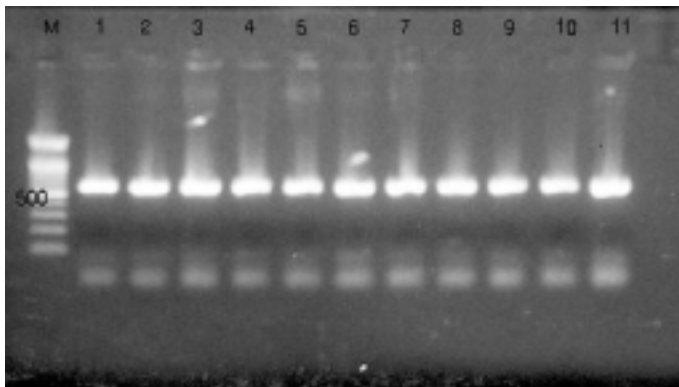


Fig. 6-16. Gel electrophoresis of amplified DNA products of 16S rRNA. For the PCR DG131 and DG 132 primer set was used. Lane M, 100 bp DNA ladder; lane 1, *E. coli* O26; lane 2, *E. coli* O55; lane 3, *E. coli* O111; lane 4, *E. coli* O114; lane 5, *E. coli* O119; lane 6, *E. coli* O157:H7 43894; lane 7, *E. coli* O157:H7 43888; lane 8, *E. coli* k12; lane 9, *Shigella flexeri* 9199; lane 10, *Shigella sonnei* 9290; lane 11, *Yersinia enterocolitica* 27729.

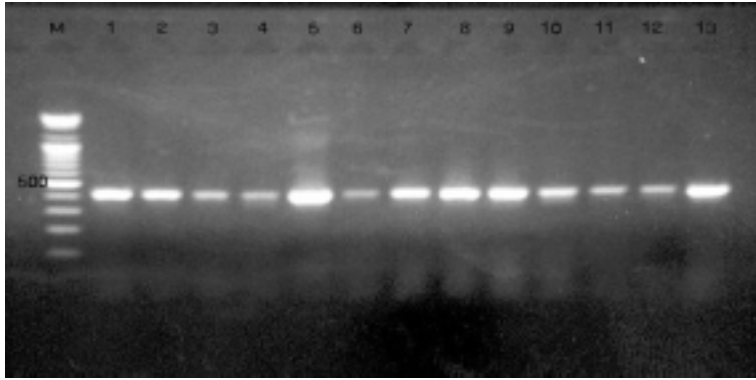


Fig. 6-17. Gel electrophoresis of amplified DNA products of 16S rRNA (*Listeria* spp.). For the PCR DG75 and DG 76 primer set was used. Lane M, 100 bp DNA ladder. The numbers on each lane are the strain numbers given in Table 6-1.

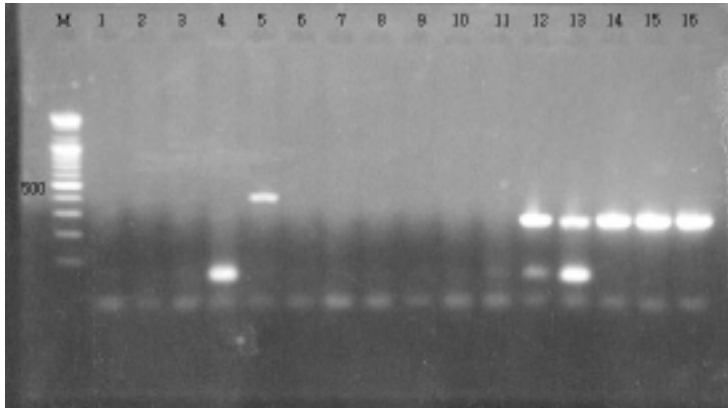


Fig. 6-18. Gel electrophoresis of amplified *invA* gene product. For the PCR, DG146/DG147 primer set was used. Lane M, 100-bp DNA ladder as a size marker. Lane 1, *E. coli* O26; lane 2, *E. coli* O55; lane 3, *E. coli* O111; lane 4, *E. coli* O114; lane 5, *E. coli* O119; lane 6, *E. coli* O157:H7 43894; lane 7, *E. coli* O157:H7 43888; lane 8, *E. coli* K12; lane 9, *Shigella flexeri* 9199; lane 10, *Shigella sonnei* 9290; lane 11, *Yersinia enterocolitica* 27729; lane 12, *Salmonella typhi* 14930; lane 13, *Salmonella paratyphi* 11511; lane 14, *Salmonella enteritidis* 4931; lane 15, *Salmonella schottmulleri* 10719; lane 16, *Salmonella choleraesuis* 13312.

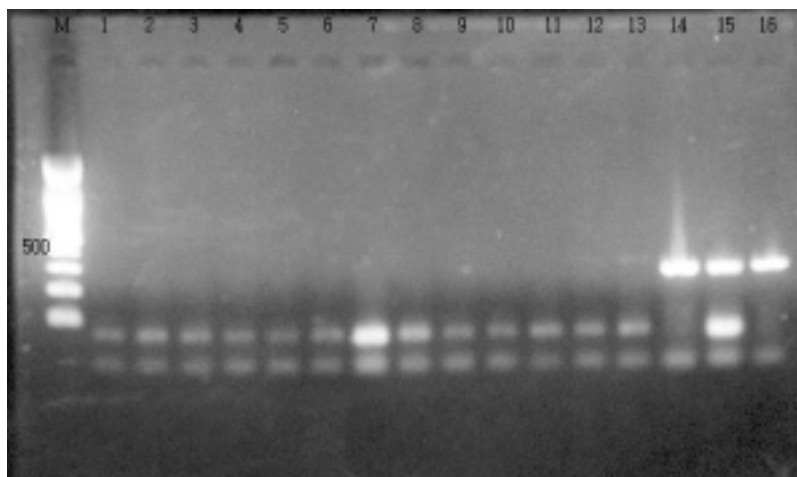


Fig. 6-19. Gel electrophoresis of amplified *invA* gene product. For the PCR, DG146/DG147 primer set was used. Lane M, 100-bp DNA ladder as a size marker. Lane 1, *Listeria monocytogenes* 19113; lane 2, *Listeria monocytogenes* 19114; lane 3, *Listeria monocytogenes* 19115; lane 4, *Listeria monocytogenes* 19117; lane 5, *Listeria monocytogenes* 19118; lane 6, *Listeria monocytogenes* HPB410; lane 7, *Listeria monocytogenes* 35152; lane 8, *Listeria ivanovii*; lane 9, *Listeria innocua* 33090; lane 10, *Listeria welshimeri* 35897; lane 11, *Listeria seeligeri* 35967; lane 12, *Listeria grayi* 19120; lane 13, *Listeria murrayi* 25401; lane 14, *Salmonella typhimurium* 14028; lane 15, *Salmonella gallinarum* 9184; lane 16, *Salmonella london* 8389.

