

316021-3

보안 과제( ), 일반 과제( o ) / 공개( o ), 비공개( )발간등록번호( )

첨단생산기술개발사업 제 3차 연도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-002530-01

농산물  
안전성  
관리를  
위한  
미생물  
학적  
위해요인  
및  
오염현황  
분석  
최  
종  
보  
고  
서

# 농산물 안전성 관리를 위한 미생물학적 위해요인 및 오염현황 분석 최종보고서

2018.12.31.

2018

농  
림  
수  
산  
식  
품  
기  
술  
기  
획  
평  
가  
원

주관연구기관 / 중앙대학교

협동연구기관 / 경상대학교

군산대학교

(주) 세니젠

국립농산물품질관리원

(주) 보레다 바이오텍

농 립 축 산 식 품 부  
(전문기관) 농림식품기술기획평가원

<제출문>

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “농산물 안전성 관리를 위한 미생물학적 위해요인 및 오염현황 분석”(개발기간 : 2016. 05. 19 ~ 2018. 12. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 12. 31.

주관연구기관명 : 중앙대학교	박기환 (인)
협동연구기관명 : 경상대학교	심원보 (인)
군산대학교	박경진 (인)
국립농산물품질관리원	문지영 (인)
참여기관명 : (주)세니젠	박정웅 (인)
(주)보레다바이오텍	최동욱 (인)

주관연구기관책임자 : 박기환  
협동연구책임자 : 심원보  
                            박경진  
                            문지영  
참여기관책임자 : 박정웅  
                            최동욱

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	316021-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2016-2018	단 계 구 분	1/1
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	첨단생산기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	농산물 안전성 관리를 위한 미생물학적 위해요인 및 오염현황 분석			
연구책임자	박기환	해당단계 참여연구원 수	총: 43명 내부: 43명 외부: 0명	해당단계 연구개발비	정부:300,000천원 민간:100,000천원 계:400,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 43명 내부: 43명 외부: 0명	총 연구개발비	정부:790,000천원 민간:264,000천원 계:1,054,000천원
연구기관명 및 소속부서명	중앙대학교/식품공학부			참여기업명 (주)세니젠 (주)보레다 바이오텍	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	일반
-------------------------	----

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설· 장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품중	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호											

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

○ GAP 농산물의 미생물학적 안전성 관리를 위한 현장 위생 가이드라인 개발	245
○ 베이지안 네트워크를 이용한 농산물 재배단계 동태학적 (Fate & Transport) 모델 개발	259
○ QMRA 기반 위해수준 평가 및 이를 이용한 농산물에서 유해 미생물 관리 우선순위 제안	322
○ 주요 농산물별 미생물 기준·규격 설정(안) 제안	325
○ 1시간 이내 multiplex real-time PCR Kit 최적조건 확립	334
○ 위해 식중독 세균 6종 신속검출 전처리 방법 개선	344
○ multiplex real-time PCR kit 개발	356
○ 위해 식중독 바이러스 5종 PCR 마커를 선정 하였으며 최적 조건 확립	384
○ 바이러스 검출용 PCR 키트 개발	395
○ 국내 농산물(GAP 포함)에서 미생물학적 위생안전관리방안 개선안 제시	426



<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 안심 농산물 생산을 위한 농업용수, 세척용수, 토양 및 농산물 등 재배로부터 최종 유통까지 국내 농산물의 미생물학적 안전성 평가 및 농산물별 가이드라인 작성             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 농산물 관련 식중독 등에 대한 사전 예방 및 관리 방안 마련</li> </ul> </li> <li>○ 우수농산물관리제도(GAP)의 미생물학적 관리 개선 방안 마련</li> <li>○ 실제 농산물의 미생물학적 품질관리를 위한 표준분석방법의 개선 및 신뢰도 제고</li> <li>○ 현장적용이 가능한 유해미생물(세균/바이러스) 신속 검출법 개발</li> </ul>				
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 안심 농산물 생산을 위한 농업용수, 세척용수, 토양 및 농산물 등 재배로부터 최종 유통까지 국내 농산물의 미생물학적 안전성 평가             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 농산물 및 환경시료에서의 모니터링 [세균 6종 / 바이러스 5종]</li> </ul> </li> <li>○ GAP 농산물 대상 미생물학적 위생안전관리 개선 방안 확립             <ul style="list-style-type: none"> <li>- GAP 인증 · 미인증 농장의 농산물 및 재배환경에 대한 미생물학적 위해 비교 평가 및 위해요소 분석</li> <li>- 현장에 적용 가능한 미생물 저감/예방 방안 및 위해요소 분석 마련, 가이드라인 제시</li> <li>- 신선농산물 재배농장의 GAP 인증 전·후 미생물학적 안전성 비교 평가</li> </ul> </li> <li>○ 주요 다소비 농산물에 대한 정량적 미생물 위해평가결과를 활용하여 유해관리 우선순위 농산물 품목 결정 및 관련 미생물 기준·규격 설정             <ul style="list-style-type: none"> <li>- ALOP 개념 적용 신선농산물 관련 재배에서 유통까지 유해 미생물에 의한 국내 질병발생 현황과의 관련성 및 risk factor 분석</li> <li>- 농산물에 대한 미생물학적 모니터링 결과에 대한 통계학적 오염수준 정량화</li> <li>- 베이지안 네트워크를 이용한 농산물 재배단계 동태학적 (Fate &amp; Transport) 모델 개발</li> <li>- 동태학적 모델 기반 QMRA 활용 농산물 재배단계 안전수준 평가</li> <li>- QMRA 기반 위해수준 평가 및 이를 이용한 농산물에서 유해 미생물 관리 우선순위 제안</li> <li>- 위해수준에 근거한 미생물 안전기준으로 제외국 농산물 미생물 안전관리 기준·규격 비교 검토를 통한 Sampling plan 기준(안) 제안</li> </ul> </li> <li>○ 식중독균 6종에 대한 Marker 탐색 및 1시간 이내 Multiplex Real time PCR kit의 개발 및 상품화를 완료하였음</li> <li>○ 주요 5종 식중독 바이러스의 신속검출을 위한 PCR 키트 개발 및 상용화             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 식중독 바이러스 신속 검출을 위한 PCR 프라이머 선정</li> <li>- 래피드 키트 방식의 PCR 산물 검출법 개발</li> <li>- 식중독바이러스 신속검출용 래피드 PCR 키트 개발</li> <li>- 면역자기분리법(IMS)을 이용한 전처리 방법 개선안 도출</li> <li>- 특허출원(1건) 및 기술실시를 통한 시제품 제작</li> </ul> </li> </ul>				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ GAP 농산물의 미생물학적 안전성 관리를 위한 현장 위생 가이드라인 개발에 활용</li> <li>○ 국내 다소비 농산물에서 식중독 미생물에 대한 정량적 미생물 위해평가(Quantitative Microbial risk assessment: QMRA)결과와 이를 활용하여 관리 우선순위 농산물 품목 결정 및 관련 미생물 기준 및 규격 설정에 활용             <ul style="list-style-type: none"> <li>- GAP, HACCP 등 관리기준 설정 및 관련 교육·훈련프로그램 개발 자료로 활용</li> </ul> </li> <li>○ 식품안전성 분야에서는 좀 더 신속하고 정확한 식품안전성 및 독성의 진단 및 평가방법을 제공할 것임</li> <li>○ 산업경제 발전 측면에서는 원료식품의 부가가치 향상과 농림수산업 전반의 활성화, 식품산업의 부가가치 및 생산성 증대, 국제기준의 안전성 확보에 따른 식품산업의 국제경쟁력 확보 및 수출 증대, 위해인자 진단 시약의 개발 및 수출, 식품 위해인자에 의한 질병의 치료 및 예방 기술로 활용할 계획임</li> <li>○ 바이러스 검출 키트 개발에 따른 매출 증가가 기대</li> <li>○ 바이러스 항체 개발에 따른 매출 증가가 기대</li> <li>○ 래피드 키트 방식의 PCR 산물 검출법 개발에 따른 신제품 개발 및 사업화 기대</li> <li>○ 제품판매 및 매출 증가에 따른 고용창출 기대(생산 및 연구분야)</li> </ul>				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>유해바이러스</p>	<p>유해미생물</p>	<p>우수농산물 품질관리제</p>	<p>농산물의 미생물학적 관리방안</p>	<p>신속검사법</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>Hazardous viruses</p>	<p>Pathogens</p>	<p>Good agricultural practices</p>	<p>Microbial management of agricultural products</p>	<p>Rapid detection methods</p>

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

< 목 차 >

제 1장. 연구개발과제의 개요 .....	6
제 1절. 연구개발 목적 .....	6
제 2절. 연구개발의 필요성 .....	6
제 3절. 연구개발 범위 .....	57
제 2장. 연구수행 내용 및 결과 .....	62
제 1절. 연구개발의 추진전략·방법 및 추진체계 .....	62
제 2절. 연구방법 .....	71
제 3절. 연구결과 .....	152
제 4절. 연구성과 .....	431
제 3장. 목표 달성도 및 관련분야 기여도 .....	442
제 1절. 목표달성도 .....	442
제 2절. 관련분야기여도 .....	446
제 3절. 목표 미달성 시 원인 및 사후대책 .....	447
제 4장. 연구 결과의 활용 계획 .....	452
붙임. 참고 문헌 .....	454

# 제 1 장. 연구개발과제의 개요

## 제 1 절. 연구개발 목적

- 안심 농산물 생산을 위한 농업용수, 세척용수, 토양 및 농산물 등 재배로부터 최종 유통까지 국내 농산물의 미생물학적 안전성 평가 및 농산물별 가이드라인 작성
  - 농산물 관련 식중독 등에 대한 사전 예방 및 관리 방안 마련
- 우수농산물관리제도(GAP)의 미생물학적 관리 개선 방안 마련
- 실제 농산물의 미생물학적 품질관리를 위한 표준분석방법의 개선 및 신뢰도 제고
- 현장적용이 가능한 유해미생물(세균/바이러스) 신속 검출법 개발

## 제 2 절. 연구개발의 필요성

### 2-1. 연구개발의 개요

#### <연구개발 내용 요약>

- 유해미생물(바이러스/세균) 신속검출법 개발 및 표준분석방법 개선
  - 5종 식중독 바이러스/6종 식중독 세균의 특이 유전자 마커 탐색
  - 유해미생물 PCR 최적조건(민감도, 특이도, 검출시간, 검출한계 등)
    - 민감도, 특이도 : 양성반응 95% 이상/PCR 검출시간 : 1시간 이내/검출한계 : 100CFU 이하
  - 유해바이러스(탈리/농축기법), 유해세균(탈리/중균기법) 개발기술 활용 전처리 방법 개선안 도출 : 전처리시간 6-12시간 이내
  - 국제 인증 ISO(바이러스)/AOAC(세균) 방법을 준용한 개발된 Kit 현장검증
  - 개발 제품의 사용자 편의 제품설명서 제작 및 표준분석방법 개선안 도출
  - 개발제품의 상용화 및 수출기반 확립
- 국내 농산물의 미생물학적 안전성 평가
  - 농산물 관련 재배부터 유통까지 risk factor 탐색
  - 주요 다소비 농산물 선정 후 재배부터 유통·소비까지 단계별 미생물학적 오염도 조사 (농산물 및 환경시료에서의 모니터링) : 농산물 12품목 이상, 미생물 6종 이상 등
  - 농산물 안전관리 체계 및 실태조사 : 문헌조사 및 현장조사
  - 신선농산물 관련 유해 미생물에 의한 국내 질병발생 현황과의 관련성 분석
  - 신선농산물에 대한 미생물학적 모니터링 결과에 대한 통계학적 오염수준 정량화
  - 안전성 평가를 위한 재배부터 유통까지 동태학적(Fate & Transport) 모델 개발
  - 동태학적 모델 기반 재배부터 유통까지의 미생물학적(세균/바이러스) 안전성 평가 : Monte-carlo simulation, QMRA 방법 등 활용

- 국내 농산물(GAP 포함) 생물학적 유해미생물 관리 우선순위 목록화

○ 국내 농산물(GAP 포함) 미생물학적 관리체계 개선

- 신선농산물 대표작물 선정 및 생물학적 위해요소 조사
- 현장방문을 통한 위해요소 발생원인 분석
- 국내 농산물(GAP 포함)에서 유해미생물 저감 장치 및 시설 보완 방안 확립
- 미생물학적 안전성 확보를 위한 국내 농산물(GAP 포함) 관리시설의 지정 기준 보완 방안 제시
- 국내 농산물(GAP 포함)에서 미생물학적 기준·규격 제안 : Sampling plan 등
- 국내 농산물(GAP 포함) 품목별 미생물학적 위생안전관리 가이드라인 개선안 도출

○ 네트워킹

- 연구과제 참여기관 정기회의 : 2개월 간격(예정)

<연구개발 대상 기술 및 제품 개요>

(1) 식중독 세균 신속검출용 multiplex real-time PCR kit 개발

○ 연구개발 개요

- 유전체 data를 기반으로 한 target gene primer를 제작하여 multiplex real-time PCR 기술로 single 또는 multiplex 신속 검출 kit 개발



<Multiplex real-time PCR 제품 개념도>

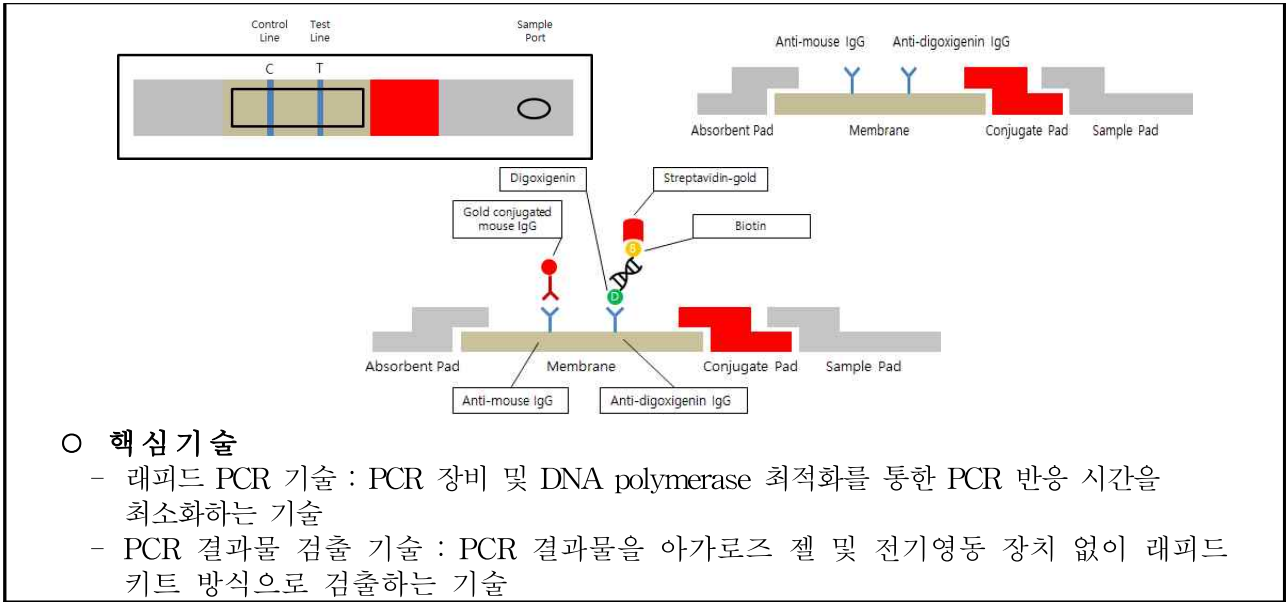
○ 핵심기술

- 유해균의 유전체 염기서열 분석과 이에 따른 comparative genomics 분석으로 target host의 specific region을 알 수 있음
- Target gene 검출용 primer의 probe 제작과 이들을 활용한 cross checking 검사
- 정확성 높은 Real-Time PCR 조건 확립

(2) 식중독 바이러스 신속검출용 래피드 PCR kit 개발

○ 연구개발 개요

- PCR을 기반으로 한 농산물 관련 유해 바이러스(노로바이러스, A형 간염 바이러스, 아데노바이러스, 로타바이러스, 아스트로바이러스) 신속검출 kit 개발



○ 핵심 기술

- 래피드 PCR 기술 : PCR 장비 및 DNA polymerase 최적화를 통한 PCR 반응 시간을 최소화하는 기술
- PCR 결과물 검출 기술 : PCR 결과물을 아가로스 젤 및 전기영동 장치 없이 래피드 키트 방식으로 검출하는 기술

<현재 개발된 농산물에서의 식중독 세균 및 바이러스 검사 키트의 문제점과 본 연구를 통한 개선방법>

문제점	개선방법
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 사용자 편의를 고려하여 전처리 기법과 검출을 일원화한 one-step 키트가 없음</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 증균부터 분리농축, 정제, 핵산추출 과정 등의 전처리 과정을 포함한 일원화된 one-step 키트의 개발(탈리-농축-증균 시간 6시간 목표)</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 유해미생물(세균 6종/바이러스 5종) 동시 또는 신속검출을 위한 multiplex real-time PCR type으로 되어있는 식중독 세균 검출용 키트가 없음</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 6종 식중독세균 또는 5종 바이러스를 동시에 검출할 수 있는 multiplex real-time PCR 개발</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 균에 따라 증균 시간이 최소 24-48시간 소요됨</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 새로운 증균 배지의 개발을 통해 증균 배지 내 inhibitor와 정상 세균 총을 줄이고 증균 시간을 단축(6시간 목표)</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 또한 증균 중 경쟁균이 함께 자라 민감도와 특이도를 낮춤</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 농산물에서 오염되어 식중독을 일으킬 수 있는 6종 식중독 세균 및 5종 바이러스에 대한 검출키트 개발</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 대장균 O157, 살모넬라, 리스테리아 등의 세균과 노로바이러스 등의 바이러스를 위주로 위해도가 높은 유해미생물 위주로 개발되어 있음</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• AOAC validation 기법을 활용 실험실 및 필드 테스트를 통한 실제 농산물에서 민감도와 특이도 등 효능검증 후 상용화 및 수출시장 개척에 활용</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 국내에는 AOAC 혹은 AFNOR validation 등의 국제표준 인증을 받은 식중독 검출 키트가 없음</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 6종 식중독 세균 및 5종 바이러스에 대한 타겟 특이 유전자 정보 확보와 분석을 통해 국제표준 수준의 primer-probe 개선</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 또한 검증된 키트도 농산물을 포함한 실제 식품 시료에서는 위양성과 위음성이 많이 보고됨</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 국내에서 제한적으로 개발된 PCR 기반 기술은 primer-probe 개선의 여지가 많음</li> </ul>	

## 2-1-1. 국내·외 농산물에서의 식품사고 발생 증가

### <주요 내용 요약>

1. 신선농산물 섭취의 기하급수적인 증가
2. 최근 발생하는 식중독 사고는 대부분 신선농산물과 관계가 있음
3. 농산물 위생안전관리를 위하여 GAP 제도를 실행하고 있으나, 미생물학적 위생 안전관리방안은 없는 실정임

□ 국내·외적으로 농산물에서 식품사고가 매우 빈번하게 일어나고 있음



- 세계무역기구(WTO)체제의 출범으로 농산물과 가공식품의 생산과 교역은 더욱 활발해짐
- 국가 간 무역보호 장벽이 무너지고 위생 및 검역협정(Agreement on the Application of the Sanitary and Phytosanitary Measure, SPS)이 발효됨
- 최근 웰빙 열풍을 타고 농산물에 대한 소비자의 수요가 국내외적으로 급증하는 추세임
- 그러나, 농산물의 경우 유해미생물이 육류 등에 비해 상대적으로 적음에도 불구하고, 별도의 가열조리 없이 섭취되므로, 높은 위해도를 가지고 있음

### (1) 국내·외 농산물 소비경향

- 미국의 경우 2003년에 USDA에서 발표한 자료에 따라 지난 1970년부터 1997년의 27년간 1인당 채소 소비량의 변화는 가공채소와 신선채소를 중심으로 증가하는 추세였으며, 1인당 소비량이 가장 많은 것은 토마토, 시금치 등으로 채소류의 소비는 10년 전에는 감자, 상추, 토마토가 중요한 위치를 차지하였으나, 최근에는 양파 소비가 늘어나 감자, 상추, 양파의 순으로 소비되고 있음

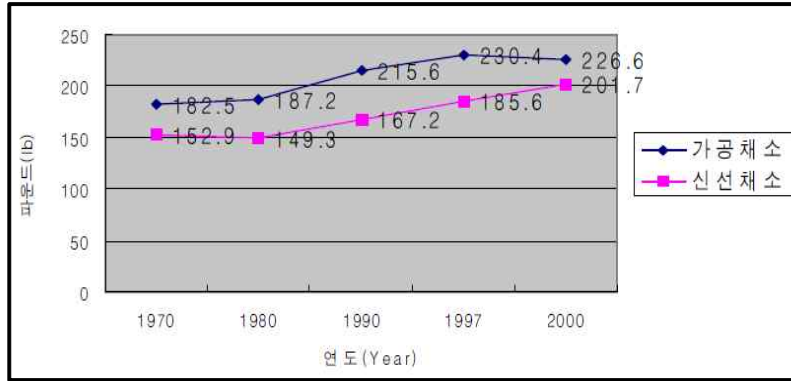


그림 1-1. 미국인의 채소 1인당 연간 소비량

[자료출처 : 미국 USDA]

- 국내의 경우 2000년대 초반 웰빙붐과 함께 **엽채류 및 과실류에 대한 1인당 소비량이 증가하는 추세임**

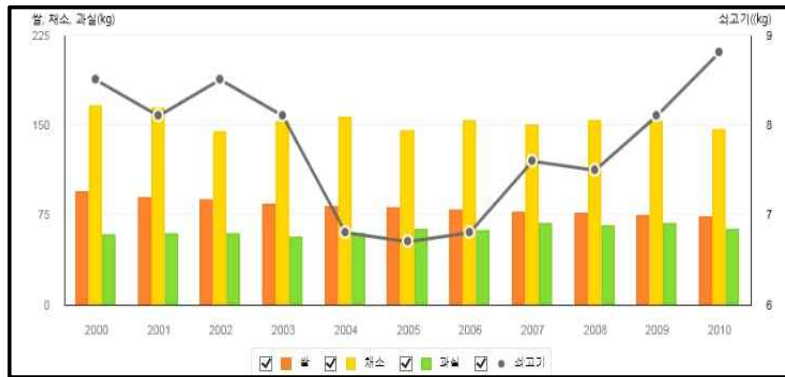


그림 1-2. 국내 주요 농산물 1인당 연간 소비량

[자료출처 : 2015 농림축산식품부 작물통계]

- 특히, **국내의 다소비 농산물은 채소류 중에서 김치의 영향으로 배추가 13.4개로 가장 높았고, 그 다음은 4.8개인 무가 높았음**
- 과일류 중에서는 **사과가 1.5개로 가장 높았으며, 그 다음은 바나나와 오렌지로 1개로 나타났음**

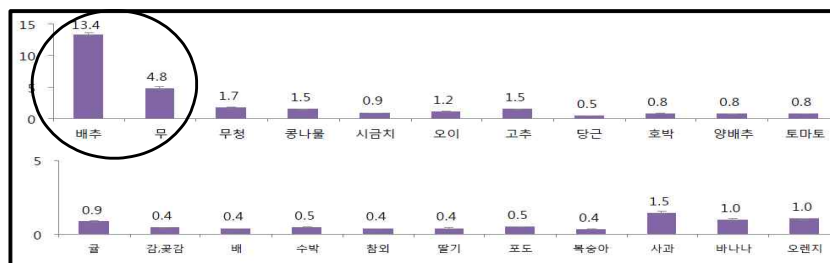
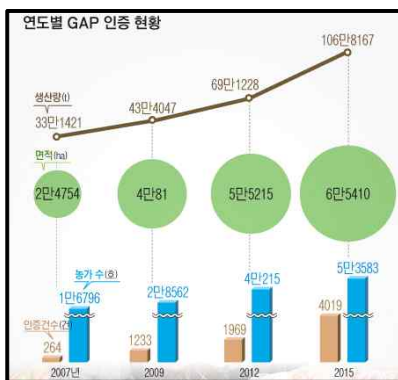


그림 1-3. 국내 1일 동안 소비되는 과일, 채소류 품목

[자료출처 : 2013 한국농촌경제연구원]

- 특히, GAP 농산물 등에 대한 수요도 급증하는 추세임. “GAP 농산물”이란 농산물(축산물은 제외한다)의 안전성을 확보하고 농업환경을 보전하기 위하여 농산물의 생산, 수확 후 관리(농산물의 저장·세척·건조·선별·절단·조제·포장 등을 포함한다) 및 유통의 각 단계에서 작물이 재배되는 농경지 및 농업용수 등의 농업환경과 산물에 잔류할 수 있는 농약, 중금속, 잔류성 유기오염물질 또는 유해생물 등의 위해요소를 적절하게 관리하는 것을 의미함
- 한국소비자원이 최근 수도권 거주 20세 이상 기혼여성 400명을 대상으로 조사한 결과 95%가 GAP 농산물을 구입한 경험이 있었다고 응답하였으며, 구입 이유로는 91%가 ‘안전하다’는 점을 들었으나, GAP 농산물이 세균 감염과 같은 생물학적 위해에 취약한 것으로 나타났음



- 2003년 9농가로 시작한 GAP 인증은 지속적으로 증가하여, 2015년에 5만3583농가로 확대되었으며, 생산량도 106만8167t을 기록하였음
- 인증면적도 매년 증가세를 보여 2009년 3만ha, 2012년 4만ha였던 면적은 지난해 5만3583ha를 기록하며 처음으로 5만ha를 넘겼음

- 한편 최근에는 전통적인 개념의 농산물 외에 신선편의 식품이나, 후레쉬컷처럼 간편하게 먹을 수 있는 타입의 농산물에 대한 수요가 늘어났음
- 특히 minimally processed vegetable 같이 간단하게 손질된 신선 농산물에 대한 수요가 세계적 늘어나고 있는 추세이며, 이러한 간편 농산물의 경우 추가적인 손질이나 세척 과정 없이 그대로 섭취하게 되어 있어 가공 단계에서 관리가 제대로 되지 않은 경우 식중독에 더 취약할 수 있음
- 한편, 신선편이농산물(조리가공용의 단순처리 농산물과 즉석섭취용 편의식품 포함) 구입 후 이용습관에 대한 설문조사 결과에 따르면 대다수의 소비자가 이미 세척과정을 거친 단순처리 농산물을 다시 씻어서 사용(응답자의 80%)하는 것으로 나타났음

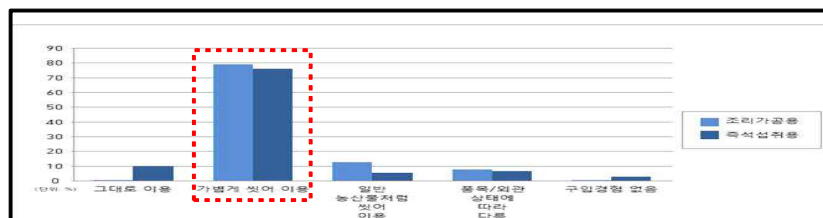


그림 1-4. 소비자 가구의 신선편이 농산물 구입 후 이용습관

[자료출처 : 2013 농림축산식품부 연구보고서]



(2) 농산물에서 식품사고 주요 원인

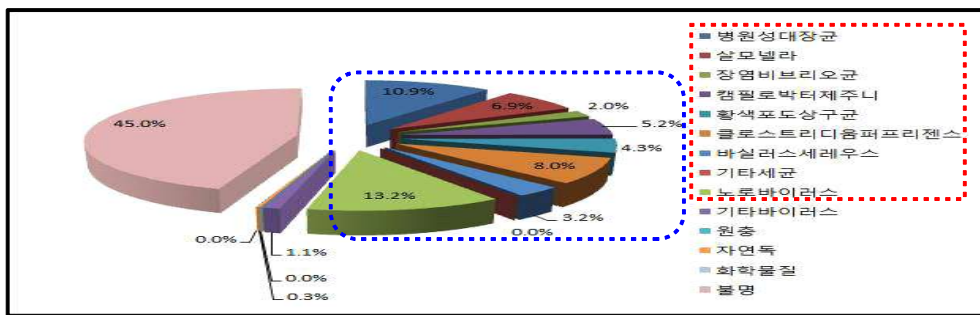
- 농산물 안전성 위해요인은 생물학적 위해, 화학적 위해, 물리적 위해요소로 분류되며, 특히, 농산물에서의 식품사고(2002~2015)의 주요 원인을 분석한 결과 **유해미생물이 1,996건으로 전체 58.1%를 차지**하고 있으며, 원인을 밝히지 못한 경우도 1,297건으로 나타남

표 1-1. 국내 원인별 식품사고 현황

구분	유해미생물	화학물질	자연독	불명	합계
발생건수(건)	1,966	5	34	1,97	3,332
비율(%)	58.1	0.1	1.0	37.8	100

[자료출처 : 식품의약품안전처 식중독통계시스템]

- **농산물에서의 식품사고의 원인을 분석하면 장염비브리오균(13.2%), 병원성대장균(10.9%), 클로스트리디움퍼프리젠스(8.0%), 살모넬라(6.9%) 등 유해미생물의 비중이 높은 것으로 나타났음**



[자료출처 : 식품의약품안전처 식중독통계시스템]

(3) 농산물에서 미생물학적 오염도 현황

- **2015년 국립농산물품질관리원**에서 농식품 식중독 사고에 대비하여 우리나라 농산물의 사전 예방적 안전관리를 위하여 농산물 등 1,101건에 대하여 오염조사를 실시한 결과, 993건(90.2%)에서는 병원성 미생물이 불검출 되었고, 95건(8.6%)에서는 검출되었으나 오염수준이 낮아 안전한 것으로 평가되었음

- **조사대상 : 생식채소류, 단순처리 농산물, 가축 매몰지역 농산물, 농산물 세척용수**
- **유해물질 : 식중독균 7종 및 노로바이러스**

\*식중독균 7종 : 대장균, 장출혈성 대장균, 황색포도상구균, 살모넬라, 바실러스 세레우스, 클로스트리디움 퍼프린젠스, 리스테리아 모노사이토제네스

표 1-2. 농산물 분류별 병원성 미생물 검출 현황

병원성미생물	검출율(%)*			
	생식 채소류	단순처리 농산물	가축 매몰지 농산물	농산물 세척용수
바실러스 세레우스( <i>B. cereus</i> )	13.6	4.9	3.0	-
대장균( <i>E. coli</i> )	0.7	N.D.**	1.0	-
황색포도상구균( <i>S. aureus</i> )	0.2	N.D.	1.0	-
클로스트리디움 퍼프린젠스 ( <i>Cl. perfringens</i> )	N.D.	N.D.	N.D.	-
살모넬라( <i>Salmonella</i> spp.)	N.D.	N.D.	N.D.	-
장출혈성대장균 ( <i>Enterohemorrhagic E. coli</i> )	N.D.	N.D.	N.D.	-
리스테리아 모노사이토제네스 ( <i>L. monocytogenes</i> )	N.D.	N.D.	N.D.	-
노로바이러스( <i>Norovirus</i> )	-	-	-	N.D.

\*검출율(%)는 전체 분석시료 건수에 대한 검출시료 건수의 백분율

\*\*N.D.는 불검출을 의미함

[자료출처 : 2016 국립농산물품질관리원 연구보고서]

표 1-3. 국내 신선농산물로부터 분리한 유해미생물 모니터링 결과

Fresh produce	Microbial count (cfu/g)				
	Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Pathogen	Reference
Carrot	6.6 log 2.58×10 <sup>5</sup>	5.16×10 <sup>4</sup>		<i>Cl. perfringens</i> 1.2×10 <sup>4</sup>	Jo et al., 2002 Kim et al., 2004 Kim and Cha, 2002
Lettuce	6.9×10 <sup>6</sup> 8.01 log	1.2×10 <sup>6</sup> 7.13 log 6.0 log	1.00~2.30 log	<i>Cl. perfringens</i> 3.0×10 <sup>2</sup>	Jo et al., 2002 Jung et al., 2006 Choi et al., 2005 Kim et al., 2004
Chinese cabbage	8.8×10 <sup>6</sup>	4.1×10 <sup>5</sup>		<i>Cl. perfringens</i> 3.2×10 <sup>2</sup>	Jo et al., 2002 Jung et al., 2006
Cabbage	2.05×10 <sup>5</sup>	6.9 log 2.40×10 <sup>4</sup>			Kim et al., 2004 Kim and Cha, 2002
Dropwot	1.6×10 <sup>7</sup>	3.7×10 <sup>6</sup>		<i>Cl. perfringens</i> 1.4×10 <sup>5</sup>	Jo et al., 2002 Jung et al., 2006
Sesame leaf	3.0×10 <sup>6</sup> 7.65 log	9.5×10 <sup>5</sup> 7.05 log	1.18~3.45 log		Jung et al., 2006 Choi et al., 2005
Cucumber	6.57 log 2.45×10 <sup>5</sup>	5.42 log 1.03×10 <sup>4</sup>	1.38~1.41 log	<i>Cl. perfringens</i> 3.0×10 <sup>2</sup>	Jo et al., 2002 Choi et al., 2005 Kim and Cha, 2002
Korean leek	1.6×10 <sup>7</sup>	9.8×10 <sup>6</sup>			Jung et al., 2006
Crown daisy	9.6×10 <sup>6</sup>	1.6×10 <sup>6</sup>			Jung et al., 2006
Pimpinella brachycarpa	2.2×10 <sup>6</sup>	8.3×10 <sup>5</sup>			Jung et al., 2006
Chicory	6.6×10 <sup>7</sup>	4.7×10 <sup>6</sup>			Jung et al., 2006
Potato	6.14 log	4.69 log		<i>Cl. perfringens</i> 2.6×10 <sup>4</sup>	Jo et al., 2002 Kim et al., 2007
Balloonflower	9.15×10 <sup>6</sup> 5.2×10 <sup>6</sup>	1.74×10 <sup>5</sup> 3.6×10 <sup>6</sup>	1.0×10	<i>S. aureus</i> 3.4×10 <sup>2</sup> <i>B. cereus</i> 1.7×10 <sup>3</sup>	Kim and Cha, 2002 Kim et al., 2009

(4) 국내·외 농산물 안전사고 현황

- 신선농산물의 소비는 1980년대부터 현재까지 꾸준히 증가하고 있으며, 세계적으로 1990년부터 2004년까지 매년 평균 4.5%의 소비증가율을 보였음
- 신선농산물의 소비가 증가함에 따라 신선농산물에 의한 식중독 발병률은 빠르게 증가하고 있으며 국내외로 다수의 식중독사고가 보고되고 있는 실정임(Warriner 등, 2009; Sivapalasingam 등, 2004)
- 미국에서는 1973년에서 2006년 사이 양배추, 양상추, 시금치 등 잎 채소류에 의한 식중독사고가 총 502건 발생하였으며, 2006년에는 신선 시금치에 오염된 *E. coli* O157:H7로 인하여 200명 이상의 환자가 감염되고 관련 소비시장이 냉각된 바 있음(Herman 등, 2008; Bassett 과 McClure, 2008; CDC, 2006; USDA ERS, 2008)
- 신선농산물로 인한 식중독 발생 중 70%는 엽채류(Leafy vegetables)에 기인하여, 단순처리 된 엽채류의 잠재적 위해 가능성을 시사하였음(Dewaal과 Bhuiya, 2007; FAO/WHO, 2008)
- 신선농산물에 의한 식중독사고의 주요 원인균은 *Salmonella*와 병원성대장균으로 나타났다(Buck 등, 2003; FDA, 1998;Warriner 등, 2009), 국제적으로 신선 농산물을 1차적으로 가공한 단순처리 농산물의 안전사고 실태 또한 다수 보고되고 있음

표 1-4. 농산물 관련 미생물학적 안전사고 현황(2000-2011)

연도	분류	품목	원인체	예상오염경로	Case (Deaths)	참고문헌
2011	엽채류	치커리	<i>Yersinia</i> spp.	특정브랜드의 샐러드상품 오염	21	MacDonald 등, 2011
2010	엽채류	상추	Pathogenic <i>E. coli</i>	Freshway Foods	26	CSPI
	엽채류	샐러리	<i>L. monocytogenes</i>	Fresh Cut Produce 오염	10(5)	Gaul 등, 2013
	근채류	감자	<i>Bacillus cereus</i>	Prison	9	CSPI, 2012
	근채류	감자	<i>Salmonella</i> spp.	Assisted living facility, home care	41	CSPI, 2012
	과채류	토마토	<i>Salmonella</i> spp.	Private home	16	CSPI, 2012
2009	엽채류	상추	<i>Campylobacter</i> spp.	Restaurant	11	CSPI, 2012
	엽채류	양배추	<i>S. aureus</i>	Prison	66	CSPI, 2012
	엽채류	양상추	<i>Salmonella</i> spp.	Picnic	27	CSPI, 2012
	과채류	고추	<i>Salmonella</i> spp.	Church, temple, religious location	43	CSPI, 2012
2008	엽채류	시금치	Pathogenic <i>E.coli</i>	Private home	5	CSPI, 2012
	엽채류	양상추	<i>Salmonella</i> spp.	Ready-chopped iceberg lettuce	107(2)	Lienemann 등, 2011
	두류	콩	<i>Campylobacter</i> spp.	Private home	104	CSPI, 2012
	근채류	양파	Pathogenic <i>E. coli</i>	Restaurant	235	Kozak 등, 2012
	과채류	토마토	<i>Salmonella</i> spp.	Restaurant	12	CSPI, 2012
2007	엽채류	상추	<i>Salmonella</i> spp.	Restaurant; Private home	76	CSPI, 2012
	과채류	고추	<i>Clostridium</i> spp.	Private home	4	CSPI, 2012
2006	엽채류	상추	Pathogenic <i>E. coli</i>	Restaurant	77	CSPI, 2012
	엽채류	시금치	Pathogenic <i>E. coli</i>	Private home	238	CSPI, 2012
	엽채류	양상추	Pathogenic <i>E. coli</i>	패스트푸드	4	FSnet, 2006
	근채류	당근	<i>Yersinia</i> spp.	학교급식	400	Hinhanen-fime 등, 2007
2005	엽채류	상추	Pathogenic <i>E. coli</i>	관계용수	120	Soderstrom 등, 2005
	엽채류	숙주나물	<i>Salmonella</i> spp.	Private home	2	CSPI, 2012
	근채류	당근	<i>Bacillus cereus</i>	Restaurant	6	CSPI, 2012
2004	과채류	토마토	<i>Campylobacter</i> spp.	Restaurant	13	CSPI, 2012
	과채류	오이	<i>Salmonella</i> spp.	농장에서 오염	12	BCCDC, 2005
2003	과채류	토마토	<i>Salmonella</i> spp.	Multiple locations	11	CSPI, 2012
2002	엽채류	상추	<i>Salmonella</i> spp.	Farm stand	8	CSPI, 2012
2001	과채류	고추	<i>Clostridium</i> spp.	Workplace	59	CSPI, 2012
	엽채류	상추	<i>Salmonella</i> spp.	식품 제조장비의 위생상태 불량	41	Stafford 등, 2002
2000	과채류	토마토	<i>Clostridium</i> spp.	Private home	2	CSPI, 2012
	근채류	양파	<i>Bacillus cereus</i>	Restaurant	4	CSPI, 2012
	과채류	고추	<i>Salmonella</i> spp.	Restaurant	27	CSPI, 2012

- 또한, 지난 1월에 미국 질병통제예방센터(CDC)가 발표한 연구결과에 의하면 보고되는 식중독 건의 절반가량이 과일과 견과류, 녹색 채소와 기타 다른 식물성 식품에 의해 유발되는 것으로 나타났음

표 1-5. 미국에서 최근 20년간 식중독 발병 식품의 종류, 횟수, 감염자 수

순위	종류	질병 발병횟수 (회)	감염자 수 (명)	순위	종류	질병 발병횟수 (회)	감염자 수 (명)
1	상추, 시금치	363	13,568	6	치즈	83	2,761
2	달걀	352	11,163	7	아이스크림	74	2,594
3	참치	268	2,341	8	토마토	31	3,292
4	굴	132	3,409	9	콩나물	31	2,022
5	감자	108	3,659	10	베리	25	3,397

[자료출처 : 미국 질병통제예방센터, www.cdc.gov]

- 국내에서도 단순처리 농산물 중 엽채류(시금치, 상추, 배추 등)에서의 미생물 오염도가 높은 것으로 나타났음

표 1-6. 단순처리 농산물 분류별 미생물 오염도

분류 (시료 수)*	미생물 오염량(log CFU/g) <sup>b</sup>		
	총세균	대장균군	병원성 대장균
엽채류 (n=145)	5.6 ± 1.3 <sup>BC</sup>	3.2 ± 1.8 <sup>AB</sup>	0.3 ± 0.9
근채류 (n=64)	5.0 ± 1.2 <sup>BCD</sup>	2.5 ± 2.0 <sup>ABC</sup>	ND <sup>c</sup>
엽경채류 (n=32)	5.1 ± 1.3 <sup>B</sup>	1.6 ± 1.5 <sup>BCD</sup>	0.1 ± 0.3
과채류 (n=32)	4.5 ± 1.3 <sup>CD</sup>	1.3 ± 1.5 <sup>CD</sup>	ND
두류 (n=16)	4.2 ± 1.3 <sup>D</sup>	0.4 ± 1.1 <sup>D</sup>	ND
기타 (n=16)	6.7 ± 0.4 <sup>A</sup>	4.2 ± 0.8 <sup>A</sup>	0.7 ± 1.5
합계 (n=321)	5.1 ± 1.4	2.1 ± 1.8	0.1 ± 0.5

<sup>a</sup>총세균수, 병원성 대장균군 검사 품목 수. 대장균군 검사 품목 수: 상동  
<sup>b</sup>평균 ± 표준편차  
<sup>c</sup>ND: Not Detected  
<sup>A-D</sup>같은 열에서 다른 윗첨자가 표시된 경우 통계적 유의차가 있음  
 [자료출처 : 2013 농림축산식품부 연구보고서]

(5) 농산물에서 식중독 미생물 오염경로

- 신선편의 식품 중에서 가장 많이 소비되는 엽채류는 토양에서 재배되기 때문에 수확 직후 잎 표면에 토양과 물에 의한 다양한 미생물이 부착되며, 가공공정의 세척단계에서 제거되지 않은 미생물로 인한 식품의 변질 가능성이 큼

- 또한 유통 및 보관단계에서 온도가 냉장 이상인 경우 잔류한 미생물의 증식이 가속화 될 수 있고, 다른 식품과의 교차오염이 발생 할 수 있음
- 신선농산물이 식중독 미생물에 의한 오염경로는 토양에서 유래된 식중독균, 동물의 분변이 퇴비로 사용되었을 경우, 분변에 물 등이 오염되었을 경우, 도마 등을 통한 교차오염을 통해 농산물에 식중독균이 오염되는 경우가 많음
- 분뇨는 식중독균을 죽이기 위해 55도에서 15일간 숙성시켜야 하나 제대로 숙성되지 않은 분뇨가 퇴비로 쓰이게 되면 식중독균이 오염될 수 있음
- 신선농산물에서는 축산물에 비해 균이 증식하기 어려우나, 대부분 가열조리 없이 섭취하기 때문에 감염량이 낮은 균의 경우 소량의 섭취로도 중증의 식중독을 유발할 수 있음
- 농산물 가공 형태별 주요 식중독 미생물 정성분석 결과, 특히 *B. cereus*가 가공단계 중 절단 및 다듬기 과정에서 미생물 오염도가 높은 것으로 나타났음

표 1-7. 농산물 가공 형태별 미생물 오염도

품목 (시료수)	검출건수(%)			
	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	그 외 <sup>a</sup>
절단 (n=96)	71 (74.0)	ND <sup>b</sup>	5 (5.2)	ND <sup>b</sup>
다듬기 (n=64)	57 (89.1)	2 (3.1)	8 (12.5)	ND
세척 (n=63)	44 (69.8)	1 (1.6)	7 (11.1)	ND
건조 (n=32)	20 (62.5)	ND	2 (6.3)	ND
데침 (n=32)	19 (59.4)	4 (12.5)	1 (3.1)	ND
박피 (n=16)	11 (68.8)	1 (6.3)	ND	ND
절입 (n=18)	13 (72.2)	3 (16.7)	3 (16.7)	ND
합계 (n=321)	235 (73.2)	11 (3.4)	26 (8.1)	ND

<sup>a</sup>*E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica*

<sup>b</sup>ND: Not Detected

[자료출처 : 2013 농림축산식품부 연구보고서]

- 2014년 농촌진흥청에서 국내 신선농산물인 들깨와 상추의 재배에서 소비까지 단계에서 단계별 유해미생물을 모니터링 한 결과, 식중독 미생물들이 유통단계까지 남아 있는 것으로 나타나, 섭취시에 문제가 발생할 것으로 나타났음

표 1-8. 국내 신선농산물 “들깨” 및 “상추”의 재배에서 소비까지 유해미생물 모니터링 결과

(단위 : log cfu/g)

품명	식중독 미생물	농장	마트	도매시장
들깨	일반세균	5.46	5.22	5.60
	대장균군	1.28	1.99	1.75
	<i>B. cereus</i>	1.40	1.74	1.72
	<i>S. aureus</i>	- <sup>1)</sup>	1.78	-
	<i>Salmonella</i> spp.	-	-	-

품명	식중독 미생물	농장	마트	도매시장
	<i>L. monocytogenes</i>	-	-	-
	<i>E. coli</i> O157:H7	-	-	-
상추	일반세균	4.93	5.01	6.01
	대장균군	1.18	1.35	1.30
	<i>B. cereus</i>	1.54	2.02	1.35
	<i>S. aureus</i>	-	-	-
	<i>Salmonella spp.</i>	-	-	-
	<i>L. monocytogenes</i> <i>E. coli</i> O157:H7	-	-	-

<sup>1)</sup> - : Not detected

[자료출처 : 농촌진흥청 내부자료, Unpublished]

## 2-1-2. 농산물에서 유해미생물 신속검출기법 개발의 중요성

### <주요 내용 요약>

1. 신속정확한 식중독세균의 검사는 농산물 HACCP 및 GAP 시스템의 효율적인 운영과 안전한 농산물 생산-소비와 국산 농산물의 경쟁력 향상에 매우 중요
2. 식중독 미생물 검출 시장은 지속적으로 증가가 예상되어 국내기술의 확보로 바이오산업 발전과 수출증대에 기여할 수 있음

- 산업이 발전하고 수입 자유화에 따른 식품 교역량이 늘어나면서 세계적으로 농산물 유통성 질병이 늘어나고 있음
- 식중독이란 ‘식품 또는 물의 섭취에 의해 발생되었거나 발생된 것으로 생각되는 감염성 또는 독소형 질환’을 의미함
- 식품위생법상 집단 식중독은 역학적 조사결과 식품 또는 물이 질병의 원인으로 확인된 경우로서 동일한 식품이나 동일한 공급원의 물을 섭취한 경우 2인 이상의 사람이 유사한 질병을 경험한 사건으로 정의됨
- 현재 식중독 검사는 발병 후 역학적으로 관련이 있는 식품에서 원인 물질이 검출되거나 환자 2인 이상에서 동일한 형태의 혈청형 또는 유전자형의 미생물이 검출되면 식중독으로 판정하고 있음
- 하지만 식품의 경우 다양한 물질의 혼합물이기 때문에 검출에 어려움이 있으며, 다양한 원인 물질 검사 방법의 부족 및 극미량의 원인 물질로 검출에 제한이 있음
- 특히 재래식 방법을 통한 식품 유해물질 검사는 아직도 높은 비용과 오랜 시간(2-5일 이상)을 요구하는 노동 집약적인 방법이 사용되는 경우가 많아서 신속 정확한 검사방법 개발이 시급함

- 식품검사의 수요증가에 맞추어 신속 검사키트의 수요도 증가하고 있으며 일선 위생담당자들의 검사능력에도 직접적인 관계가 있음
- 식중독 사고의 예방과 진단, 역학 조사는 신속·정확한 표준화된 미생물 시험법이 전제
- 식중독 원인균에 대한 표준화된 검출법을 통한 식품안전 관리는 생산자의 자발적인 검사시스템을 유도하고 국민의 신뢰도를 획득할 수 있음

#### 가. 농산물에서의 위해 식중독 미생물 신속검출기법의 적용 증가

- 최근 HACCP, GAP 등 농산물 위생관리 시스템에 있어서 가장 중요한 부분은 식중독 미생물의 정확한 검출이라고 할 수 있음
- 현재 세균의 검출은 배지검출법을 표준화된 방법으로 예비증균배양, 선택증균배양, 선택배지배양 후 생화학적인 동정 검사, 면역학적 검사 등을 거쳐 5-10일 정도가 소요되는 비효율적인 방법임
- 따라서, 최근 식품에서는 신속검출기술을 기반으로 한 검출법이 증가하고 있음
- 칩, 바이오센서, 마이크로 어레이, 나노입자, 라만센서 법 등 첨단기술을 활용한 식중독세균 검출기술이 개발되었으나, 다양하고 복잡한 매트릭스를 지니고 있는 식품에서의 실용 가능성이 문제가 되어 상용화된 제품은 전무함
- 현재까지 개발되어 실용화 및 상용화된 신속검출기법은 주로 항원-항체 반응을 사용한 면역기법과 DNA나 RNA정보를 이용한 유전자기법이 주된 방법이고 분석시간도 20분에서 2시간 이내여서 신속검사법의 범주에 든다고 할 수 있음
- 다만, 유전자 기법과 면역기법도 식품에서 검출한계 세균수가 높아( $10^3$ - $10^5$  CFU/g 이상) 낮은 세균수(100 CFU/g 이하)로 농산물에 오염되어 있는 식중독세균을 증균과정 없이 검출할 수는 없어 검출한계 이상으로 식중독세균 수를 신속하게 증균하는 기술이 전제되어야 진정한 의미의 신속검출법이라고 할 수 있음
- 따라서, 검출한계 이상으로 목표 식중독세균을 6시간 이내에 증균할 수 있는 증균배지 시스템이 개발될 경우 유전자기법과 면역기법은 시간과 노동력을 단축하면서 8시간 내에 유해 미생물을 높은 민감도를 가지고 검출할 수 있다는 장점이 있어 그 개발의 필요성이 증대하고 있음



표 1-9. 각 검출기법의 특징

(+++ : 매우우수, ++ : 우수, + : 보통, - : 미흡)

	선택배지법	PCR	면역기법	Microarray 혹은 칩
검출속도(Speed)	-	++	+++	+
검출감도 (Sensitivity)	+	++	+++	++
검출의 선택성 (Selectivity)	-	+++	+	+++
검출의 편이성 (Simplicity)	-	+	+++	+
검출비용 (Cost)	+++	++	+	-

[자료출처 : 식중독 미생물 검출기술 동향분석, 한국식품공업협회, 2007]

- 현재 대부분의 신속검출기법은 24-48시간 내로 증균하고, 이후 3시간 미만의 신속검출기법을 적용하여 균을 검출하는 시스템임

표 1-10. 국내·외적으로 상용화된 살모넬라 키트

⇒ 특징 : 키트를 이용한 검사전 20-48시간의 증균을 거치게 되어있음.

상품명	방법	민감도	검출시간		개발국 (회사)	AOAC
			증균시간 (hr)	키트검사		
API-20E	Biochemical test	98%	48	24h	프랑스 (bioMerieux)	998.24
VITEK (GN)	Biochemical test	98%	48	3h-6h	프랑스 (bioMerieux)	991.13
Biosign	Dipstick	5×10 <sup>5</sup> cell 3-8 CFU/25g	24	5분	미국 (PBM)	-
Reveal for Salmonella	Dipstick	1-5 CFU/25g (99%)	20	15분	미국 (Neogene)	960801
Gene-QUENCE	DNA hybridization	1-5 CFU/25g (98.9%)	40-48	90분	미국 (Neogene)	030201
Bioline Salmonella SELEVTA	ELISA	1 CFU/25g 10 <sup>5</sup> -10 <sup>6</sup> cell/mL (100%)	24	75분	덴마크 (Bioline)	AFNOR NordVal 인증
Bioline Salmonella OPTIMA	ELISA	1 CFU/25g 10 <sup>5</sup> -10 <sup>6</sup> cell/mL (100%)	40	75분	덴마크 (Bioline)	AFNOR AOAC 인증

- 그러나, 최근에는 8시간 이내 증균 후 검출하는 시스템이 도입되어, 실제 검출현장에서 많이 활용되고 있음
- 총 소요시간은 증균 8시간 정도, 신속검출 2-3시간 이내로, 총 12시간 내에 신속검출이 가능함
- 특히 항체가 코팅된 Magnetic bead를 활용한 FDLB Pathtrix의 경우, 5시간 이내로 증균하고, 3시간 이내로 검출하여, 총 8시간 이내로 검출이 가능하고, 검출한계는 25 g에서 2 CFU 이내임

표 1-11. 5가지 신속 병원균 검출법 특징

키트	원리	검출 시간		용량	검출 역치
		중균	검출		
Neogen Reveal	면역기법과 측면 흐름 크로마토그래피를 합한 lateral flow device	8시간	20분	10ml을 10분간 가열 + 상온에서 식힘	1CFU/25g
SDI RapidChek	이중항체 샌드위치 면역기법을 사용한 측면흐름 스트립	8시간	10분	1ml direct	1CFU/25g
Dupont BAX	Q-PCR-SYBR Green	8시간	3시간	5ul direct	<5CFU/65g
BioControl GDS	Probe-based Q-PCR	8시간	75분	1ml direct	1CFU/25g
FDLB Pathatrix	recirculation, follow-up plating이나 PCR을 통한 항체 코팅된 비드를 캡처	5시간	3시간 qPCR and/or 24시간 배양	Full vol (225ml)	<5CFU/65g

나. 농산물에서 주요 위해 식중독 미생물 검출의 어려움

- 높은 정상세균총 및 낮은 오염량으로 인한 검출의 어려움 : 농산물에서는 식중독 세균의 오염정도가 100 CFU/g 이하로 대단히 낮아 검출이 어렵고, 경쟁집락으로 작용하는 정상세균총의 수는  $10^7 \sim 10^8$  수준으로 높아 농산물에서의 식중독 세균 검출은 일반적인 배지검출법 및 신속검출법으로는 한계가 있음

병원성 미생물				
샘플	병원성 미생물	검출	참고문헌	
상추	<i>L.monocytogenes</i> , <i>Cronobacter spp</i> , <i>STEC</i> , <i>EPEC</i>	검출(<10 <sup>2</sup> )	D. ALTHAUS et al. 2012	
과일	<i>Cronobacter spp</i>	검출(<10 <sup>2</sup> )		
무순	<i>Cronobacter spp</i>	검출(<10 <sup>2</sup> )		
상추	<i>Escherichia coli</i>	검출(10 <sup>1</sup> )	M. Oliveira. 2010	
숙주나물	<i>Salmonella spp</i>	검출(<10 <sup>2</sup> )	Rohekar et al., 2008	
알과과 새싹	<i>Salmonella</i>	검출(정성)	Compton et al., 2008	
시금치	<i>E. coli O157:H7</i>	검출(정성)	Grant et al., 2006	
바질	<i>Salmonella</i>	검출(10 <sup>1</sup> )	Pezzoli et al., 2007	
바질	<i>Salmonella</i>	검출(정성)	Elviss et al., 2009	
상추	<i>E. coli O157:H7</i>	검출(정성)	Warriner et al, 2010	
꼬마당근	<i>Shigella sonnei</i>	검출(정성)	Lewis et al., 2007	
알과과 새싹	<i>Salmonella</i>	검출(정성)	Emberland et al., 2007	
시금치	<i>Salmonella</i>	검출(<10 <sup>2</sup> )	Denny et al., 2007	
혼합과일	<i>Campylobacter spp</i>	검출(정성)	L.Verhoeff-Bakkenesa, et al., 2011	
야채샐러드	<i>Campylobacter spp</i>	검출(정성)		
토마토	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Slmonella spp</i>	검출(정성)	Poorna Viswanathan et al., 2001	
과일 샐러드	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> ,	검출(정성)		

병원성 미생물			
샘플	병원성 미생물	검출	참고문헌
	<i>Salmonella spp</i>		
칸탈루프	<i>Salmonella</i>	검출( $10^1$ )	Munnoch et al., 2008
정상세균총(경쟁집락) 수준			
샘플	CFU/g	참고문헌	
브로콜리싹	$10^6$	Hyeon et al., 2009	
상추	$10^6 \sim 10^8$	D. ALTHAUS et al., 2012	
과일	$10^3 \sim 10^5$		
무순	$10^7 \sim 10^8$		
무순	$10^7$	Chon et al., 2010	
야채 샐러드	$10^6$	Chon et al., 2011	
상추	$>10^8$	M. Oliveira. 2010	
양배추	$10^6 \sim 10^8$	Poorna Viswanathan et al., 2001	
토마토	$10^8$		
과일 샐러드	$10^8$		
샐러드	$10^6$	Lee et al., 2010	
무순	$10^7$	Chon et al., 2011	
샐러드	$10^6$		
상추샐러드	$10^3$	Magdevis. 2011	

- **식중독 세균의 바이오필름 생성 및 기공흡착으로 인한 탈리-농축의 어려움:** 농산물, 특히 엽채류 등에서 병원성 세균은 식물의 상처나 기공에 흡착되는 경우가 많아 탈리-농축이 어려움
- 특히 오염된 식중독균은 식물의 표면 및 기공에서 바이오필름을 형성하는 경우가 많아 웬만한 세척에도 균을 제거하기 힘든 경우가 많음

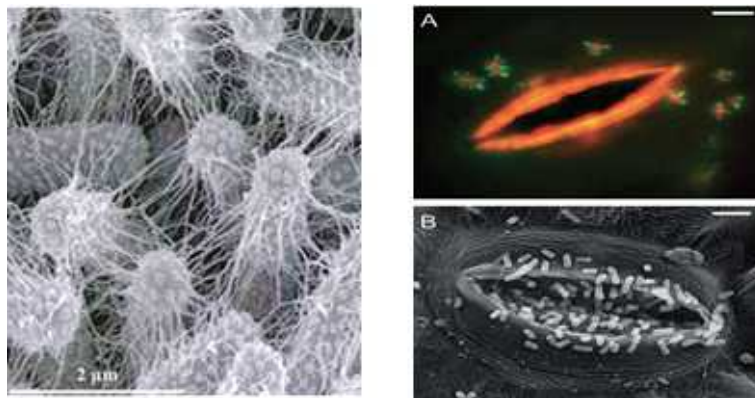

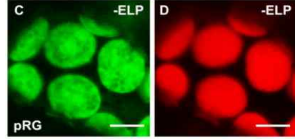
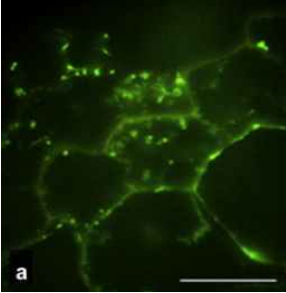
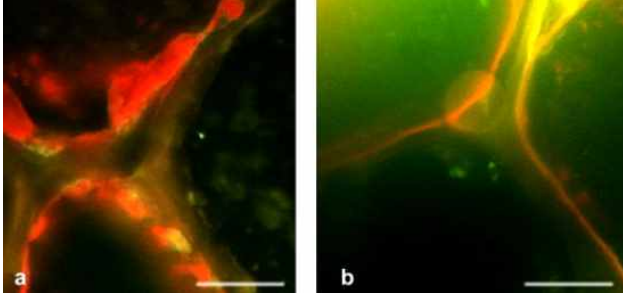
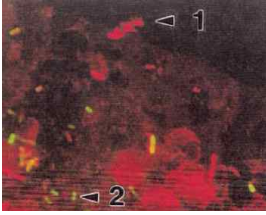
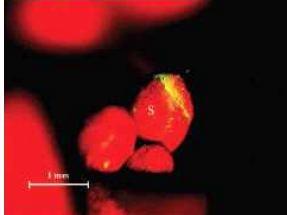


그림 1-5. 식중독 세균의 채소표면 바이오필름의 형성(좌) 및 기공 속에 흡착되어 있는 병원성 대장균 사진(우)

- **형광을 이용한 칩 기반기술 적용의 어려움 :** 농산물에는 형광물질이 기본적으로 많이 존재하고 있어 신속검출기법에서 많이 사용되는 형광을 이용한 칩 기반기술을 적용하기에는 background 작용 때문에 어려운 점이 많음

균 검출에 있어서 부정적인 영향을 미칠 수 있는 야채 자체에서의 autofluorescence	Francesca et al., 2005	Andrew et al., 2009
--	------------------------	---------------------

	
autofluorescence에 의한 세균분별 저하	
Stephane <i>et al.</i> , 2010	
	
Seo <i>et al.</i> , 1999	Michael <i>et al.</i> , 2003
	

- **검출능력이 현저하게 감소함:** 현행 사용되는 대부분의 배지검출법 및 신속검출법은 신선야채류, 채소류와 같이 같이 정상세균총이 높은 수준으로 존재하는 식품의 경우 배지검출법은 물론 PCR 방법과 같은 신속검출법의 검출능력이 현저하게 감소함
- 농산물은 매트릭스가 다양하고, 정상세균총의 수준이 높아(g 당 6-7 log CFU 수준) 일반 배지검출법은 물론이고 신속기법으로도 검출이 잘 되지 않는 경우가 많음
- 특히 농산물에 있는 정상세균총의 경우, 증균과정에서 목적하는 균을 억제하는 inhibitor로 작용하는 경우가 많아, 원하는 균의 선택적인 증균배양이 어려움
- 이러한 경우 목적균이 검출한계 이하로 자라게 되어, 검출감도가 좋은 신속검출기법을 사용하더라도 정확하고 빠르게 검출할 수 없음
- 또한 농산물 자체가 가지고 있는 형광 background가 많아 형광기반의 센서기술을 적용하기에도 어려움이 많음
- 특히 농산물의 경우 다른 식품과 달리 검출시간이 오래 걸리면 원료품의 신선도가 하락할 우려가 있으므로 신속 정확한 농산물 내 검출법의 개발 및 개선이 절실한 상황임

- 실제 다양한 농산물에서 개발된 키트를 사용하여 검출하였을 때, 면역학적 키트는 대단히 낮은 검출능력을 보였으며, qPCR의 경우에도 특정 농산물에서는 검출률이 낮았음
- 위에서 언급한 8시간 이내 혹은 12시간 이내의 검출법을 야채에서 적용하였을 때, 대부분 좋지 않은 검출률을 보였으며, 검출률이 좋은 경우에도 특정 농산물에서는(Lollo Rosa 등) 검출률이 떨어지는 것이 연구를 통해 확인되었음

표 1-12. 농산물에서 한계를 가지는 12시간 이내, 혹은 8시간 이내 신속검출법

<믹스 레터스와 녹색 채소에서의 E. coli O157:H7 검출 테스트 결과 개요>

종류	Test kits						FDLB protocol			
	Rapid Chek 8	Rapid Chek 12	Reveal 1	GDS E	GDS S	BAX	배지 (CHROM)	qRT-PCR		
								stx1	stx2	uidA
로멘상추	0/4	4/4	4/4	4/4	4/4	ND	3/4	4/4	4/4	4/4
청상추	0/4	2/4	4/4	4/4	4/4	2/4	4/4	4/4	4/4	4/4
적상추	0/4	4/4	1/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
시금치	0/4	0/4	4/4	3/4	3/4	3/4	4/4	4/4	2/4	3/4
롤로로사	0/4	2/4	0/4	4/4	4/4	4/4	2/4	2/4	1/4	1/4
양상추	3/4	3/4	4/4	4/4	4/4	3/4	4/4	4/4	2/4	4/4
적상추	4/4	ND	3/4	4/4	4/4	4/4	2/4	4/4	4/4	4/4
청상추	4/4	ND	4/4	4/4	4/4	4/4	2/4	4/4	4/4	4/4
치커리	4/4	ND	1/4	3/4	4/4	4/4	4/4	4/4	3/4	4/4

<시금치와 롤로로사 반복시험에서 BAX 결과 불일치>

Sample	Tube 1	Tube 2	Tube 3
시금치 1	양성	양성	양성
시금치 2	음성	양성	음성
시금치 3	음성	음성	양성
시금치 4	음성	음성	음성
롤로로사 1	양성	양성	양성
롤로로사 2	음성	양성	양성
롤로로사 3	양성	양성	양성
롤로로사 4	양성	양성	양성

- 식품검사 시장의 기하급수적인 성장과 생명공학 기술의 발달로 첨단기술을 탑재한 식품 유해물질 진단 키트가 지속적으로 개발되고 있음. 야채는 매트릭스가 복잡하고 세균종이 많아 균의 검출이 어려움에도 농산물을 대상으로 한 키트는 개발되지 않은 상태임
- 신선도가 생명인 농산물에서의 검사를 위해 8시간 이내로 증균 및 신속검출이 가능한 키트를 개발해야 함
- 상용화된 검사 키트를 공정한 검증을 거쳐 사려 깊게 사용한다면 비용, 시간, 노동력 절

감이라는 일석삼조의 경제적 효과를 얻을 수 있을 것임

- 특히 식중독 세균 검사키트는 대부분 수입에 의존하고 있어 국산화가 시급함
- 해당 연구를 통해 국산 식품 유해물질 진단 산업을 활성화 시키는 발판을 마련할 수 있을 것이며 BT 산업 발전은 수출 분야에서도 큰 몫을 차지하게 될 것임
- 면역학적 기법과 PCR의 검출한계를 개선하는 것은 한계가 있으므로, 8시간 이내로 농산물 내의 식중독 균 검출을 위해서는 새로운 증균배지의 개발, 새로운 전처리 기법의 개발이 함께 이루어져야 함

#### 다. 농산물에서 신속검출 키트 개발 단계

- 기존의 분석방법으로 그 결과를 얻기까지 원료품의 신선도가 하락할 우려가 있으며 완제품의 유효기간을 낭비할 수밖에 없는 상황이어서 신속 정확한 식품 유해물질 검사키트 사용의 활성화가 시급함
- 현재 Q-PCR 키트를 비롯한 다양한 분자생물학적, 면역학적 키트가 개발되었으나 농산물에 최적화된 검출키트는 개발이 되지 않았음
- 농산물의 특성이 고려된 증균, 전처리, 검출 일원화(one-step) 키트가 개발되면 일선 현장에서 검출자의 편의에 맞게 용이하게 사용할 수 있을 뿐 아니라, 농산물에서 8-12시간 이내에 신속하게 균을 검출하는 효과를 누릴 수 있을 것으로 판단됨
- 특히 이러한 키트의 개발을 위해서는 증균배지, 전처리 기술의 개발 및 개선 외에도 PCR 및 면역키트 등 분자유전학적, 면역학적 검출기법의 개선과 이를 활용한 검출키트의 개발이 동시에 이루어져야 함

#### (1) 농산물에서 오염도 조사 및 단계별 오염을 분석의 필요성

- 농산물은 유통기간이 짧고 냉장유통 되어야 신선함이 유지되어 보관, 수송 관리가 중요함
- 특히 종류가 매우 다양하고, 농산물마다 가지고 있는 정상세균총의 종류와 성상이 제각각이어서 특성을 분석하여 이를 바탕으로 다소비 농산물을 중심으로 한 위생관리 및 식중독 균 오염 저감화를 위한 제어방안이 필요함

#### (2) 증균배지 개발의 필요성

- 식중독 세균의 검출에 있어서 PCR이나 ELISA, Biosensor 등을 이용한 여러 가지 신속검출기법이 증가하고 있으나 이러한 신속검출기법을 적용하기 위해서는 손상된 세포를 선택적으로 적절히 회복시킬 수 있는 증균배지의 개발이 필수적임

- 식중독 세균을 어느 샘플(인체분변, 동물분변, 식품, 물, 환경, 토양)에서 검출하느냐에 따라 그 민감도와 특이도에 있어서 검출법마다 현저한 차이를 보임. 특히 균수가 많고 손상된 세균(injured cell)이 적은 분변에서는 식중독균의 검출이 쉬우나 성상(matrix)이 다양하고 산도, 온도, 수분활성도등의 다양한 요소가 개입되는 농산물에서는 정상세균 총이 높은 수준으로 증식해 원하는 식중독균의 선택적 증균이 쉽지 않음

**표 1-13. 대장균 선택배지 비교: 증균시간에 따른 TSA와 ECC에 도달한 상추의 경쟁균의 수**

⇒ 단점 : 상추에서의 background flora(경쟁세균총)의 성장 즉, 목적하는 균 외에 경쟁 집락이 과도하게 자라, 원하는 균의 선택적 증균이 어려움

시간 (h)	mBPW		mEHEC		Neogen		SDI	
	TSA	ECC	TSA	ECC	TSA	ECC	TSA	ECC
0	3.6±0.3	<0.6±0	5.0±0.4	<0.6±0	4.7±0.2	<0.6±0	4.7±0.2	<0.6±0
6	6.4±0.2	3.4±0.4						
8			7.9±0.2	C:5.8±0.4				
9				E:6.1±0.5	6.0±0.2	C:5.5±0.3	7.3±0.2	C: 5.5±0.3

- 따라서, 식중독균은 손상된 세균을 회복시키는 증균과정을 필수적으로 거쳐야하며 그렇지 않을 경우, 손상된 세균은 검출되지 않을 확률이 높음
- 특히 농산물에서는 정상세균총을 효과적으로 억제하고 스트레스 상태에 있는 세균을 선택적으로 증식시킬 수 있는 선택성과 우수한 회복력을 지닌 증균배지의 개발이 절대적임
- 세계적으로 신속하고 높은 민감도로 세균을 증균할 수 있는 배지의 개발에 대한 연구가 시행되고 있으며 이렇게 개발된 배지는 ISO나 FDA/BAM 등 다양한 공인검출법에서 높은 민감도와 선택성을 승인받아 사용되고 있는 경우가 많음
- 현재 대부분 면역학적, 혹은 PCR 키트 등에는 증균배지가 함께 포함된 one-step kit가 많은데, 이러한 대부분의 키트는 24-48시간을 증균시간으로 함
- 따라서, 선택성과 빠른 균의 회복력을 갖춘 증균배지의 개발이 8시간 이내 신속검출 기법 개발의 핵심임
- 최근에는 다양한 식중독 세균을 한번에 검출가능한 시스템(multipathogen platforms) 구축을 위해 Universal preenrichment broth(동시증균배지)에 대한 관심도 높아졌음
- Bailey and Cox는 최초로 Universal preenrichment broth를 개발하여 두 가지 이상의 균을 하나의 증균배지에서 증균할 수 있도록 하였음. 이러한 배지들은 다양하게 개발되고 상업화되어 현재 Difco 등에서는 두 가지의 균을 동시에 선택증균 가능한 Universal preenrichment broth

등을 시판하고 있음. 최근에는 *Salmonella* Enterica, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7을 한꺼번에 선택증균 가능한 SEL broth도 개발되었음

- Universal preenrichment broth의 경우, 증균후 바로 multiplex PCR, protein/antibody microarray biosensors, array-based immunosorbent assays, DNA microarray method 등의 최신 검출기법을 통해 한 번에 여러 가지 식중독균의 검출이 가능함
- 이러한 검출시스템은 빠르고 정확한 식중독의 역학조사를 가능하게 하며, 최소한의 노동력과 시간으로 식품 내 식중독균을 검출할 수 있게 함
- 샘플마다 다르겠지만 이러한 배지는 mL당 10 cfu 수준의 균도 검출 가능한 수준으로 적절하게 증균 가능한 것으로 알려져 있음

(3) 최적화된 전처리 방법 개발의 필요성

- 신속검출기법을 적용하는 경우에도, 식중독 위해인자는 농산물에서 매우 낮은 양으로 오염되어 있고 스트레스로 인해 증식하지 않는 경우도 많으며 시료 내에 비균질하게 오염되어 있어 신속한 검출을 위해서는 탈리, 정제, 농축 등의 전처리 과정이 필요함
- 최적의 샘플 처리과정은, 1) 샘플에서 얻어낼 수 있는 위해인자의 양이 최대여야 하며, 2) 세포독성이 있는 물질이나 PCR inhibitor가 제거되어야 함
- 특히 농산물에서의 신속검출 전 시료 전처리는 증균 후 적절한 정제/농축과정 없이는 불가능

(가). 농축 및 정제 기법의 개발

- 신속검출법 적용을 위해서는 검출법 이전까지 손실(loss)을 최소화해야 하며 위해인자의 농축 및 정제를 수행해야 하며 그 방법은 다음과 같음

표 1-14. 농축(concentration) / 정제 (purification) 방법 및 특징

방법	종류	방법 및 장단점	
antibody capture assay	immunomagnetic bead	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 불순물이나 PCR inhibitor를 제거하기 위한 샘플준비</li> <li>• 매우 특이적</li> </ul>	
Centrifugation	differential centrifugation	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 빠르고 저렴, 간단하고 크기가 큰 샘플에 적당</li> <li>• 바이러스 등은 matrix complex와 흡착 및 침전생길 수 있음</li> </ul>	
	ultracentrifugation	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 바이러스 검출시 유용</li> <li>• 비용이 비싸고 시간이 오래 걸림</li> </ul>	
Flitration	centrifugal ultrafiltration	<ul style="list-style-type: none"> <li>• size-exclusion filtration</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• filter asorption-elution</li> </ul>



방법	종류	방법 및 장단점
	electro-positive/ negative filtration	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 빠르고 간단,</li> <li>• 비 특이적, 필터가 빨리 막히고 필터에서 세균이 잘 떨어지지 않음, 크기가 큰 샘플에 부적당</li> </ul>
polymer two-phase separation	chloroform extraction	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 빠르고 저렴하며 간단</li> <li>• 비교적 비특이적, 분리가 불완전,</li> <li>• 지방에 의해서 분리 방해,</li> <li>• 바이러스 생존에 영향을 미칠 가능성 존재</li> </ul>
precipitation	acid precipitation	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 용액의 pH를 낮춤으로써 beef extract에 바이러스를 침전</li> </ul>
	organic flocculation	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 원심 분리 후에 얻어진 침전물을 sodium phosphate buffer (pH 9.5)에 풀어줌</li> </ul>
	polyethylene glycol (PEG) precipitation	<ul style="list-style-type: none"> <li>• pH 조정 불필요</li> <li>• PEG-6000이 PEG-8000보다 우수함</li> </ul>

□ 한편 현재 식중독 검출 기술에서 가장 널리 사용되는 농축 및 정제 기술은 immunomagnetic bead separation (IMS)를 사용한 기술로서 실제 많은 공인검출법에서 사용하고 있을 정도로 검증된 방법임

□ Immunomagnetic bead(IMB, 면역자기구슬)을 부착인자로 활용하는데 IMB에 항체를 부착시키고 자기력을 이용하여 IMB만을 선택적으로 분리하는 균의 분리-농축 방법임

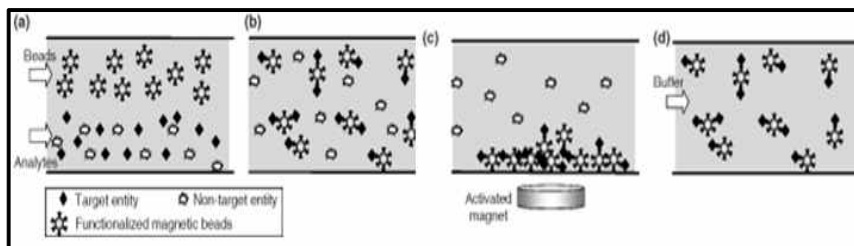


그림 1-6. IMS를 활용한 식품 내 위해인자 정제/농축 방법

□ IMS 방법을 거치는 경우 균이 농축되어 원하는 균을 효율적으로 분리할 수 있으며, 실제 미국 FDA BAM이나 USDA FSIS 같은 선진국의 공인검출법에는 신속검출 이전에 등을 활용하여 정제 및 농축과정을 거치고 있음

표 1-16. IMS를 활용한 전처리 - 농산물에서의 검출민감도 상승

Trials	Number of positive samples/ Number of tested samples (% positive)								P-value	
	1 22		2 21		3 18		Total 20 <sup>a</sup>			
Inoculum (CFU/500 g)	No IMS	IMS	No IMS	IMS	No IMS	IMS	No IMS	IMS	No IMS	IMS
NAL-SMAC	13/20 (65)	14/20 (70)	14/20 (70)	17/20 (85)	3/20 (15)	7/20 (35)	30/60 (50)	38/60 (64)		
CT-SMAC	12/20 (60)	14/20 (70)	15/20 (75)	16/20 (80)	4/20 (20)	7/20 (35)	31/60 (52)	37/60 (62)	1.0000 <sup>b</sup>	1.0000 <sup>b</sup>
SMAC	10/20 (50)	13/20 (65)	12/20 (60)	14/20 (70)	2/20 (10)	4/20 (20)	24/60 (40)	31/60 (52)	0.3590 <sup>c</sup>	0.2678 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Average of inoculum levels for three trials.

<sup>b</sup>  $p < 0.05$  indicates a statistically significant difference between NAL-SMAC and CT-SMAC with and without IMS.

<sup>c</sup>  $p < 0.05$  indicates a statistically significant difference between NAL-SMAC and SMAC with and without IMS.

- IMS 방법은 항원-항체 반응을 이용하기 때문에 민감도와 특이도가 다른 방법에 비해 대단히 높아 식품의 정상 및 정상세균총 수준 등에 관계없이 높은 효율을 보이고 있음
- 그러나 IMS 방법은 항원-항체 반응을 사용하는데 있어서, 항체의 수입은 절차가 까다롭고, 어떤 항체를 쓰느냐에 따라 민감도가 제한되는 경우가 많음
- 또한 *Salmonella*, *E. coli* O157, 리스테리아 등 주요 식중독균 위주로 제한적으로 개발되었고 생산비용 측면에 있어서 개선의 필요성이 있음

(나). 핵산추출기술의 개발

- 핵산 추출법은 주요 전처리 과정중 하나로서 다양한 원리를 이용하여 적용되나 최근에는 키트를 사용하여 검출하는 경우가 많음
- 핵산추출 시, 자동화된 방법을 사용함으로써 시간과 노동력을 크게 줄일 수 있으며 관련된 방법이 지속적으로 개발되고 있음
- 핵산분석방법의 장점은 급성기 이후에도 100 particle/ml보다 작은 농도의 환자의 분변에서뿐 아니라 4℃에서 여러 달, -70℃에서 여러 해 봉안 보관된 샘플에서도 검출이 가능하다는 것임
- 최근에는 다양한 자동화 기계를 사용한 핵산추출법이 적용되어 짧은 시간에 빠르게 식품 내 병원성 인자의 핵산을 추출하고 있음

(4) Multiplex real-time PCR 기반 키트의 개발

- PCR은 내열성 DNA 중합효소를 이용하여 시험관내에서 DNA 혹은 RNA(cDNA)를 대량으로 증폭시키는 기술로 이론적으로는 한 가닥의 template DNA를 검출할 수 있을 정도로 감도가 높은 방법임
- 특히 병원균에 특이적으로 존재하는 DNA 정보를 사용하여 목표하는 세균을 검출할 수 있어서 식품위생 분야에 널리 사용됨
- 제 3세대 PCR인 Real-time PCR (실시간 PCR)은 1990년대 후반에 소개되어 2000년대 들어서 기하급수적으로 그 사용빈도가 높아짐
- 이는 목표하는 유전자에 특이적으로 결합하는 primers 이외에 형광물질을 부착한 probe를 추가로 사용하여 PCR 증폭과정을 실시간으로 모니터링 하는 방법

□ Real-time PCR의 장점

- PCR 증폭과정을 실시간으로 모니터링 가능

- 추가적인 전기영동 확인 과정이 필요 없음
  - 신속성 : 1시간 이내 검사 완료
  - 특이성 : Real-time PCR의 경우 Primers이외에 Probe의 특이성 추가
  - 민감성 : 이론적으로 1 CFU
  - 효율성 : PCR기기와 시약의 자동화와 키트화로 사용이 편리하고 많은 샘플가능
  - 정량시험 : Ct 값과 균수(혹은 DNA 양)과의 관계를 이용하여 정량시험 - 가장 큰 장점
  - 복수균 검출능 (multiplex PCR) : Probe의 형광물질 색을 복수로 사용 다수의 병원균 동시검출
- 특히 병원균에 특이적으로 존재하는 DNA 정보를 사용하여 목표하는 세균을 검출할 수 있어서 식품위생 분야에 널리 사용됨
  - PCR 기법 등 유전자 정보를 이용하여 상품화된 식중독균 진단키트 중 많은 제품들이 미국과 캐나다 등의 선진국에서 공식 시험법으로 채택되어 있음
  - 한편 기존에는 multiplex real-time PCR이 가장 선호되는 방법으로 사용되었으나, 96 well- 혹은 384 well- 최근에는 1536 well- multiplex real-time PCR까지 나오면서 다양한 well을 활용한 real-time 기반 multiplex PCR이 각광받게 되었음
  - 특히 multiplex real-time PCR의 경우, 다른 형광스펙트럼을 잡는 real-time 기반에서는 triplex 이상 어려운 점이 있고, 하나의 well에 희석된 농도의 master mix 등이 들어가 반응이 약해지는 단점이 있음
  - 따라서, 10종의 병원성 세균, 혹은 다종의 독소는 각각 다른 well(혹은 strip)을 사용하는 multiplex real-time 기반 PCR을 활용한다면 하나의 plate에서 동시적인 검출이 가능함
  - 현재 multiplex real-time PCR은 인체 유전자 발현 규명 및 암진단 등에서 사용되고 있으나 10여종의 병원성 세균과 toxin을 대상으로 개발된 상품이 없음

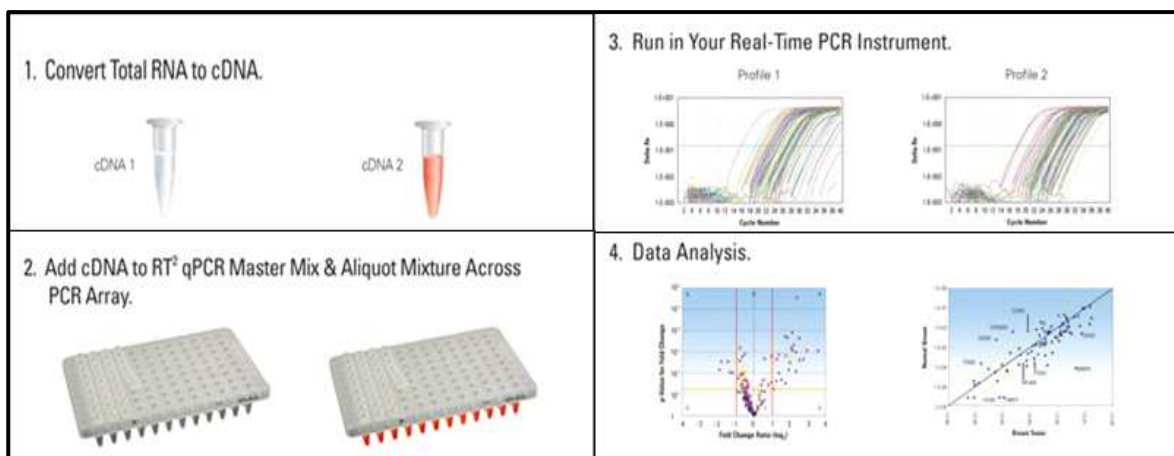


그림 1-7. Multiplex real-time PCR

### 2-1-3. 개발된 신속검출기법의 검증 필요성 - AOAC 또는 Field test

#### <주요 내용 요약>


1. 표준 미생물 검출 시험법은 과학적인 평가나 검증 과정을 거쳐야만 함.
2. 현재 국내에는 국제적 인증제도(AOAC 등)를 승인받은 미생물 검출법은 전무한 실정임.
3. 개발된 신속검출법은 현장 적용형 field test를 통하여 평가 및 검증과정을 거쳐야 함.

- 미생물 시험법은 국내 유통 식품 종류별, 사용된 배지, 시약, 확인 방법 등에 대해 과학적인 평가(evaluation)나 검증(validation) 과정을 거쳐서 표준방법의 대체 방법으로 사용되어야함
- 더욱이 식품 수출입 양이 증가함에 따라 검사량도 증가하고 있는데 검사의 국제적 신뢰도와 공정성 확보를 위해서 사용되는 검사방법에 대해서 공인 평가(evaluation), 검증(validation) 과정을 거쳐야 함
- 검사업무를 담당하고 있는 미국 FDA나 USDA 그리고 캐나다의 Health Canada는 첨단 기술을 사용한 진단키트나 유전자 기법의 사용을 권장하고 있음
- 프랑스, 캐나다, 미국 등에서는 식품검사에 상용되는 키트에 대한 허가나 인 증은 의료용 진단키트와는 달리 허가기관의 허가를 승인받는 시스템이 아님
- 다만 사용하는 식품검사 방법은 공신력을 갖기 위하여 반드시 소정의 검증을 거쳐 효율성이 증명된 방법만을 공식법으로 채택·사용함
- 자체 개발을 위해서는 많은 연구 인력과 다년간의 연구기간이 필요하고 진단키트 개발회사들이 우수한 제품들을 제조하기 때문에 미국이나 캐나다의 식품안전 행정기관에서는 상용화된 제품들을 Validation하여 공식법으로 채택하는 경우가 대부분임
- 이 중 신속 검사법의 검증을 담당하는 기관은 AFNOR, Rapid AOAC Official Methods, AOAC Performance Tested Methods, Certification Reports, MicroVal, NordVal 등임
- 유럽에서도 Q-PCR 방법과 같은 새로운 식중독 원인균 검출 방법이 활발히 개발되어 왔으며 표준화 방법으로 채택되기 위해서는 CEN(Comite Europeen de Normalisation)의 인 증을 받아야 함

- 이와 같이 더욱 적합한 샘플링법, 새로운 선택배지, 신속검출법 등이 현재도 꾸준히 개발되고 있으며 미국 FDA나 USDA등에서는 검증을 통해 적극적으로 공인 검사법으로 이용하고 있음
- AOAC, CEN, AFNOR, DIN 등과 같은 국제공인 검증기관에서 심도 있는 평가 과정을 거쳐서 각 단계별 검증 증서를 받아 제품에 명시함
- 신속 검출법 및 시험법이 개발될 경우 AOAC validation법 등 세계적인 공인시험법에 준하여 검증을 실시하여야 함
- 본 연구팀에서는 2013년도에 수행된 과제를 통해 AOAC 가이드라인에 기초한 농산물에서의 식중독 세균 검출 시험법검증 가이드라인을 확립하였음
- 또한 이를 기반으로 각종 과제와 연구논문에서 AOAC 가이드라인을 이용한 validation 시험을 수행하여 이 분야에 국내 최고의 노하우를 가지고 있음

### <식중독균 신속검사키트 검증을 위한 AOAC 가이드라인>

<p><b>AOAC INTERNATIONAL METHODS COMMITTEE GUIDELINES FOR VALIDATION OF QUALITATIVE AND QUANTITATIVE FOOD MICROBIOLOGICAL OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS</b></p> <p><i>Feldbine, Philip, BioControl Systems, Inc., 12822 SE 32nd Street, Bellevue, WA 98005 USA</i>  <i>Aberna, Carlos, U.S. Food and Drug Administration, Seafood Products Research Center, 22201 21st Drive S.E., Bothell, WA 98021-4421 USA</i>  <i>Andrews, Wallace H., U.S. Food and Drug Administration, Division of Microbiological Studies, 200 C Street S.W., Washington, DC 20204 USA</i></p> <p><b>5.1.1.1 Reference procedure</b></p> <p>Alternative methods are always compared to a reference culture method. Reference culture methods (outlined in AOAC/ FDA/ BACB or USDA for meat and poultry products) are examples of reference methods. (see item 3.2.)</p> <p><b>5.1.1.6 Number of test samples</b></p> <p>The number of test portions per inoculum level is 20. To use the McNemar statistic, test samples must be paired. If, for example, the test and reference methods each require a separate 25 g test portion because the primary enrichment media are different, then 20 test samples of at least 50 g each should be drawn from the inoculated or control portions. From each 50 g test sample, paired 25 g test portions are prepared. It is permissible to share initial test portions when applicable such that pairing is through the use of the same homogenate or enrichment broth. This is the situation when both the alternative method and the reference method share a common pre-enrichment medium.</p>	<table border="0" style="width: 100%;"> <tr><td>1. Scope</td><td style="text-align: right;">5</td></tr> <tr><td>2. Applicability</td><td style="text-align: right;">5</td></tr> <tr><td>3. Terms and definition</td><td style="text-align: right;">6</td></tr> <tr><td>3.1 Alternative method</td><td style="text-align: right;">6</td></tr> <tr><td>3.2 Reference method</td><td style="text-align: right;">6</td></tr> <tr><td>3.3 Validation of an alternative method</td><td style="text-align: right;">6</td></tr> <tr><td>3.4 Analyte</td><td style="text-align: right;">6</td></tr> <tr><td>3.5 Qualitative method</td><td style="text-align: right;">6</td></tr> <tr><td>3.6 Quantitative method</td><td style="text-align: right;">6</td></tr> <tr><td>3.7 Methods comparison or prelaboratory study</td><td style="text-align: right;">6</td></tr> <tr><td>3.8 Interlaboratory collaborative study</td><td style="text-align: right;">6</td></tr> <tr><td>3.9 Fractional recovery</td><td style="text-align: right;">6</td></tr> <tr><td>3.10 Baggage testing (BT)</td><td style="text-align: right;">6</td></tr> <tr><td>4. Validation protocol</td><td style="text-align: right;">7</td></tr> <tr><td>4.1 Validation option</td><td style="text-align: right;">7</td></tr> <tr><td>4.2 The OMA method</td><td style="text-align: right;">7</td></tr> <tr><td>4.3 Participants of the official methods SSI Process</td><td style="text-align: right;">7</td></tr> <tr><td>4.3.1 The official methods team (OMT)</td><td style="text-align: right;">7</td></tr> <tr><td>4.3.2 Methods committee (MC)</td><td style="text-align: right;">7</td></tr> <tr><td>4.3.3 Methods committee subcommittee (MCS)</td><td style="text-align: right;">7</td></tr> <tr><td>4.3.4 Methods Committee safety advisor (MCSA)</td><td style="text-align: right;">7</td></tr> <tr><td>4.3.5 General referee (GR)</td><td style="text-align: right;">8</td></tr> <tr><td>4.3.6 Study Director (SD) or organizing laboratory responsibilities</td><td style="text-align: right;">8</td></tr> <tr><td>4.3.7 Collaborators</td><td style="text-align: right;">9</td></tr> </table>	1. Scope	5	2. Applicability	5	3. Terms and definition	6	3.1 Alternative method	6	3.2 Reference method	6	3.3 Validation of an alternative method	6	3.4 Analyte	6	3.5 Qualitative method	6	3.6 Quantitative method	6	3.7 Methods comparison or prelaboratory study	6	3.8 Interlaboratory collaborative study	6	3.9 Fractional recovery	6	3.10 Baggage testing (BT)	6	4. Validation protocol	7	4.1 Validation option	7	4.2 The OMA method	7	4.3 Participants of the official methods SSI Process	7	4.3.1 The official methods team (OMT)	7	4.3.2 Methods committee (MC)	7	4.3.3 Methods committee subcommittee (MCS)	7	4.3.4 Methods Committee safety advisor (MCSA)	7	4.3.5 General referee (GR)	8	4.3.6 Study Director (SD) or organizing laboratory responsibilities	8	4.3.7 Collaborators	9
1. Scope	5																																																
2. Applicability	5																																																
3. Terms and definition	6																																																
3.1 Alternative method	6																																																
3.2 Reference method	6																																																
3.3 Validation of an alternative method	6																																																
3.4 Analyte	6																																																
3.5 Qualitative method	6																																																
3.6 Quantitative method	6																																																
3.7 Methods comparison or prelaboratory study	6																																																
3.8 Interlaboratory collaborative study	6																																																
3.9 Fractional recovery	6																																																
3.10 Baggage testing (BT)	6																																																
4. Validation protocol	7																																																
4.1 Validation option	7																																																
4.2 The OMA method	7																																																
4.3 Participants of the official methods SSI Process	7																																																
4.3.1 The official methods team (OMT)	7																																																
4.3.2 Methods committee (MC)	7																																																
4.3.3 Methods committee subcommittee (MCS)	7																																																
4.3.4 Methods Committee safety advisor (MCSA)	7																																																
4.3.5 General referee (GR)	8																																																
4.3.6 Study Director (SD) or organizing laboratory responsibilities	8																																																
4.3.7 Collaborators	9																																																



**PERFORMANCE TESTED**  
**AOAC**  
**RESEARCH INSTITUTE**  
**LICENSE NUMBER 071204**

- ① 모든 식중독균 검사에 사용되는 분석법은 식품공전에 기재된 방법을 사용함을 원칙으로 한다. 분석법이 식품공전에 등재되기 전에 소정의 검증 과정을 거쳐야 한다.
- ② 검사키트를 사용한 분석은 검사키트가 식품공전에 기재된 기준방법과 통계학적으로 동일하거나 우수한 검출능력이 있음을 검증해야만 공신력이 있다.
- ③ 검사키트 사용을 위해 공인검증은 의무사항은 아니지만 능력검증을 받지 않았거나 식품의약품안전청에서 정한 가이드라인에서 인정하지 않는 검증을 거친 방법을 사용하면 문제 발생 시 공신력은 상실한다.
- ④ AOAC 등 국제적으로 공신력이 있는 기관에서 검증을 받은 검사키트는 소정의 심의 위원회의 심의를 거쳐 적용되는 식품군 혹은 식품종류에 따라 검증절차와 검사법의 적용범위 등에 대해 검증 재확인을 받아야 한다.
- ⑤ AOAC 등 국제적으로 공신력이 있는 기관에서 검증을 받은 검사키트 일지라도 검증 과정에서 사용된 식품군 혹은 식품종류가 국내에서 응용하려는 식품군 혹은 식품종류와 상이할 경우 식약청이 인정하는 검증기관에서 시험을 거쳐 검증을 받아야 한다.