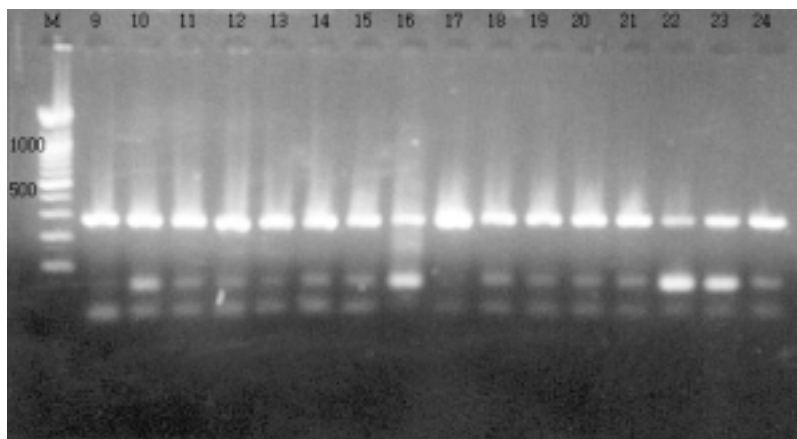


Fig. 6-20. Gel electrophoresis of amplified *invA* gene product. For the PCR, DG146/DG147 primer set was used. Lane M, 100-bp DNA ladder as a size marker. The numbers on each lane are the strain numbers of *Salmonella* given in Table 6-5.

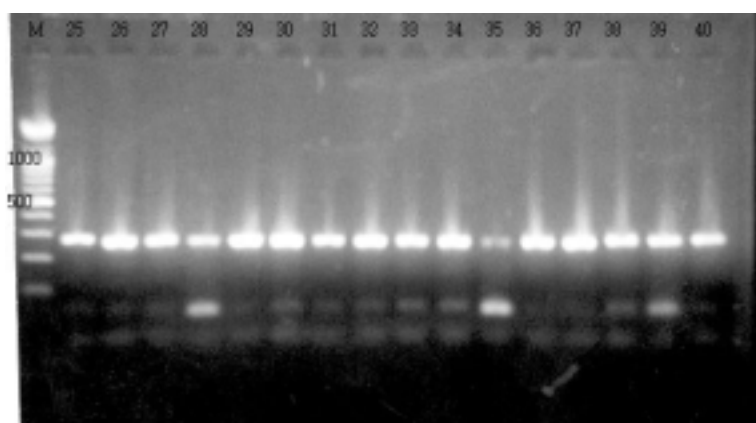


Fig. 6-21. Gel electrophoresis of amplified *invA* gene product. For the PCR, DG146/DG147 primer set was used. Lane M, 100-bp DNA ladder as a size marker. The numbers on each lane are the strain numbers of *Salmonella* given in Table 6-5.

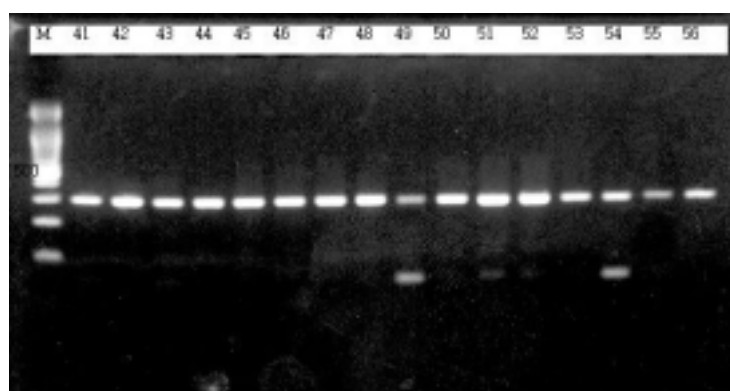


Fig. 6-22. Gel electrophoresis of amplified *invA* gene product. For the PCR, DG146/DG147 primer set was used. Lane M, 100-bp DNA ladder as a size marker. The numbers on each lane are the strain numbers of *Salmonella* given in Table 6-5.

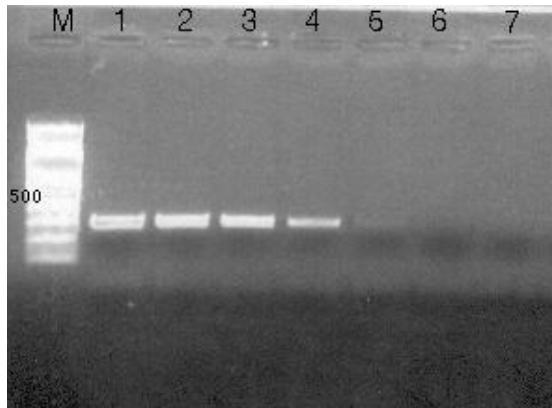


Fig. 6-23. Detection limit of *Salmonella typhimurium* in pork. 284-bp PCR products were detected from 7.0×10^6 , 7.0×10^5 , 7.0×10^4 , 7.0×10^3 and 7.0×10^2 cfu of per 0.1 g pork (lane 1-5). No band was detected from 7.0×10^1 cfu (lane 6) and 7.0 cfu of per 0.1 g pork.

4. Competitive PCR을 이용한 돈육에서 *L. monocytogenes* 정량

본 연구진에서 과거에 DG69/DG74를 이용하여 PCR 증폭시 방사성 동위원소로 표지한 *hlyA* 특이부위가 30 cycle후에도 여전히 exponential tange에 있음을 보인 바 있다 (Choi, 2003). 그러므로 cPCR을 위해서도 동일한 조건을 사용하였다. *L. monocytogenes*의 정량을 위해 인위적으로 접종한 돈육으로부터 DNA를 추출하여 숫자를 알고 있는 경쟁 plasmid DNA인 pGEM-4Z LMARI-RV와 함께 증폭시켰다. 경쟁 plasmid DNA인 pGEM-4Z LMARI-RV는 같은 primer set인 DG69/DG74와 결합할 뿐 아니라 148 bp를 미리 결실시켜 놓아 *L. monocytogenes*의 원래 DNA와 구별이 가능하다. 이 두 가지 다른 DNA의 증폭 효율은 동일 primer가 동일 염기서열에 결합되어 증폭되므로 같다. 단지 차이는 결실된 148 bp뿐이다. 증폭결과 생긴 cPCR 산물의 양은 두 가지 다른 DNA의 초기의 상대적인 양을 반영하므로 *L. monocytogenes*의 cfu는 전기영동 후 두 band의 강도를 비교하여 쉽게 추정 가능 하다. 실제로 이 방법을 사용한 결과 표준 DNA의 계산된 DNA copy수와 MPN방법으로 구한 cfu가 거의 같게 나타났다 <Fig. 6-24>.