- ⑥ 검증의 유효기간은 2년을 원칙으로 하며 매 2년 갱신함을 원칙으로 한다.
- ⑦ 국산 검사키트는 국제 공인기관의 인증 없이 식약청이 정한 소정의 검증 절차를 거쳐 인증을 받을 경우 국내에서 상용화될 수 있고 공신력도 인정받는다.
- ⑧ 국내 인증의 종류는 “식약청 능력시험인증”과 “식약청 공식인증법” 두 종류를 둔다.
- ⑨ 식약청 공식인증법은 AOAC와 같은 국제공인인증기관에서 정한 검증방법 가이드라인과 준하는 검증과정을 거쳐서 인증 신청을 할 수 있다.
- ⑩ 식약청 능력시험인증은 식약청공신인증법의 축소된 인증절차로써 공신력 있는 단일 실험실에서 실시한다.
- ⑪ 본 가이드라인의 시행은 제3자의 독립적인 비영리 검증기관의 설립을 전제로 한다.
- ⑫ 검증시험을 실제로 수행하는 실험실은 소정의 자격요건을 거친 실험실이어야 한다.

**※ 검증방법(validation protocol)**

검증방법은 두 종류의 인증시스템으로 한다. AOAC Official Methods(AOAC OMA), AOAC

Performance Tested Methods Program(AOAC PTM)을 벤치마킹하여 실험의 규모와 검증의

방법에 따라서 차별화된 검증 인증시스템을 구축하여 인증규모와 과정이 긴 “식약청 공식인증법”

(식공법, OMA)과 규모와 시간이 짧은 “식약청 능력시험인증법”(식능법, PTM) 두 종류의 공인

인증 경로를 통해 인증의 차별화를 도모함과 동시에 키트사용의 권장을 유도한다.

**표 1-15. AOAC validation을 거친 키트(예: 살모넬라)**

Company	Kit Name	Recognition
BioControl Systems, Inc.	1-2 Test	* AOAC Official Method 989.13 * MLP-70, AFNOR, Zenoh (Japan)
	Gold <i>Salmonella</i> EIA	AOAC Official Method 999.08
	<i>Salmonella</i> EIA	AOAC Official Method 992.11
	VIP for <i>Salmonella</i>	AOAC Official Method 999.09
Bioline/ Mast Diagnostics	<i>Salmonella</i> ELISA/ Mastazyme <i>Salmonella</i>	* Performance Tested Method 960901 * AFNOR * NMKL;NORDVAL
bioMerieux	VIDAS Immuno Concentration <i>Salmonella</i>	* AFNOR * AOAC Official Method 2001.07, 2001.08, 2001.09
	VIDAS <i>Salmonella</i> (SLM)	* AOAC Official Method 996.08 * AFNOR
Bio-Rad Laboratories	iQ-Check <i>Salmonella</i>	
BioteCon Diagnostics	foodproof <i>Salmonella</i>	
Celsis Ltd.	PATH-STIK	
Diffchamb AB	Transia Card <i>Salmonella</i>	
	Transia Plate <i>Salmonella</i> GOLD	
Dynal Biotech	Dynabeads Anti- <i>Salmonella</i>	
Foss Electric A/S	EiaFoss <i>Salmonella</i>	
IGEN	PATHIGEN <sup>®</sup> <i>Salmonella</i> Test	
Matrix MicroScience Ltd	PATHATRIX System for <i>Listeria/Salmonella</i> species	
	PATHATRIX System for <i>Salmonella</i> species	
Matrix MicroScience, Inc.	Pathatrix <i>Salmonella</i> spp. Pooling Test System	

Company	Kit Name	Recognition
Merck KGaA		Diasalm
		Singlepath <i>Salmonella</i> Lateral Flow Assay
Neogen Corp.		Alert for <i>Salmonella</i>
		GENE TRAK <i>Salmonella</i> Assay
		GENE TRAK <i>Salmonella</i> DLP Assay
		ISO-Grid + EF18 Agar
		REVEAL for <i>Salmonella</i>
Organon Teknika		<i>Salmonella</i> Capture-Tek
		<i>Salmonella</i> Tek
Oxoid Ltd.		O.B.I.S. PYR Test
		O.B.I.S. <i>Salmonella</i> Test
		Rapid <i>Salmonella</i> Test Kit
		S.P.R.I.N.T. <i>Salmonella</i> enrichment system
TECRA Diagnostics		TECRA <i>Salmonella</i> Unique
		TECRA <i>Salmonella</i> VIA
VICAM		<i>Salmonella</i> Screen/ <i>Salmonella</i> Verify
Warnex Diagnostics Inc.		Genevision™ Rapid Pathogen Detection System for <i>Salmonella</i>

2-1-4. 농산물에서의 신속검출법 표준화 및 신속검출 매뉴얼 개발의 필요성

<u>&lt;주요 내용 요약&gt;</u>
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 농산물은 미생물의 검출이 어려워 농산물 고유의 특성을 고려하여 검출법을 확립해야 함</li> <li>2. 농산물을 대상으로 한 검출기법의 표준화는 이루어지지 않았음</li> <li>3. 신속검출 매뉴얼 개발을 통해 농산물의 유통 단계별 위생적 처리, 관리, 보관방법에 대한 식중독 위생관리 지침을 수립해야 함</li> </ol>

- 농산물은 균의 검출이 어려워 농산물 고유의 특성을 고려하여 검출법을 확립해야 함
- 농산물의 신선도 하락 우려에 따른 제한된 검출시간을 고려했을 때, 신속검출법을 기반으로 한 농산물 대상의 검출기법 표준화가 요구됨
- 국내의 검출법은 식품(식품공전) 혹은 축산식품(축산물의 가공기준 및 성분규격)을 대상으로 하고 있으며 농산물을 대상으로 한 검출기법의 표준화는 이루어지지 않았음
- 미국 FDA BAM 검출법 등에서는 농산물 시료일 경우 시료의 양을 늘이거나, 배양시간을 조절하는 식으로 농산물에 대한 검출법의 차이를 두고 있음

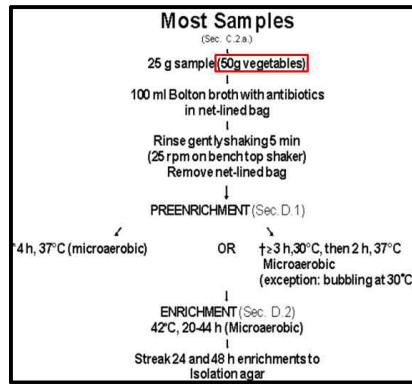


그림 1-8. 미국 FDA BAM - 캄필로박터 검출법, 시료가 채소일 경우, 시료 채취량에 차이를 둬

- 시료 채취 및 전처리 과정 등에 있어서 농산물의 전반적인 식중독 세균 검사/분리/동정을 위한 모니터링 표준화기법을 개발해야 함
- 또한 이를 바탕으로 농산물의 유통 단계별 위생적 처리, 관리, 보관방법에 대한 식중독 위생관리 지침을 수립해야 함
- 미국 USDA의 “Laboratory Guidebook”의 *Salmonella* 검출 방법의 *Salmonella* 균 검출에 대한 내용을 보면 총 17페이지의 매뉴얼로 작성함으로써 배지 제조방법부터 혈청형 검사법 까지 자세히 서술되어 있음
- 또한 간단한 flow chart로 형식으로 도식화함으로써 검사자가 한눈에 알아보기 쉽게 되어 있음

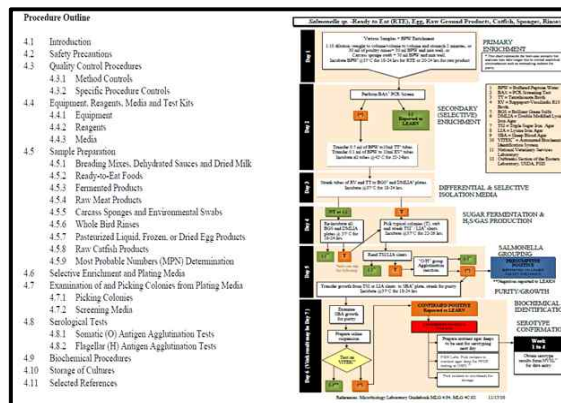


그림 1-9. 플로차트를 활용한 미국 USDA FSIS의 검출법 - PCR 등의 신속검출 기법을 기반으로 함



2-1-5. 농산물에서 미생물학적 안전성 평가 필요성

<주요 내용 요약>

1. 현대사회에서는 농산물들에 의한 식품사고 발생시 인터넷, SNS 등을 통한 빠른 전파로 소비자 불안감이 증폭되고 있는 현실임
2. 사회적으로 단순처리 농산물의 수요가 증가하는 반면 신선 농산물로 인한 안전사고 발생은 증가하고 있어 소비자 불안감이 증대될 수 있으며, 단순처리 된 농산물의 소비 전 단계 사전 안전성 확보가 필수적임

□ 사회구조의 핵가족화, 여성 경제참여 증가, 1인가구의 증가 등의 원인으로 외식이 증가하면서 ‘안전 먹거리’에 대한 관심이 증가함

○ 외식비 증가 추이

5.9천원('75) → 285.7천원('10) → 304.8천원('12) \*75년대비 51.7배 이상 성장



[자료출처 : 2014 통계청 연구보고서]

□ 이에 따라 단순처리 농산물과 같이 미리 다듬어 바로 조리할 수 있는(Ready-to-cook) 형태의 신선 농산물에 대한 소비자 선호도가 증가해 왔음

□ 식품안전 사고 발생의 여파 등 안전성에 대한 국민 공감대 형성

- 현대사회에서는 농산물들에 의한 식품사고 발생시 인터넷, SNS 등을 통한 빠른 전파로 소비자 불안감이 증폭되고 있는 현실임
- 특히, 도시화 및 산업화로 외식, 단체급식 등 식생활 패턴이 변화됨에 따라 식품에 대한 안전성 민감도가 높게 나타나고 있음
  - 소비자의 농식품 선택기준(2011, KREI) : **안전(59%)** > 건강·영양(21%) > 조리(11%) > 가격(9%)

□ 실제로 채소류를 포함하여 단순처리 농산물의 생산·소비량이 증가하면서 신선과채류 관련 식중독 발병사례는 1990년대 후반부터 지속적으로 증가하는 추세에 있음(Warriner 등, 2009)

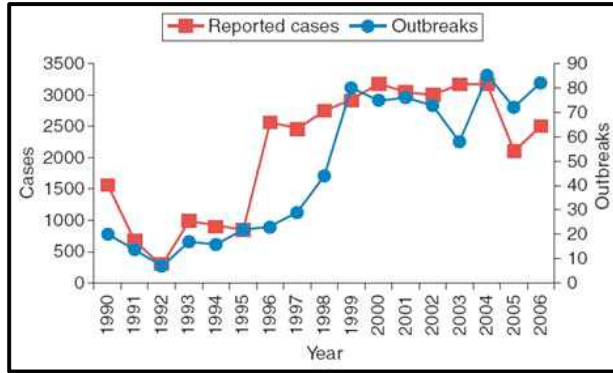


그림 1-10. 신선과채류 관련 식중독 발병 사례(1990-2006)

[자료출처 : 2008 Centre for Science in the Public Interest]

□ 식중독에 의한 농산물 식품안전관련 불안감 증대

- 2009년 한국소비자단체협의회에서 실시한 농산물 식품안전관련 소비자 의식조사 결과, 현재 우리나라 시중에서 유통·판매되고 있는 농산물에 대해 **불안전하다는 응답이 23.8%**(매우 불안전 1.5% + 불안전 6.2% + 약간 불안전 16.1%)로 10명 중 2명은 식품안전에 대해 부정적인 인식이 있었음

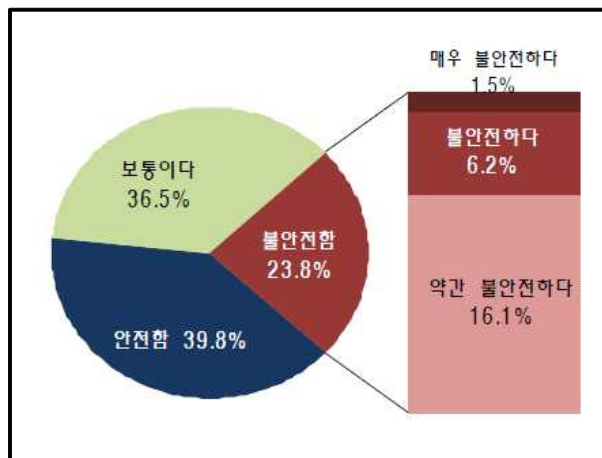


그림 1-11. 식중독에 의한 식품안전 인식

- 따라서, 사회적으로 단순처리 농산물의 수요가 증가하는 반면 신선 농산물로 인한 안전 사고 발생은 증가하고 있어 소비자 불안감이 증대될 수 있으며, 단순처리 된 농산물의 소비 전 단계 사전 안전성 확보가 필수적임
- 농산물에 대한 안전성 요구는 사회가 선진화되고 식품산업의 발달과 함께 식생활 양식 변화와 더불어 소비자의 인식변화, 관심도 증가로 인해 사회적 문제로 크게 대두되었음
  - **농산물의 안전성 확보는 국가의 중요한 정책의 하나로서 농산물의 생산, 유통 및 섭취 전 단계에 걸쳐 그 안전성을 확보하기 위한 노력이 필요함**
  - 특히, 소비자들은 **안전한 농산물 공급(51.0%)에 대한 관심이 가장 높은** 것으로 나타났으며, 최근 2년간 농식품 안전 관련 피해를 경험한 응답자는 11.8%였으며, 가공식품, 외식 순으로 피해를 경험했던 것으로 조사됨

□ 특히, 식품 피해 중에서 응답자들이 가장 우려하는 것은 신선하지 않거나 상한 제품을 구매하게 되는 경우, 즉 식중독에 의한 식품안전사고(22.5%)가 가장 높은 비율로 조사되었음 (한국농촌경제연구원, 2013)

□ 식품안전에 대한 높은 관심과 기대 수준 증대

○ 식중독 사고, AI 발생, 한·미, 한·중 FTA 체결로 인한 수입산 식품 증대 등으로 식품안전에 대한 불안심리가 심각한 사회갈등 요인으로 대두되고 있음

➔ 선진국도 식중독에 의한 식품불안으로 정치적 혼란과 막대한 경제적 손실 경험

(예) 독일 : 2011년 변종 병원성 대장균(*E. coli* O104:H4)에 의해 약 3,100억원의 손실과 사회문제 발생

□ 세계적으로도 각국이 식품안전기준을 강화하는 등 무역장벽화하고 있음

- 전세계 118개국에서 Global GAP 인증을 활용하고, 우리나라 FTA 체결국 중 42개국이 Global GAP 인증으로 농산물을 거래하고 있음
- 미국의 경우, 수출 농산물 GAP 수준관리 요구, 홍콩은 잔류농약 기준을 신규로 제정하고, 인도네시아는 수입농산물에 대한 GAP를 의무화하여 GAP를 무역장벽으로 활용하고 있음
- 국내에서 수출되는 신선편이농산물의 안전성이 확보되지 않을 경우 국제적인 문제로 대두될 가능성이 있으며 국가 이미지에 타격을 입어 산술적으로 추산 불가능한 경제적 손실이 발생할 수 있음

2-1-6. 농산물에서 미생물학적 위생안전 가이드라인 필요성

□ UN(WHO, CODEX), 미국 FDA, 캐나다 CFIA, 일본, 유럽 EFSA는 신선 편이 농산물에 대한 선진적 위생안전관리 가이드라인을 확립하고 있음

□ 신선농산물(단순처리 농산물)에서의 유해미생물에 대한 위생안전관리제도 개선방안 마련

- 식중독 발생은 생산 기업의 이미지와 신뢰도를 저하시켜 시장경제를 위축시킬 수 있으므로 이를 미연에 방지할 수 있는 사전적 안전관리제도가 마련되어야 함
- 국내에서는 즉석섭취용 신선편이 농산물은 가공식품으로 구분되어 대장균 불검출, 유통 온도 5℃ 이하 등 안전관리 기준을 적용하고 있으나, 조리가공용 단순처리 농산물에 대한 위생안전관리제도는 부재인 실정임(식품공전, 2011)
- 특히, GAP 농산물 인증은 개인농가 중심으로 위해요소를 관리하고 있어 GAP 인증제도 및 가이드라인의 마련이 시급한 상황임

2-1-7. 농산물에서 미생물학적 안전관리를 위한 유해미생물 기준·규격 필요

□ 현재 우리나라는 신선 농산물에 대한 유해미생물의 허용기준은 마련되지 않았고, 신선 농산물을 수확 후 가공 처리한 “신선편이 식품”에 대해서는 HACCP 기준에 준하여 식품의약품안전처가 제정한 식품위생법 “신선편이 식품” 유해 미생물 8종에 대한 포괄적 의미의 정량

적 관리 기준만이 설정되어 있는 실정임

- 그러므로, GAP농산물을 비롯한 신선(단순처리)농산물은 유해미생물들에 의한 식중독 안전사고의 잠재적 위험이 있으므로, 가열·조리 없이 섭취하는 신선(단순처리) 농산물 품목을 대상으로 유해미생물(세균 및 바이러스)에 대한 기준·규격을 만들어 위생안전을 위해 관리할 필요성이 있음

#### 2-1-8. GAP 농산물 관리제도 개선방안 제시

- GAP 농산물 중 단순 세척이외에 추가적인 미생물 저감화 과정을 거치지 않는 신선농산물의 경우 수확 후 관리 시설의 위생 안전관리가 매우 중요하며 신선농산물 대부분이 토양의 흙이 묻어 있는 형태로 유통되고 있어서 생물학적 위해요인에 노출됨
- GAP 농산물은 화학적·물리적 측면 보다 토양 용수 자재 등 농산물 재배 환경에 의해 오염될 수 있는 유해물질에 대한 종합적인 관리가 미흡하며 일부생산자의 농약안전 사용인식 부족으로 부적절한 농산물 지속발생, 안전 농산물 생산을 위한 대체 농약개발 등 기술적 지원 미흡함으로 개선의 필요함

#### 2-2. 연구개발 대상의 국내·외 현황

##### 가. 국내 기술 수준 및 시장 현황

###### □ 기술현황

- 국내에서도 배지의 개발, real-time PCR과 면역화학적 방법을 이용한 키트 등 식중독균 검출을 위한 다양한 방법이 개발되고 있으며 상품화되는 사례도 보고됨
- 국내에서도 인공유전자인 PNA(peptide nucleic acid) 칩을 이용한 신선농산물에서의 식중독균 6균 검출기술을 개발하였고 증균을 이용하여 10시간내에 신속검출이 가능한 시스템을 개발하였음
- 그러나, 해당 기술에 대해서는 실제 다양한 농산물에서 추가적인 검증이 필요함
- (주)보레다바이오텍의 주력 품목은 식중독균 신속검출을 위한 PCR 키트, 항원·항체를 이용한 면역학적 신속검출 키트가 돋보이고 최근에 발생한 노로 바이러스 식중독 사고를 겨냥하여 노로 바이러스 multiplex real-time PCR 키트도 출시하였음
- 그 외에도 신홍 벤처회사들이 앞 다투어 식중독 진단키트를 개발하고 있고 농림부의 ARPC 과제나 보건복지부의 보건의료기기 개발 과제를 통하여 학교 및 연구소 등에서 면역크로마토그래피를 이용한 스트립형 식중독 검출키트들이 개발되었음
- 우리나라는 2006년부터 GAP 제도가 도입되었으며, 최근 HACCP의 원리에 기초한 GAP 제도로 수정·보완하여 운영하고 있으나, 비용부담이 크며, 복잡한 기준 등으로 어려워 2014년에 GAP 제도가 농업인들이 쉽게 이해할 수 있도록 개선되었음
- 그러나, 우리나라는 정부 주도하의 GAP 제도가 운영 및 인증 기준이 마련되었기 때문에 유럽연합(EU) 및 다른 나라의 민간 유통업체를 중심으로 Global-GAP 인증시스템을 구

축하는데 어려움이 있음

- 현재까지도 우리나라는 Global-GAP 미인증 국가로 분류되고 있는 상황이며, 서류 심사를 중점적으로 하는 인증제도를 운영하고 있기 때문에 농가현장에서의 미생물학적 위해 요소가 관리되는 GAP 제도가 마련되어야 할 것임

□ 시장현황

- 국내 바이오 진단 분야 중 면역화학적 진단 시장이 2014년 2,263억 원이며 분자 진단은 730억 원 규모의 시장을 형성함
- 면역화학적 진단 시장은 2013년부터 2018년까지 연평균 10.40% 성장할 것으로 예상되며 분자진단 시장은 같은 기간 연평균 13.16%의 성장률을 보일 것으로 예상됨

표 1-16. 바이오 진단 분야 국내시장현황 및 전망

(단위: 억원)

	2013년	2014년	2015년	2016년	2017년	2018년	성장률 (%) (2013~2018)
면역화학적 진단	2,077	2,263	2,478	2,805	3,086	3,407	10.40
분자진단	649	730	826	935	1,064	1,204	13.16

[자료출처: 중소기업 기술로드맵 보고서]

- 국내 시장의 규모는 전 세계 시장에 비해 작은 편이나 기술개발 수준은 시장규모에 비해 높은 편임
- 국내 제품이 대개 의료용에 집중되어 있어 식품, 환경 내 식중독균 검사를 위한 제품이 부족해 식품, 환경에 대한 검사는 국외 제품에 의존하는 실정임

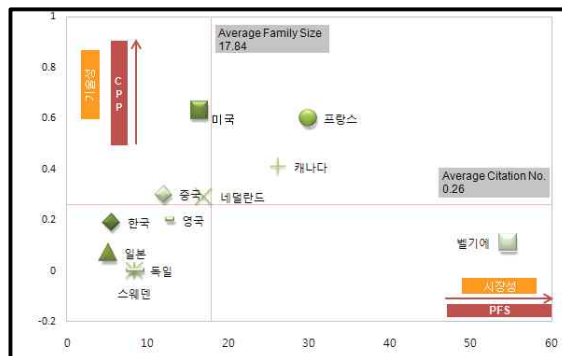



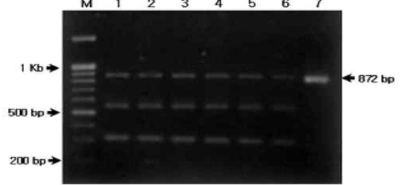


그림 1-12. 우리나라 및 세계 진단분야의 기술성 및 시장성 분석

- 2003년 9농가로 시작한 GAP 인증은 지속적으로 증가하여, 2015년에 5만3583농가로 확대 되었으며, 생산량도 106만8167t을 기록하였음
- 인증면적도 매년 증가세를 보여 2009년 3만ha, 2012년 4만ha였던 면적은 지난해 5만3583ha를 기록하며 처음으로 5만ha를 넘겼음

나. 경쟁기관 산업화 현황

(1) 유해 식중독 세균 신속검출법 산업현황

(가) Q-PCR kit(DNA base assay)

<b>(1) ©gene-Check ISO T</b>	
 ©gene-Check ISO T	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 회사 : 삼성 에버랜드</li> <li>○ 국가 : 대한민국</li> <li>○ 검출기법 : Real time PCR-SYBR Green</li> <li>○ 소요시간 : 8~24시간</li> <li>○ 검사가능 균 : <i>Salmonella, Listeria, S.aureus, E. coli</i> O157, <i>Campylobacter, Vibrio parahaemolyticus</i> etc</li> </ul>
<b>(2) ©gene-Check ISO T</b>	
 PowerChek™ Q-PCR	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 회사 : (주)코젠 바이오텍</li> <li>○ 국가 : 대한민국</li> <li>○ 검출기법 : Real time PCR</li> <li>○ 소요시간 : 10~24시간</li> <li>○ 검사가능 균 : <i>Salmonella, Listeria, S.aureus, E. coli</i> O157, <i>Campylobacter spp, Vibrio spp, Clostridium perfringens</i>, etc</li> </ul>
<b>(3) Gene Chaser</b>	
 Gene Chaser Mono	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 회사 : RapiGEN INC</li> <li>○ 국가 : 대한민국</li> <li>○ 검출기법 : PCR</li> <li>○ 소요시간 : 10~48시간</li> <li>○ 검사가능 균 : ETEC, EHEC, <i>Campylobacter, Cholera</i> etc</li> </ul>
<b>(4) PNA chip</b>	
 PNA chip	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 회사 : 농촌진흥청</li> <li>○ 국가 : 대한민국</li> <li>○ 검출기법 : PNA microarray</li> <li>○ 소요시간 : 6~10시간</li> <li>○ 검사가능 균 : <i>E. coli</i> O157:H7, <i>Salmonella enterica, S.aureus, Bacillus cereus, Yersinia enterocolitica, Listeria monocytogenes</i></li> </ul>
<b>(5) AccuPower®</b>	
 AccuPower®	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 회사 : Bioneer</li> <li>○ 국가 : 대한민국</li> <li>○ 검출기법 : PCR</li> <li>○ 소요시간 : 증균후 2시간</li> <li>○ 검사가능 균 : <i>Salmonella typhimurium</i></li> </ul>

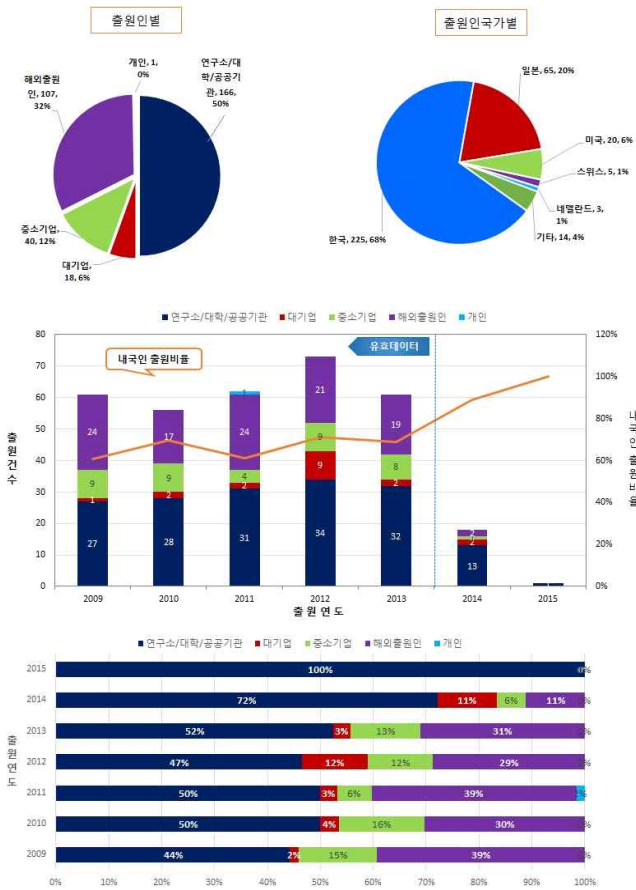
(2) 유해 바이러스 신속검출법 및 제어장치 산업화 현황

- 국내의 식중독바이러스 관련 제품은 그린피아에서 노로바이러스 멸균장치를 상용화하고 있으나, 식수나 공정수 등 용수살균에 국한되어 있음

(2) 지식재산권현황

- 농산물에 대한 검출방법이나 식의 미생물학적 안전성에 관련된 유해미생물 저감화 방법 등에 대한 지식재산권은 아직 기초적인 수준임
- 미국의 경우 유해미생물에 신속검출법에 대해 국내와 비교하여 더 많은 특허를 보유하였지만, 항체와 백신에 초점이 맞춰져 있어 농산물에 존재하는 유해미생물의 검출과 제어에 관련된 특허는 국내의 실정과 크게 다르지 않았음

기존특허명, 특허번호, 등록년도	특허내용	유사점 및 차이점
노로바이러스 검출용 조성물 및 그를 이용한 노로바이러스 검출 방법, 2013-0055042, 20130528	높은 진단의 정확도 및 특이도로 노로바이러스를 검출 할 수 있으며, ELISA와 접목하여 간단한 조작 및 낮은 단가로 육안으로 노로바이러스를 검출 할 수 있음	식품에 오염된 저농도의 노로바이러스를 효율적으로 검출할 수 있지만 검출법에 대한 조성물에 관한 내용으로 실제 농산물에서의 검출방법은 고려되지 않음
SELECTIVE DETECTION OF NOROVIRUS, 2014-0315750, 20141023	Quantitative Revers Transcription PCR을 이용한 노로바이러스의 선택적 검출방법	sample 내의 노로바이러스를 선택적으로 검출 할 수 있지만, 검출하기 위한 프라이머 및 프루브의 개발에 관한 것으로 한정됨
A형 간염 바이러스에 대한 역전사 중합효소 연쇄반응 효소면역 측정법, 2011-0052794, 2011.05.19	높은 진단의 정확도 및 특이도로 A형간염 바이러스를 검출 할 수 있으며, ELISA와 접목하여 간단한 조작 및 낮은 단가로 육안으로 노로바이러스를 검출 할 수 있음	A형 간염바이러스를 민감도와 특이도가 높게 검출할 수 있으나 검출하기 위한 프라이머 및 프루브의 개발에 관한 것으로 한정됨
다중 호흡기 바이러스의 동시 검출 방법, 및 이의 용도, 1380414, 2014.03.26	시료 내 타겟 유전자들을 멀티플렉스 실-시간 PCR을 통해 간편하고 효율적으로 검출할 수 있다. 따라서, 다양한 호흡기 바이러스들의 시료 내 감염 여부를 선택적으로 용이하게 검출할 수 있음	아데노바이러스를 간편하게 검출할 수 있으나, 시료가 임상검체라는 점에서 판이함
소설사병 바이러스성 원인체의 유전자 진단을 위한 프로브, 프라이머 및 이를 이용한 진단방법, 2013-0058105, 2013.06.04	소설사병 바이러스 원인체인 노로바이러스, 로타바이러스 및 코로나바이러스의 진단방법으로 한번의 검사로 신속하게 신생우 설사병을 유발하는 주요 바이러스 원인체 및 유전형질을 검사 할 수 있음	노로바이러스와 로타바이러스를 효율적으로 검출할 수 있으나 송아지설사병에 관련된 유전자형으로 다소 제한됨
병원성 RNA 바이러스 검출방법, 및 검출키트, 2005-0120114, 2005.12.22	국내에서 감염성 설사질환을 유발하는 대표적인 3종의 RNA 바이러스인 아스트로바이러스(astrovirus), 로타바이러스(rotavirus), 노로바이러스(norovirus genogroup I, II)를 신속 정확하게 검출해 내는 병원성 RNA 검출방법	현황과약에 중요한 아스트로바이러스, 로타바이러스, 노로바이러스(genogroup I, II)를 신속하게 검출할 수 있지만, 시료가 인간의 분변을 사용했다는 것과 RT-PCR만을 사용하여 민감도가 떨어진다는 한계점이 있음



[자료출처: 중소기업 기술로드맵 보고서]

□ 연구기관현황

연구수행기관	연구개발내용	연구개발성과
○○대학교	Multiplex-PCR에 의한 먹는 샘플 및 야채류로부터의 병원성 <i>Y. enterocolitica</i> 의 신속검출	야채 및 물에서 <i>Yersinia enterocolitica</i> 의 특이적이고 신속한 검출법을 개발하기 위해 multiplex PCR을 이용하고, 이 균의 검출 민감도와 특이도 조사
○○대학교	Comparison of Standard Culture Method and Q-PCR Assay for Detection of <i>S. aureus</i> in Processed and Unprocessed Foods	채소류와 가공식품에서 황색포도상구균 검출을 위한 배지법과 Q-PCR법의 비교
○○대학교	Comparison of Three Selective Media and Validation of the VIDAS Campylobacter Assay for the Detection of Campylobacter jejuni in Ground Beef and Fresh-Cut Vegetables	절단신선채소류 등에서 캠필로박터 제주니의 분리를 위한 선택배지 3종과 자동 ELISA 시스템인 VIDAS를 비교
○○대학교	편육과 브로콜리썩에서 Salmonella spp. 검출을 위한 배지법과 Q-PCR 및 신속 검사키트(VIDAS(R))의 비교검증	브로콜리썩과 편육에서 Salmonella spp. 검출을 위한 배지법과 Q-PCR 및 신속 검사키트의 비교검증



연구수행기관	연구개발내용	연구개발성과
oo대학교	The Rapid Detection of Pathogens in Organically Grown Vegetables Using PCR-DGGE	유기농 채소에서 5종의 식중독세균을 포함한 6종의 유해 미생물의 PCR-DGGE법을 이용한 신속 검출법 정립
oo대학교	Development of Immunochromatography for Detection of Escherichia coli O157:H7 Contaminated in Meats and Sprouts	육류 및 새싹채소에 오염된 병원성대장균 O157:H7의 신속검출을 위한 면역크로마토그래피법의 개발

## 다. 국외 기술 수준 및 시장 현황

### □ 기술현황

- 생명공학 기술의 발전으로 식품 내 식중독균의 검출도 나날이 발전하고 있음
- 식중독 원인균의 검사방법은 선택(selective) 배지를 사용한 방법이 표준검출법으로 사용되거나 생명공학 기술의 발달로 인해 식중독 원인균의 검출 방법도 다양화 되어 ELISA와 같은 면역기법, PCR과 같은 유전자 기법 등이 새롭게 개발되어 일상적으로 사용됨
- 미국 FDA에서도 BAM 시험법에 유전자 기법과 신속검출법을 추가로 기재하는 등 미생물 시험법의 대 변혁기를 지나고 있음. 이러한 방법은 항원-항체 반응을 이용한 면역기법과 DNA/RNA 정보를 활용한 유전자기법으로 크게 양분됨
- 면역기법은 ELISA, IMB 등이 널리 사용되고 있으나, 효율성 높은 항체의 생산이 필수적으로 이루어져야 함. 최근에는 높은 특이성, 안정성, 대량생산능력, 경제성 등의 장점을 가진 IgY를 활용한 다양한 면역화학 기법에 대한 연구가 활발
- 유전자기법으로는 최근에 가장 연구가 많이 되고 있고 별도의 전기영동 과정 없이 실시간으로 결과를 알 수 있기 때문에 폭발적인 인기를 모으고 있는 Q-PCR 방법이 식중독 원인균 검출을 위해 가장 적합한 것으로 보고됨
- 그러나, Q-PCR은 식중독 원인식품에서 실제 균주를 분리하는 검사법은 아니므로 신속하게 식중독 세균의 유무만을 판정하는 예비검사법(presumptive screening)으로 주로 활용되고 양성으로 판단되었을 경우에는 반드시 표준방법인 배지배양법을 활용하여 균을 분리해내야 하며 대부분 신속검사법과 동시에 사용되는 경우가 많음
- 신속검출법과 전통 배지 검출법 모두 식품에서 검출한계가 대략 각각  $10^3$ - $10^5$  CFU/g수준이어서 식중독사고 원인균규명에 한계가 있고, 정량검출에 용이하지 못한 단점이 있어, IMB를 포함한 다양한 방법으로 세균을 분리-농축하는 기법들에 관한 연구가 활발하게 진행 중
- 샘플의 특성과 시험법에 따라 보다 나은 시료준비 방법이 연구되고 크롬아가 개발, 기존배지의 개선 등 다양한 선택배지들이 개발되고 있으며 개발된 새로운 시험법이나 배지 등에 대해 기존 방법과의 비교 검증연구가 활발히 이루어지고 있음
- 기존의 ELISA와 같은 면역기법이나 PCR(polymerase chain reaction)과 같은 유전자 기법 등의 신속검출 기법이 연구 개선되어 보다 간편하고 효과적인 결과를 기대할 수 있음
- 농산물과 관련한 식중독 사고로 인해 가장 안전한 식품공급을 하고 있는 미국에서 매년 약 4천 8백만명이 식중독으로 고통받고 있음 (미국인구의 15%, 6.6명 1명에 해당)
- 유럽연합(EU), 미국, 중국 등 전세계적으로 자국민의 보호를 위해 농산물의 안전제도로

GAP를 시행하고 있음(FA), Codex, 등 국제기구에서도 지침, 규격 및 기준을 마련하여 시행하도록 하고 있음)

- 유럽연합(EU)은 민간 유통업체를 중심으로 Global-GAP 인증시스템을 구축하도록 요구하고 있기 때문에 현재 114개 국가가 Global-GAP를 인증을 받도록 참여하고 있음
- 앞서 설명한 바와 같이 외국의 경우는 민간유통 업체를 중심으로 GAP 제도의 개선 및 시설, 장비의 보완이 이루어지도록 하는 측면이 있으나, 우리나라의 경우는 정부 주도적인 GAP 제도를 마련하고 있는 것과는 대조적임

#### □ 시장현황

- 바이오칩 세계시장 규모는 2008년 약 70억달러였으며 2015년 180억 달러에 이를 것으로 예측되고 있음(Kalorama Inf., 2005)
- 세계 시장은 꾸준한 증가세를 보이고 있으나 대부분의 시장이 미국과 프랑스가 앞선 기술력과 선점효과로 인해 시장을 대부분 점유하고 있는 상황임
- 미국의 2005년 미생물 검사시장은 13억 달러로 추정됨

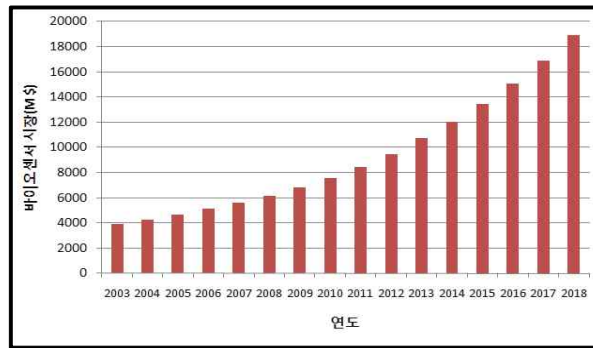


그림 1-13. 바이오센서 세계시장 규모

[자료출처 : "World Biosensors Market", Frost & Sullivan, 2007]

- 진단키트 개발의 핵심은 신뢰성 높은 바이오마커 개발과 고감도 검출 방법 개발로 그 기술은 나날이 발전하고 있으며 최근에는 하나의 키트로 복수 목적 대상을 검사할 수 있는 multiplex 키트가 신속성과 편리성을 이유로 주목받고 있음
- 미국의 경우 PCR을 이용한 분자유전적 진단을 인정하고 있으며 일본은 공인검사법으로 지정하고 있음
- 주요 회사 및 제품으로는 미국 Neogen의 Reveal® Test Kit, DUPONT사의 Dupont BAX, SDIX사의 Rapid chek, BD Difco의 BD BBLTM Test Kit, 3M사의 TECRA kit, Petrifilm, Biocontrol system사의 Assurance® EIA 프랑스 Biomerieux의 VIDAS®(Vitek Immuno Diagnostic Assay System), VITEK®, API®, 스웨덴 Rasio Diagnostics사의 Transia Elisamatic II, 영국 Oxoid사의 Latex Agglutination Test Kit 등이 있음
- 미생물의 생화학적 성상 실험과정을 간편하게 해주는 일원화 kit 제품 및 자동화 시스템은 대개 프랑스 Biomerieux사가 장악하고 있는 상태
- 증균배지와 면역화학적 진단 제품을 kit화한 제품은 Neogen의 Reveal® Test Kit, SDIX

사의 Rapid chek 등 미국회사에 의해 주점되고 있음

- PCR을 이용한 분자유전진단 제품 시장은 미국, 독일, 스웨덴 등이 경쟁하는 체제로 지속적 성장을 보이고 있는 분야임
- 또한 분자유전진단 분야는 Micro-array기술 발달로 균 동시분석 및 소형화가 이루어졌고, 원가절감으로 인한 가격경쟁력이 확보되어 더욱 지속적 발전이 이루어질 것으로 보임
- LAMP PCR법 등 다양한 PCR기법 개발과 DNA추출 기기 및 PCR 기기의 휴대화가 이루어지고 있어 PCR분야의 전망이 밝을 것으로 예상됨
- 전세계적으로 FTA 체결이 확대되고 있는 상황에서 안전성이 확보된 농산물의 거래가 활발히 이루어질 것이기 때문에 GAP 인증 농산물의 생산 및 교역은 증가할 것임(전세계 380여개의 FTA가 체결되어 있으며, 전 세계의 무역량 60% 이상을 차지)

표 1-17. 바이오 진단 분야 해외시장현황 및 전망

(단위: 백만달러)






	2013년	2014년	2015년	2016년	2017년	2018년	성장률 (%) (2013~2018)
면역화학적 진단	19,950	21,280	22,700	24,270	25,990	27,770	6.84%
분자진단	5,630	6,340	7,150	8,050	9,070	10,220	12.66%



[자료출처: 중소기업 기술로드맵 보고서]

## 라. 경쟁기관 산업화 현황

### (1) Q-PCR kit(DNA base assay)

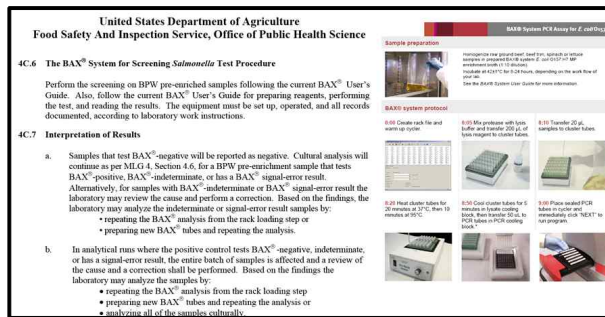
- 면역 화학적 진단의 특허 9,123건 중 미국이 가장 많은 특허를 보유함
- 출원 규모에 있어서 미국이 7,451건(82%)으로 가장 높은 점유율을 나타내었으며, 유럽이 738건(8%), 일본 602건(6%), 한국 332건(4%)의 순서로 특허점유율을 기록함
- 분자진단의 해외 대상 특허 4,765건에 대한 각 국가의 연도별 출원 동향의 경우 미국이 가장 많은 특허를 보유함
- 출원 규모에 있어서 미국이 2,053건 (43%)로 가장 높은 점유율을 나타내며, 일본이 1,116건 (24%) 한국이 965건(20%), 유럽이 631건(13%)로 점유율을 보임

<b>(1) Dupont BAX</b>	
 <p>DUPONT™ BAX® system</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 회사 : DUPONT</li> <li>○ 국가 : 미국</li> <li>○ 검출기법 : Q-PCR - SYBR Green</li> <li>○ 소요시간 : 24~48시간</li> <li>○ 검사가능 균 <ul style="list-style-type: none"> <li>: Salmonella, Listeria spp, E. coli O157:H7, STEC, Campylobacter, Vibrio spp, Staphylococcus aureus, Enterobacter sakazakii</li> </ul> </li> <li>○ 인증 : AOAC, AFNOR</li> </ul>
<b>(2) Assurance GDS®</b>	
 <p>Assurance GDS®</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 회사 : Biocontrol system</li> <li>○ 국가 : 미국</li> <li>○ 검출기법 : Probe-based Q-PCR</li> <li>○ 소요시간 : 10~24시간</li> <li>○ 검사가능 균 <ul style="list-style-type: none"> <li>: STEC, Salmonella, Listeria spp, E. coli O157:H7</li> </ul> </li> <li>○ 인증 : AOAC, Health Canada MFLP</li> </ul>
<b>(3) iQ-Check kit</b>	
 <p>iQ-Check kit</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 회사 : Bio-Rad</li> <li>○ 국가 : 미국</li> <li>○ 검출기법 : Q-PCR</li> <li>○ 소요시간 : 8~24시간</li> <li>○ 검사가능 균 <ul style="list-style-type: none"> <li>: Cronobacter spp, Campylobacter spp, E. coli O157:H7, Listeria spp, Salmonella, STEC</li> </ul> </li> <li>○ 인증 : AFNOR</li> </ul>
<b>(4) Foodproof®</b>	
 <p>Foodproof®</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 회사 : Merck Millipore</li> <li>○ 국가 : 독일</li> <li>○ 검출기법 : Q-PCR</li> <li>○ 소요시간 : 24시간</li> <li>○ 검사가능 균 : Salmonella, Listeria, E.coli O157,</li> <li>○ 인증 : AOAC,</li> </ul>
<b>(5) Check &amp; Trace</b>	
 <p>Check &amp; Trace</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 회사 : Check-Points</li> <li>○ 국가 : 네덜란드</li> <li>○ 검출기법 : Microarray</li> <li>○ 소요시간 : 8~10시간</li> <li>○ 검사가능 균 : Salmonella spp.</li> <li>○ 인증 : AOAC, Oie</li> </ul>
<b>(6) Arrayit</b>	

 <p style="text-align: center;">Arrayit</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 회사 : Arrayit</li> <li>○ 국가 : 미국</li> <li>○ 검출기법 : DNA microarray</li> <li>○ 소요시간 : 3.5~18시간</li> <li>○ 검사가능 균 : <i>Salmonella typhimurium, S.aureus, E. coli</i></li> <li>○ 인증 : Austrian Institute of Technology</li> </ul>
(7) Assurance GDS®	
 <p style="text-align: center;">Reactive Antigen Microarray</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 회사 : Antigen Discovery Inc.</li> <li>○ 국가 : 캘리포니아</li> <li>○ 검출기법 : Microarray</li> <li>○ 소요시간 : 14시간</li> <li>○ 검사가능 균 : <i>Salmonella typhi, Staphylococcus aureus</i></li> <li>○ 인증 : FDA(For research use only)</li> </ul>

**마. 표준화 현황**

- FDA의 식품검사업무를 담당하는 ORA(Office of Regulatory Affairs)의 실험실에서는 Q-PCR 기기를 갖추고 *Salmonella, E. coli* O157:H7, *Vibrio*, Norovirus 등의 검출에 사용하기 위한 검출법 평가와 검증 과정을 거쳐 적극 활용함으로써 식품검사에 능동적으로 대처하고 있음
- 새로운 검출방법은 AOAC에서 제정한 가이드라인에 따른 검증(validation) 과정을 거쳐 FDA BAM에 수록되어 공식적인 인증을 받고 있음
- 이렇게 인정받은 기법은 미국 FDA의 BAM과 USDA의 FSIS에도 유전자 기법과 신속검출기법이 적극적으로 채택되어 보다 신속하고 경제적인 식중독균의 관리에 기여하고 있음
- 현재 PCR 기법 등 유전자 정보를 이용하여 상품화된 식중독균 진단키트 중 많은 제품들이 미국과 캐나다 등의 선진국에서 공식 시험법으로 채택되어 있음



**그림 1-14. 미국 농무성에서 공인법으로 채택된 BAX Q-PCR 방법**

- 현재 식품에서 사용되는 신속검출 기법은 대부분 전처리 시간과 검출시간이 2시간 이내이나, 16-24시간 동안 예비증균을 하도록 명시하고 있음
- 8시간 이내의 검출기술은 대장균 등을 중심으로 개발되었으나, 육류나 우유 등의 축산물 시료가 아닌 농산물 시료에서는 그 감도가 매우 떨어진다는 연구결과가 있음

예시) TaqMan® *Staphylococcus aureus* Detection Kits (Applied Biosystems)

● protocol

- 1) enrich sample: 24시간 소요
  - 표준적인 증균배양법을 이용하여 선택된 샘플에서 특정한 병원균이 자라게 함
- 2) prepare sample, PCR을 위한 DNA 추출: 1시간 소요
  - 전배양이 끝난 후 Prepman과 같은 sample preparation reagent와 섞어서 세포를 녹이고 DNA를 추출
- 3) run sample: 1시간 30분 소요
  - Applied Biosystems SDS이나 Q-PCR System에서 샘플분석을 위한 plate running를 시행



□ 연구기관현황

연구수행기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
미국 USDA	The linear accumulation of atmospheric mercury by vegetable and grass leaves: Potential biomonitors for atmospheric mercury pollution.	농산물에서 Q-PCR을 활용하여 바실러스 신속검출기법을 확립한 연구
독일 National Reference Laboratory	A rapid procedure for the detection and isolation of enterohaemorrhagic Escherichia coli (EHEC) serogroup O26, O103, O111, O118, O121, O145 and O157 strains and the aggregative EHEC O104:H4 strain from ready-to-eat vegetables	즉석섭취 채소류로부터 Q-PCR 및 크롬배지를 활용한 EHEC의 다양한 혈청형의 신속검출법 개발 연구
스페인 University of Valencia	Quantitative detection of viable foodborne E. coli O157:H7, Listeria monocytogenes and Salmonella in fresh-cut vegetables combining propidium monoazide and Q-PCR	Propidium monoazide(PMA)를 qPCR에 접목시킨 신선야채류에서의 대장균, 살모넬라, 리스테리아의 신속 검출기법 개발
스페인 University of Girona	Evaluation of ISO enrichment Q-PCR methods with internal amplification control for detection of Listeria monocytogenes and Salmonella enterica in fresh fruit and vegetables	신선 과채류에서 Internal Amplification Control(IAC)를 포함한 Q-PCR을 활용한 리스테리아 및 살모넬라 검출법 확립
미국 Auburn University	Direct Detection of Salmonella on Fresh Vegetables Using Multiple Magnetoelastic Biosensors	Multiple Phage 기반의 magnetoelastic(ME) 바이오센서를 통한 신선 야채에서 살모넬라 검출 연구
캐나다 Agriculture and Agri-Food Canada	Detection of viable but non-culturable Escherichia coli O157:H7 from vegetable samples using quantitative PCR with propidium monoazide and immunological assays	propidium monoazide(PMA) 및 면역기법들과 qPCR을 접목시켜 야채시료로부터 대장균 O157:H7 검출
스페인 Politecnica University	Detection and enumeration of viable Listeria monocytogenes cells from ready-to-eat and processed vegetable foods by culture and DVC-FISH	DVC(Direct Viable Count) -FISH(Fluorescent in situ Hybridization)기법을 이용한 리스테리아 정량 기법 개발
모로코	A Simple and Rapid Detection by	네가지 유형의 채소에서 PCR을

연구수행기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
University Hassan II	PCR of Enteropathogenic Escherichia coli in Naturally Contaminated Vegetables	이용한 24시간내에 병원성 대장균 검출법 개발
Water Analysis and Research Center 등	Detection and Molecular Characterization of Human Noroviruses in Korean Groundwater Between 2008 and 2010	국내에서 사용하는 관개용수에서 지속적으로 Norovirus(genogroup I, II)가 검출되고 있음을 제시함.
Gyeonggi Provincial Research Institute of Public Health and Environment 등	Acute gastroenteritis outbreaks associated with ground-waterborne norovirus in South Korea during 2008 - 2012	ultraviolet light, sand filtration, chlorination과 같은 disinfection system을 거친 지하수에서도 Norovirus(genogroup I, II)가 검출되어 antiviral system의 필요성을 제시함.
National Institute of Food and Drug Safety Evaluation	Effect of Wash Treatments on Reducing Human Norovirus on Iceberg Lettuce and Perilla Leaf	농산물에 존재하는 Norovirus의 저감화에 기여할 새로운 세척방법 강구.
Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University	Microbiological Safety Assessment of a Perilla Leaf Postharvest Facility for Application of a Good Agricultural Practices (GAP) System	GAP system을 적용한 깻잎을 수확후 미생물학적 안전성을 평가하였지만, 병원성세균으로 제한되어 바이러스에 관한 평가요소가 전무함.
Gyeongsang National University	Investigation of Microbiological Hazard from Korean Leeks and Cultivation Area to Establish the GAP Model	GAP model을 개발하기 위해 부추 생산환경에서 위해요소를 조사하였지만 바이러스에 관련된 항목이 전무함.
MMWR-CDC	Vital Signs: Foodborne Norovirus Outbreaks – United States, 2009 - 2012	노로바이러스 감염이 foodborne뿐만 아니라 waterborne의 사례도 상당수를 차지하여 식품용수 또한 바이러스 안전관리의 필요성을 제시함.
Department of Health, Autonomous Government of Catalonia	Epidemiology of foodborne Norovirus outbreaks in Catalonia, Spain	노로바이러스가 세균성 식중독보다 발생비율이 높아 식품의 미생물학적 안전성에 있어 바이러스에 대한 관리체계의 필요성을 제시함.
Laboratory Services Division, University of Guelph	Microbial Assessment of Irrigation Water Used for Production of Fruit and Vegetables in Ontario, Canada	관개용수의 미생물학적 안전성 평가를 진행하였으나 박테리아에 그쳐 바이러스에 대한 대책이 없음.
College of Natural Sciences, Seoul National University, Seoul	Enteric Viruses in Raw Vegetables and Groundwater Used for Irrigation in South Korea	관개용수와 생채소에서 지속적으로 식중독바이러스가 검출되고 있으며, 비록 관개용수가 오염되지 않았더라도 생채소에서 식중독바이러스가 검출을 제시함.

## 2-3. 연구개발의 중요성

### 2-3-1. 사회·문화적 측면

- 환경의식 확산 및 건강의식 증대, 참살이(well-being)와 Lifestyle of Health and Sustainability (LOHAS)열풍으로 인하여 친환경 농산물 및 바른먹거리(안전성)를 선호하는 건강 지향의 식품 소비 행태가 증가하고 있음
- 대한상공회의소가 2013년 5월 9일부터 14일까지 주부 500명을 대상으로 주부들을 대상으로 식품소비패턴 및 식품안전에 관한 소비인식을 조사한 결과, ‘신뢰, 건강, 저비용, 간편’이라는 키워드로 나타났으며, 10명 중 4명은 먹거리에 대해 불안감을 느끼고 있음
- 최근 1인가구, 맞벌이 부부, 노령가구와 같은 인구구조의 변화가 소량구매 및 편리성을 중시하는 소비패턴의 변화를 이끌고 있으며, 대형유통업체와 백화점을 중심으로 한 기존 농산물 유통시장이 편리성을 중시하는 편의점과 인터넷 쇼핑 중심으로 급격히 이동하고 있음
- 편의성을 중시하는 라이프 스타일은 식품의 소비행태에도 영향을 끼치게 되어 조리가 간편하거나, 조리과정이 따로 요구되지 않는 신선편이 식품의 수요가 증대되고 있으며, 그대로 섭취하거나 단순한 식품첨가물을 첨가하여 섭취하는 샐러드, 새싹채소와 같은 형태의 제품이 판매되고 있음
- 농산물의 시장규모가 증가하면서 무농약, 무항생제와 같은 화학적 물질 오염에 관한 인식은 두텁게 형성되어 있으나, 농산물에 쉽게 오염되는 식중독 유해 미생물에 관한 인식은 다소 낮게 평가되고 있음
- 미국 CDC에 따르면, 미국의 경우 일 년에 4,800만 명이 한번 이상 식중독에 걸리며 이 중 2,000명이 사망하며, 식중독 사고의 절반은 야채, 견과류, 녹색 채소 등 농산물에서 비롯되는 것으로 나타남. 이 중 상추 시금치 등 녹색 잎채소에 의한 발생 빈도가 가장 높았으며, 식중독의 원인은 주로 노로 바이러스인 것으로 조사됨
- 농산물에 대한 안전성 요구는 사회가 선진화되고 식품산업의 발달과 함께 식생활 양식 변화와 더불어 소비자의 인식변화, 관심도 증가로 인해 사회적 문제로 크게 대두되었음
- 농산물의 안전성 확보는 국가의 중요한 정책의 하나로서 농산물의 생산, 유통 및 섭취 전 단계에 걸쳐 그 안전성을 확보하기 위한 노력이 필요
- 특히, 소비자들은 안전한 농산물 공급(51.0%)에 대한 관심이 가장 높은 것으로 나타났으며, 최근 2년간 농식품 안전 관련 피해를 경험한 응답자는 11.8%였으며, 가공식품, 외식 순으로 피해를 경험했던 것으로 조사됨



- 유해미생물(세균, 바이러스)의 오염은 재배지역의 농산물, 관개용수 및 급식소, 음식점의 농식품, 음용수 등 광범위하게 발생하고 있으므로 농산물의 생산/수확부터 각 유통단계에서 발생할 수 있는 유해미생물의 오염실태를 조사하여 안전성을 평가하고, 다각적인 관리체계 구축 및 개선을 통한 소비전 단계 사전 안전성 확보가 필수적으로 요구됨

### 2-3-2. 경제·산업적 측면

- 국내 신선(단순처리)농산물 시장 규모는 꾸준히 확대되어 침체되어 있는 농산물 시장의 활성화에 기여할 수 있는 ‘신 성장 동력’으로 주목받고 있으며, 시장 규모는 2011년 기준 1조 4000억 원 수준으로 2004년 이후 연평균 13%정도의 꾸준한 성장률을 보이고 있음
- 신선편이농산물 시장이 활성화된 다양한 국가를 대상으로 국내 신선 농식품의 수출 규모가 증가하고 있으며, 2009년 우리나라 신선 농식품 수출 금액이 총 10억 달러로 전년 대비 16.2% 증가하였음

표 1-18. 신선농식품 수출동향

(단위: 천 톤, 백만불, %)

구분	2010년(A)		2011년(B)		증감률(B/A)	
	물량	금액	물량	금액	물량	금액
전체	2,947	5,880	3,479	7,691	18.1	30.8
신선농식품	329	874	331	1,015	0.8	16.2

[자료출처 : 농수산물무역정보, 2012]

- 국내에서 수출되는 신선편이농산물의 안전성이 확보되지 않을 경우 국제적인 문제로 대두될 가능성이 있으며 국가 이미지에 타격을 입어 산술적으로 추산 불가능한 경제적 손실이 발생할 수 있음
- 특히, 신선농산물에서의 식중독 발생은 생산 기업의 이미지와 신뢰도를 저하시켜 시장 경계를 위축시킬 수 있음
- 식품의약품안전처 “식중독 사고발생 추정 및 사회경제적 손실분석 보고서(2013)”에 따르면 식중독으로 인한 손실 비용은 2조 8천억원으로 2012년 GDP대비 0.22%에 해당되는 금액으로 매년 증가하는 실정임



그림 1-15. 연도별 식중독 발생건수 및 환자수

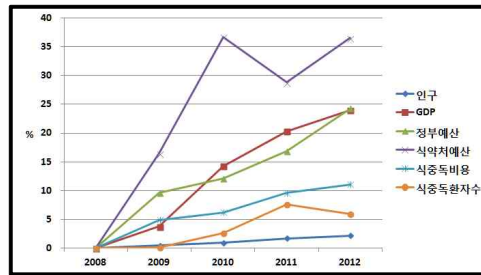


그림 1-16. 연도별 국내 식중독 발생에 따른 경제적 손실비용

- 또한, 국민건강보험공단심사평가원(2009) 자료에 의하면 세균성 식중독과 바이러스 식중독 등 관련 약 처방과 진료비의 총액은 총 3천억으로 추정하였음
- 식중독에 의한 손실비용에는 의료비용, 일반 생산성 손실 비용, 조기사망에 따른 생산성 손실 비용, 역학조사비용, 여가 손실 비용을 포함하고 있는데, 이중 일반 생산성 손실 비용이 9,634억원으로 전체손실비용의 73.51%를 차지하고 있음

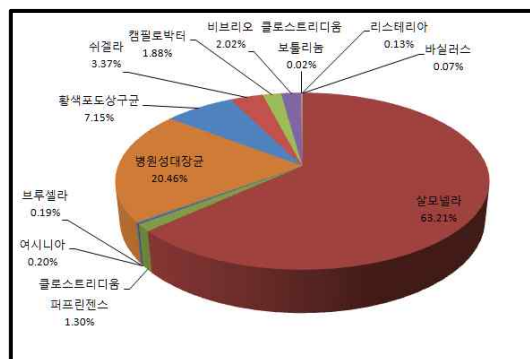


그림 1-17. 식중독 원인 세균별 환자수 분포(2008년~2012년)

- 미국은 매년 650만 명에서 3,300만 명 정도의 세균성 식중독 환자가 발생하고 있으며, 이중에서 약 9,000명 정도가 사망하고 있고, 주요 식중독균(Salmonella, Campylobacter, Clostridium, E. coli O157:H7, Staphylococcus aureus, Toxoplasma gondii)에 의해 발생한 식중독으로 연간 56억~94억 달러의 비용이 소요되는 것으로 추정하고 있음(USDA, 2006)
- 스웨덴에서는 닭고기 생산에서 Salmonella 균을 완벽히 제거하는데 US\$ 8 million이 소

요되었으나, 살모넬라에 의한 식중독 치료를 위한 의료비용 등의 경제적 손실은 약 US\$ 2.8 million 정도이므로, 사전에방조치가 훨씬 경제적이라는 것이 입증되고 있음

□ 식품안전성 확보 방안은 식중독 발생을 사전에 방지하여 피해에 따른 경제적 손실을 최소화하는데 목적을 두고 있으며, 식중독 예방에 대한 관리체계의 확립은 식품을 섭취하는 소비자뿐만 아니라 제품의 생산자를 보호하고 국가적으로 보건, 사회적으로 경제적 효과를 가져 올 수 있음

#### □ 신개념 식중독 사전예방관리 시스템

○ 식중독 발생에 대한 최선의 예방방법은 발생에 관여하는 위해인자(risk factor)를 조사하고 이를 바탕으로 사전 또는 조기에 그 발생 위해인자를 감소 또는 제거하는 것으로 이는 식중독 사전예방관리시스템의 기본골격이라 할 수 있음

○ 따라서, 신선농산물에서 식중독에 대한 사전예방관리를 위해서는 식중독 발생에 관여하는 risk factor를 조사하고 이 결과를 수학적 통계모델로 해석할 수 있는 기술력이 우선시 되어야 하며, 농산물에서의 생물학적 위험요인의 관리는 세계적인 추세로서 국내에서도 미생물학적 위해 관리방안으로 식중독 미생물에 대한 선진국형 위생안전관리지침 개선 및 표준화가 적극적으로 이루어져야 함

### 2-3-3. 기술적 측면

□ 산업이 발전하고 수입 자유화에 따른 식품 교역량이 늘어나면서 세계적으로 농산물 유통성 질병이 늘어나고 있음

□ 하지만, 식품의 경우 다양한 물질의 혼합물이기 때문에 검출에 어려움이 있으며, 다양한 원인 물질 검사 방법의 부족 및 극미량의 원인 물질로 검출에 제한이 있음

□ 특히 재래식 방법을 통한 식품 유해물질 검사는 아직도 높은 비용과 오랜 시간(2-5일 이상)을 요구하는 노동 집약적인 방법이 사용되는 경우가 많아서 신속 정확한 검사방법 개발이 시급함

□ 현재까지 개발되어 실용화 및 상용화된 신속검출기법은 주로 항원-항체 반응을 사용한 면역기법과 DNA나 RNA정보를 이용한 유전자기법이 주된 방법이고 분석시간도 20분에서 2시간이내여서 신속검사법의 범주에 든다고 할 수 있음

□ 다만, 유전자 기법과 면역기법도 식품에서 검출한계 세균수가 높아( $10^3$ - $10^5$  CFU/g 이상) 낮은 세균수(100 CFU/g 이하)로 농산물에 오염되어 있는 식중독세균을 증균과정 없이 검출할 수는 없어 검출한계 이상으로 식중독세균 수를 신속하게 증균하는 기술이 전제되어야 진정한 의미의 신속검출법이라고 할 수 있음

- 따라서, 검출한계 이상으로 목표 식중독세균을 6시간 이내에 증균할 수 있는 증균배지 시스템이 개발될 경우 유전자기법과 면역기법은 시간과 노동력을 단축하면서 8시간 내에 유해 미생물을 높은 민감도를 가지고 검출할 수 있다는 장점이 있어 그 개발의 필요성이 증대하고 있음

표 1-19. 각 검출기법의 특징

(+++ : 매우우수, ++ : 우수, + : 보통, - : 미흡)

	선택배지법	PCR	면역기법	Microarray 혹은 칩
검출속도(Speed)	-	++	+++	+
검출감도 (Sensitivity)	+	++	+++	++
검출의 선택성 (Selectivity)	-	+++	+	+++
검출의 편이성 (Simplicity)	-	+	+++	+
검출비용 (Cost)	+++	++	+	-

[자료출처 : 식중독 미생물 검출기술 동향분석, 한국식품공업협회 (2007)]

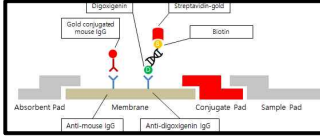
- 유해 미생물 및 유해 바이러스 검출법으로는 항원 항체 결합 특이성을 이용하는 면역검사법과 유전자 증폭을 통한 분자 진단법이 일반적으로 사용되고 있음
- 면역 검사법의 경우 검사 방법이 비교적 간단하고 현장에서 검사가 이루어지므로 신속한 결과를 얻을 수 있는 장점이 있으나 극미량의 물질을 검출하는 것에는 한계가 있음
- 분자 진단법의 경우 미량의 물질을 검출하는데 적합하고 민감도와 특이성이 높은 장점이 있다. 그러나, 검사를 위한 다양한 장비가 요구되고 검사 시간이 길어 현장검사가 어려운 실정임
- 유해 미생물 및 유해 바이러스의 정확하고 신속한 검사법의 개발은 병원성 물질에 대한 치료, 예방 및 대응 차원에서 매우 중요한 일임
- 바이러스 유전자의 증폭 및 산물의 결과확인 절차를 바이러스 채취 현장에서 가능하도록 하는 기술은 분석실로 시료를 이동하는데 소요되는 시간과 비용을 감소시켜 검출 후에 보다 빠르게 대처할 수 있게 해줌
- 또한, ‘intense pulsed light’, ‘pulsed white light(WHL)’, ‘broad-spectrum white light’ 등 여러 가지 이름으로 불리는 광펄스 살균기술은 해외에서 식품 유래 병원성 세균의 불활성화를 위한 연구에 활용되고 있음(Huffman at el., 2000, 이화여대 정명수 교수)
- 기존에 사용하고 있는 UV살균 보다 파장이 넓고 강한 빛을 아주 짧은 시간 안에 가하여 식품의 표면을 멸균시키거나 표면 미생물 수를 감소시키는 방법으로 사용되고 있으나, 국내에서는 광펄스를 이용한 바이러스 억제 관련 연구가 전무함

- 최근 농촌진흥청에서는 열수처리방법을 이용하여 발아되지 않은 새싹채소종자를 60℃의 물에 넣고 15분간 처리하여 소독처리와 비교해 미생물 저감 효과를 확인하였으나, 유통과정 중에 발생 가능한 식중독병원체의 제어기술로는 활용될 수 없다는 한계점이 있음
- 우리나라에서 운영되고 있는 GAP제도는 서류 심사를 중점적으로 하는 인증제도이기 때문에 농가현장에서의 미생물학적 위해요소가 관리되는 GAP 제도가 마련되어야 할 것임
- 그러므로, 기존의 GAP제도를 보완하고 미생물학적 위해요소를 제어할 수 있는 세척 장치 및 시설이 보완된 GAP 가이드라인의 마련과 제도의 개선이 필요함

### 제 3 절. 연구개발 범위

#### 1. 연구개발의 최종 목표 및 주요 내용

##### 1-1 연구개발의 최종목표

구분	내용												
최종목표	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 안심 농산물 생산을 위한 농업용수, 세척용수, 토양 및 농산물 등 재배로부터 최종 유통까지 국내 농산물의 미생물학적 안전성 평가 및 농산물별 가이드라인 작성               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 농산물 관련 식중독 등에 대한 사전 예방 및 관리 방안 마련</li> </ul> </li> <li>○ 우수농산물관리제도(GAP)의 미생물학적 관리 개선 방안 마련</li> <li>○ 실제 농산물의 미생물학적 품질관리를 위한 표준분석방법의 개선 및 신뢰도 제고</li> <li>○ 현장적용이 가능한 유해미생물 신속 검출법 개발</li> </ul>												
핵심 연구목표	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 25%;">연구목표</th> <th style="width: 10%;">단위</th> <th style="width: 30%;">현재기술수준</th> <th style="width: 35%;">개발목표</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>식중독 바이러스 신속검출 PCR 키트개발</td> <td>hr</td> <td>검출까지 48시간 (미국/유럽)</td> <td>-전처리 시간 6-12시간 이내 -바이러스 PCR 검출시간 3시간 이내 -PCR 검출 한계 10<sup>2</sup> CFU 양성 검출 95% 이상</td> </tr> <tr> <td>식중독세균 6종 동시검출 multiplex real-time PCR 키트개발</td> <td>종 hr CFU</td> <td>2~4종/ 검출시간 24시간/ 검출한계 100 CFU 이상 (미국/유럽)</td> <td>-농산물에서 최적 증균 후 6종 세균 동시 검출 능력 95% 이상 -세균 PCR 검출시간 1시간 이내 -PCR 검출 한계 10<sup>2</sup> CFU 양성 검출 95% 이상</td> </tr> </tbody> </table>	연구목표	단위	현재기술수준	개발목표	식중독 바이러스 신속검출 PCR 키트개발	hr	검출까지 48시간 (미국/유럽)	-전처리 시간 6-12시간 이내 -바이러스 PCR 검출시간 3시간 이내 -PCR 검출 한계 10 <sup>2</sup> CFU 양성 검출 95% 이상	식중독세균 6종 동시검출 multiplex real-time PCR 키트개발	종 hr CFU	2~4종/ 검출시간 24시간/ 검출한계 100 CFU 이상 (미국/유럽)	-농산물에서 최적 증균 후 6종 세균 동시 검출 능력 95% 이상 -세균 PCR 검출시간 1시간 이내 -PCR 검출 한계 10 <sup>2</sup> CFU 양성 검출 95% 이상
	연구목표	단위	현재기술수준	개발목표									
	식중독 바이러스 신속검출 PCR 키트개발	hr	검출까지 48시간 (미국/유럽)	-전처리 시간 6-12시간 이내 -바이러스 PCR 검출시간 3시간 이내 -PCR 검출 한계 10 <sup>2</sup> CFU 양성 검출 95% 이상									
식중독세균 6종 동시검출 multiplex real-time PCR 키트개발	종 hr CFU	2~4종/ 검출시간 24시간/ 검출한계 100 CFU 이상 (미국/유럽)	-농산물에서 최적 증균 후 6종 세균 동시 검출 능력 95% 이상 -세균 PCR 검출시간 1시간 이내 -PCR 검출 한계 10 <sup>2</sup> CFU 양성 검출 95% 이상										
<p>○ 식중독 바이러스 5종 신속검출 키트 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 전처리 : (기존) 탈리/농축 12-24시간 이상 → (본 연구) 탈리/농축 6-12시간 이내</li> <li>- 민감도 : (기존) 양성반응 90-95% 이내 → (본 연구) 양성반응 95% 이상</li> <li>- 특이도 : (기존) 양성반응 90-95% 이내 → (본 연구) 양성반응 95% 이상</li> <li>- 검출한계 : (기존) 10<sup>2</sup>-10<sup>3</sup> cfu/g or mL 이상 → (본 연구) 10<sup>2</sup> cfu/g or mL 이내</li> <li>- PCR 반응부터 PCR 결과 확인까지 소요 시간 : (기존) 2-4시간 이상 → (본 연구) 1시간 이내</li> <li>- 진단대상 : 노로바이러스 G1/G2, A형 간염 바이러스, 아데노 바이러스, 로타 바이러스, 아스트로 바이러스</li> <li>- 적용범위 : 농업용수 및 세척용수의 수질, 토양 및 위생 관리를 위한 미생물 오염 검출 및 안전성 평가</li> </ul> <p style="text-align: center;">&lt;제품 사용 모식도&gt;</p>  <p>○ 식중독 세균 6종 신속검출 multiplex real-time PCR kit 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 주요기능 : Multiplex RT-PCR을 이용한 식중독 세균 6종(<i>E. coli</i> O157:H7, <i>S. aureus</i>, <i>Salmonella</i> spp., <i>L. monocytogenes</i>, <i>B. cereus</i>, <i>Cl. perfringens</i>) 신속 검출 가능</li> <li>- 전처리 : (기존) 탈리/중균 12-24시간 이상 → (본 연구) 탈리/중균 6-12시간 이내</li> <li>- 검출시간 : 30 cycle 이내에서 반응시 1 시간 이내 검출 가능 (기존) 2-4시간 이상 → (본 연구) 1시간 이내</li> <li>- 민감도 : (기존) 양성반응 90-95% 이내 → (본 연구) 양성반응 95% 이상</li> <li>- 특이도 : (기존) 양성반응 90-95% 이내 → (본 연구) 양성반응 95% 이상</li> <li>- 검출한계 : (기존) 10<sup>2</sup>-10<sup>3</sup> cfu/g or mL 이상 → (본 연구) 10<sup>2</sup> cfu/g or mL 이내</li> <li>- 핵심기술 : 다양한 샘플로부터 Bacterial DNA을 순수분리 및 정제할 수 있고 Real-Time PCR에 최적화된 분리정제방법 확립</li> <li>- Omics 기술 및 comparative genomics 기반 target gene 선별 및 primer 제작</li> <li>- 적용범위 : 농업용수 및 세척용수의 수질, 토양 및 위생 관리를 위한 미생물 오염 검출 및 안전성 평가</li> </ul>													

1-2 연차별 개발목표 및 내용

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1 차 년 도	2016	[제1세부 : 중앙대학교]  주요 다소비 농산물 생산에서 소비까지 단계별 미생물학적 오염도 조사	○ 주요 다소비 농산물 재배부터 유통·소비까지 단계별 미생물학적 오염도 조사 - 농산물 및 환경시료에서의 모니터링 [세균 6종 / 바이러스 5종]
		[위탁기관 : 경상대학교]  신선농산물 대표작물 선정 및 위생안전관리 개선 방안 마련	○ 신선농산물(엽채류, 과채류, 근채류 및 과채류)의 대표작물 선정 - 최근 작물별 GAP 인증현황 조사 및 대표 GAP 농산물 선정 - GAP 농산물 품목별 농가 선정 및 현장방문(제3협동 연계를 통한 미생물학적 위해요소 조사·분석)  ○ 현장방문조사를 통한 미생물학적 위해요인 발생원인 분석 및 위생안전관리 개선 방안 마련 : 제1협동, 제3협동 연계 연구
		[제1협동 : 군산대학교]  신선농산물 관련 유해미생물과 국내 질병발생과의 관련성 분석 및 통계학적 오염수준 정량화	○ 신선농산물 관련 유해 미생물에 의한 국내 질병발생 현황과의 관련성 분석 - 국내 식중독 발생 동향 분석 - ALOP 개념 적용 국내 실제 식중독 발생 현황 분석 - 식중독 발생사례 자료로부터 농산물 관련 재배에서 유통까지 risk factor 탐색 : 제3협동 연계 연구  ○ 농산물에 대한 미생물학적 모니터링 결과에 대한 통계학적 오염수준 정량화 : 제1세부, 제3협동 연계 연구 - 제1세부 모니터링 결과 및 제3협동 과거 분석자료 활용 - 통계적 방법 및 모니터링 결과에 대한 오염수준 정량화
		[제2협동 : (주)세니젠]  6종 식중독 세균 신속검출 특이 유전자 마커 탐색 및 multiplex real-time PCR Kit 최적 조건 확립	○ 위해 식중독 세균 6종에 대한 특이 유전자 마커 탐색 - NCBI에 등록된 유전자 정보를 활용하여 6종의 식중독 표준균주와 wild type 균주에 공통적으로 적용 가능한 타겟 유전자 및 마커 탐색  ○ 1시간 이내 multiplex real-time PCR Kit 최적조건 확립 - 식중독균 특이적 반응성 multiplex real-time PCR 용 프라이머/프로브 세트 개발 및 선정 - 식중독균 진단용 프라이머의 특이성 검증 및 multiplex real-time PCR kit의 최적조건 확립
		[제3협동 : 국립농산물품질관리원 시험연구소]  농산물 관련 재배부터 유통까지 risk factor 탐색 및 모니터링 자료 조사	○ 농산물 관련 재배에서 유통까지 risk factor 탐색 - 국내 농산물의 미생물학적 위해요소 탐색  ○ 과거 농산물에서의 미생물학적 모니터링 자료 조사 : 제1협동 연계 연구 - 문헌조사 및 과거 자체 모니터링 자료·제공
[제4협동 : (주)보레다바이오텍]  식중독 바이러스 5종 신속검출 PCR 최적조건 확립	○ 위해 식중독 바이러스 5종에 대한 신속검출 PCR 마커 탐색 및 최적조건 확립 - NCBI에 등록된 유전자 정보를 활용한 타겟 바이러스 유전자 및 마커 탐색 - 식중독 바이러스 신속검출을 위한 최적 PCR primer 제작 및 특이성 검증 - 실제 바이러스를 이용한 PCR 조건 확립		

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
2 차 년 도	2017	[제1세부 : 중앙대학교]  1차년도 모니터링 연구 지속적 수행 및 참여기관을 비롯한 유관기관 전문가 자문위원회 개최	○ 1차년도 모니터링 연구 지속적 수행 - 농산물 및 환경시료에서의 모니터링 [세균 6종 / 바이러스 5종]
		[위탁기관 : 경상대학교]  GAP 농산물 유해미생물 저감 장치 및 시설 보완 방안 제시	○ GAP 농산물에서 유해미생물 저감 장치 및 시설 보완 방안 확립 - 유해세균 및 유해바이러스 등 미생물 저감을 위한 국내· 외 장치 및 기술 조사·분석  ○ 유해세균 및 유해바이러스 등 미생물 저감을 위한 장치 및 시설의 보완 방안 제시 : 제1세부, 제3협동 연계 연구 - 미생물 저감을 위한 세척 시설 및 장치의 농가 적용 방 안 연구 - 세척장치 및 시설을 이용한 농작물 세척방법의 현장적용 법 및 세척수 재활용 방안 제시 - 최적 세척장치 및 시설 이용 후 농산물에서의 미생물 안 전성 검증 - 세척장치 및 시설을 적용한 신선농산물 품목별 GAP 미 인증 농장에 대한 GAP 계획서 개발
		[제1협동 : 군산대학교]  농산물 관련 미생물학적 안전성 평가를 위한 QMRA-동태 모델 개발	○ 안전성 평가를 위한 재배부터 유통까지 동태학적 (Fate & Transport) 모델 개발 - 베이지안 네트워크를 이용한 재배에서 유통단계까지 오 염원 및 동태학적 이동경로 조사·분석 및 모형 개발  ○ 동태학적 모델 기반 QMRA 활용 재배부터 유통까지의 미생물학적 (세균/바이러스) 안전성 평가 : 제3협동 연계 연구 - 정량적 미생물학적 위해평가(QMRA)를 이용한 농산물에 서 미생물학적 위해안전성 평가
		[제2협동 : ㈜세니젠]  위해 식중독 세균 6종 신속검출 전처리 방법 개선 및 multiplex real-time PCR Kit 개발	○ 식중독 세균 신속검출을 위한 중균배지 개발기술 활용 전처리 방법 개선안 도출 - 6시간 이내 증균할 수 있는 중균배지 개발기술 조사 및 적용평가  ○ 위해 식중독 세균 6종 동시 검출 multiplex real-time PCR kit개발 - 현재 구축된 Fluidigm사의 multiplex real-time PCR system 응용  ○ 중균 배지 기술과 multiplex real-time PCR 기술을 활용한 신속 검출 분석 평가 - 8시간 이내 6종의 식중독 세균의 분석 평가  ○ 개발기술을 활용한 multiplex real-time PCR 자동분석시스템 구축 - 식중독 세균 신속검출용 multiplex real-time PCR 키트 개발 및 이를 활용한 자동분석시스템 구축
		[제3협동 : 국립농산물품질관리원 시험연구소]  국내·외 농산물 안전관리 체계 및 실태 자료 조사	○ 국내·외 농산물 안전관리 체계 및 실태 자료 조사 : 제1협동 연계 연구 - 국내·외 신선편이 농산물 재배부터 유통까지 미생물학적 위해요소 및 안전관리 체계 분석



구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
		<p>[제4협동 : (주)보레다바이오텍]</p> <p>5종 식중독 바이러스 신속검출 전처리 방법 개선 및 래피드 PCR 키트 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 식중독 바이러스 탈리/농축기법 개발기술 활용을 통한 전처리 방법 개선안 도출 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 식중독 바이러스 선택적 농축을 자료 조사 및 적용 평가</li> <li>- 업체류 등의 농산물에서 상용화된 식중독 바이러스 탈리용액 적용</li> <li>- 신속검출을 위한 상용화된 항체필터 등을 활용한 식중독 바이러스 분리농축기술 적용</li> </ul> </li> <li>○ 위해 식중독 바이러스 신속검출용 래피드 PCR 키트 개발 및 최적화 조건 수립 <ul style="list-style-type: none"> <li>- PCR product 표지법 개발</li> <li>- 개발기술을 이용하여 신속검출 래피드 PCR 키트 개발</li> <li>- 다양한 polymerase 및 PCR 반응 버퍼를 사용하여 PCR 반응시간 단축 및 최적조건 확립</li> </ul> </li> </ul>

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
3 차 년 도	2018	<p>[제1세부 : 중앙대학교]</p> <p>개발된 신속검출 키트 field test 및 다소비 농산물 단계별 미생물학적 위생안전관리방안 개선안 확립</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 1-2차년도 모니터링 연구 지속적 수행</li> <li>○ AOAC/ISO validation 방법을 준용한 농산물 및 재배환경에서의 개발된 신속검출 kit 현장 적용 검증 : 제3협동 연계 연구 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 개발된 kit를 활용하여 다소비 농산물 및 재배환경에서의 유해미생물 민감도/특이도/검출한계 검증</li> </ul> </li> <li>○ 다소비 농산물 생산/보관/유통/소비 과정에서의 단계별 주요 미생물학적 위해요소 분석 및 개선방안 도출:위탁기관, 제1협동, 제3협동 연계 연구 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 모니터링 결과를 바탕으로 다소비 농산물 전단계에 걸쳐 미생물학적 위해요소 분석 및 위생안전관리방안 개선안 확립</li> </ul> </li> </ul>
		<p>[위탁기관 : 경상대학교]</p> <p>GAP 농산물 미생물학적 위생안전관리 개선방안 제시 및 GAP 시설 기준 보안 방안 제시</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 미생물학적 안전성 확보를 위한 GAP 시설의 지정 기준 보완 방안 제시</li> <li>○ GAP 농산물 품목별 미생물학적 위생안전관리 가이드라인 방안 확립</li> <li>○ 신선농산물 재배 농가의 GAP 적용 전·후의 미생물 안전성 비교 분석 <ul style="list-style-type: none"> <li>- GAP 농산물 처리 과정, 작업장 관리, 작업자 관리, 포장 및 유통 등 단계별 비교 분석</li> </ul> </li> <li>○ 우수농산물관리인증제도(GAP) 미생물학적 위생안전관리 개선 방안 확립 : 제1세부, 제1협동, 제3협동 연계 연구 <ul style="list-style-type: none"> <li>- GAP 농산물 재배부터 유통·소비까지 전 단계별 미생물학적 위해요소 조사·분석</li> <li>- GAP 농산물 미생물학적 위생안전관리 개선방안 제시</li> </ul> </li> </ul>
		<p>[제1협동 : 군산대학교]</p> <p>유해미생물 관리 우선순위 목록화 및 기준·규격, 위생안전관리방안 개선안 제안</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 농산물의 생물학적 유해미생물 관리 우선순위 목록화 <ul style="list-style-type: none"> <li>- QMRA 기반 위해수준을 이용한 농산물에서 유해미생물 관리 우선순위 제안</li> </ul> </li> <li>○ 재배부터 유통까지 위생안전관리 및 미생물학적 위해안심관리 방안 확립 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 위해수준에 근거한 미생물 안전기준 설정</li> </ul> </li> </ul>