최근 real-time PCR을 이용하여 *L. monocytogenes*를 정량하는 것이 가능하다고 보고 되었지만 (Nogva, 2000) real-time PCR은 비싼 고가의 장비와 시약이 필요한

단점이 있다. 본 연구에서 개발된 방법은 돈육에 오염된 *L. monocytogenes*의 정확한 정량적인 수치를 직접적으로 계산하는 방법이 아니라, 정량적인 차이에 따른 band의 강도를 구분하여 판정하는 방법이다. 따라서 real-time PCR이 없는 대부분의 일반실험실에서 가능하며, 특히 오염량이 일정수준(기준)을 초과했는지 여부를 현장에서 신속하게 monitoring하는데 유용하게 활용될 수 있다고 판단된다.

그러나 이번에 개발된 방법은 기본적으로 PCR에 기초를 둔 것으로 살아있는 균과 죽은 균을 구별하지 않으므로 현장적용 시 실제보다 다소 많은 값으로 나올 수도 있다. 최근 식품중의 살아있는 *L. monocytogenes*를 RT-PCR을 이용하여 검출가능하다는 연구내용을 참고한다면 (Klein, 1997), 앞으로 RT-cPCR을 이용한 돈육의 *L. monocytogenes* 오염 정량이 가능할 것으로 사료된다.

요약하면, *hlyA* 유전자를 cloning하고 수정하여 이를 cPCR에 사용함으로써 돈육에 오염된 *L. monocytogenes*를 신속히 정량할 수 있었다. 본 연구에서 개발된 방법은 HACCP system의 control point에 대한 정량적인 monitoring과 같이 현장에서의 신속한 검사가 요구되는 경우에 활용성이 있다고 판단되었다.

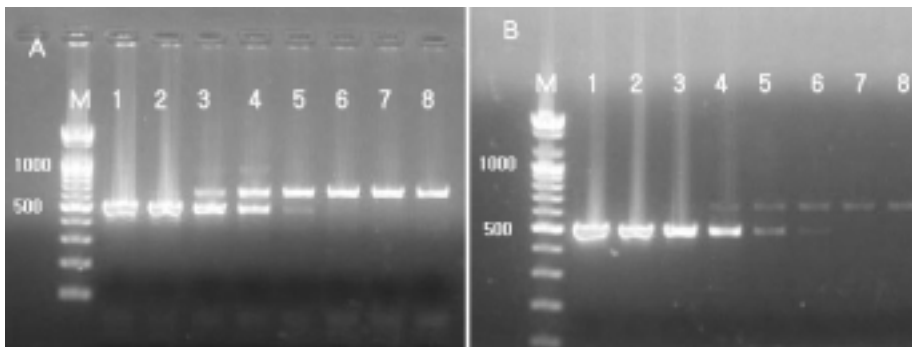


Fig. 6-24. Agarose gel electrophoresis after cPCR. The upper band (636 bp) is derived from artificially inoculated *L. monocytogenes* (ATCC 19113) DNA and the lower band (488 bp) is from pGEM-4Z LM Δ RI-RV standard DNA. (A) 4.0×10^4 cfu *L. monocytogenes* (B) 4.0×10^3 cfu *L. monocytogenes*. Lane M, 100-bp DNA ladder as a size marker; lane 1, 4.0×10^7 copies of standard DNA (pGEM-4Z LM Δ RI-RV); lane 2, 4.0×10^6 copies of standard DNA; lane 3, 4.0×10^5 copies of standard DNA; lane 4, 4.0×10^4 copies of standard DNA; lane 5, 4.0×10^3 copies of standard DNA; lane 6, 4.0×10^2 copies of standard DNA; lane 7, 4.0×10^1 copies of standard DNA; lane 8, 4.0 copies of standard DNA.

5. Competitive PCR을 이용한 돈육의 *Salmonella* 정량

*L. monocytogenes*의 정량을 위해 PCR 증폭시 방사성 동위원소로 표지한 *hlyA* 특이부위가 30 cycle후에도 여전히 exponential range에 있음을 보인 바 있다 (Choi, 2003). 그러므로 *Salmonella*의 정량을 위한 cPCR을 위해서도 동일한 조건을 사용하였다. *Salmonella*의 정량을 위해 인위적으로 접종한 돈육으로부터 DNA를 추출하여 숫자를 알고 있는 경쟁 plasmid DNA인 pGEM-4Z Δ RV-Nru와 함께 증폭시켰다. 경쟁 plasmid DNA인 pGEM-4Z Δ RV-Nru는 같은 primer set인 DG146/DG147와 결합할 뿐 아니라 82 bp를 미리 결실시켜 놓아 *Salmonella*의 원래 DNA와 구별이 가능하다. 이 두 가지 다른 DNA의 증폭 효율은 동일 primer가 동일 염기서열에 결합하여 증폭되므로 같다. 단지 차이는 결실된 bp뿐이다. 증폭결과 생긴 cPCR 산물의 양은 두 가지 다른 DNA의 초기의 상대적인 양을 반영하므로 *Salmonella*의 cfu는 전기영동 후 두 band의 강도를 비교하여 쉽게 추정이 가능하다. 실제로 이 방법을 사용한 결과 표준 DNA의 계산된 DNA copy수와 MPN방법으로 구한 cfu가 거의 같게 나타났다 <Fig. 6-25>.

아직까지 식품에 오염된 전체 *Salmonella*를 PCR로 정량한다는 논문은 보고된 바 없다. 일반적으로 위생기준에서는 *Salmonella*는 검출여부만을 판단하므로 현장에서의 활용을 위한 신속한 정량적인 검출과 관련된 연구는 제한적이었다. 본 연구에서 개발된 방법은 돈육에 오염된 *Salmonella*의 정확한 숫자를 알려주지는 못하지만 *Listeria*의 경우와 마찬가지로 사용 목적에 따라 일정량에 대한 신속검출에는 활용성이 높다고 판단된다. 또한 이 결과는 장차 real-time PCR을 이용하여 정량하고자 하는 group에도 사용 가능한 primer가 되겠다.

이번에 개발된 방법은 기본적으로 PCR에 기초를 둔 것으로 *Listeria*의 경우처럼 살아있는 균과 죽은 균을 구별하지 않으므로 실제보다 다소 많은 값으로 나올 수도 있다. *L. monocytogenes*의 경우와 마찬가지로 RT-PCR을 행하면 살아있는 *Salmonella*만을 정량하는 것이 가능하므로, 앞으로 RT-cPCR을 이용한다면 돈육에 오염된 *Salmonella* 생균의 직접적인 정량이 가능할 것으로 사료된다.