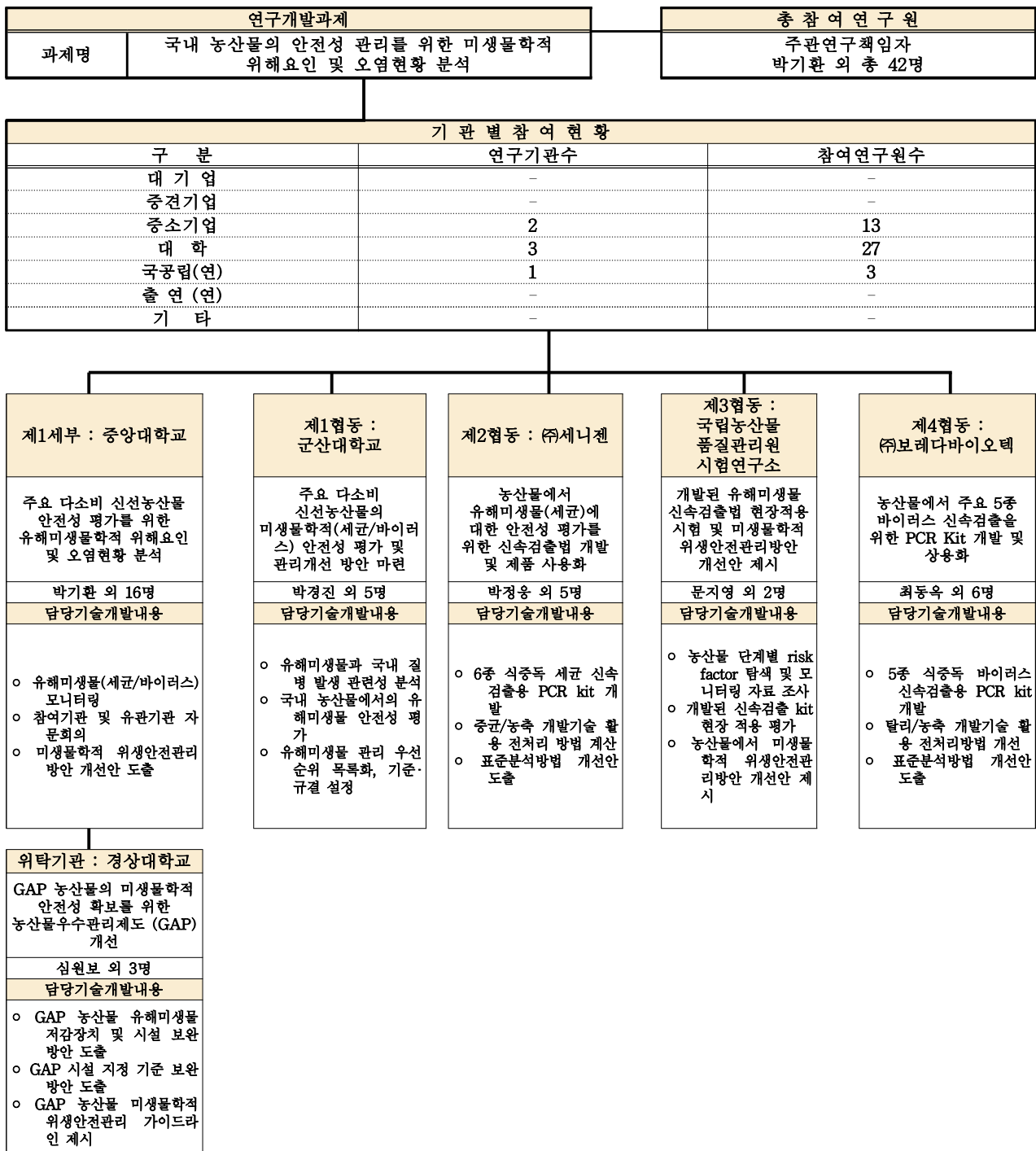
구분			
			<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Sampling plan 기법을 활용한 유해미생물 기준·규격 설정               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 제외국 농산물 미생물 안전관리 기준·규격 비교 검토</li> </ul> </li> <li>○ 농산물에서 미생물학적 위생안전관리방안 개선안 확립 : 제1세부, 위탁기관, 제3협동 연계 연구               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 제외국 농산물 미생물 안전관리 기준·규격 비교 검토</li> <li>- 모니터링 결과를 바탕으로 다소비 농산물 및 환경에서의 단계별 주요 위해요소 분석 및 관리 개선방안 확립</li> </ul> </li> </ul>
		<p style="text-align: center;">[제2협동 : ㈜세니젠]</p> <p style="text-align: center;">식중독 세균 신속검출 키트의 AOAC 인증 및 Field test</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 개발된 PCR 키트의 현장적용 평가를 위한 민감도 및 특이도 검사 : 제1세부, 제3협동 연계 연구               <ul style="list-style-type: none"> <li>- AOAC 방법을 준용한 농산물 및 재배환경에서의 민감도/특이도/검출한계/검출시간 분석: QC test/현장담당자 등</li> </ul> </li> <li>○ 개발 제품의 사용자 편의 제품 설명서 제작 및 표준분석방법 개선안 도출 : 제1세부, 제3협동 연계 연구               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 사용자 편의 제품 사용설명서 제작 및 표준분석방법 개선안 도출</li> </ul> </li> <li>○ 개발 기술의 상용화 및 수출기반 확립</li> </ul>
		<p style="text-align: center;">[제3협동 : 국립농산물품질관리원 시험연구소]</p> <p style="text-align: center;">유해미생물 표준분석방법 개선안 도출 및 미생물학적 위생안전관리방안 개선안 제시</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 농산물 신속분석법 현장 적용 평가 및 표준분석방법 개선안 도출 : 제1세부, 참여기업, 제2협동 연계 연구               <ul style="list-style-type: none"> <li>- AOAC/ISO 방법에 준용한 실제 농산물에서의 민감도/특이도/검출한계 분석 및 표준분석방법 개선방안 도출</li> </ul> </li> <li>○ 국내 농산물(GAP 포함)에서 미생물학적 위생안전관리방안 개선안 제시               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 제외국 농산물 미생물 안전관리 기준·규격 비교 검토</li> <li>- 모니터링 결과를 바탕으로 국내 농산물(GAP 포함) 및 재배환경에서의 단계별 주요 미생물학적 위생안전 관리 방안 개선안 제시</li> </ul> </li> </ul>
		<p style="text-align: center;">[제4협동 : (주)보레다바이오텍]</p> <p style="text-align: center;">개발된 바이러스 신속검출 키트의 AOAC 인증 및 Field test</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 개발된 PCR 키트의 현장적용 평가를 위한 민감도 및 특이도 검사 : 제1세부, 제3협동 연계 연구               <ul style="list-style-type: none"> <li>- ISO protocol을 준용한 농산물 및 재배환경에서의 민감도/특이도/검출한계/검출시간 검증</li> <li>- 검출하는 기관에서 QC test/현장담당자 등에 활용 : 검출효율 등을 실질적으로 평가</li> </ul> </li> <li>○ 개발 제품의 사용자 편의 제품 설명서 제작 및 표준분석방법 개선안 도출 : 제3협동 연계 연구               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 사용자 편의 제품 사용설명서 제작 및 표준분석방법 개선안 도출</li> </ul> </li> <li>○ 개발 제품의 상용화 및 수출기반 확립</li> </ul>

## 제 2 장. 연구수행 내용 및 결과

### 제 1 절. 연구개발의 추진전략·방법 및 추진체계

#### 1-1. 연구개발 추진전략·방법

##### 가. 참여 조직 및 역할



나. 주관연구기관 및 참여기관의 업무분장 및 공조 체계



- 연구총괄/네트워킹 : 중앙대학교
  - 연구총괄/참여기관(2개월) 개최
- 기술개발 : (주)보레다바이오텍/(주)세니젠
  - 유해미생물(세균/바이러스) 신속검출 PCR kit 개발
- 미생물학적 안전성 평가 : 중앙대학교/군산대학교/경상대학교
  - 국내 농산물(GAP 포함)에서의 미생물학적 안전성 평가
- 신속검출법 개선 : 중앙대학교/국립농산물품질관리원 시험연구소/(주)보레다바이오텍/(주)세니젠
  - 농산물에서 유해미생물(세균/바이러스) 신속검출을 위한 전처리 방법 개선 및 표준분석 방법 개선안 도출
- 관리체계 개선 : 중앙대학교/군산대학교/경상대학교/국립농산물품질관리원 시험연구소
  - 국내 농산물(GAP 포함)에서의 미생물학적 위생안전관리방안 개선안 도출
- 지원기관 : 농림축산식품부(식생활소비정책과)
  - 연구과제 수행을 위한 지원 및 결과물 활용

1-1-1. 제1세부기관[중앙대학교] 연차별 추진전략 및 방법



**[1차년도 제1세부 연구기관 연구과제 추진 전략 및 방법]**

가. 국내 농산물에서 미생물학적 안전성 평가를 위한 오염도 조사

- 주요 다소비 농산물에서 유해미생물(세균·바이러스) 모니터링을 위한 정성·정량 분석
  - 주요 다소비 농산물에서 유해세균 정성·정량 분석
  - 주요 다소비 농산물에서 유해바이러스 정성·정량 분석

나. 1-3차년도 참여기관 개최

**[2차년도 제1세부 연구기관 연구과제 추진 전략 및 방법]**

가. 1차년도에 이어 모니터링 연구 지속적 수행

**[3차년도 제1세부 연구기관 연구과제 추진 전략 및 방법]**

가. 1-2차년도에 이어 모니터링 연구 지속적 수행

나. AOAC/ISO validation method를 준용한 자연 감염 농산물에서의 개발된 kit의 현장검증

다. 다소비 농산물 생산/보관/유통/소비 과정에서의 주요 감염단계 분석과 위생안전관리 개선방안 확립

1-1-2. 위탁 연구기관[경상대학교] 연차별 추진전략 및 방법



**[1차년도 위탁 연구기관 연구과제 추진 전략 및 방법]**

- 가. 신선농산물(엽채류, 과채류, 근채류 및 과실류)의 주요 다소비 농산물 선정
- 나. 주요 다소비 신선농산물의 생물학적 위해요소조사
- 다. 현장방문조사(제3협동 협조)를 통한 발생원인 분석 및 관리개선 방안 마련

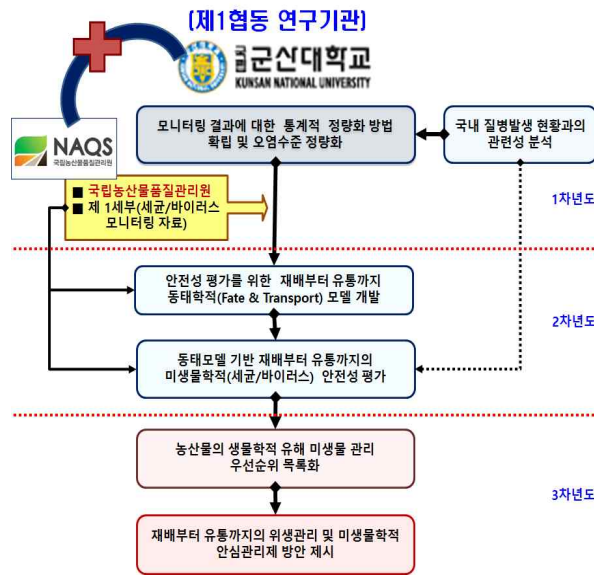
**[2차년도 위탁 연구기관 연구과제 추진 전략 및 방법]**

- 가. GAP 농산물에서 유해세균 및 유해바이러스 등 유해미생물 저감을 위한 장치 및 기술 조사
- 나. 유해세균 및 유해바이러스 등 유해미생물 저감을 위한 장치 및 시설의 보완 방안 제시

**[3차년도 위탁 연구기관 연구과제 추진 전략 및 방법]**

- 가. 미생물학적 안전성 확보를 위한 GAP 시설의 지정 기준 보완 방안 제시
- 나. GAP 농산물 품목별 미생물학적 위생안전관리 가이드라인 작성 (미생물학적 관리 개선 방안)
- 다. 주요 다소비 신선농산물 재배 농가의 GAP 적용 전·후의 미생물 안전성 비교 분석
- 라. GAP 인증 시 애로 사항 및 문제점 도출

1-1-3. 제1협동기관[군산대학교] 연차별 추진전략 및 방법



**[1차년도 제1협동 연구기관 연구과제 추진 전략 및 방법]**

- 가. 농산물 관련 미생물, 바이러스에 의한 국내 질병발생 현황과의 관련성 분석
- 나. 농산물에 대한 미생물학적 모니터링 결과에 대한 통계학적 오염수준 정량화

**[2차년도 제1협동 연구기관 연구과제 추진 전략 및 방법]**

- 가. 안전성 평가를 위한 재배부터 유통까지 동태학적(Fate & Transport) 모델 개발
- 나. 동태모델 기반 재배부터 유통까지의 미생물학적(세균/바이러스) 안전성 평가
- 다. QMRA의 단계별 진행

**[3차년도 제1협동 연구기관 연구과제 추진 전략 및 방법]**

- 가. 농산물의 생물학적 유해 미생물 관리 우선순위 목록화
- 나. 재배부터 유통까지의 위생관리 및 미생물학적 안심관리제 방안 제시
- 다. 미생물 안전관리 기준으로 적정 Microbiological Sampling Plan 제안
- 라. 농산물 안전관리 기준 설정
- 마. 잠정 결정된 Microbiological Sampling Plan에 대한 국제 기준과 비교
- 바. 식중독 발생 가능 시나리오를 통한 위생관리 방안 제안



1-1-4. 제2협동 연구기관[(주)세니젠] 연차별 추진전략 및 방법



[1차년도 제2협동 연구기관 연구과제 추진 전략 및 방법]

가. 대상 식중독 세균

구분	대상 식중독 세균
세균 (총 6종)	<i>E. coli</i> O157:H7, <i>B. cereus</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>S. aureus</i> <i>L. monocytogenes</i> , <i>Cl. perfringens</i>

나. 식중독 세균 6종에 대한 특이 유전자 마커 탐색

다. 2시간 이내 multiplex real-time PCR Kit 최적조건 확립

[2차년도 제2협동 연구기관 연구과제 추진 전략 및 방법]

가. 식중독 세균 신속검출을 위한 증균배지 개발기술 활용 전처리 방법 개선안 도출

나. 위해 식중독 세균 6종 동시 검출 multiplex real-time PCR Kit 개발

다. 증균배지 기술과 multiplex real-time PCR 기술을 활용한 신속검출 분석 평가

라. 개발 키트를 활용한 multiplex real-time PCR 자동분석시스템 구축

[3차년도 제2협동 연구기관 연구과제 추진 전략 및 방법]

가. 개발된 PCR 키트의 현장적용 평가를 통한 민감도 및 특이도 평가

나. 개발 제품의 사용자 편의 제품 사용설명서 제작 및 표준분석방법 개선안 도출

다. 개발 제품의 상용화 및 수출기반 확립



1-1-5. 제3협동기관[국립농산물품질관리원 시험연구소] 연차별 추진전략 및 방법



**[1차년도 제3협동 연구기관 연구과제 추진 전략 및 방법]**

- 가. 식중독 발생사례 자료로부터 농산물 관련 재배에서 유통까지 risk factors 탐색
- 나. 농산물에서 오염수준 정량화를 위한 과거 농산물에서의 유해미생물 모니터링 자료 조사·제공

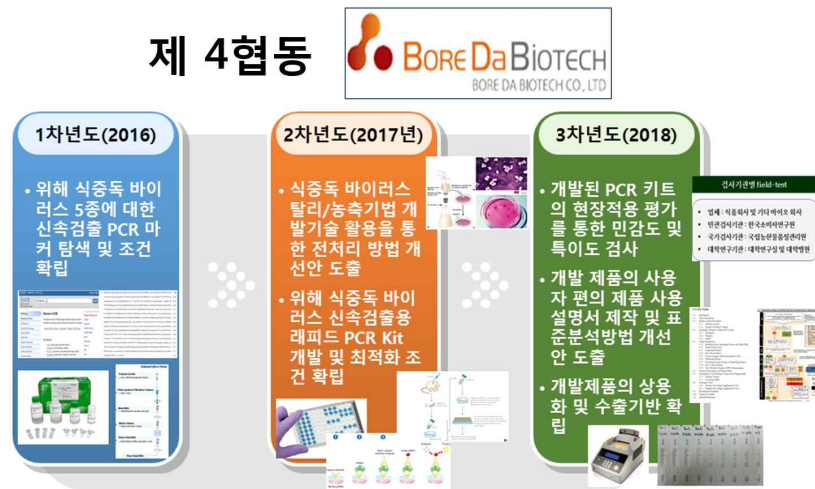
**[2차년도 제3협동 연구기관 연구과제 추진 전략 및 방법]**

- 가. 국내·외 농산물 안전관리 체계 및 실태조사

**[3차년도 제3협동 연구기관 연구과제 추진 전략 및 방법]**

- 가. 농산물 신속분석법 현장적용 평가 및 표준분석방법 개선방안 도출
- 나. 국내 농산물(GAP 포함)에서 미생물학적 위생안전관리방안 개선안 제시

1-1-6. 제4협동기관[(주)보레다바이오텍] 연차별 추진전략 및 방법



[1차년도 제4협동 연구기관 연구과제 추진 전략 및 방법]

가. 대상 바이러스

구분	위해 식중독 바이러스
바이러스 (총 5종)	Norovirus G1/G2, Hepatitis A virus, Adenovirus, Rotavirus, Astrovirus

나. 위해 식중독 바이러스 5종에 대한 신속검출 PCR 특이마커 탐색 및 조건 확립

다. 1시간 이내 유해바이러스 신속검출용 래피드 PCR 키트 개발을 위한 최적 PCR primer 제작 및 특이성 검증

라. 실제 바이러스를 이용한 PCR 조건확립

[2차년도 제4협동 연구기관 연구과제 추진 전략 및 방법]

가. 식중독 바이러스 탈리/농축기법 개발기술 활용을 통한 전처리 방법 개선안 도출

나. 위해 식중독 바이러스 신속검출용 래피드 PCR 키트 개발 및 최적화 조건 확립

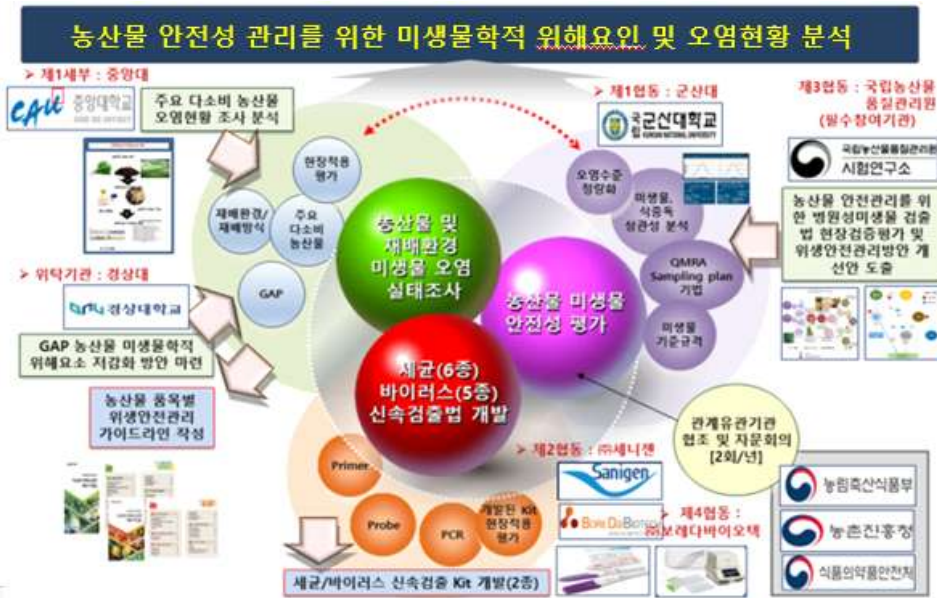
[3차년도 제4협동 연구기관 연구과제 추진 전략 및 방법]

가. 개발된 PCR 키트의 현장적용 평가를 통한 민감도 및 특이도 평가

나. 개발 제품의 사용자 편의 제품 설명서 제작 및 표준분석방법 개선안 도출

다. 개발 제품의 상용화 및 수출기반 확립

## 1-2. 연구개발 추진체계



### □ 제1세부 연구기관 : 중앙대학교

- 연구총괄 / 주요 다소비 신선농산물 안전성 평가 및 관리를 위한 유해미생물학적 위해요인 및 오염현황 분석

### □ 위탁연구기관 : 경상대학교

- GAP 농산물의 미생물학적 안전성 확보를 위한 농산물우수관리제도(GAP) 개선

### □ 제1협동 연구기관 : 군산대학교

- 국립농산물품질관리원 시험연구소와 연계하여, 주요 다소비 신선농산물의 미생물학적(세균/바이러스) 안전성 평가 및 관리개선 방안 마련

### □ 제2협동 연구기관 : (주)세니젠

- 농산물에서 주요 5종 식중독 세균의 신속검출을 위한 multiplex real-time PCR kit 개발 및 상용화

### □ 제3협동 연구기관 : 국립농산물품질관리원 시험연구소

- 제1세부, 위탁연구기관, 제1협동기관과 연계하여, 주요 다소비 농산물 및 GAP 농산물에서의 개발된 키트 현장적용 검증과 미생물학적 위생안전관리방안 개선안 도출

### □ 제4협동 연구기관 : (주)보레다바이오텍

- 농산물에서 주요 5종 바이러스의 신속검출을 위한 PCR kit 개발 및 상용화

## 제 2 절. 연구방법

### 2-1. 농산물 안전성 관리를 위한 미생물학적 위해요인 및 오염현황 분석

#### 1. 주요 다소비 농산물 재배부터 유통·소비까지 단계별 미생물학적 오염도 조사

##### 가. 농산물 및 환경시료에서의 모니터링 [세균 6종 / 바이러스 5종]

□ 국내 소비량이 높은 신선채소 12종을 선정하여 모니터링을 진행함

- 엽채류 : 배추, 상추
- 근채류 : 무, 감자, 당근, 열무
- 과채류 : 오이, 토마토, 방울토마토, 고추, 딸기
- 과실류 : 사과

□ 2016년 8월 - 2018년 9월 동안 국내 농산물 재배 농가를 방문하여 농산물, 토양 및 용수 등의 환경샘플을 수거함. 총 배추 73농가, 오이 18농가, 상추 14농가, 딸기 22농가, 고추 10농가, 토마토 10농가, 열무 8농가, 사과 3농가를 방문하였으며 추가로 국립농산물품질관리원 시험연구소에서 시료를 공급 받아 실험에 사용함

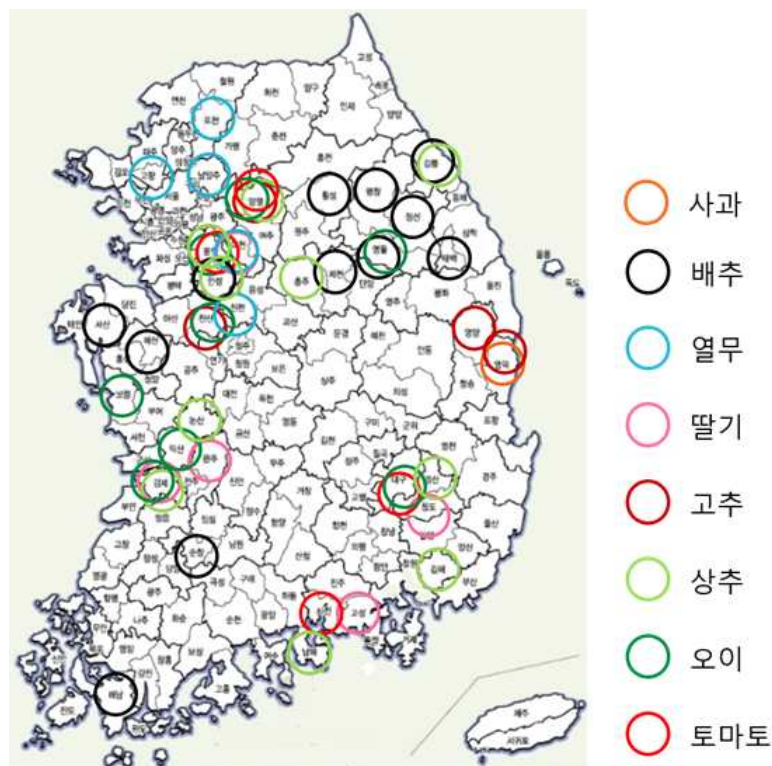


그림 2-1-1. 샘플 채취 지역

□ 각 지역별로 농산물 수확시기에 맞추어 모니터링을 수행함

- 농산물의 경우 재배 농가에서 수확 전 현장에서 채취하였으며 토양의 경우 농산물 경작지의 토양을 50mL 용량의 멸균튜브에 샘플을 채취함. 용수의 경우 농산물 재배농가 주변의 농업용수를 1L 씩 멸균 유리병 혹은 멸균된 일회용 채수병에 채취함
- 국내 유통되고 있는 농산물을 구매하여 실험에 사용함. 2016년 11월 - 2018년 9월 동안 배추 47건, 감자 13건, 당근 13건, 무 12건, 사과 12건, 방울토마토 12건, 열무 12건 미생물 분석을 진행함

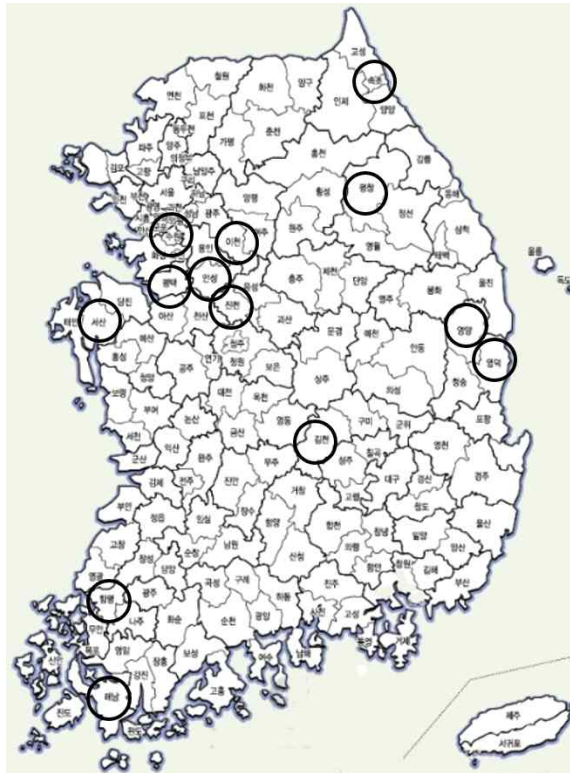


그림 2-1-2. 유통 샘플 채취 지역

- 각각의 농산물과 환경샘플은 일반세균으로 총균수, 대장균군, *E. coli* 및 곰팡이/효모를 정량평가 하였으며, 병원성 세균으로 *S. aureus*, *E. coli* O157, *Salmonella* sp., *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *C. perfringens*를 정성평가 하였음

(1) 농산물 샘플 준비

- 농산물 샘플 준비: 앞서 조사된 농산물 재배 농가에서 수확 전 농산물을 현장 구입하여 미생물의 분포에 대한 조사가 수행됨. 미생물의 오염을 조사하기 위하여 일정량을 각각의 증균 용액이 담긴 멸균백에 담은 후 미생물 조사에 이용함. 배추는 겉잎과 속잎을 구분하였으며 열무는 잎, 줄기, 뿌리를 구분하여 미생물 오염도를 평가함. 오이, 사과, 토마토, 방울토마토의 경우 한 가지를 멸균백에 담고 직접 손으로 2분 동안 stomacher하였음
- 용수 샘플 준비: 농산물 재배농가 주변의 농업용수 샘플을 1L 씩 멸균 유리병에 채취하여 미생물의 오염을 조사함. 용수의 미생물 오염도는 vacuum membrane-filtration method를 사용하여 조사됨
- 토양 샘플 준비: 농산물 경작지의 토양을 50 mL 용량의 멸균튜브에 가득 채워 샘플을 수



거함. 농산물의 준비 과정과 같이 일정량(10g 이상)을 각각의 증균용액 100 mL가 담긴 멸균백에 담고 다음의 미생물 조사에 이용함

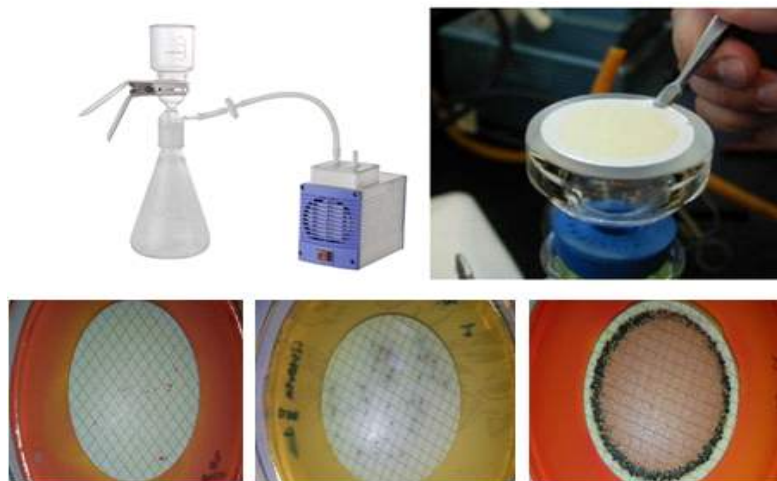


그림 2-1-3. 일반세균 및 병원성세균 분리 과정

## (2) 미생물 분석

### □ 총균수(Total aerobic bacteria) 측정

- 샘플을 희석액(peptone water) 100 mL과 섞은 뒤, stomacher를 이용하여 균질화(2분)한 다음, 희석액을 이용하여 균질된 샘플을 9 mL 희석액(peptone water)에 10배 희석법으로 희석하고, Total microbial load용 Petri-film(3M)에 분주하여 도말함. 32°C에서 48시간 동안 배양 후 균수를 측정함

### □ E. coli/대장균군(Coliform) 측정

- 희석액을 이용하여 균질된 샘플을 9 mL 희석액(peptone water)에 10배 희석법으로 희석

- 하고, *E. coli*/coliform용 Petri-film(3M)에 분주하여 도말함
- 37°C에서 24시간 동안 배양 후 균수를 측정함. 빨간색에 가스를 포함한 대장균 균과 파란색에 가스를 포함한 대장균(*E. coli*) 균수를 따로 측정함
  - 곰팡이/효모(Yeast/mold) 측정
    - 희석액을 이용하여 균질된 샘플을 9 mL 희석액(peptone water)에 10배 희석법으로 희석하고, Yeast/mold용 Petri-film(3M)에 분주하여 도말함
    - 25°C에서 72시간 동안 배양 후 균수를 측정함
  - 병원성 미생물(Food-borne pathogens) 검사
    - 병원성 미생물(*S. aureus*, *E. coli* O157, *Salmonella* sp., *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *C. perfringens* 등)의 오염 여부 및 오염 수준을 본 실험에서 조사함
    - 각각의 병원성 미생물은 오염여부를 파악하기 위하여 액체증균배지(표)를 이용하여 균질화한 뒤 배양기에서 증균 과정을 거친 후, 각각의 선택배지(표)에 도말하여 각각의 선택배지에서 전형적인 모양의 콜로니를 확인하며, 의심되는 집락에 대하여 확인시험(표)을 실시함
    - 오염여부가 확인되는 병원성 미생물들은 다시 제품에 오염된 수준을 검사하기 위하여 제품을 균질화 한 뒤, 선택 증균 과정을 거치지 않고 9 mL 희석액(Peptone water)에 10배 희석법으로 희석하여 각각의 선택배지에 도말하고 배양한 뒤 균수를 확인하도록 함
    - 각각의 미생물에 대한 확인시험에서는 아래 표에 보여주는 확인시험 이외에 현재 상업적으로 이용 가능한 신속검사법을 활용하여 조사할 수 있음
    - 농업용수의 병원성세균에 대한 오염여부를 파악하기 위하여 membrane-filtration method를 사용함. 용수 샘플 100 mL를 0.45  $\mu$ m membrane이 설치된 필터링장치로 천천히 흘려보내어 용수 내 존재할 수 있는 미생물을 농축함. 이후, membrane을 각각의 선택배지 위에 올려놓고 30-37°C에서 24시간 배양 후 균수를 측정함

표 2-1-1. 병원성 미생물의 조사에 이용되는 선택배지와 확인법 및 배양 조건

세균의 종류	선택증균배지 (selective broth)	선택고체배지 (selective agar)	확인법 (confirmation)	배양 조건
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	mEC media	MacConkey Sorbitol agar	Latex agglutination test kit, API test Real Time PCR	37°C, 24h
<i>Salmonella</i> spp.	Rappaport-Vassiliadis medium	Xylose Lysine Desoxycholate agar	Biochemical test, coagulation test, API test Real Time PCR	37°C, 24h
<i>Listeria monocytogenes</i>	UVM-modified <i>Listeria</i> Enrichment broth	Oxford Agar base with <i>Listeria</i> oxford supplement	hemolysis, motility, catalase, CAMP test, API test, Real Time PCR	37°C, 24-48h
<i>Staphylococcus aureus</i>	Mannitol Salt agar with egg yolk	Baird-Parker agar	Coagulase test, API test Real Time PCR,	37°C, 24h
<i>Bacillus cereus</i>	Robertson's Cooked Meat medium	<i>Bacillus cereus</i> selective agar	Biochemical tests, API test, Real Time PCR	37°C, 24h
<i>Clostridium perfringence</i>	Peptone-Glucose-Yeast extract broth	Tryptase-sulphite-cycloserine agar	TSC supplemented with egg yolk	37°C, 24h, 혐기적 배양

(3) 검출미생물 확인 검사

□ 각각의 선택배지에서 양성을 나타내는 집락을 따로 취해 16S rRNA sequencing을 의뢰함

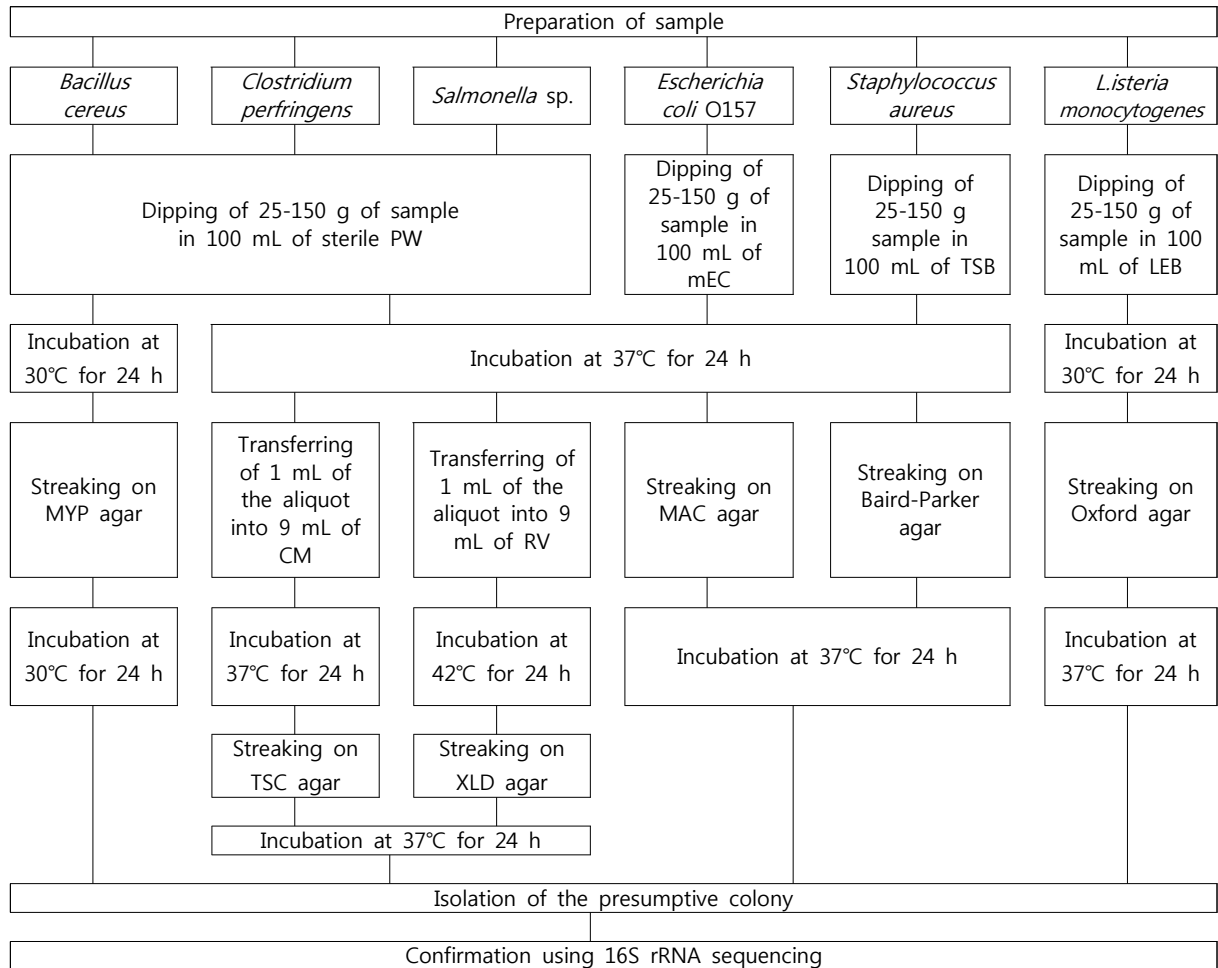


그림 2-1-4. Schematic diagrams for detecting pathogenic bacteria in fresh produce and farming field (MFDS, 2016). PW, peptone water; mEC, modified *Escherichia coli* broth with novobiocin; TSB, tryptic soy broth containing 10% NaCl; LED, *Listeria*-enrichment broth; MYP, mannitol egg yolk polymyxin agar; CM, cooked meat broth; RV, Rappaport-Vassiliadis enrichment broth; MAC, modified MacConky agar; Oxford, Oxford-*Listeria* agar; TSC, tryptose sulfite cycloserine agar; XLD, xylose lysine deoxycholate agar.

(3) ISO표준시험법에 따른 농산물의 바이러스 검사(ISO/TS 15216-1)

: 그 밖의 농산물 이외의 샘플에 대한 바이러스 회수/농축법은 표준검사법에 준함

(가) 농산물(엽채류, 과채류, 근채류 및 과실류 등)에서의 바이러스 회수/농축

- 1) 시료 (25±0.3) g (2.5 cm x 2.5 cm x 2.5 cm)를 400 ml mesh filter bag로 옮김
- 2) (40±1) ml TGBE buffer와 (10±0.1) µl process control virus material (8.2.1) 추가
- 3) 실온에서 60 oscillations min<sup>-1</sup>, (20±1)분 동안 교반
- 4) ※ 산성 soft fruits의 경우, 교반하는 동안 10분 간격으로 용출액의 pH를 조사하여, pH가 9.0 밑으로 떨어지면 NaOH로 9.5±0.1로 조정. pH를 조정하게 되면 교반기간을 10분씩 늘림. centrifuge tube로 filter된 용출액을 옮김.



- 5) 10000×g, (30±5)분, (5±3) °C에서 원심분리
- 6) 상층액을 깨끗한 용기에 따르고 pH 7.0±0.5로 조정 (with HCl).
- 7) 0.25 volumes의 5x PEG/NaCl solution (final 농도가 100 g/l PEG 0.3 mol/l NaCl가 되도록)를 추가한 후, (60±5)초 동안 shaking하여 균질화한 후 60 oscillations min<sup>-1</sup>, (5±3) °C, (60±5)분 동안 교반
- 8) 10000×g, (30±5)분, (5±3) °C에서 원심분리
- 9) 상층액을 버리고 pellet을 압축하기 위해 10000×g, (5±1)분, (5±3) °C에서 원심분리
- 10) 상층액을 버리고 pellet을 (500±10) µl PBS로 재 부유
- 11) Salad vegetables에서 추출할 경우, 알맞은 tube에 부유물을 옮겨서 RNA 추출을 진행
- 12) soft fruits에서 추출할 경우 chloroform-resistant centrifuge tube에 부유물을 옮기고, (500±10) µl chloroform/butanol mixture 추가하여 vortex한 후, 상온에서 5분간 정치
- 13) Centrifuge at 10000×g for (15±1) min at (5±3) °C. aqueous phase to a fresh tube에 옮긴 후 RNA extraction

#### (나) RNA extraction

##### □ MiniMAG SYSTEM을 통한 RNA extraction

- 1) RNA추출물 (500±10) µl에 lysis buffer (2±0.1) ml 넣은 뒤 vortex 후 RT 조건에서 10분간 반응.
- 2) 1500×g에서 3분간 원심분리 후 상층액을 1.5 ml micro centrifuge tube에 옮김
- 3) (50±2) µl magnetic silica를 넣고 vortex 후 RT 조건에서 10분간 반응
- 4) 1500×g에서 (120±10)초간 원심분리 후 상층액을 제거 후 Wash buffer 1을 (400±10) µl 넣어 pipetting or vortexing
- 5) Automated wash Step of miniMAG system을 이용하여 (30±2)초간 세척 후 상층액을 제거
- 6) Wash buffer 2를 (500±10) µl을 넣어 automated wash Step of miniMAG system에서 (30±2)초간 세척 후 상층액을 제거 후 다시 Wash buffer 2 (500±10) µl를 반복
- 7) Wash buffer 3을 (500±10) µl을 넣은 후 automated wash Step of miniMAG system에서 (15±1)초간 세척. 상층액을 제거 후 Elution buffer (100±2) µl을 넣어 (60±1) °C (5±0.5)분간 1400 oscillations min<sup>-1</sup> 반응
- 8) Magnetic rack을 이용하여 silica를 제외한 eluate를 clean tube에 옮김

##### □ RNeasy minikit (Qiagen)을 사용하여 바이러스 RNA 추출

- 1) 300~500 µl의 바이러스 농축액에 Buffer RLT 600 µl를 넣어주고 full speed로 3분간 원심분리 후 상층액을 1.5ml tube에 옮겨 70%에탄올 1vol을 첨가
- 2) RNeasy spin column에 위의 혼합액 700ul씩 넣고, 8000~10000 rpm에서 15초간 원심분리 후 flow-through을 제거
- 3) RNeasy spin column에 buffer RW1 700ul을 넣고 8000~10000 rpm에서 15초간 원심분리 한 후 flow-through을 제거
- 4) RNeasy spin column에 buffer RPE 500ul을 넣고 8000~10000 rpm에서 15초 동안 원심분리 후

- flow-through을 제거. 같은 방법으로 RPE 500ul을 넣고 8000~10000 rpm에서 2분 동안 원심분리
- 5) 새로운 tube로 교체한 후 full speed로 1분간 원심분리
  - 6) RNeasy spin column을 1.5 ml tube에 넣고 spin column membrane에 RNase free water 30~50 μl 첨가 후, 8000~10000 rpm에서 1분간 원심분리

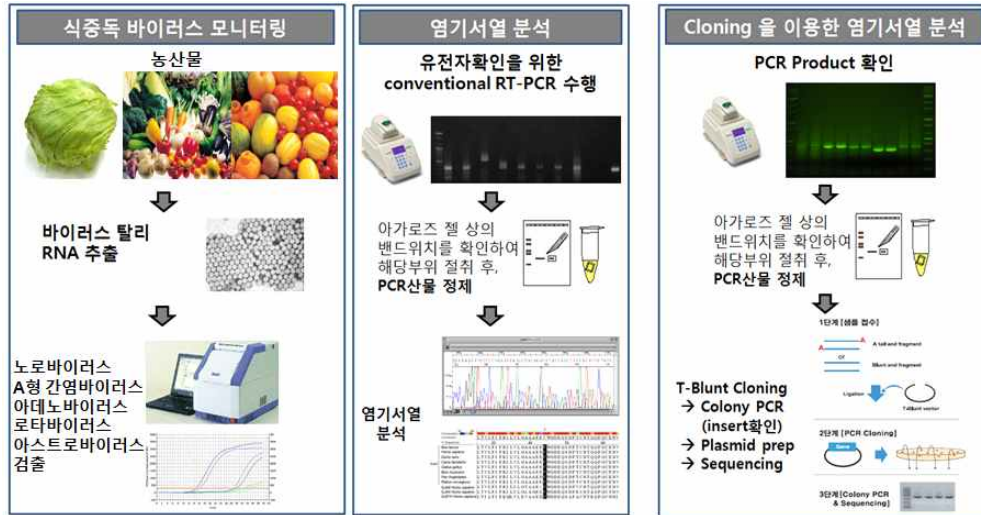
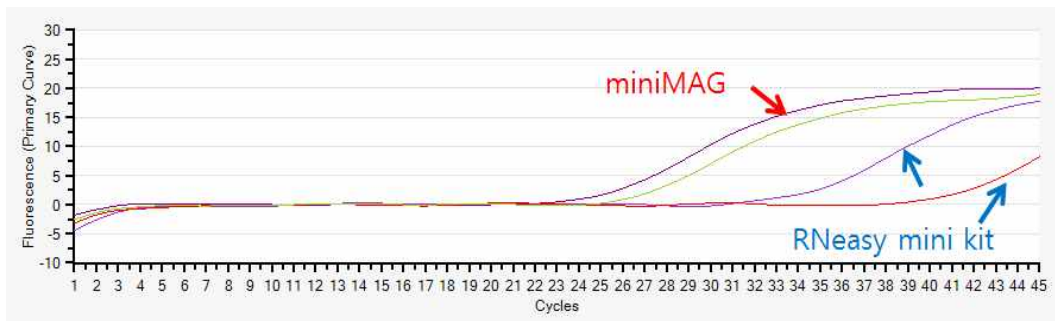


그림 2-1-5. 식중독 바이러스 모니터링 방법

□ MiniMAG SYSTEM과 RNeasy minikit(Qiagen) RNA extraction 비교 실험

- 식약처와 ISO에서 사용하고 있는 viral RNA 추출법인 MiniMAG SYSTEM (Biomerieux)과 RNeasy mini kit (Qiagen)의 추출효율을 murine NoV를 이용하여 비교하였음. 위의 두 가지 방법으로 추출한 RNA에 real-time PCR을 비교한 결과, miniMAG SYSTEM을 사용한 경우 Ct 값이 26~27로 RNeasy mini kit를 사용하였을 때보다 9이상 Ct값이 차이남. Magnetic silica를 이용한 miniMAG SYSTEM이 식품 중 유리되는 PCR inhibitor를 제거함에 따라서 더 높은 검출감도를 가짐을 확인할 수 있었고, ISO 시험법에 명시된 miniMAG SYSTEM을 이용하여 RNA 추출하였음

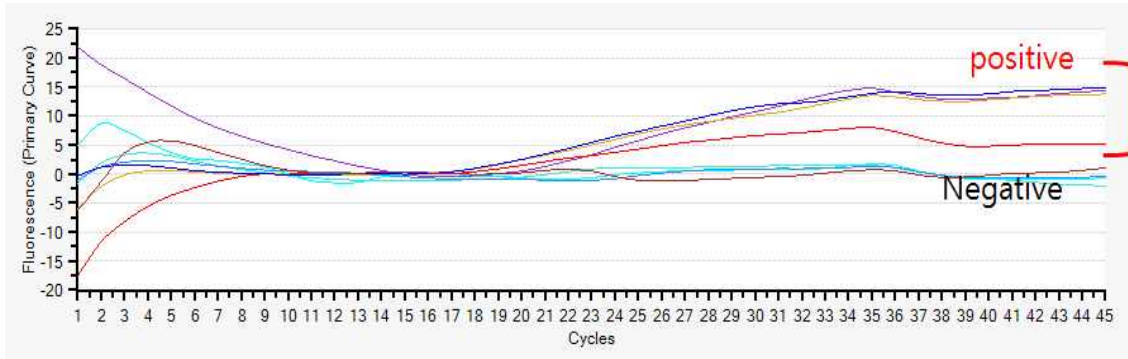


(4) 식중독바이러스별 Real-Time PCR 및 sequencing 조건

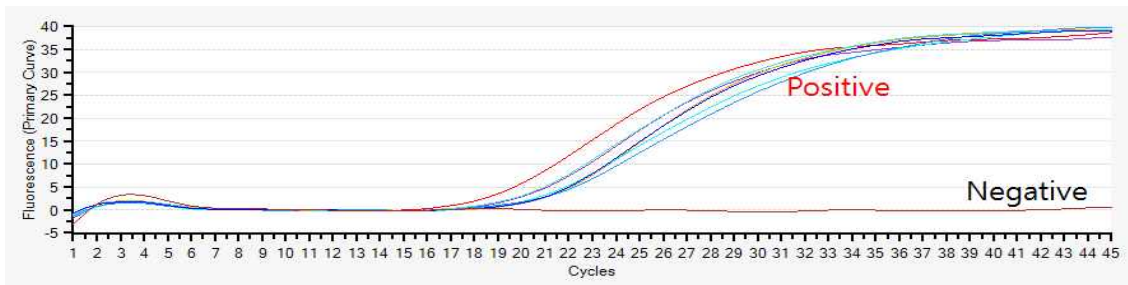
(가) Primer sensitivity 비교 실험

- 본 연구사업의 선정 당시에는 ISO 표준시험법에 사용되는 HAV primer, probe set를 사용하기로 하였으나, realtime PCR의 결과가 아래의 그림과 같이 Primary Curve의 변동이

심하며, 민감도가 다소 떨어지는 경향이 확인되었음



- 따라서 Jothikumar et al., (2004)가 보고한 primer, probe를 사용하여 민감도 비교 실험을 수행하였음. 그 결과 ISO Primer, probe set보다 민감도가 높음을 확인하여 향후 HAV 검출실험에는 Jothikumar 논문의 프라이머를 사용하였음



- 식중독 바이러스 검출 민감도 등을 고려하여 아래와 같이 프라이머 세트를 제작 사용하였음

표 2-1-2. Primers and probe sets of real-time PCR for norovirus (HuNoV) geno group I (GI), genogroup II (GII), hepatitis A, rotavirus, astrovirus, adenovirus and murine norovirus

virus	primer/probe	oligonucleotide sequence(5'→3')	reference
HuNoV GI	QNIF4	5'-CGCTGGATGCGNTTCCAT-3'	ISO
	NV1LCR	5'-CCTTAGACGCCATCATCATTTAC-3'	
	NVGG1p	5'-FAM-TGGACAGGAGAYCGCRATCT - TAMRA-3'	
HuNoV GII	QNIF2	5'-ATGTTTCAGRTGGATGAGRTTCTCWGA-3'	ISO
	COG2R	5'-TCGACGCCATCTTCATTCACA-3'	
	QNIFs	5'-FAM-AGCACGTGGGAGGGCGATCG-TAMRA-3'	
HAV	Forward.P	5'-GGT AGG CTA CGG GTG AAA C -3'	Jothikumar et al., 2004
	Reverse.P	5'-AACAACTCACCAATATCCGC -3'	
	HAV Probe	5'-FAM-CTTAGGCTAATACTTCTATGAAGAGATGC-TAMRA-3'	
RotaV	MVP3-FDeg	5'-ACCATCTWCACRTRACCCTC-3'	MFDS
	MVP3-R1	5'-GGTCACATAACGCCCTATA-3'	
	NVP3-Probe	5'-FAM-ATGAGCACAATAGTTAAAAGCTAACACTGTCAA-TAMRA-3'	

Astro V	AstV F	5'-CCDGCCAGRCTCACAGAAGAG-3'	MFDS
	AstV R	5'-GACTTGCTAGCCATCACACTYC-3'	
	AstV Probe	5'-FAM-ACTCCATCGCATTTGGAGGGGAGGACC-TAM RA-3'	
Adeno V	JTVFF	5'-AACTTTCTCTCTTAATAGACGCC-3'	MFDS
	JTVFR	5'-AGGGGGCTAGAAAACAAAA-3'	
	JTVFAP	5'-FAM-CGAAGAGTGCCCGTGTGTCAGC-BHQ-3'	
Murine NoV	MNV 5036	5'-ACGCTCAGCAGTCTTTGTGA-3'	MH LEE et al., 2015
	MNV 5088	5'-CTGGCCTCAGAGCCATTG-3'	
	MNV 5060	5'-FAM-CGCTGCGCCATCACTCATCC-TAMRA-3'	

\*murine norovirus는 process control virus material로 사용

(5) 미국 EPA(Environmental Protection Agency) 지침에 따른 Coliphage 검사 (Method 1601: Male-specific (F<sup>+</sup>) and Somatic Coliphage in Water by Two-step Enrichment Procedure)

- Host Bacteria를 준비하기 위하여 항생물질이 첨가된 TSB에 host bacteria를 접종하고 log phase가 될 때까지 36±1.0℃ 배양 (520nm 파장에서 optimal density(OD) units가 0.1-0.5에 도달시킴)

표 2-1-3. Host bacteria and antibiotic solution of coliphage

Coliphage	male-specific coliphage (MS2-ATCC#15597-B1)
Host bacteria	E coli Famp (ATCC#700891)
Antibiotic solution	ampicillin + streptomycin

- 샘플 100ml 당 아래의 표4와 같이 MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, log-phage *E.coli* Famp, 10X TSB, 항생제를 첨가하여 잘 섞은 후 36±1.0 °C에서 16~24시간. Host bacteria가 함유된 spot plate에 접종하여 30~60분간 흡수 시킨 뒤 36±1.0°C에서 16~24시간 배양하여 lysis zone의 형성유무를 확인

표 2-1-4. Composition of two-step enrichment procedure

구성	부피 (ml)
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1.25
Log-phage <i>E.coli</i> Famp	0.5
Sterile 10X TSB	5
Stock ampicillin and streptomycin solution (0.15g/100 ml of ampicillin and streptomycin)	1

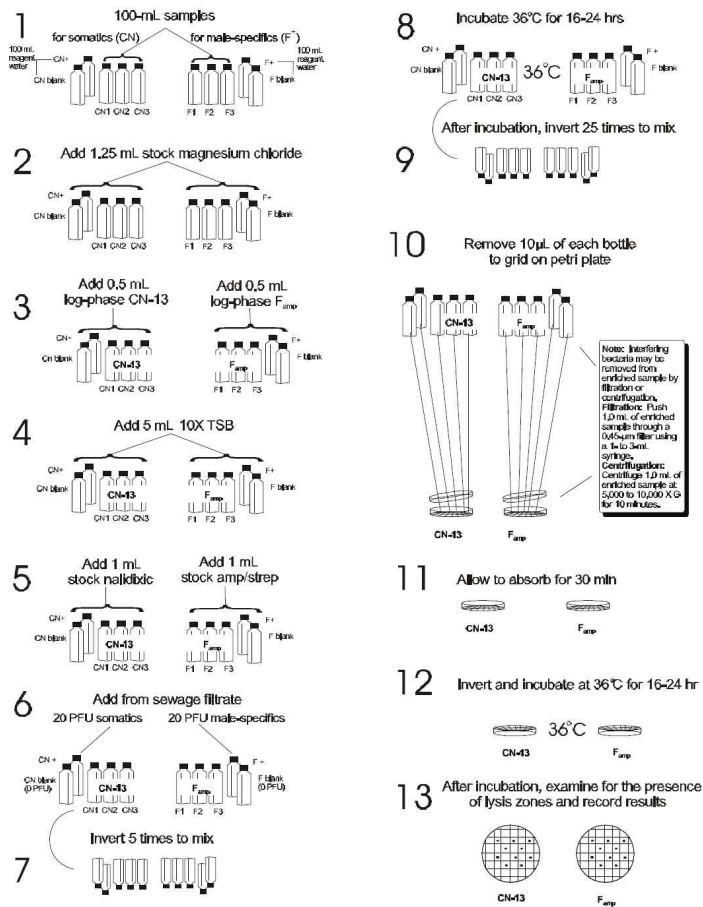
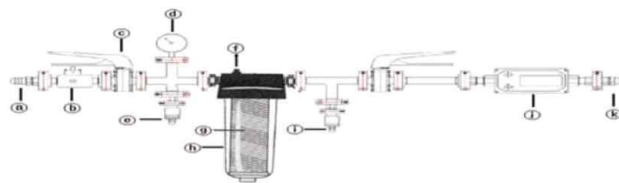


그림 2-1-6. Two-step enrichment procedure for 100 ml samples

(6) 식품용수 속 바이러스 검사법 (식품의약품안전처의 식중독 원인조사 검사지침)

☐ 식품용수 시험법에 준하여 검체 채수 과정 후 바이러스 탈리 및 농축



- Ⓐ용수 유입구 Ⓑ단일주입기 Ⓒ유량조절밸브 Ⓓ압력계이지 Ⓔ탈리액 주입구
- Ⓕ감압단추 Ⓖ양전하 카트리지 필터 Ⓗ카트리지 하우징 Ⓘ탈리액 유출구
- Ⓛ유량계 Ⓚ용수 유출구

그림 2-1-7. 표준 필터장치

(가) 탈리 과정

- 1) 냉장 보관 한 필터는 최대 72시간이 넘지 않도록 하여 탈리액 주입구에 연동정량펌프 호스를 연결한 후 1.5% Beef extract 용액이 채워져 있는 유리병에 호스를 연결
- 2) 탈리액 유출구에 유출용 호스를 연결하여 1.5% Beef extract 용액이 들어 있는 유리병에 넣고 탈리액 유출구를 닫음

- 3) 연동정량펌프를 가동하여 양전하 카트리지가 필터 하우스 안으로 1.5% Beef extract 용액이 양전하 카트리지가 필터 내에 완전히 차도록 한 후 감압단추를 통해 1.5% Beef extract 용액이 넘쳐흘러 나오기 시작하면 감압단추에서 손을 떼고, 연동정량펌프 가동을 멈춘 후 5분간 정치  
※ 감압단추는 탈리액이 양전하 카트리지가 필터 안으로 가득 채워질 때까지 누름
- 4) 탈리액 유출구를 열고 연동정량펌프를 다시 가동한 후 하우스에 채워져 있는 1.5% Beef extract 용액이 서서히 필터를 통과하도록 하되, 탈리액을 회수 시에는 거품이 없도록 주의
- 5) 유리병에 수집된 탈리액은 2)~4) 과정을 2회 반복
- 6) 최종 탈리액은 1M 염산 용액으로 pH를 7.0~7.5 사이로 조절
- 7) 탈리액은 24시간 이내로 농축시험 가능 시 4°C보관, 즉시 시행하기 어려울 시 -70°C에서 보관

(나) 농축과정

- 1) 최종 탈리액을 교반기에서 혼합하여 1M 염산용액으로 pH를 3.5±0.1로 조절한 후, 실온에서 30min간 천천히 섞음
- 2) 침전물이 생기면 탈리액을 멸균한 원심분리기에 옮겨 원심분리 (2500G, 15분, 4°C)
- 3) 원심분리 후, 상등액 제거하고 남은 침전물에 0.15M sodium phosphate 완충액을 20~30ml 넣어 부유시킨 후 실온에 10분간 방치
- 4) 부유시킨 용액을 7,000G, 10분 4°C에서 원심분리
- 5) 상등액을 1M 염산용액으로 pH 7.0~7.5로 조절
- 6) 미생물 오염 방지하기 위해 0.22µm 주사기 필터로 여과(사전에 바이러스가 필터에 흡착되는 것을 방지 위해 0.22µm 주사기 필터에 10~20ml의 Beef extract 용액을 통과)
- 7) 검체를 24시간 이내 분석할 경우 4°C에 보관하고 나머지는 분석 전까지 -70°C에 보관
- 8) 최종 농축검체 20~30ml는 유전자 추출을 위한 검체로 사용

## 2-2. GAP 농산물의 미생물학적 안전성 확보를 위한 농산물우수관리제도(GAP)개선

### 1.. 작물별 GAP 인증현황 조사 및 대표 GAP 농산물 선정

#### □ 작물별 GAP 인증 현황 조사 및 대표 GAP 농산물 선정

- GAP 인증 현황 통계자료(GAP정보서비스; <http://www.gap.go.kr>)를 바탕으로 GAP인증 주요 신선농산물 조사
- 신선농산물(상추, 오이, 배추)의 지역별 GAP인증현황 조사 결과를 바탕으로 추가 대상 신선농산물 선정하였음

### 2. 신선농산물 GAP 인증 미인증 농가의 재배환경과 신선농산물의 미생물학적 위해요소 모니터링

#### □ 일반세균, 대장균 및 대장균군 Petri film을 이용하여 미생물학적 분석을 통한 모니터링을 실시하였음

#### □ 전처리 및 미생물학적 분석실험은 식품공전상의 방법을 이용하여 결과를 확인하였음

#### □ 상추농장 미생물모니터링(1차년도)

- 현장방문 한 상추농가는 총 4곳, 그 중 GAP 인증 농가는 1곳이며 GAP 미인증 농가는 3곳으로 샘플링은 상추와 용수, 토양, 작업도구(모종삽)에 대하여 미생물학적 평가를 실시하였으며, 농장특성상 가능한 지역에 대해 샘플링을 진행하였음

#### □ 배추농장 미생물모니터링(1차년도)

- 현장방문 한 배추농가는 총 1곳으로 GAP 미인 농가에서 샘플링은 배추와 용수, 토양, 장갑에 대하여 미생물학적 평가를 실시하였으며, 농장특성상 가능한 지역에 대해 샘플링을 진행하였음

#### □ 딸기농장 미생물모니터링(2, 3차년도)

- 현장방문 한 딸기농가는 총 15곳, 그 중 GAP 인증 농가는 5곳이며 GAP 미인증 농가는 10곳으로 샘플링은 딸기와 용수, 토양, 장갑, 작업도구(바구니)에 대하여 미생물학적 평가를 실시하였으며, 농장특성상 가능한 지역에 대해 샘플링을 진행하였음

#### □ 오이농장 미생물 모니터링(1, 2차년도)

- 현장방문 한 오이농가는 총 13곳, 그 중 GAP 인증 농가는 1곳이며 GAP 미인증 농가는 12곳으로 샘플링은 오이와 용수, 토양, 장갑, 작업도구(집게)에 대하여 미생물학적 평가를 실시하였으며, 농장특성상 가능한 지역에 대해 샘플링을 진행하였음

#### □ 토마토농장 미생물 모니터링(2, 3차년도)

- 현장방문 한 토마토농가는 총 7곳, 그 중 GAP 인증 농가는 3곳이며 GAP 미인증 농가는 4곳으로 샘플링은 토마토와 용수, 토양, 장갑, 작업도구(원예가위), 컨베이어벨트에 대하여 미생물학적 평가를 실시하였으며, 농장특성상 가능한 지역에 대해 샘플링을 진행하였음

#### □ 고추농장 미생물 모니터링(2, 3차년도)

- 현장방문 한 고추농가는 총 10곳, 그 중 GAP 인증 농가는 1곳이며 GAP 미인증 농가는 9곳으로 샘플링은 고추와 용수, 토양, 장갑, 작업도구(집게)에 대하여 미생물학적 평가를 실시하였으며, 농장특성상 가능한 지역에 대해 샘플링을 진행하였음

### 3. 현장방문조사를 통한 미생물학적 위해요인 발생원인 분석 및 위생안전관리 개선 방안 마련

- 샘플링을 실시한 딸기, 오이, 토마토, 상추, 고추 GAP 인증·미인증 농가를 대상으로 개인 위생 및 작업도구 위생관리, 주변 환경조사를 통한 위해요소 발생 가능성에 대해서 전반적으로 조사하였고 농장주 인터뷰를 실시하였음
- 모니터링 결과를 토대로 방문한 농가에 대해 작업 중의 작업자의 개인위생, 작업도구의 위생관리방안과 GAP 인증과 GAP 미인증 농가의 주변 환경에 의한 위해요소 발생원인과 개선방안에 대해 작성하였음

### 4. 유해미생물(세균 및 바이러스) 저감을 위한 국내의 장치 및 기술 조사

- 식품의약품안전처의 식품 중 위해 세균 저감화사업 연구보고서(2007) 및 발표 된 논문 등을 중심으로 신선농산물의 미생물 저감화를 위한 방안을 조사하였음



그림 2-2-1. 비세척 신선농산물의 저감화 방법

### 5. 신선농산물 재배현장 중심의 미생물 저감화 방안모색(딸기, 고추 농장을 중심으로)

- 수확단계에서 작업도구(작업자의 장갑)의 주기적인 교체를 통한 미생물 예방 및 저감화
  - 대부분의 신선농산물은 생산농가나 수확 후 관리시설에서 세척을 하지 않고 유통하는 것으로 조사되어 미생물의 오염을 저감할 수 있는 단계로 세척은 적절하지 않다고 판단하였음
  - 그러므로 기존의 화학적·물리적 저감화 방안 대신 신선농산물 재배 농가현장에서 실천할 수 있는 미생물 저감화 방안을 모색하고자 하였음
  - 신선농산물의 재배단계에서는 외부환경과 차단 또는 분리를 할 수 없는 상황이기 때문에 수확 및 수확 후 단계의 위생관리 위주의 저감화 방안을 모색하였음
  - 농가에서는 수확 및 선별 등의 수확 후 단계에 작업 장갑 및 수확용 바구니 등을 사용하였고 이에 대한 위생관리를 통해 미생물의 오염을 예방하는 연구를 수행하였음
  - 그러므로 작업자 장갑의 주기적인 교체에 의한 미생물의 오염을 예방하고자 하였음
  - 주기적인 장갑의 교체를 통해 얻은 사용한 장갑과 신선농산물에 대해 일반세균, 대장균



및 대장균군, 효모/곰팡이 3M Petri film을 사용하였으며, 전처리 및 미생물학적 분석실험은 식품공전상의 방법을 이용하여 결과를 확인하였음

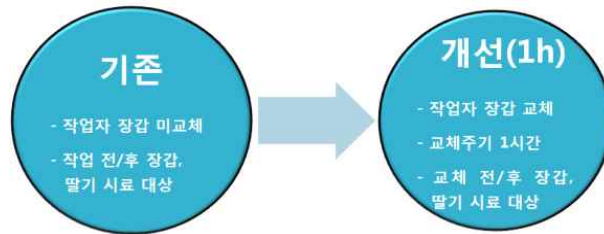


그림 2-2-2. 장갑의 교체적인 주기 방법

□ 장갑의 재사용을 위한 세척법(세제, 락스, 비눗물, 수돗물, 삶는 방법 이용)의 사후관리 적용

- 사용된 장갑의 미생물을 효과적으로 제거할 수 있는 위생적인 세척방법으로 세제, 락스, 비눗물, 수돗물, 삶는 방법을 사용하여 실험을 실시하였음
- 일반세균, 대장균 및 대장균군, 효모/곰팡이 3M Petri film을 사용하였으며, 전처리 및 미생물학적 분석실험은 식품공전상의 방법을 이용하여 결과를 확인하였음



그림 2-2-3. 장갑의 재사용을 위한 세척법의 사후관리 적용 실험방법

## 6. 신선농산물 유통 및 저장단계의 미생물 저감화 방안모색

□ 유통 중 보관온도에 따른 미생물 저감효과 확인(냉장, 실온)

- 70 % 알코올로 소독한 딸기에 LB 배지에 딸기로부터 얻은 일반세균을 증균 시킨 후 1-5일 동안 미생물학적 분석을 실시하였음
- 일반세균, 대장균 및 대장균군, 효모, 곰팡이 Petri film을 사용하였으며, 전처리 및 실험은 식품공전상의 방법으로 분석하여 결과를 확인하였음



그림 2-2-4. 유통 중 보관온도에 따른 미생물 저감 확인 실험방법

□ 소형 플라즈마 발생장치를 이용한 수확 및 유통과정의 저감효과 확인

- 모니터링 결과 대부분의 신선농산물이 세척단계 없이 유통되는 것으로 확인되었음
- 그러므로 세척이 불가능한 신선농산물에 대해 비세척을 통한 미생물 저감화 방안을 조사하는 중 국내 기업 ‘(주)아이엠헬스케어’에서 판매하고 있는 Dr. USB 제품(그림 2-2-5)이 공기뿐만 아니라 접촉면에 대해 바이러스, 박테리아, 곰팡이 등에 살균효과가 있는 것으로 소개하고 있었음



그림 2-2-5. 플라즈마 발생장치

- ㈜아이엠헬스케어에서 제시하고 있는 Dr. USB의 살균효과는 아래 표 2-2-1과 같으며, 바이러스와 일부 식중독 균에 대한 살균효과가 99.8% 이상인 것으로 확인되었음

표 2-2-1. 플라즈마 발생장치 시험성적서

항목	오염원	효과	검증기관
항 바이러스	독감 Inﬂuenza A virus (H1N1)	99.2% 제거	Kitasato Univ.(Japan)
	고양이 바이러스 (Feline Adenovirus)	99.2% 제거	
	신종플루(H5N1_inﬂuenza A subtype)	99.9% 제거	Microbiotest(USA)
	조류독감(H7N9_Avian inﬂuenza)	99.9% 제거	
	코로나바이러스(Human Coronavirus)	99.9% 제거	
	지카바이러스(ZIKA Virus)	99.9% 제거	
항균	대장균	99.8% 제거	한국건설환경시험연구원 (KCL)
	녹농균	99.8% 제거	
	황색포도상구균	99.9% 제거	
탈취	암모니아	100% 제거	한국건설환경시험연구원 (KCL)
	톨루엔	100% 제거	
	벤젠	100% 제거	
	포름알데히드	100% 제거	
	이산화황	99.5% 제거	
안전성	이산화질소	99.5% 제거	한국기계연구원 캠온비임상 연구소
	오존발생량	0.002PPM(기준0.03)	
	흡입독성	안전	

- 따라서 플라즈마 발생장치인 Dr. USB를 이용한다면 신선농산물을 비세척으로 제어 가능할 것으로 예상되어 오이와 고추를 대상으로 하여 플라즈마 발생장치인 Dr. USB가 표면 미생물을 제거할 수 있는지 여부를 확인하였음

- 실험 방법은 오이와 고추를 플라즈마 발생기 Dr. USB와 함께 밀폐 플라스틱 용기에 넣고 1일-3일과 1-5일 동안 상온조건에서 보관한 것을 실험구로 사용하였으며, 대조구는 플라즈마 발생기 Dr. USB를 넣지 않고 오이와 고추만 보관하였음
- 실험구와 대조구를 보관기관 별로 일반세균, 대장균군, 대장균, 그리고 효모·곰팡이를 대상으로 미생물 분석을 실시하였음

## 7. GAP 인증 신선농산물의 미생물학적 위생안전관리 및 가이드라인 확립

- GAP 인증 농가와 미인증 농가를 방문하여 확인한 위해요소 원인을 개선하기 위해 중요 관리점을 설정하였음
  - 생육단계, 수확단계, 선별단계 포장단계 및 유통단계로 나누어 중요관리점을 세분화하였음
  - 중요관리점을 통해 현재 GAP 인증을 위한 과정 중 서류상의 미생물학적 관리방법은 위해 요소를 제어하는데 어려움이 있으므로 수확단계부터 선행요건관리프로그램을 적용한다면 사전에 위해요소로부터 예방이 가능할 것으로 판단되었음
- 딸기와 같은 비세척 신선농산물의 미생물오염에 대한 관리방법으로 1시간 주기로 장갑의 주기적인 교체와 락스나 삶는 방법을 이용한 세척방법 사용과 신선농산물을 10°C이하의 온도에서 냉장보관 하는 것이 저감화 및 미생물 제어에 도움이 될 것으로 판단됨. 실험 결과를 토대로 단계별 관리요점을 작성하였음
- 앞서 도출된 관리점과 저감화 방안에 대해 연구결과를 토대로 신선농산물의 수확단계, 선별 및 포장단계, 유통단계에 대해 관해 선행요건프로그램에 준한 관리방안을 제시함
- 인증기관 및 농장주와 인터뷰를 실시하여 미생물학적 위생안전관리에 관한 개선방안을 제시하였으며, 모니터링 결과와 인증과정 중에 확인한 문제점에 대한 해결방안을 가이드라인으로 제시하였음

## 8. 신선농산물 농장대상 GAP 인증지원 및 GAP 인증 전·후의 미생물 오염도 변화

- (1) 신선농산물 재배 농가의 GAP 적용 전·후의 미생물 안전성 비교 분석을 위한 GAP 인증 적용
  - GAP 인증 적용 전·후의 미생물 안전성 비교 분석하기 위해 자가 선별장을 갖춘 고추 농가를 대상으로 GAP 인증 지원을 실시하였음
  - GAP 인증 과정을 위해 필요한 서류를 작성하고 인증기관을 통해 GAP 인증서를 발급받았으며, 인증과정 중 작성한 GAP 위해요소관리계획서 항목 중 미생물 안전성과 관련한 내용을 확인하였음
- (2) 고추 농가의 GAP 적용 전·후 미생물 오염도 현황 조사
  - 고추농가의 GAP 인증 전과 후로 나누어 미생물학적 오염도를 조사를 실시하였음
  - 시료로 신선농산물인 고추와 토양, 용수, 장갑과 작업도구로 집계를 시료로 수집하였으며, 위생지표세균인 일반세균, 대장균 및 대장균군과 효모/곰팡이를 Petri film을 이용하여 미생물학적 분석을 실시하였음
  - 전처리 및 미생물학적 분석실험 결과 확인은 식품공전상의 방법으로 실험을 진행하였음

## 2-3. 농산물에서 미생물학적 평가 및 위생안전관리 개선 방안 확립

### 1. 신선농산물 관련 유해미생물과 국내 질병발생과의 관련성 분석 및 통계학적 오염수준 정량화

#### 가. 신선농산물 관련 유해 미생물에 의한 국내 질병발생 현황과의 관련성 분석

##### (1) 국내 식중독 발생 동향 분석

- 식품의약품안전처 등 유관기관의 최근 국내 식중독 발생 동향 및 통계자료를 분석하였음

##### (2) ALOP 개념 적용 국내 실제 식중독 발생 현황 분석

- 국내 식중독 발생 통계자료 및 국내 다소비 농산물 중 식중독 발생과 관련이 있는 농산물을 분석하여 최종 농산물을 선정하였음

##### (3) 식중독 발생사례 자료로부터 농산물 관련 재배에서 유통까지 risk factor 탐색

- 이들 자료를 바탕으로 ALOP(Appropriate Level of Protection) “국민건강 적정보호수준” 개념 적용 국내 농산물 관련 식중독 발생 현황 및 관련성을 분석하였음

ALOP (Appropriate Level of Protection) “국민건강 적정보호수준”으로서 국내에서 특정 식품에서 특정 원인균에 의한 식중독 발생수준으로 표현

#### 나. 농산물에 대한 미생물학적 모니터링 결과에 대한 통계학적 오염수준 정량화

- 본 연구에서는 모니터링 결과에 따른 적용 방법을 달리하여 최근에 발표된 관련 방법론을 활용하여 통계적으로 추정하였음

##### (1) 제1세부 모니터링 결과 및 제3협동 과거 분석자료 활용

- (가) 제1세부 모니터링 결과 및 제3협동 과거 모니터링 자료(오염도 조사 자료)를 MRA 시뮬레이션 모델에 이용하기 위해 정량적 오염수준 추정을 위한 통계학적 방법으로 다음과 같은 3가지 가능성을 적용하였음

###### 1) 정량적 결과를 이용한 오염수준 산출

- 가) 검출한계(detection limit) 이하 결과가 없는 경우
- 나) 검출한계(detection limit) 이하 결과가 있는 경우

###### 2) 정성적 결과(presence/absence)를 이용한 정량적 오염수준 추정

- (나) 기본적으로 식품중 미생물에 대한 정량적 오염수준은 평균( $\mu$ )과 표준편차( $\sigma^2$ )를 가지는 정규분포(Normal distribution)를 한다고 가정하였음

###### 1) 검출한계(detection limit) 이하 결과가 없는 정량적 결과를 이용한 오염수준 산출방법

- 가) 각각의 모니터링 결과를 로그로 전환 후 빈도(frequency:  $f$ )분포로 정리하여 식(3),(4)와 같이 정규분포의 평균( $\mu$ )과 표준편차( $\sigma^2$ )를 산출하여 적용하였음(Jarbis, B. 2008)

$$\mu = \sum \frac{fX}{n} \dots \text{식(3)}$$

$$\sigma^2 = \frac{\sum f(x^2) - \mu \sum fx}{n-1} \dots \text{식(4)}$$

2) 검출한계(detection limit) 이하 결과가 있는 정량적 결과를 이용한 오염수준 산출방법

가) 검출한계를 포함하는 오염수준 추정 방법은 평균( $\mu$ )과 표준편차( $\sigma^2$ )를 가지는 정규분포(Normal distribution) 식(5)에 식(6)과 같이 “Maximum Likelihood Estimates: MLEs(최대가능도법)”를 적용하여 검출한계를 포함하는 오염수준을 산출하였음

□ 평균( $\mu$ )과 표준편차( $\sigma^2$ )를 가지는 정규분포는 다음 식(5)와 같음

$$f(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} \exp\left(-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}\right) \dots \text{식(5)}$$

□ 이를 Likelihood function ( $L(\mu, \sigma)$ )으로 대체하면

$$L(\mu, \sigma) = \left(\frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}}\right)^n \exp\left(-\sum_{i=1}^n \frac{(x_i - \mu)^2}{2\sigma^2}\right)$$

$$= -\frac{n}{2} \ln(2\pi) - n \ln \sigma - \sum_{i=1}^n \frac{(x - \mu)^2}{2\sigma^2} \dots \text{식(6)}$$

나) 식(6)은 엑셀(Excel)의 “Solver: 해찾기” 기능을 활용하여 계산할 수 있으며 (Finkelstein, M.M. et al., 2001), 이를 통해 농산물에서 주요 식중독 원인균에 대한 모니터링 결과에서 검출한계(detection limit)이하를 포함하는 최적의 평균( $\mu$ )과 표준편차( $\sigma^2$ )를 산출하였음

3) 정성적 결과(presence/absence)를 이용한 정량적 오염수준 추정

가) 본 연구에서는 베타분포의 방법의 한계를 극복하기 위한 방법으로 이항(Binomial)분포 기반 Bayesian 모델을 이용하는 방법(Andritos, N.D. et al., 2013)을 활용하여 오염수준을 추정하였음

나) 이항(Binomial)분포의 probability( $p$ )와 평균( $\mu$ )과 표준편차( $\sigma^2$ )는 각각 다음 식(8), (9), (10)과 같음

$$f(x) = \binom{n}{x} p^x (1-p)^{n-x} \dots \text{식(8)}$$

$$\mu = np \dots \text{식(9)}$$

$$\sigma^2 = \sqrt{np(1-p)} \dots \text{식(10)}$$

다) 이항(Binomial)분포는 엑셀에서 BINOMDIST(number\_s, trials, probability\_s, cumulative)함수로 이용할 수 있음. 여기서 number\_s는 시행에서의 성공 횟수(즉, 양성 시료 수), trials는 독립 시행 횟수(전체 시료수), probability\_s는 각 시행에서 성공할 확률, cumulative는 함수의 형태를 결정하는 논리 값임

라) 성공할 확률( $p$ )은 Poisson 분포를 이용하여 다음 식(11)과 같이 산출되었음

$$p = 1 - \exp(-\lambda \times s \times SE) \dots \text{식(11)}$$

( $\lambda$ 는 균의 농도,  $s$ 는 분석에 사용된 시료량(g),  $SE$ 는 사용된 선택배지의 Sensitivity/Specificity 값을 의미)

(2) 통계적 방법 및 모니터링 결과에 대한 오염수준 정량화

- 결정된 오염수준 정량화 방법은 대부분이 직접적인 산술 계산에 어려움이 있어, 본 연구에서는 엑셀에서 사용가능한 검출한계(detection limit) 이하 결과가 있는 정량적 결과를 이용한 오염수준 산출 프로그램을 개발 및 이용하였음

## 2. 농산물 관련 미생물학적 안전성 평가를 위한 QMRA-동태 모델 개발

### 가. 안전성 평가를 위한 재배부터 유통까지 동태학적 (Fate & Transport) 모델 개발

(1) 베이지안 네트워크를 이용한 재배에서 유통단계까지 오염원 및 동태학적 이동경로 조사·분석 및 모형 개발

- 단계별 정량화된 오염수준을 주요 입력변수로 활용하여 대상 농산물별 재배방법, 사용용수, 토양 오염 등에 따른 베이지안 분석(Bayesian analysis)을 기반으로 이들 물리화학적 요인(재배방법, 사용용수, 토양오염 등)들과의 통계적 유의 관련성 분석을 통해
  - ▶ 생물학적 위해요소 이동 모델(전이, 교차오염 등) 개발
  - ▶ 생물학적 위해요소 변화 모델(증식, 사멸 등) 개발
- 개발된 모델에 대한 입력변수는 Monte-Carlo simulation을 활용할 수 있는 확률분포모형으로 함

(가) 베이지안 분석 및 확률모형 결정에 대한 이론적 접근

- 오염수준의 이동을 분석할 수 있는 동태학적 모형은 베이지안 분석 및 정리(Bayesian theorem)에 기초하여 다음과 같이 3단계로 구성 될 것임
  - 알려져 있지 않은 모수(parameter)의 사전(prior)예측에 대한 신뢰할 수 있는 확률분포

모형 결정

- 알려져 있지 않은 모수에 대한 관찰된 실제 자료의 확률을 계산하는 적절한 likelihood 함수(function) 선정
- 사전분포와 likelihood 함수에 의한 수정된 확률분포 모형 결정

(나) 농산물 재배에서 유통단계에서의 오염원 및 동태학적 이동경로 구성 및 자료 확보

- 농산물 재배시 미생물학적 위해요소의 잠재적 오염원으로 볼 수 있는 가축 및 야생 동물의 분뇨, 토양, 폐수 발생, 농업용수(surface water) 등으로부터 이동에 대한 영향분석 (그림 2-3-1)

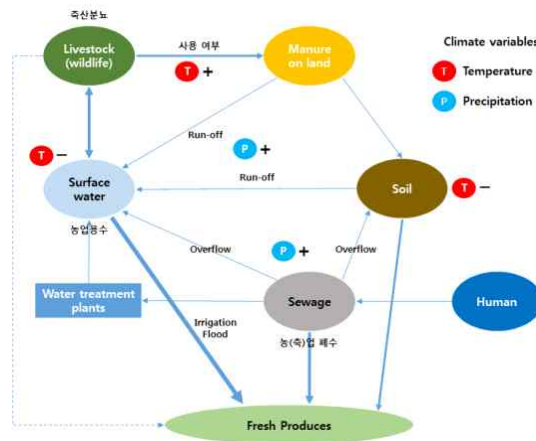


그림 2-3-1. 미생물학적 위해요소의 잠재적 오염원 및 동태학적 구성도

(다) 오염원 및 동태학적 이동 경로관련 예측모델 확보

- 생산 및 유통단계 농산물에서 식중독 세균과 바이러스에 대한 확산 과정 시뮬레이션을 위해서는 관련 예측모델 확보가 우선시되어야 함
- 관련 모델 범위는 다음과 같이 4가지를 고려할 수 있으며, 경우에 따라 추가적인 내용과 관련 모델이 필요할 수도 있음

- ① 농산물 생산 및 보관, 저장, 유통에 따른 성장예측모델
- ② 토양, 용수 등에서 세균 및 바이러스의 생존(survivor)관련 수학적 모델
- ③ 용수 및 분뇨로부터 농산물로의 전이(transfer) 모델
- ④ 유통 및 소비 중 보관에 따른 균수 변화 예측 모델

- 관련 모델에 대한 확보는 문헌을 통해 우선적으로 확보 예정

- 문헌 및 보고서 등을 조사하여, 관련모델을 수학적으로 생성할 것임
- ※ 경우에 따라 직접적인 모델 개발도 필요할 수 있지만 예산의 한계로 수행이 어려울 수 있으며, 이 경우 전문가 의견 등을 통해 가정(assumption)으로 모델 대체 예정

(라) 오염원 및 동태학적 이동 경로 관련 확률모형 구성

- 잠재적 오염원에서 미생물학적 위해요소에 대한 발생수준, 이동 모형(예측모델 등)에 따라 베이지안 분석을 바탕으로 한 확률분포 모형을 시작으로 단계별로 확률모형 개발

나. 동태학적 모델 기반 QMRA 활용 재배부터 유통까지의 미생물학적 (세균/바이러스) 안전성 평가

(1) 정량적 미생물학적 위해평가(QMRA)를 이용한 농산물에서 미생물학적 위해안전성 평가

- 개발된 동태학적 모형을 바탕으로 Monte-Carlo simulation을 이용하는 정량적 미생물 위해평가(quantitative microbial risk assessment: QMRA) 기법(노출평가, 섭취량, 위해수준 등) 적용하고 다음의 사나리오별 수행
  - 생식성 농산물(엽채류, 과채류, 근채류 및 과실류 등) 안전성 평가
  - 토양(노지) 및 수경재배, 비닐하우스 등 재배방식에 따른 안전성 평가
  - 농업용수, 세척용수 등 수질, 토양 등에 대한 위생관리에 따른 미생물 안전성 평가

(가) 정량적 미생물 위해평가(QMRA)의 기본 방법

□ 동태모델 기반 재배부터 유통까지의 미생물학적(세균/바이러스) 안전성 평가에 활용하게 되는 정량적 미생물 위해평가(QMRA) 기본 추진방법은 다음 그림 2-3-2에서 같이 Codex에서 제시한 원칙과 지침(Principles for the establishment and application of microbiological criteria for foods (CAC/GL 21, 1997), (Principle and guidelines for the conduct of microbiological risk assessment (CAC/GL-30, 1999)에 따르면 국내 식품의약품안전처에서 마련한 미생물 위해평가 지침 내용도 반영하여 수행함

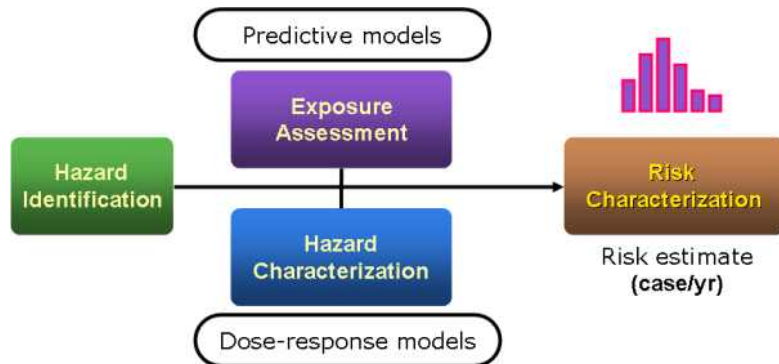


그림 2-3-2. Codex 제시 미생물위해평가 기본방법론

- 위험성 확인(Hazard Identification): 독성실험 및 역학연구 등을 활용하여 화학적·미생물학적·물리적 위해요인의 유해성, 독성 및 그 정도와 영향 등을 파악하고 확인하는 과정
- 노출평가(Exposure Assessment): 식품 등을 통하여 사람이 섭취하는 위해요소의 양 또는 수준을 정량적 및(또는) 정성적으로 산출하는 과정
- 위험성 결정(Hazard Characterization): 위해요소의 노출량과 유해영향 발생과의 관계를 정량적으로 규명하는 단계
- 위해수준 결정(Risk Characterization): 위험성 확인, 위험성 결정 및 노출평가 결과를 근거로 하여 평가대상 위해요인이 인체건강에 미치는 유해영향 발생과 위해정도를 정량적 또는 정성적으로 예측하는 과정
- 동태모델을 기반으로 하고, 여기에 필요한 자료로서 앞서 기술한 정량적 오염수준, 관련 생육예측모델, 양-반응 모델, 주요 농산물별 섭취량 등에 대한 모델 등을 포함하고 있음.



이들 자료는 계속적으로 수집, 보완, 수정되면서 수행하게 될 것임

### 3) QMRA의 단계별 진행 방법

#### 가) 위험성 확인(Hazard Identification)

- 국내 현실을 최대한 반영하기 위하여 최근의 국내·외 학술자료 및 관련 보고서 등의 조사를 수행하고, 농산물의 재배, 저장, 운송과 관련한 자료와 미생물학적 위해요소의 임상 및 역학조사자료, 유통, 섭취단계에서 미생물학적 위해요소를 확인하여 정리함

#### 나) 노출평가(Exposure assessment)

- 농산물 재배부터 유통까지 동태학적(Fate & Transport) 모델에서와 같이 재배(재배방법, 토양, 용수 등의 물리화학적 특성), 유통, 소비단계별로 오염도(모니터링) 조사를 통한 정량화된 오염수준, 예측모델(성장, 생존, 교차오염 예측모델)을 확률분포모델에 기반한 입력변수로서 주요 농산물 섭취 등을 통한 미생물학적 위해요소에 의한 노출수준(균 섭취 수준)을 정량적으로 추정함

#### 다) 위험성 결정(Hazard Characterization)

##### ① 양-반응 모델 확보

- 양-반응 모델에는 exponential 모델(식(1))과 beta-Poisson 모델(식(2))이 대표적이며,

$$P_{\infty} = 1 - \exp^{-rN} \quad \dots \text{식(1)}$$

$$P_{\infty} = 1 - [1 + N/\beta]^{-\alpha} \quad \dots \text{식(2)}$$

- 식(1)과 (2)에서  $r$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$ 는 optimized parameter이고,  $N$ 은 대상 농산물의 노출평가 결과에 따른 균 섭취 수준
- 현재까지 조사된 농산물 관련 주요 식중독 원인균에 대한 양-반응 모델은 표 2-3-1와 같으며, 양-반응 모델이 없는 경우는 표 2-3-1와 같은 최소감염량을 활용할 예정임. 이들 양-반응 모델은 위해수준 추정을 위한 시뮬레이션 모델에 포함됨

표 2-3-1. 주요 식중독 원인균 및 바이러스에 대한 양-반응 모델 및 최소감염량

Pathogens	Proper D-R model		비고 (최소감염량: CFU/g, Particle/g)
	Model	Parameters	
<i>Bacillus cereus</i>			D-R모델 없음( $10^5$ )
<i>Campylobacter jejuni</i>	Beta-Poisson	$\alpha=0.145, \beta=7.589$	
<i>Clostridium perfringens</i>	Exponential	$r=1.82 \times 10^{-11}$	
Pathogenic <i>E.coli</i> O157:H7	Beta-Poisson	$\alpha=0.17, \beta=1.61 \times 10^6$	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Exponential	$r=1.18 \times 10^{-10}$	
<i>Salmonella</i> spp.	Beta-Poisson	$\alpha=0.3136, \beta=3,008$	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Exponential	$r=7.64 \times 10^{-8}$	
Noro virus			1~10
Adeno virus			$10^1 \sim 10^3$
Astro virus			Unknown
Rota virus	Beta-Poisson	$\alpha=2.53 \times 10^{-1}, \beta=6.17$	
Hepatitis A virus			$10^1 \sim 10^2$

② 농산물별 소비량 조사 및 정리

- 1일 섭취량(amounts)과 섭취빈도(frequency: 1인 1일 섭취자 비율)는 국민건강영양조사 자료 바탕으로 @RISK BestFit 이용하여 표 2-3-2의 예와 같이 적정 확률분포모델로 결정
  - (예) 배추김치의 경우 평균  $35.6 \pm 23.863g$ 이며, 이는 InGauss (39.419, 57,941)로 나타낼 수 있음(그림 2-3-3). 1일 섭취빈도(Frequency)는 2010년 국민건강영양조사에 의하면 약 59.57%로, 즉 1일 우리나라민의 약 59.57%는 배추김치를 먹고, 나머지는 섭취하지 않은 것으로 추정 할 수 있는 것임

표 2-3-2. 주요 농산물 섭취량 분석

품목	mean	S.D	95%	1일 섭취비율	모델	모델변수
사과	167.40	115.98	0.38	17.54%	Gamma	$\alpha=2.22$ $\beta=74.44$
상추	22.29	17.97	57.09	11.7%	InvGauss	$\mu=24.35$ $\lambda=45.24$
포도	181.96	198.19	0.57	4.68%	Pareto2	$b=1554.58$ $q=9.63$
딸기	132.15	180.71	0.42	3.28%	Pearson5	$\alpha=2.02$ $\beta=157.58$
고추	18.74	15.16	46.86	3.02%	InvGauss	$\mu=22.84$ $\lambda=56.90$
깻잎	14.97	13.23	40.64	2.87%	InvGauss	$\mu=15.47$ $\lambda=21.19$
토마토	216.97	163.10	527.95	2.31%	Gamma	$\alpha=1.8463$ $\beta=117.52$
오이	110.07	116.34	0.34	2.03%	Lognorm2	$\mu=4.33$ $\sigma=0.92$
당근	43.069	48.197	120.81	0.01%	Pearson5	$\alpha=3.2490$ $\beta=127.46$
무	121.06	124.64	1741.74	0.00%	Pearson5	$\alpha=0.60370$ $\beta=10.099$
배추김치	35.248	30.609	98.493	59.57%	InvGauss	$\mu=39.419$ $\lambda=57.941$

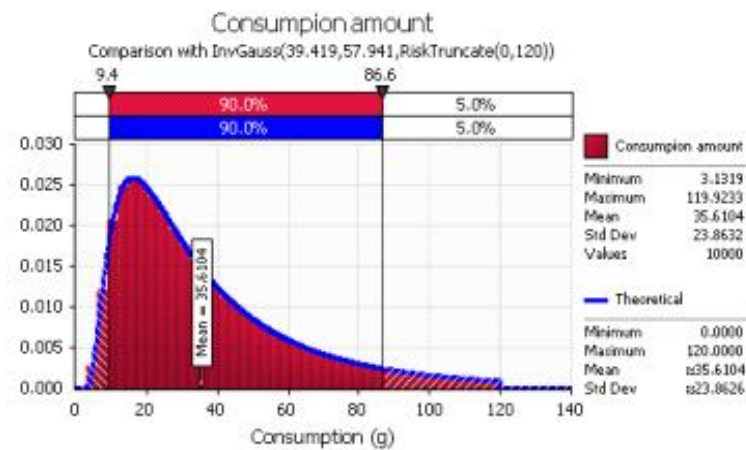


그림 2-3-3. 배추김치 1일 섭취량에 대한 확률분포 모델

라) 위해수준 결정(Risk Characterization)

- 다음 그림 2-3-4에서 보여주는 바와 같은 3단계 절차로 시뮬레이션 모델 작성 및 수행하여, 최종 위해수준 추정 및 적정 위해수준이 추정될 때까지 반복적으로 진행될 예정임



그림 2-3-4. 시나리오별 위해수준(risk level) 추정을 위한 절차

① 위해수준을 추정할 수 있는 simulation 모델 개발

- 그림 2-3-5와 같이 오염수준과 노출평가(동태)모델, 양-반응 모델, 섭취량과 관련된 자료 또는 모델을 중심으로 엑셀 기반으로 작성될 예정

② 몬테카를로 시뮬레이션

- @RISK (version 6.1, Palisade, Newfield, NY, USA)를 이용하며, Sampling type은 Median Latin Hypercube sampling을, Generator seed는 1로 고정하고, Iteration(반복시행 횟수) 100,000이상의 결과를 최종적인 시뮬레이션 결과로 이용할 예정(그림 2-3-5)

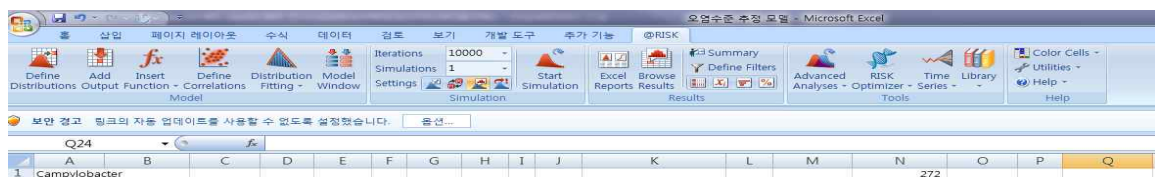


그림 2-3-5. 엑셀에서 시뮬레이션을 위한 @RISK 프로그램

③ 위해수준 추정

- 시뮬레이션 모델에 의한 최종 결과는 표 2-3-3에서 보여주고 있는 바와 같이 1일 위해수준(Probability of illness/person/day) 또는 1인 1일 식중독 발생수준으로 제안

표 2-3-3. 상추에서 E. coli O157:H7에 대한 위해수준 추정 예

	Min	5%	Mean	95%	Max
1인 1일 균섭취량(CFU)	0.00	0.00	0.01	0.04	3.45
1인 1일 식중독 발생수준	0.00	0.00	1.67E-07	1.08E-06	8.73E-05

\* 상기의 결과는 예이며 최종결과는 변경될 수 있음

- 위해수준을 농산물별, 재배 방식별, 위생관리별로 제시될 예정이며, 이들 결과는 주요 농산물에 대한 관리 우선순위 목록화 및 미생물 안전관리 기준 (Microbiological Sampling Plan)에 활용할 예정임

### 3. 유해미생물 관리 우선순위 목록화 및 기준·규격, 위생안전관리방안 개선안 제안

#### 가. 동태 모델 기반 미생물 안전성 평가 수정 및 보완

- 모니터링 자료의 추가적인 진행결과와 Data Gap에서 제시한 부족한 부분의 관련 자료의 보완 등을 추가적인 진행하여 MRA 기반 동태모델을 수정 및 보완
- 수정 보완된 모델을 바탕으로 주요 농산물별 식중독 원인균 및 바이러스에 대한 안전수준 평가 계속 진행 예정

#### 나. 농산물의 생물학적 유해미생물 관리 우선순위 목록화

##### (1) QMRA 기반 위해수준을 이용한 농산물에서 유해미생물 관리 우선순위 제안

○ QMRA 기반 동태모델을 통해 위해수준(risk level)을 이용하여 농산물에 대한 미생물 관리 우선순위제안

- QMRA 기반 동태모델에 대한 Simulation을 통해 추정된 주요 농산물별 주요 식중독 원인균에 대한 위해수준(risk level: probability of illness/person/day)은 표 2-3-4과 제시하고, 위해수준에 따른 순위(표 2-3-5)를 정해 미생물 우선관리 품목 제시 예정

##### 다. 재배부터 유통까지 위생안전관리 및 미생물학적 위해안심관리 방안 확립

○ QMRA 기반 동태모델에 의한 추정된 위해수준을 바탕으로 시나리오 및 민감분석 등을 통해 환경요인(오염수준, 용수, 토양, 재배 방법)에 따른 적정 위생관리 방안 제안

- 미생물(세균/바이러스) 안심 기준 및 규격으로 적정 Sampling plan(n,c,m,M) 제안
- 식중독 발생 가능 시나리오를 통한 위생관리 방안 제안
- 이들 제안된 안심관리 방안은 GAP 개선 방안으로 활용

표 2-3-4. 주요 농산물별 식중독 원인균에 따른 추정된 위해수준 예

농산물	식중독 원인균	위해수준(Risk level)		
		Mean	95%	Maximum
상추	<i>Cl. perfringenes</i>	2.52E-13	2.02E-12	9.88E-12
	<i>L. monocytogenes</i>	5.04E-13	3.68E-12	3.79E-11
	<i>S. aureus</i>	4.11E-10	3.27E-09	2.40E-08
	<i>E. coli</i> O157:H7	3.18E-08	2.30E-07	1.61E-06
	<i>Salmonella</i>	9.69E-07	7.51E-06	4.31E-05
	<i>C. jejuni</i>	1.18E-04	7.36E-04	1.23E-02
	<i>B. cereus</i>	-	-	-

농산물	식중독 원인균	위해수준(Risk level)		
		Mean	95%	Maximum
토마토	<i>L. monocytogenes</i>	6.52E-13	0	2.04E-10
	<i>S. aureus</i>	4.22E-10	0	1.32E-07
	<i>E. coli</i> O157:H7	3.35E-08	0	1.05E-05
	<i>Salmonella</i>	5.75E-07	0	1.80E-04
	<i>B. cereus</i>	-	-	-
오이	<i>L. monocytogenes</i>	5.50E-13	4.09E-12	2.64E-11
	<i>S. aureus</i>	1.43E-09	1.09E-08	5.97E-08
	<i>E. coli</i> O157:H7	5.66E-08	4.17E-07	3.67E-06
	<i>Salmonella</i>	7.43E-07	5.25E-06	5.01E-05
	<i>C. jejuni</i>	1.67E-04	1.25E-03	1.07E-02
	<i>B. cereus</i>	-	-	-
부추	<i>L. monocytogenes</i>	1.01E-14	0	2.86E-11
	<i>Cl. perfringens</i>	1.03E-14	0	2.60E-11
	<i>S. aureus</i>	2.00E-11	0	3.76E-08
	<i>E. coli</i> O157:H7	5.27E-10	0	2.02E-06
	<i>Salmonella</i>	6.98E-09	0	2.10E-05
	<i>C. jejuni</i>	2.58E-06	0	9.81E-03
	<i>B. cereus</i>	-	-	-
양배추	<i>L. monocytogenes</i>	3.02E-16	0	2.55E-12
	<i>S. aureus</i>	1.08E-12	0	8.77E-09
	<i>E. coli</i> O157:H7	1.55E-11	0	1.31E-07
	<i>Salmonella</i>	2.66E-10	0	2.25E-06
	<i>C. jejuni</i>	2.10E-07	0	1.77E-03
	<i>B. cereus</i>	-	-	-

\* 상기의 결과는 예이며 최종결과는 변경될 수 있음

표 2-3-5. 생식 농산물별 주요 식중독균에 대한 위해수준 순위 예

순위	농산물	식중독원인균	Risk level
1	김치	<i>E. coli</i> O157:H7	1.30E-06
2	상추	<i>Salmonella</i>	9.69E-07
3	오이	<i>Salmonella</i>	7.43E-07
4	토마토	<i>Salmonella</i>	5.75E-07
5	오이	<i>E. coli</i> O157:H7	5.66E-08
6	토마토	<i>E. coli</i> O157:H7	3.35E-08
7	상추	<i>E. coli</i> O157:H7	3.18E-08
8	김치	<i>S. aureus</i>	9.32E-09
9	부추	<i>Salmonella</i>	6.98E-09
10	양파	<i>Salmonella</i>	6.83E-09
11	오이	<i>S. aureus</i>	1.43E-09
12	당근	<i>Salmonella</i>	1.34E-09
13	부추	<i>E. coli</i> O157:H7	5.27E-10
14	양파	<i>E. coli</i> O157:H7	4.85E-10
15	생선회	<i>S. aureus</i>	4.71E-10
16	토마토	<i>S. aureus</i>	4.22E-10
17	상추	<i>S. aureus</i>	4.11E-10
18	양배추	<i>Salmonella</i>	2.66E-10
19	당근	<i>E. coli</i> O157:H7	6.01E-11
20	육회	<i>S. aureus</i>	3.49E-11
21	부추	<i>S. aureus</i>	2.00E-11
22	양배추	<i>E. coli</i> O157:H7	1.55E-11

순위	농산물	식중독원인균	Risk level
23	양파	<i>S. aureus</i>	2.69E-12
24	당근	<i>S. aureus</i>	1.86E-12
25	양배추	<i>S. aureus</i>	1.08E-12
26	마늘	<i>S. aureus</i>	8.40E-13
27	토마토	<i>L. monocytogene</i>	6.52E-13
28	오이	<i>L. monocytogenes</i>	5.50E-13
29	상추	<i>L. monocytogene</i>	5.04E-13
30	상추	<i>Cl. Perfringenes</i>	2.52E-13
31	생선회	<i>L. monocytogene</i>	2.45E-13
32	부추	<i>Cl. Perfringenes</i>	1.03E-14
33	부추	<i>L. monocytogene</i>	1.01E-14
34	육회	<i>Cl. Perfringenes</i>	9.28E-15
35	양파	<i>L. monocytogenes</i>	7.76E-15
36	당근	<i>L. monocytogene</i>	6.79E-16
37	양배추	<i>L. monocytogene</i>	3.02E-16
38	당근	<i>Cl. Perfringenes</i>	1.62E-18

\* 상기의 결과는 예이며 최종결과는 변경될 수 있음

(1) 위해수준에 근거한 미생물 안전기준 설정

(가) 기본 방법론

- **정량적 미생물 위해평가(QMRA)를 통해 추정된 식품에서 특정 식중독 원인균에 대한 위해수준을 바탕으로 가장 과학적으로 식품안전기준을 설정하는데 활용될 수 있는 기본 개념으로 ALOP, FSO가 있음(ICMSF, 1998)**
- 이들의 기본 개념은 아래와 같음

<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <b>ALOP (Appropriate Level of Protection) “국민건강 적정보호수준”</b>으로서 국내에서 특정 식품에서 특정 원인균에 의한 식중독 발생수준으로, 1일1인 식중독 발생 가능성 또는 1회 제공량(serving)당 환자수 및 연간 발생수준으로 표현</li> <li>▪ <b>FSO (Food Safety Object)로 “소비단계 식품안전목표”</b>로서 소비 직전 시점에서 특정 식품내 특정 식중독 원인균의 최대 발생수준(빈도) 및 농도(오염수준)로, ALOP를 달성하기 위한 정량적 기준으로 볼 수 있으며, 예로 2 log CFU/g 이하 또는 발생수준 0.01% 이하로 표현</li> </ul>
---

[자료출처 : Food Safety, 2015]

라. 미생물 안전관리 기준으로 적정 Microbiological Sampling Plan 제안

(1) 제외국 농산물 미생물 안전관리 기준·규격 비교 검토

- ALOP를 기반으로 차례대로 설정된 FSO, PO를 준수하기 위해서 식품산업체에서 활용할 수 있는 기준이 PC이고, 이는 ICMSF에서 제안(ICMSF, 1998)하고 있는 **Microbiological Sampling Plan**을 이용하여 적정 미생물 안전관리 기준을 설정할 수 있음(그림 2-3-6)

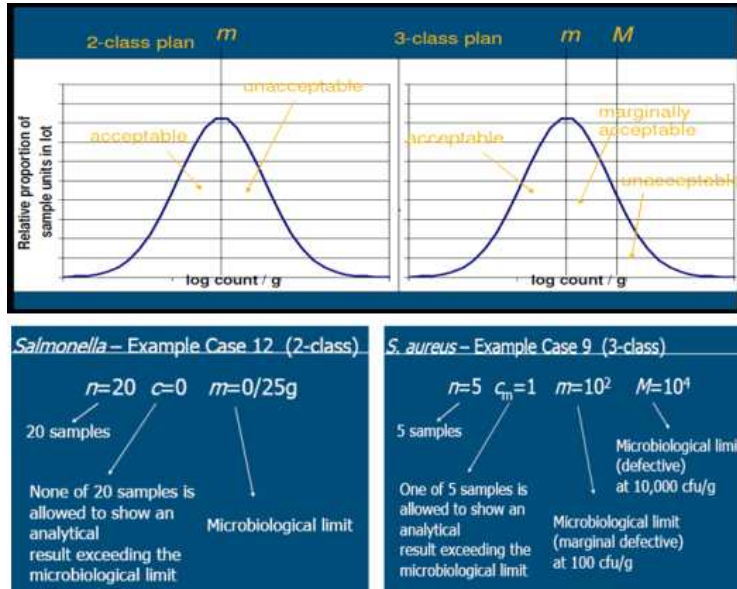


그림 2-3-6. Microbiological Sampling Plan의 기본개념으로 2-class와 3-class 제시

- 적정 Microbiological Sampling Plan 결정에는 그림 2에서는 보는바와 같이 ICMSF에서 2010년 개발하여 제공하고 있는 엑셀기반 ICMSF Sampling Plan Tool을 이용할 예정임

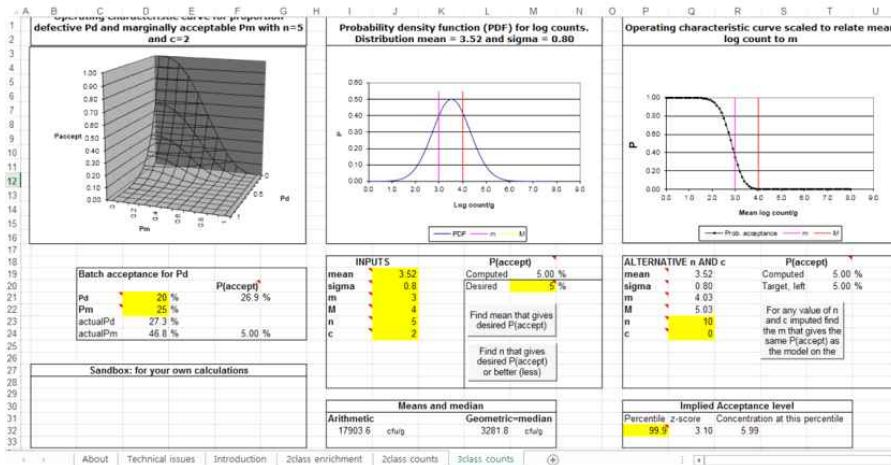


그림 2-3-7. 엑셀기반 ICMSF Sampling Plan Tool 프로그램 화면

- 농산물에서 미생물학적 위해요소에 대한 안전하고 합리적 미생물 기준은 다음 그림 2-3-8에서 제시한 5단계의 방법과 절차를 통해 제안할 예정이며, 이는 적정 미생물 기준이 제시될 때까지 계속적으로 피드백하면서 실시할 예정임

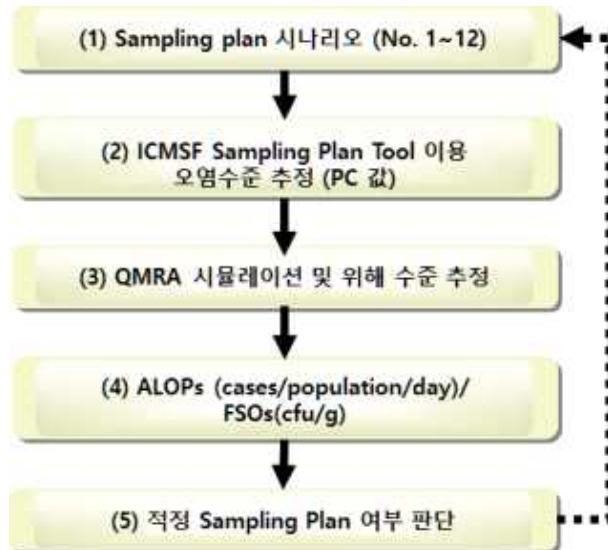


그림 2-3-8. Sampling plan 활용 농산물에 대한 미생물 관리기준 설정과정

□ 세부적인 절차와 수행될 방법은 다음과 같음

- 우선적으로 신선농산물에서 황색포도상구균과 클로스트리디움 퍼프린젠스에 대한 Sampling plan에 대해 가능한 시나리오로 현재기준( $n=5, c=0, m=0$  cfu/25g)으로부터 여러 가능한 수준(예로  $n=5, c=2, m=100, M=1,000$  CFU/g 등)을 통해 여러 개의 가능한 시나리오를 구성함(표 2-3-6)  
(※연구 진행에 따라 여러 다른 기준의 시나리오가 활용 될 수 도 있음)
- 표 2-3-6의 Microbiological Sampling plan 시나리오별로 그림 5에서 보여준 엑셀기반 ICMSF Sampling Plan Tool을 이용하여 각각의 시나리오별 오염수준(Log CFU/g)을 추정하며, 이는 그림 2-3-8의 PC에 해당된다고 볼 수 있음
- 추정된 각각의 시나리오별 오염수준은 앞서 제시한 QMRA 시뮬레이션 모델에서 생산 직후 단계의 입력변수로 활용되어 시뮬레이션을 수행하고, 각각의 시나리오별 위해수준을 산출함
- 추정된 위해수준을 바탕으로 각각의 시나리오별 ALOP/FSO를 산출하고, 각각의 시나리오별 현재 추정된 오염수준과 차이 등을 분석함
- 이들 분석결과를 바탕으로 관련 업체와 전문가 그룹과 자문회의 및 식약처 담당 및 관련부서와의 내부 회의를 통해 최종적으로 적정한 미생물 기준인지를 결정함. 최종적인 미생물 기준이 결정되기 까지 이러한 작업을 반복적으로 수행할 예정임



표 2-3-6. Microbiological Sampling Plan 시나리오와 추정된 오염수준

Scenario number	Sampling plans	Estimated Microbial concentration* (Mean, Log CFU/g)
<b>2-class attributes plans (25g)</b>		
1	$n=100, c=0, m=0$ CFU/25g	-4.03
2	$n=10, c=0, m=0$ CFU/25g	-3.46
3	$n=5, c=0, m=0$ CFU/25g (현재 기준)	-3.26
<b>2-class attributes plans (g)</b>		
4	$n=5, c=0, m=1$ CFU/g	-1.86
5	$n=5, c=0, m=10$ CFU/g	-0.86
6	$n=5, c=0, m=100$ CFU/g	0.14
<b>3-class attributes plans (g)</b>		
7	$n=5, c=1, m=1$ M=10 CFU/g	-1.20
8	$n=5, c=2, m=1$ M=10 CFU/g	-0.94
9	$n=5, c=1, m=10$ M=100 CFU/g	-0.20
10	$n=5, c=2, m=10$ M=100 CFU/g	0.06
11	$n=5, c=1, m=100$ M=1,000 CFU/g	0.80
12	$n=5, c=2, m=100$ M=1,000 CFU/g	1.06
:	:	:
:	:	:

\*그림 2-3-7의 엑셀기반 ICMSF Sampling Plan Tool을 이용하여 계산

**마. 농산물 안전관리 기준 설정 예(상추에서의 병원성 대장균)**

- 위해관리자는 ALOP cases와 FSO초과율을 임의적으로 선정 후 앞서 개발된 QMRA 기반 동태모델을 활용하여 적정한 안전관리 기준을 선정할 수 있음
- 그림 2-3-9에서 보는 바와 같이 QMRA 기반 동태모델에 의한 추정된 상추에서 병원성대장균 E. coli O157:H7의 최종 섭취직전 오염수준이 -2.69 Log CFU/g이고, ALOP cases가 2명, FSO 초과율은 약  $0.1 \times 10^{-5}\%$ 로 결과가 나온다고 가정할 경우
  - 이 경우 만약 위해관리자가 상추에서 병원성대장균에 대한 ALOP cases와 FSO초과율을 현재 수준 2명과  $0.1 \times 10^{-5}\%$ 에서 1명이하와  $0.05 \times 10^{-5}\%$ 로 수준을 강화하고 싶다면 역으로 본 연구에서 개발된 QMRA 기반 동태모델을 활용하여 섭취직전의 오염수준이 현재수준 -2.69 Log CFU/g에서 -3.25 Log CFU/g되어야 한다는 것을 추정할 수 있으며, 이를 바탕으로 적정 Sampling plan으로  $n=5, c=0, m=<1/25g$ 의 기준을 제시할 수 있으며, 식품공급체인을 통한 연속적인 시물레이션을 통해 최종 농장에서의 오염수준을  $n=10, c=0, m=<1/25g$ 으로 제안할 수 있음. 이들 결과는 추후 해당 농산물의 GAP에 대한 관리기준으로 제시 가능

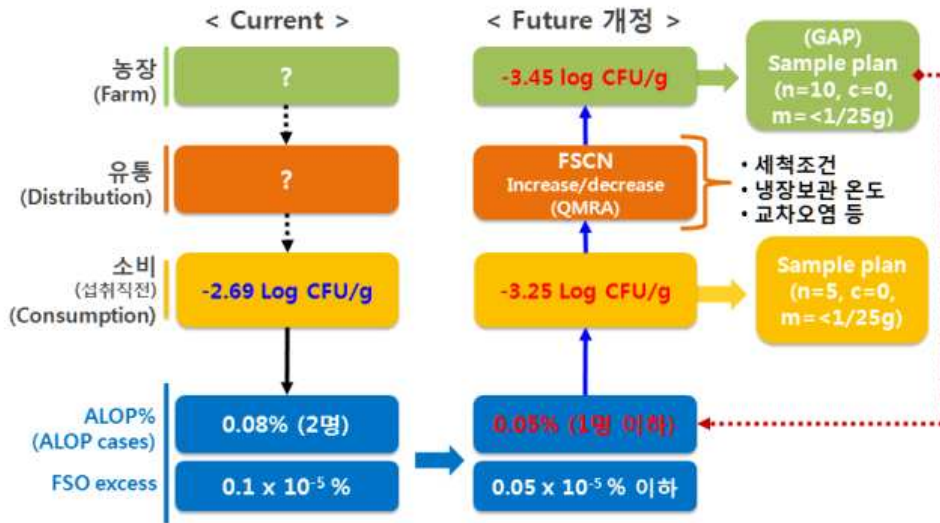


그림 2-3-9. ALOP cases, FSO초과율을 이용한 관리기준 개정을 위한 시나리오 분석 예 (상추, 병원성 대장균)

바. 농산물에서 미생물학적 위생안전관리방안 개선안 확립

(1) 제외국 농산물 미생물 안전관리 기준·규격 비교 검토

- 농산물에서 주요 미생물학적 위해요소에 대해 본 연구를 통해 결정된 기준과 국제기구, 미국, EU 등 기준 설정된 나라와 비교 분석을 수행하여 국제기준과 조화를 위한 과학적 근거를 확보할 수 있도록 함

표 2-3-7. 신선농산물 관련 제외국 기관

국가	기관	웹사이트 주소
United Nations 산하 국제 기구	세계보건기구 (World Health Organization, WHO)	www.who.int
미국	국제식품규격위원회 (CODEX Alimentarius)	www.codexalimentarius.org
	미국 식품의약국 (United States Food and Drug Administration, FDA)	www.fda.gov
	미국 농무부 (United States Department of Agriculture, USDA)	www.usda.gov
	미국 식품안전검사국(Food Safety and Inspection Service, FSIS)	www.fsis.usda.gov
캐나다	캐나다 식품 검역원 (Canadian Food Inspection Agency, CFIA)	www.inspection.gc.ca
	캐나다 신선식품 연합 (Fresh Produce Alliance, FPA)	www.freshproducealliance.com
유럽	유럽식품안전청 (European Food Safety Authority, EFSA)	www.efsa.europa.eu
일본	일본 후생노동성	www.mhlw.go.jp
	일본 식품안전위원회	www.fsc.go.jp

- (2) 모니터링 결과를 바탕으로 다소비 농산물 및 환경에서의 단계별 주요 위해요소 분석 및 관리 개선방안 확립
- 농산물 섭취에 의한 식중독 발생이 일어날 수 있는 최악의 시나리오(Worst 시나리오, what-if 시나리오) 작성
  - 개발된 개발된 QMRA 기반 동태 모델을 이용하여 농산물별, 재배 방식별, 위생관리에 따른 식중독이 발생할 수 있는 최악의 시나리오로 다음과 같은 경우를 고려할 수 있음

<최악의 시나리오(Worst 시나리오의 예)>

- 재배지 생산 환경 및 재배 방식의 변화
- 갑작스러운 재배 환경 기상 변화
- 단순처리 공정 중 세척 공정의 실패
- 관련 종사자 위생관리 실패
- 보관, 유통 중 적정 온도관리 실패
- :
- 등등

- 최악의 시나리오별 위해수준 산출 및 민감도 분석(sensitivity analysis)
  - 시나리오에 따른 변화는 QMRA 기반 동태 모델에서 입력변수의 변경으로 각각의 시나리오별 위해수준을 산출하고,
  - 이들 위해수준에 영향을 미칠 수 있는 관련 인자별 민감도 분석을 통해 영향수준을 파악하고
  - 이들 영향 수준을 사전에 예방할 수 있는 방법으로 위생관리 방안을 제안할 수 있음
  - 이들 결과는 추후 해당 농산물의 GAP에 대한 관리기준으로 제시 가능
- 따라서, 위 결과와 아래 신선 농산물 안전관리 관련 제외국 기관 탐색을 통하여 국내·외 신선 농산물 위생·안전관리 현황을 비교하며, 국내 단순처리 농산물 식품안전관리 제도 개선 및 기준·규격 설정을 위한 정보 기반을 마련할 예정임

## 2-4. 농산물에서 식중독 세균 신속검출법 개발 및 표준화

### 1. 6종 식중독 세균 신속검출 특이 유전자 마커 탐색 및 multiplex real-time PCR Kit 최적 조건 확립

#### 가. 위해 식중독 세균 6종에 대한 특이 유전자 마커 탐색

(1) NCBI에 등록된 유전자 정보를 활용하여 6종의 식중독 표준균주와 wild type 균주에 공통적으로 적용 가능한 타겟 유전자 및 마커 탐색

(가) 선행 자료를 통해 비교 대상 Target gene과 Primer 조사

□ 본 연구에 포함된 6종(EHEC, *S. aureus*, *S. spp.*, *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *C. perfringens*)과 관련된 논문 등을 통해 Target gene 및 primer 정보 등을 조사하였음

(나) NCBI에서 target gene의 full sequence 검색

□ NCBI 사이트 접속

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>

□ 찾고자 하는 target gene 검색

Ex) *Bacillus cereus* (hbl)



□ 찾고자 하는 target gene의 size(bp) 확인 후 선택 (size가 수천 bp에서 선택)

나. 1시간 이내 multiplex real-time PCR Kit 최적조건 확립

(1) 식중독균 특이적 반응성 multiplex real-time PCR 용 프라이머/프로브 세트 개발 및 선정

(가) Primer 후보 선정

□ Target gene의 full sequence와 primer sequence 정보 비교 방법

- NCBI에서 찾은 target gene의 full sequence를 복사하여 'seqbuilder' 프로그램에 붙여 넣으면 target gene의 full sequence에 상보적인 sequence가 같이 나타났음
- 알고 있는 primer sequence를 'seqbuilder' 프로그램에서 검색한 후 일치하는 sequence 유무를 확인하였음
- 일치하는 sequence가 없다면 다시 target gene의 full sequence 검색하였음
- 균주의 strain에 따라 같은 target gene이라도 gene sequence가 다른 경우가 있음. 또한 논문에서 나타난 F primer sequence는 'seqbuilder' 프로그램에서 5'→3' strand sequence와 동일했고, 반대로 R primer sequence는 seqbuilder 상 3'→5' strand sequence와 동일하였음

□ Target gene의 full sequence 정보와 알고 있는 target gene의 primer sequence와 상보적인 sequence가 일치하면 Target gene의 full sequence 내에서 새로운 primer 탐색을 진행하였음

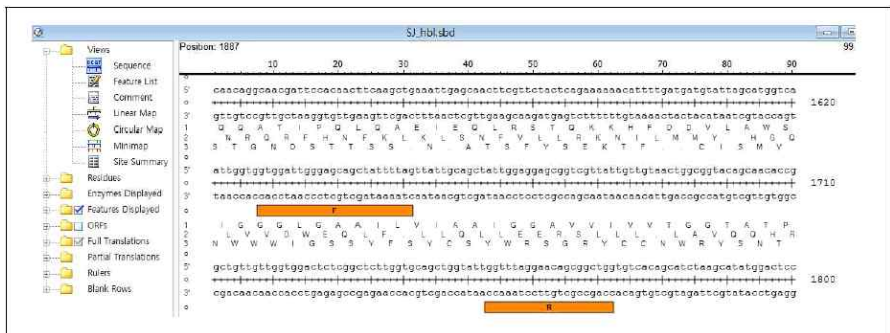
- Primer 선정 기준은 임의적이거나, primer의 길이(20-25bp) 및 G-C 비율을 확인하여 netprimer에서 sequence를 평가하였음

```

ORIGIN
1  tgaagtgaac  cctgtcaagt  agacagtatt  caaaaaaac  aactaagcaa  cctgagttct
61  atatttata  ggactcaggt  tatttagttt  cttttggaac  ctttgggtat  tataaaagtg
121  tataatatt  cgcacagcaa  acttaacctc  atcagctgtg  cggaaagagt  ataatgaaa
181  acactctgac  ttaaagtgac  tgaagaagct  ttctatacaa  gcattgtccc  aacagtttcc
241  ctttctggac  aactatgctt  tcacttgata  ttttttgagt  agttgattat  attgacgaga
301  tgtgtactgg  aacctctgat  cactatgcag  gagaatccct  tcaagtttcc  gttttttctt
361  tgctttttta  agtgtgtcta  gtaactagtt  taggtcattt  ctacggctaa  ttccataggg
421  aacaatttca  ttgtgtata  ggtctttaat  agcggataag  tacaatctct  gtccattgaa
481  aatcaaatag  gtaatatctg  ttacctattt  ttctgttggg  ttggaagctt  gaaaatccct
541  gttcaagatg  ttatctgaaa  tcacataagc  ttctttcttc  ccgtaataag  gtcgttttct
601  octaataata  gctttgatac  ctagtccacc  catcaacctt  tgtatacgtt  tgtgattaaa
661  atgaaggtta  taagtgggct  tcagccaaac  ttgtactctc  ctgtatccat  aatcccttt
    
```

○ Primer 선정기준

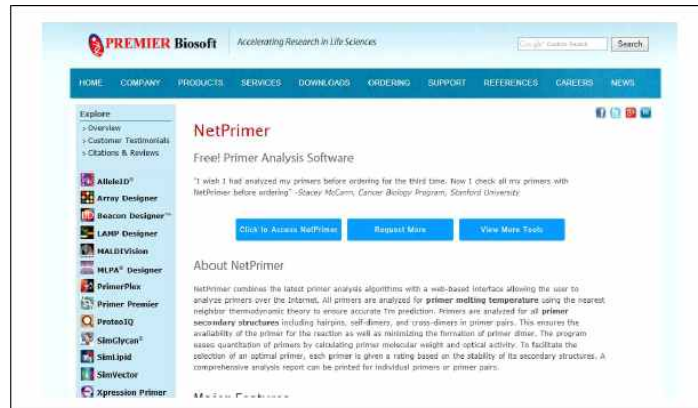
- ① Rating: 80-100 사이
- ② Tm값: 55-61℃ 사이
- ③ primer의 길이: 20-25bp
- ④ G-C contents: 40-60% 사이



(나) Netprimer를 이용한 Primer 검증

- Netprimer 사이트 접속

<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/index.html>



- primer sequence를 입력하고 결과값 확인

(다) Singleplex PCR을 이용한 Primer 검증

1) DNA preparation

- Beadbeater 이용하여 singleplex PCR에 이용할 DNA를 준비하는 과정으로 세포의 cell을 깨주는 과정임
- 균주 50ul+bead 2스푼

2) PCR 조성에 맞게 tube에 분주

- PCR tube에 총 volume 25 ul가 되도록 각각의 성분을 넣어주었음
- Template DNA 1 ul, F& R primer 각각 0.75 ul, Taq buffer 2.5 ul, dNTP 2.5 ul, Taq polymerase 0.5 ul, Molecular water 17 ul을 넣어주었음

표 2-4-1. Singleplex PCR을 이용한 검증 시 조성

Samples	Volume	Quantity
Template DNA	1 $\mu$ L	40 ng
R primer ( $\mu$ M)	0.75 $\mu$ L	15
F primer ( $\mu$ M)	0.75 $\mu$ L	15 pmol
Taq bufer (10X)	2.5 $\mu$ L	
dNTP (each 2mM)	2.5 $\mu$ L	
Taq polymerase	0.5 $\mu$ L	
M.W	17 $\mu$ L	
Total	25 $\mu$ L	

3) Tm값 확인하여 PCR run

- 선행 연구 균주
  - 선행 연구의 균주별 타겟진은 EHEC(stx2, rfbE), *S. aureus*(Sa442), *S. spp.*(ttr), *L. monocytogenes*(lssrA), *B. cereus*(hbl), *C. Perfringens*(plc, cpa)이고 Tm은 아래 표와 같음

표 2-4-2 . Singleplex PCR을 이용한 검증 시 선행 연구의 균주별 Target gene 및 Tm(°C)

Pathogen	EHEC	EHEC	B	S	S.au	L	C.P	C.P
Tatget gene	stx2	rfbE	hbl	ttr	Sa442	lssrA	plc	cpa
Tm(°C)	54.5	58	61.7	59.9	60.8	57	62.4	60.7

□ 본 과제용 균주 1차 Tm값

- 본 과제용 균주별 Target gene에 대한 Tm(°C)은 60°C에 가까운 값을 선정하였음

표 2-4-3. Singleplex PCR을 이용한 검증 시 1차 본 과제용 균주별 Target gene 및 Tm(°C)

Pathogen	E H EC	E H EC	E H EC	E H EC	S.au	S.au	L.m o	L.m o	S	S	C.P	C.P	C.P	C.P	B	B
Tatget gene	stx2 (1)	stx2 (2)	rfbE (1)	rfbE (2)	Sa442(1)	Sa442	lssrA(1)	lssrA2)	ttr(1)	ttr2)	cpa(1)	cpa2)	plc(1)	plc2)	hbl(1)	hbl2)
Tm(°C)	57.52	59.03	59.32	59.32	58.13	56.28	58.53	59.2	60.31	56.67	60.26	59.9	59.1	55.66	58.18	59.33

□ 본 과제용 균주 2차 Tm값

- 본 과제용 균주별 Target gene에 대한 Tm(°C)은 60°C에 가까운 값을 선정하였음

표 2-4-4. Singleplex PCR을 이용한 검증 시2차 본 과제용 균주별 Target gene 및 Tm(°C)

Pathogen	S	S	S.au	S.au
Tatget gene	invA(1)	invA(2)	femA(1)	femA(2)
Tm(°C)	59.4	59.9	57.3	59.7

- Primer의 Tm값과 실험 실시할 때의 Tm값이 맞지 않는 것은 PCR 기계 자체 gradient 설정에 유사한 값으로 맞추어 실험을 진행하기 때문임

4) 전기영동

□ 전기영동에 쓰일 agarose gel(농도 2.5%) 준비

- TAE buffer(100ml)+agar(2.5g)+Etbr(4ul) 섞은 후 녹여 전기영동 틀에 굳혔음

□ 전기영동 시 well에 넣을 DNA 준비 후 전기영동 실시

- DNA(10ul)+6X dye(2ul) mix 후 전기영동 well에 주입 후 전기영동 실시하였음
- Marker의 경우, 확인하고자 하는 DNA의 size에 따라 설정하였음

(라) Cross check를 이용한 검증

1) DNA preparation

- Beadbeater 이용하여 singleplex PCR에 이용할 DNA를 준비하는 과정으로 세포의 cell을 깨주는 과정임
- 균주 50ul+bead 2스푼

2) PCR 조성에 맞게 tube에 분주

- PCR tube에 총 volume 25 ul가 되도록 각각의 성분을 넣어주었음
- Template DNA 1 ul, F& R primer 각각 0.75 ul, Taq buffer 2.5 ul, dNTP 2.5 ul, Taq polymerase 0.5 ul, Molecular water 17 ul을 넣어주었음

표 2-4-5. Cross check PCR을 이용한 검증 시 조성

Samples	Volume	Quantity
Template DNA	1 ul	15 ul
R primer(20pmol)	0.75 ul	0.75 ul
F primer(20pmol)	0.75 ul	0.75 ul
Taq buffer(10X)	2.5 ul	2.5 ul
dNTP	2.5 ul	2.5 ul
Taq polymerase	0.5 ul	0.5 ul
Molecular Water	17 ul	3 ul
Total	25 ul	25 ul

□ 실험대상

- Mix 조성대로 PCR tube에 분주함

□ 실험대상의 비교군(-)

- 실험대상이 되는 균주를 제외한 나머지 15균주의 DNA 1ul씩 tube에 넣어 섞어줌

3) Tm값 확인하여 PCR run

□ 선행 연구 균주의 Tm값

- 선행 연구의 균주별 Target gene은 EHEC(stx2, rfbE), *S. aureus*(Sa442), *S. spp.*(ttr), *L. monocytogenes*(lssrA), *B. cereus*(hbl), *C. Perfringens*(plc, cpa)이고 Tm은 아래 표와 같음

표 2-4-6. Cross check PCR을 이용한 검증 시 선행 연구의 균주별 Target gene 및 Tm(°C)

Pathogen	EHEC	EHEC	B	S	S.au	L	C.P	C.P
Target gene	stx2	rfbE	hbl	ttr	Sa442	lssrA	plc	cpa
Tm(°C)	54.5	58	61.7	59.9	60.8	57	62.4	60.7

□ 본 과제용 균주 1차 Tm값

- 본 과제용 균주별 Target gene에 대한 Tm(°C)은 60°C에 가까운 값을 선정하였음



표 2-4-7. Cross check PCR을 이용한 검증 시 1차 본 과제용 균주별 Target gene 및 Tm(°C)

Pathogen	EHEC	EHEC	EHEC	EHEC	S.au	S.au	Lmo	Lmo	S	S	C.P	C.P	C.P	C.P	B	B
Target gene	stx2(1)	stx2(2)	rfbE(1)	rfbE(2)	Sa442(1)	Sa442(2)	lssrA(1)	lssrA(2)	ttr(1)	ttr(2)	cpa(1)	cpa(2)	plc(1)	plc(2)	hbl(1)	hbl(1)
Tm(°C)	57.52	59.03	59.32	59.32	58.13	56.28	58.53	59.2	60.31	59.67	60.26	59.9	59.1	55.66	58.18	59.33

□ 본 과제용 균주 2차 Tm값

○ 본 과제용 균주별 Target gene에 대한 Tm(°C)은 60°C에 가까운 값을 선정하였음

표 2-4-8. Cross check PCR을 이용한 검증 시 1차 본 과제용 균주별 Target gene 및 Tm(°C)

Pathogen	S	S	S.au	S.au
Target gene	invA(1)	invA(2)	femA(1)	femA(2)
Tm(°C)	59.4	59.9	57.3	59.7

○ Primer의 Tm값과 실험 실시할 때의 Tm값이 맞지 않는 것은 PCR 기계 자체 gradient 설정에 유사한 값으로 맞추어 실험을 진행하기 때문임

#### 4) 전기영동

□ 전기영동에 쓰일 agarose gel(농도 2.5%) 준비

○ TAE buffer(100ml)+agar(2.5g)+Etbr(4ul) 섞은 후 녹여 전기영동 틀에 굳혔음

□ 전기영동 시 well에 넣을 DNA 준비 후 전기영동 실시

○ DNA(10ul)+6X dye(2ul) mix 후 전기영동well에 주입 후 전기영동 실시하였음

#### (마) Singleplex Real-Time PCR 활성 검증

1) Singleplex PCR과 Cross check 검증이 완료된 primer를 이용하여 Singleplex Real-Time PCR을 통해 활성을 확인하였음

○ Singleplex Real-Time PCR 활성 검증을 위한 진행 target gene 아래와 같음

표 2-4-9. Singleplex Real-Time PCR 활성 검증 균주별 Target gene

Pathogen	Target gene	Pathogen	Target gene
<i>B. cereus</i>	hbl(1)	EHEC	stx2(1)
	hbl(2)		stx2(2)
<i>C. perfringens</i>	plc(2)		rfbE(1)
	cpa(1)		rfbE(2)
	cpa(2)	<i>S. spp.</i>	
<i>L. monocytogenes</i>	lssrA(1)	<i>S. aureus</i>	femA(1)

#### 2) DNA extraction

□ G-spin(kit)를 이용하여 chromosome, 단백질, 부유물 등을 제거하는 단계로, template

DNA를 준비하는 단계. (G-spin kit 내의 설명서 참고)

3) Real-Time PCR 조성에 맞게 tube 안에 분주하였음

□ Real-Time PCR 조성은 아래 표와 같음

- 실험 대상 target gene은 Template DNA 1 ul, F, R primer 각각 0.75 ul, qPCR mix 5 ul(1X), Taqman probe 0.75 ul, ROX dye II 0.4 ul, Molecular Water 11.35 ul
- 실험 대상 (-) 비교군은 F, R primer 각각 0.75 ul, qPCR mix 5 ul(1X), Taqman probe 0.75 ul, ROX dye II 0.4 ul, Molecular Water 12.35 ul (Negative control의 경우 template DNA 대신 M.W. 1 ul를 넣음)

표 2-4-10. Real-Time PCR 조성

Samples	volume	Quantity
DNA template	1 ul	
F primer (20 uM)	0.75 ul	15 pmol
R primer (20 uM)	0.75 ul	15 pmol
qPCR mix(2X)	10 ul	1X
TaqMan probe (20 uM)	0.75 ul	15 pmol
ROX reference dye II	0.4 ul	
Molecular Water	6.35 ul	
Total	20 ul	

4) ABI 7500 Fast 모델 Real-Time PCR 기기에 tube를 넣고 분석 실시하였음

(바) Multiplex PCR을 통한 최적화

1) 6군주를 여러 group으로 묶어 전기영동 상에서 간섭 없이 band가 확인되는지 검증하였음

- Singleplex Real Time PCR 활성이 나타난 target gene의 primer를 이용하여 grouping 진행하였음

2) 각 target gene 중 서로 다른 군주가 섞이도록 grouping

□ 유사한 Tm값을 가지는 target gene을 기준으로 하나의 그룹으로 묶었음

- Group 1: EHEC(stx2(1), stx2(2)), L. monocytogenes(lssrA(1), lssrA(2))
- Group 2: EHEC(rfbE(1), rfbE(2)), B. cereus(hbl(1), hbl(2))
- Group 3: C. perfringens(cap(1), cpa(2)), S. spp.(invA(1))
- Group 4: C. perfringens(plc(2)), S. aureus(femA(1))

표 2-4-11. Multiplex PCR 최적화를 위한 Grouping

Group	Pathogen	Target gene	Tm (°C)	Size (bp)
1	<i>EHEC</i>	stx2(1)	57.52	216
		stx2(2)	59.03	115
	<i>L. monocytogenes</i>	lssrA(1)	58.53	180
		lssrA(2)	59.2	220
2	<i>EHEC</i>	rfbE(1)	59.32	169
		rfbE(2)	59.32	185
	<i>B. cereus</i>	hbl(1)	58.18	237
		hbl(2)	59.33	149
3	<i>C. perfringens</i>	cpa(1)	60.26	186
		cpa(2)	59.9	175
	<i>S. spp.</i>	invA(1)	59.17	133
4	<i>C. perfringens</i>	plc(2)	55.66	205
	<i>S. aureus</i>	femA(1)	57.31	133

3) PCR 조성에 맞게 분주 (기본 조성)

□ PCR tube에 총 volume 25 ul가 되도록 각각의 성분을 넣어줌

○ Template DNA 1 ul, F, R primer 각각 0.75 ul, Taq buffer 2.5 ul, dNTP 2.5 ul, Taq polymerase 0.5 ul, Molecular water 17 ul (Group에 따라 primer 양이 달라지므로 총 volume 25 ul에 맞게 M.W 조절)

4) Tm값을 확인하여 PCR 실시

□ 한 그룹 내 primer Tm값들의 평균값으로 정하여 실시하였음

표 2-4-12. Multiplex PCR 조성

Samples	volume
DNA template	1 ul
F primer (20 pmol)	0.75 ul
R primer (20 pmol)	0.75 ul
Taq bfr	2.5 ul
dNTP	2.5 ul
Taq polymerase	0.5 ul
Molecular Water	17 ul
Total	25 ul

표 2-4-13. Primer Tm값들의 평균값

Group	1	2	3	4
Tm(°C)	58.5	57	59.8	56.5

5) 전기영동

□ 전기영동에 쓰일 agarose gel(농도 2.5%) 준비

○ TAE buffer(100 ml)+agar(2.5 g)+Etbr(4 ul) 섞은 후 녹여 전기영동 틀에 균침

- 전기영동 기기에 굳힌 agarose gel을 넣음
  - 전기영동 시 well에 넣을 DNA 준비 후 전기영동 실시
    - DNA(10ul)+6X dye(2ul) mix 후 전기영동 well에 주입 후 전기영동 실시하였음
    - Marker의 경우, 확인하고자 하는 DNA의 size에 따라 설정하였음
- (2) 식중독균 진단용 프라이머의 특이성 검정 및 multiplex real-time PCR kit의 최적조건 확립
- (가) 6균주를 여러 group으로 묶어 전기영동 상에서 간섭 없이 band가 확인되는지 검증하였음
- Singleplex Real Time PCR 활성이 나타난 target gene의 primer를 이용하여 grouping 진행하였음
- (나) 각 target gene 중 서로 다른 균주가 섞이도록 grouping
- 유사한 Tm값을 가지는 target gene을 기준으로 하나의 그룹으로 묶었음
    - Group 1: EHEC(stx2(1), stx2(2)), L. monocytogenes(lssrA(1), lssrA(2))
    - Group 2: EHEC(rfbE(1), rfbE(2)), B. cereus(hbl(1), hbl(2))
    - Group 3: C. perfringens(cap(1), cpa(2)), S. spp.(invA(1))
    - Group 4: C. perfringens(plc(2)), S. aureus(femA(1))

표 2-4-14. Multiplex PCR 최적화를 위한 Grouping

Group	Pathogen	Target gene	Tm (°C)	Size (bp)
1	<i>EHEC</i>	stx2(1)	57.52	216
		stx2(2)	59.03	115
	<i>L. monocytogenes</i>	lssrA(1)	58.53	180
		lssrA(2)	59.2	220
2	<i>EHEC</i>	rfbE(1)	59.32	169
		rfbE(2)	59.32	185
	<i>B. cereus</i>	hbl(1)	58.18	237
		hbl(2)	59.33	149
3	<i>C. perfringens</i>	cpa(1)	60.26	186
		cpa(2)	59.9	175
	<i>S. spp.</i>	invA(1)	59.17	133
4	<i>C. perfringens</i>	plc(2)	55.66	205
	<i>S. aureus</i>	femA(1)	57.31	133

- (다) PCR 조성에 맞게 분주 (기본 조성)
- PCR tube에 총 volume 25 ul가 되도록 각각의 성분을 넣어줌
    - Template DNA 1 ul, F, R primer 각각 0.75 ul, Taq buffer 2.5 ul, dNTP 2.5 ul, Taq polymerase 0.5 ul, Molecular water 17 ul (Group에 따라 primer 양이 달라지므로 총 volume 25 ul에 맞게 M.W 조절)

표 2-4-15. Multiplex PCR 조성

Samples	volume
DNA template	1 ul
F primer (20 pmol)	0.75 ul
R primer (20 pmol)	0.75 ul
Taq bfr	2.5 ul
dNTP	2.5 ul
Taq polymerase	0.5 ul
Molecular Water	17 ul
Total	25 ul

(라) Tm값을 확인하여 PCR 실시

- 한 그룹 내 primer Tm값들의 평균값으로 정하여 실시하였음

Group	1	2	3	4
Tm(°C)	58.5	57	59.8	56.5

(마) 전기영동

- 전기영동에 쓰일 agarose gel(농도 2.5%) 준비
  - TAE buffer(100 ml)+agar(2.5 g)+Etbr(4 ul) 섞은 후 녹여 전기영동 틀에 균힙
  - 전기영동 기기에 균힙 agarose gel을 넣음
- 전기영동 시 well에 넣을 DNA 준비 후 전기영동 실시
  - DNA(10ul)+6X dye(2ul) mix 후 전기영동 well에 주입 후 전기영동 실시하였음
  - Marker의 경우, 확인하고자 하는 DNA의 size에 따라 설정하였음

## 2. 위해 식중독 세균 6종 신속검출 전처리 방법 개선 및 multiplex real-time PCR kit 개발

### 가. 식중독 세균 신속검출을 위한 증균배지 개발기술 활용 전처리 방법 개선안 도출

(1) 6시간 이내 증균할 수 있는 증균배지 개발기술 조사 및 적용평가

- 엽채류 등의 농산물에서 식중독 세균 검출 시 전처리의 필요성
  - 식중독 위해인자(세균)는 농산물에서 매우 낮은 양으로 오염되어 있고 스트레스로 인해 증식하지 않는 경우도 많으며 시료 내에 비균질하게 오염되어 있어 신속한 검출을 위해서는 탈리, 농축 등의 전처리 과정이 필요함

(가) 엽채류 등의 농산물에서 식중독 세균 탈리용액 적용

- 1) 엽채류 등의 농산물에서 식중독 세균 탈리용액 적용의 필요성
  - 농산물에서 식중독 세균을 탈리하는 것은 식품에서 위해인자를 분리하는 과정을 의미하며, 세균은 식품 내에 불균질하게 분포되기 때문에 식품에 붙어있는 위해인자를 적절하게 분리해내야 함
  - 세균의 경우 시료 25g을 9배 가량의 멸균 식염수 등과 섞어 균질화하여 탈리액으로

사용하는 경우가 많으나 어떤 시료를 사용하느냐에 따라 탈리 방법은 다양화될 수 있음.

- 탈리 과정 중 균의 손상을 막기 위해 완충 용액을 탈리 용매로 적용함
- 균질화에 쓰이는 Phosphate buffered saline, Buffered peptone water, Sterile distilled water 등과 같은 다양한 용액을 적용하여 가장 적합한 탈리용액을 활용하고자 함

## 2) 조사 결과

- 세균의 경우 시료 25g을 9배 가량의 멸균 식염수 등과 섞어 균질화하여 탈리액으로 사용하는 경우가 많으나 어떤 시료를 사용하느냐에 따라 탈리 방법은 다양화 될 수 있음
- 탈리 과정 중 균의 손상을 막기 위해 완충 용액을 탈리 용매로 적용함
- 균질화 쓰이는 Phosphate buffered saline, Buffered peptone water, Sterile distilled water 등과 같은 다양한 탈리 용액을 적용하여 가장 적합한 탈리용액을 활용하고자 함

## 3) 탈리용액 비교 실험 방법

- 시험균액 제조 및 배양
  - 각 식중독 세균들의 순수분리를 위해 멸균된 TSB 10 mL에 각각의 표준균주를 접종하고, 35°C에서 24시간 배양하여 활성화시켰음. 이렇게 배양된 표준균주를 각각의 선택 배지(agar plate)에 각각 streaking하고, 35°C에서 24시간 배양한 후 전형적인 집락을 확인하여 냉장보관(4°C)하면서 사용하였음
  - 앞서 선택 배지에서 분리된 각각의 colony를 백금이로 취하여 멸균된 TSB 10 mL에 접종하고, 35°C에서 24시간 배양으로 활성화시킨 후, 다시 배양된 균을 TSB 10 mL에 100 µL씩 접종하여 35°C에서 24시간 동안 전배양하였음
  - 배양된 표준균주를 20분간 원심분리(3000rpm/4°C)하고, 상등액을 제거한 후 PBS(pH 7.4)을 10 mL 넣고 pellet을 재부유시켰음. 다시 20분간 원심분리(3000rpm/4°C)하여 상등액을 제거한 후, PBS를 10 mL 넣고 pellet을 재부유하여 최종 균수의 농도를 10<sup>6</sup> CFU/mL가 되도록 하였음
- 시료 준비
  - 상추는 외엽과 중심부를 제거한 후 멸균된 수술용 메스로 5 × 5 cm로 절단한 것 10 장 (무게 10 g, 면적 200 cm<sup>2</sup>; 엽면적계 (Li-3100C, Li-Cor, Lincoln, NE, USA)에 올려 측정)이 되게 절단한 것을 본 연구에 사용하였음
  - 각 시료는 증류수로 5분세척, 30분 물빼기 한 후 마이크로핏펫을 이용하여 1.0 ml/g 이 되게 표면에 고르게 접종하였고 이후 후드에서 1시간동안 건조
- 탈리용매 및 탈리시간에 따른 회수율 비교
  - 탈리용매 및 탈리시간에 따른 회수율을 비교하기 위하여 식중독균이 접종된 상추를 stomacher백에 넣고 0.1% Buffered peptone water, Phosphate buffered saline(pH 7.4), Sterile distilled water 90 ml(10배 희석)를 가함
  - 단순히 탈리만 한 용액과 stomacher로 10, 30, 60, 120초간 균질화 시킨 각각의 용액 1 ml를 취하여 9 ml의 Sterile distilled water로 희석함
  - 각 희석농도에 대하여 100 µL씩 각각의 선택배지에 접종한 후 37°C에서 24-48시간 배양한 후 집락을 계수함

(나) 엽채류 등의 농산물에서 식중독 세균 농축 개선 방안

1) 엽채류 등의 농산물에서 식중독 세균 농축의 필요성

- 식품 내 존재하는 식중독 세균의 경우 수가 매우 적기 때문에 한정된 샘플에서 이를 검출하기 위해 최대한 많은 양의 세균을 회수해야 함
- 식중독 세균은 PCR 등과 같은 분자진단 방법을 이용하여 검출하기 위해 해당 검출 기술이 가지는 검출 한계 이상의 균 농도가 필요함
- 검출 한계 이상의 균 농도를 확보하기 위해 농산물에서 탈리한 용액을 농축함으로써 최대한 많은 양의 식중독 세균을 회수하고자 함
- 식중독 세균 증균에 앞서 filter를 이용한 미생물 농축, 원심분리를 이용한 미생물 농축 등이 이용되고 있으며, 최근 이 방법 외에 면역자기비드 분리 방법 등과 같은 기술들이 이용되고 있음
- 식중독 세균 농축에 이용될 수 있는 방법들의 특징을 조사하여 적용하고자 함

표 2-4-16. 식중독 세균 농축에 이용되는 방법의 특징

방법	종류	방법 및 장단점
antibody capture assay	immunomagnetic bead separation(IMS)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 불순물이나 PCR inhibitor를 제거하기 위한 샘플 준비</li> <li>• 매우 특이적</li> </ul>
Centrifugation	differential centrifugation	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 빠르고 저렴, 간단하고 크기가 큰 샘플에 적당</li> <li>• 바이러스 등은 matrix complex와 흡착 및 침전 생길 수 있음</li> </ul>
	Ultracentrifugation	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 바이러스 검출 시 유용</li> <li>• 비용이 비싸고 시간이 오래 걸림</li> </ul>
Filtration	Centrifugal ultrafiltration	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Size-exclusion filtration</li> <li>• filter adsorption-elution</li> </ul>
	electro-positive/negative filtration	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 빠르고 간단</li> <li>• 비특이적, 필터가 빨리 막히고 필터에서 세균이 잘 떨어지지 않음, 크기가 큰 샘플에 부적당</li> </ul>

2) 조사 결과

- 정상세균총의 많은 농산물에서의 효과적인 식중독 균 검출을 위해서는 농산물에서의 식중독 균의 탈리 외에도 균의 순수 분리정제 기술이 필수적임
- 본 연구에서는 실린지 필터(syringe filtration)와 원심분리를 이용하여 농산물에서의 중독균의 개선하고자 함
- 기존 filtration 방법을 사용할 경우, 식품의 단백질, 지방 등의 높은 함량으로 filter가 막히는 한계가 있어 이를 극복하기 위해 개발됨
- 식품에 완충용액을 넣어 균질화 후 세균이 통과할 수 있는 pore size가 큰 필터를 통해 식품 matrix만 걸러내고, 2차적으로 세균이 통과할 수 없는 pore size가 작은 filter를 이용하여 최종적으로 미생물만 걸러 농축하는 방법으로 전처리 시간이 빠르고 저렴함
- 실린지 필터법은 실린지 필터를 주사기(syringe)에 끼운 후, 위에서 누르는 압력을 이용하여 균을 필터사이로 통과시키는 방법으로 시간이 매우 단축되고 오염의 가능성도 적으면서 기존 멤브레인 필터와 동일한 효과를 볼 수 있음



- 특히 실린지 필터법으로 균을 정제한 경우 정제액을 튜브 등에 모아 PCR 등으로 검출 가능하기 때문에 본 연구개발 주제에 매우 적합하다고 할 수 있음
- 검증시험에 사용될 농산물은 업체류인 상추로 결정하였고 이를 대상으로 개발된 기술을 평가하였음

### 3) 농축 방법 개선을 위한 적용 실험

#### □ 시험균액 제조 및 배양

- 각 식중독 세균들의 순수분리를 위해 멸균된 TSB 10 mL에 각각의 표준균주를 접종하고, 35°C에서 24시간 배양하여 활성화시켰음. 이렇게 배양된 표준균주를 각각의 선택배지(agar plate)에 각각 streaking하고, 35°C에서 24시간 배양한 후 전형적인 집락을 확인하여 냉장보관(4°C)하면서 사용하였음
- 앞서 선택 배지에서 분리된 각각의 colony를 백금으로 취하여 멸균된 TSB 10 mL에 접종하고, 35°C에서 24시간 배양으로 활성화시킨 후, 다시 배양된 균을 TSB 10 mL에 100  $\mu$ L씩 접종하여 35°C에서 24시간 동안 전배양하였음
- 배양된 표준균주를 20분간 원심분리(3000rpm/4°C)하고, 상등액을 제거한 후 PBS(pH 7.4)을 10 mL 넣고 pellet을 재부유시켰음. 다시 20분간 원심분리(3000rpm/4°C)하여 상등액을 제거한 후, PBS를 10 mL 넣고 pellet을 재부유하여 최종 균수의 농도를  $10^6$  CFU/mL가 되도록 하였음

#### □ 시료 준비

- 상추는 외엽과 중심부를 제거한 후 멸균된 수술용 메스로  $5 \times 5$  cm로 절단한 것 10 장(무게 10 g, 면적  $200 \text{ cm}^2$ ; 엽면적계 (Li-3100C, Li-Cor, Lincoln, NE, USA)에 올려 측정)이 되게 절단한 것을 본 연구에 사용하였음
- 각 시료는 증류수로 5분세척, 30분 물빼기 한 후 마이크로펫렛을 이용하여 1.0 ml/g 이 되게 표면에 고르게 접종하고 후드에서 1시간동안 건조하였음

#### □ Membrane filtration(two-step filtration)+Centrifugation 농축방법에 따른 비교

- 식중독균이 접종된 상추 10g을 stomacher백에 넣고 phosphate buffered saline(pH 7.4) 90 ml(10배 희석)를 가한 다음, stomacher로 60초간 균질화함
- 균질화 시킨 용액은 미생물이 통과할 수 있는 pore size가 큰 filter(40  $\mu$ m)을 이용하여 pre-filtration을 진행
- Pre-filtration 용액을 미생물이 통과할 수 없는 pore size가 작은 filter(0.65  $\mu$ m)를 사용하여 최종적으로 미생물이 filter에 걸러짐
- Filter에 1 ml physiological saline 첨가 후 교반하여 filter로부터 식중독 세균 분리
- 필터로부터 식중독 세균 분리 후 배양하지 않은 sample 1ml를 따서 5,000g로 10분간 centrifuge 진행함
- 상등액을 제거한 후 PBS(pH 7.4)을 10 mL 넣고 pellet을 균질화하여 1.0 ml씩 Sterile distilled water로 희석하였음. 각 희석농도에 대하여 100  $\mu$ L씩 각각의 선택배지에 접종한 후 37°C에서 24-48시간 배양한 후 집락을 계수하였음

### (다) 식중독 세균에 대한 증균 배지 개선 방안

#### 1) 증균배지 개선의 필요성



- 식중독 세균을 어느 샘플에서 검출하느냐에 따라 그 민감도와 특이도에 있어서 검출법마다 현저한 차이를 보임
- 특히 농산물의 경우 세균이 매우 낮은 양으로 오염되어 있어 전처리 과정을 거쳐 회수하게 되는 세균의 양 또한 적으므로, 이를 PCR 등의 신속검출 방법의 검출 한계에 이를 수준으로 증균하는 것이 중요함
- 기존 사용되는 증균 배지를 이용하여 pre-enrichment 단계를 거치나 이는 12-24 시간 정도로 많은 시간을 소요하게 됨
- 기존 사용되던 증균배지에 세균의 성장을 촉진할 수 있는 첨가 성분을 추가하여 증균의 효율을 높임으로서 기존보다 적은 시간의 증균 배양을 할 수 있도록 하며, 이는 식중독 세균의 검출에 소요되는 시간을 단축할 수 있음
- 각 식중독 세균의 증균 배지에 성장을 촉진할 수 있는 첨가 성분의 비율을 조절함으로써 증균 효율이 좋은 첨가 성분의 성분량을 확인하고자 함

## 2) 증균배지의 조사

- 일반적으로 사용되는 증균배지의 경우 세균의 증균 및 손상된 세균의 회복(recovery)의 역할을 함
- 식품공전 및 기타 논문을 참고하여 증균배지로 주로 사용되는 배지 선정하였으며, 6시간 증균 결과 가장 증균 효과가 좋은 배지로 선정하기로 함
- 기존 시판되고 있는 증균 배지에 세균의 성장을 촉진하거나 손상된 세균의 회복 또는 증균을 목적으로 하는 균 외의 세균 성장 억제에 도움이 되는 첨가 성분을 추가함으로써 짧은 시간 내의 증균 효율을 높이고자 함.
- 각 세균 증균 시 증균 배지에 추가할 첨가 성분의 특성은 아래 표와 같으며, 각 성분들의 첨가 비율을 조절함으로써 가장 효율이 좋은 조성을 확인하고자 함

표 2-4-17. 각 식중독 세균별 증균 배지 및 첨가 성분 특성

Pathogen	media	supplement	Characteristics
<i>Bacillus cereus</i>	BHI	Magnesium sulfate	포자 발아 촉진
		yeast extract	추가 영양분 제공
		Sodium pyruvate	손상 세포 회복에 도움
<i>Listeria monocytogenes</i>	BHI	Magnesium sulfate	효소 반응에 필요
		yeast extract	추가 영양분 제공
		Sodium pyruvate	대사 과정의 에너지원 되며 손상 세포 회복에 도움
<i>Staphylococcus aureus</i>	BHI	Magnesium sulfate	포자 발아 촉진
		mannitol	발효능을 가져 식품 내 기타 균주에 비해 생육 유리하게 함
		Sodium pyruvate	손상 세포 회복에 도움

Pathogen	media	supplement	Characteristics
<i>Salmonella</i> <i>Typhimurium</i>	BPW	D-mannitol	발효능을 가져 식품 내 기타 균주에 비해 생육 유리하게 함
		peptone	영양소 공급
EHEC	BPW	lactose	발효능을 가져 식품 내 기타 균주에 비해 생육 유리하게 함
		yeast extract	추가 영양분 제공
		Sodium pyruvate	손상 세포 회복에 도움
<i>Clostridium</i> <i>perfringens</i>	RCM	yeast extract	추가 영양분 제공
		neomycin	항생제로서 gram-negative 균 성장 억제

3) 식중독 세균의 생육에 첨가 성분이 미치는 영향 확인

- 각 식중독 세균들의 순수분리를 위해 멸균된 TSB 10 mL에 각각의 표준균주를 접종하고, 35 °C에서 24시간 배양하여 활성화시켰음. 이렇게 배양된 표준균주를 각각의 선택배지(agar plate)에 각각 streaking하고, 35°C에서 24시간 배양한 후 전형적인 집락을 확인하여 냉장보관(4°C)하면서 사용하였음
- 앞서 선택 배지에서 분리된 각각의 colony를 백금이로 취하여 멸균된 TSB 10 mL에 접종하고, 35°C에서 24시간 배양으로 활성화시킨 후, 다시 배양된 균을 TSB 10 mL에 100 µL씩 접종하여 35°C에서 24시간 동안 전배양하였음
- 배양된 표준균주를 20분간 원심분리(3000 rpm/4 °C)하고, 상등액을 제거한 후 PBS(pH 7.4)을 10 mL 넣고 pellet을 재부유시켰음. 다시 20분간 원심분리(3000rpm/4 °C)하여 상등액을 제거한 후, PBS를 10 mL 넣고 pellet을 재부유하여 최종균수의 농도를 10<sup>9</sup> CFU/mL가 되도록 하였음
- 배양된 표준균주액을 0.1% BPW(Buffered Peptone Water)로 단계 희석하여, 대조군(기존 선택배지)과 실험군(기존 선택배지+생육촉진인자)에 초기접종 농도가 10<sup>2</sup>CFU/mL 수준이 되도록 각각의 9ml 선택배지에 각각의 식중독 세균 1ml씩 접종한 후, 온도별(25°C, 30°C, 35°C), 증균시간별(4hr, 6hr)로 증균한 후 균수를 측정하였음

가) 증균 배지 및 첨가 성분 조성에 따른 영향 확인

- *B. cereus*

표 2-4-18. *B. cereus* 증균 배지 개선 실험 조건

	Magnesium sulfate	yeast extract	sodium pyruvate
1	0.2	1.5	8
2	0.2	1.5	10
3	0.2	2.5	8
4	0.2	2.5	10
5	0.4	1.5	8
6	0.4	1.5	10
7	0.4	2.5	8
8	0.4	2.5	10

- 기존 자료 조사를 통해 시판 배지에 증균 효율이 좋은 생육촉진 성분량을 아래와 같은 조건으로 하여 생육도를 측정하였음
- 위 실험 조건에 따라 배양된 표준균주액을 0.1% BPW(Buffered Peptone Water)로 단계 희석하여, 대조군(기존 선택배지)과 실험군(기존 선택배지+생육촉진인자)에 초기접종 농도가  $10^2$  CFU/mL 수준이 되도록 9 ml의 선택배지에 *B. cereus* 1 ml를 접종한 후, 온도별(25℃, 30℃, 35℃), 증균시간별(4hr, 6hr)로 증균한 후 균수를 측정하였음

□ *L. monocytogenes*

- 기존 자료 조사를 통해 시판 배지에 증균 효율이 좋은 생육촉진 성분량을 아래와 같은 조건으로 하여 생육도를 측정하였음

표 2-4-19. *L. monocytogenes* 증균 배지 개선 실험 조건

	Magnesium sulfate	sodium pyruvate	yeast extract
1	6	3	7
2	6	3	10
3	6	6	7
4	6	6	10
5	9	3	7
6	9	3	10
7	9	6	7
8	9	6	10

- 위 실험 조건에 따라 배양된 표준균주액을 0.1% BPW(Buffered Peptone Water)로 단계 희석하여, 대조군(기존 선택배지)과 실험군(기존 선택배지+생육촉진인자)에 초기 접종 농도가  $10^2$  CFU/mL 수준이 되도록 9ml의 선택배지에 *L. monocytogenes* 1ml를 접종한 후, 온도별(25℃, 30℃, 35℃), 증균시간별(4hr, 6hr)로 증균한 후 균수를 측정하였음

□ *S. aureus*

- 기존 자료 조사를 통해 시판 배지에 증균 효율이 좋은 생육촉진 성분량을 아래와 같은 조건으로 하여 생육도를 측정하였음

표 2-4-20. *S. aureus* 증균 배지 개선 실험 조건

	Magnesium sulfate	sodium pyruvate	mannitol
1	0.1	8	10
2	0.1	8	20
3	0.1	12	10
4	0.1	12	20
5	0.3	8	10
6	0.3	8	20
7	0.3	12	10
8	0.3	12	20

- 위 실험 조건에 따라 배양된 표준균주액을 0.1% BPW(Buffered Peptone Water)로 단계 희석하여, 대조군(기존 선택배지)과 실험군(기존 선택배지+생육촉진인자)에 초기 접종 농도가 10<sup>2</sup> CFU/mL 수준이 되도록 9ml의 선택배지에 *S. aureus* 1ml를 접종한 후, 온도별(25℃, 30℃, 35℃), 증균시간별(4hr, 6hr)로 증균한 후 균수를 측정하였음

□ *S. spp*

- 기존 자료 조사를 통해 시판 배지에 증균 효율이 좋은 생육촉진 성분량을 아래와 같은 조건으로 하여 생육도를 측정하였음

표 2-4-21. *S. spp* 균 배지 개선 조건

	D-mannitol	peptone
1	0	5
2	0	10
3	5	0
4	5	5
5	5	10
6	10	0
7	10	5
8	10	10

- 위 실험 조건에 따라 배양된 표준균주액을 0.1% BPW(Buffered Peptone Water)로 단계 희석하여, 대조군(기존 선택배지)과 실험군(기존 선택배지+생육촉진인자)에 초기접종 농도가 10<sup>2</sup> CFU/mL 수준이 되도록 9ml의 선택배지에 *S. Typhimurium* 1ml를 접종한 후, 온도별(25℃, 30℃, 35℃), 증균시간별(4hr, 6hr)로 증균한 후 균수를 측정하였음

□ EHEC

- 기존 자료 조사를 통해 시판 배지에 증균 효율이 좋은 생육촉진 성분량을 아래와 같은 조건으로 하여 생육도를 측정하였음

표 2-4-22. EHEC 증균 배지 개선 조건

	Sodium pyruvate	yeast extract	lactose
1	0.5	3	5
2	0.5	3	10
3	0.5	6	5
4	0.5	6	10
5	2	3	5
6	2	3	10
7	2	6	5
8	2	6	10

- 위 실험 조건에 따라 배양된 표준균주액을 0.1% BPW(Buffered Peptone Water)로 단계 희석하여, 대조군(기존 선택배지)과 실험군(기존 선택배지+생육촉진인자)에 초기접종농도가 10<sup>2</sup> CFU/mL 수준이 되도록 9ml의 선택배지에 EHEC 1ml를 접종한 후, 온도별(25℃, 30℃, 35℃), 증균시간별(4hr, 6hr)로 증균한 후 균수를 측정하였음

- 위 실험 조건에 따라 배양된 표준균주액을 0.1% BPW(Buffered Peptone Water)로 단계 희석하여, 대조군(기존 선택배지)과 실험군(기존 선택배지+생육촉진인자)에 초기접종 농도가  $10^2$  CFU/mL 수준이 되도록 9ml의 선택배지에 EHEC 1ml를 접종한 후, 온도별 (25°C, 30°C, 35°C), 증균시간별(4hr, 6hr)로 증균한 후 균수를 측정하였음

□ *C. perfringens*

- 기존 자료 조사를 통해 시판 배지에 증균 효율이 좋은 생육촉진 성분량을 아래와 같은 조건으로 하여 생육도를 측정하였음

표 2-4-23. *C. perfringens* 증균 배지 개선 조건

	yeast extract	neomycin
1	3	0.1
2	3	0.2
3	5	0.1
4	5	0.2

- 위 실험 조건에 따라 배양된 표준균주액을 0.1% BPW(Buffered Peptone Water)로 단계 희석하여, 대조군(기존 선택배지)과 실험군(기존 선택배지+생육촉진인자)에 초기접종 농도가  $10^2$  CFU/mL 수준이 되도록 9ml의 선택배지에 *C. perfringens* 1ml를 접종한 후, 온도별(25°C, 30°C, 35°C), 증균시간별(4hr, 6hr)로 증균한 후 균수를 측정하였음

나. 위해 식중독 세균 6종 동시 검출 multiplex real-time PCR kit개발

(1) 현재 구축된 Fluidigm사의 multiplex real-time PCR system 응용

(가) 현재 구축된 Fluidigm사의 multiplex real-time PCR system 응용

- Fluidigm사의 multiplex real-time PCR의 플레이트의 경우 플레이트당 수천개의 hole을 가지며 각각의 hole의 양끝은 hydrophobic, 내부는 hydrophilic 코팅이 되어 있음

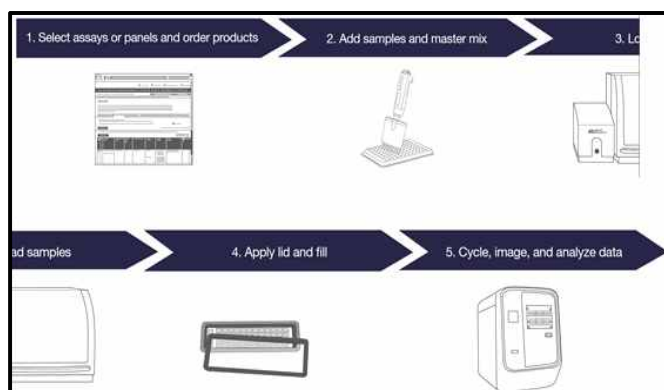


그림 2-4-1. Fluidigm사의 BioMark™ System-multiplex real-time PCR의 work flow

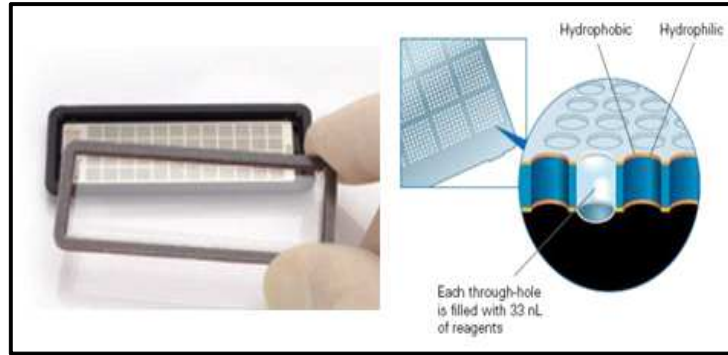


그림 2-4-2. Multiplex real-time PCR에 사용되는 plate 구성의 예

- 그러나 대부분의 Real time PCR 기기 중 많이 쓰이는 타입은 tube type이며, 실험량에 따라 실험자가 키트의 사용량 조절을 용이하게 하기 위하여 single strip type tube를 이용하여 multiplex real time PCR kit를 개발하기로 함
- Multiplex real time PCR은 여러 primer set를 이용하여 동시에 여러 target gene을 검출할 수 있는 방법임
- 확인하고자 하는 샘플의 양이 제한적일 때 여러 target gene의 발현을 볼 수 있기 때문에 확인 실험 시 소요되는 시간 및 노력을 줄일 수 있음
- 현재로서 real time PCR 기기의 성능에 따라 하나의 tube에서 최대 다섯 개까지의 서로 다른 target gene을 증폭 가능하나, Taqman probe의 경우 fluorescent dye들 간의 간섭으로 보통 2-3 종의 multiplex 그룹을 구성함
- 또한 Primer set의 종류가 많아질수록 증폭 과정 중 primer set 간의 간섭이 발생하여 검출 sensitivity가 감소할 수 있음
- 농산물에는 매우 소량의 식중독 세균이 오염되어 있으며 농산물의 food matrix에 포함되어 있는 PCR inhibitor로 인한 검출 sensitivity가 낮으므로, multiplex real time PCR 그룹 내 primer set 수의 적절한 분배가 필요함

(나) Multiplex real time PCR 개발

- 지난 1차년도 과제에서 각 식중독 세균 검출을 위한 singleplex real time PCR primer 및 probe set 개발 완료
- 이를 바탕으로 multiplex real time PCR kit 개발 진행

표 2-4-24. 개발 완료된 식중독 세균 6종에 대한 primer 및 probe

Pathogen (Target gene)		Primer sequence(5'-3')
<i>L. monocytogenes</i> ( <i>IssrA</i> )	F-Primer	GGGATCGTCCTCGTTATCAAC
	R-Primer	TCTATTTAACCCAGACGGAGAT
	Probe	CGCTGCCTAATAAGCAGTAGCATAGCTG
<i>S. aureus</i> ( <i>femA</i> )	F-Primer	CCTACATATCGATCCATATTTACCA
	R-Primer	CCCTTTATGGAATCCAGTATGTT
	Probe	GATGGCGAGATTACAGGTAATGCTGG

Pathogen (Target gene)		Primer sequence(5'-3')
<i>B. cereus</i> (hbl)	F-Primer	GTGGTGGATTGGGAGCAGCT
	R-Primer	GACACCAGCCGCTGTTTCCTAA
	Probe	CTGTTGTTGGTGGACTCTCGGCTCTT
<i>S. Typhimurium</i> (ttr)	F-Primer	CAGAAAAGCTCTCGTTGGCG
	R-Primer	AAGCATCATGACCGACCAGG
	Probe	CAGCGAACAGTGCGGCGTGC
<i>C. perfringens</i> (cpa)	F-Primer	CCTGACACAGGGGAATCACAA
	R-Primer	CATGTCCTGCGCTATCAACG
	Probe	CTTGGAGAGGCTATGCACTATTTTGGAG
EHEC (stx2)	F-Primer	ATTAACCACACCCACCG
	R-Primer	GTCATGGAAACCGTTGTCAC
	Probe	CAGTTATTTTGCTGTGGATATACGAGGGCTTG

1) Real time PCR 기기 상 적용 가능 Fluorescent dye 확인

가) Multiplex real time PCR group 적용 시 고려 사항

❑ Multiplex 진행 시 fluorescent 파장대 간 간섭이 없는 dye

❑ ABI 7500 fast 기기 적용 가능 fluorescent dye

- Channel 1: FAM, SYBR Green
- Channel 2: JOE, VIC
- Channel 3: TAMRA, NED, CY3
- Channel 4: ROX, TEXAS RED
- Channel 5: Cy5

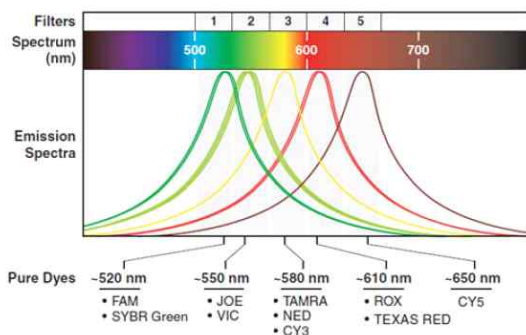
❑ Biorad CFX 96 기기 적용 가능 fluorescent dye

- Channel 1: FAM, SYBR Green
- Channel 2: HEX, TET, Cal Gold 540, VIC
- Channel 3: ROX, TEXAS RED, Cal Red 610
- Channel 4: Cy5, Quasar 670
- Channel 5: Quasar 705

❑ 여러 real time PCR 장비에 공통적으로 사용 가능한 fluorescent dye

❑ 개발 후 제품화 시 사용자가 보유하는 real time PCR 장비가 각각 다를 것이므로 기기 종류에 상관없이 공통적으로 사용가능한 fluorescent dye를 사용하여 개발하고자 함

❖ ABI 7500 fast



❖ Biorad

Channel	Fluorophore	Selected	Color
1	FAM	<input type="checkbox"/>	Blue
	SYBR	<input type="checkbox"/>	Green
	HEX	<input type="checkbox"/>	Teal
	Cal Gold 540	<input type="checkbox"/>	Yellow-Green
	VIC	<input type="checkbox"/>	Orange
3	ROX	<input type="checkbox"/>	Red
	Texas Red	<input type="checkbox"/>	Orange-Red
4	Cal Red 610	<input type="checkbox"/>	Red
	Cy5	<input type="checkbox"/>	Purple
5	Quasar 670	<input type="checkbox"/>	Red
	Quasar 705	<input type="checkbox"/>	Dark Red

그림 2-4-3. 각 기기별 fluorescent dye channel 정보

나) 결론

- 각 channel 안에 해당되는 fluorescent dye의 경우 유사한 파장대를 가지고 있으므로 각 다른 channel에 해당되는 fluorescent dye 선정이 필요
- FAM, VIC, Cy5 총 3가지의 fluorescent dye를 이용하여 식중독균 6균주 검출 가능한 multiplex real time PCR kit를 총 2 그룹을 1 세트로 개발 진행하기로 함

2) Multiplex real time PCR 활성 확인

가) DNA preparation

- 인트론 사의 G-spin genomic DNA extraction kit를 이용하여 DNA 추출
  - 배양한 균액 1-2 ml를 1분간 원심분리하여 상등액을 모두 버리고 pellet을 풀어줌
  - Gram-positive 해당: 50 ul의 pre-buffer와 3 ul의 lysozyme을 넣고 섞어준 뒤 37 °C 에서 15분간 incubation 진행
  - G-buffer 250 ul(Gram-positive) 또는 300 ul(Gram-negative)를 넣어주고 invert 하여 섞어준 뒤 65 °C에서 15분간 incubation 진행
  - Binding buffer 250 ul를 넣어주고 pipetting으로 섞어줌
  - 용액을 column tube에 옮긴 후 1분간 원심분리
  - washing buffer A 500 ul를 넣어주고 1분간 원심분리
  - washing buffer B 500 ul를 넣어주고 1분간 원심분리
  - 빈 column을 1분간 원심분리한 뒤 column을 새로운 tube에 옮겨준 뒤 elution buffer 50 ul 넣어준 후 1분간 상온에 둔 후 1분간 원심분리하여 DNA 추출
- 추출된 DNA는 Quickdrop을 이용하여 농도 및 순도를 확인하고, 40 ng/ul에 맞게 희석하여 준비

나) Multiplex real time PCR 반응액 준비

- Multiplex real time PCR 반응액에 필요한 성분들을 각 tube에 넣고 섞어줌
  - F-primer, R-primer, Taqman probe, 엠지메드 사 qPCR mix, ROX dye, molecular water 첨가
  - 실험 결과, 최종적으로 확정된 multiplex real time PCR 조성은 아래 표와 같음

표 2-4-25. Multiplex real time PCR 조성

Group	Target gene(dye)	Sample	volume	기타
Group1	lssrA (FAM-TAMRA)	F primer	0.5 ul	20 uM
		R primer	0.5 ul	20 uM
		probe	0.5 ul	20 uM
	stx2 (VIC-MGB)	F primer	0.5 ul	20 uM
		R primer	0.5 ul	20 uM
		probe	0.5 ul	20 uM
	cpa (Cy5-BHQ2)	F primer	1 ul	20 uM
		R primer	1 ul	20 uM



		probe	1 ul	20 uM
		qPCR mix	8 ul	엡지메드 사
			2 ul	바이오니아 사
		Molecular water	3 ul	
		DNA	1 ul	40 ng/ul, 각 pathogen의 DNA 동일 양 mix 후
Total			20 ul	
Group2	hbl (FAM-TAMRA)	F primer	0.75 ul	20 uM
		R primer	0.75 ul	20 uM
		probe	0.75 ul	20 uM
	femA (VIC-MGB)	F primer	0.75 ul	20 uM
		R primer	0.75 ul	20 uM
		probe	0.75 ul	20 uM
	ttr (Cy5-BHQ2)	F primer	0.5 ul	20 uM
		R primer	0.5 ul	20 uM
		probe	0.5 ul	20 uM
		qPCR mix	8 ul	엡지메드 사
			2 ul	바이오니아 사
		Molecular water	3 ul	
		DNA	1 ul	40 ng/ul, 각 pathogen의 DNA 동일 양 mix 후
	Total			20 ul

표 2-4-26. Multiplex real time PCR 조건

단계	Temp(°C)	Time	Cycle
Initial denaturation	95	5 min	1
Denaturation	95	10 sec	35
Annealing/Extension	60	30 s	

다) Multiplex real time PCR run

다. 중균 배지 기술과 multiplex real-time PCR 기술을 활용한 신속 검출 분석 평가

(1) 8시간 이내 6종의 식중독 세균의 분석 평가

- 실제 농산물의 경우 해당 PCR kit가 검출할 수 있는 균주가 매우 극미량 또는 오염이 되지 않는 경우가 있음
- field test를 위하여 농산물에 해당 식중독균을 인위 접종한 후 검출 여부 확인을 진행하였음
- 시험 균액의 제조
  - 각 식중독 세균들의 순수분리를 위해 멸균된 TSB 10 mL에 각각의 표준균주를 접종하고, 35 °C에서 24시간 배양하여 활성화시켰음. 이렇게 배양된 표준균주를 각각의 선택배지(agar plate)에 각각 streaking하고, 35 °C에서 24시간 배양한 후 전형적인 집락을 확인하여 냉장보관(4 °C)하면서 사용하였음
  - 앞서 선택 배지에서 분리된 각각의 colony를 loop를 이용하여 멸균된 TSB 10 mL에 접종하고, 35 °C에서 24시간 배양하여 사용하였음
  - 배양된 균액은 9ml saline 용액을 이용하여 약 1-2 log 수준까지 희석하였고, 초기 배양

액의 균수를 확인하기 위하여 각 식중독균의 선택배지에 도말하여 정량하였음

□ 농산물의 인위 오염

- 방울토마토는 꼭지를 제거한 후 10 g 정도 크기를 사용하며 고추의 경우 꼭지 및 끝 부분을 제거한 후 10 g을 사용함
- 약 1-2 log 수준의 균액 1 ml를 피펫으로 따 준비한 10 g 시료 표면에 고르게 접종하고 후드에서 1 시간 동안 건조하였음

□ 인위 오염된 농산물의 전처리

① 탈리

- 균액 접종 후 건조된 식품 샘플 10 g과 Phosphate buffered saline(pH 7.4) 90 ml을 스토마커백에 넣은 후 1분간 스토마커를 이용하여 탈리를 진행함

② 농축

- 탈리 용액을 40 um membrane filter를 이용하여 food matrix 등을 걸러냄
- filter를 이용하여 걸러낸 용액은 10,000 RPM에서 20분간 centrifuge를 하여 농축시킴

③ 증균배양

- Centrifuge를 이용하여 농축 후 상층액은 버린 뒤 아래의 pellet을 풀어줌
- pellet에 각 해당 식중독균에 해당하는 증균 배지 10ml를 첨가하여 37 °C, 6시간 배양 조건에서 증균배양을 진행함
- 각 증균 배지는 특정 식중독 세균의 생육 촉진에 도움이 되는 첨가 성분들을 추가한 배지임

표 2-4-27. 생육 촉진 성분이 첨가된 증균 배지

Pathogen	Medium	첨가생육촉진인자(g/L)	온도(°C)	시간(hr)
<i>B. cereus</i>	BHI	Magnesium sulfate: 0.4 Yeast extract: 1.5 sodium pyruvate: 10	35	6
<i>L. monocytogenes</i>	BHI	Magnesium sulfate: 6 Yeast extract: 3 Sodium pyruvate: 7	35	6
<i>S. aureus</i>	BHI	Magnesium sulfate: 0.1 Sodium pyruvate: 8 Mannitol: 20	35	6
<i>S. Typhimurium</i>	BPW	D-mannitol: 0 Peptone: 10	35	6
EHEC	BPW	Sodium pyruvate: 2 Yeast extract: 3 Lactose: 10	35	6
<i>C. perfringens</i>	RCM	Yeast extract: 3 Neomycin: 0.2	35	6

□ DNA 추출

- 인트론 사의 G-spin genomic DNA extraction kit를 이용하여 DNA 추출
- 배양한 균액 1-2 ml를 1분간 원심분리하여 상등액을 모두 버리고 pellet을 풀어줌

- Gram-positive 해당: 50 ul의 pre-buffer와 3 ul의 lysozyme을 넣고 섞어준 뒤 37 °C 에서 15분간 incubation 진행
- G-buffer 250 ul(Gram-positive) 또는 300 ul(Gram-negative)를 넣어주고 invert 하여 섞어준 뒤 65 °C에서 15분간 incubation 진행
- Binding buffer 250 ul를 넣어주고 pipetting으로 섞어줌
- 용액을 column tube에 옮긴 후 1분간 원심분리
- washing buffer A 500 ul를 넣어주고 1분간 원심분리
- washing buffer B 500 ul를 넣어주고 1분간 원심분리
- 빈 column을 1분간 원심분리한 뒤 column을 새로운 tube에 옮겨준 뒤 elution buffer 50 ul 넣어준 후 1분간 상온에 둔 후 1분간 원심분리하여 DNA 추출
- Multiplex real time PCR 진행
  - Multiplex real time PCR 반응액에 필요한 성분들을 각 tube에 넣고 섞어줌
  - F-primer, R-primer, Taqman probe, 엠지메드 사 qPCR mix, ROX dye, molecular water 첨가함
  - 실험 결과, 최종적으로 확정된 multiplex real time PCR 조성 및 반응 조건 은 아래와 같음

**표 2-4-28. multiplex real time PCR 조성 및 반응 조건**

Temperature(°C)	Time	Cycle
50	2 min	1
95	10 min	1
95	15 sec	40
60	1 min	

- Multiplex real time PCR 결과 분석
  - 총 40 cycle까지 real time PCR run 후 결과 확인하였음. 35 cycle 이내 검출 여부는 ct 값 및 증폭 그래프를 통해 확인함

**라. 개발기술을 활용한 multiplex real-time PCR 자동분석시스템 구축**

(1) 식중독 세균 신속검출용 multiplex real-time PCR 키트 개발 및 이를 활용한 자동분석시스템 구축

- Real time PCR의 경우 검출 여부를 실시간으로 확인이 가능함. 증폭 그래프 및 PCR 증폭 산물이 일정량 증폭되었을 때 검출 cycle인 ct값으로 결과 확인이 가능하며 결과의 확인은 아래 그림(ABI Real time PCR software)과 같음
- 해당 샘플에서 DNA 추출 후 개발된 multiplex real time PCR kit에 적용하여 실험 결과를 확인 시 아래 그림 ①과 같이 증폭 그래프를 확인할 수 있으며, 그림 ②와 같이 ct값의 확인을 통해서도 쉽게 검출 여부를 확인할 수 있음

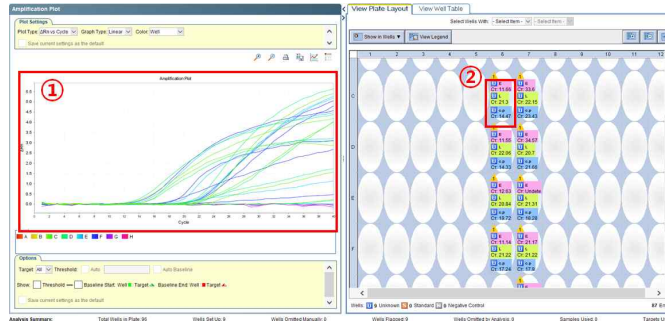


그림 2-4-4. ABI Real time PCR software 결과 확인 예시

### 3. 식중독 세균 신속검출 키트의 AOAC 인증 및 Field test

#### 가. 개발된 PCR 키트의 현장적용 평가를 위한 민감도 및 특이도 검사

(1) AOAC 방법을 준용한 농산물 및 재배환경에서의 민감도/특이도/검출한계/검출시간 분석

(가) 민감도, 검출한계 및 검출시간 분석

□ 실험에 사용된 6종 식중독균에 대한 정보는 다음과 같음

표 2-4-29. 실험에 사용된 균

균주이름	균주의 출처
<i>Clostridium perfringens</i>	NCCP 15911
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 15313
<i>Salmonella</i> Typhimurium	ATCC 700720
<i>Bacillus cereus</i>	KCTC 3624
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 27664
EHEC	ATCC 43895

□ 각 균주는 Tryptic soy Broth(TSB)에서 37°C, 24 시간동안 배양한 후, Intron 사의 G-spin DNA extraction kit를 이용하여 증균배양 원액에서 DNA를 추출하였음. 추출한 원액 DNA는 각 10배씩 단계 희석하여 민감도 확인을 위한 template DNA로 사용하였음

□ 초기 균수를 확인하기 위해 증균배양액 1 ml를 취하여 9 ml의 saline dilution 용액에 단계적으로 희석한 후 각 희석농도에 대하여 100 ul를 취하여 각 선택배지에 접종한 후 37°C, 24 시간 배양 후 집락을 계수함

□ 35 cycle 이내(1시간) 2 log 수준까지 검출 여부를 확인함

(나) 특이도 분석

□ 제작된 primer 및 probe의 특이도를 확인하기 위하여 실험에 사용된 16종 식중독균에 대한 정보는 다음과 같음

표 2-4-30. 실험에 사용된 16종 식중독균

균주이름	균주의 출처
<i>Campylobacter jejuni</i>	KCTC 15212
<i>Campylobacter coli</i>	NCTC 11168
<i>Clostridium perfringens</i>	NCCP 15911
<i>Vibrio vulnificus</i>	CMCP6
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	KCTC 2471
<i>Vibrio cholerae</i>	NCCP 14552
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 15313
<i>Salmonella</i> Typhimurium	ATCC 700720
<i>Bacillus cereus</i>	KCTC 3624
<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC 55076
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 27664
EHEC	ATCC 43895
EAEC	NCCP 14039
ETEC	NCCP 15732
EPEC	NCCP 15661
EIEC	NCCP 15663

- 각 균주로부터 추출한 DNA를 이용하여 real time PCR kit에 적용한 결과 target 균주에서만 증폭이 되었고 다른 균주의 경우 증폭이 일어나지 않음을 확인함

**나. AOAC/ISO validation 방법을 준용한 농산물 및 재배환경에서의 개발된 신속검출 kit 현장 적용 검증**

(1) 개발된 kit를 활용하여 다소비 농산물 및 재배환경에서의 유해미생물 민감도/특이도/검출한계 검증

(가) AOAC 방법을 기반으로 하여 검증 실험 프로토콜 개발 및 검증 실험 방법

□ 시험 균액의 제조

- 각 식중독 세균들의 순수분리를 위해 멸균된 TSB 10 mL에 각각의 표준균주를 접종하고, 35 °C에서 24시간 배양하여 활성화시켰음. 이렇게 배양된 표준 균주를 각각의 선택배지(agar plate)에 각각 streaking하고, 35°C에서 24시간 배양한 후 전형적인 집락을 확인하여 냉장보관(4 °C)하면서 사용
- 앞서 선택 배지에서 분리된 각각의 colony를 loop를 이용하여 멸균된 TSB 10 mL에 접종하고, 35°C에서 24시간 배양하여 사용하였음
- 배양된 균액은 9ml saline 용액을 이용하여 약 1-2 log 수준까지 희석하였고, 초기 배양액의 균수를 확인하기 위하여 각 식중독균의 선택배지에 도말하여 정량하였음
- 각 0-1 log (저농도) 수준 및 1-2 log (고농도) 수준으로 예상되는 희석된 배양액을 농산물 시료의 인위 오염에 사용하였음

□ 농산물의 인위 오염

- 사용한 농산물의 샘플은 방울토마토 및 고추로, 방울토마토는 꼭지를 제거한 후 10 g 정도 크기를 사용하며 고추의 경우 꼭지 및 끝 부분을 제거한 후 10 g을 사용함
- 양성대조균으로 각 0-1 log (저농도) 및 1-2 log (고농도) 수준의 균액 1 ml를 피펫으로 따 준비한 10 g 시료 표면에 고르게 접종하고 후드에서 1 시간 동안 건조하였음
- 음성대조균으로 인위 오염하지 않은 시료 10 g을 사용하였음

- 인위 오염된 농산물의 전처리 및 증균 배양 후 결과 확인
  - 각 양성대조균 및 음성대조균 샘플 10 g과 해당 균에 대한 증균 배지 90 ml을 스토마커 백에 넣은 후 1분간 스토마커를 이용하여 탈리를 진행함
  - 탈리한 각 샘플은 37 °C에서 24시간 배양하였음
  - 24시간 증균배양된 샘플은 DNA를 추출하여 real time PCR로 확인하고 각 선택배지에 도말하여 37 °C에서 24시간 배양 후 확인하였음
- Multiplex real time PCR을 이용한 식중독 세균 검출
  - Multiplex real time PCR은 여러 primer set를 이용하여 동시에 여러 target gene을 검출할 수 있는 방법임
  - 확인하고자 하는 샘플의 양이 제한적일 때 여러 target gene의 발현을 볼 수 있기 때문에 확인 실험 시 소요되는 시간 및 노력을 줄일 수 있음
  - 현재로서 real time PCR 기기의 성능에 따라 하나의 tube에서 최대 다섯개까지의 서로 다른 target gene을 증폭 가능하나, Taqman probe의 경우 fluorescent dye들 간의 간섭으로 보통 2-3 종의 multiplex 그룹을 구성함
  - 또한 Primer set의 종류가 많아질수록 증폭 과정 중 primer set 간의 간섭이 발생하여 검출 sensitivity가 감소할 수 있음
  - 농산물은 매우 소량의 식중독 세균이 오염되어 있으며 농산물의 food matrix에 포함되어 있는 PCR inhibitor로 인한 검출 sensitivity가 낮으므로, multiplex real time PCR 그룹 내 primer set 수의 적절한 분배가 필요하기 때문에 총 6 종의 식중독 세균을 검출하기 위한 multiplex real time PCR kit의 구성을 2 그룹의 triplex로 하여 한 번의 real time PCR run 시 동시에 6종을 검출할 수 있도록 하였음
  - 개발된 multiplex real time PCR kit의 구성은 아래와 같음

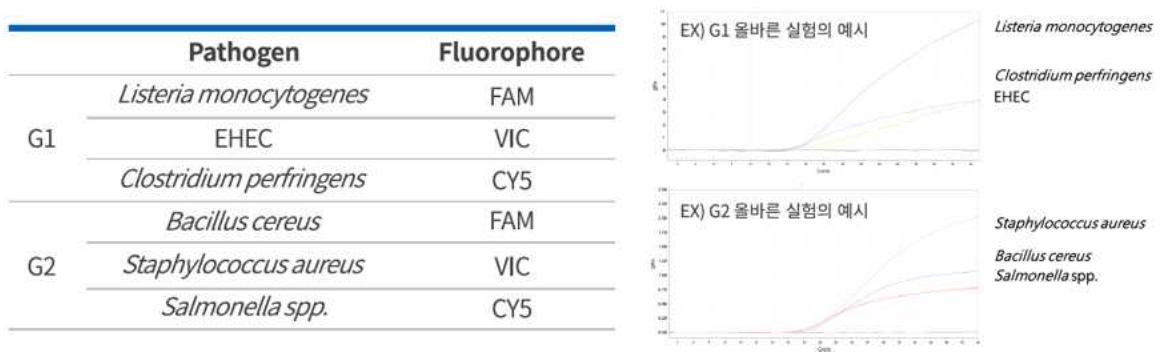


그림 2-4-5. 개발된 multiplex real time PCR kit의 구성

- AOAC 방법을 기반으로 하여 검증 실험 프로토콜을 개발 후 배포한 검증 실험 프로토콜은 아래와 같음

# AOAC 기반 검증을 위한 실험 프로토콜

**1. 시험 균액의 제조**

- 식중독균 6종(EHEC, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Typhimurium)을 TSB에 배양
- 각 0-1 log (저농도) 수준 및 1-2 log (고농도) 수준으로 예상되는 희석된 배양액을 농산물 시료의 인위 오염에 사용하였음.