요약하면, *invA* 유전자를 cloning하여 수정하여 이를 cPCR에 사용함으로써 돈육에 오염된 *Salmonella*를 신속히 정량할 수 있었다. 본 연구에서 개발된 방법은 현장에서 control point 관리시 신속한 monitoring이 가능하므로 효과적으로 이용될 수 있을 것이다.

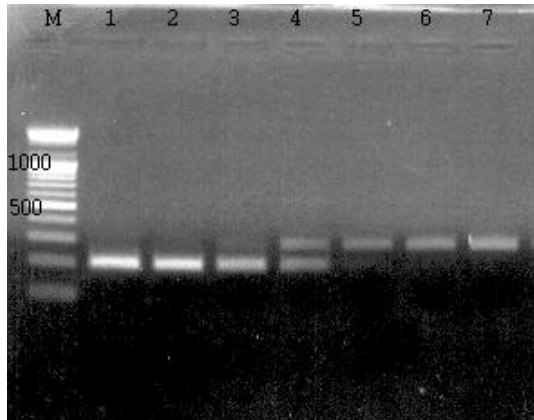


Fig. 6-25. Agarose gel electrophoresis after cPCR. The upper band (284 bp) is derived from artificially inoculated *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 DNA and the lower band (202 bp) is from pGEM-4Z Δ RV-Nru standard DNA. 7.0×10^4 cfu *S. typhimurium* was inoculated. Lane M, 100-bp DNA ladder as a size marker; lane 1, 7.0×10^7 copies of standard DNA (pGEM-4Z Δ RV-Nru); lane 2, 7.0×10^6 copies of standard DNA; lane 3, 7.0×10^5 copies of standard DNA; lane 4, 7.0×10^4 copies of standard DNA; lane 5, 7.0×10^3 copies of standard DNA; lane 6, 7.0×10^2 copies of standard DNA; lane 7, 7.0×10 copies of standard DNA.

제7장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

● 1차년도

○ 연구목표

작업장의 exposure assessment와 오염발생요인 분석

○ 평가 착안사항

- Exposure assessment를 위한 자료 분석은 합리적인가
- 대상 작업장 선정 및 작업조건에서의 CF, TR 및 오염도 분석실험이 적절히 수행 되었는가
- Fingerprinting 기술 보완을 위한 실험과정이 적절히 수행 되었는가

○ 연구목표의 달성도

- 오염원 추적을 위한 실험대상 작업장 4곳 선정 및 현장분석, pilot-test 2차례 실시
- HACCP 지정업체, 비지정업체를 대상으로 작업환경 및 작업공정 분석
- 돈육과 *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*에 관한 자료수집 - 오염수준, fingerprinting을 이용한 오염원 추적, Exposure assessment 및 predictive microbial model 개발을 위한 관련자료
- Exposure assessment를 위한 Frame-work model 작성
- 작업장 온도와 작업시간을 주요 Controlling Factor로 선정
- *Listeria* spp., *Salmonella* spp.를 대상으로 현장에서 적용 가능한 typing 방법 개발을 위하여 fingerprinting 기법 보완을 위한 계획된 내용 수행 완료
- 기술보완을 위해서 ERIC fingerprinting, ribotyping-PCR, RAPD, SSCP, PFGE 등 검토

○ 기술발전예의 기여도

- 노출평가 방법론 연구 ; 국내에서는 아직 미개척 분야인 (1) 확률적 접근방법

을 이용한 축산식품에서의 위해미생물 오염수준 산출방법과, (2) 식품산업체에서 위해미생물 수의 불규칙 분포 해석을 위한 확률분포 모델적용에 대한 기본 원리와 방법론 개발에 기여함.

- 작업장을 오염시킨 *Listeria*와 *Salmonella*의 typing이 가능한 신속한 기술을 개발하여, HACCP 등 위생관리의 monitoring과 최종제품검사의 효율성을 높일 수 있음.

● 2차년도

○ 연구목표

오염발생 예측모델 개발 및 역학적인 오염원 조사

○ 평가 착안사항

- 오염전이율 예측 model 개발방법이 합리적인가
- 분리된 *Salmonella*, *Listeria*의 오염특성 분석 및 오염원의 역학적 관련성 분석이 합리적인가
- Exposure model 개발이 합리적으로 이루어졌는가
- *L. monocytogenes* 신속검출 및 정량화 기술 개발이 적절히 수행 되었는가

○ 연구목표의 달성도

- 분석을 위한 시료 782건에 대한 *Salmonella spp.*와 *L. monocytogenes*에 분리 동정 완료
- RAPD에 의한 fingerprinting 일부 완료(3차년도 계속)
- 작업장별 각각 4회 시료채취에 대해 매회별 composite type을 분류하며 정리한 결과 오염원 추정이 가능하게 됨.
- *Salmonella*, *L. monocytogenes* 균의 돈육, 식품접촉면과의 부착을 실험과 접촉 후 잔류 및 생존 가능성에 대한 전이율(TR) 실험 수행
- 이 실험결과를 바탕으로 regression procedure를 이용하여 각 단계에서의 TR

예측모델 개발

- 공정내 작업변수(시간 및 온도) 조건에 따른 *Salmonella*, *Listeria*의 생존 및 소멸실험과 실험결과를 이용한 성장예측모델 개발.
- *L. monocytogenes*를 신속히 검출하고 정량화하는 기술을 개발하였음.

○ 기술발전예의 기여도

- Fingerprinting 방법의 현장적용은 작업장 오염의 흐름 파악에 매우 유용하며, 그 결과는 HACCP 적용시 위해분석의 과학적 근거를 제공하며, 특히 선정된 critical control point 위치의 적합성 여부를 판단하는데 기여한다. 이러한 목적의 적용은 국내에서는 처음 시도하는 것으로 사료된다.
- 오염전이율 및 성장예측 model은 국내에서 최초로 실시되는 것으로, 축산식품에서 위해미생물에 대한 오염전이율 및 성장예측 분석방법을 확립하였고, 이를 바탕으로 한 모델개발 기술력 축적에 기여하였다.
- 1차년도의 Frame-work model 및 확률분포 모델과 2차년도의 오염전이율 및 성장예측모델을 토대로 하여 돈육포장공정에서의 *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* 오염을 추정할 수 있는 exposure simulation model 초안을 작성하였다. 이러한 연구는 microbial risk assessment에 필수적인 @RISK 프로그램을 이용한 simulation 응용능력에 크게 이바지하였다.
- *L. monocytogenes*의 오염정도를 competitive-PCR을 이용하여 신속히 검출하고 정량하는 것이 가능해졌으므로 종합적인 관리방안 등의 대책수립과 국민보건증진에 기여할 수 있다.