**2. 농산물의 인위 오염**

- 시료는 멸균적으로 수집하여 적당한 처리 후 10 g 정도를 사용
- 양성대조군으로 각 0-1 log (저농도) 및 1-2 log (고농도) 수준의 균액 1 ml를 피펫으로 따 준비한 시료 표면에 고르게 접종하고 후드에서 1 시간 동안 건조하였음.
- 음성대조군으로는 아무것도 접종되지 않은 시료를 사용함.

**3. 전처리 및 증균 배양**

- 각 오염 및 미오염 샘플 10 g과 증균 배지 90 ml을 스토마커백에 넣은 후 1분간 스토마커를 이용하여 탈리를 진행함.
- 탈리한 각 샘플은 37 ℃에서 24시간 배양하였음.

**4. 결과 확인**

1) Real time PCR을 이용한 결과 확인

- 24시간 증균 배양된 샘플로부터 각각 1 ml를 채취하여 DNA prep kit를 이용하여 DNA 추출
- 각 추출된 DNA 3 ul를 이용하여 개발된 PCR kit 내 strip tube 안 master mix 17 ul와 섞어 총 20 ul의 반응액 제조 후 real time PCR 기기를 이용하여 결과 확인
- 증폭 그래프 및 ct 값 기준 35 cycle 이전에 확인되는 결과를 바탕으로 검출 여부를 확인

(나) AOAC 방법을 기반으로 하여 검증 실험 진행

1) 중앙대학교 검증 실험

- AOAC 방법을 기반으로 하여 개발된 PCR kit가 실제 식품에 적용 가능한지 확인하기 위한 실험을 진행함
- 실제 식품에는 식중독 세균이 없으므로 식품에 각 식중독 세균을 접종하여 검증 실험을 진행하였으며 실험은 세니젠에서 제공한 AOAC 검증 프로토콜에 따라 진행하였음

## 2) 경상대학교 검증 실험

- 개발된 PCR kit의 민감도 검증을 위하여 식품 샘플에 대하여 경상대학교 심원보 교수님 연구실 및 세니젠에서 blind test를 진행

### □ Blind test

- 경상대학교 심원보 교수님 연구실에서 농산물에 특정 세균을 인위적으로 오염시킨 후 A OAC 검증 프로토콜에 따라 전처리한 샘플을 전달받아 세니젠에서 개발된 kit로 식중독 세균 검출 확인 실험을 진행하였음
- 이 때 경상대에서는 인위 접종한 식중독 세균 명을 알려주지 않고 총 샘플 6종을 이용하여 검증 실험을 진행함
- 전처리한 샘플을 받은 세니젠에서 DNA 추출 및 multiplex real time PCR 진행 후 multiplex real time PCR kit로 각 샘플 당 검출 결과 및 세균 명을 전달하였으며 추후 경상대학교에서 실제 접종된 균 정보와 비교하여 blind test 결과를 확인하였음
- 각 샘플 6종으로부터 추출한 DNA를 각각 2 group의 multiplex real time PCR kit에 적용하여 결과를 확인함
- 총 40 cycle까지 반응하여 35 cycle 이전 ct값이 확인될 경우 검출, 그 이후의 경우 불검출로 봄

## 다. 개발 제품의 사용자 편의 제품 설명서 제작 및 표준분석방법 개선안 도출

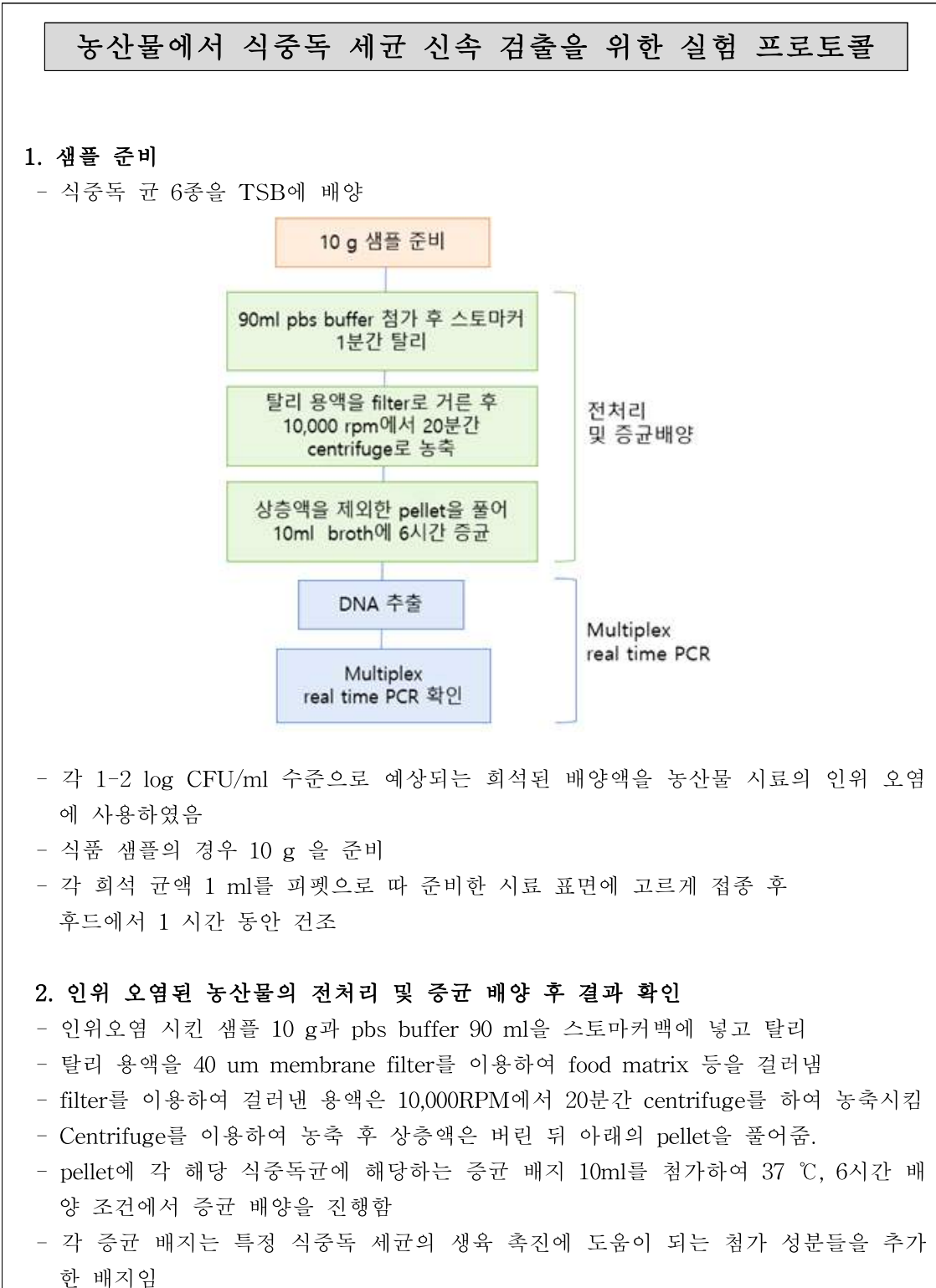
### (1) 사용자 편의 제품 사용설명서 제작 및 표준분석방법 개선안 도출

#### □ 개발된 multiplex real time PCR kit의 사용설명서 제작을 완료하였음

- 농산물에서 식중독 세균을 신속 검출하기 위한 탈리-농축-중균배양-DNA 추출-real time PCR 과정을 간단하게 만들어 제품화 되는 multiplex real time PCR kit 사용설명서에 내용 포함



2-5. 농산물에서 주요 5종 바이러스의 신속검출을 위한 PCR kit 개발 및 상용화



Pathogen	Medium	첨가생육촉진인자 (g/L)	온도 (℃)	시간 (hr)
<i>B. cereus</i>	BHI	Magnesium sulfate: 0.4 Yeast extract: 1.5 sodium pyruvate: 10	37	6
<i>L. monocytogenes</i>	BHI	Magnesium sulfate: 6 Yeast extract: 3 Sodium pyruvate: 7	37	6
<i>S. aureus</i>	BHI	Magnesium sulfate: 0.1 Sodium pyruvate: 8 Mannitol: 20	37	6
<i>S. Typhimurium</i>	BPW	D-mannitol: 0 Peptone: 10	37	6
EHEC	BPW	Sodium pyruvate: 2 Yeast extract: 3 Lactose: 10	37	6
<i>C. perfringens</i>	RCM	Yeast extract: 3 Neomycin: 0.2	37	6

**3. DNA 추출 및 real time PCR**

- 6시간 증균 배양된 샘플은 DNA prep kit를 이용하여 추출
- 각 추출액에서 각 1 ul 씩 따서 해당 multiplex group의 PCR 반응액(well)에 첨가

## 1. 식중독 바이러스 5종 신속검출 PCR 최적조건 확립

### 가. 위해 식중독 바이러스 유전자 탐색

- (1) National Center of Biotechnology Information(NCBI)에서 위해 식중독 바이러스 5종(Norovirus, Rotavirus, Hepatitis A virus, Adenovirus, Astrovirus)에 대한 유전정보를 탐색하였음
  - (가) Keyword로 각각의 바이러스명을 입력하고 Nucleotide를 선택하여 전체 유전자 염기서열을 확보하였음
  - (나) 아데노바이러스의 경우 Hexon 유전자를 타겟으로 검색하였고, 로타바이러스의 경우 VP7 유전자를 타겟으로 검색하였음

### 나. 신규 PCR 마커 (primer) 탐색 및 PCR primer 선별

- (1) 위해 식중독 바이러스 유전자 염기서열을 분석하기 위하여 Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)를 이용하여 다수의 서열을 alignment하였음
- (2) Alignment 결과 및 NCBI의 primer-BLAST 툴을 이용하여 PCR primer를 선별하였음
  - (가) 상동성 있는 부위를 선택하여 신규 primer를 제작하였음
  - (나) Primer 길이는 약 20 bp 전후로 정하였고 Foward primer와 Reverse primer 간의 Tm 값을 고려하여 선별하였음
  - (다) PCR 산물의 길이는 약 200~600 bp의 길이를 선택하였음

## 다. 바이러스 배양

- (1) A형 간염 바이러스를 African green monkey 신장세포인 Vero 세포에 감염하여 배양함
  - (가) Vero 세포는 T-175 flask에서 10% FBS(Fetal bovine serum)가 첨가된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Media)배지를 이용하여 배양하였고 2-3일 간격으로 계대배양하여 유지함
  - (나) A형 간염 바이러스를 증식시키기 위해 Vero 세포를 T-175 flask 표면의 80-90%를 차지할 정도로 성장시키고 2% FBS가 첨가된 DMEM 배지에서 바이러스를 현탁시킨 후 세포에 감염시킴
  - (다) 감염 후 세포병변이 관찰되면 세포 및 세포 배양액을 회수하고 4,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 pellet과 상등액을 분리하였음. 상등액은 회수 후 다음 바이러스 배양을 위한 바이러스 용액으로 이용하였음

## 라. RNA 추출

- (1) 바이러스 배양액으로부터 RNA를 추출하였음
  - (가) A형 간염 바이러스를 Vero 세포에 감염 시키고 5일 후 세포 및 세포 배양액을 회수함. 세포 및 배양액을 4,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 pellet과 상등액을 분리하고 상등액을 회수함
  - (나) Trizol LS (Invitrogen)를 이용하여 상등액 250 ul에서 total RNA를 추출하였음
    - 1) 바이러스 배양액 250 ul에 Trizol LS 750 ul 첨가 후 상온에서 10분간 방치
    - 2) 12,000×g로 15분간 원심분리 후 상층액을 새로운 micro tube에 회수
    - 3) Isopropanol 500 ul 첨가 후 10분간 방치
    - 4) 12,000×g로 15분간 원심분리 후 상층액을 제거
    - 5) 75% 에탄올 1 ml을 첨가하고 잘 혼합
    - 6) 7,500×g로 5분간 원심분리 후 상층액을 제거
    - 7) DEPC가 처리된 증류수 20~50 ul로 RNA를 용출
  - (다) Nano photometer를 이용하여 RNA를 정량하였음. 음성 대조군으로 바이러스를 감염시키지 않은 vero 세포 배양액을 사용하였음

## 마. cDNA 합성 및 PCR

- (1) CycleScript Reverse Transcriptase (Bioneer)를 이용하여 제조사의 실험방법에 따라 RNA로부터 cDNA를 합성함
  - (가) RT-PCR시 식품의약품안전처 및 식품공전에서 제시하는 HAV용 reverse primer (HAV 2, BR9) 및 본 연구를 통하여 새로 디자인한 primer (HAV R1, HAV R2)를 사용하였음
  - (나) RNA와 primer 및 DEPC water를 혼합 후 65°C에서 10분간 반응 후 즉시 ice에 두고 5X reaction buffer 4 ul, 100 mM DTT 2 ul, dNTP 2 ul, reverse transcriptase 1 ul를 첨가하고 48°C에서 1시간동안 반응하여 cDNA를 합성하고 반응이 끝난 후 95°C에서 5분간 반응하여 역전사효소를 불활성화 하였음

(2) 상기 합성한 cDNA로부터 HAV 유전자를 증폭하였음

(가) cDNA 1 ul, Forward, Reverse primer (HAV1,HAV2; BR5,BR9; HAV F1,HAV R1; HAV F2, HAV R2) 각 1 ul (표 3), dH<sub>2</sub>O 17 ul를 AccuPower PCR premix (Bioneer)에 혼합 후 PCR을 수행함

(나) PCR 반응조건은 94℃에서 5분간 DNA를 변성시키고 94℃에서 30초, 55℃에서 30초, 72℃에서 30초를 1회로 하여 30회를 반응시킨 후 72℃에서 5분간 연장 반응하였음

## 바. Cloning

(1) A형 간염바이러스 유전자를 증폭함

(가) TaKaRa 사의 LA Taq polymerase를 이용하여 상기 합성한 cDNA로부터 HAV 유전자를 증폭함. 주형 DNA는 HAV 2, BR9, HAV R1. HAV R2 primer를 이용해 합성한 cDNA 3 ul를 사용하였고 제조사의 실험법에 따라 실험을 수행하였음

(나) PCR시 사용한 primer는 상기 PCR시 사용한 primer와 동일하며 PCR 반응조건은 94℃에서 5분간 DNA를 변성시키고 94℃에서 30초, 55℃에서 30초, 72℃에서 30초를 1회로 하여 30회를 반응시킨 후 72℃에서 5분간 연장 반응하였음

(2) 증폭한 A형 간염바이러스 유전자를 분리·정제함

(가) PCR 종료 후 DNA 전기영동을 수행함. Agarose를 TAE (tris-acetate-EDTA) buffer에 2% (w/v)로 녹인 후 Ecodye (Biofact)를 첨가하여 젤을 만들고 젤의 각 홈에 PCR 증폭 산물 및 크기 식별을 위한 DNA marker를 loading 하였음

(나) 100 V로 20분간 전기영동 한 후 자외선 조사기 (UV transilluminator)로 조사하여 증폭된 DNA 밴드를 관찰하였음. 타겟 DNA를 gel로부터 잘라내고 Gel extraction kit (m biotech)를 이용하여 각각의 PCR 산물을 분리정제 하였음

(3) A형 간염바이러스 유전자를 T-vector에 삽입하고 대장균에 형질전환시킴

(가) T-vector (Promega) 50 ng과 분리 정제한 DNA 약 100 ng, 2× ligation buffer, T4 DNA ligase를 혼합 후 25℃에서 2시간 동안 반응 시킴. T-vector에 ligation 된 각각의 DNA를 *E. coli*에 형질전환 시키고 Blue-white colony selection을 통하여 선별함

(나) T-vector에 각각의 DNA가 삽입되었는지 확인하기 위하여 형질전환된 *E. coli*를 ampicillin이 첨가된 LB 배지에 배양 후 plasmid prep kit (nucleogen)를 이용하여 plasmid를 회수하였음. Plasmid DNA에 EcoR I 제한효소 (TaKaRa)를 처리하고 37℃에서 2시간 반응 후 agarose 전기영동을 통해 vector DNA와 insert DNA를 확인하였음

## 사. Digoxigenin, Biotin 단일클론 항체 개발

(1) 항원 제조

(가) Digoxigenin NHS-ester (Sigma) 및 Biotin NHS-ester (Thermo Fisher Scientific)을 BSA (Bovine Serum Albumin)과 혼합 후 상온에서 1시간 반응 하여 Digoxigenin-BSA conjugate, Biotin-BSA conjugate를 만들었음. 여분의 Digoxigenin NHS-ester, Biotin NHS-ester 반응물은 Amicon Ultra Centrifugal Filter (Millipore)를 이용하여 제거하였음

(2) 마우스 면역 및 hybridoma 세포를 개발함

- (가) Digoxigenin-BSA conjugate, Biotin-BSA conjugate를 FCA와 1:1로 혼합 후 실험 동물의 foot pad에 주입하였음. 2주 간격으로 3차례 boosting 하여 면역반응을 유도함
- (나) Lymph node를 추출하여 마우스 암세포주인 골수종 세포 (myeloma cell, SP2/O)와 융합하였음. 세포 융합 후 HAT (hypoxanthine, aminopterin, thymidine) 배지에서 배양하여 융합된 세포를 선별하였으며 ELISA (Enzyme-linked Immunosorbant Assay)를 통하여 항원에 특이적인 IgG 항체를 생산하는 세포를 스크리닝 하여 선별하였음. 1차적으로 스크리닝 한 세포를 한계희석법으로 희석하고 배양 후 2차 스크리닝을 통하여 단일 클론 항체를 생산하는 세포를 분리하였음

## 2. 5종 식중독 바이러스 신속검출 전처리 방법 개선 및 래피드 PCR 키트 개발

### 가. 식중독 바이러스 5종 검출용 PCR

(1) DNA virus 검출 PCR

- (가) 식중독 5종 바이러스는 제1세부 연구기관으로부터 분양받거나(Hepatitis A virus, Rotavirus, Noro GII virus) 물환경바이러스은행으로부터 분양받아 사용하였음(Astrovirus, Adenovirus). Stool(Adenovirus)에서 DNA prep kit(m.biotech)를 이용하여 total DNA를 추출하였음. 실험은 시약제조사에서 제공하는 실험방법을 준용하여 수행하였음. 간단히 설명하면 다음과 같음.

1) DNA prep

- 가) stool sample 25 mg에 180 ul의 TG I buffer와 20 ul의 Proteinase K를 넣고 vortex로 섞어준 후 56°C에서 sample이 완전히 녹을 때 까지 반응
- 나) TG II buffer 200 ul를 첨가하고 70°C에서 10분간 반응
- 다) Ethanol 400 ul를 첨가하고 섞은 후 Binding column에 적하 하고 13,000 ×g에서 1분간 원심분리 후 column을 통과한 용액을 버림
- 라) Wash buffer I 700 ul를 넣어주고 13,000 ×g에서 1분간 원심분리 후 column을 통과한 용액을 버림
- 마) Wash buffer II 700 ul를 넣어주고 13,000 ×g에서 1분간 원심분리 후 column을 통과한 용액을 버림
- 바) 13,000 ×g에서 2분간 원심분리하여 buffer를 완전히 제거
- 사) elution buffer 50~200 ul를 첨가하고 2분간 반응
- 아) 13,000 ×g에서 2분간 원심분리하고 column을 통과한 용액을 회수
- 자) Natophotometer(Implen)로 DNA 정량

2) PCR

- 가) DNA 1 ul, Forward, Reverse primer(AD1, AD2; Adeno F1, Adeno R1; Adeno F2, Adeno R2) 각 0.5 ul, dH<sub>2</sub>O 18 ul를 AccuPower PCR premix (Bioneer)에 혼합 후 PCR을 수행하였음
- 나) PCR 반응조건은 94°C에서 5분간 DNA를 변성시키고 94°C에서 1분, 50°C에서 1분, 7

2°C에서 1분을 1회로 하여 35회를 반응시킨 후 72°C에서 5분간 연장 반응하였음

## (2) RNA virus 검출 RT-PCR 및 PCR

(가) 위해 5종 병원성 바이러스는 제1세부 연구기관으로부터 분양받거나(Hepatitis A virus, Rotavirus, Noro GII virus) 물환경바이러스은행으로부터 분양받아 사용하였음(Astrovirus, Adenovirus). 바이러스 배양액(Hepatitis A virus, Rotavirus, Noro GII virus) 또는 stool(Astrovirus)에서 Trizol LS(Invitrogen 사) 또는 RNA prep kit(intronbio 사)를 이용하여 total RNA를 추출하였음. 실험은 시약제조사에서 제공하는 실험방법을 준용하여 수행하였음. 간단히 설명하면 다음과 같음.

### 1) Trizol을 이용한 RNA 추출

- 가) 바이러스 배양액 또는 stool 250 ul에 Trizol LS (Invitrogen) 750 ul를 첨가 후 상온에서 5분간 방치
- 나) chloroform 200 ul를 첨가하고 잘 섞은 후 상온에서 10-15분간 방치
- 다) 12,000 ×g에서 15분간 원심분리(4 °C)
- 라) 상층액을 새로운 micro tube에 옮기고 isopropanol 500 ul 첨한 다음 상온에서 10분간 방치
- 마) 12,000 ×g에서 15분간 원심분리(4 °C)후 상층액 제거
- 바) 75% ethanol 1 ml을 첨가하고 잘 섞은 후 7,500 ×g에서 5분간 원심분리(4 °C)
- 사) 상층액을 모두 제거하고 DEPC 처리된 증류수 20-50 ul로 elution
- 아) Natophotometer(Implen)로 RNA 정량

### 2) RNA prep kit를 이용한 RNA 추출

- 가) 바이러스 배양액 또는 stool 150 ul에 lysis buffer 250 ul 첨가하고 15분간 혼합 후 상온에서 10분간 반응
- 나) binding buffer 350 ul 첨가 후 잘 섞어줌
- 다) collection tube에 적하 후 13,000 rpm에서 1분간 원심분리
- 라) collection tube 통과액을 제거하고 washing buffer A 500 ul, washing buffer B 500 ul로 순차적으로 washing
- 마) 13,000 rpm에서 1분간 원심분리 후 elution buffer 50 ul로 RNA elution
- 바) Natophotometer(Implen)로 RNA 정량

### 3) cDNA 합성(RT-PCR)

- 가) RNA 1-5 ul, forward 또는 reverse primer를 1 ul를 혼합후 DEPC water을 첨가하여 최종적으로 11 ul로 맞추는 후 65°C에서 10분간 반응하고 즉시 ice에 둠
- 나) 5× reaction buffer 4 ul, 100 mM DTT 2 ul, dNTP2 ul, reverse transcriptase 1 ul를 첨가하고 42°C에서 1시간 반응하여 cDNA를 합성함
- 다) 반응이 끝난 후 95°C에서 5분간 반응하여 역전사효소를 불활성화함

#### 4) PCR

- 가) DNA 1 ul, Forward, Reverse primer 각 0.5 ul, dH<sub>2</sub>O 18 ul를 AccuPower PCR premix (Bioneer)에 혼합 후 PCR을 수행하였음
- 나) PCR 반응조건은 94°C에서 5분간 DNA를 변성시키고 94°C에서 1분, 각 primer에 맞는 annealing 온도에서 1분, 72°C에서 1분을 1회로 하여 30회를 반응시킨 후 72°C에서 5분간 연장 반응하였음

### 나. 래피드 PCR kit 개발

#### (1) Anti-Digoxigenin Antibody 개발

##### (가) 면역

- 1) Digoxigenin NHS-ester (Sigma)와 BSA를 접합함
- 2) Digoxigenin-BSA가 들어있는 PBS와 같은 부피의 Freund's complete adjuvant (FCA, Sigma)를 혼합하여 에멀전(emulsion)제조함
- 3) BALB/c 마우스의 foot pad에 주입 (100 ul/마리)
- 4) 최초 면역 2주 후 FCA 대신 Freund's incomplete adjuvant (FIA)를 이용하여 에멀전을 제조하고 BALB/c 마우스의 foot pad에 주입함(2차 면역)
- 5) 2주 후 FIA를 이용하여 에멀전을 제조하고 BALB/c 마우스의 foot pad에 주입함(3차 면역)
- 6) 2주 후 FIA를 이용하여 에멀전을 제조하고 BALB/c 마우스의 foot pad에 주입함(4차 면역)

##### (나) 세포융합

- 1) 최종적으로 면역을 마친 후 마우스를 CO<sub>2</sub> 가스를 이용하여 희생 시키고 슬와부의 림프절(popliteal lymphnode)을 적출
- 2) 적출한 림프절은 RPMI 1640 배지로 세척하고 그라인딩하여 림프절세포를 적출함. 적출한 림프절세포를 1,200 rpm으로 3분간 원심분리하여 침전시킨 후 RPMI 1640 배지 40 ml로 2회 세척 후 같은 배지 20 ml로 재현탁하여 잘 풀어줌
- 3) 림프절세포와 SP2/0세포를 trypan blue 용액 (Sigma)로 염색하고 현미경으로 관찰하여 생존 세포수를 측정
- 4) SP2/0 세포와 림프절 세포의 비율이 1:5가 되도록 각 세포를 섞어준 후 1,200 rpm으로 3분간 원심분리하여 침전
- 5) 상층액 제거 후 침전된 세포가 들어있는 튜브를 가볍게 쳐서 세포를 잘 섞어준 후 50% (w/v) PEG 1500 용액 1 ml을 1분간 천천히 첨가
- 6) RPMI 1640 배지 1 ml을 30초간, 3 ml을 30초간, 17 ml을 1분간 천천히 첨가해 준후 18 ml을 첨가
- 7) 세포를 1,200 rpm에서 5분간 원심분리하여 침전시키고 상층액 제거 후 침전된세포를 HAT(hypoxanthine, aminopterin, thymidine)가 포함된 RPMI 1640 배지에 부유
- 8) 96 well plate에 well당 100 µl 씩 분주하고 HAT가 포함된 RPMI 1640 배지를 well 당 200 µl 씩 첨가한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 존재 하에서 배양

(다) 스크리닝

- 1) Digoxigenin-BSA 또는 BSA를 coating buffer (0.05 M Carbonate-Bicarbonate, pH 9.6)에 1 µg/ml 농도로 희석하고 96 well plate (SPL)에 well 당 100 µl씩 분주 후 4°C에서 하룻밤 동안 두어 코팅
- 2) plate를 washing buffer (PBS with 0.05% Tween-20, PBST)로 well 당 300 µl 씩 3회 세척 하고 0.25% 카제인이 포함된 PBS를 well 당 200 µl 씩 분주 후 37°C에서 1시간 두어 blocking
- 3) PBST로 3회 세척 후 배양 상층액을 well 당 100 µl 씩 분주 후 37°C에서 1시간 반응
- 4) PBST로 3회 세척 하고 horse radish peroxidase (HRP)가 접합된 항-마우스 IgG 항체 (Fitzerald)를 PBS에 1/10,000배 희석한 용액을 well 당 100 µl 씩 분주한 다음 37°C에서 1시간 반응
- 5) 마지막으로 PBST로 3회 세척 후 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)용액을 well 당 100 µl 씩 분주하고 차광 후 상온에서 10분간 반응
- 6) 0.5 M의 황산용액을 well 당 50 µl 씩 첨가하여 반응을 중지시키고 ELISA reader(Biotek)를 이용해 450 nm에서의 흡광도를 측정하여 발색반응의 정도를 측정
- 7) 흡광도가 1.0이상인 well을 선택하였으며 BSA의 흡광도가 높은 well은 선택하지 않음
- 8) 1차 스크리닝을 마친 세포를 한계희석법으로 희석하여 배양한 후 상기 방법대로 ELISA를 수행하여 2차 스크리닝을 하였으며, 항체 역가가 높고 세포의 상태가 좋은 well을 선별하여 단일클론 항체를 생산하는 세포를 분리, 확립

(라) 항체 정제

- 1) 상기방법으로 확립한 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마세포를 PBS에  $1\sim5\times 10^6$  cell/ml 농도로 현탁하고 성체 암컷 또는 수컷 BALB/c 마우스의 복강에 주사
- 2) 1~2주 후 마우스의 복수가 차면 주사바늘을 이용하여 복수를 채취하고 4,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 침전시킨 후 상등액을 회수
- 3) 복수를 3회에 걸쳐 PBS에 투석한 다음 0.2 µm membrane filter로 여과
- 4) Protein A, protein G 가 결합된 셀룰로오즈 비드를 컬럼에 충전하고 PBS로 평형화 한 후 여과한 투석액을 컬럼에 주입
- 5) 투석액을 분당 2 ml 속도로 흘려주어 Protein A, protein G 가 결합된 셀룰로오즈 비드에 항체를 결합시키고 비드 양의 10배에 해당하는 PBS를 흘려주어 결합하지 않은 물질을 세척
- 6) 결합한 항체를 100 mM 글리신용액 (100 mM Glycine, pH 2.8)으로 용출 (elution)하고 용출용액의 1/10 부피에 해당하는 1 M 트리스 용액 (1 M Tris, pH 9.0)을 첨가하여 산성의 용출용액을 중화
- 7) 정제된 항체를 3회에 걸쳐 PBS에 투석하고 280 nm 흡광도 측정을 통하여 단백질을 정량

(2) Rapid kit 개발

(가) Streptavidin-gold 접합

- 1) 금 나노입자를 Frens (1973)의 방법을 변형하여 제작



- 가) 증류수 240ml에 1% H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 용액 10.3 ml을 더하고 자력식 가열교반기에서 가열하여 용액을 끓임
- 나) 용액이 끓으면 38.8 mM의 trisodium citrate 25 ml을 첨가하고 용액의 색을 관찰하여, 용액이 자주색으로 바뀌면 5분간 더 가열 후 가열을 멈추고 10분간 더 교반
- 다) 합성된 금 나노입자용액을 식히고 540 nm에서 흡광도를 측정하여 농도를 결정

2) 금 나노입자를 streptavidin(Arista)과 축합(conjugation)함

- 가) 금 나노입자용액을 200 mM K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>를 이용하여 pH 9.0으로 적정
- 나) 금 나노입자용액과 1 mg의 streptavidin을 혼합 후 상온에서 30분간 반응
- 다) 1% BSA를 첨가하고 상온에서 20분간 반응
- 라) 1% BSA가 포함된 PBS로 3회 세척

(나) 면역 측방유동 키트(rapid kit) 제작

- 1) 샘플패드 제조를 위하여 니트로셀룰로오스막 검정선 위치에 Digoxigenin을 포획하는 항-digoxigenin 항체를 kinematics 분주기를 이용하여 1 ul/cm의 양으로 분주하고 대조선 위치에는 내부 기준(internal standard)의 기능으로 mouse IgG를 포획하는 항-mouse IgG 항체를 같은 방법으로 분주 후 건조시킴
- 2) 축합패드 제조를 위해 항-digoxigenin 항체 및 mouse IgG가 축합된 금축합체를 유리섬유에 적셔 건조시킴
- 3) 샘플패드는 0.5% PVA (polyvinyl alcohol)와 0.5% Tween-20이 포함된 0.1 M Tris-Cl (pH 8.0)를 셀룰로오스 섬유에 적신 후 건조시킴
- 4) 흡착패드는 아무것도 처리하지 않은 셀룰로오스 섬유로 구성됨
- 5) 제조된 모든 패드는 1회용 카세트 (16×90 mm)에 샘플 용액이 이동할 수 있도록 부분적으로 겹치도록 배열하고 조립하여 제조실에서 제조상태로 포장한 후 사용 전까지 실온에서 보관

(3) PCR kit 성능 시험

(가) PCR

- 1) T-HAV F1/R1 또는 T-HAV F2/R2 plasmid DNA 1 ul, forward primer(HAV nF1, HAV nF2) reverse primer(HAV nR1, HAV nR2) 각각 0.5 ul, dH<sub>2</sub>O 18 ul를 PCR remix (Bioneer)에 혼합 후 PCR를 수행하였음
- 2) PCR 반응조건은 94℃에서 5분간 DNA를 변성시키고 94℃에서 1분, 각 55℃에서 1분, 72℃에서 1분을 1회로 하여 30회를 반응시킨 후 72℃에서 5분간 연장 반응하였음

(나) RDTs kit을 이용한 PCR product 검출

- 1) PCR 후 바이오틴 및 digoxigenin이 표지된 probe를 각각 2 ul 첨가 후 95℃에서 3분간 반응 후 55℃에서 1분간 반응시켜 probe를 표지함
- 2) 상기 방법으로 표지 후 Rapid kit buffer를 80 ul 첨가하고 rapid kit의 샘플패드에 적하 후 10분간 반응시킴

## 다. 바이러스 농축법 개선 시험

### (1) HAV 항체 개발

- (가) HAV 재조합 단백질(Abcam)을 이용하여 상기 단일클론 항체 개발법과 같은 방법을 이용하여 HAV 항체를 개발하였음

### (2) Norovirus 항원 개발

- (가) Norovirus VP1 재조합 유전자 제조

#### 1) Norovirus 시료로부터 viral RNA 추출

- 가) Norovirus RNA 추출은 Intron사의 Viral DNA/RNA extraction kit를 사용하였음
- 나) 바이러스 배양액 150 $\mu$ l에 lysis buffer 250 $\mu$ l를 넣고 15초간 vortex 한 후 상온(15-25 $^{\circ}$ C)에서 10분간 방치
- 다) binding buffer 350 $\mu$ l를 넣고 완전히 섞어준 후 column tube를 넣은 collection tube에 용액을 옮겨 원심분리
- 라) column에 washing buffer A, B를 차례대로 500 $\mu$ l씩 넣고 column을 원심분리하여 세척한 후 membrane을 완전히 건조
- 마) Ethanol이 남아있지 않은 membrane에 elution buffer 50 $\mu$ l를 넣고 원심분리하여 최종적으로 Norovirus viral RNA를 용출

#### 2) RT-PCR 및 PCR

- 가) viral RNA를 2 $\mu$ l 취하여 PCR(Polymerase Chain Reaction)용 tube에 넣고 Specific primer와 섞어준 후 65 $^{\circ}$ C에서 10분간 RNA와 primer를 변성
- 나) DTT, dNTP, M-MLV RTase, M-MLV RTase reaction buffer와 잘 섞어준 후 42 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시켜 cDNA를 합성
- 다) 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 불활성시킨 후 반응을 완료
- 라) 합성된 cDNA를 PCR의 Template로 사용하여 forward primer, reverse primer, dNTP, Taq polymerase, PCR reaction buffer와 함께 PCR 반응을 수행
- 마) PCR 반응은 다음과 같음. 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 변성한 후 95 $^{\circ}$ C에서 30초, 55 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 반응을 35회 동안 반복하였으며, 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 합성시킨 후 반응을 종료

#### 3) 재조합 plasmid 제작

- 가) pET-32 vector(Clontech)와 상기 PCR 산물을 제한효소(Hind III, Xho I) 처리 후 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 반응
- 나) 제한 효소처리한 상기 DNA를 1% agarose gel 전기영동을 한 다음, DNA purification kit(Nucleogen)을 이용하여 Vector 및 VP1 유전자를 분리정제 함
- 다) T4 DNA ligase와 상기 순수 분리정제한 vector 및 VP1 유전자를 혼합 후 25 $^{\circ}$ C에서 2시간 반응하여 재조합 plasmid를 제작함
- 라) T4 DNA ligase와 상기 순수 분리정제한 vector 및 VP1 유전자를 혼합 후 25 $^{\circ}$ C에서 2시간 반응하여 재조합 plasmid를 제작함

마) 생성된 단일 colony를 ampicillin이 포함된 LB 액체배지에서 키워 plasmid DNA를 순수 분리

#### (나) Norovirus VP1 재조합 항원 개발

##### 1) 단백질 발현

가) BL21(DE3) competent cell에 재조합 plasmid를 첨가 후 잘 섞은 후 42°C로 맞춰진 Heat Block에 cell을 넣고 90초간 열 충격을 주어 재조합 plasmid를 BL21(DE3)에 형질 전환

나) 형질 전환 된 세포를 항생제(ampicillin)이 포함된 LB 평판배지에 도말하여 37°C 배양기에서 16시간 이상 배양하여 재조합 plasmid를 BL21(DE3)에 형질 전환

다) 생성된 단일 colony를 항생제가 들어간 LB 배지에 접종하여 배양한 후 LB 배지에서 충분히 자란 배양액을 새로운 LB 배지에 1%가 되도록 접종하여 배양

라) 세포배양액의 O.D 600의 값이 0.6 수준으로 자랐을 때 IPTG(최종 농도 0.5mM)를 첨가하고 18°C 배양기에서 16시간 동안 추가 배양

마) 세포를 원심분리로 회수하고 lysis buffer로 현탁 후 초음파 파쇄를 통하여 세포를 용해

바) 상기 세포 추출물을 원심분리하여 상층액을 취하여 수용성 단백질을 분리

사) 남은 pellet을 8M Urea가 포함된 lysis buffer로 풀어준 후 원심 분리하고 상층액을 얻어 불용성 단백질을 분리

아) SDS-PAGE 및 Coomassie blue stain을 이용하여 단백질 발현 확인

##### 2) 단백질 정제

가) Ni-NTA column을 완충액으로 충분히 세척하여 평형화

나) column에 과잉발현이 끝나고 파쇄하여 얻은 Norovirus VP1 수용성 단백질을 용액을 흘려보내 column에 Norovirus VP1 단백질이 흡착시킴

다) 20 mM imidazole이 포함된 세척액을 충분히 흘려보내 Norovirus VP1 단백질 이외의 비특이 단백질을 column에서 제거

라) 다시 완충액으로 평형화시킨 후 250 mM imidazole이 포함된 용출액을 흘려보내 column에 흡착되어있는 Norovirus VP1 항원을 용출

마) 500 mM, 1 M imidazole이 포함된 용출액을 흘려보내 남아있는 VP1을 모두 용출

바) 용출된 VP1 재조합 단백질을 SDS-PAGE 전기영동 후 Coomassie Blue 염색하여 확인

#### (3) 항체-IMS 접합

##### (가) 항-HAV 항체와 magnetic bead 접합

1) Magnetic bead (Ademtech) 1 mg을 1×activation buffer에 풀어준 후 magnet을 이용하여 2~3회 activation buffer로 washing

2) EDC(1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide-HCL) 80 ul를 첨가 후 37°C에서 10분간 반응시킴

3) 10~50 ug의 항-HAV 항체를 첨가하고 37°C에서 2시간 반응

- 4) BSA 200 ul(0.5 mg/ml)를 첨가하고 40℃에서 30분 반응
- 5) Storage buffer로 2회 washing 후 사용 전까지 4℃에서 보관

(4) IMS 회수율 시험

(가) 바이러스 접종 및 IMS를 이용한 바이러스 정제 - 1세부기관과 연계

- 1) 1.5 ml tube에 PBS 1 ml, HAV 10 ul(5 log RNA copies/ul), 10 ul IMS bead를 넣고 1시간 반응
- 2) 반응 후 Tube를 Mini mag에 넣어 1분간 washing
- 3) 남은 용액을 제거하고 140 ul의 PBS로 채부유

(나) RNA extraction(MiniMAG SYSTEM)-1세부기관과 연계

- 1) 상기 바이러스 정제액 140 ul에 lysis buffer 2 ml을 넣고 vortex 후 상온에서 10분간 반응
- 2) 1500×g에서 3분간 원심분리 후 50 ul silica를 첨가하고 vortex 후 상온에서 10분간 반응
- 3) 1500×g에서 3분간 원심분리 후 상층액을 제거하고 400 ul의 wash buffer 1을 첨가
- 4) sample을 1.5 ml tube에 옮긴 뒤 mini mag에 넣고 30초간 세척 후 상층액 제거
- 5) wash buffer 1을 400 ul 첨가하고 30초간 세척 후 상층액을 제거
- 6) wash buffer 2를 500 ul 첨가하고 30초간 세척 후 상층액을 제거(2회 반복)
- 7) wash buffer 3을 500 ul 첨가하고 30초간 세척 후 상층액을 제거
- 8) wash buffer 3을 500 ul 첨가하고 15초간 세척 후 상층액을 제거
- 9) Elution buffer 50 ul를 첨가하고 60℃에서 15분간 반응
- 10) 자석을 이용하여 silica를 제외한 상층액을 회수

다) Real-time PCR

- 1) RNA 5 ul, forward, reverse primer 각각 0.5 ul, probe 0.5 ul, 5× reaction buffer 5 ul, RNA ultrasense enzyme mix 1.25 ul, DEPC water 12.25 ul를 혼합 후 real-time PCR 기기(TaKaRa)로 분석을 실시함

### 3. 개발된 바이러스 신속검출 키트의 AOAC 인증 및 Field test

#### 가. 바이러스 검출 키트 제작

(1) Primer 및 probe 제작

- (가) 바이러스 검출을 위한 PCR kit 제조용 primer 및 probe는 전문 올리고 합성 회사에 의뢰하여 제작하였음
- (나) primer 및 probe는 사용 목적에 따라 5'의 phosphate 부위에 digoxigenin 또는 biotin을 접합하였으며, 합성 및 접합 후에 적절한 정제 과정을 거쳤음

(2) Rapid kit (Devices) 제작

- (가) Rapid kit 제작은 상기 'Rapid kit 개발' 방법과 같은 방법을 사용하였으며 제작 후 장기 보관을 위하여

과우치에 흡습제와 함께 밀봉하여 보관하였음

(3) 양성 대조물질 제작

- (가) 각 바이러스 검출 키트에 포함되는 양성 대조 물질을 제조하였음
- (나) 1, 2차년도 연구를 통하여 확보한 각 바이러스 유전자를 증폭하고 T-vector에 접합함
- (다) 벡터에 삽입한 유전자는 1차 또는 2차 PCR용 primer를 이용하여 증폭한 유전자 산물임
- (라) 접합한 벡터를 대장균에 형질전환하고 형질전환된 대장균을 배양 후 plasmid DNA를 정제하여 사용하였음
- (마) 정제된 DNA 농도를 이용하여 copy수를 계산하였음

나. 표준분석방법 개선안 도출

(1) IMS를 이용한 바이러스 농축

- (가) 바이러스를 40 ml의 바이러스 용출액 (TGBE buffer, 100 mM Tris-HCl, 50 mM glycine, 1% beef extract, pH9.5)에 첨가
- (나) 항체-IMS bead 50 ul를 첨가 후 rolling mixer에서 10분간 반응
- (다) 4,000 rpm에서 5분간 원심분리 후 상층액을 제거
- (라) PBST 1 ml로 washing 후 micro tube에 옮김
- (마) PBST를 이용하여 2회 washing
- (바) 50 mM glycine 용액 (pH 2.8) 20 ul를 이용하여 용출
- (사) 100 mM Tris-HCl 용액 (pH 7.5) 93 ul를 첨가하여 중화

(2) RNA extraction kit을 이용한 RNA 추출

- (가) 바이러스 농축액에 lysis buffer 250 ul 첨가 후 15초간 vortexing 후 상온에서 10분간 반응
- (나) Proteinase(Thermo) 10 ul를 첨가하고 55°C에서 10분간 반응
- (다) Binding buffer 350 ul를 첨가하고 vortexing 후 column tube에 옮김
- (라) 13,000 rpm에서 1분간 원심분리 후 column을 빠져나온 용액을 버림
- (마) Washing buffer A를 500 ul 첨가 후 13,000 rpm에서 1분간 원심분리 후 column을 빠져나온 용액을 버림
- (바) Washing buffer B를 500 ul 첨가 후 13,000 rpm에서 1분간 원심분리 후 column을 빠져나온 용액을 버림
- (사) 13,000 rpm에서 1분간 추가적으로 원심분리 후 elution buffer 500 ul 첨가하고 1분간 방치
- (아) 13,000 rpm에서 1분간 원심분리 후 column을 빠져나온 용액을 회수

(3) One-step RT-PCR 및 PCR

- (가) One-step RT-PCR 및 PCR은 Wizbiosolution 사의 pre-mix를 이용하였음

1) One-step RT-PCR

- 가) RNA 1~5 ul와 forward primer, reverse primer 각각 0.5 ul, 2× RT-PCR master mix 10 ul를 혼합한 후 DEPC water를 이용하여 최종적으로 20 ul를 맞춤
- 나) One-step RT-PCR 반응 조건은 42°C에서 20분간 반응하여 cDNA를 합성하고 94°C에서 5분간 DNA

를 변성시키고 94°C에서 10초, 50°C 또는 55°C에서 10초, 72°C에서 10초간 반응을 1회로 하여 30회를 반응 시킨 후 72°C에서 5분간 연장반응함

## 2) Nested-PCR

- 가) 1차 PCR 반응물 1 ul와 2차 PCR용 forward primer, reverse primer 각각 0.5 ul, 2× PCR master mix 10 ul를 혼합한 후 멸균된 증류수를 이용하여 최종적으로 20 ul를 맞춤
- 나) Nested-PCR 반응 조건은 94°C에서 5분간 DNA를 변성시키고 94°C에서 5초, 50°C 또는 55°C에서 5초, 72°C에서 5초를 1회로 하여 30회를 반응시킨 후 72°C에서 5분간 연장 반응하였음

## 다. 개발된 PCR 키트의 민감도, 특이도 및 검출시간 검사

### (1) 민감도 및 특이도 검사

- (가) 개발된 키트의 민감도, 특이도는 분석을 위한 바이러스 유전 물질은 주관연구기관, 물환경바이러스은행으로부터 분양받은 바이러스로부터 추출하거나 환경미생물연구소로부터 바이러스 유전물질을 분양 받아 사용하였음
- (나) 분석에 사용한 바이러스 유전물질은 A형간염바이러스 2종, 아데노바이러스 2종, 아스트로바이러스 3종, 로타바이러스 2종, 노로바이러스 GI 3종, 노로바이러스 GII 2종임
- (다) 상기 바이러스 유전물질을 제작한 PCR 키트를 이용하여 증폭 및 검출하고 아가로즈 겔 전기영동을 통하여 확인하였음

### 1) RNA prep kit를 이용한 RNA 추출

- 가) 분석시료 150 ul에 lysis buffer 250 ul 첨가하고 15분간 혼합 후 상온에서 10분간 반응
- 나) binding buffer 350 ul 첨가 후 잘 섞어줌
- 다) collection tube에 적하 후 13,000 rpm에서 1분간 원심분리
- 라) collection tube 통과액을 제거하고 washing buffer A 500 ul, washing buffer B 500 ul로 순차적으로 washing
- 마) 13,000 rpm에서 1분간 원심분리 후 elution buffer 50 ul로 RNA elution
- 바) Natophotometer(Implen)로 RNA 정량

### 2) DNA prep kit를 이용한 DNA 추출

- 가) 분석시료 150 ul에 180 ul의 TG I buffer와 20 ul의 Proteinase K를 넣고 vortex로 섞어준 후 56°C에서 sample이 완전히 녹을 때 까지 반응
- 나) TG II buffer 200 ul를 첨가하고 70°C에서 10분간 반응
- 다) Ethanol 400 ul를 첨가하고 섞은 후 Binding column에 적하 하고 13,000 ×g에서 1분간 원심분리 후 column을 통과한 용액을 버림
- 라) Wash buffer I 700 ul를 넣어주고 13,000 ×g에서 1분간 원심분리 후 column을 통과한 용액을 버림
- 마) Wash buffer II 700 ul를 넣어주고 13,000 ×g에서 1분간 원심분리 후 column을 통과한 용액을 버림
- 바) 13,000 ×g에서 2분간 원심분리하여 buffer를 완전히 제거

- 사) elution buffer 50~200 ul를 첨가하고 2분간 반응
- 아) 13,000 ×g에서 2분간 원심분리하고 column을 통과한 용액을 회수
- 자) Natophotometer(Implen)로 DNA 정량

3) One-step RT-PCR 및 PCR

가) One-step RT-PCR

- RNA 1~5 ul와 foward primer, reverse primer 각각 0.5 ul, 2× RT-PCR master mix 10 ul를 혼합한 후 DEPC water를 이용하여 최종적으로 20 ul를 맞춤
- One-step RT-PCR 반응 조건은 42°C에서 20분간 반응하여 cDNA를 합성하고 94°C에서 5분간 DNA를 변성시키고 94°C에서 10초, 50°C 또는 55°C에서 10초, 72°C에서 10초간 반응을 1회로 하여 30회를 반응 시킨 후 72°C에서 5분간 연장 반응함

나) PCR

- DNA 1~5 ul와 foward primer, reverse primer 각각 0.5 ul, 2× RT-PCR master mix 10 ul를 혼합한 후 DEPC water를 이용하여 최종적으로 20 ul를 맞춤
- PCR 반응 조건은 42°C에서 20분간 반응하여 cDNA를 합성하고 94°C에서 5분간 DNA를 변성시키고 94°C에서 10초, 50°C 또는 55°C에서 10초, 72°C에서 10초간 반응을 1회로 하여 30회를 반응 시킨 후 72°C에서 5분간 연장 반응함

4) Nested-PCR

- 가) 1차 PCR 반응물 1 ul와 2차 PCR용 foward primer, reverse primer 각각 0.5 ul, 2× PCR master mix 10 ul를 혼합한 후 멸균된 증류수를 이용하여 최종적으로 20 ul를 맞춤

- 나) Nested-PCR 반응 조건은 94°C에서 5분간 DNA를 변성시키고 94°C에서 5초, 50°C 또는 55°C에서 5초, 72°C에서 5초를 1회로 하여 30회를 반응시킨 후 72°C에서 5분간 연장 반응하였음

5) 결과 확인

- 가) PCR 수행 후 PCR 산물(20 ul) 중 10 ul를 검출용 디바이스의 샘플투입구에 적하 후 사용버퍼 90 ul를 추가한 후 5~10분 후 결과를 관찰하였음. 테스트라인과 컨트롤라인 모두에 붉은선이 관찰되면 양성으로 판정하고 컨트롤라인에는 선이 관찰되지 않고 테스트라인에만 선이 관찰되면 음성으로 판정하였으며 컨트롤라인에 선이 관찰되지 않는 경우 무효로 판정하였음

- 나) PCR 수행 후 PCR 산물(20 ul) 중 나머지 10 ul에 gel loading buffer 2 ul를 첨가 후 잘 혼합하고 1~2% 아가로즈겔 전기영동을 수행하였음

(라) 민감도 및 특이도는 아래 계산식에 의하여 계산하였음

$$\text{민감도} = \frac{\text{진양성}}{\text{진양성} + \text{위음성}} \times 100 \quad \text{특이도} = \frac{\text{진음성}}{\text{위양성} + \text{진음성}} \times 100$$

(2) 검출시간 검사

(가) 바이러스 seeding

- 1) 시료 25 g에 바이러스 용액 500 ul를 접종 후 1시간동안 흡착시킴

- 2) 40 ml의 TGBE buffer 첨가 후 20분간 교반
- 3) 10,000×에서 30분간 원심분리 하고 상층액을 회수 후 pH를 7.0으로 조절

(나) 바이러스 검출

- 1) 바이러스 농축 및 RNA 추출, PCR 및 증폭 유전물질 검출은 상기 표준분석방법 개선안 도출 방법과 같이 수행하였음

**라. 개발 제품의 상용화**

(1) 시제품 제작 및 사용 설명서 제작

(가) 시제품의 구성품은 다음과 같음

- 1) 증폭유전자 검출용 디바이스(Device)
- 2) 증폭유전자 검출용 희석버퍼(Rapid kit buffer)
- 3) 사용설명서
- 4) PCR kit
  - 가) 2× One-step RT-PCR mix
  - 나) 1<sup>st</sup> PCR primer set
  - 다) 1<sup>st</sup> PCR primer set
  - 라) 2<sup>nd</sup> PCR primer set
  - 마) Positive control
  - 바) Nuclease free water

(나) 구성품 중 2× One-step RT-PCR mix, 2× PCR master mix는 시약제조업체를 통해 공급받아 제작하였으며, PCR primer는 nucleotide 전문 합성 업체에 의뢰하여 제작함

(다) 증폭유전자 검출용 디바이스, 희석버퍼는 자체 생산함



2-6. 농산물 안전관리를 위한 병원성미생물 검출법 검증 및 현장적용 시험

1. 농산물 관련 재배부터 유통까지 risk factor 탐색 및 모니터링 자료 조사

가. 농산물 관련 재배에서 유통까지 risk factor 탐색

(1) 국내 농산물의 미생물학적 위해요소 탐색

- 식중독 원인식품으로서의 생식 농산물에 대한 분석에 추가적으로 재배에서 유통 및 소비단계에서의 식중독 원인균의 발생과 관련한 위해요인(risk factors)을 식중독 발생 역학조사 관련 문헌 및 전문가 등을 통해 분석

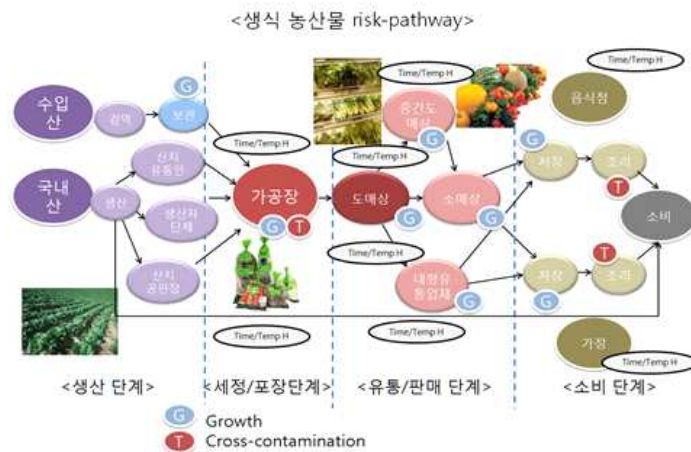


그림 2-6-1. 생식 농산물 risk-pathway

- 관련된 위해요인(risk factors)으로 재배단계에서의 식중독 원인균의 오염원, 유통 및 소비 단계에서의 성장 및 교차오염 등을 예로 들 수 있으며, 이들 자료는 동태분석 및 관련 모델 개발에 활용

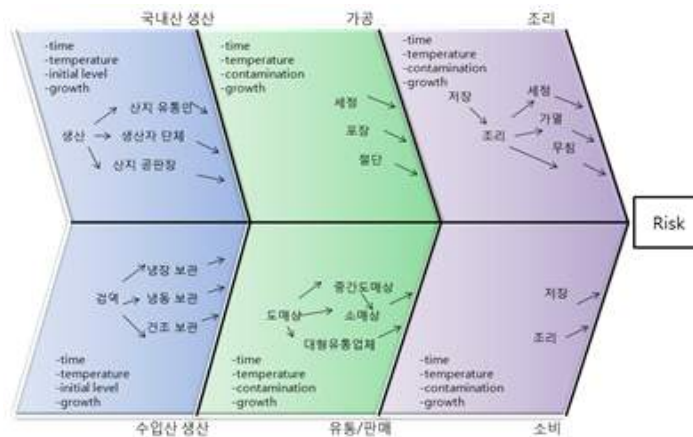


그림 2-6-2. 단계별 risk factor 도식화

나. 과거 농산물에서의 미생물학적 모니터링 자료 조사

(1) 문헌조사 및 과거 자체 모니터링 자료·제공

- 국립농산물품질관리원의 과거 자체 모니터링 자료 등을 조사 및 분석하여 국내 주요 농산물에 대한 전반적인 오염수준을 추정

2. 국내·외 농산물 안전관리 체계 및 실태 자료 조사

가. 국내·외 농산물 안전관리 체계 및 실태 자료 조사

(1) 국내·외 신선편이 농산물 재배부터 유통까지 미생물학적 위해요소 및 안전관리 체계 분석

- 국내·외 신선편이 농산물 관리현황을 조사하기 위하여 식품관련 국제기구 및 미국, 캐나다, 유럽, 일본 등을 조사대상으로 선정하고, 각 국가별 식품 안전관리 기관 및 관계 정보 제공 기관을 탐색하고 웹사이트 및 보도 자료 조사를 통하여 농산물의 제외국 안전관리 현황에 대한 기초자료를 확보함
- 농산물 안전관리 관련 제외국 기관 탐색을 통하여 국내외 농산물 위생·안전관리 현황을 비교하며, 국내 농산물 안전관리 제도 개선 및 향후 농산물 안전관리 시사점 도출을 위한 기초자료로 활용하고자 하였음

표 2-6-1. 신선농산물 관련 제외국 기관

국가	기관	웹사이트 주소
United Nations 산하 국제 기구	세계보건기구 (World Health Organization, WHO)	www.who.int
미국	국제식품규격위원회 (CODEX Alimentarius)	www.codexalimentarius.org
	미국 식품의약국 (United States Food and Drug Administration, FDA)	www.fda.gov
	미국 농무부 (United States Department of Agriculture, USDA)	www.usda.gov
	미국 식품안전검사국(Food Safety and Inspection Service, FSIS)	www.fsis.usda.gov
캐나다	캐나다 식품 검역원 (Canadian Food Inspection Agency, CFIA)	www.inspection.gc.ca
	캐나다 신선식품 연합 (Fresh Produce Alliance, FPA)	www.freshproducealliance.com
유럽	유럽식품안전청 (European Food Safety Authority, EFSA)	www.efsa.europa.eu
일본	일본 후생노동성	www.mhlw.go.jp
	일본 식품안전위원회	www.fsc.go.jp

### 3. 유해미생물 표준분석방법 개선안 도출 및 미생물학적 위생안전관리방안 개선안 제시

#### 가. 국내 농산물(GAP 포함)에서 미생물학적 위생안전관리방안 개선안 제시

(1) 제외국 농산물 미생물 안전관리 기준·규격 비교 검토

- 식품관련 국제기구 및 미국, 캐나다, 유럽, 일본을 조사대상으로 선정하여 각 국내외 농산물 미생물 안전관리 기준·규격을 비교하며, 국내 농산물 안전관리 제도 개선을 위한 기초 자료로 활용

(2) 모니터링 결과를 바탕으로 국내 농산물(GAP 포함) 및 재배환경에서의 단계별 주요 미생물학적 위생안전관리방안 개선안 제시

- 국내 농산물(GAP 농산물 포함) 재배부터 유통까지 전 단계별 미생물학적 위해요소 조사
- 국내 농산물(GAP 농산물 포함) 미생물학적 위생안전관리방안 개선안 제시

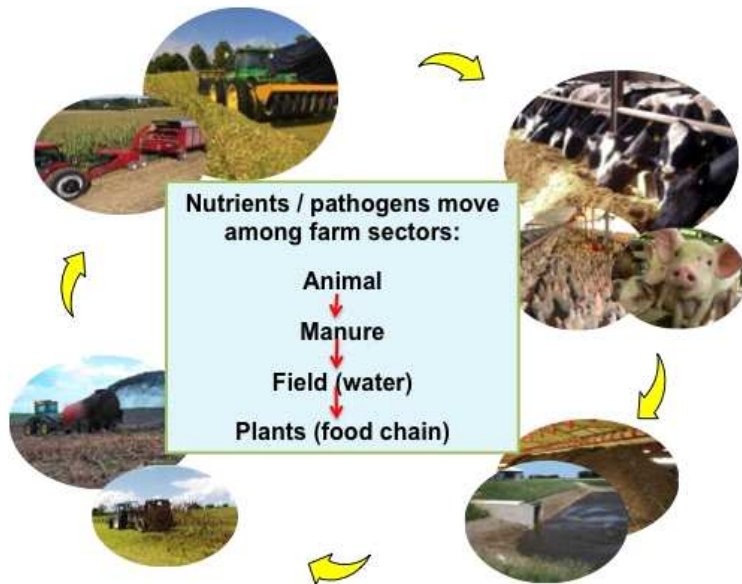


그림 2-6-3. 농산물 생산단계별 안전 관리

- 품목별 위해요소 분석 : 발생원인, 위해평가, 예방조치방법 설정
- 품목별 중요관리점 설정 : 수확 후 과정에서의 세척 과정, 수확 후 과정에서의 저장 과정 등
- 품목별 한계기준 설정
  - 세척방법에 따른 한계기준 설정, 세척용수의 염소농도에 따른 한계기준 설정
- 품목별 모니터링 방법 설정 : 모니터링 주기, 대상, 담당자 및 방법 등 설정

표 2-6-2. (예) 신선편의 식품 생산시 위생관리 대책  
 - Food Preservation and Processing Industry 발취

	과정	위험	통제 대책	
1	원료: 건조씨앗	B	대장균 O157:H7, 살모넬라, 리스테리아와 같은 병원성세균	- 새, 설치류, 곤충 통제 프로그램 - 양질 씨앗 공급자 선정
		C	농약	- 점검
		P	토양, 금속물질, 깨진 유리, 머리카락 등의 이물	- 점검, 사분(sieving), 세척
2	종자 저장	B	대장균 O157:H7, 살모넬라, 리스테리아와 같은 병원성세균	- 씨앗의 건조 저장/습도 통제, 수분제어 - 위생적인 저장환경
3	발아 전 담그기 (pre-germinat ion soak)	B	대장균 O157:H7, 살모넬라, 리스테리아와 같은 병원성세균	- 씨앗의 표면 오염제거 - 담그기 용기 세척 및 소독
4	발아 (germination)	B	높은 미생물수준, 대장균 O157:H7, 살모넬라, 리스테리아와 같은 병원성세균	- 발아 용기 세척 및 소독 - 수도 소독
5	성장	B	높은 미생물수준, 대장균 O157:H7, 살모넬라, 리스테리아와 같은 병원성세균	- 소독한 관개수도 사용 - 수도 소독
6	수확	B	높은 미생물수준, 대장균 O157:H7, 살모넬라, 리스테리아와 같은 병원성세균	- 수확에 사용된 삽 등의 세척 및 소독
7	세척	B	높은 미생물수준, 대장균 O157:H7, 살모넬라, 리스테리아와 같은 병원성세균	- 세척수도 염소화 - 생산 마지막에 세척탱크 세척 및 소독
		C	잔류염소	- 수확 후 음수로 싹 행구어줌
8	건조	B	높은 미생물수준, 대장균 O157:H7, 살모넬라, 리스테리아와 같은 병원성세균	- 건조대 세척 및 소독

## 제 3 절. 연구결과

### 3-1. 농산물 안전성 관리를 위한 미생물학적 위해요인 및 오염현황 분석

#### 3-1 연구요약

<세균>

- 2016년-2018년 동안 국내 배추(73곳), 상추(14곳), 딸기(22곳), 열무(8곳), 오이(18곳), 고추(10곳), 토마토(10곳), 사과(3곳) 농가의 농산물과 환경시료(농업용수, 토양)의 일반미생물(총균수, *Escherichia coli*, 대장균군, 곰팡이, 효모) 및 병원성세균(*Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*)의 평가를 실시함
- 농산물과 환경시료 중 토양에서 가장 많은 총균수 및 대장균군이 검출되었으며 *E. coli*의 경우 농산물, 토양, 농업용수에서 낮게 검출됨(각각 0.21 Log<sub>10</sub> CFU/g, 0.20 Log<sub>10</sub> CFU/g, 0.46 Log<sub>10</sub> CFU/mL 이하)
- 엽채류인 배추, 상추의 총균수는 6.00 Log<sub>10</sub> CFU/g 미만이고, 대장균군은 2.00 Log<sub>10</sub> CFU/g 이하로 검출됨. *E. coli*는 배추에서만 0.01 Log<sub>10</sub> CFU/g 수준이 검출됨
- 배추, 상추 경작지 토양의 총균수는 각각 6.88, 6.92 Log<sub>10</sub> CFU/g 으로 검출되었으며, 대장균군과 곰팡이/효모는 각각 3.33, 4.86 Log<sub>10</sub> CFU/g 이하로 나타남. 반면, *E. coli*는 상추샘플에서만 0.09 Log<sub>10</sub> CFU/g 수준으로 검출됨
- 배추, 상추 경작지 농업용수의 총균수는 각각 2.63, 2.01 Log<sub>10</sub> CFU/mL 이었으며, 대장균군은 각각 0.67, 0.11 Log<sub>10</sub> CFU/mL 으로 검출됨. 곰팡이/효모는 1.04 Log<sub>10</sub> CFU/mL 이하로 검출되었으며, *E. coli*의 경우 배추에서만 0.15, Log<sub>10</sub> CFU/mL 으로 검출됨
- 근채류인 열무의 총균수는 7.12 Log<sub>10</sub> CFU/g 이고, 4.30 Log<sub>10</sub> CFU/g 의 대장균군이 검출되었으며 *E. coli*는 검출되지 않음. 토양샘플의 총균수는 7.26 Log<sub>10</sub> CFU/g 이상이었으며, 대장균군과 곰팡이/효모는 각각 3.45, 4.40 Log<sub>10</sub> CFU/g 으로 검출되었고, *E. coli*는 검출되지 않음. 용수샘플의 경우 1.81 Log<sub>10</sub> CFU/mL 이하의 총균수를 보였고, 대장균군과 곰팡이/효모는 각각 0.17, 0.09 Log<sub>10</sub> CFU/mL 이하로 검출됨. 마찬가지로 *E. coli*는 검출되지 않음
- 과채류인 딸기, 오이, 고추, 토마토의 총균수는 4.61 Log<sub>10</sub> CFU/g 이하로 검출되었으며, 대장균군은 딸기에서는 검출되지 않았으며, 나머지 농산물에서 2.54 Log<sub>10</sub> CFU/g 이하로 검출됨. 곰팡이/효모는 3.52 Log<sub>10</sub> CFU/g 이하로 검출되었고, *E. coli*의 경우 오이와 토마토 샘플에서만 각각 0.02, 0.21 Log<sub>10</sub> CFU/g 이하로 검출됨
- 딸기, 오이, 고추, 토마토 토양의 총균수는 7.52 Log<sub>10</sub> CFU/g 이하로 검출되었으며, 대장균군과 곰팡이/효모는 각각 3.43, 4.74 Log<sub>10</sub> CFU/g 이하로 검출됨. 반면, *E. coli*는 딸기, 오이, 고추 샘플에서 0.20 Log<sub>10</sub> CFU/g 이하로 검출됨
- 딸기, 오이, 고추, 토마토 경작지 농업용수의 총균수는 각각 1.61, 1.74, 3.47, 3.06 Log<sub>10</sub> CFU/mL 이었으며, 대장균군은 각각 0.12, 0.46, 1.09, 0.79 Log<sub>10</sub> CFU/mL 으로 검출됨. 곰팡이/효모는 1.15 Log<sub>10</sub> CFU/mL 이하로 검출되었으며, *E. coli*는 각각 0.01, 0.15, 0.46, 0.18 Log<sub>10</sub> CFU/mL 으로 검출됨
- 과실류인 사과의 총균수는 4.11 Log<sub>10</sub> CFU/g 이었으며, 곰팡이/효모는 3.68 Log<sub>10</sub> CFU/g 으로 검출됨. 대장균군과 *E. coli*는 검출되지 않음. 토양샘플의 총균수는 6.85 Log<sub>10</sub> CFU/g 으로 검출되었으며, 대장균군과 곰팡이/효모는 각각 4.16, 5.16 Log<sub>10</sub> CFU/g 으로 검출됨. *E. coli*는 0.20 Log<sub>10</sub> CFU/g 으로 검출됨
- 실험결과, 다소비 농산물 재배농가의 일반세균의 오염수준은 농업용수<농산물<토양의 순으로 확인됨. 또한, 엽채류와 근채류에서 일반세균의 오염수준이 높은 것으로 확인됨
- *B. cereus*는 배추에서 2종(2.7%), 상추에서 3종(12.0%), 열무에서 1종(5.9%), 오이에서 1종(5.6%), 고추에서 1종(6.7%)이 검출되었으며, 토양 샘플은 배추에서 10종(14.5%), 상추에서 5종(21.7%), 열무에서 2종(11.8%), 오이에서 4종(25.0%), 고추에서 6종(26.1%), 토마토에서 5종(38.5%), 딸기에서 1종(3.0%)이 검출됨. 용수 샘플은 상추에서 2종(18.2%), 딸기에서 2종(9.5%)이 검출됨
- *S. aureus*는 배추에서 3종(4.1%), 상추에서 1종(4.0%)이 검출되었으며, 배추 농가의 토양에서 1종(1.5%)가 검출됨. 용수 샘플의 경우 배추에서 1종(2.7%), 오이에서 3종(16.7%), 딸기에서 1종(4.8%)이 검출되었으며, 딸

기와 토마토 경작지에서 사용된 장갑에서 각각 1종(4.8%), 1종(33.3%)이 검출됨

- 농산물 및 환경시료에서의 세균 6종, 바이러스 5종에 대한 모니터링 결과 농업용수<농산물<토양의 순으로 미생물학적 오염도가 높은 것으로 나타났음
- 농산물 및 환경시료의 미생물 오염도를 비교분석한 결과 특히 농업용수에서 *E. coli*가 검출된 경우 배추 겉잎에서도 *E. coli*가 검출된 사례가 다수 있었음 이를 통해 농산물의 식중독균 오염은 농업용수의 영향을 받는다고 볼 수 있음

## (2) 다소비 유통단계 농산물의 미생물학적 오염도조사

- 2016년~2018년 동안 국내에서 유통중인 배추(19곳), 감자(13곳), 무(12곳), 당근(13곳), 사과(13곳), 방울토마토(13곳), 열무(12곳)의 일반미생물(총균수, *Escherichia coli*, 대장균군, 곰팡이, 효모) 및 병원성세균(*Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*)의 평가를 실시함
- 엽채류인 배추의 총균수는 5.80 Log<sub>10</sub> CFU/g 으로 검출되었으며, 대장균군과 곰팡이/효모는 각각 1.54, 4.84 Log<sub>10</sub> CFU/g 이하로 검출되었고, *E. coli*는 검출되지 않음
- 근채류인 감자, 무, 당근, 열무의 총균수는 7.38 Log<sub>10</sub> CFU/g 이하로 검출되었으며, 4.26 Log<sub>10</sub> CFU/g 이하의 대장균군이 검출됨. *E. coli*는 무와 당근샘플에서 각각 0.03, 0.19 Log<sub>10</sub> CFU/g 이하로 검출됨
- 과채류인 방울토마토의 총균수는 3.45 Log<sub>10</sub> CFU/g 으로 검출되었으며, 대장균군과 곰팡이/효모는 각각 0.25, 3.31 Log<sub>10</sub> CFU/g 이하로 검출됨. *E. coli*의 경우 검출되지 않음
- 과실류인 사과의 총균수는 4.13 Log<sub>10</sub> CFU/g 미만이었으며, 대장균군과 곰팡이/효모는 각각 0.98, 3.42 Log<sub>10</sub> CFU/g 으로 관찰되었고, *E. coli*의 경우 검출되지 않음
- 실험결과, 재배농가의 농산물보다 유통중인 농산물이 일반세균 오염도가 높은 것으로 확인됨. 마찬가지로, 엽채류 및 근채류가 일반세균의 오염수준이 높은 것으로 확인됨
- *B. cereus*는 감자에서 8종(61.5%), 무에서 6종(50.5%), 당근에서 9종(69.2%), 열무에서 1종(8.3%)이 검출되었으며, 배추와 무에서 각각 1종(2.1%), 1종(8.3%)의 *S. aureus*가 검출됨
- 실험결과, 유통 중인 농산물의 병원성 세균에 대한 오염수준은 근채류에서 높은 것으로 확인됨

## <바이러스>

- 2016년~2018년 9월 까지 국내 다소비 농산물 생산 농가 총5 지역(경기도, 강원도, 충청도, 전라도, 경상도), 136개소를 방문하여 농산물 및 환경시료 (물, 토양)를 수거하고, 2017년~2018년 마트 14회 방문하여 시료를 수거하여 식중독 바이러스 5종(Norovirus GI, GII, Astrovirus, Adenovirus, hepatitis A virus , Rotavirus)에 대한 검사를 실시하였음
  - 배추 36농가, 딸기 23농가, 오이 21농가, 상추 16농가, 고추 17농가, 방울토마토 8농가, 열무 12농가, 사과 3농가
  - 마트에서 2017년 딸기 2회, 2018년 당근, 사과, 무, 감자, 열무, 방울토마토 12회
  - Norovirus GI: 농산물 3건(0.33%), 용수 3건(7.69%)에서 검출
  - Norovirus GII: 농산물 18건(2.00%), 토양 7건(2.08%), 용수 4건(10.2%), 장갑 1건(2.7%) 에서 검출
  - Astrovirus: 농산물 3건(0.33%), 토양 2건(0.59%), 장갑 1건(2.7%) 에서 검출
  - Adenovirus: 농산물 3건(0.33%), 용수 2건(0.51%) 에서 검출
  - Rotavirus: 용수 1건(2.56%) 에서 검출
  - A형 간염바이러스 (HAV): 농산물 3건(0.33%), 토양 2건(0.59%), 용수 1건(0.25%), 장갑에서 1건(2.7%) 검출되었음
- 바이러스오염 지표미생물인 male-specific coliphage의 분리
  - 농산물 12건(3.76%), 토양 2건(0.64%), 농업용수 6건(5.88%) 검출되었음
- 시기별 농업용수의 오염도 변화 조사
  - 측정기간: 2017년 4월말 ~2018년 11월까지
  - 한국농어촌공사 관할 안성시 저수지 10개소 대상 채수 검사 실시 (농촌, 오촌, 마둔, 금광, 장계, 용설, 덕산, 고삼, 거청, 만수, 안성천)
  - 각 바이러스 검출 결과

: Norovirus GI 4건(4.16%), GII 26건(27.0%),  
 : Adenovirus 10건(10.4%)  
 : Astrovirus 3건(3.12%)  
 : Rotavirus 10건(10.4%)  
 : Hepatitis A virus 모두 검출되지 않았음  
 : Male specific coliphage 총23건(23.9%) 검출되었음  
 : E. coli는 금광 저수지 1건, 용설 저수지 2건, 거청 1건, 안성천 5건 검출되었음

1. 주요 다소비 농산물 재배부터 유통·소비까지 단계별 미생물학적 오염도 조사

가. 농산물 및 환경시료에서의 모니터링 [세균 6종 / 바이러스 5종]

(1) 엽채류

(가) 배추

1) 농작물

가) 농가

□ 배추농가에서 채취한 배추에 대한 미생물 일반미생물 오염수준은 아래 그림과 같음. 배추의 걸잎에서만 대장균과 *B. cereus* 균이 검출되었으며 대장균균과 효모/곰팡이가 속잎에 비해 상대적으로 높은 수준을 보임

표 3-1-1. 배추시료의 미생물 오염도

Samples (No. of sample)		Quantitative (Log <sub>10</sub> CFU/g) <sup>1)</sup>				
		Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold	<i>B. cereus</i>
Chinese cabbage outer (73)	average	5.13±0.72	2.14±1.16	0.02±0.20	4.54±0.68	0.06±0.40
	range	2.96-7.25	0-6.20	0-2.23	2.72-6.95	0-3.48
Chinese cabbage inner (73)	average	5.16±0.83	0.94±1.34	ND <sup>2)</sup>	2.25±1.33	ND
	range	3.16-7.62	0-5.88	ND	0-5.98	ND

Data represent mean ± standard deviations of two measurements

2) ND, not detected (detection limit: 0.70 Log<sub>10</sub> CFU/g)

□ 농가에서 재배되는 배추에 대한 병원성 미생물을 분석한 결과 *B. cereus*와 *S. aureus* 균이 검출되었음. *S. aureus* 균의 경우 속잎에서 검출된 경우 같은 배추의 걸잎에서 또한 검출되었으며 *B. cereus* 균의 경우 걸잎에서만 검출되었음

표 3-1-2. 배추시료의 병원성 미생물 오염도

Samples (No. of sample)	Positive no. (%)		
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	Total
Chinese cabbage outer (73)	1(1.3)	2 (2.6)	3 (3.9)
Chinese cabbage inner (73)	ND <sup>1)</sup>	1 (1.3)	1 (1.3)

<sup>1)</sup> ND, not detected

- 2016-2017년 배추농가에서 바이러스 5종 검사 결과 바이러스 모두 검출되지 않았음
- 지표미생물 Coliphage은 7/149 (4.69%)건 검출되었음

표 3-1-3. 배추농가 배추 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Sample		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
Chinese cabbage	Detection number (rate %)	0/376 (0.00)	0/376 (0.00)	0/376 (0.00)	0/376 (0.00)	0/376 (0.00)	0/376 (0.00)	7/149 (4.69)

① 지역별

- 배추를 지역별로 구분하여 본 결과는 다음 표와 같음. 대장균의 경우 B지역에서는 1.54±1.05 Log<sub>10</sub> CFU/g 관찰되었고 이 지역을 제외한 A, C, D 지역에서는 검출되지 않았음. 검출된 B지역에서 3건 검출되었는데 이 3곳은 인근한 지역이었으며 *B. cereus*가 검출된 D지역 역시 가까운 거리에서 채취한 배추에서 검출되었음

표 3-1-4. 지역별 배추의 미생물 오염도

Sampling region (No. of sample)		Quantitative (Log <sub>10</sub> CFU/g) <sup>1)</sup>				
		Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold	<i>B. cereus</i>
A (1)	average	6.19	3.15	ND <sup>2)</sup>	5.94	ND
	range	-	-	-	-	-
B (30)	average	5.26±0.64	1.54±1.05	0.03±0.11	3.79±0.65	ND
	range	3.61-6.37	0-4.79	0-0.56	2.08-4.88	-
C (19)	average	5.35±0.35	2.00±0.30	ND	4.60±0.62	ND
	range	4.80-5.98	1.54-2.54	-	3.86-6.33	-
D (23)	average	5.21±0.72	2.38±1.24	ND	4.17±0.62	0.26±0.85
	range	4.25-6.97	1.52-5.87	-	3.48-6.33	0-3.18

<sup>1)</sup> Data represent mean ± standard deviations of two measurements

<sup>2)</sup> ND, not detected (detection limit: 1.00 Log<sub>10</sub> CFU/g)

표 3-1-5. 지역별 배추시료의 병원성 미생물 오염도

Samples (No. of sample)	Positive no. (%)		
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	Total
A (1)	ND <sup>1)</sup>	ND	ND
B (30)	ND	1 (3.3)	1 (3.3)
C (19)	ND	ND	ND
D (23)	1 (4.3)	2 (8.7)	3 (13.0)

<sup>1)</sup> ND, not detected

- 2016-2017년 배추농가 배추 바이러스 5종 검사 결과 각 지역 바이러스 모두 검출되지 않았음. 지표미생물 주로 B에서 7/79 (8.86%) 검출됐음



표 3-1-6. 배추 제배지역의 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Sample	NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
Chinese cabbage	A	0/24	0/24	0/24	0/24	0/24	0/8
	B	0/205	0/205	0/205	0/205	0/205	7/79
	C	0/27	0/27	0/27	0/27	0/27	0/22
	D	0/120	0/120	0/120	0/120	0/120	0/40
	Detection number (rate %)	0/376 (0.00)	0/376 (0.00)	0/376 (0.00)	0/376 (0.00)	0/376 (0.00)	0/376 (0.00)

② 계절별

- 배추시료에 대한 미생물 오염도를 계절별로 분석한 결과, 일반미생물, 대장균군, 효모/곰팡이는 계절에 상관없이 비슷한 오염도를 나타내었음. 대장균은 가을에만 검출되었는데 이는 인근한 지역에서 같은 날짜에 검출되었음

표 3-1-7. 계절별 배추경작지 배추의 미생물 오염도

Samples (No. of sample)	Quantitative (Log <sub>10</sub> CFU/g) <sup>1)</sup>					
	Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold	<i>B. cereus</i>	
Spring (n=19)	average	5.35±0.35	2.00±0.30	ND <sup>2)</sup>	4.60±0.63	ND
	range	4.80-5.98	1.54-2.54	-	3.86-6.39	-
Summer (n=21)	average	5.50±0.82	2.25±1.81	ND	4.26±0.62	ND
	range	3.61-6.97	0-5.87	-	3.31-6.33	-
Autumn (n=13)	average	5.34±0.61	1.58±0.90	0.08±0.17	3.55±1.00	ND
	range	4.32-6.30	0-3.13	0-0.56	2.08-5.94	-
Winter (n=20)	average	4.98±0.43	1.92±0.20	ND	4.03±0.40	0.29±0.91
	range	4.15-5.50	1.52-2.22	-	3.48-4.84	0-3.18

<sup>1)</sup> Data represent mean ± standard deviations of two measurements

<sup>2)</sup> ND, not detected (detection limit: 0.70 Log<sub>10</sub> CFU/g)

- 배추에서 *B. cereus* 균과 *S. aureus* 균이 검출되었고 그 외 병원성미생물인 *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 및 *C. perfringens* 균은 발견되지 않음(데이터 표시되지 않음). *S. aureus* 균이 검출된 배추의 경우 *B. cereus* 균도 같이 검출되었음

표 3-1-8. 계절별 배추경작지 배추의 병원성 미생물 오염도

Samples (No. of sample)	Positive no. (%)		
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	Total
Spring (n=19)	ND <sup>1)</sup>	ND	ND
Summer (n=21)	ND	1(4.8)	1(4.8)
Autumn (n=13)	ND	ND	ND
Winter (n=20)	2(10)	2(10)	4 (20)

<sup>1)</sup> ND, not detected

- 배추농가 배추 계절별 바이러스 5종 검사 결과 겨울과 봄에 모두 검출되지 않았고, 여름에 지표미생물 Coliphage 4/27 (14.8%)건, 가을에 3/56 (5.35%)건 검출됐음

표 3-1-9. 배추 계절별 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Samples		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
Chinese cabbage	Winter	0/120	0/120	0/120	0/120	0/120	0/120	0/40
	Spring	0/26	0/26	0/26	0/26	0/26	0/26	0/26
	Summer	0/80	0/80	0/80	0/80	0/80	0/80	4/27
	Autumn	0/150	0/150	0/150	0/150	0/150	0/150	3/56
	Detection number (rate %)	0/376 (0.00)	0/376 (0.00)	0/376 (0.00)	0/376 (0.00)	0/376 (0.00)	0/376 (0.00)	7/149 (4.69)

나) 유통

- 유통되는 배추를 분석한 결과, 걸잎이 속잎과 비교하여 일반세균, 대장균군, 효모/곰팡이 많이 검출되었고 유통되는 배추에서 대장균 및 병원성미생물은 검출되지 않음

표 3-1-10. 유통 배추시료의 미생물 오염도

Samples (No. of sample)		Quantitative (Log <sub>10</sub> CFU/g) <sup>1)</sup>				
		Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold	<i>B. cereus</i>
Chinese cabbage outer (47)	average	6.10±0.69	1.80±1.27	ND <sup>2)</sup>	5.07±0.70	ND
	range	5.04-7.42	0-5.26	-	2.62-6.58	-
Chinese cabbage inner (47)	average	4.93±0.84	0.20±0.48	ND	1.81±1.70	ND
	range	3.22-6.78	0-1.70	-	0-6.16	-

<sup>1)</sup> Data represent mean ± standard deviations of two measurements

<sup>2)</sup> ND, not detected (detection limit: 0.70 Log<sub>10</sub> CFU/g)

2) 토양

- 배추경작지에서 수거한 토양에서 6.88±0.59 Log<sub>10</sub> CFU/g 수준의 일반세균이 검출되었으며 대장균은 검출되지 않음. *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 및 *C. perfringens* 균은 발견되지 않았고 *B. cereus* 균이 10건, 0.55±1.47 Log<sub>10</sub> CFU/g 검출되었으며 *S. aureus* 균이 1건 검출됨

표 3-1-11. 배추경작지 토양의 미생물 오염도

Samples (No. of sample)		Quantitative (Log <sub>10</sub> CFU/g) <sup>1)</sup>				
		Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold	<i>B. cereus</i>
Farming soil (69)	average	6.88±0.59	3.33±1.18	ND <sup>2)</sup>	4.86±0.60	0.55±1.47
	range	5.42-8.10	0-5.68	-	3.51-6.38	0-5.70

<sup>1)</sup> Data represent mean ± standard deviations of two measurements

<sup>2)</sup> ND, not detected (detection limit: 1.00 Log<sub>10</sub> CFU/g)

표 3-1-12. 배추경작지 토양의 병원성 미생물 오염도

Samples (No. of sample)	Positive no. (%)		
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	Total
Farming soil (69)	10 (14.5)	1 (1.5)	11 (16.0)

- 2016-2017년 배추농가 토양에서 바이러스 5종 검사 결과 바이러스 모두 검출되지 않았음
- 지표미생물 Coliphage은 2/82 (2.43%)건 검출되었음

표 3-1-13. 배추농가 토양 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Samples		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
Farming soil	Detection number (rate %)	0/82 (0.00)	0/82 (0.00)	0/82 (0.00)	0/82 (0.00)	0/82 (0.00)	0/82 (0.00)	2/82 (2.43)

가) 지역별

- 배추경작지 토양을 지역별로 구분한 결과, C지역에서 대장균의 평균 오염수준 4.43 Log<sub>10</sub> CFU/g 이 검출되었지만 지역별에 큰 차이는 없었음. 또한 *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 및 *C. perfringens* 균은 발견되지 않았고 *B. cereus* 균 이 B, C, D 지역에서 검출되었고 A지역에서는 검출되지 않았는데 A지역의 샘플은 1건이 었기 때문에 비교하기 어려움

표 3-1-14. 지역별 배추경작지 토양의 미생물 오염도

Sampling region (No. of sample)		Quantitative (Log <sub>10</sub> CFU/g) <sup>1)</sup>				
		Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold	<i>B. cereus</i>
A (1)	average	7.78	4.63	ND <sup>2)</sup>	5.49	ND
	range	-	-	-	-	-
B (28)	average	6.49±0.41	2.91±1.32	ND	4.35±0.37	0.49±1.21
	range	5.42-7.21	0-4.65	-	3.51-5.07	0-4.70
C (19)	average	7.35±0.50	4.43±0.51	ND	5.21±0.46	1.09±2.19
	range	6.36-8.07	3.60-5.68	-	4.58-6.38	0-5.70
D (21)	average	6.94±0.52	2.84±0.66	ND	5.21±0.47	0.17±0.76
	range	5.85-8.10	1.81-5.03	-	4.54-6.31	0-3.48

<sup>1)</sup> Data represent mean ± standard deviations of two measurements

<sup>2)</sup> ND, not detected (detection limit: 1.00 Log<sub>10</sub> CFU/g)

표 3-1-15. 지역별 배추경작지 토양의 병원성 미생물 오염도

Samples (No. of sample)	Positive no. (%)		
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	Total
A (1)	ND <sup>1)</sup>	ND	ND
B (28)	4 (14.3)	1 (3.6)	5 (17.9)
C (19)	4 (21.1)	ND	4 (21.1)
D (21)	1 (4.8)	ND	1 (4.8)

<sup>1)</sup> ND, not detected

- 2016-2017년 배추농가 토양 바이러스 5종 검사 결과 각 지역 바이러스 모두 검출되지 않았음. 지표미생물 주로 B에서 2/37 (5.40%) 검출됐음

표 3-1-16. 배추농가 토양 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Samples		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
Farming soil	A	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	B	0/37	0/37	0/37	0/37	0/37	0/37	2/37
	C	0/13	0/13	0/13	0/13	0/13	0/13	0/13
	D	0/28	0/28	0/28	0/28	0/28	0/28	0/28
	Detection number (rate %)	0/82 (0.00)	0/82 (0.00)	0/82 (0.00)	0/82 (0.00)	0/82 (0.00)	0/82 (0.00)	0/82 (0.00)

나) 계절별

- 계절별로 오이경작지 토양시료에 대한 미생물 오염도는 밑의 표와 같음. 여름과 겨울에 대장균군이 비교적 적은 수준으로 관찰되었으며 *B. cereus* 균의 경우 가을을 제외한 모든 계절에서 검출되었고 배추 토양 전체에서 *S. aureus*가 1건 검출되었는데 이는 가을에 검출된 것으로 확인됨

표 3-1-17. 계절별 배추경작지 토양의 미생물 오염도

Sampling region (No. of sample)		Quantitative (Log <sub>10</sub> CFU/g) <sup>1)</sup>				
		Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold	<i>B. cereus</i>
Spring (n=19)	average	7.35±0.50	4.43±0.51	ND <sup>2)</sup>	5.21±0.46	1.09±2.19
	range	6.36-8.07	3.60-5.68	-	4.58-6.38	0-5.70
Summer (n=17)	average	6.40±0.28	2.60±1.54	ND	4.23±0.40	0.80±1.49
	range	5.98-6.95	0-5.03	-	3.51-5.07	0-4.70
Autumn (n=13)	average	6.74±0.59	3.61±0.84	ND	4.63±0.33	ND
	range	5.41-7.78	2.10-4.65	-	4.24-5.49	-
Winter (n=20)	average	6.94±0.53	2.74±0.44	ND	5.23±0.47	0.17±0.78
	range	5.85-8.10	1.81-3.45	-	4.54-6.31	0-3.48

<sup>1)</sup> Data represent mean ± standard deviations of two measurements

<sup>2)</sup> ND, not detected (detection limit: 1.00 Log<sub>10</sub> CFU/g)

표 3-1-18. 계절별 배추경작지 토양의 병원성 미생물 오염도

Samples (No. of sample)	Positive no. (%)		
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	Total
Spring (n=19)	4 (19.0)	ND <sup>1)</sup>	4 (19.0)
Summer (n=17)	5 (29.4)	ND	5 (29.4)
Autumn (n=13)	ND	1 (7.7)	1 (7.7)
Winter (n=20)	1 (5.0)	ND	1 (5.0)

<sup>1)</sup> ND, not detected

- 배추농가 토양 계절별 바이러스 5종 및 지표미생물 검사 결과 겨울, 봄과 가을에 모두 검출되지 않았고. 여름에만 지표미생물 Coliphage 2/15 (13.3%)건 검출됐음

표 3-1-19. 배추농가 토양 계절별 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Samples		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
Farming soil	Winter	0/28	0/28	0/28	0/28	0/28	0/28	0/28
	Summer	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11
	Summer	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	2/15
	Autumn	0/28	0/28	0/28	0/28	0/28	0/28	0/28
	Detection number (rate %)	0/82 (0.00)	0/82 (0.00)	0/82 (0.00)	0/82 (0.00)	0/82 (0.00)	0/82 (0.00)	2/82 (2.43)

3) 용수

- 배추경작지에 사용된 농업용수를 분석한 결과  $2.63 \pm 0.89 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/mL}$  수준의 총균수가 검출되었고 대장균군, *E. coli* 및 곰팡이/효모에 대한 오염수준은  $0.67 \pm 0.74$ ,  $0.00 \pm 2.00$ ,  $0.00 \pm 2.70 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/mL}$ 로 관찰됨(표)

표 3-1-20. 배추경작지 용수의 미생물 오염도

Samples (No. of sample)		Quantitative ( $\text{Log}_{10} \text{ CFU/g}$ ) <sup>1)</sup>			
		Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold
Irrigation water (37)	average	$2.63 \pm 0.89$	$0.67 \pm 0.74$	$0.15 \pm 0.44$	$1.04 \pm 0.97$
	range	0.78-4.72	0-2.00	0-2.05	0-2.70

<sup>1)</sup> Data represent mean  $\pm$  standard deviations of two measurements

- 배추경작지 용수시료에 대한 병원성 미생물 오염도를 조사하여 표 3-1-21에 나타냄. 총 37개 시료 중 1개(2.7%)의 *S. aureus*가 검출됨. 그 외 병원성 미생물은 검출되지 않음

표 3-1-21. 배추경작지 용수의 병원성 미생물 오염도

Samples (No. of sample)	Positive no. (%)		
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	Total
Irrigation water (37)	ND <sup>1)</sup>	1 (2.7)	1 (2.7)

<sup>1)</sup> ND, not detected

- 비닐멀칭을 사용하는 경우 토양이 직접 농업용수와 접촉하지 않으며, 배추속잎은 겉잎에 비해 접촉할 확률이 현저히 낮음. 따라서 배추겉잎은 비닐멀칭을 사용한 토양과 배추속잎에 비해 농업용수와 접촉이 많음. 특히, 스프링클러를 이용하는 방식은 배추의 미생물 오염도에 직접적인 영향을 줄 수 있음
- 2016-2017년 배추농가 농업용수에서 바이러스 5종 검사 결과 바이러스 모두 검출되지 않았음

□ 지표미생물 Coliphage은 1/24 (4.16%)건 검출되었음

표 3-1-22. 배추농가 농업용수 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Samples		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
Irrigation water	Detection number (rate %)	0/1 (0.00)	0/1 (0.00)	0/1 (0.00)	0/1 (0.00)	0/1 (0.00)	0/1 (0.00)	1/24 (4.16)

가) 지역별

□ 배추경작지 용수시료를 지역별로 구분한 결과, 지역별로 미생물 검출에 대한 차이는 없었지만 *E. coli*가 B 지역에서만 검출되었으며 용수시료에서 병원성미생물 중 *S. aureus*가 검출되었는데 이 시료도 B 지역에서 검출됨

표 3-1-23. 지역별 배추경작지 용수의 미생물 오염도

Sampling region (No. of sample)		Quantitative (Log <sub>10</sub> CFU/mL) <sup>1)</sup>			
		Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold
A (1)	average	1.07	0.00	0.00	0.00
	range	-	-	-	-
B (19)	average	2.78±0.96	0.93±0.74	0.30±0.58	1.29±1.01
	range	1.60-4.72	0-2.00	0-2.05	0-2.70
C (9)	average	2.39±0.99	0.50±0.81	0.00	0.59±0.94
	range	0.78-3.49	0-2.00	-	0-2.16
D (8)	average	2.73±2.86	0.34±0.49	0.00	1.09±0.76
	range	2.32-3.21	0-1.18	-	0-2.06

<sup>1)</sup> Data represent mean ± standard deviations of two measurements

표 3-1-24. 지역별 배추경작지 용수의 병원성 미생물 오염도

Samples (No. of sample)	Positive no. (%)		
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	Total
A (1)	ND <sup>1)</sup>	ND	ND
B (19)	ND	1 (5.2)	1 (5.2)
C (9)	ND	ND	ND
D (8)	ND	ND	ND

<sup>1)</sup> ND, not detected

□ 2016-2017년 배추농가 농업용수 농장 1만 샘플링 했고 바이러스 5종 검사 결과 검출되지 않았음. 지표미생물 C에서 1/3 (33.3%) 검출됐음

표 3-1-25. 배추농가 농업용수 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Samples		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
Irrigation water	A	-	-	-	-	-	-	0/6
	B	-	-	-	-	-	-	0/9

Samples		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
	C	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/3
	D	-	-	-	-	-	-	0/6
	Detection number (rate %)	0/1 (0.00)	0/1 (0.00)	0/1 (0.00)	0/1 (0.00)	0/1 (0.00)	0/1 (0.00)	1/24 (4.16)

나) 계절별

- 배추경작지의 용수시료를 계절별로 보면 표 3-1-26과 같음. 계절별로 일반 미생물 검출량에 대한 차이는 없었지만 *E. coli*의 경우 여름과 가을에서만 검출되었음. 또한 *S. aureus*는 가을에만 검출된 것으로 확인됨

표 3-1-26. 계절별 배추경작지 용수의 미생물 오염도

Sampling region (No. of sample)		Quantitative (Log <sub>10</sub> CFU/mL) <sup>1)</sup>			
		Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold
Spring (n=9)	average	2.39±0.99	0.50±0.81	0.00	0.59±0.94
	range	0.78-3.49	0-2.00	-	0-2.16
Summer (n=9)	average	2.95±0.85	0.92±0.75	0.33±0.70	1.60±0.92
	range	1.77-4.72	0-1.78	0-2.05	0-2.69
Autumn (n=12)	average	2.52±1.06	0.78±0.79	0.23±0.49	0.83±1.03
	range	1.07-4.55	0-2.00	0-1.30	0-2.70
Winter (n=7)	average	2.72±0.31	0.39±0.50	0.00	1.25±0.67
	range	2.32-3.21	0-1.18	-	0.48-2.06

<sup>1)</sup> Data represent mean ± standard deviations of two measurements

표 3-1-27. 계절별 배추경작지 용수의 병원성 미생물 오염도

Samples (No. of sample)	Positive no. (%)		
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	Total
Spring (n=9)	ND <sup>1)</sup>	ND	ND
Summer (n=9)	ND	ND	ND
Autumn (n=12)	ND	1 (8.3)	1 (8.3)
Winter (n=7)	ND	ND	ND

<sup>1)</sup> ND, not detected

- 배추농가 농업용수 계절별 바이러스 5종 및 지표미생물 검사 결과 겨울, 봄과 여름에 모두 검출되지 않았고, 가을에 지표미생물 Coliphage 1/12 (8.33%)건 검출됐음

표 3-1-28. 배추농가 농업용수 계절별 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Samples		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
Irrigation water	Winter	-	-	-	-	-	-	0/6
	Spring	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/4
	Summer	-	-	-	-	-	-	0/2
	Autumn	-	-	-	-	-	-	1/12
	Detection number (rate %)	0/1 (0.00)	0/1 (0.00)	0/1 (0.00)	0/1 (0.00)	0/1 (0.00)	0/1 (0.00)	2/24 (8.33)

4) 장갑

- 배추경작지에 사용되는 장갑을 미생물 분석한 결과는 표 3-1-29와 같음. 장갑에서 병원성 미생물은 검출되지 않음

표 3-1-29. 배추경작지 장갑의 미생물 오염도

Samples (No. of sample)		Quantitative (Log <sub>10</sub> CFU/g) <sup>1)</sup>				
		Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold	<i>B. cereus</i>
Glove (2)	average	6.62±0.41	1.12±1.59	ND <sup>2)</sup>	3.89±1.35	ND
	range	6.33-6.91	0-2.25	-	2.93-4.85	-

<sup>1)</sup> Data represent mean ± standard deviations of two measurements

<sup>2)</sup> ND, not detected (detection limit: 1.00 Log<sub>10</sub> CFU/g)

- 2017년 배추농가 장갑 바이러스 5종 검사 결과 바이러스 모두 검출되지 않았음.
- 지표미생물 Coliphage은 모두 검출되지 않았음

표 3-1-30. 배추농가 장갑 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Samples		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
Glove	Detection number (rate %)	0/12 (0.00)	0/12 (0.00)	0/12 (0.00)	0/12 (0.00)	0/12 (0.00)	0/12 (0.00)	0/6 (4.16)

- 배추 및 토양 등 환경샘플에 대한 실험 결과를 종합하면, 지역에 따라 배추 및 환경샘플의 미생물 오염도는 상이했으나 *E. coli*에 대한 검출결과를 비교했을 때 배추의 오염도는 농업용수로부터 비롯되는 것으로 생각할 수 있음

(나) 상추

1) 농작물

가) 농가

- 국내 상추시료의 일반미생물의 오염도를 조사한 결과, 상추의 총균수 오염 수준은 4.79±1.34 Log<sub>10</sub> CFU/g이었으며, 대장균군 및 곰팡이/효모에 대한 오염수준은 각각 1.75±1.80, 3.98±0.91 Log<sub>10</sub> CFU/g으로 관찰됨(표 3-1-31). *E. coli*의 경우 상추시료에서



는 검출되지 않았고, *B. cereus*에 대한 오염수준은  $0.15 \pm 0.45 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ 으로 관찰됨

표 3-1-31. 상추시료의 미생물 오염도

Samples (No. of sample)		Quantitative ( $\text{Log}_{10} \text{ CFU/g}$ ) <sup>1)</sup>				
		Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold	<i>B. cereus</i>
Romaine lettuce (25)	average	4.79±1.34	1.75±1.80	ND <sup>2)</sup>	3.98±0.91	0.15±0.45
	range	2.36-7.48	0-5.65	ND	1.30-6.04	0-1.96

<sup>1)</sup>Data represent mean ± standard deviations of two measurements

<sup>2)</sup> ND, not detected (detection limit: 0.70  $\text{Log}_{10} \text{ CFU/g}$ )

- 국내의 여러 지역에 위치한 상추경작지에서 수거한 상추시료의 병원성세균에 대한 오염도를 16s rRNA sequence 방법으로 조사하였다. 총 25개의 상추에서 3종(12.0%)의 *B. cereus*균과 1종(4.0%)의 *S. aureus*균이 검출됨(표 3-1-32). 그 외 병원성미생물인 *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 및 *C. perfringens* 균은 발견되지 않음(데이터 표시되지 않음)

표 3-1-32. 상추시료의 병원성 미생물 오염도

Samples (No. of sample)	Positive no. (%)		
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	Total
Romaine lettuce (25)	3 (12.0)	1 (4.0)	4 (16.0)

1) ND, not detected.

- 2016-2018년 상추농가에서 바이러스 5종 검사 결과 노로바이러스 GII 1/83 (1.20%)건만 검출되었고, 지표미생물 Coliphage은 2/83 (2.40%)건 검출되었음

표 3-1-33. 상추농가 상추 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Samples		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
Romaine lettuce	detection number (rate %)	0/83 (0.00)	1/83 (1.20)	0/83 (0.00)	0/83 (0.00)	0/83 (0.00)	0/83 (0.00)	2/83 (2.40)

① 지역별

- 지역별로 구분하여 상추시료에 대한 미생물 오염도 결과는 표 3-1-34와 같음. 지역에 따라 상추시료의 미생물 오염도는 상이한 것으로 나타났으며, 병원성 미생물 검출은 A-E 지역에서 수거한 상추의 총균수는 각각  $4.60 \pm 1.51$ ,  $5.57 \pm 0.31$ ,  $4.33 \pm 0.99$ , 5.35 및  $5.48 \pm 0.82 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ 으로 B 지역의 오염도가 가장 높은 것이 확인됨. 반면, 대장균군은 C 지역에서 수거한 상추에서  $3.32 \pm 1.10 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$  수준이 검출되어 다른 지역의 상추보다 많은 대장균군이 검출됨. *E. coli*는 모든 시료에서 검출한계( $<0.70 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ ) 미만으로 확인됨. 상추에서 평균  $4.00 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$  이상의 곰팡이/효모가 검출되었으나 배추경작지와 유사하게 총균수( $4.79 \pm 1.34 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ )보다 낮은 오염도를 나타냄

표 3-1-34. 지역별 상추시료의 미생물 오염도

Sampling region (No. of sample)		Quantitative (Log <sub>10</sub> CFU/g) <sup>1)</sup>				
		Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold	<i>B. cereus</i>
A (17)	average	4.60±1.51	1.35±1.91	ND <sup>2)</sup>	4.07±0.61	0.05±0.22
	range	2.36-7.48	0-5.65	ND	3.40-6.04	0-0.91
B (2)	average	5.57±0.31	1.75±1.44	ND	4.77±0.19	ND
	range	5.34-5.79	0.74-2.77	ND	4.63-4.90	ND
C (2)	average	4.33±0.99	3.32±1.10	ND	2.81±1.08	0.42±0.60
	range	3.63-5.03	2.54-4.10	ND	2.04-3.57	0-0.85
D (1)	average	5.35	2.25	ND	4.47	ND
	range	5.35	2.25	ND	4.47	ND
E (3)	average	5.48±0.82	2.80±1.53	ND	3.57±1.98	0.65±1.13
	range	4.57-6.15	1.43-4.45	ND	1.30-4.89	0-1.96
Total (25)		4.79±1.34	1.75±1.85	ND	3.98±0.91	0.15±0.45

<sup>1)</sup> Data represent mean ± standard deviations of two measurements

<sup>2)</sup> ND, not detected (detection limit: 0.70 Log<sub>10</sub> CFU/g)

- 상추시료에 대한 병원성 미생물 오염도를 지역별로 분석한 결과 A, C, E지역에서 *B. cereus*가 전체 25개 중 각각 17개 중 1개(5.3%), 2개 중 1개(50.0%), 3개 중 1개(33.3%)의 시료에서 양성반응을 보였으며, A 지역에서만 *S. aureus*가 전체 17개 중 1개(5.3%)의 시료에서 양성반응을 보였음(표 3-1-35)

표 3-1-35. 지역별 상추시료의 병원성 미생물 오염도

Sampling region (No. of sample)	Positive no. (%)		Total
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	
A (17)	1(5.3)	1 (5.3)	2 (11.8)
B (2)	ND <sup>1)</sup>	ND	ND
C (2)	1(50.0)	ND	1 (50.0)
D (1)	ND	ND	ND
E (3)	1(33.3)	ND	1 (33.3)
Total (25)	3 (12.0)	1 (4.0)	4 (16.0)

1) ND, not detected

- 바이러스 5종 검사 결과 C지역에서 1/6 (16.6%) 건만 검출되었고, 지표미생물 Coliphage 은 A지역에서 1/11 (9.09%)건 검출됐고, B지역에서 1/2 (50.0%)건 검출됐음

표 3-1-36. 상추 제배지역의 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Samples		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
Romaine lettuce	A	0/34	0/34	0/34	0/34	0/34	0/34	1/11
	B	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	1/2
	C	0/6	1/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/3
	D	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/2
	E	0/24	0/24	0/24	0/24	0/24	0/24	0/2
	detection number (rate %)	0/83 (0.00)	1/83 (1.20)	0/83 (0.00)	0/83 (0.00)	0/83 (0.00)	0/83 (0.00)	0/83 (0.00)

② 계절별

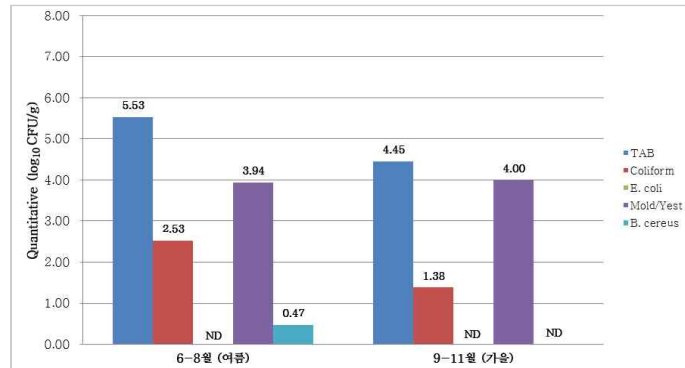


그림 3-1-1. 계절별 상추시료의 미생물 오염도

- 상추시료에 대한 병원성 미생물 오염도를 계절별로 분석한 결과 여름과 가을로 나뉘어졌으며, 여름시기에 수거한 상추샘플이 가을시기에 수거한 상추에 비해 많은 미생물 오염도를 보였으며 *B. cereus*가 검출된 것을 확인할 수 있음(그림3-1-1)
- 상추시료에 대한 병원성 미생물 오염도 또한 계절별로 분석하여 표 3-1-37에 나타냈다. 여름시기에 수거한 상추에서만 *B. cereus*가 검출되었으며, 가을시기에 수거한 상추에서 *S. aureus*가 낮게 검출된 것을 확인할 수 있음

표 3-1-37. 계절별 상추시료의 병원성 미생물 오염도

Samples (No. of sample)		Positive no. (%)		
		<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	Total
Romaine lettuce (25)	June-Aug. (Summer)	3 (37.5)	ND <sup>1)</sup>	3 (37.5)
	Sep.-Nov. (Autumn)	ND	1 (5.9)	1 (5.9)

<sup>1)</sup> ND, not detected

- 상추농가 상추 계절별 바이러스 5종 검사 결과 모두 검출되지 않았고, 여름에 지표미생물 Coliphage 1/10 (10.0%)건, 가을에 1/10 (10.0%)건 검출됐음

표 3-1-38. 상추 계절별 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Samples		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	Adeno V	RotaV	Coliphage
Romaine lettuce	Summer	0/42	0/42	0/42	0/42	0/42	0/42	1/10
	Autumn	0/41	0/41	0/41	0/41	0/41	0/41	1/10
	detection number (rate %)	0/83 (0.00)	0/83 (0.00)	0/83 (0.00)	0/83 (0.00)	0/83 (0.00)	0/83 (0.00)	2/20 (10.0)

2) 토양

- 상추경작지 토양시료의 일반미생물의 오염도를 조사한 결과, 토양의 총균수 오염수준은

6.92±0.34 Log<sub>10</sub> CFU/g이었으며, 대장균군 및 곰팡이/효모에 대한 오염수준은 각각 2.71±0.86, 4.57±0.50 Log<sub>10</sub> CFU/g으로 관찰됨(표 3-1-39). *E. coli* 및 *B. cereus*에 대한 오염수준은 0.09±0.41, 0.85±1.68 Log<sub>10</sub> CFU/g으로 관찰됨

표 3-1-39. 상추경작지 토양의 미생물 오염도

Samples (No. of sample)		Quantitative (Log <sub>10</sub> CFU/g) <sup>1)</sup>				
		Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold	<i>B.cereus</i>
Farming soil (23)	average	6.92±0.34	2.71±0.86	0.09±0.41	4.57±0.50	0.85±1.68
	range	6.43-7.50	1.30-4.91	0-1.96	3.75-5.60	0-4.40

1) Data represent mean ± standard deviations of two measurements

- 상추경작지에서 수거한 토양시료의 병원성세균에 대한 오염도를 조사하였다. 총 22개의 토양에서 4종(18.2%)의 *B. cereus*균이 검출됨(표 3-1-40). 반면, *S. aureus* 균은 검출되지 않음. 또한, 그 외 병원성미생물인 *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 및 *C. perfringens* 균은 발견되지 않음(데이터 표시되지 않음)

표 3-1-40. 상추경작지 토양의 병원성 미생물 오염도

Samples (No. of sample)	Positive no. (%)		
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	Total
Farming soil (22)	4 (18.2)	ND <sup>1)</sup>	4 (18.2)

<sup>1)</sup> ND, not detected

가) 지역별

- 상추경작지에서 수거한 토양시료의 *E. coli*는 A 지역에서 수거한 상추경작지 토양에서만 *E. coli*가 0.12±0.49 Log<sub>10</sub> CFU/g 수준으로 매우 낮게 검출됨. *B. cereus*의 경우 B 지역을 제외한 A, C 및 E 지역에서 약 3 Log<sub>10</sub> CFU/g 미만으로 검출됨

표 3-1-41. 지역별 상추경작지 토양의 미생물 오염도

Sampling region (No. of sample)		Quantitative (Log <sub>10</sub> CFU/g) <sup>1)</sup>				
		Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold	<i>B. cereus</i>
A (16)	average	6.81±0.30	2.29±0.48	0.12±0.49	4.60±0.44	0.43±1.22
	range	6.43-7.45	1.30-2.89	0-1.96	4.00-5.60	0-4.40
B (2)	average	6.79±0.10	3.85±0.77	ND <sup>2)</sup>	5.01±0.13	ND
	range	6.72-6.86	3.30-4.39	ND	4.92-5.10	ND
C (2)	average	7.29±0.30	3.83±1.54	ND	4.28±0.18	2.13±3.01
	range	7.08-7.50	2.74-4.91	ND	4.15-4.40	0-4.25
E (3)	average	7.34±0.17	3.45±0.41	ND	4.31±0.91	2.80±2.44
	range	7.15-7.48	3.13-3.91	ND	3.75-5.36	0-4.39
Total (23)		6.92±0.34	2.71±0.86	0.09±0.41	4.57±0.50	0.85±1.68

1) Data represent mean ± standard deviations of two measurements

2) ND, not detected (detection limit: 1.00 Log<sub>10</sub> CFU/g)

- 상추경작지 토양시료에 대한 병원성 미생물 오염도를 지역별로 분석한 결과 A, C 및 E지역에서 *B. cereus*가 전체 22개 중 각각 15개 중 1개(6.7%), 2개 중 1개(50.0%), 3개 중 2개(66.0%)의 시료에서 검출됨(표 3-1-42)

표 3-1-42. 상추경작지 토양의 병원성 미생물 오염도

Sampling region (No. of sample)	Positive no. (%)		Total
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	
A (16)	2 (12.5)	ND <sup>1)</sup>	1 (6.7)
B (2)	ND	ND	ND
C (2)	1 (50.0)	ND	1(50.0)
E (3)	2 (66.0)	ND	2 (66.0)
Total (23)	5 (21.7)	ND	5 (21.7)

1) ND, not detected

- 2016-2018년 상추농가 토양 바이러스 5종 검사 결과 E지역에서 1/12 (8.33%) 건 검출되었고, 지표미생물 Coliphage은 각 지역에서 모두 검출되지 않았음

표 3-1-43. 상추 토양 제배지역의 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Sample	NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
soil	A	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20
	B	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	C	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	D	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/2
	E	0/12	1/12	0/12	0/12	0/12	0/12
detection number (rate %)	0/45 (0.00)	1/45 (2.22)	0/45 (0.00)	0/45 (0.00)	0/45 (0.00)	0/45 (0.00)	0/42 (0.00)

나) 계절별

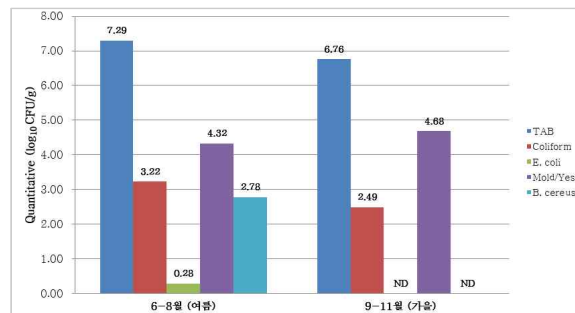


그림 3-1-2. 계절별 상추경작지 토양의 미생물 오염도

- 상추경작지의 토양시료에 대한 병원성 미생물 오염도를 여름과 가을시기에 대한 계절별로 분석한 결과, 여름시기에 수거한 토양시료가 가을시기에 수거한 토양시료에 비해 많은 미생물 오염도를 보였으며, *E. coli* 및 *B. cereus*가 검출된 것을 확인할 수 있음(그림 3-1-2)

- 상추경작지 토양시료에 대한 병원성 미생물 오염도 또한 계절별로 분석한 결과, *B. cereus*는 여름시기에 수거한 상추에서만 검출된 것을 확인(표 3-1-44)

표 3-1-44. 계절별 상추경작지 토양의 병원성 미생물 오염도

Samples (No. of sample)		Positive no. (%)		
		<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	Total
Farming soil (23)	June-Aug. (Summer)	5 (71.4)	ND <sup>1)</sup>	5 (71.4)
	Sep.-Nov. (Autumn)	ND	ND	ND

<sup>1)</sup> ND, not detected

- 상추농가 상추 계절별 바이러스 5종 검사 결과 모두 검출되지 않았고, 여름에 지표미생물 Coliphage 1/10 (10.0%)건, 가을에 1/10 (10.0%)건 검출됐음

표 3-1-45. 상추 계절별 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Samples		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
soil	Summer	0/25	1/25	0/25	0/25	0/25	0/25	0/22
	Autumn	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20
	Detection number (rate %)	0/45 (0.00)	1/45 (2.22)	0/45 (0.00)	0/45 (0.00)	0/45 (0.00)	0/45 (0.00)	0/42 (10.0)

### 3) 용수

- 상추경작지 용수시료의 일반미생물의 오염도를 조사한 결과, 용수의 총균수는 2.01±1.84 Log<sub>10</sub> CFU/mL으로 낮은 수준이었으며, 대장균군 및 곰팡이/효모에 대한 오염수준은 각각 0.11±0.29, 0.25±0.50 Log<sub>10</sub> CFU/mL으로 관찰됨(표 3-1-46). *E. coli*는 검출한계(< 0.00 Log<sub>10</sub> CFU/mL) 미만으로 확인됨. 상추경작지에 대한 일반세균의 오염수준은 용수 <신선채소(상추)<토양의 순으로 확인됨

표 3-1-46. 상추경작지 용수의 미생물 오염도

Samples (No. of sample)		Quantitative (Log <sub>10</sub> CFU/mL) <sup>1)</sup>			
		Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold
Irrigation water (11)	average	2.01±1.84	0.11±0.29	ND <sup>2)</sup>	0.25±0.50
	range	0-5.30	0-0.95	ND	0-1.26

<sup>1)</sup> Data represent mean ± standard deviations of two measurements

<sup>2)</sup> ND, not detected (detection limit: 0.00 Log<sub>10</sub> CFU/mL)

- 상추경작지에서 수거한 용수시료의 병원성세균에 대한 오염도를 조사하였다. 총 11개의 용수에서 2종(18.2%)의 *B. cereus*균이 검출됨(표 3-1-47). 반면, 그 외 병원성미생물인 *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 및 *C. perfringens*은 발견되지 않음

- 병원성 미생물에 대한 오염도를 비교했을 때, 상추의 오염도는 환경샘플(토양, 용수)과 연관성이 있는 것으로 볼 수 있음

표 3-1-47. 상추경작지 용수의 병원성 미생물 오염도

Samples (No. of sample)	Positive no. (%)		
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	Total
Irrigation water(11)	2 (18.2)	ND <sup>1)</sup>	2 (18.2)

<sup>1)</sup> ND, not detected

- 상추농가 농업용수 바이러스 5종 검사 결과 모두 검출되지 않았고, 지표미생물 Coliphage 2/16 (12.5%)건 검출됐음

표 3-1-48. 상추농가 농업용수 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Samples		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
Irrigation water	Detection number (rate %)	0/3 (0.00)	0/3 (0.00)	0/3 (0.00)	0/3 (0.00)	0/3 (0.00)	0/3 (0.00)	2/16 (12.5)

가) 지역별

- 상추경작지에서 수거한 용수시료의 일반미생물 오염도를 지역별로 조사한 결과, C 지역을 제외한 A, B 및 E 지역의 총균수 오염수준은 각각 2.13±1.94, 2.03, 3.15±1.83 Log<sub>10</sub> CFU/mL이었으며, 대장균군에 대한 오염수준은 A 및 E 지역에서 각각 0.19±0.43, 0.10±0.17 Log<sub>10</sub> CFU/mL이었으며, 곰팡이/효모에 대한 오염수준은 A 지역에서 수거한 용수시료에서만 0.56±0.64 Log<sub>10</sub> CFU/mL 수준으로 관찰됨(표 3-1-49). *E. coli*는 모든 시료에서 검출한계(< 0.00 Log<sub>10</sub> CFU/mL) 미만으로 확인됨

표 3-1-49. 지역별 상추경작지 용수의 미생물 오염도

Sampling region (No. of sample)		Quantitative (Log <sub>10</sub> CFU/mL) <sup>1)</sup>			
		Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold
A (5)	average	2.13±1.94	0.19±0.43	ND <sup>2)</sup>	0.56±0.64
	range	0-5.30	0-0.95	ND	0-1.26
B (1)	average	2.03	ND	ND	ND
	range	2.03	ND	ND	ND
C (2)	average	ND	ND	ND	ND
	range	ND	ND	ND	ND
E (3)	average	3.15±1.83	0.10±0.17	ND	ND
	range	1.65-5.19	0-0.30	ND	ND
Total (11)		2.01±1.84	0.11±0.29	ND	0.25±0.50

1) Data represent mean ± standard deviations of two measurements

2) ND, not detected (detection limit: 0.00 Log<sub>10</sub> CFU/mL)

- 상추경작지 용수시료에 대한 병원성 미생물 오염도를 지역별로 분석한 결과 C와 E지역에서 *B. cereus*가 각각 2개 중 1개(50.0%), 3개 중 1개(33.3%)의 시료에서 검출되었으며, 그 외 다른 지역에서는 병원성 미생물이 검출되지 않음 (표 3-1-50)

표 3-1-50. 지역별 상추경작지 용수의 병원성 미생물 오염도

Sampling region (No. of sample)	Positive no. (%)		Total
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	
A (5)	ND <sup>1)</sup>	ND	ND
B (1)	ND	ND	ND
C (2)	1 (50.0)	ND	1 (50.0)
E (3)	1 (33.3)	ND	1 (33.3)
Total (11)	2 (18.2)	ND	2 (18.2)

<sup>1)</sup> ND, not detected

- 상추, 토양 및 용수 등 환경샘플에 대한 실험 결과를 종합하면, 지역에 따라 상추 및 환경샘플의 미생물 오염도는 상이했으나 *E. coli*에 대한 검출결과를 비교했을 때 상추의 오염도는 토양으로부터 비롯되는 것으로 생각할 수 있음
- 2016-2018년 상추농가 농업용수는 A지역과 D지역에서 바이러스 5종 검사 결과 모두 검출 검출되지 않았고, 지표미생물 Coliphage은 E지역에서만 2/4 (50.0%)건 검출됐음

표 3-1-51. 상추농업용수 제배지역의 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Sampling region	NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
Irrigation water	A	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/6
	B	-	-	-	-	-	0/1
	C	-	-	-	-	-	0/3
	D	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2
	E	-	-	-	-	-	2/4
Detection number (rate %)	0/3 (0.00)	0/3 (0.00)	0/3 (0.00)	0/3 (0.00)	0/3 (0.00)	0/3 (0.00)	2/16 (12.5)

나) 계절별

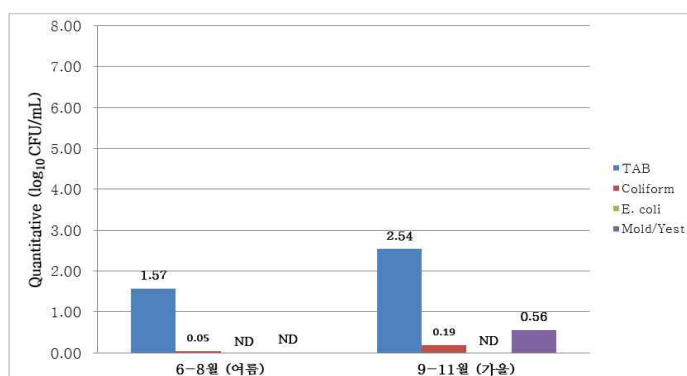


그림 3-1-3. 계절별 상추경작지 용수의 미생물 오염도

- 상추경작지의 용수시료에 대한 병원성 미생물 오염도를 계절별로 분석한 결과, 9-11월 사이인 가을시기에 수거한 용수시료가 6-8월 사이인 여름시기에 수거한 용수시료에 비해 높은 미생물 오염도를 보였으며, *B. cereus*가 검출된 것을 확인할 수 있음(그림 3-1-3)



- 용수시료에 대한 병원성 미생물 오염도 또한 계절별로 분석함. 상추, 토양시료와 마찬가지로 여름시기에 수거한 상추에서만 *B. cereus*가 검출된 것을 확인함(표 3-1-52)

표 3-1-52. 계절별 상추경작지 용수의 병원성 미생물 오염도

Samples (No. of sample)		Positive no. (%)		
		<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	Total
Irrigation water (11)	June-Aug. (Summer)	2 (33.3)	ND <sup>1)</sup>	2 (33.3)
	Sep.-Nov. (Autumn)	ND	ND	ND

<sup>1)</sup> ND, not detected

- 상추농가 농업용수 계절별 바이러스 5종 검사 결과 모두 검출되지 않았고. 여름에 지표미생물 Coliphage 2/16 (18.1%)건 검출됐음

표 3-1-53. 상추농가 농업용수 계절별 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Samples		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
Irrigation water	Summer	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	2/11
	Autumn	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/5
	Detection number (rate %)	0/3 (0.00)	0/3 (0.00)	0/3 (0.00)	0/3 (0.00)	0/3 (0.00)	0/3 (0.00)	2/16 (12.5)

(다) 딸기

1) 농작물

가) 농가

- 딸기경작지에서 수거한 딸기의 미생물학적 모니터링 수행결과, 딸기시료의 총균수의 오염 수준은  $2.21 \pm 1.49 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ 이었으며, 곰팡이/효모에 대한 오염수준은  $3.12 \pm 1.45 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ 으로 관찰됨(표 3-1-54). 대장균군, *E. coli* 및 *B. cereus*는 모든 시료에서 검출한 계( $< 0.70 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ ) 미만으로 확인됨

표 3-1-54. 딸기시료의 미생물 오염도

Samples (No. of sample)		Quantitative ( $\text{Log}_{10} \text{ CFU/g}$ ) <sup>1)</sup>				
		Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold	<i>B. cereus</i>
Strawberry (33)	average	$2.21 \pm 1.49$	ND <sup>2)</sup>	ND	$3.12 \pm 1.45$	ND
	range	0-5.26	ND	ND	0-5.20	ND

<sup>1)</sup> Data represent mean  $\pm$  standard deviations of two measurements

<sup>2)</sup> ND, not detected (detection limit:  $0.70 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ )

- 국내의 딸기경작지에서 수거한 딸기시료의 병원성세균에 대한 오염도를 조사한 결과, 총 33개의 딸기에서 병원성 미생물이 검출되지 않음(표 3-1-55)

표 3-1-55. 딸기시료의 병원성 미생물 오염도

Samples (No. of sample)	Positive no. (%)		
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	Total
Strawberry (33)	ND <sup>1)</sup>	ND	ND

1) ND, not detected

- 2017-2018년 딸기농가에서 바이러스 5종 검사결과 A형 간염바이러스 1/156 (0.64%)건만 검출되었고, 지표미생물 Coliphage은 검출되지 않았음

표 3-1-56. 딸기농가 딸기 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Samples		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
Strawberry	Detection number (rate %)	0/156 (0.00)	0/156 (0.00)	1/156 (0.64)	0/156 (0.00)	0/156 (0.00)	0/156 (0.00)	0/33 (0.00)

① 지역별

- 딸기시료를 지역별로 나누어 각 지역의 총균수, 곰팡이/효모의 오염수준을 비교하면 A 지역의 오염도가 가장 낮은 것이 확인됨. 대장균군, *E. coli* 및 *B. cereus*는 모든 시료에서 검출한계(< 0.70 Log<sub>10</sub> CFU/g) 미만으로 확인됨

표 3-1-57. 지역별 딸기시료의 미생물 오염도

Sampling region (No. of sample)		Quantitative (Log <sub>10</sub> CFU/g) <sup>1)</sup>				
		Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold	<i>B. cereus</i>
A (4)	average	0.58±0.41	ND <sup>2)</sup>	ND	2.21±0.17	ND
	range	0-0.94	ND	ND	2.04-2.38	ND
D (9)	average	3.58±0.13	ND	ND	4.78±0.38	ND
	range	3.39-3.72	ND	ND	4.09-5.20	ND
E (20)	average	1.92±1.47	ND	ND	2.55±1.29	ND
	range	0-5.26	ND	ND	0-4.56	ND
Total (33)		2.21±1.49	ND	ND	3.12±1.45	ND

1) Data represent mean ± standard deviations of two measurements

2) ND, not detected (detection limit: 0.70 Log<sub>10</sub> CFU/g)

- E지역에서 딸기 바이러스 5종 검사 결과 A형 간염바이러스 1/117 (0.85%) 건 검출되었고, 지표미생물 Coliphage은 각 지역에서 모두 검출되지 않았음

표 3-1-58. 딸기 재배지역의 딸기 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Sampling region		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
Strawberry	A	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/4
	D	0/27	0/27	0/27	0/27	0/27	0/27	0/9
	E	0/117	0/117	1/117	0/117	0/117	0/117	0/20
	Detection number (rate %)	0/156 (0.00)	0/156 (0.00)	1/156 (0.64)	0/156 (0.00)	0/156 (0.00)	0/156 (0.00)	0/33 (0.00)

② 계절별

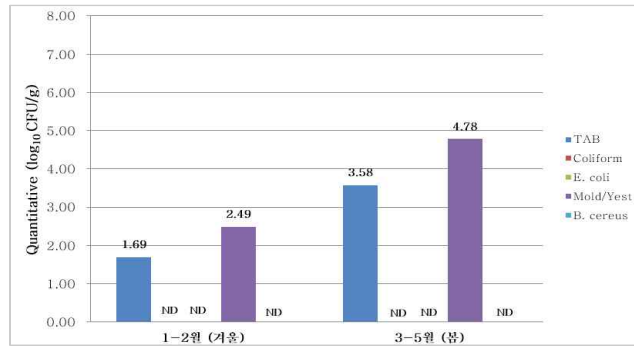


그림 3-1-4. 계절별 딸기시료의 미생물 오염도

- 딸기시료에 대한 병원성 미생물 오염도를 계절별로 분석한 결과, 1-2월 사이인 겨울시기에 수거한 딸기시료가 3-5월 사이인 봄 시기에 수거한 딸기시료에 비해 낮은 미생물 오염도를 보였음(그림 3-1-4). 대장균군, *E. coli* 및 *B. cereus*는 검출되지 않음
- 딸기농가 딸기 계절별 바이러스 5종 검사 결과 겨울에 A형 간염바이러스 1/129 (0.77%) 건 검출됐음. 지표미생물 Coliphage는 검출되지 않았음

표 3-1-59. 딸기 계절별 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Samples		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
Straw berry	Winter	0/129	0/129	1/129	0/129	0/129	0/129	0/24
	Spring	0/27	0/27	0/27	0/27	0/27	0/27	0/9
	Detection number (rate %)	0/156 (0.00)	0/156 (0.00)	1/156 (0.64)	0/156 (0.00)	0/156 (0.00)	0/156 (0.00)	0/33 (10.0)

2) 토양

- 딸기경작지 토양시료의 총균수, 대장균군, *E. coli*, 곰팡이/효모 및 *B. cereus*에 대한 오염 수준은 각각  $7.52 \pm 0.60$ ,  $2.90 \pm 1.07$ ,  $0.06 \pm 0.30$ ,  $5.00 \pm 0.81$ ,  $0.04 \pm 0.24$  Log<sub>10</sub> CFU/g으로 관찰됨

표 3-1-60. 딸기경작지 토양의 미생물 오염도

Samples (No. of sample)		Quantitative (Log <sub>10</sub> CFU/g) <sup>1)</sup>				
		Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold	<i>B. cereus</i>
Farming soil (33)	average	$7.52 \pm 0.60$	$2.90 \pm 1.07$	$0.06 \pm 0.30$	$5.00 \pm 0.81$	$0.04 \pm 0.24$
	range	6.64-8.61	0.65-4.72	0-1.65	2.74-6.39	0-1.35

<sup>1)</sup> Data represent mean ± standard deviations of two measurements

- 딸기경작지에서 수거한 토양시료의 병원성세균에 대한 오염도를 표 3-1-61에 나타냄. 총 33개의 토양시료에서 1종(3.0%)의 *B. cereus* 균이 검출됨. 그 외 병원성미생물인 *L.*

*monocytogenes*, *Salmonella* spp., *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 및 *C. perfringens* 균은 발견되지 않음

표 3-1-61. 딸기경작지 토양의 병원성 미생물 오염도

Samples (No. of sample)	Positive no. (%)		
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	Total
Farming soil (33)	1 (3.0)	ND <sup>1)</sup>	1 (3.0)

<sup>1)</sup> ND, not detected

□ 딸기농장 토양 바이러스 5종 및 지표미생물 Coliphage 검출결과 각 지역에서 모두 검출되지 않았음

표 3-1-62. 딸기 제배지역의 토양 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Sampling region	NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
soil	A	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
	D	0/51	0/51	0/51	0/51	0/51	0/51
	E	0/33	0/33	0/33	0/33	0/33	0/33
	Detection number (rate %)	0/92 (0.00)	0/92 (0.00)	0/92 (0.00)	0/92 (0.00)	0/92 (0.00)	0/92 (0.00)

가) 지역별

□ 딸기경작지 토양의 미생물 오염도를 지역별로 분석한 결과, D 지역 토양의 총균수는  $8.33 \pm 0.27 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ 으로 나타났으며, A 와 E 지역의 총균수는 각각  $7.22 \pm 0.30$ ,  $7.22 \pm 0.37 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ 으로 D 지역의 오염도가 가장 높음(표 3-1-63). 지역 D를 제외한 나머지 지역 내 토양시료로부터 평균  $2.59 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$  수준의 대장균군이 검출되었으며, 지역 E에서 각각  $0.11 \pm 0.38$ ,  $0.07 \pm 0.30 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$  수준의 *E. coli*와 *B. cereus*가 확인됨

표 3-1-63. 지역별 딸기경작지 토양의 미생물 오염도

Sampling region (No. of sample)	Quantitative (Log <sub>10</sub> CFU/g) <sup>1)</sup>					
	Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold	<i>B. cereus</i>	
A (4)	average	$7.22 \pm 0.30$	$2.97 \pm 0.59$	ND <sup>2)</sup>	$4.26 \pm 0.09$	ND
	range	6.84-7.54	2.35-3.49	ND	4.20-4.40	ND
D (9)	average	$8.33 \pm 0.27$	$4.38 \pm 0.36$	ND	$5.93 \pm 0.23$	ND
	range	7.75-8.61	3.85-4.72	ND	5.56-6.39	ND
E (20)	average	$7.22 \pm 0.37$	$2.21 \pm 0.54$	$0.11 \pm 0.38$	$4.74 \pm 0.69$	$0.07 \pm 0.30$
	range	6.64-8.23	0.65-2.98	0-1.65	2.74-6.03	0-1.35
Total (33)		$7.52 \pm 0.60$	$2.90 \pm 1.07$	$0.06 \pm 0.30$	$5.00 \pm 0.81$	$0.04 \pm 0.24$

<sup>1)</sup> Data represent mean  $\pm$  standard deviations of two measurements

<sup>2)</sup> ND, not detected (detection limit:  $1.00 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ )

□ 딸기경작지 토양시료에 대한 병원성 미생물 오염도를 지역별로 분석한 결과, E지역에서 *B. cereus*가 20개 중 1개(5.0%)의 시료에서 검출되어 낮은 오염도를 보임

표 3-1-64. 지역별 딸기경작지 토양의 병원성 미생물 오염도

Sampling region (No. of sample)	Positive no. (%)		Total
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	
A (4)	ND <sup>1)</sup>	ND	ND
D (9)	ND	ND	ND
E (20)	1 (5.0)	ND	ND
Total (33)	1 (3.0)	ND	1 (3.0)

<sup>1)</sup> ND, not detected

- 딸기농장 토양 바이러스 5종 및 지표미생물 Coliphage 검출결과 각 지역에서 모두 검출되지 않았음

표 3-1-65. 딸기 제배지역의 토양 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Sampling region	NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
soil	A	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
	D	0/51	0/51	0/51	0/51	0/51	0/51
	E	0/33	0/33	0/33	0/33	0/33	0/33
	Detection number (rate %)	0/92 (0.00)	0/92 (0.00)	0/92 (0.00)	0/92 (0.00)	0/92 (0.00)	0/92 (0.00)

나) 계절별

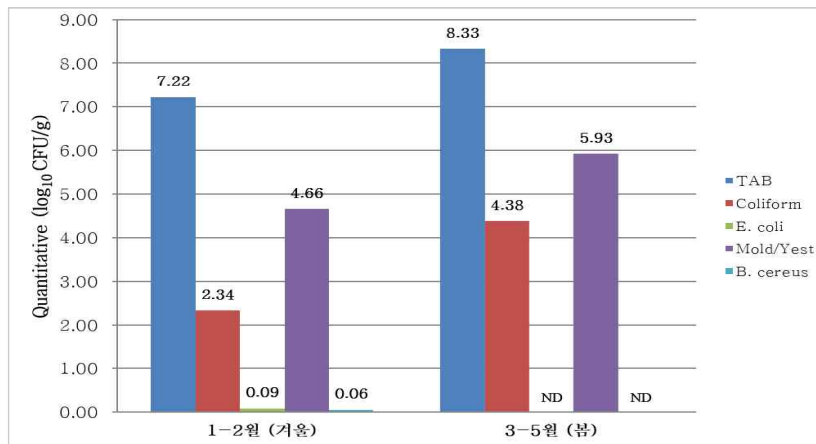


그림 3-1-5. 계절별 딸기경작지 토양의 미생물 오염도

- 딸기경작지 토양시료에 대한 병원성 미생물 오염도를 계절별로 분석한 결과, 봄 시기에 수거한 상추샘플이 겨울시기에 수거한 토양에 비해 많은 미생물 오염도를 보였으나, 겨울시기에 *E. coli*와 *B. cereus*가 검출된 것을 확인할 수 있음(그림 3-1-5)
- 토양시료에 대한 병원성 미생물 오염도 또한 계절별로 분석하여 표 3-1-66로 나타냄. 여름시기에 수거한 토양시료에서만 *B. cereus*가 검출됨

표 3-1-66. 계절별 딸기시료의 병원성 미생물 오염도

Samples (No. of sample)		Positive no. (%)		
		<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	Total
Farming soil (33)	Jan.-Feb. (Winter)	1 (4.2)	ND <sup>1)</sup>	1 (4.2)
	Mar.-May (Spring)	ND	ND	ND

<sup>1)</sup> ND, not detected

- 딸기농가 토양 계절별 바이러스 5종 및 지표미생물 Coliphage 검사 결과 모두 검출되지 않았음

표 3-1-67. 딸기농가 토양 계절별 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Samples		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
soil	Winter	0/65	0/65	0/65	0/65	0/65	0/65	0/65
	Spring	0/27	0/27	0/27	0/27	0/27	0/27	0/27
	Detection number (rate %)	0/92 (0.00)	0/92 (0.00)	0/92 (0.00)	0/92 (0.00)	0/92 (0.00)	0/92 (0.00)	0/92 (0.00)

3) 용수

- 딸기경작지 용수시료의 경우  $1.61 \pm 0.95 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/mL}$  수준의 총균수가 검출되었고 대장균과 *E. coli* 및 곰팡이/효모에 대한 오염수준은 각각  $0.12 \pm 0.27$ ,  $0.01 \pm 0.07$ ,  $0.42 \pm 0.54 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/mL}$ 으로 관찰됨(표 3-1-68). 실험결과, 딸기경작지 내 일반세균의 오염수준은 용수<딸기<장갑<토양의 순으로 확인되었으며, 딸기의 경우 다른 농산물보다 일반세균의 오염도가 낮게 검출됨

표 3-1-68. 딸기경작지 용수의 미생물 오염도

Samples (No. of sample)		Quantitative ( $\text{Log}_{10} \text{ CFU/g}$ ) <sup>1)</sup>			
		Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold
Irrigation water (21)	average	$1.61 \pm 0.95$	$0.12 \pm 0.27$	$0.01 \pm 0.07$	$0.42 \pm 0.54$
	range	0-3.94	0-1.09	0-0.30	0-1.73

<sup>1)</sup> Data represent mean  $\pm$  standard deviations of two measurements

- 딸기경작지에서 수거한 용수시료의 병원성세균에 대한 오염도를 조사한 결과, 총 21개의 용수시료에서 2종(9.5%)의 *B. cereus*균이 검출됨(표 3-1-69). 그 외 병원성미생물인 *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 및 *C. perfringens*균은 발견되지 않음
- 병원성 미생물에 대한 오염도를 비교했을 때, 딸기경작지의 오염도는 딸기를 제외한 토양과 용수사이에 연관성이 있는 것으로 생각할 수 있음

표 3-1-69. 딸기경작지 용수의 병원성 미생물 오염도

Samples (No. of sample)	Positive no. (%)		
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	Total
Irrigation water (21)	2 (9.5)	ND1)	2 (9.5)

- 2017-2018년 딸기농가 농업용수 바이러스 5종 검사결과 노로바이러스 GI 2/8 (25.0%)건, GII 2/8(25.0%)건 검출되었고, 지표미생물 Coliphage은 1/22(4.54%)건 검출되었음

표 3-1-70. 딸기농가 농업용수 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Samples		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
Irrigation water	Detection number (rate %)	2/8 (25.0)	2/8 (25.0)	0/8 (0.00)	0/8 (0.00)	0/8 (0.00)	0/8 (0.00)	1/22 (4.54)

가) 지역별

- 딸기경작지의 용수시료에 대한 미생물 오염도를 지역별로 분석한 결과, A 지역을 제외한 D 와 E 지역의 총균수는 1.51±0.27, 1.84±1.19 Log CFU/mL 수준으로 검출됐으며, 대장균 군 및 곰팡이/효모에 대한 오염수준은 각각 0.12±0.36, 0.14±0.21 Log CFU/mL, 0.47±0.57, 0.42±0.56 Log CFU/mL으로 관찰됨. E. coli는 E 지역에서 수거한 용수시료에서만 0.03±0.09 Log CFU/mL로 관찰되었으며, A 지역에서 수거한 용수시료에서는 모두 검출 한계(< 0.00 Log CFU/mL) 미만으로 확인됨

표 3-1-71. 지역별 딸기경작지 용수의 미생물 오염도

Sampling region (No. of sample)		Quantitative (Log <sub>10</sub> CFU/mL) <sup>1)</sup>			
		Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold
A (1)	average	ND <sup>2)</sup>	ND	ND	ND
	range	ND	ND	ND	ND
D (9)	average	1.51±0.27	0.12±0.36	ND	0.47±0.57
	range	0.95-1.79	0-1.090	ND	0-1.23
E (11)	average	1.84±1.19	0.14±0.21	0.03±0.09	0.42±0.56
	range	0.30-3.94	0-0.60	0-0.30	0-1.73
Total (21)		1.61±0.95	0.12±0.27	0.01±0.07	0.42±0.54

<sup>1)</sup> Data represent mean ± standard deviations of two measurements

<sup>2)</sup> ND, not detected (detection limit: 0.00 Log<sub>10</sub> CFU/mL)

- 딸기경작지 용수시료에 대한 병원성 미생물 오염도를 지역별로 분석한 결과, E지역에서만 *B. cereus*가 21개 중 2개(9.5%)의 시료에서 검출되어 낮은 오염도를 보였으며, 그 외 다른 지역에서는 병원성 미생물이 검출되지 않음(표 3-1-72)

표 3-1-72. 지역별 딸기경작지 용수의 병원성 미생물 오염도

Sampling region (No. of sample)	Positive no. (%)		Total
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	
A (1)	ND <sup>1)</sup>	ND	ND
D (9)	ND	ND	ND
E (11)	2 (18.2)	ND	ND
Total (21)	2 (9.5)	ND	2 (9.5)

<sup>1)</sup> ND, not detected

- 딸기, 토양, 용수, 장갑 등 환경샘플에 대한 실험 결과를 종합하면, 지역에 따라 딸기 및 환경샘플의 미생물 오염도는 유사했으며, *E. coli*에 대한 검출결과를 비교했을 때 딸기의 오염도는 토양 및 용수로부터 비롯되는 것으로 생각할 수 있음
- E지역에서 바이러스 5종 검사결과 노로바이러스 GI 2/8 (25.0%)건, GII 2/8(25.0%)건 검출되었고, 지표미생물 Coliphage은 1/22(4.54%)건 검출되었음

표 3-1-73. 딸기 제배지역의 농업용수 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Sampling region	NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
Irrigation water	A	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
	D	-	-	-	-	-	0/9
	E	2/7	2/7	0/7	0/7	0/7	1/12
	Detection number (rate %)	2/8 (25.0)	2/8 (25.0)	0/8 (0.00)	0/8 (0.00)	0/8 (0.00)	0/8 (0.00)

나) 계절별

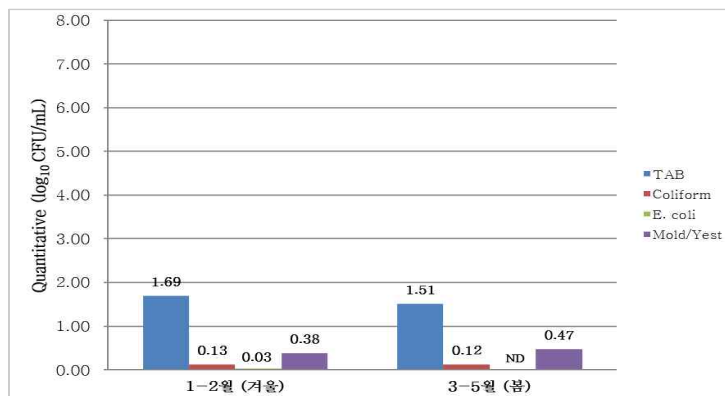


그림 3-1-6. 계절별 딸기경작지 용수의 미생물 오염도

- 딸기경작지에서 채취한 용수시료에 대한 계절별 미생물 오염수준은 위 그림 3-1-6과 같음. 겨울시기에 수거한 딸기시료와 봄 시기에 수거한 딸기시료는 비슷한 오염수준으로 관찰되었으나, 겨울시기에 수거된 용수시료에서 *E. coli*가 낮은 수준으로 검출됨
- 용수시료의 병원성 미생물 오염도를 계절별로 분석한 결과, 겨울시기에서만 *B. cereus*와 *S. aureus*가 검출된 것을 확인할 수 있음. 봄 시기에는 병원성 미생물이 검출되지 않음



표 3-1-74. 계절별 딸기경작지 용수의 병원성 미생물 오염도

Samples (No. of sample)		Positive no. (%)		
		<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	Total
Irrigation water (21)	Jan.-Feb. (Winter)	2 (16.7)	1 (8.3)	3 (25.0)
	Mar.-May (Spring)	ND <sup>1)</sup>	ND	ND

<sup>1)</sup> ND, not detected

- 딸기농가 농업용수 계절별 바이러스 5종 검사 결과 겨울에 노로바이러스 GI 2/8 (25.0%) 건, GII 2/8 (25.0%) 건 검출됐고, 지표미생물 Coliphage 검사 결과 겨울에 1/13(7.69%) 건 검출됐음

표 3-1-75. 딸기농가 농업용수 계절별 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Samples		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
Irrigation water	Winter	2/8	2/8	0/8	0/8	0/8	0/8	1/13
	Spring	-	-	-	-	-	-	0/9
	Detection number (rate %)	2/8 (25.0)	2/8 (25.0)	0/8 (0.00)	0/8 (0.00)	0/8 (0.00)	0/8 (0.00)	1/22 (0.00)

4) 장갑

- 딸기경작지 장갑시로부터 5.92±1.15 Log<sub>10</sub> CFU/g 수준의 총균수가 검출됨(표 3-1-76). 대장균군, 곰팡이/효모의 오염수준은 각각 0.65±1.05, 4.40±1.89 Log<sub>10</sub> CFU/g으로 관찰됨. *E. coli*와 *B. cereus*는 모두 검출한계(< 1.00 Log<sub>10</sub> CFU/g) 미만으로 확인되었으나, 딸기 시료에 비해 총균수가 높은 오염수준으로 확인됨

표 3-1-76. 딸기경작지 장갑의 미생물 오염도

Samples (No. of sample)		Quantitative (Log <sub>10</sub> CFU/g) <sup>1)</sup>				
		Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold	<i>B. cereus</i>
Glove (21)	average	5.92±1.15	0.65±1.05	ND <sup>2)</sup>	4.40±1.89	ND
	range	3.15-8.00	0-3.27	ND	0-5.87	ND

<sup>1)</sup> Data represent mean ± standard deviations of two measurements

<sup>2)</sup> ND, not detected (detection limit: 1.00 Log<sub>10</sub> CFU/g)

- 딸기경작지에서 수거한 장갑시료의 병원성세균에 대한 오염도를 조사한 결과, 총 21개의 장갑시료에서 1종(4.8%)의 *S. aureus*균이 검출됨(표 3-1-77)

표 3-1-77. 딸기경작지 장갑의 병원성 미생물 오염도

Samples (No. of sample)		Positive no. (%)		
		<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	Total
Glove (21)		ND <sup>1)</sup>	1 (4.8)	1 (4.8)

<sup>1)</sup> ND, not detected

- 2017-2018년 딸기농가 장갑 바이러스 5종 검사결과 A형 간염바이러스 1/21 (4.45%)건 검출되었고, 지표미생물 Coliphage은 검출되지 않았음

표 3-1-78. 딸기경작지 장갑의 병원성 미생물 오염도

Samples (No. of sample)	Positive no. (%)		
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	Total
Glove (21)	ND <sup>1)</sup>	1 (4.8)	1 (4.8)

가) 지역별

- 딸기경작지 장갑시료를 지역별로 분석한 결과, D와 E 지역에 대한 총균수는 각각 6.02±0.30, 5.89±1.35 Log<sub>10</sub> CFU/g으로 검출되었으며, 곰팡이/효모에 대한 오염수준은 각각 5.24±0.46와 4.06±2.15 Log<sub>10</sub> CFU/g으로 확인됨(표 3-1-79). 대장균군에 대한 오염수준은 E 지역에서만 0.91±1.14 Log<sub>10</sub> CFU/g의 낮은 수준으로 검출됨

표 3-1-79. 지역별 딸기경작지 장갑의 미생물 오염도

Sampling region (No. of sample)		Quantitative (Log <sub>10</sub> CFU/g) <sup>1)</sup>				
		Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold	<i>B. cereus</i>
D (6)	average	6.02±0.30	ND <sup>2)</sup>	ND	5.24±0.46	ND
	range	5.43-6.20	ND	ND	4.80-5.87	ND
E (15)	average	5.89±1.35	0.91±1.14	ND	4.06±2.15	ND
	range	3.15-8.00	0-3.27	ND	0-5.58	ND
Total (21)		5.92±1.15	0.65±1.05	ND	4.40±1.89	ND

<sup>1)</sup> Data represent mean ± standard deviations of two measurements

<sup>2)</sup> ND, not detected (detection limit: 1.00 Log<sub>10</sub> CFU/g)

- 지역별로 딸기경작지 장갑시료에 대한 병원성 미생물 오염도 분석한 결과, E지역에서만 *S. aureus*가 21개 중 1개(6.7%)의 시료에서 검출되었으며, 그 외 다른 지역에서는 병원성 미생물이 검출되지 않음(표 3-1-80)

표 3-1-80. 지역별 딸기경작지 장갑의 병원성 미생물 오염도

Sampling region (No. of sample)	Positive no. (%)		
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	Total
D (6)	ND <sup>1)</sup>	ND	ND
E (15)	ND	1 (6.7)	ND
Total (21)	ND	1 (4.8)	1 (4.8)

<sup>1)</sup> ND, not detected

- 경상도에서 바이러스 5종 검출결과 A형 간염바이러스 1/21 (4.45%)건 검출되었고, 지표미생물 Coliphage은 검출되지 않았음

표 3-1-81. 딸기 제배지역의 장갑 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Sampling region		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
Glove	A	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
	E	0/20	0/20	1/20	0/20	0/20	0/20	0/18
	Detection number (rate %)	0/21 (0.00)	0/21 (0.00)	1/21 (4.76)	0/21 (0.00)	0/21 (0.00)	0/21 (0.00)	0/19 (0.00)

나) 계절별

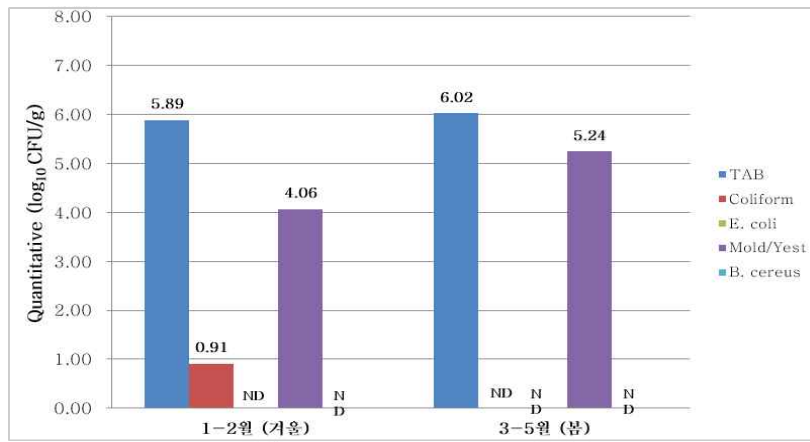


그림 3-1-7. 계절별 딸기경작지 장갑의 미생물 오염도

- 딸기경작지에서 채취한 장갑시료에 대한 미생물 오염도를 계절별로 분석한 결과, 겨울 시기에 수거한 딸기시료와 봄 시기에 수거한 딸기시료는 비슷한 오염수준으로 관찰되었으나, 겨울 시기에 수거된 장갑시료에서 대장균군이 낮은 수준으로 검출됨(그림 3-1-7)
- 수거한 장갑시료의 병원성 미생물 오염도를 계절별로 분석하여 표 3-1-82로 나타냄. 겨울 시기에 수거한 장갑시료에서만 *S. aureus*가 검출된 것을 확인함

표 3-1-82. 계절별 딸기경작지 장갑의 병원성 미생물 오염도

Samples (No. of sample)		Positive no. (%)		
		<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	Total
Glove (21)	Jan.-Feb. (Winter)	ND <sup>1)</sup>	1 (6.7)	1 (6.7)
	Mar.-May (Spring)	ND	ND	ND

<sup>1)</sup> ND, not detected

- 딸기농가 장갑 계절별 바이러스 5종 검사 결과 겨울에만 A형 간염바이러스 1/21 (4.67%) 건 검출됐고, 지표미생물 Coliphage 모두 검출되지 않았음

표 3-1-83. 딸기농가 장갑 계절별 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Samples		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
Glove	Winter	0/21	0/21	1/21	0/21	0/21	0/21	0/19
	Detection number (rate %)	0/21 (0.00)	0/21 (0.00)	1/21 (4.76)	0/21 (0.00)	0/21 (0.00)	0/21 (0.00)	1/19 (0.00)

(2) 근채류

(가) 무

1) 농작물

가) 유통

- 국내 유통단계 무 시료의 일반미생물의 오염도를 조사한 결과, 무의 총균수 오염수준은  $6.44 \pm 0.62 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ 이었으며, 대장균군과 곰팡이/효모에 대한 오염수준은 각각  $4.26 \pm 1.49$ ,  $3.84 \pm 0.92 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ 으로 관찰됨(표 3-1-84). *E. coli*와 *B. cereus*의 오염정도는 각각  $0.03 \pm 0.10$ ,  $0.54 \pm 0.62 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ 의 낮은 수준으로 나타났지만, 유통단계까지 남아있는 것으로 확인됨

표 3-1-84. 유통단계 무의 미생물 오염도

Samples (No. of sample)		Quantitative ( $\text{Log}_{10} \text{ CFU/g}$ ) <sup>1)</sup>				
		Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold	<i>B. cereus</i>
Radish (12)	average	$6.44 \pm 0.62$	$4.26 \pm 1.49$	$0.03 \pm 0.10$	$3.84 \pm 0.92$	$0.54 \pm 0.62$
	range	5.24-7.34	0.96-5.82	0-0.35	1.87-4.62	0-1.65

<sup>1)</sup> Data represent mean  $\pm$  standard deviations of two measurements

- 유통단계 무에 대한 병원성 세균 오염도를 조사한 결과, 총 12개의 시료에서 *S. aureus* 및 *B. cereus*균이 각각 6종(50.0%), 1종(8.3%)이 검출됨(표 3-1-85). 그 외 병원성미생물인 *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 및 *C. perfringens*균은 발견되지 않음(데이터 표시되지 않음)

표 3-1-85. 유통단계 무의 병원성 미생물 오염도

Samples (No. of sample)	Positive no. (%)		
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	Total
Radish (12)	6 (50.0)	1 (8.3)	7 (58.3)

<sup>1)</sup> ND, not detected

- 2018년 유통단계에 있는 무의 바이러스 5종 검사 결과, 아스트로바이러스 2/26 (7.69%)건, 아데노바이러스 2/26 (7.69%)건 검출됨
- 지표미생물 Coliphage모두 검출 되지 않음

표 3-1-86. 유통단계 무 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Samples		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
Radish	Detection number (rate %)	0/26 (0.00)	0/26 (0.00)	0/26 (0.00)	2/26 (7.69)	2/26 (7.69)	0/26 (0.00)	0/13 (0.00)

(나) 당근

1) 농작물

가) 유통

- 국내의 유통단계 당근시료를 대상으로 한 미생물학적 모니터링 실험결과  $6.40 \pm 0.59 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$  수준의 총균수가 검출됨(표 3-1-87). 유통단계의 당근에서 평균  $3.80 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$  이상의 대장균군과 곰팡이/효모가 검출되었으나 유통단계의 무와 유사하게 총균수( $6.40 \pm 0.59 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ )보다 낮은 오염도를 나타냄. *E. coli*와 *B. cereus*는 각각  $0.19 \pm 0.69$ ,  $1.46 \pm 1.22 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ 의 낮은 오염수준으로 관찰됨

표 3-1-87. 유통단계 당근의 미생물 오염도

Samples (No. of sample)		Quantitative ( $\text{Log}_{10} \text{ CFU/g}$ ) <sup>1)</sup>				
		Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold	<i>B. cereus</i>
Carrot (13)	average	$6.40 \pm 0.59$	$4.08 \pm 1.21$	$0.19 \pm 0.69$	$3.52 \pm 0.57$	$1.46 \pm 1.22$
	range	5.30-7.66	2.31-6.03	0-2.50	2.02-4.18	0-3.60

<sup>1)</sup> Data represent mean  $\pm$  standard deviations of two measurements

- 유통단계 당근에 대한 병원성 세균 오염도를 조사한 결과, 총 13개의 시료에서 *B. cereus* 균이 9종(69.2%)이 검출됨(표 3-1-88). 그 외 병원성미생물인 *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 및 *C. perfringens*은 발견되지 않음

표 3-1-88. 유통단계 당근의 병원성 미생물 오염도

Samples (No. of sample)	Positive no. (%)		
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	Total
Carrot (13)	9 (69.2)	ND <sup>1)</sup>	9 (69.2)

<sup>1)</sup> ND, not detected

- 2018년 유통단계 당근에 대한 바이러스 5종 검사 결과, 노로바이러스 GII 1/26 (3.84%)건만 검출됐음

표 3-1-89. 유통단계 당근 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Samples		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
Carrot	Detection number (rate %)	0/26 (0.00)	1/26 (3.84)	0/26 (0.00)	0/26 (0.00)	0/26 (0.00)	0/26 (0.00)	0/13 (0.00)

(다) 감자

1) 농작물

가) 유통

- 국내 유통단계 감자시료의 경우 6.25±0.70 Log<sub>10</sub> CFU/g의 총균수가 검출되었고, 대장균군과 곰팡이/효모에 대한 오염수준은 각각 3.75±1.46, 3.63±0.56 Log<sub>10</sub> CFU/g으로 관찰됨(표 3-1-90). *E. coli*의 오염수준은 검출한계(< 0.70 Log<sub>10</sub> CFU/g) 미만으로 확인되었으며 *B. cereus*의 오염정도는 각각 1.14±1.14 Log<sub>10</sub> CFU/g의 낮은 수준으로 관찰됨

표 3-1-90. 유통단계 감자의 미생물 오염도

Samples (No. of sample)		Quantitative (Log <sub>10</sub> CFU/g) <sup>1)</sup>				
		Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold	<i>B. cereus</i>
Potato (13)	average	6.25±0.70	3.75±1.46	ND <sup>2)</sup>	3.63±0.56	1.14±1.14
	range	5.41-7.57	1.52-6.04	ND	2.53-4.36	0-3.30

<sup>1)</sup> Data represent mean ± standard deviations of two measurements

<sup>2)</sup> ND, not detected (detection limit: 0.70 Log<sub>10</sub> CFU/g)

- 유통단계 감자에 대한 병원성 세균 오염도를 조사한 결과를 표 3-1-91에 나타냄. 총 13개의 시료에서 *B. cereus*균이 8종(61.5%)이 검출되었으며, 그 외 병원성미생물인 *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 및 *C. perfringens*균은 발견되지 않음

표 3-1-91. 유통단계 감자의 병원성 미생물 오염도

Samples (No. of sample)		Positive no. (%)		
		<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	Total
Potato (13)		8 (61.5)	ND <sup>1)</sup>	8 (61.5)

<sup>1)</sup> ND, not detected

- 2018년 유통단계 감자의 바이러스 5종 검사결과 노로바이러스 GII 1/26 (3.84%)건, 아데노바이러스 1/26 (3.84%)건 검출됐음
- 지표미생물 Coliphage 모두 검출 되지 않음

표 3-1-92. 유통단계 감자 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Samples		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
Potato	Detection number (rate %)	0/26 (0.00)	1/26 (3.84)	0/26 (0.00)	0/26 (0.00)	1/26 (3.84)	0/26 (0.00)	0/13 (0.00)

(라) 열무

1) 농작물

가) 농가

- 국내 재배되고 있는 열무를 수거 분석한 결과 일반미생물, 대장균군, 효모/곰팡이는 각각  $7.12 \pm 0.52$ ,  $4.30 \pm 1.02$ ,  $3.63 \pm 0.56$  Log<sub>10</sub> CFU/g이 검출되었으며 대장균은 검출한계(< 0.70 Log<sub>10</sub> CFU/g) 미만으로 검출됨(표 3-1-93)

표 3-1-93. 열무경작지의 열무 미생물 오염도

Samples (No. of sample)		Quantitative (Log <sub>10</sub> CFU/g) <sup>1)</sup>				
		Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold	<i>B. cereus</i>
Young radish(17)	average	7.12±0.52	4.30±1.02	ND <sup>2)</sup>	3.63±0.56	0.19±0.30
	range	6.33-7.41	1.89-5.34	ND	3.19-5.35	0-3.30

<sup>1)</sup> Data represent mean ± standard deviations of two measurements

<sup>2)</sup> ND, not detected (detection limit: 0.70 Log<sub>10</sub> CFU/g)

- 열무를 잎, 줄기, 뿌리로 나누어 분석한 결과, 뿌리가 줄기와 잎과 비교하여 일반세균수, 대장균군, 효모/곰팡이의 검출 값이 높았음. 열무에서 대장균은 검출되지 않았으며 *B. cereus*의 경우 뿌리 17건 중 1건에서 3.78 Log<sub>10</sub> CFU/g이 검출되고 줄기와 잎에서는 검출되지 않음

표 3-1-94. 열무경작지의 열무 미생물 오염도

Samples (No. of sample)		Quantitative (Log <sub>10</sub> CFU/g) <sup>1)</sup>				
		Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold	<i>B. cereus</i>
Root (n=17)	average	7.61±0.46	4.86±0.91	ND <sup>2)</sup>	4.06±0.54	0.12±0.68
	range	6.01-8.12	2.17-5.87	-	2.65-4.93	0-3.78
Stem (n=17)	average	6.60±0.65	3.63±0.87	ND	3.73±0.90	ND
	range	5.01-7.35	1.93-5.39	-	2.48-5.85	-
Leaf (n=17)	average	5.89±0.46	2.88±1.03	ND	3.85±0.74	ND
	range	5.02-6.77	0-4.02	-	2.65-5.07	-

<sup>1)</sup> Data represent mean ± standard deviations of two measurements

<sup>2)</sup> ND, not detected (detection limit: 0.70 Log<sub>10</sub> CFU/g)

- 농가에서 재배되는 총 17개의 열무의 병원성미생물 오염도를 조사한 결과, 표 3-1-95와 같이 *B. cereus*균이 1건(5.9%)이 검출되었으며, 그 외 병원성미생물인 *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 및 *C. perfringens*균은 검출되지 않음

표 3-1-95. 열무경작지의 열무 병원성 미생물 오염도

Samples (No. of sample)	Positive no. (%)		
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	Total
Young radish(n=17)	1(5.9%)	ND <sup>1)</sup>	1(5.9%)

<sup>1)</sup> ND, not detected

- 열무를 뿌리, 줄기, 잎으로 나누어 병원성미생물을 분석한 결과, 열무에서 검출된 1건 (5.9%)의 *B. cereus*의 경우 뿌리에서 검출되었음(표 3-1-96)

표 3-1-96. 열무경작지의 열무 병원성 미생물 오염도

Samples (No. of sample)	Positive no. (%)		
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	Total
Root (n=17)	1(5.9%)	ND <sup>1)</sup>	1(5.9%)
Stem (n=17)	ND	ND	ND
Leaf (n=17)	ND	ND	ND

<sup>1)</sup> ND, not detected

- 2018년 열무농가에서 열무 바이러스 5종 검사결과 열무 잎 노로바이러스 GII 2/34 (5.88%)건, A형 간염바이러스 1/34 (2.94%)건, 아스트로바이러스 1/34 (2.94%)건, 아데노바이러스 2/34(5.88%)건; 열무 줄기 노로바이러스 GII 3/34 (8.82%)건, 아스트로바이러스 1/34 (2.94%)건; 열무 뿌리 노로바이러스 GII 4/34 (11.7%)건, A형 간염바이러스 1/34 (2.94%) 건 검출되었음
- 지표미생물 Coliphage은 검출되지 않았음

표 3-1-97. 열무농가 열무 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Samples		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
Young radish	Leaf	0/34	2/34	1/34	1/34	2/34	0/34	0/17
	Stem	0/34	3/34	0/34	1/34	0/34	0/34	0/17
	Root	0/34	4/34	1/34	0/34	0/34	0/34	0/17
	Detection number (rate %)	0/102 (0.00)	9/102 (8.82)	2/102 (1.96)	2/102 (1.96)	2/102 (1.96)	0/102 (0.00)	0/51 (0.00)

① 지역별

- 열무의 경우 A지역에서만 채취했음

② 계절별

- 열무 농작지 열무의 계절별 미생물 분석 결과는 여름과 가을에 분석한 열무에서 일반미생물과 대장균군이 상대적으로 높은 경향을 보였음. 대장균의 경우 모든 열무에서 검출되지 않음



표 3-1-98. 계절별 열무경작지의 열무 미생물 오염도

Samples (No. of sample)		Quantitative (Log <sub>10</sub> CFU/g) <sup>1)</sup>				
		Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold	<i>B. cereus</i>
Spring (n=3)	average	6.15±0.37	2.56±0.62	ND <sup>2)</sup>	3.33±0.18	0.19±0.80
	range	5.72-6.38	1.89-3.12	-	3.19-3.53	0-3.30
Summer (n=8)	average	7.24±0.26	4.53±0.77	ND	4.06±0.65	ND
	range	6.72-7.49	3.24-5.34	-	3.30-5.35	-
Autumn (n=6)	average	7.45±0.08	4.87±0.16	ND	4.22±0.50	ND
	range	7.35-7.56	4.64-5.05	-	3.52-4.82	-

<sup>1)</sup> Data represent mean ± standard deviations of two measurements

<sup>2)</sup> ND, not detected (detection limit: 0.70 Log<sub>10</sub> CFU/g)

- 열무의 병원성미생물 검출결과를 계절별로 분류한 결과, 여름과 가을에는 병원성미생물이 검출되지 않았으며 봄에 3건 중 *B. cereus*균이 1건(33.33%)이 검출됨

표 3-1-99. 계절별 열무경작지의 열무 병원성 미생물 오염도

Samples (No. of sample)	Positive no. (%)		
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	Total
Spring (n=3)	1(33.33%)	ND <sup>1)</sup>	1(33.33%)
Summer (n=8)	ND	ND	ND
Autumn (n=6)	ND	ND	ND

<sup>1)</sup> ND, not detected

- 열무농가에서 열무 계절별 바이러스 5종 검사결과 여름에 노로바이러스 GII 2/48 (4.16%) 건, 아스트로바이러스 1/48 (2.08%)건, 아데노바이러스 1/48(2.08%)건; 가을에 노로바이러스 GII 7/36 (19.4%)건, A형 간염바이러스 2/36 (5.55%)건, 아스트로바이러스 1/36 (2.77%)건, 아데노바이러스 1/36 (2.77%)건 검출되었음
- 지표미생물 Coliphage은 검출되지 않았음

표 3-1-100. 열무농가 열무 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Samples		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
Young radish	Spring	0/18	0/18	0/18	0/18	0/18	0/18	0/9
	Summer	0/48	2/48	0/48	1/48	1/48	0/48	0/24
	Autumn	0/36	7/36	2/36	1/36	1/36	0/36	0/18
	Detection number (rate %)	0/102 (0.00)	9/102 (0.00)	2/102 (0.00)	2/102 (0.00)	2/102 (0.00)	0/102 (0.00)	0/51 (0.00)

나) 유통

- 유통되는 열무를 분석한 결과, 일반미생물과 대장균군이 뿌리에서 각각 7.74±0.64, 4.29±1.01 Log<sub>10</sub> CFU/g으로 줄기와 잎에 비해 상대적으로 높은 값을 보였음

표 3-1-101. 유통단계 열무의 미생물 정량평가 오염도

Samples (No. of sample)		Quantitative (Log <sub>10</sub> CFU/g) <sup>1)</sup>				
		Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold	<i>B. cereus</i>
Root (n=11)	average	7.74±0.64	4.29±1.01	ND <sup>2)</sup>	4.99±0.79	0.23±0.74
	range	6.35-8.35	2.21-5.62	-	3.26-5.85	0-2.70
Stem (n=11)	average	6.65±0.84	3.33±1.34	ND	4.58±0.80	ND
	range	4.91-8.15	0-4.84	-	3.25-5.61	-
Leaf (n=11)	average	6.31±0.71	3.06±1.23	ND	4.66±0.84	ND
	range	4.99-7.46	0-4.02	-	2.65-5.07	-