● 3차년도

○ 연구목표

오염발생 예측 시스템 및 Microbial Hazard Exposure Model 개발

○ 평가 착안사항

- 오염발생 예측용 핵심기술 개발이 논리적으로 이루어 졌는가
- HACCP system의 취약점으로 지적한 부분을 적절히 보완 하였는가
- 타 과제와의 협력관계 및 Microbial Hazards Exposure Model 개발과정이 합리적으로 진행 되었는가
- *Salmonella* 신속검출 및 정량화 기술개발이 적절히 수행 되었는가

○ 연구목표의 달성도

- 작업전·중, HACCP 지정 비지정업체간의 오염상태 변화 분석실험 수행
- Fingerprinting 실험 계속 (2차년도에서)
- 2차년도에서 개발된 포장돈육 공정에서의 *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* 오염을 추정할 수 있는 exposure simulation model 초안으로부터 최종적으로 오염발생 예측용 핵심기술로서 Microbial Hazards Exposure Model (MS Excel-added 프로그램화)을 개발
- 개발된 모델에 대한 현실적 활용가능성에 대한 검증 수행; 초기 오염수준, 작업장 온도, 작업시간의 실험자료(주관과제)를 입력하여 비교 평가한 결과 최종 포장돈육에서의 *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*의 오염수준 예측 값에 대한 신뢰성과 가능성을 확인함.
- *Salmonella*를 신속히 검출하고 정량화하는 기술을 개발하였다.

○ 기술발전의 기여도

- Fingerprinting 기법을 HACCP 작업장에 적용하면 보다 정확한 CCP 선정에 도움이 되므로, HACCP 지정 작업장에 대한 사후평가 및 HACCP 도입예정 작업장에 대한 적용의 필요성을 알리고 있다.
- 본 연구는 국제적으로도 초보단계인 축산식품 위해평가의 국내모델 개발기술 축적에 크게 기여하였으며, 이러한 모델 개발 연구는 MRA에 대한 이해를 넓혀 실제 산업체에서 위생관리를 위한 MRA 활용 가능성을 제시하고 있다.
- *Salmonella*의 오염정도를 competitive-PCR을 이용하여 신속히 검출하고 정량하는 것이 가능해졌으므로 종합적인 관리방안 등의 대책수립과 국민보건증진에 기여할 수 있다.

제8장 연구개발결과의 활용계획

1. 추가연구의 필요성

- 식품생산 공정의 특성과 발생 frequency, severity를 고려한 지표미생물 선정
- 오염전이율 및 성장예측모델 개발에 있어 온도와 시간을 제외한 다른 환경요인 (pH, Aw, 초기균수, 소독제농도, 공기에서의 전이 등)에 대한 영향평가 실험
- 작업장 오염원 추적을 위한 중요 식중독세균에 대한 primer 선정 실험
- 재현성을 보완하기 위한 fingerprinting 기술 개발
- Real-time PCR을 이용한 *L. monocytogenes* 및 *Salmonella*의 정량화 실험
- RT-PCR을 이용한 *L. monocytogenes* 및 *Salmonella*의 생균수의 정량

2. 타 연구에의 응용

- HACCP 프로그램 개발시 작업장 위해분석, CCP 설정과 유효성 검증에 오염원 추적방법 적용
- HACCP 사후관리시 운영실태의 정확한 파악을 위한 실험적 방법에 활용
 - CCP 전후의 오염상태 분석으로 관리상태 파악
 - 오염원 유입 차단 여부 확인
 - 세척 및 소독 효과의 실질적인 확인
- 축산식품 위해미생물에 대한 오염수준을 예측을 위한 모델 개발에 활용
- 축산식품 위해미생물에 대한 위험 평가시 국내에서 활용 가능한 microbial risk assessment 기법 제공
- HACCP system의 위해요소 분석 및 CCP 결정에 대한 microbial risk assessment 기법 활용
- Sensitivity 분석과 scenario 분석기법은 식품생산 공정에 대한 위생관리기준 설정에 활용

3. 기업화 추진방안

- Fingerprinting 및 오염원 추적기술 ; HACCP 컨설팅, 현장 위해분석 및 진단에 활용
- 위해미생물 검출 및 정량화기술 ; 식품센상 공정에 존재하는 위해미생물 검출 및 정량 kit개발
- MHEM 모델의 핵심기술을 프로그래밍 언어(C 언어 등)를 이용한 산업용 소프트웨어 개발 및 축산식품산업체에서 활용

제9장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 도축공정에 존재하는 *E. coli*를 fingerprinting 하여 Critical Control Point 타당성 검증
- 오염원 추적과 fingerprinting의 업체 적용 예 ; vegetable processing plant, 식육(햄·소시지)가공장, 연어가공장, Ready-to-eat food, 도축장, 유가공장
- 식품생산 공정에서의 Cross-contamination 발생과 평가모델
- 개발된 성장예측모델에 대한 검증 프로그램
- 식품에서의 위해미생물 오염수준 예측에 활용 가능한 확률분포모델
- Risk Analysis의 식품안전정책에의 활용
- Real-time PCR을 이용한 과일, 채소, 유가공품 등으로부터의 *Salmonella* 검출
- Fingerprinting을 이용한 송어, 치즈제품 등에서 분리된 *L. monocytogenes*의 typing

제10장 참고문헌

- Aguado V, Vitas AI, García-Jalón I. Characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from a vegetable processing plant by RAPD and REA. *Int J Food Microbiol.* 2004, 90, 341-347.
- Alford JA, Palumbo SA. Interaction of salt, pH, and temperature on the growth and survival of salmonellae in ground pork. *Appl Microbiol.* 1969, Apr;17(4), 528-32.
- Berends BR, Knapen FV, Mossel DAA, Burt SA, Snijders JMA. Salmonella spp. on pork at cutting plant and at the retail level and the influence of particular risk factors. *Int J Food Microbiol.* 1998, 44, 207-217.
- Bingen E, Boissinot C, Desjardins P, Cave H, Brahimi N, Lambert-Zechovsky N, Denamur E., Blot P. and Elion J. Arbitrarily prime polymerase chain reaction provides rapid differentiation of *Proteus mirabilis* isolates from a pediatric hospital. *Journal of Clinical Microbiology.* 1993, 31, 1055-1059.
- Boerlin P, Bannerman E, Ischer F, Rocourt J, Bille J. Typing *Listeria monocytogenes*: a comparison of random amplification of polymorphic DNA with 5 other methods. *Res Microbiol.* 1995, 146, 35-49.
- Buchanan RL, Demart WG, Whiting RC, van Schothorst M. Use of epidemiological and food survey data to eliminate a purposefully conservative dose-response relationship for *Listeria monocytogenes* levels and incidence of listeriosis. *J. Food Prot.* 1997, 60, 918-922.
- Buchanan RL, Klawitter LA. Effect of temperature history on the growth of *Listeria monocytogenes* Scott A at refrigeration temperatures. *Int. J. Food Microbiol.* 1991, 12, 235-246.
- Buchanan RL, Phillips JG. Response Surface Model for Predicting the Effects of Temperature, pH, Sodium Chloride content, Sodium Nitrite Concentration, and Atmosphere on the Growth of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Protection.* 1990, 53, 370-376.