<sup>1)</sup> Data represent mean ± standard deviations of two measurements

<sup>2)</sup> ND, not detected (detection limit: 0.70 Log<sub>10</sub> CFU/g)

- 유통단계의 열무의 병원성미생물 오염도를 조사한 결과, 표 3-1-102와 같이 *B. cereus*균이 1건(9.1%)이 검출되었으며, 그 외 병원성미생물인 *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 및 *C. perfringens*은 검출되지 않음

표 3-1-102. 유통단계 열무의 병원성 미생물 오염도

Samples (No. of sample)	Positive no. (%)		
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	Total
Root (n=11)	1(9,1%)	ND <sup>1)</sup>	1(9,1%)
Stem (n=11)	ND	ND	ND
Leaf (n=11)	ND	ND	ND

<sup>1)</sup> ND, not detected

- 2018년 마트 열무 바이러스 5종 및 노로바이러스 GII 2/22 (9.09%)건, 아데노바이러스 1/22 (4.54%)건; 줄기 노로바이러스 GII 4/22 (18.1%)건, 아스트러바이러스 1/66 (1.51%)건, 아데노바이러스 2/22 (9.09%)건; 뿌리 노로바이러스 GII 3/22 (13.6%)건, 아데노바이러스 2/22 (9.09%)건 검출되었음
- 지표미생물 Coliphage 검사결과 모두 검출 되지 않았음

표 3-1-103. 마트 열무 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Samples		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
Young radish	leaf	0/22	2/22	0/22	0/22	1/22	0/22	0/11
	stem	0/22	4/22	0/22	1/22	2/22	0/22	0/11
	root	0/22	3/22	0/22	0/22	2/22	0/22	0/11
	Detection number (rate %)	0/66 (0.00)	9/66 (13.6)	0/66 (0.00)	1/66 (1.51)	5/66 (7.57)	0/66 (0.00)	0/33 (0.00)

2) 토양

- 표 3-1-104에 따르면 열무경작지 토양의 일반미생물 오염도를 조사한 결과, 7.26±0.25

Log<sub>10</sub> CFU/g이었으며, 대장균군, 효모/곰팡이는 3,45±0.72, 4.40±0.42 Log<sub>10</sub> CFU/g이었음. 열무경작지의 토양에서 대장균은 검출한계(< 0.70 Log<sub>10</sub> CFU/g) 미만으로 검출됨

표 3-1-104. 열무경작지 토양의 미생물 오염도

Samples (No. of sample)		Quantitative (Log <sub>10</sub> CFU/g) <sup>1)</sup>				
		Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold	<i>B. cereus</i>
Soil (n=17)	average	7.26±0.25	3.45±0.72	ND <sup>2)</sup>	4.40±0.42	0.38±1.15
	range	6.75-7.78	2.09-4.72	-	3.72-5.13	0-4.30

<sup>1)</sup> Data represent mean ± standard deviations of two measurements

<sup>2)</sup> ND, not detected (detection limit: 0.70 Log<sub>10</sub> CFU/g)

- 열무경작지 토양의 병원성 미생물 오염도를 조사한 결과, 총 17개의 토양에서 2건(11.8%)의 *B. cereus*균이 검출됨(표 3-1-105). 그 외의 *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 및 *C. perfringens*균은 검출되지 않음

표 3-1-105. 열무경작지 토양의 병원성 미생물 오염도

Samples (No. of sample)	Positive no. (%)		
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	Total
Farming soil (17)	2(11.8%)	ND <sup>1)</sup>	2(11.8%)

<sup>1)</sup> ND, not detected

- 2018년 열무농가에서 토양 바이러스 5종 검사결과 노로바이러스 GII 2/31 (6.45%)건, A형 간염바이러스 2/31 (6.45%)건 검출되었음
- 지표미생물 Coliphage은 검출되지 않았음

표 3-1-106. 열무농가 토양 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Samples		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
soil	Detection number (rate %)	0/31 (0.00)	2/31 (6.45)	2/31 (6.45)	0/31 (1.96)	0/31 (1.96)	0/31 (0.00)	0/17 (0.00)

가) 지역별

- 열무의 경우 A지역에서만 채취했음

나) 계절별

- 열무경작지 토양을 계절별로 나누어 분석한 결과, 계절별 일반미생물 오염도는 비슷한 수준으로 관찰되었음. *B. cereus*의 경우 봄, 여름에는 각각 1.43±2.38, 0.28±0.79 Log<sub>10</sub> CFU/g 으로 검출되었으나 가을에는 검출한계(< 0.70 Log<sub>10</sub> CFU/g)미만으로 나타남

표 3-1-107. 계절별 열무경작지의 토양 미생물 오염도

Samples (No. of sample)		Quantitative (Log <sub>10</sub> CFU/g) <sup>1)</sup>				
		Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold	<i>B. cereus</i>
Spring (n=3)	average	7.03±0.24	3.12±0.45	ND <sup>2)</sup>	4.06±0.21	1.43±2.48
	range	6.75-7.16	2.61-3.44	-	3.81-4.18	0-4.30
Summer (n=8)	average	7.15±0.13	3.14±0.69	ND	4.06±0.65	0.28±0.79
	range	6.92-7.34	2.09-4.51	-	3.72-5.13	0-2.24
Autumn (n=6)	average	7.51±0.13	4.02±0.55	ND	4.22±0.50	ND
	range	7.40-7.78	3.33-4.72	-	4.25-4.85	-

<sup>1)</sup> Data represent mean ± standard deviations of two measurements

<sup>2)</sup> ND, not detected (detection limit: 0.70 Log<sub>10</sub> CFU/g)

- 열무경작지 토양의 병원성 미생물을 분석한 결과, *B. cereus*가 봄에는 3건 중 1건, 여름에는 8건 중 1건 검출되었고 가을에는 검출되지 않음(표 3-1-108). 그 외의 *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 및 *C. perfringens*은 검출되지 않음

표 3-1-108. 계절별 열무경작지 토양의 병원성 미생물 오염도

Samples (No. of sample)	Positive no. (%)		
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	Total
Spring (n=3)	1 (33.33)	ND <sup>1)</sup>	1 (33.33)
Summer (n=8)	1 (12.5)	ND	1 (12.5)
Autumn (n=6)	ND	ND	ND

<sup>1)</sup> ND, not detected

- 열무농가에서 토양 계절별 바이러스 5종 검사결과 가을에 노로바이러스 GII 2/12 (16.6%) 건, A형 간염바이러스 2/12 (16.6%)건 검출되었음
- 지표미생물 Coliphage은 검출되지 않았음

표 3-1-109. 열무농가 토양 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Samples		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
soil	Spring	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	Summer	0/16	0/16	0/16	0/16	0/16	0/16	0/10
	Autumn	0/12	2/12	2/12	0/12	0/12	0/12	0/4
	Detection number (rate %)	0/31 (0.00)	2/31 (6.45)	2/31 (6.45)	0/31 (0.00)	0/31 (0.00)	0/31 (0.00)	0/17 (0.00)

3) 용수

- 열무경작지 용수시료의 경우 일반미생물, 대장균군, 효모/곰팡이에 대한 오염수준은 각각 1.81±1.12, 0.17±0.30, 0.09±0.16 Log<sub>10</sub> CFU/mL 으로 확인되었으며 대장균은 검출되지 않음(표 3-1-110)

표 3-1-110. 열무경작지 용수의 미생물 오염도

Samples (No. of sample)		Quantitative (Log <sub>10</sub> CFU/g) <sup>1)</sup>			
		Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold
Irrigation water (8)	average	1.81±1.12	0.17±0.30	0.00	0.09±0.16
	range	0.18-3.47	0.00-0.85	-	0.00-0.40

<sup>1)</sup> Data represent mean ± standard deviations of two measurements

□ 열무경작지의 용수시료를 분석한 결과, 병원성 미생물이 검출되지 않음(표 3-1-111)

표 3-1-111. 열무경작지 용수의 병원성 미생물 오염도

Samples (No. of sample)	Positive no. (%)		
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	Total
Irrigation water (8)	ND <sup>1)</sup>	ND	ND

<sup>1)</sup> ND, not detected

□ 2018년 열무농가에서 농업용수 바이러스 5종 검사결과 A형 간염바이러스 1/5 (20.0%)건, 아데노바이러스 1/5(20.0%)건 검출되었고 지표미생물 Coliphage은 검출되지 않았음

표 3-1-112. 열무농가 농업용수 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Samples		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
Irrigation water	Detection number (rate %)	0/5 (0.00)	0/5 (0.00)	1/5 (20.0)	0/5 (0.00)	1/5 (20.0)	0/5 (0.00)	0/8 (0.00)

가) 지역별

□ 열무의 경우 A지역에서만 채취했음

나) 계절별

□ 여름과 가을에 채취한 용수가 봄에 비해 일반미생물과 대장균군의 검출수준이 높았고 효모/곰팡이의 경우 가을에만 0.17±0.21 Log<sub>10</sub> CFU/mL이 검출되었음

표 3-1-113. 열무경작지 용수의 미생물 오염도

Samples (No. of sample)		Quantitative (Log <sub>10</sub> CFU/g) <sup>1)</sup>			
		Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold
Spring (n=1)	average	0.81	0.00	0.00	0.00
	range	0.18-3.47	-	-	-
Summer (n=3)	average	1.19±0.96	0.28±0.49	0.00	0.00
	range	0.18-2.08	0.00-0.49	-	-
Autumn (n=4)	average	1.81±1.12	0.17±0.30	0.00	0.17±0.21
	range	1.23-3.47	0.00-0.30	-	0.00-0.40

<sup>1)</sup> Data represent mean ± standard deviations of two measurements

- 열무경작지에서 채취한 모든 용수시료의 경우 *B. cereus*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 및 *C. perfringens*균이 검출되지 않음(표 3-1-114)

표 3-1-114. 열무경작지 용수의 병원성 미생물 오염도

Samples (No. of sample)	Positive no. (%)		
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	Total
Spring (n=1)	ND <sup>1)</sup>	ND	ND
Summer (n=3)	ND	ND	ND
Autumn (n=4)	ND	ND	ND

<sup>1)</sup> ND, not detected

- 열무농가에서 농업용수 계절별 바이러스 5종 검사결과 가을에 A형 간염바이러스 1/4 (25.0%)건, 아데노바이러스 1/4 (25.0%)건 검출되었음
- 지표미생물 Coliphage은 검출되지 않았음

표 3-1-115. 열무농가 농업용수 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Samples		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
Irrigation water	Spring	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
	Summer	-	-	-	-	-	-	0/3
	Autumn	0/4	0/4	1/4	0/4	1/4	0/4	0/4
	Detection number (rate %)	0/5 (0.00)	0/5 (0.00)	1/5 (0.00)	0/5 (0.00)	1/5 (0.00)	0/5 (0.00)	0/8 (0.00)

(3) 과채류

(가) 오이

1) 농작물

가) 농가

- 국내의 오이경작지에서 수거한 오이시료의 총균수, 대장균군, *E. coli*, 곰팡이/효모 및 *B. cereus*에 대한 오염수준은 각각  $4.36 \pm 1.38$ ,  $1.07 \pm 1.06$ ,  $0.02 \pm 0.07$ ,  $3.52 \pm 1.43$ ,  $0.02 \pm 0.07$  Log<sub>10</sub> CFU/each 으로 관찰됨(표 3-1-116)

표 3-1-116. 오이시료의 미생물 오염도

Samples (No. of sample)		Quantitative (Log <sub>10</sub> CFU/each) <sup>1)</sup>				
		Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold	<i>B. cereus</i>
Cucumber (18)	average	$4.36 \pm 1.38$	$1.07 \pm 1.06$	$0.02 \pm 0.07$	$3.52 \pm 1.43$	$0.02 \pm 0.07$
	range	1.54-5.89	0-3.87	0-0.30	1.27-5.06	0-0.30

<sup>1)</sup> Data represent mean  $\pm$  standard deviations of two measurements

- 오이경작지에서 수거한 오이의 병원성 미생물 오염도를 조사함. 총 6종(*B. cereus*, *L.*

*monocytogenes*, *Salmonella* sp., *S. aureus*, *E. coli* O157 및 *C. perfringens*)의 병원성 세균을 조사한 결과, 전체 18개 중 1종(5.6%)의 낮은 수준으로 *B. cereus*가 검출됨(표 3-1-117)

표 3-1-117. 오이시료의 병원성 미생물 오염도

Samples (No. of sample)	Positive no. (%)		
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	Total
Cucumber (18)	1 (5.6)	ND <sup>1)</sup>	1 (5.6)

<sup>1)</sup> ND, not detected

- 2016-2018년 오이농가에서 바이러스 5종 검사결과 노로바이러스 GI 2/109 (1.83%)건, GII 2/109 (1.83%) 검출되었음
- 지표미생물 Coliphage은 1/30 (3.33%)검출되었음

표 3-1-118. 오이농가 오이 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Samples		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
Cucumber	Detection number (rate %)	2/109 (1.83)	2/109 (1.83)	0/109 (0.00)	0/109 (0.00)	0/109 (0.00)	0/109 (0.00)	1/30 (3.33)

① 지역별

- 오이시료의 일반미생물 오염도를 지역별로 조사한 결과, E를 제외한 A-D 지역의 총균수 오염수준은 각각 5.02±0.92, 3.79±0.90, 4.07±1.90, 4.95±0.96 Log<sub>10</sub> CFU/each 이었으며, 대장균군에 대한 오염수준은 각각 1.36±0.84, 1.78±1.82, 0.80±0.97, 0.81±0.82 Log<sub>10</sub> CFU/each 이었으며, 곰팡이/효모에 대한 오염수준은 각각 4.58±0.31, 2.22±0.09, 3.13±1.68, 4.55±0.49 Log<sub>10</sub> CFU/each으로 관찰됨 (표 3-1-119). A 지역에서 수거한 오이시료가 전반적으로 높은 오염수준을 보여주었으나, C 지역에서 수거한 오이시료에서만 *E. coli*가 0.05±0.12 Log<sub>10</sub> CFU/each 수준으로 낮게 검출됨. *B. cereus*의 경우 A 지역에서 약 0.06±0.13 Log<sub>10</sub> CFU/each 미만으로 검출됨

표 3-1-119. 지역별 오이시료의 미생물 오염도

Sampling region (No. of sample)		Quantitative (Log <sub>10</sub> CFU/each) <sup>1)</sup>				
		Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold	<i>B. cereus</i>
A (5)	average	5.02±0.92	1.36±0.84	ND <sup>2)</sup>	4.58±0.31	0.06±0.13
	range	3.43-5.62	0.50-2.48	ND	4.19-5.06	0-0.30
B (3)	average	3.79±0.90	1.78±1.82	ND	2.22±0.09	ND
	range	2.98-4.76	0.60-3.87	ND	2.12-2.29	ND
C (6)	average	4.07±1.90	0.80±0.97	0.05±0.12	3.13±1.68	ND
	range	1.54-5.84	0-2.10	0-0.30	1.27-4.78	ND
D (3)	average	4.95±0.96	0.81±0.82	ND	4.55±0.49	ND
	range	3.96-5.89	0-1.64	ND	4.03-5.01	ND
E (1)	average	2.68	ND	ND	1.27	ND
	range	2.68	ND	ND	1.27	ND
Total (18)		4.36±1.38	1.07±1.06	0.02±0.07	3.52±1.43	0.02±0.07

<sup>1)</sup> Data represent mean ± standard deviations of two measurements

<sup>2)</sup> ND, not detected (detection limit: 0.30 Log<sub>10</sub> CFU/each)

- 오이시료에 대한 병원성 미생물 오염도를 지역별로 분석한 결과, A지역에서만 *B. cereus*가 5개 중 1개(20.0%)의 시료에서 검출되었으며, 그 외 다른 지역에서는 병원성 미생물이 검출되지 않음(표 3-1-120)

표 3-1-120. 지역별 오이시료의 병원성 미생물 오염도

Sampling region (No. of sample)	Positive no. (%)		Total
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	
A (5)	1 (20.0)	ND <sup>1)</sup>	ND
B (3)	ND	ND	ND
C (6)	ND	ND	ND
D (3)	ND	ND	ND
E (1)	ND	ND	ND
Total (18)	1 (5.6)	ND	1 (5.6)

<sup>1)</sup> ND, not detected

- A지역에서 오이 바이러스 5종 검사 결과 노로바이러스 GI 2/57 (3.50%)건, 노로바이러스 GII 1/57(1.75%)건 검출되었고, 지표미생물 Coliphage은 1/11(9.09%)건 검출되었음
- E지역에서 노로바이러스 GII 1/2(50.0%)건 검출됐음

표 3-1-121. 오이 제배지역의 오이 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Sampling region		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
Cucumber	A	2/57	1/57	0/57	0/57	0/57	0/57	1/11
	B	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/7
	C	0/14	0/14	0/14	0/14	0/14	0/14	0/8
	D	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/3
	E	0/2	1/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/1
	Detection number (rate %)	2/109 (1.83)	2/109 (1.83)	0/109 (0.00)	0/109 (0.00)	0/109 (0.00)	0/109 (0.00)	0/109 (0.00)



② 계절별

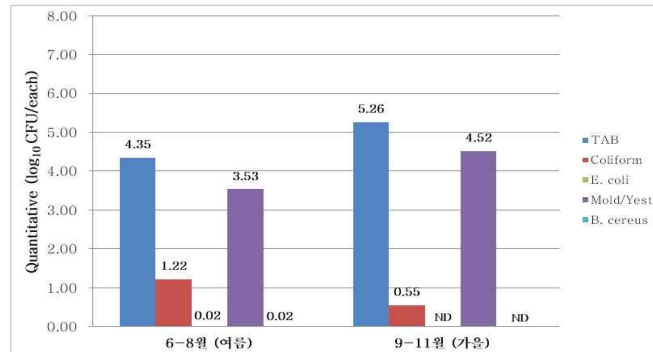


그림 3-1-8. 계절별 오이시료의 미생물 오염도

- 오이시료에 대한 미생물 오염도를 계절별로 분석한 결과, 6-8월 사이인 여름시기에 수거한 오이시료와 9-11월 사이인 가을시기에 수거한 오이시료는 비슷한 미생물 오염수준으로 관찰되었으나, 여름시기에 수거된 오이시료에서 낮은 수준으로 *E. coli*가 검출됨(그림 3-1-8)
- 오이시료에 대한 병원성 미생물 오염도를 계절별로 분석하여 표 3-1-122로 나타냄. 여름시기에 수거한 오이시료에서만 *B. cereus*가 검출됨

표 3-1-122. 계절별 오이시료의 병원성 미생물 오염도

Samples (No. of sample)		Positive no. (%)		
		<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	Total
Cucumber (18)	Mar.-May (Spring)	ND <sup>1)</sup>	ND	ND
	June-Aug. (Summer)	1 (6.7)	ND	1 (6.7)
	Sep.-Nov. (Autumn)	ND	ND	ND

<sup>1)</sup> ND, not detected

- 오이농가에서 오이 계절별 바이러스 5종 검사결과 봄에 노로바이러스 GII 1/2 (50.0%)건, 여름에 지표미생물 Coliphage 1/19 (5.26%)검출되었고 가을에 노로바이러스 GI 2/52 (3.84%)건, GII 1/52 (1.75%)건 검출됐고, 지표미생물 Coliphage 검출되지 않았음

표 3-1-123. 오이농가 오이 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Samples		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
Cucumber	Spring	0/2	1/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/1
	Summer	0/55	0/55	0/55	0/55	0/55	0/55	1/19
	Autumn	2/52	1/52	0/52	0/52	0/52	0/52	0/10
	Detection number (rate %)	2/109 (1.83)	2/109 (1.83)	0/109 (0.00)	0/109 (0.00)	0/109 (0.00)	0/109 (0.00)	1/30 (3.33)

2) 토양

- 오이경작지에서 수거한 토양으로부터 6.89±0.40 Log<sub>10</sub> CFU/each수준의 총균수가 검출되었으며, 대장균군과, *E. coli*, 곰팡이/효모, *B. cereus*에 대한 오염수준은 각각 6.89±0.40와 2.64±1.36, 0.20±0.36, 4.74±0.71, 1.09±1.97 Log<sub>10</sub> CFU/each로 확인됨(표 3-1-124)

표 3-1-124. 오이경작지 토양의 미생물 오염도

Samples (No. of sample)		Quantitative (Log <sub>10</sub> CFU/g) <sup>1)</sup>				
		Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold	<i>B. cereus</i>
Farming soil (16)	average	6.89±0.40	2.64±1.36	0.20±0.36	4.74±0.71	1.09±1.97
	range	5.87-7.41	0-4.81	0-0.95	2.74-5.63	0-4.89

<sup>1)</sup> Data represent mean ± standard deviations of two measurements

- 오이경작지에서 수거한 토양시료의 병원성세균에 대한 오염도를 조사하였다. 총 16개의 토양에서 4종(22.2%)의 *B. cereus*균이 검출됨(표 3-1-125). 반면, *S. aureus* 균은 검출되지 않음. 또한, 그 외 병원성미생물인 *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 및 *C. perfringens*균은 발견되지 않음(데이터 표시되지 않음)
- 병원성 미생물에 대한 오염도를 비교했을 때, 오이경작지의 오염도는 용수를 제외한 오이 시료와 토양사이에 *B. cereus* 오염에 대한 연관성이 있는 것으로 생각할 수 있음

표 3-1-125. 오이경작지 토양의 병원성 미생물 오염도

Samples (No. of sample)	Positive no. (%)		
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	Total
Farming soil (16)	4 (22.2)	ND <sup>1)</sup>	4 (22.2)

<sup>1)</sup> ND, not detected

- 2016-2018년 오이농가에서 토양 바이러스 5종 검사결과 노로바이러스 GII 2/39 (5.12%) 건, 아스트로바이러스 1/39 (2.56%) 검출되었음
- 지표미생물 Coliphage은 검출되지 않았음

표 3-1-126. 오이농가 토양 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Samples		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
soil	Detection number (rate %)	0/39 (0.00)	2/39 (5.12)	0/39 (0.00)	1/39 (2.56)	0/39 (0.00)	0/39 (0.00)	0/38 (0.00)

가) 지역별

- 다양한 지역의 오이경작지에서 수거한 토양 중 A-E 지역의 총균수 오염수준은 평균 6.91 Log<sub>10</sub> CFU/each이었으며, 대장균군과 곰팡이/효모에 대한 평균 오염수준은 각각 2.88, 4.74 Log<sub>10</sub> CFU/each로 관찰됨(표 3-1-127). A, D, E 지역에서 수거한 토양에서 *E. coli*

가 0.19±0.43, 0.42±0.49, 0.17±0.29 Log<sub>10</sub> CFU/each수준으로 낮게 검출됨. *B. cereus*의 경우 A 및 C 지역에서 각각 1.71±2.36, 2.23±2.60 Log<sub>10</sub> CFU/each수준으로 검출되어 A와 C 지역의 미생물 오염수준이 다른 지역보다 높은 것이 확인됨

표 3-1-127. 지역별 오이경작지 토양의 미생물 오염도

Sampling region (No. of sample)		Quantitative (Log <sub>10</sub> CFU/g) <sup>1)</sup>				
		Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold	<i>B. cereus</i>
A (5)	average	6.97±0.30	1.90±1.16	0.19±0.43	4.38±1.03	1.71±2.36
	range	6.53-7.33	0-2.84	0-0.95	2.74-5.59	0-4.68
B (3)	average	7.07±0.21	3.45±1.25	ND <sup>2)</sup>	4.71±0.31	ND
	range	6.91-7.31	2.36-4.81	ND	4.38-5.00	ND
C (4)	average	6.85±0.46	3.13±1.81	0.42±0.49	4.72±0.41	2.23±2.60
	range	6.31-7.41	0.50-4.38	0-0.85	4.46-5.34	0-4.89
D (3)	average	6.56±0.61	1.98±0.72	0.17±0.29	5.51±0.19	ND
	range	5.87-7.02	1.15-2.49	0-0.50	5.30-5.63	ND
E (1)	average	7.13	3.94	ND	4.40	ND
	range	7.13	3.94	ND	4.40	ND
Total (16)		6.89±0.40	2.64±1.36	0.20±0.36	4.74±0.71	1.09±1.97

<sup>1)</sup> Data represent mean ± standard deviations of two measurements

<sup>2)</sup> ND, not detected (detection limit: 1.00 Log<sub>10</sub> CFU/g)

- 오이경작지 토양시료에 대한 병원성 미생물 오염도를 지역별로 분석한 결과, A와 C지역에서 *B. cereus*가 각각 5개 중 2개(40.0%), 4개 중 2개(50.0%)의 시료에서 검출되었으며, 그 외 다른 지역에서는 병원성 미생물이 검출되지 않음 (표 3-1-128)

표 3-1-128. 지역별 오이경작지 토양의 병원성 미생물 오염도

Sampling region (No. of sample)	Positive no. (%)		Total
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	
A (5)	2 (40.0)	ND <sup>1)</sup>	2 (40.0)
B (3)	ND	ND	ND
C (4)	2 (50.0)	ND	2 (50.0)
D (3)	ND	ND	ND
E (1)	ND	ND	ND
Total (16)	4 (22.2)	ND	4 (22.2)

<sup>1)</sup> ND, not detected

- C에서 오이농가 통양 바이러스 5종 검사 결과 노로바이러스 GII 1/6 (16.6%)건 검출됐음
- E에서 노로바이러스 GII 1/2(50.0%)건, 아스트로바이러스 1/2(50.0%)건 검출되었음
- 지표미생물 Coliphage은 각 지역에서 모두 검출되지 않았음

표 3-1-129. 오이 제배지역의 토양 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Sampling region		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
soil	A	0/14	0/14	0/14	0/14	0/14	0/14	0/14
	B	0/14	0/14	0/14	0/14	0/14	0/14	0/13
	C	0/6	1/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
	D	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	E	0/2	1/2	0/2	1/2	0/2	0/2	0/1
	Detection number (rate %)	0/39 (0.00)	2/39 (5.12)	0/39 (0.00)	1/39 (2.56)	0/39 (0.00)	0/39 (0.00)	0/38 (0.00)

나) 계절별

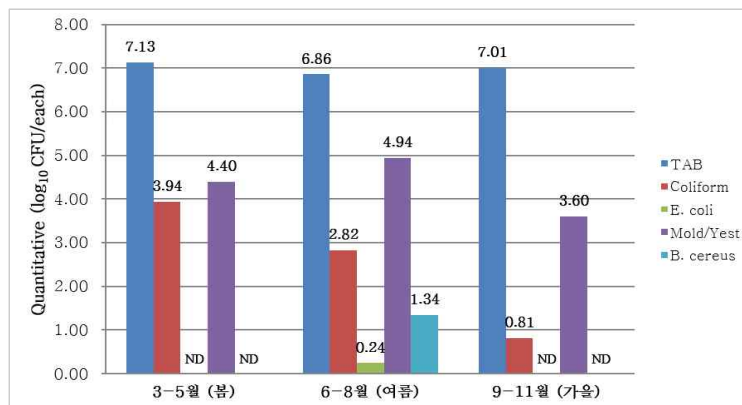


그림 3-1-9. 계절별 오이경작지 토양의 미생물 오염도

- 계절별로 오이경작지 토양시료에 대한 미생물 오염도를 그림 3-1-9에 나타냄. 봄, 여름 및 가을시기에 수거한 오이시료는 비슷한 미생물 오염수준으로 관찰되었으나, 여름시기에 수거된 오이시료에서 낮은 수준으로 *E. coli*가 검출됨
- 토양시료에 대한 병원성 미생물 오염도를 계절별로 분석한 결과, 여름시기에 수거한 토양에서만 *B. cereus*가 검출된 것을 확인(표 3-1-130)

표 3-1-130. 계절별 오이경작지 토양의 병원성 미생물 오염도

Samples (No. of sample)		Positive no. (%)		
		<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	Total
Farming soil (16)	Mar.-May (Spring)	ND <sup>1)</sup>	ND	ND
	June-Aug. (Summer)	4 (30.8)	ND	4 (30.8)
	Sep.-Nov. (Autumn)	ND	ND	ND

<sup>1)</sup> ND, not detected

- 오이농가에서 토양 계절별 바이러스 5종 검사결과 봄에 노로바이러스 GII 1/2 (50.0%)건, 이스트로바이러스 1/2 (50%)건 검출되었음
- 여름에 노로바이러스 GI만 1/25 (4.00%)건 검출되었음

표 3-1-131. 오이농가 토양 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Samples		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
soil	Spring	0/2	1/2	0/2	1/2	0/2	0/2	0/2
	Summer	0/25	1/25	0/25	0/25	0/25	0/25	0/24
	Autumn	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12
	Detection number (rate %)	0/39 (0.00)	2/39 (5.12)	0/39 (0.00)	1/39 (2.56)	0/39 (0.00)	0/39 (0.00)	0/38 (0.00)

3) 용수

- 오이경작지에서 사용하는 농업용수의 미생물 오염도를 평가하였을 때  $1.74 \pm 1.58 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/mL}$  수준의 총균수가 검출되었고 대장균군, *E. coli* 및 곰팡이/효모에 대한 오염수준은  $0.46 \pm 0.63$ ,  $0.15 \pm 0.28$ ,  $0.55 \pm 0.68 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/mL}$ 로 관찰됨(표 3-1-132). 오이경작지에 대한 일반세균의 오염수준은 용수<신선채소(오이)<토양의 순으로 확인됨

표 3-1-132. 오이경작지 용수의 미생물 오염도

Samples (No. of sample)		Quantitative ( $\text{Log}_{10} \text{ CFU/mL}$ ) <sup>1)</sup>			
		Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold
Irrigation water (19)	average	$1.74 \pm 1.58$	$0.46 \pm 0.63$	$0.15 \pm 0.28$	$0.55 \pm 0.68$
	range	0-4.74	0-1.69	0-0.85	0-2.07

<sup>1)</sup> Data represent mean  $\pm$  standard deviations of two measurements

- 오이경작지 용수시료에 대한 병원성 미생물 오염도를 조사하여 표 3-1-133에 나타냄. 총 19개 시료 중 3개(15.8%)의 *S. aureus*가 검출됨. 그 외 병원성 미생물은 검출되지 않음

표 3-1-133. 오이경작지 용수의 병원성 미생물 오염도

Samples (No. of sample)		Positive no. (%)		
		<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	Total
Irrigation water (19)		ND <sup>1)</sup>	3 (15.8)	3 (15.8)

<sup>1)</sup> ND, not detected

- 2016-2018년 오이농가에서 농업용수 바이러스 5종 및 지표미생물 Coliphage 검사결과 모두 검출되지 않았음

표 3-1-134. 오이농가 농업용수 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Samples		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
Irrigation water	Detection number (rate %)	0/8 (0.00)	0/8 (0.00)	0/8 (0.00)	0/8 (0.00)	0/8 (0.00)	0/8 (0.00)	0/16 (0.00)

가) 지역별

- 오이경작지 용수의 미생물 오염도를 지역별로 분석한 결과, E 지역을 제외한 A-D 지역의 총균수 오염수준은 평균 1.48 Log<sub>10</sub> CFU/mL로 낮은 수준이었으며, 곰팡이/효모에 대한 평균 오염수준도 0.62 Log<sub>10</sub> CFU/mL로 낮은 수준으로 관찰됨(표 3-1-135). D 지역의 경우 대장균군과 *E. coli*가 검출한계(< 0.00 Log<sub>10</sub> CFU/mL) 미만으로 관찰됨

표 3-1-135. 지역별 오이경작지 용수의 미생물 오염도

Sampling region (No. of sample)		Quantitative (Log <sub>10</sub> CFU/mL) <sup>1)</sup>			
		Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold
A (6)	average	1.89±1.03	0.28±0.69	ND <sup>2)</sup>	0.31±0.55
	range	0.30-3.53	0-1.69	ND	0-1.36
B (3)	average	2.09±0.30	1.08±0.53	0.20±0.35	0.88±0.78
	range	1.83-2.42	0.70-1.68	0-0.60	0-1.46
C (6)	average	1.85±2.28	0.51±0.65	0.27±0.35	0.50±0.85
	range	0-4.74	0-1.54	0-0.85	0-2.07
D (3)	average	0.10±0.17	ND	ND	0.77±0.77
	range	0-0.30	ND	ND	0-1.54
E (1)	average	3.94	0.74	0.63	0.66
	range	3.94	0.74	0.63	0.66
Total (19)		6.89±0.40	2.64±1.36	0.20±0.36	4.74±0.71

<sup>1)</sup> Data represent mean ± standard deviations of two measurements

<sup>2)</sup> ND, not detected (detection limit: 0.00 Log<sub>10</sub> CFU/mL)

- 지역별로 오이경작지 용수시료에 대한 병원성 미생물 오염도 분석한 결과, A와 B지역에서만 *S. aureus*가 각각 6개개 중 2개(33.3%), 3개 중 1개(33.3%)의 시료에서 검출되었으며, 그 외 다른 지역에서는 병원성 미생물이 검출되지 않음(표 3-1-136)

표 3-1-136. 지역별 오이경작지 용수의 병원성 미생물 오염도

Sampling region (No. of sample)	Positive no. (%)		
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	Total
A (6)	ND <sup>1)</sup>	2 (33.3)	2 (33.3)
B (3)	ND	1 (33.3)	1 (33.3)
C (6)	ND	ND	ND
D (3)	ND	ND	ND
E (1)	ND	ND	ND
Total (19)	ND	3 (15.8)	3 (15.8)

<sup>1)</sup> ND, not detected

- 오이 및 환경샘플(토양, 용수)에 대한 실험 결과를 종합하면, 지역에 따라 오이 및 환경샘플의 미생물 오염도는 상이했으나 오이, 토양, 용수시료에서 모두 *E. coli*가 검출된 것으로 보아 오이의 오염도는 토양 및 용수로부터 영향을 받는 것으로 생각할 수 있음
- 2016-2018년 오이농가에서 농업용수 바이러스 5종 및 지표미생물 Coliphage 검사결과 모두 검출되지 않았음

표 3-1-137. 오이농가 농업용수 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Samples		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
Irrigation water	Detection number (rate %)	0/8 (0.00)	0/8 (0.00)	0/8 (0.00)	0/8 (0.00)	0/8 (0.00)	0/8 (0.00)	0/16 (0.00)

나) 계절별

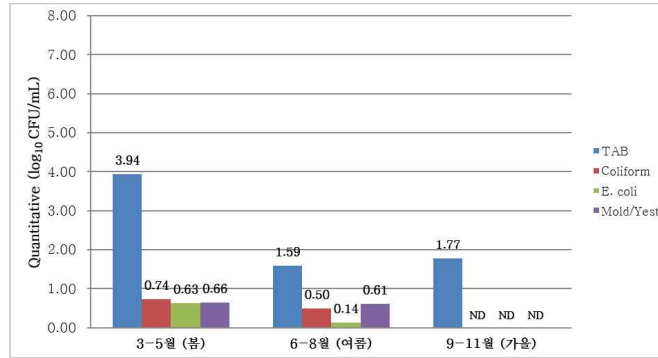


그림 3-1-10. 계절별 오이경작지 용수의 미생물 오염도

- 계절별로 분석한 오이경작지 용수시료에 대한 미생물 오염도를 그림 3-1-10에 나타냄. 봄 시기에 수거한 용수시료가 여름 및 가을 시기에 수거한 용수시료보다 많은 미생물 오염수 준으로 관찰되었으며, 봄 및 여름 시기에 수거된 용수시료에서 낮은 수준으로 *E. coli*가 검출됨
- 용수에 대한 병원성 미생물 오염도를 분석한 결과, 여름 시기에 수거한 용수에서만 *S. aureus*가 검출된 것을 확인(표 3-1-138)

표 3-1-138. 계절별 오이경작지 용수의 병원성 미생물 오염도

Samples (No. of sample)		Positive no. (%)		
		<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	Total
Irrigation water (19)	Mar.-May (Spring)	ND <sup>1)</sup>	ND	ND
	June-Aug. (Summer)	ND	3 (18.8)	3 (18.8)
	Sep.-Nov. (Autumn)	ND	ND	ND

<sup>1)</sup> ND, not detected

- 오이농가에서 농업용수 계절별 바이러스 5종 및 지표미생물 Coliphage는 검출되지 않음

(나) 고추

1) 농작물

가) 농가

- 고추시료의 미생물 오염도를 분석한 결과, 총균수 오염수준은 평균  $4.61 \pm 0.94 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ 로 관찰되었으며, 대장균군, 곰팡이/효모에 대한 평균 오염수준은  $2.54 \pm 1.54$ ,

2.74±0.97 Log<sub>10</sub> CFU/g로 낮은 수준으로 관찰됨(표 3-1-139). *E. coli*의 경우 검출한계(< 0.70 Log<sub>10</sub> CFU/g) 미만으로 관찰되었으며 *B. cereus*는 0.02±0.06으로 낮은 미생물 오염 수준으로 관찰됨. 고추시료는 6-8월 사이인 여름시기에서만 수거됨

표 3-1-139. 고추경작지의 미생물 오염도

Samples (No. of sample)		Quantitative (Log <sub>10</sub> CFU/g) <sup>1)</sup>				
		Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold	<i>B. cereus</i>
Pepper (21)	average	4.61±0.94	2.54±1.54	ND <sup>2)</sup>	2.74±0.97	0.02±0.06
	range	2.97-5.97	0-5.08	ND	1.29-4.11	0-0.25

<sup>1)</sup> Data represent mean ± standard deviations of two measurements

<sup>2)</sup> ND, not detected (detection limit: 0.70 Log<sub>10</sub> CFU/g)

- 고추경작지에서 수거한 고추의 병원성 미생물 오염도를 조사하여 표 3-1-140에 나타냄. 총 6종(*B. cereus*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* sp., *S. aureus*, *E. coli* O157 및 *C. perfringens*)의 병원성 세균을 조사한 결과, 전체 21개 중 1종(8.3%)의 낮은 수준으로 *B. cereus*가 검출됨. 그 외 병원성 미생물은 검출되지 않음

표 3-1-140. 고추시료의 병원성 미생물 오염도

Samples (No. of sample)	Positive no. (%)		
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	Total
Pepper (21)	1 (8.3)	ND <sup>1)</sup>	1 (8.3)

<sup>1)</sup> ND, not detected

- 2017-2018년 고추농가에서 바이러스 5종 검사결과 노로바이러스 GI 1/41 (2.43%)건, GII 3/41 (7.31%)건, 아데노바이러스 1/41 (2.43%)건 검출되었음
- 지표미생물 Coliphage은 1/20 (5.00%)검출되었음

표 3-1-141. 고추농가 고추 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Samples		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
Pepper	Detection number (rate %)	1/41 (2.43)	3/41 (7.31)	0/41 (0.00)	0/41 (0.00)	1/41 (2.43)	0/41 (0.00)	1/20 (5.00)

① 지역별

- 고추시료의 일반미생물의 오염도를 지역별로 분석한 결과, A, C, D 및 E 지역에서 수거한 고추의 총균수는 각각 4.89, 3.53, 5.22 및 4.63±0.99 Log<sub>10</sub> CFU/g으로 표본의 개수가 부족하나 D 지역의 오염도가 가장 높은 것이 확인됨 (표 3-1-142). E 지역에서 수거한 *B. cereus*가 발견되었으며, 그 오염수준은 0.02±0.07 Log<sub>10</sub> CFU/g으로 확인됨. 반면, 대장균군은 E 지역에서 수거한 고추에서 2.96±1.38 Log<sub>10</sub> CFU/g 수준이 검출되어 다른 지역의 고추보다 많은 대장균군이 검출됨



표 3-1-142. 지역별 고추경작지의 미생물 오염도

Sampling region (No. of sample)		Quantitative (Log <sub>10</sub> CFU/g) <sup>1)</sup>				
		Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold	<i>B. cereus</i>
A (1)	average	4.89	1.51	ND <sup>2)</sup>	3.94	ND
	range	4.89	1.51	ND	3.94	ND
C (1)	average	3.53	ND	ND	1.95	ND
	range	3.53	ND	ND	1.95	ND
D (1)	average	5.22	1.02	ND	4.11	ND
	range	5.22	1.02	ND	4.11	ND
E (12)	average	4.63±0.99	2.96±1.38	ND	2.59±0.90	0.02±0.07
	range	5.26-5.97	2.94-5.08	ND	3.14-4.04	0-0.25
Total (15)		4.61±0.94	2.54±1.54	ND	2.74±0.97	0.02±0.06

<sup>1)</sup> Data represent mean ± standard deviations of two measurements

<sup>2)</sup> ND, not detected (detection limit: 0.70 Log<sub>10</sub> CFU/g)

□ 지역별로 고추경작지 고추시료에 대한 병원성 미생물 오염도 분석한 결과, E지역에서만 *B. cereus*가 12개 중 1개(8.3%)의 시료에서 검출되었으며, 그 외 다른 지역에서는 병원성 미생물이 검출되지 않음(표 3-1-143)

표 3-1-143. 지역별 고추시료의 병원성 미생물 오염도

Sampling region (No. of sample)	Positive no. (%)		Total
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	
A (1)	ND <sup>1)</sup>	ND	ND
C (1)	ND	ND	ND
D (1)	ND	ND	ND
E (12)	1 (8.3)	ND	ND
Total (15)	1 (8.3)	ND	1 (8.3)

<sup>1)</sup> ND, not detected

□ E지역에서 고추 바이러스 5종 검사 결과 노로바이러스 GI 1/36 (2.77%)건, 노로바이러스 GII 3/41(8.33%)건 검출되었고, 아데노바이러스 1/36(2.77%)건 지표미생물 Coliphage은 1/20 (5.00%)건 검출되었음

표 3-1-144. 고추 제배지역의 고추 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Sampling region		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
Pepper	A	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/1
	C	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/1
	E	1/36	3/36	0/36	0/36	1/36	0/36	1/18
	Detection number (rate %)	1/41 (2.43)	3/41 (7.31)	0/41 (0.00)	0/41 (0.00)	1/41 (2.43)	0/41 (0.00)	1/20 (5.00)

② 계절별

- 국내의 고추경작지 고추시료 분석은 모두 여름에 진행됨

2) 토양

- 고추경작지 토양시료의 미생물 오염도를 분석한 결과, 총균수 오염수준은  $6.75 \pm 0.35 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ 으로 관찰되었으며, 대장균군, 곰팡이/효모에 대한 오염수준은  $3.43 \pm 1.79$ ,  $4.35 \pm 0.43 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ 으로 관찰됨(표 3-1-145). *E. coli*, *B. cereus*는  $0.04 \pm 0.16$ ,  $1.46 \pm 0.95 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ 으로 낮은 미생물 오염수준으로 관찰됨

표 3-1-145. 고추경작지 토양의 미생물 오염도

Samples (No. of sample)		Quantitative ( $\text{Log}_{10} \text{ CFU/g}$ ) <sup>1)</sup>				
		Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold	<i>B. cereus</i>
Farming soil (22)	average	$6.75 \pm 0.35$	$3.43 \pm 1.79$	$0.04 \pm 0.16$	$4.35 \pm 0.43$	$1.46 \pm 1.95$
	range	5.99-7.33	0-5.83	0-0.65	3.04-4.91	0-4.17

<sup>1)</sup> Data represent mean  $\pm$  standard deviations of two measurements

- 고추경작지에서 수거한 토양시료의 병원성세균에 대한 오염도를 조사하여 표 3-1-146에 나타냄. 총 22개의 토양에서 6종(37.5%)의 *B. cereus*균이 검출됨. 반면, *S. aureus* 균은 검출되지 않음. 또한, 그 외 병원성미생물인 *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 및 *C. perfringens*균은 발견되지 않음(데이터 표시되지 않음)

표 3-1-146. 고추경작지 토양의 병원성 미생물 오염도

Samples (No. of sample)		Positive no. (%)		
		<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	Total
Farming soil (22)		6 (37.5)	ND <sup>1)</sup>	6 (37.5)

<sup>1)</sup> ND, not detected

- 2017-2018년 고추농가에서 토양 바이러스 5종 검사결과 노로바이러스 GII 2/30 (6.66%) 검출되었음
- 지표미생물 Coliphage은 검출되지 않았음

표 3-1-147. 고추농가 토양 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Samples		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
soil	Detection number (rate %)	0/30 (0.00)	2/30 (6.66)	0/30 (0.00)	0/30 (0.00)	0/30 (0.00)	0/30 (0.00)	0/25 (0.00)

가) 지역별

- 고추경작지에서 수거한 토양의 미생물 오염도를 지역별로 분석한 결과, A, C, E 지역의

총균수 오염수준은 각각 4.89, 3.53, 6.79±0.34 Log<sub>10</sub> CFU/g으로 관찰됨 (표 3-1-148). A 및 D 지역을 제외한 E 지역의 대장균군과 곰팡이/효모에 대한 오염수준은 각각 3.73±1.62, 4.34±0.46 Log<sub>10</sub> CFU/g으로 관찰됨. 표본의 개수가 다르나 고추시료와 마찬가지로 E 지역의 미생물 오염수준이 많은 것으로 확인됨. 또한, *E. coli* 및 *B. cereus*의 경우 E 지역에서만 각각 0.05±0.17, 1.66±2.00 Log<sub>10</sub> CFU/g의 낮은 수준으로 검출됨

표 3-1-148. 지역별 고추경작지 토양의 미생물 오염도

Sampling region (No. of sample)		Quantitative (Log <sub>10</sub> CFU/g) <sup>1)</sup>				
		Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold	<i>B. cereus</i>
A (1)	average	4.89	1.51	ND <sup>2)</sup>	3.94	ND
	range	4.89	1.51	ND	3.94	ND
C (1)	average	3.53	ND	ND	1.95	ND
	range	3.53	ND	ND	1.95	ND
E (14)	average	6.79±0.34	3.73±1.62	0.05±0.17	4.34±0.46	1.66±2.00
	range	5.99-7.33	0-5.83	0-0.65	3.04-4.91	0-4.17
Total (16)		6.75±0.35	3.43±1.79	0.04±0.16	4.35±0.43	1.46±1.95

<sup>1)</sup> Data represent mean ± standard deviations of two measurements

<sup>2)</sup> ND, not detected (detection limit: 1.00 Log<sub>10</sub> CFU/g)

□ 지역별로 고추경작지 토양에 대한 병원성 미생물 오염도를 분석한 결과, E 지역에서만 총 14개 중 6종(42.9%)의 *B. cereus*가 검출됨(표 3-1-149)

표 3-1-149. 지역별 고추경작지 토양의 병원성 미생물 오염도

Sampling region (No. of sample)	Positive no. (%)		Total
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	
A (1)	ND <sup>1)</sup>	ND	ND
C (1)	ND	ND	ND
E (14)	6(42.9%)	ND	6(42.9%)
Total (16)	6(42.9%)	ND	ND

<sup>1)</sup> ND, not detected

□ E지역에서 고추 바이러스 5종 검사결과 노로바이러스 GII 2/29 (6.89%) 검출되었음

□ 지표미생물 Coliphage은 검출되지 않았음

표 3-1-150. 고추농가 토양 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Sampling region	NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
soil	A	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
	E	0/29	2/29	0/29	0/29	0/29	0/24
	Detection number (rate %)	0/30 (0.00)	2/30 (6.66)	0/30 (0.00)	0/30 (0.00)	0/30 (0.00)	0/30 (0.00)

나) 계절별

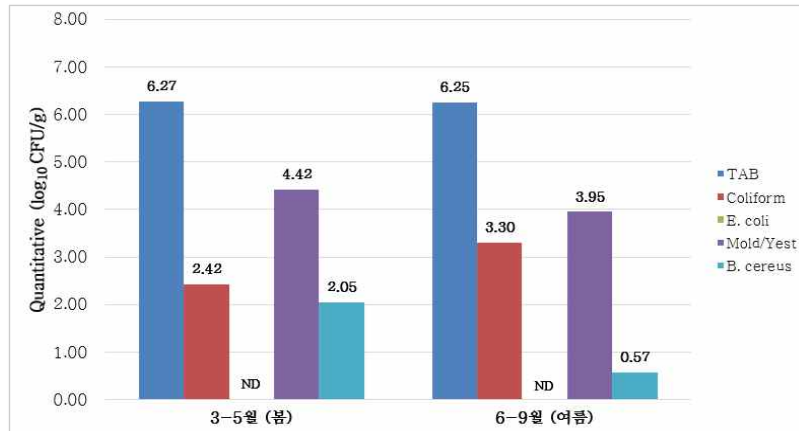


그림 3-1-11. 계절별 고추경작지 토양의 미생물 오염도

- 고추경작지 토양시료에 대한 미생물 오염도를 계절별로 분석하여 그림 3-1-11에 나타냄. 봄과 여름시기에 수거한 토양시료의 미생물 오염도는 비슷한 수준으로 관찰되었으나, *B. cereus*의 경우 봄에 수거한 토양시료보다 여름에 수거한 토양시료에서 미생물 오염도 수준이 낮은 것이 확인됨
- 토양시료에 대한 병원성 미생물 오염도 또한 계절별로 분석하여 표 3-1-151로 나타냄. *B. cereus*는 봄, 여름시기에 수거한 토양시료에서 모두 검출된 것을 확인되었으며, 봄 시기에 수거한 토양시료(50.0%)의 *B. cereus*가 여름시기에 수거한 토양시료(35.7%)의 *B. cereus*보다 높은 오염도를 보였으며, 다른 병원성 미생물은 검출되지 않은 것을 확인할 수 있음

표 3-1-151. 계절별 고추경작지 토양의 병원성 미생물 오염도

Samples (No. of sample)		Positive no. (%)		
		<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	Total
Farming soil (22)	Mar.-May (Spring)	1 (50.0)	ND <sup>1)</sup>	1 (50.0)
	June-Aug. (Summer)	5 (35.7)	ND	5 (35.7)

<sup>1)</sup> ND, not detected

- 고추농가에서 토양 계절별 바이러스 5종 검사결과 여름 노로바이러스 GII 2/30 (6.66%) 검출됐고, 지표미생물 Coliphage은 검출되지 않았음

표 3-1-152. 고추농가 토양 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Samples		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
soil	Summer	0/30	2/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/25
	Detection number (rate %)	0/30 (0.00)	2/30 (6.66)	0/30 (0.00)	0/30 (0.00)	0/30 (0.00)	0/30 (0.00)	0/25 (0.00)

3) 용수

- 고추경작지에서 수거한 토양의 미생물학적 모니터링을 수행했을 때  $3.47 \pm 1.32 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/mL}$  수준의 총균수가 검출되었고 대장균군, *E. coli* 및 곰팡이/효모에 대한 오염수준은  $1.09 \pm 1.28$ ,  $0.46 \pm 0.73$ ,  $0.90 \pm 0.59 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/mL}$ 로 관찰됨(표 3-1-153). 고추경작지에 대한 일반세균의 오염수준은 용수<신선채소(고추)>토양의 순으로 확인됨

표 3-1-153. 고추경작지 용수의 미생물 오염도

Samples (No. of sample)		Quantitative ( $\text{Log}_{10} \text{ CFU/g}$ ) <sup>1)</sup>			
		Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold
Irrigation water (8)	average	$3.47 \pm 1.32$	$1.09 \pm 1.28$	$0.46 \pm 0.73$	$0.90 \pm 0.59$
	range	1.74-5.64	0-3.59	0-2.00	0-1.61

<sup>1)</sup> Data represent mean  $\pm$  standard deviations of two measurements

- 고추경작지 용수시료에 대한 병원성 미생물 오염도를 조사한 결과, 총 8개의 용수시료에서 병원성 미생물이 검출되지 않음(표 3-1-154)

표 3-1-154. 고추경작지 용수의 병원성 미생물 오염도

Samples (No. of sample)	Positive no. (%)		
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	Total
Irrigation water (8)	ND <sup>1)</sup>	ND	ND

<sup>1)</sup> ND, not detected

- 2017-2018년 고추농가에서 농업용수 바이러스 5종 검사결과 노로바이러스 GI 1/9 (11.1%), GII 2/9 (22.2%)건, 로타바이러스 1/9 (11.1%)건 검출되었음
- 지표미생물 Coliphage은 2/9 (22.2%)건 검출되었음

표 3-1-155. 고추농가 농업용수 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Samples		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
Irrigation water	Detection number (rate %)	1/9 (11.1)	2/9 (22.2)	0/9 (0.00)	0/9 (0.00)	0/9 (0.00)	1/9 (11.1)	2/9 (22.2)

가) 지역별

- 고추경작지 용수의 미생물 오염도를 지역별로 분석한 결과, A와 E 지역의 총균수 오염수준은 각각 4.89,  $3.62 \pm 1.36 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/mL}$ 로 낮은 수준이었으며, 대장균군과, *E. coli* 및 곰팡이/효모에 대한 오염수준은 E 지역에서만  $1.25 \pm 1.30$ ,  $0.52 \pm 0.76$ ,  $1.03 \pm 0.50 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/mL}$ 로 낮은 수준으로 관찰됨(표 3-1-156)

표 3-1-156. 지역별 고추경작지 용수의 미생물 오염도

Sampling region (No. of sample)		Quantitative (Log <sub>10</sub> CFU/g) <sup>1)</sup>			
		Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold
A (1)	average	4.89	ND <sup>2)</sup>	ND	ND
	range	4.89	ND	ND	ND
E (7)	average	3.62±1.36	1.25±1.30	0.52±0.76	1.03±0.50
	range	1.74-5.64	0-3.59	0-2.00	0.24-1.61
Total (8)		3.47±1.32	1.09±1.28	0.46±0.73	0.90±0.59

<sup>1)</sup> Data represent mean ± standard deviations of two measurements

<sup>2)</sup> ND, not detected (detection limit: 0.00 Log<sub>10</sub> CFU/g)

- 고추, 토양 및 용수 등 환경샘플에 대한 실험 결과를 종합하면, 표본의 개수가 차이가 나지만 지역에 따라 고추 및 환경샘플의 미생물 오염도는 상이했으며, *E. coli*에 대한 검출 결과를 비교했을 때 고추의 오염도는 토양 및 용수로부터 영향을 받는 것으로 생각할 수 있음
- E지역에서 고추 바이러스 5종 검사 결과 노로바이러스 GI 1/36 (2.77%)건, 노로바이러스 GII 3/41(8.33%)건 검출되었고, 아데노바이러스 1/36(2.77%)건 지표미생물 Coliphage은 1/20 (5.00%)건 검출되었음

표 3-1-157. 고추 제배지역의 고추 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Sampling region	NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
Pepper	A	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/1
	C	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/1
	E	1/36	3/36	0/36	0/36	1/36	0/36
	Detection number (rate %)	1/41 (2.43)	3/41 (7.31)	0/41 (0.00)	0/41 (0.00)	1/41 (2.43)	0/41 (0.00)

나) 계절별

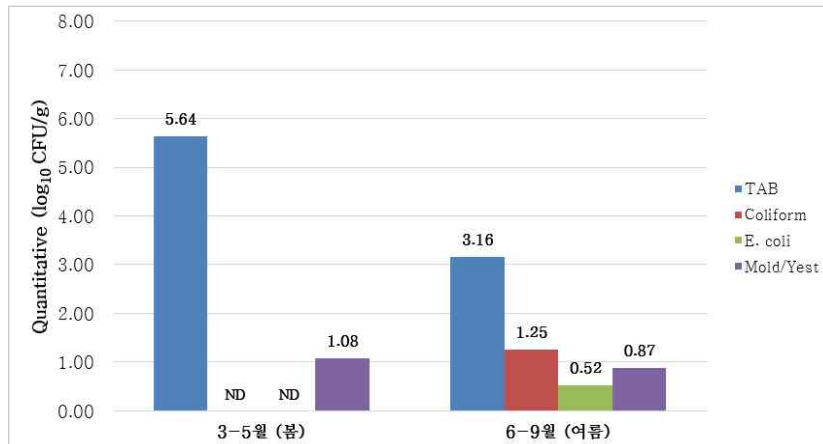


그림 3-1-12. 계절별 고추경작지 용수의 미생물 오염도

- 고추경작지 용수에 대한 미생물 오염도를 계절별로 분석한 결과, 봄 시기에 수거한 용수 시료가 여름시기에 수거한 용수시료보다 총균수의 오염수준이 많은 것으로 관찰되었으나, 여름시기에 수거된 용수시료에서 낮은 수준으로 대장균군과 *E. coli*가 검출됨(그림 3-1-12)
- 고추농가에서 고추 계절별 바이러스 5종 검사결과 여름에만 노로바이러스 GI 1/41 (2.43%)건, GII 3/41 (7.31%)건, 아데노바이러스 1/41 (2.43%)건 검출됐고, 지표미생물 Coliphage은 1/20 (5.00%)검출되었음

표 3-1-158. 고추농가 고추 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Samples		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
Pepper	Summer	1/41	3/41	0/41	0/41	1/41	0/41	1/20
	Detection number (rate %)	1/41 (2.43)	3/41 (7.31)	0/41 (0.00)	0/41 (0.00)	1/41 (2.43)	0/41 (0.00)	1/20 (5.00)

(다) 토마토

- 1) 농작물
  - 가) 농가

- 토마토시료의 총균수 오염수준은 평균  $2.40 \pm 1.49 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/each}$ 로 관찰되었으며, 대장균군, 곰팡이/효모에 대한 평균 오염수준은  $1.10 \pm 1.43$ ,  $0.21 \pm 0.51 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/each}$ 로 낮은 수준으로 관찰됨(표 3-1-159). 되었으며 *E. coli*는  $0.21 \pm 0.51 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/each}$ 으로 낮은 미생물 오염수준으로 관찰되었으며 *B. cereus*의 경우 검출되지 않음

표 3-1-159. 토마토시료의 미생물 오염도

Samples (No. of sample)		Quantitative ( $\text{Log}_{10} \text{ CFU/each}$ ) <sup>1)</sup>				
		Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold	<i>B. cereus</i>
Tomato (15)	average	$2.40 \pm 1.49$	$1.10 \pm 1.43$	$0.21 \pm 0.51$	$1.76 \pm 1.66$	ND <sup>2)</sup>
	range	0-4.91	0-3.81	0-1.75	0-5.77	ND

<sup>1)</sup> Data represent mean  $\pm$  standard deviations of two measurements

<sup>2)</sup> ND, not detected (detection limit:  $0.30 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/each}$ )

- 국내의 토마토경작지 토마토시료에 대한 병원성 미생물 오염도를 조사한 결과, 총 15개의 토마토시료에서 병원성 미생물이 검출되지 않음(표 3-1-160)

표 3-1-160. 토마토시료의 병원성 미생물 오염도

Samples (No. of sample)	Positive no. (%)		
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	Total
Tomato (15)	ND <sup>1)</sup>	ND	ND

<sup>1)</sup> ND, not detected

- 2017-2018년 토마토농가에서 바이러스 5종 검사결과 노로바이러스 GII 1/27 (3.70%)건, 아스트로바이러스 1/27 (3.70%)건 검출되었음
- 지표미생물 Coliphage은 1/13 (7.69%)건 검출되었음

표 3-1-161. 토마토농가 토마토 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Samples		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
Tomato	Detection number (rate %)	0/27 (0.00)	1/27 (3.70)	0/27 (0.00)	1/27 (3.70)	0/27 (0.00)	0/27 (0.00)	1/13 (7.69)

① 지역별

- 표 3-1-162는 지역별 토마토 시료의 미생물 오염도 평가결과를 나타냄. A 및 E 지역의 총균수 오염수준은 각각  $4.46 \pm 0.75$ ,  $1.89 \pm 1.13$  Log<sub>10</sub> CFU/each이었으며, 곰팡이/효모에 대한 오염수준은 각각  $4.32 \pm 1.26$ ,  $1.11 \pm 1.00$  Log<sub>10</sub> CFU/each 수준으로 표본의 개수가 적지만 E 지역의 오염도가 낮은 것이 확인됨. 대장균군에 대한 오염수준도 각각  $2.48 \pm 0.74$ ,  $0.76 \pm 1.36$  Log<sub>10</sub> CFU/each으로 낮은 수준으로 관찰됨. *E. coli* 및 *B. cereus*는 E 지역의 모든 시료에서 검출한계(< 0.30 Log<sub>10</sub> CFU/each) 미만으로 확인됨

표 3-1-162. 지역별 토마토시료의 미생물 오염도

Sampling region (No. of sample)	Quantitative (Log <sub>10</sub> CFU/each) <sup>1)</sup>					
	Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold	<i>B. cereus</i>	
A (3)	average	$4.46 \pm 0.75$	$2.48 \pm 0.74$	$1.04 \pm 0.73$	$4.32 \pm 1.26$	ND <sup>2)</sup>
	range	3.60-4.91	1.63-2.97	0.30-1.75	3.48-5.77	ND
E (12)	average	$1.89 \pm 1.13$	$0.76 \pm 1.36$	ND	$1.11 \pm 1.00$	ND
	range	0-4.30	0-3.81	ND	0-3.04	ND
Total (15)		$2.40 \pm 1.49$	$1.10 \pm 1.43$	$0.21 \pm 0.51$	$1.76 \pm 1.66$	ND

<sup>1)</sup> Data represent mean ± standard deviations of two measurements

<sup>2)</sup> ND, not detected (detection limit: 0.30 Log<sub>10</sub> CFU/each)

- A지역에서 지표미생물 Coliphage은 1/1 (100%)건만 검출되었음
- E지역에서 토마토농가에서 토마토 바이러스 5종 검사결과 노로바이러스 GII 1/18 (5.55%)건, 아스트로바이러스 1/18 (5.55%)건 검출되었음

표 3-1-163. 토마토농가 토마토 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Sampling region		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
Tomato	A	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/1
	E	0/24	1/24	0/24	1/24	0/24	0/24	0/12
	Detection number (rate %)	0/27 (0.00)	1/27 (3.70)	0/27 (0.00)	1/27 (3.70)	0/27 (0.00)	0/27 (0.00)	1/13 (7.69)



② 계절별

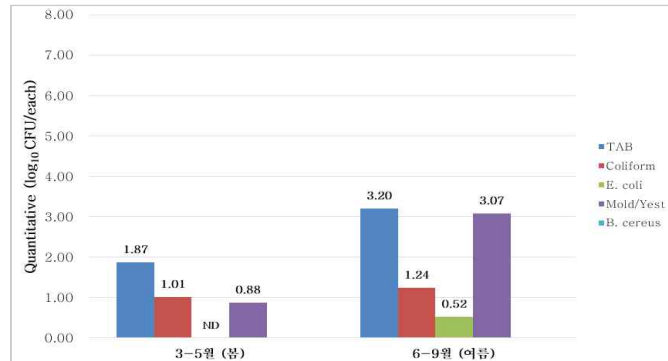


그림 3-1-13. 계절별 토마토시료의 미생물 오염도

- 토마토시료에 대한 병원성 미생물 오염도를 계절별로 분석한 결과, 6-9월 사이인 여름시기에 수거한 토마토시료가 3-5월 사이인 봄 시기에 수거한 토마토시료에 비해 많은 미생물 오염도를 보였으며, 여름시기에 *E. coli*가 검출된 것을 확인할 수 있음(그림 3-1-13)
- 토마토농가에서 토마토 계절별 바이러스 5종 검사결과 봄에 노로바이러스 GII 1/18 (5.55%)건, 아스트로바이러스 1/18 (5.55%)건 검출되었음
- 여름 지표미생물 Coliphage은 1/9 (11.1%)건 검출되었음

표 3-1-164. 토마토농가 토마토 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Samples		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
Tomato	Spring	0/18	1/18	0/18	1/18	0/18	0/18	0/18
	Summer	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	1/9
	Detection number (rate %)	0/27 (0.00)	1/27 (3.70)	0/27 (0.00)	1/27 (3.70)	0/27 (0.00)	0/27 (0.00)	1/13 (7.69)

2) 토양

- 토마토경작지 토양시료의 경우  $6.68 \pm 0.43 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ 의 총균수가 검출되었고 대장균, 곰팡이/효모 및 *B. cereus*에 대한 오염수준은 각각  $2.04 \pm 1.05$ ,  $4.36 \pm 0.64$ ,  $1.39 \pm 1.87 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ 으로 관찰됨(표 3-1-165). 반면, *E. coli*는 모든 시료에서 검출한계( $< 1.00 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/each}$ ) 미만으로 확인됨

표 3-1-165. 토마토경작지 토양의 미생물 오염도

Samples (No. of sample)		Quantitative ( $\text{Log}_{10} \text{ CFU/g}$ ) <sup>1)</sup>				
		Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold	<i>B. cereus</i>
Farming soil (13)	average	$6.68 \pm 0.43$	$2.04 \pm 1.05$	ND <sup>2)</sup>	$4.36 \pm 0.64$	$1.39 \pm 1.87$
	range	5.91-7.35	0.74-4.72	ND	3.54-5.45	0-4.43

<sup>1)</sup> Data represent mean  $\pm$  standard deviations of two measurements

<sup>2)</sup> ND, not detected (detection limit:  $1.00 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ )

- 국내의 토마토경작지 토양시료에 대한 병원성 미생물 오염도를 조사한 결과, 총 13개의 토양에서 4종의 *B. cereus*균이 검출됨(표 3-1-166). 그 외 병원성미생물인 *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 및 *C. perfringens*균은 발견되지 않음 (데이터 표시되지 않음)

표 3-1-166. 토마토시료의 병원성 미생물 오염도

Samples (No. of sample)	Positive no. (%)		
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	Total
Farming soil (13)	4 (30.8)	ND <sup>1)</sup>	4 (30.8)

<sup>1)</sup> ND, not detected

- 2017-2018년 토마토농가에서 토양 바이러스 5종 검사결과 아스트로바이러스 1/13 (7.69%)건 검출되었음
- 지표미생물 Coliphage은 모두 검출되지 않았음

표 3-1-167. 토마토농가 토양 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Samples		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
soil	Detection number (rate %)	0/13 (0.00)	0/13 (0.00)	0/13 (0.00)	1/13 (7.69)	0/13 (0.00)	0/13 (0.00)	0/13 (0.00)

가) 지역별

- 토마토경작지에서 수거한 토양의 미생물 오염도를 지역별로 분석한 결과, A 및 E 지역의 총균수 오염수준은 각각  $6.89 \pm 0.39$ ,  $6.65 \pm 0.45$  Log<sub>10</sub> CFU/g으로 유사한 수준으로 관찰됨 (표 3-1-168). A 및 E 지역의 대장균군에 대한 오염수준은 각각  $3.35 \pm 1.94$ ,  $1.80 \pm 0.74$  Log<sub>10</sub> CFU/g으로 표본의 개수가 다르나 E 지역의 오염도가 낮게 관찰됨. 반면, 곰팡이/효모 및 *B. cereus*에 대한 오염수준은 각각 평균 4.61, 1.73 Log<sub>10</sub> CFU/g으로 유사하게 관찰되었고 *E. coli*는 모든 시료에서 검출한계(< 1.00 Log<sub>10</sub> CFU/each) 미만으로 확인됨

표 3-1-168. 지역별 토마토경작지 토양의 미생물 오염도

Sampling region (No. of sample)		Quantitative (Log <sub>10</sub> CFU/g) <sup>1)</sup>				
		Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold	<i>B. cereus</i>
A (2)	average	$6.87 \pm 0.39$	$3.35 \pm 1.94$	ND <sup>2)</sup>	$4.97 \pm 0.68$	$2.22 \pm 3.13$
	range	6.60-7.15	1.98-4.72	ND	4.49-5.45	0-4.43
E (11)	average	$6.65 \pm 0.45$	$1.80 \pm 0.74$	ND	$4.25 \pm 0.60$	$1.24 \pm 1.75$
	range	5.91-7.35	0.74-3.01	ND	3.54-5.40	0-3.72
Total (13)		$6.68 \pm 0.43$	$2.04 \pm 1.05$	ND	$4.36 \pm 0.64$	$1.39 \pm 1.87$

<sup>1)</sup> Data represent mean ± standard deviations of two measurements

<sup>2)</sup> ND, not detected (detection limit: 1.00 Log<sub>10</sub> CFU/g)

- 토마토경작지 토양시료에 대한 병원성 미생물 오염도를 지역별로 분석한 결과, E지역에서 *B. cereus*가 11개 중 4개(36.4%)의 시료에서 검출되었고, 그 외 다른 지역에서는 병원성 미생물이 검출되지 않음(표 3-1-169)

표 3-1-169. 지역별 토마토경작지 토양의 병원성 미생물 오염도

Sampling region (No. of sample)	Positive no. (%)		Total
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	
A (2)	ND <sup>1)</sup>	ND	ND
E (11)	4 (36.4)	ND	4 (36.4)
Total (13)	4 (30.8)	ND	4 (30.8)

<sup>1)</sup> ND, not detected

- E지역 토마토농가에서 토양 바이러스 5종 검사결과 아스트로바이러스 1/13 (7.69%)건 검출되었음
- 지표미생물 Coliphage은 모두 검출되지 않았음

표 3-1-170. 토마토농가 토양 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Sampling region	NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	Adeno V	RotaV	Coliphage
soil	A	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
	E	0/12	0/12	0/12	1/12	0/12	0/12
	Detection number (rate %)	0/13 (0.00)	0/13 (0.00)	0/13 (0.00)	1/13 (7.69)	0/13 (0.00)	0/13 (0.00)

나) 계절별

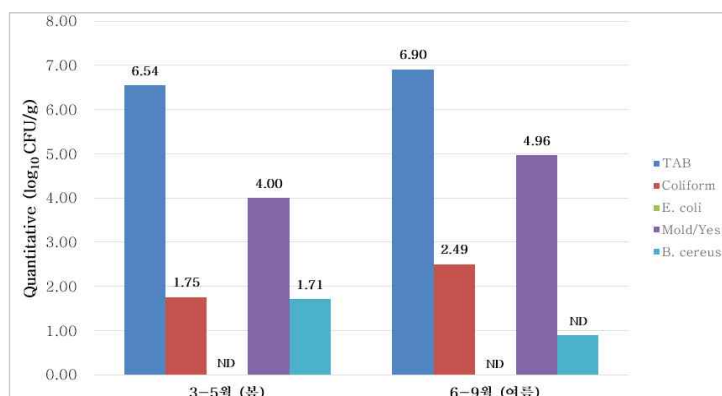


그림 3-1-14. 계절별 토마토경작지 토양의 미생물 오염도

- 토마토경작지 토양시료에 대한 미생물 오염도를 계절별로 분석하여 그림 3-1-14에 나타냄. 봄과 여름시기에 수거한 토양시료의 미생물 오염도는 비슷한 수준으로 관찰되었으며, *E. coli*의 경우 봄과 여름시기에 수거한 토양에서 모두 검출되지 않음
- 토마토경작지 토양시료에 대한 병원성 미생물 오염도를 계절로 분석한 결과, 3-5월 사이

인 봄 시기에 수거한 토양과 6-8월 사이인 여름시기에 수거한 토양에서 모두 *B. cereus* 가 검출되었으며 봄 시기에 수거한 토양시료에서 높은 오염도를 보임(표 3-1-171)

표 3-1-171. 계절별 토마토경작지 토양의 병원성 미생물 오염도

Samples (No. of sample)		Positive no. (%)		
		<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	Total
Farming soil (13)	Mar.-May (Spring)	4 (50.0)	ND <sup>1)</sup>	4 (50.0)
	June-Aug. (Summer)	1 (20.0)	ND	1 (20.0)

<sup>1)</sup> ND, not detected

- 토마토농가에서 토양 계절별 바이러스 5종 검사결과 봄에 아스트로바이러스 1/8 (12.5%) 건 검출됐고, 지표미생물 Coliphage은 모두 검출되지 않았음

표 3-1-172. 토마토농가 토양 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Samples		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
soil	Spring	0/8	0/8	0/8	1/8	0/8	0/8	0/8
	Summer	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	Detection number (rate %)	0/13 (0.00)	0/13 (0.00)	0/13 (0.00)	1/13 (7.69)	0/13 (0.00)	0/13 (0.00)	0/13 (0.00)

3) 용수

- 토마토경작지 용수시료의 경우 총균수에 대한 오염수준은  $3.06 \pm 1.22 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/mL}$ 으로 관찰되었으며 대장균군과 *E. coli* 및 곰팡이/효모에 대한 오염수준은 각각  $0.79 \pm 1.01$ ,  $0.18 \pm 0.48$ ,  $1.15 \pm 0.87 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/mL}$ 으로 관찰됨(표 3-1-173). 실험결과, 토마토경작지 내 일반세균의 오염수준은 토마토<용수<장감<토양의 순으로 확인됨. 토마토의 경우 다른 농산물보다 일반세균의 오염도가 낮게 검출되었으며 용수시료보다 토마토시료에서 일반세균 오염도가 낮게 검출됨

표 3-1-173. 토마토경작지 용수의 미생물 오염도

Samples (No. of sample)		Quantitative ( $\text{Log}_{10} \text{ CFU/g}$ ) <sup>1)</sup>			
		Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold
Irrigation water (7)	average	$3.06 \pm 1.22$	$0.79 \pm 1.01$	$0.18 \pm 0.48$	$1.15 \pm 0.87$
	range	1.60-4.92	0-2.30	0-1.26	0-2.19

<sup>1)</sup> Data represent mean  $\pm$  standard deviations of two measurements

- 국내의 토마토경작지 용수시료의 병원성세균에 대한 오염도를 조사한 결과, 총 7개의 용수시료에서 병원성 미생물이 검출되지 않음(표 3-1-174)

표 3-1-174. 토마토경작지 용수의 병원성 미생물 오염도

Samples (No. of sample)	Positive no. (%)		
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	Total
Irrigation water (7)	ND <sup>1)</sup>	ND	ND

<sup>1)</sup> ND, not detected

- E지역 토마토농가에서 농업용수 바이러스 5종 검사결과 아데노바이러스 1/5 (20.0%)건 검출되었음
- 지표미생물 Coliphage은 모두 검출되지 않았음

표 3-1-175. 토마토농가 토양 농업용수 5종 및 지표미생물 오염도

Sampling region		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
Irrigation water	A	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
	E	0/4	0/4	0/4	0/4	1/4	0/4	0/4
	Detection number (rate %)	0/5 (0.00)	0/5 (0.00)	0/5 (0.00)	0/5 (0.00)	1/5 (20.0)	0/5 (0.00)	0/5 (0.00)

가) 지역별

- 토마토경작지 용수의 미생물 오염도를 지역별로 분석한 결과, A와 E지역의 총균수 오염 수준은 각각  $1.81 \pm 0.29$ ,  $3.56 \pm 1.06$  Log<sub>10</sub> CFU/mL로 관찰됨(표 3-1-176). 대장균군, *E. coli*에 대한 오염수준은 E 지역에서만 각각  $1.10 \pm 1.05$ ,  $0.25 \pm 0.56$  Log<sub>10</sub> CFU/mL로 낮은 수준으로 관찰됨. 표본의 개수가 다르나 A 지역의 용수가 E 지역에서 수거한 용수보다 미생물 오염도가 낮은 것이 확인됨

표 3-1-176. 지역별 토마토경작지 용수의 미생물 오염도

Sampling region (No. of sample)		Quantitative (Log <sub>10</sub> CFU/g) <sup>1)</sup>			
		Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold
A (1)	average	$1.81 \pm 0.29$	ND <sup>2)</sup>	ND	$1.69 \pm 0.44$
	range	1.60-2.02	ND	ND	1.38-2.00
E (9)	average	$3.56 \pm 1.06$	$1.10 \pm 1.05$	$0.25 \pm 0.56$	$0.94 \pm 0.94$
	range	2.21-4.92	0-2.30	0-1.26	0-2.19
Total (7)		$3.06 \pm 1.22$	$0.79 \pm 1.01$	$0.18 \pm 0.48$	$1.15 \pm 0.87$

<sup>1)</sup> Data represent mean ± standard deviations of two measurements

<sup>2)</sup> ND, not detected (detection limit: 0.00 Log<sub>10</sub> CFU/g)

나) 계절별

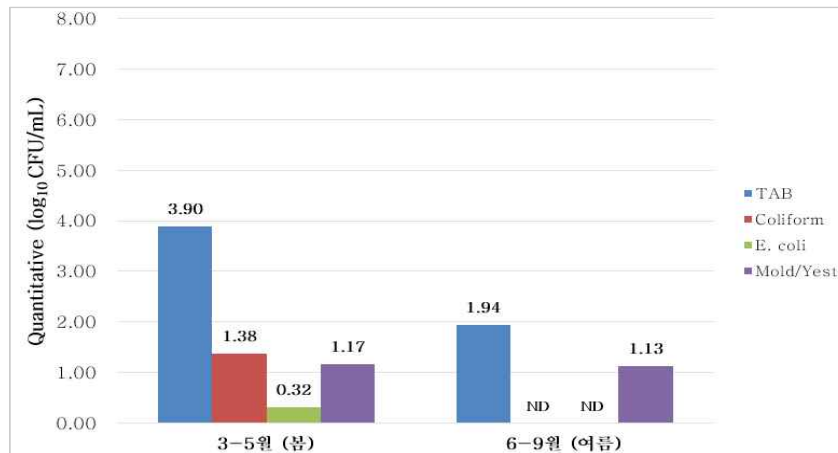


그림 3-1-15. 계절별 토마토경작지 용수의 미생물 오염도

- 토마토경작지 용수에 대한 미생물 오염도를 계절별로 분석한 결과, 봄 시기에 수거한 용수시료가 여름시기에 수거한 용수시료보다 총균수의 오염수준이 많은 것으로 관찰되었으며, 봄 시기에 수거된 용수시료에서 낮은 수준으로 *E. coli*가 검출됨(그림 3-1-15)

4) 장갑

- 봄 시기에 수거한 토마토경작지 장갑시료를 대상으로 미생물학적 모니터링 실험결과, 장갑으로부터  $4.73 \pm 0.63 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$  수준의 총균수가 검출되었으며 대장균군, 곰팡이/효모의 오염수준은 각각  $2.07 \pm 2.23$ ,  $3.71 \pm 0.92 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ 으로 관찰됨(표 3-1-177). *B. cereus*에 대한 오염도는  $0.36 \pm 0.58 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ 으로 낮은 수준으로 확인됨. 반면, *E. coli*는 모두 검출한계( $< 1.00 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ ) 미만으로 확인되었으나, 토마토시료에 비해 총균수가 높은 오염수준으로 확인됨

표 3-1-177. 토마토경작지 장갑의 미생물 오염도

Samples (No. of sample)		Quantitative ( $\text{Log}_{10} \text{ CFU/g}$ ) <sup>1)</sup>				
		Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold	<i>B. cereus</i>
Glove (3)	average	$4.73 \pm 0.63$	$2.07 \pm 2.23$	ND <sup>2)</sup>	$3.71 \pm 0.92$	$0.33 \pm 0.58$
	range	4.00-5.15	0-4.42	ND	2.65-4.32	0-1.00

<sup>1)</sup> Data represent mean  $\pm$  standard deviations of two measurements

<sup>2)</sup> ND, not detected (detection limit:  $1.00 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ )

- 토마토경작지에서 수거한 장갑의 병원성세균에 대한 오염도를 조사하였다. 총 3개의 장갑에서 1종(33.3%)의 *B. cereus*균과 1종(33.3%)의 *S. aureus*균이 검출됨(표 3-1-178). 그 외 병원성미생물인 *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 및 *C. perfringens*균은 발견되지 않음(데이터 표시되지 않음). 장갑시료는 봄 시기에 하나의 지역에서만 수확되었음

표 3-1-178. 토마토경작지 장갑의 병원성 미생물 오염도

Samples (No. of sample)	Positive no. (%)		
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	Total
Glove (3)	1 (33.3)	1 (33.3)	2 (66.7)

□ 토마토농가에서 장갑 바이러스 5종 및 지표미생물 Coliphage은 모두 검출되지 않았음(표 3-1-179)

표 3-1-179. 토마토농가 장갑 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Samples		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	Rota V	Coliphage
Glove	E	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	Detection number (rate %)	0/3 (0.00)	0/3 (0.00)	0/3 (0.00)	0/3 (0.00)	0/3 (0.00)	0/3 (0.00)	0/3 (0.00)

(라) 방울토마토

1) 농작물

가) 유통

□ 국내의 유통단계에 있는 방울토마토를 대상으로 미생물학적 모니터링 실험결과 일반미생물, 대장균군, 효모/곰팡이가 각각  $3.45 \pm 1.55$ ,  $0.25 \pm 0.87$ ,  $3.31 \pm 1.07$  Log<sub>10</sub> CFU/g 수준으로 검출되었으며 *E. coli*와 *B. cereus*는 검출되지 않음(표 3-1-180)

표 3-1-180. 유통단계 방울토마토의 미생물 오염도

Samples (No. of sample)		Quantitative (Log <sub>10</sub> CFU/g) <sup>1)</sup>				
		Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold	<i>B. cereus</i>
Cherry tomato (n=12)	average	$3.45 \pm 1.65$	$0.25 \pm 0.87$	ND <sup>2)</sup>	$3.31 \pm 1.07$	ND
	range	1.89-7.73	0.00-3.00	-	1.84-6.00	-

<sup>1)</sup> Data represent mean ± standard deviations of two measurements

<sup>2)</sup> ND, not detected (detection limit: 1.00 Log<sub>10</sub> CFU/g)

□ 유통단계의 방울토마토의 경우 *B. cereus*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 및 *C. perfringens*균이 검출되지 않음(표 3-1-181)

표 3-1-181. 유통단계 방울토마토의 병원성 미생물 오염도

Samples (No. of sample)	Positive no. (%)		
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	Total
Cherry tomato (n=12)	ND <sup>1)</sup>	ND	ND

<sup>1)</sup> ND, not detected

- 2018년 마트 방울토마토 바이러스 5종 검사결과 노로바이러스 GII 4/24 (16.6%)건, 아스트로바이러스 2/24 (8.33%)건, 아데노바이러스 2/24 (8.33%)건 검출됨
- 지표미생물 Coliphage 모두 검출 되지 않았음(표 3-1-182)

표 3-1-182. 유통단계 방울토마토 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Samples		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
Cherry tomato	Detection number (rate %)	0/24 (0.00)	4/24 (16.6)	0/24 (0.00)	2/24 (8.33)	2/24 (8.33)	0/24 (0.00)	0/12 (0.00)

(4) 과채류

(가) 사과

1) 농작물

가) 농가

- 사과경작지에서 수거한 사과의 미생물학적 모니터링 수행 결과, 일반미생물이 4.10±1.22, 효모/곰팡이가 3.67±0.49 Log<sub>10</sub> CFU/g 수준으로 검출되었으며, 대장균군, *E. coli*와 *B. cereus*는 검출되지 않음(표 3-1-183)

표 3-1-183. 사과시료의 미생물 오염도

Samples (No. of sample)		Quantitative (Log <sub>10</sub> CFU/g) <sup>1)</sup>				
		Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold	<i>B. cereus</i>
Apple (n=3)	average	4.10±1.22	ND <sup>2)</sup>	ND	3.67±0.49	ND
	range	3.36-5.51	-	-	3.37-4.23	-

<sup>1)</sup> Data represent mean ± standard deviations of two measurements

<sup>2)</sup> ND, not detected (detection limit: 1.00 Log<sub>10</sub> CFU/g)

- 사과경작지에서 수거한 사과의 병원성미생물 오염도를 분석한 결과, 병원성 미생물이 검출되지 않음
- 2018년 사과농가에서 사과 바이러스 5종 검사결과 노로바이러스 1/6 (16.6%)건 검출되었음
- 지표미생물 Coliphage은 모두 검출되지 않았음(표 3-1-184)

표 3-1-184. 사과농가 사과 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Samples		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
Apple	Detection number (rate %)	0/6 (0.00)	1/6 (16.6)	0/6 (0.00)	0/6 (0.00)	0/6 (0.00)	0/6 (0.00)	0/3 (0.00)

- 사과의 경우 동일한 지역, 동일한 계절에 샘플링이 이루어짐



나) 유통

- 국내의 유통단계에 있는 사과를 대상으로 미생물학적 모니터링 실험결과 일반미생물, 대장균군, 효모/곰팡이가 각각 4.12±0.69, 0.98±1.20, 3.42±1.02 Log<sub>10</sub> CFU/g 수준으로 검출되었으며 E. coli와 병원성 미생물은 검출되지 않음(표 3-1-185)

표 3-1-185. 유통단계 사과의 미생물 오염도

Samples (No. of sample)		Quantitative (Log <sub>10</sub> CFU/g) <sup>1)</sup>				
		Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold	<i>B. cereus</i>
Apple (n=12)	average	4.12±0.69	0.98±1.20	ND <sup>2)</sup>	3.42±1.02	ND
	range	3.19-5.41	0.00-3.26	-	0.96-5.15	-

<sup>1)</sup> Data represent mean ± standard deviations of two measurements

<sup>2)</sup> ND, not detected (detection limit: 1.00 Log<sub>10</sub> CFU/g)

- 2018년 마트 사과 바이러스 5종 검사결과 노로바이러스 GII 1/24 (4.16%)건, 아스트로바이러스 2/24 (8.33%)건, 아데노바이러스 2/24 (8.33%)건 검출됐음
- 지표미생물 Coliphage 모두 검출 되지 않았음(표 3-1-186)

표 3-1-186. 마트 사과 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

Samples		NoV (GI)	NoV (GII)	HAV	AstroV	AdenoV	RotaV	Coliphage
Apple	Detection number (rate %)	0/24 (0.00)	1/24 (4.16)	0/24 (0.00)	2/24 (8.33)	2/24 (8.33)	0/24 (0.00)	0/12 (0.00)

2) 토양

- 사과경작지 사과 토양의 미생물 오염도를 분석한 결과, 일반미생물은 6.85±0.64, 대장균군 4.16±0.06, 대장균은 0.20±0.34, 효모/곰팡이는 5.16±0.16 Log<sub>10</sub> CFU/g수준으로 검출되었으며 병원성 미생물은 검출되지 않음(표 3-1-187)

표 3-1-187. 사과경작지 사과 토양의 미생물 오염도

Samples (No. of sample)		Quantitative (Log <sub>10</sub> CFU/g) <sup>1)</sup>				
		Total aerobic bacteria	Coliform	<i>E. coli</i>	Yeast/Mold	<i>B. cereus</i>
Farming soil (n=3)	average	6.85±0.64	4.16±0.06	0.20±0.34	5.16±0.16	ND <sup>2)</sup>
	range	6.12-7.33	4.12-4.23	0.00-0.59	4.98-5.26	-

- 2018년 사과농가에서 토양 바이러스 5종 및 지표미생물 Coliphage은 모두 검출되지 않음

나. 저수지

(1) 안성시 저수지(농업용수)의 바이러스 5종 및 지표미생물 모니터링 현황

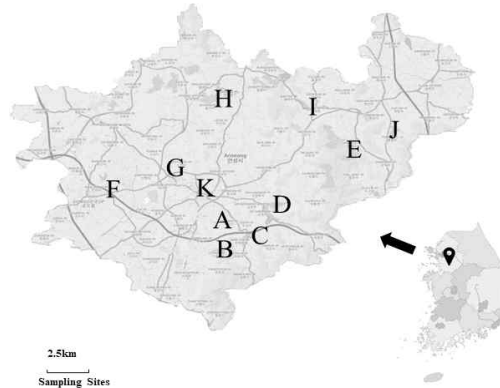


그림 3-1-16. 경기도 안성시 저수지(농업용수) 10개소 샘플링 한 위치

- 저수지 농업용수 샘플링 했을 때, 한번은 A, B, C, D, E 순서로 검사 진행했고 한번은 F, G, H, I, J, K 순서로 진행했음

표 3-1-188. 2017년-2018년 저수지 샘플링 날짜

2017				2018				
1분기	2분기	3분기	4분기	1분기	2분기	3분기	4분기	5분기
0507/ 0530	0612/ 0701	0808/ 0919	1030/ 1123	0228/ 0306	0501/ 0528	0611/ 0713	0813/ 0920	1028/ 1115

- 2017년 8월에 C에서 노로바이러스가 검출되어서 하류가 안성천(K)에 흘러들어가기 때문에 8월 이후에 K의 검사를 추가로 진행했음
- 2018년 3월에 K에서 AI가 발생했기 때문에 샘플링을 하지 않았음
- 2017년-2018년 B에서 바이러스 및 Coliphage 검출 안 됐음
- 12월부터 2월말까지 저수지의 물이 얼어서 샘플링을 못했음

표 3-1-189. 2017년-2018년 A곳의 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

분기	샘플링 Date	NoV (GI)	NoV (GII)	Astro V	Adeno V	HAV	RotaV	Coliphage
Apr.-May	0507	-	-	-	-	-	-	-
Jun.-Jul.	0612	-	-	-	-	-	-	-
Aug.-Sep.	0808	-	-	-	-	-	-	-
Oct.-Dec.	1030	-	-	-	-	-	-	-
Feb-Mar.	0227	-	-	-	-	-	-	-
Apr.-May	0501	-	-	-	-	-	-	-
Jun.-Jul.	0611	-	+	-	-	-	-	-
Agu.-Spe.	0813	-	+	-	+	-	-	+
Oct.-Dec.	1025	-	-	-	-	-	-	-

- 2017년도에 바이러스 검출 안됐으나, 2018년 6월전에 대형 공사가 있었기 때문에 그 이후

노로바이러스 2건, 아데노바이러스 1건, Coliphage 1건 검출됨

표 3-1-190. 2017년-2018년 C곳의 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

분기	샘플링 Date	NoV (GI)	NoV (GII)	Astro V	Adeno V	HAV	RotaV	Coliphage
Apr.-May.	0507	-	-	-	-	-	-	-
Jun.-Jul.	0612	-	-	-	-	-	-	-
Aug.-Sep.	0808	-	+	-	+	-	+	+
Oct.-Dec.	1030	-	-	-	-	-	-	-
Feb-Mar.	0227	-	-	-	-	-	-	-
Apr.-May.	0501	+	+	-	+	-	-	+
Jun.-Jul.	0611	-	-	-	-	-	-	-
Agu.-Spe.	0813	-	-	-	-	-	-	-
Oct.-Dec.	1025	-	-	-	-	-	-	+