- Buchanan RL. Predictive Food Microbiology. Trends Food Sci. & Technol. 1993, 4, 6-11.
- Buchanan RL. Predictive Microbiology: Mathematical Modeling of Microbial Growth in Foods. Am. Chem. Soc. 1992, 484, 250-260.
- Buzrul S, Alpas H. Modeling the synergistic effect of high pressure and heat on inactivation kinetics of *Listeria innocua*: a preliminary study. FEMS Microbiol Lett. 2004, 238, 29-36.
- Byun, SK., Jung, SC. and Yoo, HS. Random amplification of polymorphic DNA typing of *Listeria monocytogenes* isolated from meat. International J. Food Microbiol. 2001, 69, 227-235.
- Chansiripornchai, N., Ramasoota, P., Bangtrakulnonth, A., Sasipreeyajan, J., Svenson, S.B.: Application of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for typing avian *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. FEMS Immunology and Medical Microbiol. 2000, 29, 221-225.
- Chasseignaux E, Gerault P, Toquin MT, Salvat G, Colin P, Ermel G. Ecology of *Listeria monocytogenes* in the environment of raw poultry meat and raw pork meat processing plants. FEMS Microbiol Lett. 2002, 210, 271-275.
- Chavant P, Martinie B, Meylheuc T, Bellon-Fontaine M. N, Hebraud M. *Listeria monocytogenes* LO28: surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. Appl Environ Microbiol. 2002, 68, 728-737.
- Choi, WS., Hong, CH. Rapid enumeration of *Listeria monocytogenes* in milk using competitive PCR. International J. Food Microbiol. 2003, 84, 79-85.
- Curiale MS, Catherine L. Detection of *Listeria monocytogenes* in Samples Containing *Listeria innocua*. J Food Pro.. 1994, 57, 1048-1051.
- Dauphin G, Ragimbeau C, Malle P. Use of PFGE typing for tracing contamination with *Listeria monocytogenes* in three cold-smoked salmon processing plants. *Food Microbiology*. 2001, 64, 51-61.
- David JV. The application of Quantitative Risk Assessment to microbial food safety. Jol Food Prot. 1998, 61(5), 640-648.
- Destro, M, Leitao, MFF, Farber, JM. Use of molecular typing methods to trace

- the dissemination of *Listeria monocytogenes* in a shrimp processing plant. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996, 62(2), 705-711.
- Dickson, JS. Transfer of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* Between Beef Tissue Surfaces, *Journal of Food Protection*. 1990, 53(1), 51~55.
- Domann E, Chakraborty T. Nucleotide sequence of the listeriolysin gene from a *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a strain. *Nucleic Acids Res.* 1989, 17, 6406.
- Donnelly CW, Brackett RE, Doores S, Lee WH, Lovett J. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3rd ed, pp. American Public Health Association. 1992, 637-663.
- Duffy EA, Belk KE, Sofos JN, Bellinger GR, Pape A, Smith GC. Extent of microbial contamination in United States pork retail products. *J Food Prot.* 2001, 64(2), 172-178.
- El-Shenawy MA, Marth MA. Inhibition and inactivation of *Listeria monocytogenes* by sorbic acid. *J. Food Protect.* 1988, 51, 842-847.
- Elzen AMG, Snijders JMA. Critical points in meat production lines regarding the introduction of *Listeria monocytogenes*. *Veterinary Quarterly.* 1993, 15(4): 143-145.
- FAO/WHO. Application of risk analysis to food standards issues. Report of the Joint FAO/WHO Expert Consultation. 1995, March 13-17. Geneva. Switzerland.
- Farber JM, Addison CJ. RAPD typing for distinguishing species and strains in the genus *Listeria*. *J Appl Bacteriol.* 1994, 77, 242-250.
- Farber JM, Peterkin PI. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev.* 1991, 55, 476-511.
- Fenlon DR, Wilson J, Donachie W. The incidence and level of *Listeria monocytogenes* contamination of food sources at primary production and initial processing. *J Appl Bacteriol.* 1996, 81, 641-650.
- García E, Rodríguez JL, Gaya D, Medina M, Nunez M. Exogenous sources of *Listeria* contamination in raw ewe's milk. *J Food Prot.* 1996, 59, 950-954.
- Gaya P, Sanchez J, Medina M, Nunez M. Incidence of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in raw milk produced in Spain. *Food Microbiology.*

- 1998, 15, 551-555.
- Gibson AM., Bratchell N, Roberts TA. Predicting microbial growth: Growth responses of Salmonellae in a laboratory medium as affected by pH, sodium chloride, and storage temperature. *J. Food Microbiol.* 1988, 6, 155-178.
- Giovanacci I, Ragimbeau C, Queguiner S, Salvat G, Vendeuvre JL, Carlier V, Ermel G. *Listeria monocytogenes* in pork slaughtering and cutting plants :use of RAPD, PFGE and PCR-REA for tracing and molecular epidemiology. *International J. Food Micriobiol.* 1999, 53, 127-140.
- Gomez-Lus P, Fields BS, Benson RF, Martin WT, O'Connor SP, Black CM. Comparison of arbitrarily primed polymerase chain reaction, ribotyping, and monoclonal antibody analysis for subtyping *Legionella pneumophila* serogroup 1. *J. Clin. Microbiol.* 1993, 31, 1940-1942.
- Goulet V, de Valk H, Pierre O, Stainer F, Rocourt J, Vaillant V, Jacquet C, Desenclos J. C. Effect of prevention measures on incidence of human listeriosis, France, 1987-1997. *Emerg Infect Dis.* 2001, 7, 983-989.
- Grau FH, Vanderlinde PB. Growth of *Listeria monocytogenes* on vacuum packaged beef. *Meat Sci. Technol.* 1988, 34, 518-519.
- Gravani R. Incidence and control of *Listeria* in food-processing facilities. *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*, 2nd ed, pp. Marcel Dekker. 1999, 657-709.
- Greenwood MH, Roberts D, Burden P. The occurrence of *Listeria* species in milk and dairy products: a national survey in England and Wales. *Int J Food Microbiol.* 1991, 12, 197-206.
- Helmuth R, Schroeter A. Molecular typing methods for *S. enteritidis*. *Int. J. Food Microbiol.* 1994, 69-77.
- Herald PJ, Zottola EA. Adherence of *Listeria monocytogenes* to Stainless steel Surface at Various Temperatures and pH Values. *J. Food Sci.* 1988, 53(5), 1549~1552.
- Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 26, 2465-2466.
- Jay JM. Prevalence of *Listeria* spp. in meat and poultry products. *Food Control.*

- 1996, 7, 209-214.
- Jaykus L. The application of quantitative risk assessment to microbial food safety risks. *Crit. Rev. Microbiol.* 1996, 22, 279-293.
- Jin UH, Chung TW, Kim JK, Nam KS, Ha SD, Kim CH. Differentiation of *Salmonella typhimurium* from gram-negative intestinal microbes by randomly amplified DNA (RAPD) fingerprinting. *J. of Microbiol.* 2000, 38(1), 8-10.
- Johnson JL, Doyle MP, Cassens RG. *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in meat and meat products a review. *J Food Prot.* 1990, 51, 81-91.
- Joint FAO/WHO/WHO Codex Alimentarius Commission. CODEX Guidelines. 1993.
- Jordan J, McEwen SA, Lammerding AM, McNab WB, Wilson JB. Pre-slaughter control of *Escherichia coli* O157 in beef cattle: a simulation study. *Preventive Veterinary Medicine.* 1999, 41, 55-74.
- Junttila JR, Niemela SI, Hirn J. Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic *Listeria*. *J Appl Bacteriol.* 1988, 65, 321-327.
- Kerouanton A, Brisabois A, Denoyer E, Dilasser F, Grout J, Salvat G, Picard B. Comparison of five typing methods for the epidemiological study of *Listeria monocytogenes*. *International J. Food Microbiol.* 1998, 43, 61-71.
- Kerouanton A, Brisabois A, Grout J, Picard B. Molecular epidemiological tools for *Salmonella Dublin* typing. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1996, 14, 25-29 .
- Klein PG, Juneja VK. Sensitive detection of viable *Listeria monocytogenes* by reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997, 63, 4441-4448.
- Kostman JR, Elliot TD, Lipuma JJ, Stull TL. Molecular epidemiology of *Pseudomonas cepacia* determined by polymerase chain reaction ribotyping. *J. Clin. Microbiol.* 1992, 30, 2084-2087.
- Laconcha I, Lopez-Molina N, Rementeria A, Audicana A, Perales I, Garaizar J. Phage typing combined with pulsed-field gel electrophoresis and random amplified polymorphic DNA increases discrimination in the epidemiological analysis of *Salmonella enteritidis* strains. *Int. J. Food Microbiol.* 1998, 40 (1,2), 27-34.
- Lehner A, Loncarevic S, Wagner M, Kreike J, Brandl E. A rapid differentiation

- of *Listeria monocytogenes* by use of PCR-SSCP in the listeriolysin O (hlyA) locus. *Journal of Microbiological Methods*. 1999, 34, 165-171.
- Lin AW, Usera MA, Barret TJ, Goldsby RA. Application of randomly amplified polymorphic DNA analysis differentiate strains of *Salmonella enteritidis*. *J. Clin. Microbiol.* 1996, 34, 870-876.
- Mafu AA, Roy D, Goulet J, Magny P. Adherence of *Listeria monocytogenes* to Stainless steel, Glass, Polypropylene, and Rubber Surfaces After Short Contact Times. *Journal of Food Protection*. 1990, 53(9), 742~746.
- Mann JE, Smith L, Brashears MM. Validation of time and temperature values as critical limits for *Salmonella* and background flora growth during the production of fresh ground and boneless pork products. *J Food Prot.* 2004, Jul 67(7), 1389-93.
- Mare L, Dicks LMT, van der Walt ML. Characterization of South African isolates of *Salmonella enteritidis* by phage typing, numerical analysis of RAPD-PCR banding patterns and plasmid profiles. *International J. Food Microbiol.* 2001, 64, 237-245.
- Martin MC, Gonzalez-Hevia MA, Moro I, Mendoza MC. Genetic typing methods applied to the differentiation of clonal line among *Salmonella enterica* serogroup G strains causing human salmonellosis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 1997, 19, 215-221.
- Martinez I, Rorvik LM, Brox V, Lassen J, Seppola M, Gram L, Fonnesbech-Vogel B. Genetic variability among isolates of *Listeria monocytogenes* from food products, clinical samples and processing environments, estimated by RAPD typing. *International J. Food Microbiol.* 2003.
- McLauchlin J, Crofts N, Campbell D. M. A possible outbreak of listeriosis caused by an unusual strain of *Listeria monocytogenes*. *J Infect.* 1989, 18, 179-187.
- McLauchlin J. *Listeria monocytogenes*, recent advances in the taxonomy and epidemiology of listeriosis in humans. *J Appl Bacteriol.* 1987, 63, 1-11.
- McNab WB. A Literature review Linking Microbial Risk Assessment, Predictive Microbiology, and Dose-Response Modeling. *Dairy, Food and Environment*

- Sanitation. 1997, 17(7), 405-416.
- Midelet G, Carpentier B. Transfer of microorganisms, including *Listeria monocytogenes*, from various materials to beef. Applied and environmental microbiology. 2002, 68(8), 4015~4024.
- Milleman Y, Lesage-Descauses MC, Lafont JP, Chaslus-Dancla E. Comparison of random amplified polymorphic DNA analysis and enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR for epidemiological studies of *Salmonella*. FEMS Immunol. Medical Microbiol. 1996, 14, 129-134.
- Moon GS, kim WJ, Shin W. Improvement of detection sensitivity of *Listeria monocytogenes* using crude pediocin PA-1 by polymerase chain reaction (PCR). Food Sci. biotechnol. 2003, 12, 435-438.
- Nogva HK., Rudi K, Naterstad K, Holck A, Lillehaug D. Application of 5'-nuclease PCR for quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in pure cultures, water, skim milk and unpasteurized milk. Appl. Environ. Microbiol. 2000, 66, 4266-4271.
- Norwood. DE. The differential adherence capabilities of two *Listeria monocytogenes* strains in monoculture and multispecies biofilms as a function of temperature. Letters in Applied Microbiology. 2001, 33(4), 323~324.
- Notermans S, Dufrenne J, Teunis P, Beumer R. A risk assessment study of *Bacillus cereus* present in pasturized milk. Food Microbiol. 1997, 14, 143-151.
- Notermans S, Mead GC. Incorporation of elements of quantitative risk analysis in the HACCP system. Int. J. Food Microbiol. 1996, 30, 157-173.
- Pearson LJ, Marth EH. *Listeria monocytogenes*-threat to a safe food supply: a review. J Dairy Sci. 1990, 73, 912-928.
- Peggy MF. Driving Predictive Modeling on a Risk Assessment path for enhanced food safety. Int J Food Microbiol. 1997, 36, 87-95.
- Poulsen VL. Microbial Biofilm in Food Processing. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie. 1999, 32, 321-326.
- Pritchard TJ, Flanders KJ, Donnelly CW. Comparison of the incidence of *Listeria* on equipment versus environmental sites within dairy processing plants. *Food Microbiology*. 1995, 26, 375-384.

- Rahkio M, Korkeala H. Microbiological contamination of carcasses related to hygiene practice and facilities on slaughtering lines. 1996, 37, 219-228.
- Rahn K, De Gandis SA, Clarke RC, McEwen SA, Galan JE, Ginocchio C, Curtiss III R and Gyles CL. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. Molecular and cellular probes 1992, 6, 271-279.
- Richard CW. Development of Quantitative Risk Assessment model for *Salmonella enteritidis* in pasturized liquid eggs. Int Jol Food Microbiol. 1997, 36, 111-125.
- Rocourt, J. Risk factors for listeriosis. Food Control. 1996, 7, 195-202.
- Rorvik LM, Aase B, Alvestad T, Caugant DA. Molecular epidemiological survey of *Listeria monocytogenes* in seafoods and seafood-processing plants. Appl Environ Microbiol. 2000, 66, 4779-4784.
- Rorvik LM, Skjerve E, Kundsén BR, Yndestad M. Risk factors for contamination of smoked salmon with *Listeria monocytogenes* during processing. Food Microbiology. 1997, 37, 215-219.
- Samelis J, Metaxopoulos J. Incidence and principal sources of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* contamination in processed meats and a meat processing plant. *Food Microbiology*. 1999, 16, 465-477.
- Sammarco ML, Ripabelli G, Ruberto A, Iannitto G, Grasso GM. Prevalence of *Salmonellae*, *Listeriae*, *Yersinia* in the slaughterhouse environment and on work surfaces, equipment and workers. J Food Prot. 1997, 60, 367-371.
- Sarah SM, Schaffner DW. Development of model to predictive growth of *Clostridium perfringens* in cooked beef during cooling. J Food Prot. 2005, 68(2), 336-341.
- Schlech III WF. Virulence characteristics of *Listeria monocytogenes*. Food Technology, 1988, 176-178.
- Schonberg A, Teufel P, Weis E. Serovars of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from pathogens. Act Microbiol Hung. 1989, 36, 249-253.
- Seeliger HPR, Jones D. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2, 9th ed. P.H.A Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt(Eds). Williams &

- Wilkins Co., Baltimore, MD. *Listeria*. pp. 1986, 1235-1245.
- Senczek D, Stephan R, Untermann F. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) typing of *Listeria* strains isolated from a meat processing plant over a 2-year period. *Food Microbiology*. 2000, 62,155-159.
- Serra JA, Domenech E, Eschriche I, Martorell S. Risk assessment and critical control points from the production perspective. *Int. J. Food Microbiol.* 1999, 46, 9-26.
- Smith-Simpson S, Schaffner DW. Development of a model to predict growth of *Clostridium perfringens* in cooked beef during cooling. *J. Food Prot.* 2005, 68, 336-341.
- Sommer P, Martin-Rouas C, Mettler E. Influence of the adherent population level on biofilm population, structure and resistance to chlorination. *Int J Food Microbiology*. 1999, 16, 503-515.
- Soto SM, Guerra B, del Cerro A, Gonzalez-Hevia MA, Mendoza MC. Outbreaks and sporadic cases of *Salmonella* serovar Panama studied by DNA fingerprinting and antimicrobial resistance. *Int. J. Food microbiol.* 2001, 71(1), 35-43.
- Swaminathan B, Rocourt J, Bille J. *Manual of clinical microbiology*, 6th ed. pp. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1995, 342-343.
- Tsen H, Hu HH, Lin JS, Huang CH, Wang TK. Analysis of the *Salmonella typhimurium* isolates from food-poisoning cases by molecular subtyping methods. *Food Microbiology*. 2000, 17, 143-152.
- Vogel BF, Jørgensen LV, Ojeniyi B, Huss HH, Gram L. Diversity of *Listeria monocytogenes* isolates from cold-smoked salmon produced in different smokehouses as assessed by Random Amplified Polymorphic DNA analyses. *Int J Food Microbiol.* 2001, 65, 83-92.
- Walker SJ, Stringer MF. Growth of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* at chill temperatures. *J Appl Bacteriol.* 1987, 63, R20.
- Walls I. Present status and future prospect of MRA application in USA. *Quantitative Microbial Risk Assessment of Foodborne Pathogens for Scientific Food Safety Management*, Seoul Korea. April 2005, 45-67.

- Willams JGK., Kubelin AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 1990, 18, 6531-6535.
- Wong HC, Chao WL, Lee SJ. Incidence and characterization of *Listeria monocytogenes* in foods available in Taiwan. *Appl & Environ Microbiol.* 1990, 56, 3101-3104.
- 농림부 · 국립수의과학검역원. 축산물가공장위해요소중점관리기준(HACCP)적용매뉴얼. 2001.
- 박경진. Microbial Risk Assessment의 최근동향. 한국HACCP연구회 심포지움. 2001, 49-69.
- 식품의약품안전청. 식중독발생현황 및 대책. 1998.
- 안상철, 홍종해. 돈육가공 작업환경에서 *Listeria monocytogenes*의 분리와 혈청형 분포조사. *한국식품위생학회지.* 1998, 13, 425-429.
- 이철현, 손원근, 강호조. 가축사육장 및 작업장 폐수로부터 *Listeria monocytogenes*의 분리 및 분리군의 약제내성. *한국수의공중보건학회지.* 2000, 24, 9-15.
- 임형근, 홍종해, 박경진, 최원상. 리스테리아균의 특성분석을 위한 Molecular Typing 방법의 상호보완. *생명과학회지.* 2003, 13, 699-704.
- 임형근, 홍종해, 박경진, 최원상. *Listeria* spp.의 RAPD typing을 위한 primer의 분리력 비교. *한국식품위생안전성학회지.* 2003, 18, 67-72.
- 한국보건산업진흥원. 정량적위해평가를 통한 가공유, 분유, 아이스크림 위해관리시스템 구축 모델 개발. 2001.
- 허정호, 손성기, 이주홍, 임삼규, 구정현, 박영호, 조명희, 손원근, 강호조. 도축처리 단계별 도체 및 환경재료에서 *Listeria monocytogenes*의 분리. *한국가축위생학회지.* 1997, 20, 69-78.