- 2017년 봄에 C에서 심한 가뭄이 있었고, 이후 폭우가 쏟아져서 바이러스가 검출 됐음  
2018년까지 노로바이러스 GI 1건, GII 2건, 아데노바이러스 1건, 로타바이러스 1건, Coliphage 3건 검출됨

표 3-1-191. 2017년-2018년 D곳의 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

분기	샘플링 Date	NoV (GI)	NoV (GII)	Astro V	Adeno V	HAV	RotaV	Coliphage
Apr.-May.	0507	-	-	-	-	-	-	-
Jun.-Jul.	0612	-	-	-	-	-	-	-
Aug.-Sep.	0808	-	-	-	-	-	-	-
Oct.-Dec.	1030	-	-	-	-	-	-	-
Feb-Mar.	0227	-	-	-	-	-	-	-
Apr.-May.	0501	-	+	-	-	-	-	-
Jun.-Jul.	0611	-	-	-	-	-	-	-
Agu.-Spe.	0813	-	-	-	-	-	-	-
Oct.-Dec.	1025	-	-	-	-	-	-	-

- 2018년 5월에 노로바이러스 GII 1건만 검출됨

표 3-1-192. 2017년-2018년 E곳의 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

분기	샘플링 Date	NoV (GI)	NoV (GII)	Astro V	Adeno V	HAV	RotaV	Coliphage
Apr.-May.	0507	-	-	-	-	-	-	-
Jun.-Jul.	0612	-	-	-	-	-	-	-
Aug.-Sep.	0808	-	-	-	+	-	-	-
Oct.-Dec.	1030	-	-	-	-	-	-	-
Feb-Mar.	0227	-	-	-	-	-	-	-
Apr.-May.	0501	-	+	-	-	-	-	-
Jun.-Jul.	0611	-	+	-	-	-	-	-
Agu.-Spe.	0813	-	-	-	-	-	-	-
Oct.-Dec.	1025	-	-	-	-	-	-	-

- 2018년 E에서 노로바이러스 2건, 아데노바이러스 1건 검출됨

표 3-1-193. 2017년-2018년 F곳의 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

분기	샘플링 Date	NoV (GI)	NoV (GII)	Astro V	Adeno V	HAV	RotaV	Coliphage
Apr.-May.	0530	-	-	-	-	-	-	-
Jun.-Jul.	0701	-	-	-	-	-	-	-
Aug.-Sep.	0919	-	-	-	-	-	-	-
Oct.-Dec.	1123	-	-	-	-	-	-	-
Feb-Mar.	0306	-	+	-	-	-	-	-
Apr.-May.	0528	-	-	+	-	-	-	-
Jun.-Jul.	0713	-	-	-	-	-	-	-
Agu.-Spe.	0920	-	-	-	-	-	-	-
Oct.-Dec.	1115	-	+	-	-	-	-	+

- 2018년에 F에서 노로바이러스 GII 2건, 아데노바이러스 1건, 지표미생물 Coliphage 1건 검출됨

표 3-1-194. 2017년-2018년 G곳의 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

분기	샘플링 Date	No V (GI)	NoV (GII)	Astro V	Adeno V	HAV	RotaV	Coliphage
Apr.-May.	0530	-	-	-	-	-	-	-
Jun.-Jul.	0701	-	-	-	-	-	-	-
Aug.-Sep.	0919	-	-	-	-	-	-	-
Oct.-Dec.	1123	-	+	-	-	-	-	-
Feb-Mar.	0306	-	+	-	-	-	+	-
Apr.-May.	0528	-	-	-	-	-	-	-
Jun.-Jul.	0713	-	-	-	-	-	-	-
Agu.-Spe.	0920	-	-	-	-	-	-	-
Oct.-Dec.	1115	+	+	-	-	-	+	+

- G에서 노로바이러스 GI 1건 GII 3건, 로타노바이러스 1건 검출됨

표 3-1-195. 2017년-2018년 H곳의 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

분기	샘플링 Date	No V (GI)	NoV (GII)	Astro V	Adeno V	HAV	RotaV	Coliphage
Apr.-May.	0530	-	-	-	-	-	-	-
Jun.-Jul.	0701	-	-	-	-	-	-	-
Aug.-Sep.	0919	-	-	-	-	-	-	-
Oct.-Dec.	1123	-	+	-	-	-	+	-
Feb-Mar.	0306	-	+	-	-	-	-	+
Apr.-May.	0528	-	+	-	-	-	-	+
Jun.-Jul.	0713	-	-	-	-	-	-	-
Agu.-Spe.	0920	-	-	-	-	-	-	-
Oct.-Dec.	1115	-	-	-	-	-	+	-

- H에서 노로바이러스 GII 3건, 로타노바이러스 2건, 지표미생물 Coliphage 2건 검출됨

표 3-1-196. 2017년-2018년 I곳의 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

분기	샘플링 Date	No V (GI)	NoV (GII)	Astro V	Adeno V	HAV	RotaV	Coliphage
Apr.-May.	0530	-	-	-	-	-	-	+
Jun.-Jul.	0701	-	-	-	-	-	-	-
Aug.-Sep.	0919	-	-	-	-	-	-	-
Oct.-Dec.	1123	-	-	-	-	-	-	+
Feb-Mar.	0306	-	+	-	-	-	+	+
Apr.-May.	0528	-	+	+	+	-	-	+
Jun.-Jul.	0713	-	-	-	-	-	-	-
Agu.-Spe.	0920	-	-	-	-	-	-	+
Oct.-Dec.	1115	-	+	-	-	-	+	+

- I에서 노로바이러스 GII 3건, 아스트로바이러스 1건, 아데노바이러스 1건, 로타노바이러스 2건, 지표미생물 Coliphage 6건 검출됨

표 3-1-197. 2017년-2018년 J곳의 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

분기	샘플링 Date	No V (GI)	NoV (GII)	Astro V	Adeno V	HAV	RotaV	Coliphage
Apr.-May.	0530	-	-	-	-	-	-	-
Jun.-Jul.	0701	-	-	-	-	-	-	-
Aug.-Sep.	0919	-	-	-	-	-	-	-
Oct.-Dec.	1123	-	-	-	-	-	-	-
Feb-Mar.	0306	-	+	-	-	-	+	+
Apr.-May.	0528	-	+	-	-	-	-	+
Jun.-Jul.	0713	-	-	-	-	-	-	-
Agu.-Spe.	0920	-	-	-	-	-	-	+
Oct.-Dec.	1115	-	-	-	-	-	-	+

- J에서 노로바이러스 GII 2건, 로타노바이러스 1건, 지표미생물 Coliphage 4건 검출됨

표 3-1-198. 2017년-2018년 k곳의 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

분기	샘플링 Date	No V (GI)	NoV (GII)	Astro V	Adeno V	HAV	RotaV	Coliphage
Apr.-May.	0530	-	-	-	-	-	-	-
Jun.-Jul.	0701	-	-	-	-	-	-	-
Aug.-Sep.	0919	-	+	-	-	-	+	+
Oct.-Dec.	1123	-	-	-	-	-	-	-
Feb-Mar.	0306	-	-	-	-	-	-	-
Apr.-May.	0528	-	+	+	+	-	-	+
Jun.-Jul.	0713	+	+	+	+	-	-	+
Agu.-Spe.	0920	-	+	-	+	-	-	+
Oct.-Dec.	1115	+	+	-	+	-	+	+

- K에서 노로바이러스 GI 2건, GII 5건, 아스트로바이러스 2건, 아데노바이러스 4건, 로타노바이러스 2건, 지표미생물 Coliphage 5건 검출됨

표 3-1-199. 2017년-2018년 저수지 바이러스 5종 및 지표미생물 오염도

저수지	샘플링 Date	NoV (GI)	NoV (GII)	Astro V	Adeno V	HAV	RotaV	Coliphage
Apr.-May.	20170507	0	0	0	0	0	0	0
	20170530	0	0	0	0	0	0	1
Jun.-Jul.	20170612	0	0	0	0	0	0	0
	20170701	0	0	0	0	0	0	0
Aug.-Sep.	20170808	0	1	0	2	0	1	1
	20170919	0	1	0	0	0	1	1
Oct.-Dec.	20171030	0	0	0	0	0	0	0
	20171123	0	2	0	0	0	1	1
Feb.-Mar.	20180227	0	0	0	0	0	0	0
	20180306	0	5	0	0	0	3	3
Apr.-May.	20180501	1	3	0	1	0	0	1
	20180528	0	4	2	3	0	0	4
Jun.-Jul.	20180611	0	2	0	0	0	0	0
	20180713	1	1	1	1	0	0	1
Aug.-Sep.	20180813	0	1	0	1	0	0	1
	20180920	0	1	0	1	0	0	3
Oct.-Dec.	20181025	0	0	0	0	0	0	1
	20181125	2	5	0	1	0	4	5

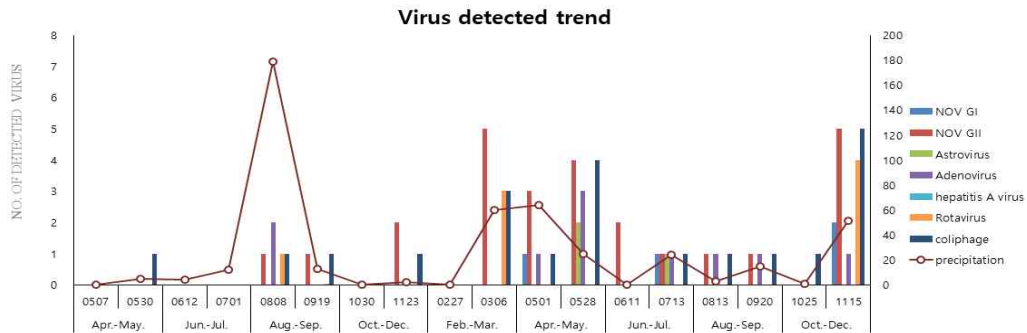


그림 3-1-17. 2017년-2018년 저수지 바이러스 5종과 Coliphage 검출 추세

□ 그림 3-1-17은 2017년-2018년 샘플링 전 누적 강수량과 바이러스 검출 추세를 나타낸 것이다. 강수량이 많아질 때 바이러스가 많이 검출되는 경향을 보임

표 3-1-200. 2017년-2018년 저수지 6군데 APC 오염도

분기	샘플링 Date	SiteC	SiteG	SiteH	SiteI	SiteJ	SiteK	강수량 (mm)
Apr.-May.	0530	0.E+00	0.E+00	0.E+00	0.E+00	0.E+00	0.E+00	5
Jun.-Jul.	0701	5.E+03	2.E+03	8.E+02	2.E+02	2.E+02	0.E+00	12
Aug.-Sep.	0919	2.E+02	3.E+03	3.E+03	4.E+03	1.E+02	6.E+03	13
Oct.-Dec.	1123	2.E+02	9.E+01	3.E+02	2.E+02	2.E+02	2.E+03	0
Feb.-Mar.	0306	2.E+01	1.E+02	3.E+01	7.E+02	1.E+02	0.E+00	60
Apr.-May.	0528	3.E+01	7.E+02	1.E+02	4.E+02	2.E+02	1.E+03	61
Jun.-Jul.	0713	3.E+01	6.E+02	2.E+02	3.E+02	1.E+02	2.E+03	23
Agu.-Spe.	0920	3.E+01	2.E+03	1.E+03	1.E+03	6.E+02	3.E+03	15
Oct.-Dec.	1115	3.E+02	2.E+02	2.E+02	9.E+01	4.E+02	9.E+02	51

□ 2017년 5월-2018년 11월까지 바이러스 5종 및 지표미생물이 많이 검출된 6군데에서 일반 세균(APC) 검사 결과는 다음과 같음

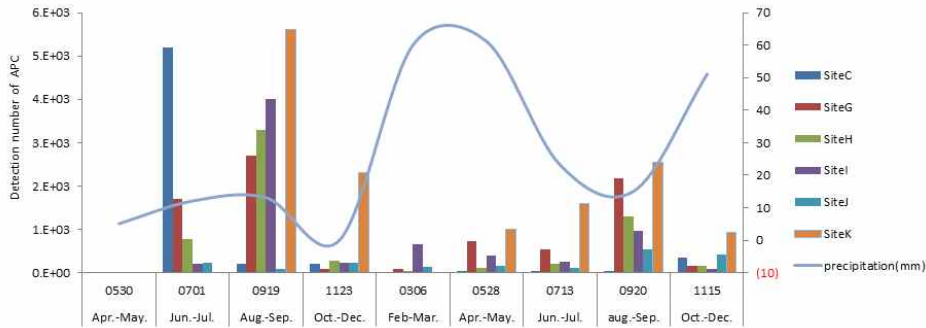


그림 3-1-18. 2017년-2018년 저수지 6군데 APC 오염도와 강수량

표 3-1-201. 2017년-2018년 저수지 6군데 Coliform 오염도

분기	샘플링 Date	SiteC	SiteG	SiteH	SiteI	SiteJ	SiteK	강수량 (mm)
Apr.-May.	0530	0.E+00	0.E+00	0.E+00	0.E+00	0.E+00	0.E+00	5
Jun.-Jul.	0701	5.E+03	2.E+03	8.E+02	2.E+02	2.E+02	0.E+00	12
Aug.-Sep.	0919	2.E+02	3.E+03	3.E+03	4.E+03	1.E+02	6.E+03	13
Oct.-Dec.	1123	2.E+02	9.E+01	3.E+02	2.E+02	2.E+02	2.E+03	0
Feb-Mar.	0306	2.E+01	1.E+02	3.E+01	7.E+02	1.E+02	0.E+00	60
Apr.-May.	0528	3.E+01	7.E+02	1.E+02	4.E+02	2.E+02	1.E+03	61
Jun.-Jul.	0713	3.E+01	6.E+02	2.E+02	3.E+02	1.E+02	2.E+03	23
Agu.-Spe.	0920	3.E+01	2.E+03	1.E+03	1.E+03	6.E+02	3.E+03	15
Oct.-Dec.	1115	3.E+02	2.E+02	2.E+02	9.E+01	4.E+02	9.E+02	51

□ 2017년 5월-2018년 11월까지 바이러스 5종 및 지표미생물이 많이 검출된 6군데에서 대장균(Coliform) 검사 결과는 다음과 같음

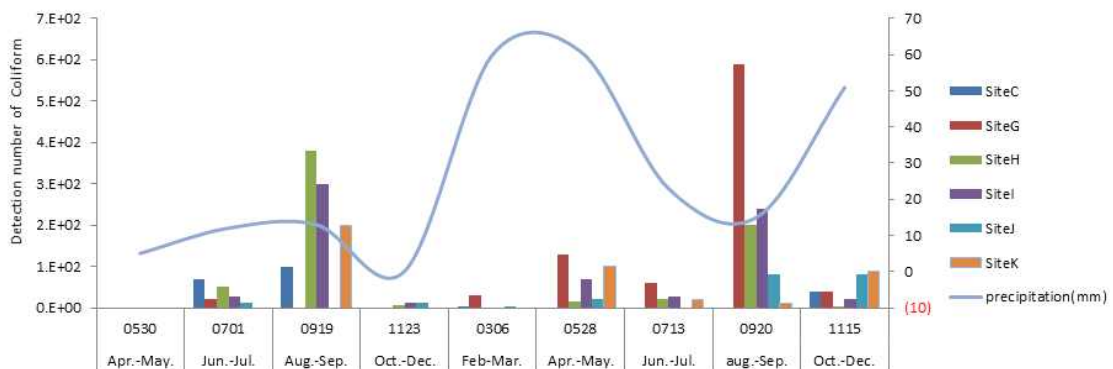


그림 3-1-19. 2017년-2018년 저수지 6군데 Coliform 오염도와 강수량

### 3-2. GAP 농산물의 미생물학적 안전성 확보를 위한 농산물우수관리제도(GAP)개선

#### 3-2 위탁 연구요약

- GAP 인증 통계자료(GAP정보서비스; <http://www.gap.go.kr>)를 바탕으로 주요 신선농산물을 딸기, 고추, 상추, 오이, 배추, 토마토로 선정하였음
- 선정된 신선농산물에 대해 GAP 인증·미인증 농가를 방문하여 농산물 및 재배환경에 대한 미생물학적 위해 평가를 실시한 결과, 신선농산물의 미생물학적 오염수준이 GAP 미인증 농가에서 약간 높았으나 거의 비슷한 오염수준을 나타냈음
- 농산물 재배농장에 대한 현장방문 조사를 통해 농업용수, 농자재 정리 현황, 농장 주변, 수확 및 선별공간, 개인위생 등의 위해요소 발생 요인을 확인하였음
- 국내의 미생물 오염·저감화 방법으로는 대부분 물리적·화학적 처리법이 개발되고 있으나, 물리적 방법은 고가의 장비가 필요하고 화학적 방법은 농산물에 잔류하는 등의 안전성 문제가 부각되었음
- 신선농산물 대부분은 세척단계 없이 수확과 유통단계를 거치는 것으로 확인되었기 때문에 수확 단계의 미생물 예방 및 저감화 방안으로 주기적인 장갑 교체를 수행하여 1시간마다 교체 시 미생물 수가 감소하는 것으로 확인되었으며, 장갑의 재사용을 위한 사후관리방안으로 세척법을 실시하여 락스와 삶는 방법이 가장 효과적인 것으로 확인되었음
- 유통단계의 미생물 예방 및 저감화 방안으로 유통 중 4℃의 냉장유통방법과 소형플라스마 발생 장치를 이용한 신선농산물의 미생물 감소 효과를 확인하였음
- 앞서 수행한 모니터링 및 현장방문을 통해 위해요소로부터 중요관리점을 확인하였으며, 현장에 적용 가능한 저감/예방 방안으로 GAP 인증 신선농산물의 미생물학적 위생 안전관리 및 가이드라인 방안을 확립하였음
- 고추 농가를 대상으로 미생물학적 위생안전관리 및 가이드라인 방안을 적용하여 GAP 인증을 지원하였고 GAP 인증 전·후 미생물학적 안전성 비교 평가하였으며, 인증 후 농산물에서 미생물 오염수준이 감소한 것으로 나타났음
- GAP 인증과정 중 미생물학적 안전성 확보에 대한 문제점으로 위해요소 분석 작성 시 품목에 상관없이 동일하게 작성하여 제출하여도 인증 시 무관하였으며, 예방조치 방법에 대해 미생물관리에 효과적이고 구체적인 사항을 작성할 필요가 있는 것으로 판단되었음
- GAP 농산물 미생물학적 위생 안전관리 개선방안으로 작업 도구 관리, 위해요소관리프로그램 작성 보완, 선행요건관리프로그램에 기반으로 현장위생관리 프로그램을 적용한다면 미생물학적 오염의 위해요소로부터 예방이 가능할 것으로 판단되었음

#### 1. 작물별 GAP 인증현황 조사 및 대표 GAP 농산물 선정

- GAP정보서비스(<http://www.gap.go.kr>)의 통계자료를 바탕으로 신선농산물 종류별 GAP인증 현황을 조사하였음
- 인증건수별 60 종류의 작물이 확인되었으며, 구기자, 오미자, 백수오 등을 제외하고는 대부분의 GAP 인증 건수가 높은 작물로는 신선농산물로 확인되었음
- 딸기, 사과, 배, 포도, 복숭아 순으로 인증건수가 많았으며, 그 중 딸기의 경우 인증건수가 501건으로 확인되어 다른 작물에 비해 높은 인증건수를 보임

표 3-2-1. GAP 인증현황

번호	품목명	인증 수	농가 수	재배면적	번호	품목명	인증 수	농가 수	재배면적
1	딸기	501	2,819	1,442	31	오이	27	536	290
2	사과	421	7,318	8,324	32	건고추	26	352	79
3	쌀	371	21,881	36,434	33	느타리버섯	25	25	8



번호	품목명	인증 수	농가 수	재배면적	번호	품목명	인증 수	농가 수	재배면적
4	배	359	3,192	3,856	34	메론	24	446	357
5	인삼	324	417	346	35	만감	24	58	40
6	포도	315	4,466	2,785	36	양파	20	640	388
7	구기자	205	205	16	37	참다래(키위)	19	372	199
8	복숭아	196	3,062	2,948	38	밤	18	295	918
9	단감	193	741	1,513	39	울무	18	193	172
10	곶잎	137	345	97	40	곶감	18	76	110
11	토마토	135	1,159	812	41	참쌀	16	569	617
12	블루베리	120	277	145	42	고구마	16	94	248
13	백수오	118	227	113	43	부추	16	148	122
14	오미자	96	593	275	44	오디	15	365	119
15	대추	93	304	229	45	상추	14	149	95
16	표고버섯	75	115	41	46	한라봉	14	14	10
17	참외	72	773	682	47	블랙초크베리	13	13	6
18	방울토마토	70	341	191	48	작약	12	78	42
19	감귤	55	612	618	49	매실	11	222	187
20	새송이	54	55	20	50	호박	10	211	118
21	미나리	53	118	260	51	당귀	10	148	116
22	수박	52	1,131	1,004	52	시금치	10	10	13
23	백출	43	261	124	53	생강	10	10	2
24	자두	42	352	258	54	아로니아	10	28	13
25	감	39	197	210	55	감초	9	50	74
26	풋고추	37	628	308	56	도라지	9	10	24
27	파프리카	34	302	303	57	엽경채류(기타)	9	13	12
28	지황	33	103	49	58	양송이	9	65	6
29	감자	32	394	547	59	콩나물	9	9	1
30	황기	28	97	117	60	배추	8	76	185

(2016년 6월 기준)

- 수확 후 세척과정 없이 출하되는 농산물 중 GAP 인증 건수가 미흡하지만 소비량이 높은 농산물을 대상으로 하였음
- 대부분의 신선농산물은 생으로 섭취하여 위생상 문제가 발생할 가능성이 높기 때문에 1차-3차년도 대상 농산물로 선정하였음

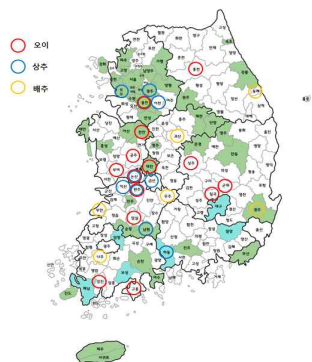


그림 3-2-1. 오이, 상추, 배추 지역별 GAP 인증농가 현황 (2016.10월 기준)

## 2. 신선농산물 GAP 인증·미인증 농가의 재배환경과 신선농산물의 미생물학적 위해요소 모니터링

### □ GAP 농산물 품목별 농가 선정

- GAP 인증농가와 미인증 농가의 미생물 오염도 비교·평가 및 미생물학적 위해요소의 관리 실태를 조사하기 위해 GAP 인증농가 및 미인증 농가를 1-3차년도 방문하였음

### □ 딸기농가 미생물모니터링

- 딸기농가로부터 수집한 시료는 딸기, 토양, 용수, 장갑, 작업도구를 포함하여 GAP 인증 농가 5 곳, GAP 미인증농가 10 곳으로 부터 총 38개의 시료를 수집하였음
- GAP 인증농가와 GAP 미인증농가의 딸기와 토양에 대해서 일반세균수는 비슷한 수준으로 나타났으나 용수와 장갑, 작업도구(바구니)는 GAP 미인증농가의 미생물 오염수준이 더 높게 나타났음
- GAP 인증농가와 GAP 미인증농가의 대장균은 불검출로 나타났으며, GAP 인증농가는 대장균군이 없거나 낮은 오염수준을 나타냈으나 GAP 미인증농가의 경우 일부 항목에서 대장균군이 나타난 것으로 확인되었음
- 특히, 장갑의 경우, 대장균군이 GAP 인증농가와 미인증농가에서 각각 1.6 log CFU/g, 2.6 log CFU/g 수준으로 나타나 작업도구의 오염이 신선농산물과 접촉으로 인한 오염이 발생 할 가능성이 높은 것으로 판단되었음

표 3-2-2. 수확농장으로부터 수집된 딸기 미생물 오염도

구분	시료	미생물			
		일반세균	대장균군	대장균	효모/곰팡이
딸기 GAP 인증 농가 (n=5)	딸기	2.5±0.5	ND <sup>1)</sup>	ND	1.5±0.7
	토양	6.8±1.0	ND	ND	3.2±1.2
	용수	2.5±0.8	ND	ND	1.4±0.5
	장갑	3.9±0.7	1.6±1.4	ND	2.8±0.4
	작업도구 (바구니)	3.6±0.9	ND	ND	2.2±1.6
딸기 GAP 미인증 농가 (n=10)	딸기	2.6±1.3	ND	ND	2.2±1.0
	토양	6.6±0.9	5.0±0.5	ND	2.9±1.0
	용수	3.7±1.0	2.2±0.6	ND	2.4±0.7
	장갑	4.6±1.3	2.6±1.2	ND	1.7±0.7
	작업도구 (바구니)	4.2±1.2	ND	ND	2.7±1.2

<sup>1)</sup> ND: Not detected(Detection limit : <1.0 CFU/plate)

### □ 오이농가 미생물모니터링

- 오이농가로부터 수집한 시료는 GAP 인증농가 1 곳, GAP 미인증농가 12 곳으로 부터 47개의 시료를 수집하였음
- GAP 인증농가와 GAP 미인증농가의 오이와 토양에 대해서 일반세균수는 비슷한 수준으로 나타났으나 장갑과 작업도구인 집게에 대해 GAP 미인증농가에서 미생물 오염수준이 4.0 log CFU/g 이상 나타난 것을 확인하였음
- GAP 미인증농가의 장갑에서 4.2 log CFU/g 수준의 대장균군이 확인되어 주기적인 세척과 소독 등의 작업도구 및 장갑의 관리가 필요할 것으로 판단되었음

표 3-2-3. 수확농장으로부터 수집된 오이 미생물 오염도

구분	시료	미생물			
		일반세균	대장균군	대장균	효모/곰팡이
오이 GAP 인증 농가 (n=1)	오이	3.4±0.6	1.7±0.3	ND <sup>1)</sup>	ND
	토양	6.9±0.2	5.0±0.5	ND	1.3±2.3
	용수	2.0±0.3	ND	ND	ND
	장갑	3.16±1.9	2.2±0.3	ND	ND
오이 GAP 미인증 농가 (n=12)	오이	3.5±1.4	2.3±0.3	ND	2.48±0.6
	토양	7.0±0.6	5.0±0.5	ND	3.8±0.6
	용수	1.5±0.8	2.6±1.8	ND	ND
	장갑	4.6±0.4	4.2±0.1	ND	1.7±0.7
	작업도구 (집계)	4.5±2.3	1.2±0.1	ND	4.27±1.9

<sup>1)</sup> ND: Not detected(Detection limit : <1.0 CFU/plate)

□ 토마토농가 미생물모니터링

- 토마토농가로부터 수집한 시료는 GAP 인증농가 3 곳, GAP 미인증농가 4 곳으로부터 30개의 시료를 수집하였음
- GAP 인증농가와 GAP 미인증농가의 토마토의 일반세균수는 GAP 미인증농가에서 0.9 log CFU/g 높게 나타났으며, 토양의 일반세균수도 약 1.7 log CFU/g 높게 나타난 것으로 나타났음
- 토마토의 경우 GAP 미인증농가에서 대장균과 대장균군이 나타났으며, 토마토 선별시 사용되는 컨베이어 벨트에서 토마토의 대장균군 오염수준과 유사한 수준으로 나타나 교차 오염의 가능성이 있는 것으로 나타났음
- 토마토의 작업도구인 원예가위의 경우 GAP 미인증농가의 일반세균 수가 높게 나타났으며 사용 후 세척 없이 천으로 닦아 사용하고 있었음
- 따라서 선별 시 사용하는 컨베이어벨트와 원예가위에 대한 세척 및 소독에 대한 관리가 필요한 것으로 나타났음

표 3-2-4. 수확농장으로부터 수집된 토마토 미생물 오염도

구분	시료	미생물			
		일반세균	대장균군	대장균	효모/곰팡이
토마토 GAP 인증 농가 (n=3)	토마토	3.1±0.4	ND <sup>1)</sup>	ND	ND
	토양	5.5±0.1	ND	ND	ND
	용수	2.1±0.2	ND	ND	ND
	장갑	4.2±0.6	2.1±0.1	ND	ND
	작업도구 (원예가위)	3.5±0.3	ND	ND	ND
	컨베이어 벨트	4.2±0.1	ND	ND	1.3±0.9
토마토 GAP 미인증 농가 (n=4)	토마토	4.0±1.8	3.3±1.6	1.6±1.5	3.4±1.2
	토양	7.2±0.3	ND	ND	3.5±1.8
	용수	2.5±0.8	ND	ND	0.8±0.1

구분	시료	미생물			
		일반세균	대장균군	대장균	효모/곰팡이
	장갑	4.0±1.5	2.8±1.6	ND	3.3±1.1
	작업도구 (원예가위)	4.9±1.3	ND	ND	2.3±1.0
	컨베이어 벨트	4.3±0.6	3.5±2.2	ND	1.0±0.5

<sup>1)</sup> ND: Not detected(Detection limit : <1.0 CFU/plate)

□ 상추농가 미생물모니터링

- 상추농가로부터 수집한 시료는 GAP 인증농가 1 곳, GAP 미인증농가 3 곳으로 부터 14 개의 시료를 수집하였음
- GAP 인증농가와 GAP 미인증농가의 미생물 오염수준은 GAP 미인증농가의 오염수준이 유사하거나 더 높게 나타났음
- 상추의 경우 GAP 인증농가와 GAP 미인증농가에서 대장균군이 나타났으며, 상추를 포함한 토양과 용수, 장갑간의 교차오염에 주의가 필요한 것으로 판단되었음

표 3-2-5. 수확농장으로부터 수집된 상추 미생물 오염도

구분	시료	미생물			
		일반세균	대장균군	대장균	효모/곰팡이
상추 GAP 인증 농가 (n=1)	상추	3.1±0.2	2.9±0.1	ND <sup>1)</sup>	NT <sup>2)</sup>
	토양	6.8±0.1	5.0±0.5	ND	ND
	용수	3.7±0.2	2.5±0.1	ND	ND
	장갑	4.5±0.1	4.3±0.1	ND	ND
상추 GAP 미인증 농가 (n=3)	상추	3.5±0.9	3.2±0.8	ND	2.7±0.6
	토양	7.2±0.3	6.0±0.3	ND	3.0±0.4
	용수	3.8±0.6	1.8±0.6	ND	2.4±0.4
	장갑	4.9±1.0	4.1±0.7	ND	2.0±0.7
	작업도구 (모종삽)	4.46±0.6	3.2±1.1	ND	2.3±0.3

<sup>1)</sup> ND: Not detected(Detection limit : <1.0 CFU/plate), <sup>2)</sup> NT: Not tested

□ 고추농가 미생물모니터링

- 고추농가로부터 수집한 시료는 GAP 인증농가 1 곳, GAP 미인증농가 9 곳으로 부터 34 개의 시료를 수집하였음
- GAP 인증농가와 GAP 미인증농가의 미생물 오염수준은 일반세균, 대장균 및 대장균군, 효모/곰팡이 모두 GAP 미인증농가의 오염수준이 더 높게 나타난 것으로 확인되었음
- 고추농가의 경우 줄기 지주대로 사용하는 집계를 세척 및 소독 없이 지속적으로 사용하는 경우가 많아 오염수준이 GAP 인증농가와 GAP 미인증농가 모두 4.0 log CFU 이상 높게 나타난 것으로 확인되었음

표 3-2-6. 수확농장으로부터 수집된 토마토 미생물 오염도

구분	시료	미생물			
		일반세균	대장균군	대장균	효모/곰팡이
고추 GAP 인증 농가 (n=1)	고추	3.78±0.25	ND <sup>1)</sup>	ND	2.24±0.2
	토양	5.20±0.4	1.50±0.4	ND	3.42±0.5
	용수	2.53±1.85	ND	ND	1.86±0.6
	장갑	2.52±0.2	ND	ND	1.29±0.2
	작업도구 (집계)	4.22±0.11	ND	ND	2.20±0.17
고추 GAP 미인증 농가 (n=9)	고추	4.23±1.5	2.02±1.04	ND	3.23±1.0
	토양	5.56±0.94	1.4±0.9	ND	3.79±0.98
	용수	2.96±1.2	ND	ND	1.97±0.43
	장갑	3.8±0.5	ND	ND	2.1±0.5
	작업도구 (집계)	4.39±0.51	ND	ND	3.57±0.79

<sup>1)</sup> ND: Not detected(Detection limit : <1.0 CFU/plate)

□ 배추농가 미생물모니터링

- 배추 농가의 경우 GAP 미인증 농가만 제외가 완료되어 미인증 농가에 대해서만 미생물 오염도 조사하였음
- 다른 신선농산물과 동일하게 고추, 토양, 용수, 장갑 시료를 대상으로 위생지표세균 (일반세균, 대장균군, 대장균)과 효모/곰팡이에 대해 오염도 조사를 실시하였으며, 그 결과는 아래 표와 같음
- 장갑에서 대장균군이 4.0 log CFU/g 수준으로 나타나 토양의 대장균군오염수준 보다 더 높게 나타났음

표 3-2-7. GAP 미인증 배추 농가의 미생물 오염도

구분	시료	미생물			
		일반세균	대장균군	대장균	효모/곰팡이
배추 GAP 미인증 농가 (n=1)	배추	4.0±0.9	2.5±0.7	ND <sup>1)</sup>	NT <sup>2)</sup>
	토양	5.7±0.7	3.5±0.9	ND	NT
	용수	3.9±1.8	2.6±2.0	ND	NT
	장갑	5.1±0.8	4.1±0.1	ND	NT

<sup>1)</sup> ND: Not detected(Detection limit : <1.0 CFU/plate), <sup>2)</sup> NT: Not tested

3. 현장방문조사를 통한 미생물학적 위해요인 발생원인 분석 및 위생안전관리 개선 방안 마련

□ GAP 농산물(상추, 오이, 고추, 토마토, 딸기) 재배과정도를 확인하였음

- 상추, 오이, 배추의 재배과정 및 주요 농작업은 아래 그림 3-2-2과 같음
- 수확 후 세척 과정 없이 농가에서 출하하는 것으로 확인되었음
- 개인위생 및 작업도구를 대상으로 중점적으로 미생물학적 위해요소를 관리할 필요성이 있는 것으로 나타났음

- 상추



- 오이



- 고추



- 토마토



- 딸기



그림 3-2-2. 신선농산물의 재배과정도

- 농가 생산현장을 방문 및 주변 환경조사와 위해요소 발생원인 도출 및 개선방안을 마련하였음
  - 딸기, 오이, 토마토, 상추, 고추 농가에 대하여 선정된 GAP 인증농가 및 미인증 농가 생산현장을 방문하여 현장조사를 실시하였고 선정된 신선농산물은 수확 후 세척작업이 없이 출하 및 유통되는 작물로 선정하였음
  - 세척단계의 부재로 작업자 및 작업도구 위생관리, 농업용수 관리의 중점적인 관리를 통한 미생물학적 위해요소 오염 관리의 필요성 있는 것으로 판단되었음
  - 모니터링 결과를 토대로 농가의 위생관리 실태(작업 중의 작업자의 개인위생, 작업도구의 위생관리)를 조사하여 미생물학적 위해요인 발생 원인을 분석하고, 이에 따른 관리개선 방안을 다음에 제시하였음

표 3-2-8. 딸기의 GAP 인증·미인증 된 신선농산물 현장조사를 통한 위해요소 발생원인 분석 및 개선방안 제시





구분		현황		위해요소 발생원인	개선방안
농업 용수	GAP 인증농가		지하수를 사용함. 지하수 관정이 비닐로 덮여 있고 주변에 간이 화장실이 있음.	-	<ul style="list-style-type: none"> <li>주변 환경에 의해 용수가 오염되지 않도록 관정 및 공급관 주변 청결관리.</li> </ul>
	GAP 미인증농가		지하수를 사용함. 주변에 간이 화장실과 수돗가가 있으나 정리가 잘 되지 않음.	<ul style="list-style-type: none"> <li>오염된 용수 사용으로 인한 작물의 오염 가능성 있으며, 수돗가가 관리 되지 않음.</li> </ul>	
농자재 정리 현황	GAP 인증농가		농자재 보관함이 마련되어 있으나 무방비한 상태로 나열되어 있음.	<ul style="list-style-type: none"> <li>농자재의 관리 부재</li> <li>오염된 농자재로부터 교차오염 가능성 있음.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>농기구 및 농자재를 보관할 필요가 있을 시 별도의 공간으로 구분하여 청결하게 보관.</li> </ul>
	GAP 미인증농가		농자재들이 보관함에 정리되어 있지 않음.		
농장 주변 현황	GAP 인증농가		농장 외부에 농약병 쓰레기를 비롯한 오염물질들이 쌓여있음.	<ul style="list-style-type: none"> <li>쓰레기나 폐자재를 방치함으로써 해충이나 오염물이 토양으로 스며들어 미생물 오염 가능성 있음.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>농약병을 지정된 장소에 폐기하고 다 쓴 자재나 농기구 방치 하지 않음.</li> </ul>
	GAP 미인증농가				
개인 위생 (장갑)	GAP 인증농가	GAP인증 및 미인증 농가 모두 수확 시 사용되는 장갑을 반복적으로 사용 및 사용 후 방치		<ul style="list-style-type: none"> <li>장갑의 반복 사용으로 미생물의 오염도가 증가함.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>수확 및 포장 작업시 일정 간격으로 장갑을 교체</li> <li>사용 종료 후 세척하여 보관.</li> </ul>
	GAP 미인증농가				



표 3-2-9. 오이의 GAP 인증·미인증 된 신선농산물 현장조사를 통한 위해요소 발생원인 분석 및 개선방안 제시

구분		현황		위해요소 발생원인	개선방안
농업 용수	GAP 인증농가		지하수를 사용하고 물탱크가 설치되어 있음.	<ul style="list-style-type: none"> <li>농업용수의 탱크 내 장기간 보관에 따른 미생물 오염 가능성.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>탱크내 용수 관리기준 마련.</li> <li>주변 환경에 의해 용수가 오염되지 않도록 관정 및 공급관 주변 청결관리.</li> </ul>
	GAP 미인증농가		지하수 관정 주변이 청결하지 못하고 바로 옆에 간이화장실이 설치되어 있음.		
농자재 정리 현황	GAP 인증농가		별도 보관함은 없으나 농자재 별로 구분하여 바닥과 이격하여 종류별로 보관하고 농약 보관함 설치되어 있음.	-	<ul style="list-style-type: none"> <li>농자재 보관 시 종류별로 구분하여 보관하되, 바닥과 이격하여 보관.</li> </ul>
	GAP 미인증농가		농자재 보관 장소가 별도 설치되어 있으나 용도 구분 없이 흙바닥에 방치되어 있음.	<ul style="list-style-type: none"> <li>농자재들이 흙바닥에 방치되어 흙 속에 존재하는 미생물의 교차 오염 가능성 있음.</li> </ul>	
수확 후 작업 공간	GAP 인증농가		하우스 앞쪽에 선별 및 포장을 위한 공간이 있으며, 이 공간에 정수기가 설치되어 있어 물이나 차를 마실 수 있도록 되어 있음.	<ul style="list-style-type: none"> <li>음료 섭취 시 부주의에 따른 작물의 미생물 오염 가능성 있음.</li> <li>작업 공간이 흙에 노출되어 있어 흙 속에 존재하는 미생물에 의해 작물이 오염될 가능성이 있음.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>작업공간에서 음식을 섭취하지 않도록 정수기 및 조리도구 등은 별도 공간 마련</li> <li>작업 공간이 흙에 직접적으로 노출되지 않도록 하며, 작업 후 작업 공간 정리정돈</li> </ul>
	GAP 미인증농가		흙 바닥에 천막을 깔고 선별 및 포장 작업을 실시. 작업 후 정리되어 있지 않음.		

표 3-2-10. 토마토의 GAP 인증·미인증 된 신선농산물 현장조사를 통한 위해요소 발생원인 분석 및 개선방안 제시

구분		현황		위해요소 발생원인	개선방안
농자재 정리 현황	GAP 인증농가		포장 박스와 작업복이 함께 방치되어 있음.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 농자재 및 작업도구 청결관리 부재에 의한 미생물 오염 발생 가능성 있음.</li> <li>• 농자재 보관 장소 부재 및 정리정돈 미흡에 의한 발생가능성 있음.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 농자재 및 농기구의 세척을 통한 관리와 보관 장소 마련</li> </ul>
	GAP 미인증농가		농자재 보관 장소가 농장내부에 있으며 정리되지 않음.		
농장 주변 현황	GAP 인증농가		주위에 다른 논밭에 의한 오염가능성이 있음.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 작업 후 농자재가 방치되어 있고 주변 환경으로 인해 오염물질이 유입될 가능성이 있음.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 외부로부터 오염가능성을 예방하고 하우스 주변정리정돈 실시</li> </ul>
	GAP 미인증농가		사용한 농기구와 농자재를 화장실 주변에 보관하고 있음.		
작업 공간 확보	GAP 인증농가		작업공간과 생활공간이 분리되지 않음.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 농장 내부에 빨래 건조 등의 생활공간과 분리되지 않음.</li> <li>• 작업도구 등을 보관 장소 없이 정리되지 않아 교차오염의 발생가능성 있음.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 지정된 장소에서 빨래를 하고 농장 내 작업공간과 분리</li> </ul>
	GAP 미인증농가				
개인위생 (장갑)	GAP 인증농가	GAP 인증여부와 관계없이 지속적으로 사용하였으며, 선별 시 하루 종일 사용하거나 진물에 의해 딱딱해지는 경우에만 교체하는 등 대부분 재사용하는 경우가 많음.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 지속적으로 장갑을 재사용하는 경우가 많고 교체의 필요성을 인식하지 못해 작물의 교차오염이 발생할 가능성이 있음.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 장갑 재사용에 대한 세척 방법과 교체의 필요성 알림</li> </ul>	
	GAP 미인증농가				

표 3-2-11. 고추의 GAP 인증·미인증 된 신선농산물 현장조사를 통한 위해요소 발생원인 분석 및 개선방안 제시

구분		현황		위해요소 발생원인	개선방안
농장내부	GAP 인증 농가		관정작업으로 잘 정돈됨.	<ul style="list-style-type: none"> <li>관정 및 공급관 주변의 오염물질이 내부로 스며들어 용수의 미생물 오염 및 오염된 용수 사용으로 인한 물의 미생물 오염 가능성 있음.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>주변 환경에 의해 용수가 오염되지 않도록 관정 및 공급관 주변 청결관리</li> </ul>
	GAP 미인증 농가		농업용수 공급 시설을 통해 공급되는 용수를 사용함. 공급관 주변 정리가 되어 있지 않음.		
농자재 정리 현황	GAP 인증 농가		농자재 및 수확용 박스가 정돈 되어있음.	-	<ul style="list-style-type: none"> <li>농자재 보관 시 주기적인 세척과 정리를 실시하여 관리할 필요가 있음.</li> </ul>
	GAP 미인증 농가		농자재가 혼잡하게 나열되어 있음.	<ul style="list-style-type: none"> <li>농자재의 정리정돈 불량.</li> <li>사용 후 그대로 보관 시 농산물의 오염도가 증가할 가능성이 있음.</li> </ul>	
선별 및 작업장 현황	GAP 인증 농가		선별 및 작업장의 정리정돈이 되어있음.	<ul style="list-style-type: none"> <li>오염된 상태에서 작업 시 작물에 교차오염가능성이 높음.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>작업장의 주기적인 청소와 정리정돈을 통해 주변환경을 깨끗이하여 교차 오염을 사전에 예방할 수 있음.</li> </ul>
	GAP 미인증 농가		선별 및 작업장 공간이 따로 분리되어 있지 않아 정리 되지 않음.		
개인위생 (장갑)	GAP 인증 농가	GAP인증 농가 일회용장갑을 사용함.		<ul style="list-style-type: none"> <li>장갑의 반복 사용으로 미생물의 오염도 증가 가능성.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>수확 및 포장 작업 시 일정 간격으로 장갑 교체.</li> <li>사용 종료 후 세척하여 보관.</li> </ul>
	GAP 미인증 농가	미인증 농가 수확 시 사용되는 장갑을 반복적으로 사용 및 사용 후 방치함.			

#### 4. 신선농산물에 대한 관리점 도출

- 딸기, 오이, 방울토마토의 GAP 인증과 미인증 농장의 현장조사를 통해 개인위생 및 작업도구 위생관리에 대해서 관리가 미흡한 것으로 확인되었음
- 모니터링 결과를 토대로 농장방문횟수가 많고, 신선농산물 중 쉽게 상처입고 물러지는 딸기를 중점적으로 미생물 오염 및 저감화 방안을 적용할 수 있다면 다른 신선 농산물에 대해 적용이 가능할 것으로 판단되었음
- 모니터링을 실시한 딸기농가 1곳을 제외하여 딸기의 미생물 저감 및 오염예방을 위한 관리점을 도출하고 적용하였음
- 모니터링에서 장갑의 경우 선별 시 진물에 의해 굳거나 딱딱해 지기 전까지 하루 종일 사용하거나 교체 하지 않은 경우가 많았음
- 실제 농장에서 사용하는 바구니는 세척여부를 확인 할 수 없었으며, 수확부터 선별 전까지 딸기와 직접 접촉하는 수확바구니의 바닥 신문지는 '14년에 발행된 신문지로 교체하지 않고 계속 사용된 것으로 추정됨
- 도출된 관리점으로 작업도구를 선정하였으며, 작업자의 장갑, 딸기와 직접 닿는 신문지 및 바구니를 선정하였음



작업자의 장갑                      2014년 3월 신문지                      관리가 미흡한 바구니  
그림 3-2-3. 선별 시 사용되는 작업도구(장갑, 신문지, 바구니)

#### 5. 유해미생물(세균 및 바이러스) 저감을 위한 국내의 장치 및 기술 조사

- 식품의약품안전처의 식품 중 위해 세균 저감화사업 연구보고서(2007) 및 발표 된 논문 등을 중심으로 신선농산물의 미생물 저감화를 위한 방안 조사하였음
- 신선농산물에 대한 미생물 저감화 방법을 크게 물리적, 화학적 방법으로 분류되었으며, 아래 표 3-2-12와 같음

표 3-2-12. 신선농산물에 대한 미생물 저감화 방법

	방법	설명
물리적 방법	방사선 조사법	방사능 물질에서 나오는 에너지를 식품에 쬐이는 것. 식품별 조사처리기준이 각각 다르며 인체에 유해한수준 이하로 사용
	고전압 처리법	고전압에 의한 식품저장방법으로 고전압에 의한 미생물의 세포막을 파괴하여 사멸함
	플라즈마 처리법	비열 플라즈마 식품 미생물 저감화 기술은 온도가 높지 않게 형성된

	방법	설명
	초음파 처리법	플라즈마를 이용하여 식품에 오염된 미생물을 저해시키는 기술임 고추과가 식품 표면에 오염된 미생물의 제거 및 효소의 불활성을 유도시키며 다른 기술과 병행하여 사용됨
	오존 처리법	유기물을 분해하여 살균, 탈취, 생화학적 산소요구량 및 화학적 산소 요구량을 낮춤
화학적 방법	전해수 처리법	식염 및 염산을 전기분해하여 제조한 살균수
	이산화염소가스법	이산화염소는 강력한 산화 작용에 의해 세균의 세포막을 파괴함으로써 세균의 사멸을 유도
	알코올 소독법	세균 표면의 막을 뚫고 세균의 단백질을 응고시켜 제거

- 대부분의 신선농산물은 세척단계 없이 수확과 유통단계를 거치기 때문에 미생물의 오염으로부터 식품의 위생 및 안전성이 요구됨
- 실제로 빈번하게 미생물이 검출되는 경우도 있으며, 이를 예방하기 위해 신선농산물에 대한 유해 미생물 오염 예방 및 저감화가 필요할 것으로 판단되었음
- 비가열처리 방법인 물리적 방법은 고가의 장비가 필요하고, 화학적 방법은 대부분 세척을 요구하기 때문에 본 과제에서 제안하고자 하는 신선농산물의 미생물 저감화 방안으로 적합하지 않은 것으로 판단됨



그림 3-2-4. 딸기의 수확 후 유통과정

- 실제 딸기의 수확 후 유통과정을 살펴보면 세척단계를 거치지 않고 유통되며, 딸기의 과실부위는 물리적인 충격에 약하기 때문에 세척이 불가능한 것을 확인하였음
- 따라서 비세척 신선농산물인 딸기의 미생물 제어를 위해 재배단계 위생관리에 대한 미생물 저감화 방안의 도입이 필요한 것으로 나타났음

## 6. 신선농산물 재배현장 중심의 미생물 저감화 방안모색(딸기, 고추 농장을 중심으로)

- 수확단계에서 작업장갑의 주기적인 교체를 통한 미생물 예방 및 저감화
  - 관리점으로 선정된 개인위생에 의한 미생물 저감화 방안으로 총 3시간 중 1시간마다 장갑을 교체한 실험구와 3시간 동안 교체하지 않은 장갑을 대조구로 하여 작업 전과 작업 후의 장갑의 주기적인 교체실험에 대한 미생물학적 평가를 실시하였음

- 작업 후 장갑과 딸기와 고추 중 일반세균수와 작업 전 장갑과 딸기 중 일반세균 수 차이를 나타내는 장갑교체와 미교체 일반세균의 증가율을 수치화 한 결과, 작업 전과 후의 오염수준 차이가 클수록 값이 증가하며, 값이 클수록 미생물의 오염 정도가 증가 되는 것을 확인하였음

표 3-2-13. 장갑의 주기적인 교체와 미교체 방법적용

○ 딸기

샘플	구분	*작업 전 (log <sub>10</sub> CFU/g)	*작업 후 (log <sub>10</sub> CFU/g)	미생물 성장률 (%)
장갑	장갑 미교체	3.09±0.27	5.39±1.67	74.43
	장갑 교체	3.58±0.38	4.13±0.32	15.36
딸기	장갑 미교체	0.77±1.09	2.56±2.20	232.47
	장갑 교체	1.26±0.91	1.63±0.64	29.37

\* log<sub>10</sub> CFU/g은 일반세균 수를 나타냄.

○ 고추

샘플	구분	*작업 전 (log <sub>10</sub> CFU/g)	*작업 후 (log <sub>10</sub> CFU/g)	미생물 성장률 (%)
장갑	장갑 미교체	1.21±0.56	3.52±0.86	190.91
	장갑 교체	1.37±0.7	1.75±0.9	27.74
고추	장갑 미교체	3.37±0.24	4.24±0.52	25.82
	장갑 교체	3.25±0.31	3.65±0.31	12.31

\* log<sub>10</sub> CFU/g은 일반세균 수를 나타냄.

- 장갑의 재사용을 위한 세척법(세제, 락스, 비눗물, 수돗물, 삶는 방법 이용)의 사후관리 적용
  - 수확단계의 딸기 농장에서는 대부분 선별 및 포장 단계에서 작업자의 장갑을 교체하지 않고 사용하고 있었으며, 사용 후 비위생적으로 관리된 장갑을 재사용하는 경우가 빈번하게 관찰 됨. 작업자의 장갑을 1시간 이내의 단위로 교체하는 것이 미생물 오염을 최소화하는데 큰 효과가 있는 것으로 나타나 작업자의 주기적 장갑교체에 사용된 장갑을 재사용할 필요가 있음
  - 사용된 장갑의 미생물을 효과적으로 제거할 수 있는 위생적인 세척방법으로 세제, 락스, 비눗물, 수돗물, 삶는 방법을 사용하여 실험을 실시함
  - 락스와 삶는 방법이 이용하는 것이 오염된 미생물을 효과적으로 제어하는 방법으로 판단되었음
  - 고추농가는 일회용 장갑을 사용하므로 재사용을 위한 사후관리는 적용하지 않았음

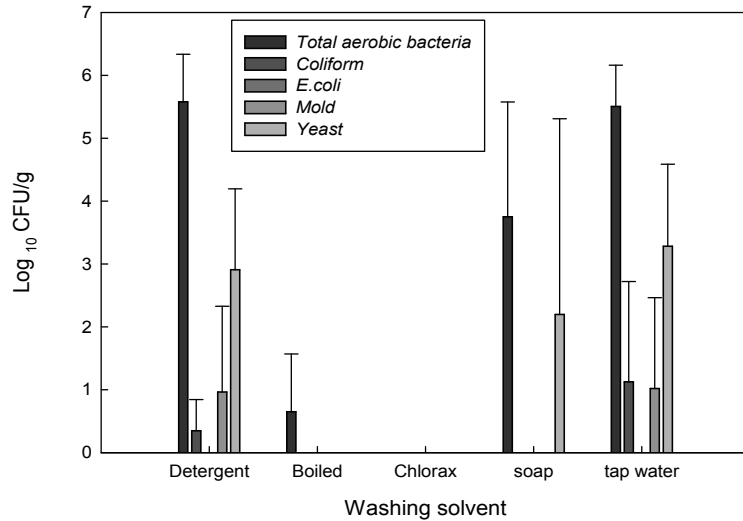


그림 3-2-5. 세제를 이용한 세척방법의 미생물학적 분석 결과

### 7. 신선농산물 유통 및 저장단계의 미생물 저감화 방안모색

- 유통 중 보관온도에 따른 미생물 저감화 효과확인(냉장, 상온)
  - 유통 중의 환경이 미생물의 오염에 미치는 영향을 확인하고자 시중에 판매중인 딸기를 수집하여 미생물 분석하였음.
  - 수집 된 딸기는 냉장과 상온에 진열되어 판매되는 딸기를 사용하였음
  - 마트 딸기의 모니터링 결과 냉장보관으로 진열된 딸기의 경우 상온보관으로 진열된 딸기에 비해 미생물 수가 낮게 나타났음
  - 추가로 농가에서 수확직후의 딸기 중 미생물 분석 결과( $2.77 \pm 0.73 \log_{10} \text{CFU/g}$ )와 마트딸기의 분석결과를 비교하였을 때 산지의 일반세균 수 보다 냉장보관 된 마트딸기의 일반세균수  $1.85 \pm 0.21 \log_{10} \text{CFU/g}$  으로 낮게 나타났음

표 3-2-14. 경남 진주 마트딸기에 대한 미생물학적 평가 결과

장소	샘플	샘플명	*일반세균	*대장균군	*대장균
마트	딸기	A 마트 (4℃)	$1.85 \pm 0.21$	ND	ND
		B 마트 (20℃)	$2.75 \pm 0.14$	ND	ND
		C 마트 (20℃)	$2.45 \pm 0.30$	ND	ND
		평균	$2.35 \pm 0.46$	ND	ND

<sup>1)</sup> ND: Not detected(Detection limit : <1.0 CFU/plate)

- 딸기를 이용한 유통과정 중 냉장과 상온보관에 따른 미생물학적 오염 분석
  - 유통과정에서 보관온도 4℃냉장보관과 20℃상온보관에 따른 미생물 수에 대한 차이를 1일, 3일, 5일 보관하였음
  - 1일차에서 상온보관의 미생물 오염 수준은 크게 증가한 후 점점 감소하지만 냉장보관의 경우 3일까지 감소하다가 그 이후 낮은 수준으로 유지되는 경향을 확인하였음



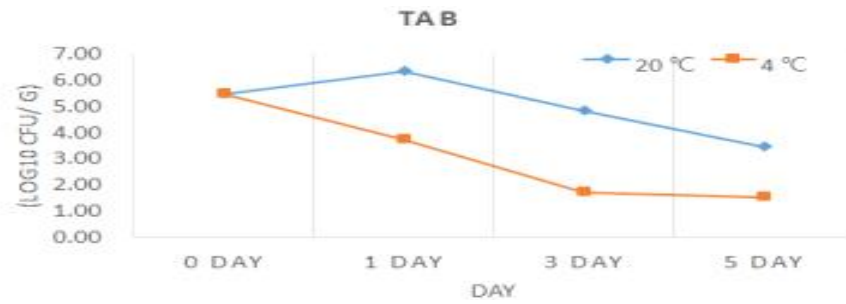


그림 3-2-6. 유통환경에 따른 미생물 저감 효과확인

□ 소형 플라즈마 발생장치를 이용한 수확 및 유통과정의 저감효과 확인



그림 3-2-7. 플라즈마 발생장치 실험방법

- 국내 기업에서 판매하고 있는 플라즈마 소형 발생장치를 신선농산물의 유통단계에 적용한다면 유통 중의 미생물 증식을 억제 또는 감소할 수 있을 것으로 판단되어 실험군으로 플라즈마를 1-5일 동안 조사한 오이와 고추로 하고 플라즈마를 처리하지 않은 처리하지 않은 것을 대조구로 하여 결과를 확인하였음
- 1-3일 동안 관찰한 결과 플라즈마 발생장치와 함께 보관한 오이는 미생물 수가 점차 감소하였으며, 플라즈마 발생장치가 없는 대조구는 점차 증가하는 경향을 보였음
- 1-5일 동안 플라즈마 발생장치와 함께 보관한 고추는 1일 만에 일반세균수가 약 0.7 log CFU/g 감소하였으며, 플라즈마 발생장치가 없는 대조구는 약 0.07 log CFU/g으로 감소하는 경향을 보임
- 따라서 플라즈마의 유해미생물 저감에 효과가 있는 것으로 판단되었음

표 3-2-15. 플라즈마 발생장치를 이용에 따른 미생물학적 오염도

○ 오이

샘플	일반세균	대장균군	대장균	효모/곰팡이
plasma 0day	4.18±0.18	ND	ND	1.85±0.17
plasma 1day	3.64±0.2	ND	ND	0.65±0.2
plasma 3day	3.57±0.08	ND	ND	ND
non-plasma 0day	4.3±0.32	ND	ND	1.08±0.41
non-plasma 1day	4.52±0.53	ND	ND	1.56±0.16
non-plasma 3day	5.64±0.22	ND	ND	ND

<sup>1)</sup> ND: Not detected(Detection limit : <1.0 CFU/plate)



○ **고추**

샘플	일반세균	대장균군	대장균	효모/곰팡이
plasma 0day	5.19±0.16	3.61±0.1	ND	1.77±0.2
plasma 1day	4.51±0.1	2.44±0.3	ND	1.51±1.06
plasma 3day	3.3±0.19	2.02±0.25	ND	ND
plasma 5day	2.26±0.17	ND	ND	ND
non-plasma 0day	5.25±0.24	3.54±0.3	ND	1.84±0.3
non-plasma 1day	5.18±0.4	2.45±0.21	ND	2.7±0.13
non-plasma 3day	4.51±0.14	2.37±0.06	ND	1.55±0.2
non-plasma 5day	4.4±0.09	2.13±0.1	ND	ND

<sup>1)</sup> ND: Not detected(Detection limit : <1.0 CFU/plate)

**8. GAP 인증 신선농산물의 미생물학적 위생안전관리 및 가이드라인 확립**

- GAP 인증 농가와 미인증 농가를 방문하여 확인한 위해요소 원인을 개선하기 위해 중요 관리점을 설정하였음
  - 재배단계는 토양, 용수, 퇴비 등 환경으로부터 주로 위해요소가 발생되므로 제어하는데 어려움이 있을 것으로 판단되었음
  - 수확단계부터 유통단계까지의 위해요소는 작업자의 위생(손세척 여부, 개인 위생관리 등), 수확도구 관리(주기적인 세척여부, 정리정돈 여부 등), 장갑교체와 온도관리 등과 같이 위해요소로부터 중요관리점 확인을 통해 사전에 제어가능 할 것으로 판단되었음





그림 3-2-8. 신선농산물의 단계별 위해요소 중요관리점

(1) GAP 농산물 품목별 선행요건프로그램을 통한 가이드라인 방안

딸기의 미생물학적 안전성확보를 위한 위생관리 가이드라인	
수확 단계	<ul style="list-style-type: none"> <li>수확에 사용하는 장갑의 주기적인 세척 및 소독과 장갑 교체 등의 방법으로 관리한다.</li> <li>수확 작업 전·후 손 세척 및 손 소독을 실시한다.</li> <li>수확에 사용하는 작업복은 청결한 상태를 유지하고 위생마스크와 위생모를 착용한다.</li> <li>수확 작업자의 개인위생과 관련하여 설사증상이나 기타 질병 등에 대해 작업자 스스로 사전에 관리한다.</li> <li>작업장과 농기구 및 농자재 보관 장소는 따로 분리한다.</li> <li>야생동물이나 애완동물의 출입을 방지한다.</li> <li>수확에 이용되는 바구니 및 신문지는 주기적인 세척과 교체를 실시한다.</li> <li>작업자의 개인위생 관리와 수확 후 위생관리에 대해 주기적인 교육을 실시한다.</li> </ul>
선별 및 포장 단계	<ul style="list-style-type: none"> <li>선별 및 포장에 사용하는 장갑의 주기적인 세척 및 소독과 장갑 교체 등의 방법으로 관리한다.</li> <li>선별 및 포장 작업 전·후 손 세척 및 손 소독을 실시한다.</li> <li>선별에 사용하는 작업복은 청결한 상태를 유지하고 위생마스크와 위생모를 착용한다.</li> <li>선별 및 포장 수확 작업자의 개인위생과 관련하여 설사증상이나 기타 질병 등에 대해 작업자 스스로 사전에 관리한다.</li> <li>선별장 내 작업 도구의 보관 장소를 마련하고 작업장 내에서만 사용한다.</li> <li>선별장 내 방충망을 설치하고 파리등의 벌레와 야생동물 및 애완동물의 출입을 방지한다.</li> <li>선별 시 병든 딸기를 제거하여 부패균으로부터 오염을 예방한다.</li> <li>포장지와 포장 박스는 바닥과 일정 간격을 두고 사용하지 않을 때는 외부에 노출 되지 않도록 보관한다.</li> <li>작업장 및 작업대는 항상 깨끗한 상태로 먼지 제거와 소독을 실시한다.</li> <li>선별에 이용되는 바구니 및 신문지는 주기적인 세척과 교체가 필요하다.</li> <li>작업자의 개인위생 관리와 선별 후 위생관리에 대해 주기적인 교육을 실시한다.</li> </ul>
유통 단계	<ul style="list-style-type: none"> <li>유통에 사용되는 보관 용기와 장비는 식품의 오염을 예방하도록 유지하고 청결하게 관리한다.</li> </ul>

딸기의 미생물학적 안전성확보를 위한 위생관리 가이드라인	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 유통과정에서 냉장 온도는 온도를 유지할 수 있는 10℃이하에서 보관하며 직사광선은 피한다.</li> </ul>

그 외 신선농산물의 미생물학적 안전성 확보를 위한 위생관리 가이드라인	
수확 단계	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 수확에 사용하는 장갑의 주기적인 세척 및 소독과 장갑 교체 등의 방법으로 관리한다.</li> <li>● 수확 작업 전·후 손 세척 및 손 소독을 실시한다.</li> <li>● 수확에 사용하는 작업복은 청결한 상태를 유지하고 위생마스크와 위생모를 착용한다.</li> <li>● 수확 작업자의 개인위생과 관련하여 설사증상이나 기타 질병 등에 대해 작업자 스스로 사전에 관리한다.</li> <li>● 작업장과 농기구 및 농자재 보관 장소는 따로 분리한다.</li> <li>● 야생동물이나 애완동물의 출입을 방지한다.</li> <li>● 수확에 이용되는 바구니 및 집게 등의 도구는 주기적인 세척과 교체를 실시한다.</li> <li>● 작업자의 개인위생 관리와 수확 후 위생관리에 대해 주기적인 교육을 실시한다.</li> </ul>
선별 및 포장 단계	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 선별 및 포장에 사용하는 장갑의 주기적인 세척 및 소독과 장갑 교체 등의 방법으로 관리한다.</li> <li>● 선별 및 포장 작업 전·후 손 세척 및 손 소독을 실시한다.</li> <li>● 선별에 사용하는 작업복은 청결한 상태를 유지하고 위생마스크와 위생모를 착용한다.</li> <li>● 선별 및 포장 수확 작업자의 개인위생과 관련하여 설사증상이나 기타 질병 등에 대해 작업자 스스로 사전에 관리한다.</li> <li>● 선별장 내 작업 도구의 보관 장소를 마련하고 작업장 내에서만 사용한다.</li> <li>● 선별장 내 방충망을 설치하고 파리등의 벌레와 야생동물 및 애완동물의 출입을 방지한다.</li> <li>● 선별 시 병든 오이를 제거하여 부패균으로부터 오염을 예방한다.</li> <li>● 포장지와 포장 박스는 바닥과 일정 간격을 두고 사용하지 않을 때는 외부에 노출 되지 않도록 보관한다.</li> <li>● 작업장 및 작업대는 항상 깨끗한 상태로 먼지 제거와 소독을 실시한다.</li> <li>● 선별에 이용되는 바구니 및 신문지는 주기적인 세척과 교체가 필요하다.</li> <li>● 작업자의 개인위생 관리와 선별 후 위생관리에 대해 주기적인 교육을 실시한다.</li> </ul>
유통 단계	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 유통에 사용되는 보관 용기와 장비는 식품의 오염을 예방하도록 유지하고 청결하게 관리한다.</li> <li>● 유통과정에서 가급적 냉장 상태에서 유통시키고 직사광선은 피한다.</li> </ul>

## 9. 신선농산물 고추농가를 대상으로 하는 GAP 인증지원 및 GAP 인증 전·후의 미생물 오염도 변화

### 가. 고추농가 GAP 인증취득 지원

- GAP 인증 과정은 다음 그림 3-2-9와 같이 인증신청서를 작성한 후 인증기관을 통해 약 40일 후 인증서를 발급 받을 수 있음
- GAP 인증 과정을 위해 필요한 서류는 신청서와 위해요소관리계획서 외 경영관련자료(영농일지 등), 기본교육이수 확인서, 시비처방서, 토지대장 및 지적도, 종자구입확인서, 농자재 구입내역서 등의 추가 서류를 제출해야 하며, GAP 인증 서류 중 미생물 안전성 자료와 가장 연관성이 높은 위해요소관리계획서를 직접 작성하여 인증서 발급을 완료하였음

- 미생물학적 안전성 확보의 문제점: 위해요소분석 작성 시 각각의 품목에 상관없이 동일한 내용으로 작성하여 제출하여도 무관하며, 식중독 세균을 관리하기 위한 예방조치방법으로 농장주변 위생 및 청결유지 등의 포괄적인 방안을 제시하고 있으므로 미생물관리에 효과적이고 구체적인 사항을 작성할 필요가 있는 것으로 판단됨

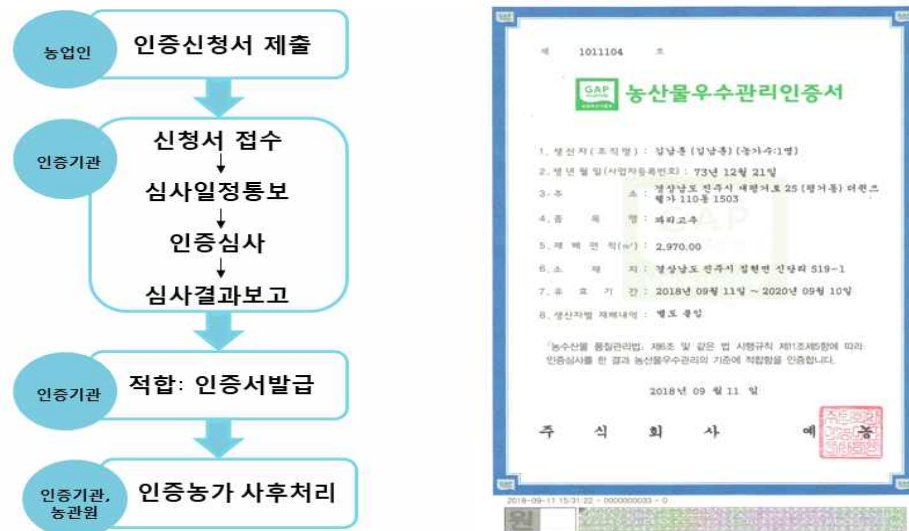


그림 3-2-9. GAP 인증과정 및 인증서

①과정	②구분	③잠재적 위해요소		④위해성 평가			⑤위해성평가결과	예방조치 방법
		종류	위해요소	심각성	발생 가능성	점수		
재배환경	토양	생	식중독세균	2	/	2	<input type="checkbox"/> 위해있음 <input checked="" type="checkbox"/> 위해없음 <input type="checkbox"/> 해당없음	농장주변 위생 및 청결 관리
		화	중금속	2	/	2	<input type="checkbox"/> 위해있음 <input checked="" type="checkbox"/> 위해없음 <input type="checkbox"/> 해당없음	중금속분석 정기 실시
	생	바이러스	2	/	2	<input type="checkbox"/> 위해있음 <input checked="" type="checkbox"/> 위해없음 <input type="checkbox"/> 해당없음	용수원 주변 청결 관리	
총								

그림 3-2-10. GAP 위해요소관리계획서 중 위해요소 분석 작성

나. 고추 농가의 GAP 적용 전·후 미생물 오염도 현황 조사

- 고추농가의 GAP 인증 전과 후로 나누어 미생물학적 오염도를 조사를 실시하였음
- GAP 인증 전 농장 내부와 외부로 대상으로 작업도구 관리와 자가선별장 정리정돈 등의 컨설팅을 실시하였으며, 고추, 토양, 용수, 장갑(수확 전 인증을 실시하여야 하므로 수확용 장갑은 샘플링하지 못함), 작업도구(집게)를 대상으로 미생물 오염수준을 확인하였음
- GAP 인증 전과 후의 미생물 오염 수준을 비교한 결과, 모든 시료에서 GAP 인증 후 일반세균과 대장균군이 감소한 것으로 나타났으나 앞서 확인한 문제점을 포함하여 인증과정을 고려하였을 때 GAP 농산물의 안전성 확보를 위한 관리방법의 보완이 필요한 것으로 판단되었음



그림 3-2-11. GAP 인증적용 전·후 비교

표 3-2-16. 고추의 GAP 인증·미인증적용 전·후 미생물 오염 분석 비교

GAP 인증여부		미생물(log CFU/g, cm <sup>2</sup> )			
		일반세균	대장균군	대장균	효모/곰팡이
고추	전	4.62±0.4	ND	ND <sup>1)</sup>	3.64±0.81
	후	3.78±0.25	ND	ND <sup>1)</sup>	2.24±0.2
토양	전	5.48±0.22	1.72±0.41	ND	3.71±0.6
	후	5.20±0.4	1.50±0.4	ND	3.42±0.5
용수	전	3.14±1.05	ND	ND	2.45±0.52
	후	2.53±1.85	ND	ND	1.86±0.6
장갑	전	NT <sup>2)</sup>	NT	NT	NT
	후	2.52±0.2	ND	ND	1.29±0.2
작업도구 (집계)	전	4.58±0.37	ND	ND	2.08±0.31
	후	4.22±0.11	ND	ND	3.20±0.17

<sup>1)</sup> ND: Not detected(Detection limit : <1.0 CFU/plate), <sup>2)</sup> NT: Not tested

## 10. 우수농산물관리인증제도(GAP) 미생물학적 위생안전관리 개선 방안 확립

### 가. GAP 농산물 미생물학적 위생안전관리 개선방안 제시

#### □ 작업도구 관리

- 앞서 수행한 모니터링 결과, GAP 인증농가와 미인증 농가 모두 작업 전·후로 작업도구의 세척이나 소독 등의 주기적인 관리가 필요한 것으로 나타났음
- 작업도구관리 및 위생 교육이나 작물별/재배 및 수확 단계에 필요한 작업도구를 세척하는 회수계획 또는 지원이 필요할 것으로 판단됨
- GAP 인증 시 영농일지에 작업내용 외에 작업도구의 세척 및 관리와 위생교육에 대한 내용을 작성하도록 하거나, 작성여부를 평가항목에 포함시켜 관리하는 등의 방안이 필요한 것으로 판단됨

#### □ 위해요소관리프로그램 작성내용 보완

- GAP 인증과정에서 확인한 위해요소분석 작성내용에 대해 각각의 품목별에 해당하는 관리방법이나 예방조치방법을 구체적인 내용을 작성하도록 유도하는 등의 보완이 필요한 것으로 확인되었음
- 또한 발생 가능성이 있는 위해요소에 대한 중요관리점을 확인한 후 사전에 위해요소로부터 예방이 가능하도록 HACCP의 선행요건관리프로그램의 표준 위생 관리기준(SSOP)에 준한 관리방안이 필요한 것으로 판단되었음

- 따라서 작업도구 관리에 대한 인식개선과 선행요건관리프로그램을 실시한다면 위해요소로부터 사전에 예방할 것으로 판단되고, GAP 인증 시 위해요소관리에 대한 구체적인 가이드라인과 주기적인 체크리스트를 작성 및 보급한다면 GAP 농산물의 미생물학적 위생안전관리가 개선될 수 있을 것으로 판단됨



### 3-3. 농산물에서 미생물학적 평가 및 위생안전관리 개선 방안 확립

#### 3-3 연구요약

- ALOP 개념 적용 신선농산물 관련 재배에서 유통까지 유해 미생물에 의한 국내 질병발생 현황과의 관련성 및 risk factor 분석
- 농산물에 대한 미생물학적 모니터링 결과에 대한 통계학적 오염수준 정량화
- 베이지안 네트워크를 이용한 농산물 재배단계 동태학적 (Fate & Transport) 모델 개발
- 동태학적 모델 기반 QMRA 활용 농산물 재배단계 안전수준 평가
- QMRA 기반 위해수준 평가 및 이를 이용한 농산물에서 유해 미생물 관리 우선순위 제안
- 위해수준에 근거한 미생물 안전기준으로 제외국 농산물 미생물 안전관리 기준·규격 비교 검토를 통한 Sampling plan 기준(안) 제안

#### 1. 신선농산물 관련 유해미생물과 국내 질병발생과의 관련성 분석 및 통계학적 오염수준 정량화

##### 가. 신선농산물 관련 유해 미생물에 의한 국내 질병발생 현황과의 관련성 분석

###### (1) 국내 식중독 발생 동향 분석

- 국내 식중독 발생에 대한 전반적인 경향은 그림 3-3-1과 같이, 2002년부터 2015년까지 발생 환자수는 감소추세에 있지만 발생건수는 오히려 증가추세로 나타났음
- 이는 환자수가 많은 대규모 식중독 발생 사례보다는 환자수는 작지만 소규모 발생이 계속해서 증가하고 있음을 보여주고 있는 것으로 사료됨



그림 3-3-1. 국내 식중독 환자수와 건수에 따른 발생동향(2002~2015)

[자료출처 : 식약처 식중독 발생통계]

- 원인균별 Norovirus와 Pathogenic *E. coli*가 가장 많은 부분을 차지하고 있으며(표 3-3-1), 최근에는 Norovirus는 약간 감소 추세에 있지만, Pathogenic *E. coli*와 *Cl. perferingens*, *C. jejuni*는 증가 추세에 있음

표 3-3-1. 연도별 및 원인균별 국내 식중독 발생 현황(5개년 현황)

[식약처 식중독 발생통계]

연도	2010		2011		2012		2013		2014		2015	
발생건수 및 환자수	건	명	건	명	건	명	건	명	건	명	건	명
계	271	7,218	249	7,105	266	6,058	235	4,958	349	7,466	339	6,046

연도		2010		2011		2012		2013		2014		2015	
세균	Pathogenic <i>E. coli</i>	28	1,926	32	2,109	31	1,844	31	1,089	38	1,784	25	1,555
	<i>Salmonella</i>	27	677	24	1,065	9	147	13	690	24	1,416	11	197
	<i>V. parahaemoliticus</i>	18	223	9	133	11	195	5	40	7	78	3	16
	<i>C. jejuni</i>	15	380	13	329	8	639	6	231	18	490	19	682
	<i>S. aureus</i>	19	372	10	323	5	35	5	63	15	195	8	148
	<i>Cl. perfringens</i>	5	171	7	324	13	297	33	516	28	1,689	13	357
	<i>B. cereus</i>	14	401	6	98	6	111	8	112	11	49	6	22
세균성 이질	0	0	2	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0
바이러스	Norovirus	31	1,994	31	1,524	50	1,665	43	1,606	46	739	46	865
	기타바이러스	2	8	3	21	1	22	1	2	4	102	1	6
원충		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	84
자연독		6	33	4	27	3	13	0	0	1	5	0	0
화학물질		1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
불검출		105	1,030	108	1,132	129	1,090	90	609	157	919	94	821
진행중		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	103	1,293

□ 식중독 발생 통계자료 이용 농산물 원인식품 분석

- 2010년부터 2015까지 연도별 원인 식품별 국내 식중독 발생 현황은 표 3-3-2와 같으며, 이 중 농산물과 관련이 있는 야채류 및 가공식품의 발생건수의 경우 2010년, 2011년 각각 4.4%, 4.0%에서 2012년, 2013년에는 각각 9.0%, 9.8%로 증가한 후 2014년과 2015년에서 각각 4.0%, 1.5%로 감소하고 있음
- 표 3-3-3은 주요 식중독 원인균과 농산물과의 관련성을 분석한 자료로서, 농산물 관련 주요 원인균별 국내 식중독 발생건수 현황은 식중독 원인균으로는 Pathogenic *E. coli* 와 Norovirus가 가장 높으며, 관련 농산물로는 김치류(배추와 열무)가 가장 높으며, 생식 농산물로는 상추, 오이, 부추의 발생건수가 높은 것으로 나타났으며, 이 들 농산물을 본 연구에서 진행할 모니터링 최종 대상 농산물로 결정하였음

표 3-3-2. 연도별 원인 식품별 국내 식중독 발생 현황(5개년 현황)

구분		2010	2011	2012	2013	2014	2015
계	건수	271	249	266	235	349	339
	환자수	7218	7105	6058	4958	7466	6,046
어패류 및 그 가공품	건수	24	9	16	23	16	15
	환자수	405	291	326	216	185	179
육류 및 그 가공품	건수	12	9	6	17	15	19
	환자수	173	200	231	457	838	1,489
유류 및 그 가공품	건수	1	1	0	0	0	0
	환자수	25	9	0	0	0	0
난류 및 그 가공품	건수	5	2	0	2	4	3
	환자수	110	132	0	123	990	66
야채류 및 그 가공품	건수	12	10	24	23	14	5
	환자수	327	1335	1546	1178	1301	187
복합조리 식품	건수	17	16	9	11	11	13
	환자수	656	1139	157	350	284	281



구분		2010	2011	2012	2013	2014	2015
곡류 및 그 가공품	건수	4	0	0	0	1	0
	환자수	146	0	0	0	33	0
기타	건수	17	13	6	19	10	14
	환자수	1358	646	382	884	218	475
불명	건수	179	189	205	140	278	167
	환자수	4018	3353	3416	1750	3617	2,076

[자료출처 : 식약처 식중독 발생통계]

표 3-3-3. 농산물 관련 주요 원인균별 국내 식중독 발생건수 현황(2006~2015)

식중독 원인균	배추 김치	열무 김치	샐러드	나물류	시금치	상 추	오 이	부 추	당 근	마나리	깻 잎	고 추	계
Pathogenic <i>E. coli</i>	14	13	2	2		2	1	1	1	1			37
<i>S. aureus</i>	2		3	3	1			1					10
<i>B. cereus</i>	2	1	2		1						1		7
<i>Cl. perfringenes</i>	3	2					1						6
<i>Salmonella</i>			2	1									3
<i>C. jejuni</i>	1				1		1						3
Norovirus	11		1		1	2	1					1	17
계	33	16	10	6	4	4	4	2	1	1	1	1	83

\*단, 기타 야채류는 제외하였음.

## (2) ALOP 개념 적용 국내 실제 식중독 발생 현황 분석

### □ 주요 농산물에 대한 오염수준 추정

- 표 3-3-3의 농산물 관련 주요 원인균별 국내 식중독 발생건수와 학회 및 연구보고서 등의 자료에 제시된 농산물별 식중독 세균 모니터링 결과를 바탕으로 “통계적 오염수준 정량화 방법”을 활용하여 표 3-3-4와 같이 농산물별로 오염수준을 추정하였음

### □ 농산물에 대한 식중독 발생수준 ALOP % 추정

- 주요 농산물에 대한 식중독 발생수준을 추정하기 위하여 ALOP 개념을 적용한 ALOP % 추정용 식(12)를 개발하였음
- 즉, ALOP %는 농산물을 섭취하였을 경우 이 농산물로 인한 식중독 발생 가능성 및 환자수를 추정할 수 있음

$$ALOP\%_i = \frac{Fd_i}{Dcon_i} \quad \dots \text{식(12)}$$

- 식(12)에서  $Fd_i$ 는 특정 농산물( $i$ )의 오염수준과 특정 균의 양-반응 모델을 접목하여 산출할 수 있으며,  $Dcon_i$ 는 특정 농산물( $i$ )의 1일 섭취자 비율로 이는 국민건강영양조사 자료를 참조하여 산출할 수 있음
- 식(12)에 의한 ALOP % 산출 결과는 표 51와 같음
- (결과분석 예) 시금치에서 살모넬라에 의한 ALOP %가  $3.16 \times 10^{-7}$ 로 국내 1일 환자수로 환산할 경우 약 15.8명으로 추정되어 가장 높은 식중독 발생 가능 농산물로 볼 수 있음
- 하지만 이들 문헌상의 결과는 실험 방법론 등의 차이로 오염수준에 대한 정확한 추정에는 한계가 있으므로 추후 본 연구에서 진행될 모니터링 결과를 바탕으로 최종적인

ALOP %를 추정할 예정임. 또한 이들 추정결과는 추후 농산물의 생물학적 유해 미생물(세균, 바이러스) 관리 우선순위관리 목록화에 활용 할 수 있음

표 3-3-4. 문헌을 통한 생식용 농산물별 식중독 원인균에 대해 추정된 오염수준

순위	농산물	식중독원인균	오염수준(Log CFU/g)
1	당근	<i>B. cereus</i>	-0.6631
2	양파	<i>E. coli</i> O157:H7	-0.9490
3	부추	<i>Cl. perfringenes</i>	-0.9662
4	오이	<i>S. aureus</i>	-1.1701
5	양파	<i>C. jejuni</i>	-1.1911
6	상추	<i>B. cereus</i>	-1.2054
7	오이	<i>B. cereus</i>	-1.2204
8	부추	<i>B. cereus</i>	-1.2474
9	당근	<i>S. aureus</i>	-1.2655
10	부추	<i>S. aureus</i>	-1.2781
11	양파	<i>Salmonella</i>	-1.2991
12	양파	<i>L. monocytogenes</i>	-1.2991
13	김치	<i>Salmonella</i>	-1.3028
14	김치	<i>E. coli</i> O157:H7	-1.3028
15	상추	<i>Cl. perfringenes</i>	-1.3084
16	양파	<i>S. aureus</i>	-1.4643
17	오이	<i>E. coli</i> O157:H7	-1.4918
18	상추	<i>Salmonella</i>	-1.5058
19	당근	<i>L. monocytogenes</i>	-1.5271
20	육회	<i>Cl. perfringenes</i>	-1.5400
21	오이	<i>C. jejuni</i>	-1.5528
22	오이	<i>Salmonella</i>	-1.6350
23	양파	<i>B. cereus</i>	-1.7217
24	상추	<i>S. aureus</i>	-1.7507
25	상추	<i>E. coli</i> O157:H7	-1.7882
26	오이	<i>L. monocytogenes</i>	-1.8067
27	상추	<i>L. monocytogenes</i>	-1.8691
28	부추	<i>L. monocytogenes</i>	-1.9039
29	상추	<i>C. jejuni</i>	-1.9039
30	부추	<i>E. coli</i> O157:H7	-1.9039
31	부추	<i>Salmonella</i>	-1.9039
32	당근	<i>E. coli</i> O157:H7	-1.9039
33	당근	<i>Salmonella</i>	-1.9039
34	부추	<i>C. jejuni</i>	-1.9039
35	양배추	<i>C. jejuni</i>	-1.9039
36	당근	<i>C. jejuni</i>	-1.9039
37	양배추	<i>S. aureus</i>	-2.0027
38	마늘	<i>B. cereus</i>	-2.1537
39	마늘	<i>S. aureus</i>	-2.1538
40	토마토	<i>Salmonella</i>	-2.2284
41	토마토	<i>E. coli</i> O157:H7	-2.2284
42	토마토	<i>S. aureus</i>	-2.2284
43	토마토	<i>L. monocytogenes</i>	-2.2284
44	토마토	<i>B. cereus</i>	-2.2284
45	당근	<i>Cl. perfringenes</i>	-2.2821
46	양배추	<i>Salmonella</i>	-2.4027
47	양배추	<i>E. coli</i> O157:H7	-2.4027

순위	농산물	식중독원인균	오염수준(Log CFU/g)
48	양배추	<i>L. monocytogenes</i>	-2.4027
49	양배추	<i>B. cereus</i>	-2.4027

표 3-3-5. 주요 농산물에 대한 ALOP %

농산물명	1일 섭취비율	식중독원인균	오염수준 (Log cfu/g)	ALOP%	환자수/1일/5천만명
당근	0.0001	<i>B. cereus</i>	-0.66	1.66 x 10 <sup>-12</sup>	<0.01
		<i>S. aureus</i>	-1.27	4.15 x 10 <sup>-13</sup>	<0.01
		<i>L. monocytogenes</i>	-1.53	3.51 x 10 <sup>-16</sup>	<0.01
		<i>E. coli</i> O157:H7	-1.90	3.16 x 10 <sup>-11</sup>	<0.01
		<i>Salmonella</i>	-1.90	1.30 x 10 <sup>-10</sup>	<0.01
		<i>Cl. perfringenes</i>	-2.28	9.50 x 10 <sup>-18</sup>	<0.01
마늘	0.0004	<i>B. cereus</i>	-2.15	2.15 x 10 <sup>-13</sup>	<0.01
		<i>S. aureus</i>	-2.15	2.15 x 10 <sup>-13</sup>	<0.01
부추	0.0014	<i>Cl. perfringenes</i>	-0.97	2.75 x 10 <sup>-15</sup>	<0.01
		<i>B. cereus</i>	-1.25	6.05 x 10 <sup>-12</sup>	<0.01
		<i>S. aureus</i>	-1.28	5.65 x 10 <sup>-12</sup>	<0.01
		<i>L. monocytogenes</i>	-1.90	2.06 x 10 <sup>-15</sup>	<0.01
		<i>E. coli</i> O157:H7	-1.90	4.42 x 10 <sup>-10</sup>	<0.01
		<i>Salmonella</i>	-1.90	1.82 x 10 <sup>-9</sup>	<0.01
상추	0.117	<i>B. cereus</i>	-1.21	5.57 x 10 <sup>-10</sup>	<0.01
		<i>Cl. perfringenes</i>	-1.31	1.05 x 10 <sup>-13</sup>	<0.01
		<i>Salmonella</i>	-1.51	3.79 x 10 <sup>-7</sup>	19.0
		<i>S. aureus</i>	-1.75	1.59 x 10 <sup>-10</sup>	<0.01
		<i>E. coli</i> O157:H7	-1.79	4.82 x 10 <sup>-8</sup>	<b>2.4</b>
		<i>L. monocytogenes</i>	-1.87	1.87 x 10 <sup>-13</sup>	<0.01
시금치	0.0918	<i>Cl. perfringenes</i>	-0.97	1.79 x 10 <sup>-13</sup>	<0.01
		<i>E. coli</i> O157:H7	-1.25	1.31 x 10 <sup>-7</sup>	<b>6.5</b>
		<i>Salmonella</i>	-1.48	3.16 x 10 <sup>-7</sup>	<b>15.8</b>
		<i>S. aureus</i>	-1.93	8.24 x 10 <sup>-11</sup>	<0.01
		<i>L. monocytogenes</i>	-1.93	1.27 x 10 <sup>-13</sup>	<0.01
		<i>S. aureus</i>	-2.00	1.52 x 10 <sup>-13</sup>	<0.01
양배추	0.0002	<i>Salmonella</i>	-2.40	8.22 x 10 <sup>-11</sup>	<0.01
		<i>E. coli</i> O157:H7	-2.40	2.00 x 10 <sup>-11</sup>	<0.01
		<i>L. monocytogenes</i>	-2.40	9.34 x 10 <sup>-17</sup>	<0.01
		<i>B. cereus</i>	-2.40	6.05 x 10 <sup>-14</sup>	<0.01
		<i>E. coli</i> O157:H7	-0.95	1.42 x 10 <sup>-9</sup>	<0.01
		<i>Salmonella</i>	-1.30	2.61 x 10 <sup>-9</sup>	<b>0.1</b>
양파	0.0005	<i>L. monocytogenes</i>	-1.30	2.96 x 10 <sup>-15</sup>	<0.01
		<i>S. aureus</i>	-1.46	1.31 x 10 <sup>-12</sup>	<0.01
		<i>B. cereus</i>	-1.72	7.25 x 10 <sup>-13</sup>	<0.01
		<i>S. aureus</i>	-1.17	1.05 x 10 <sup>-10</sup>	<0.01
		<i>B. cereus</i>	-1.22	9.34 x 10 <sup>-11</sup>	<0.01
오이	0.0203	<i>E. coli</i> O157:H7	-1.49	1.65 x 10 <sup>-8</sup>	<b>0.8</b>
		<i>Salmonella</i>	-1.64	4.89 x 10 <sup>-8</sup>	<b>2.4</b>
		<i>L. monocytogenes</i>	-1.81	3.74 x 10 <sup>-14</sup>	<0.01
		<i>Salmonella</i>	-2.23	1.42 x 10 <sup>-8</sup>	<b>0.7</b>
		<i>E. coli</i> O157:H7	-2.23	3.45 x 10 <sup>-9</sup>	<b>0.8</b>
토마토	0.0231	<i>S. aureus</i>	-2.23	1.04 x 10 <sup>-11</sup>	<0.01
		<i>L. monocytogenes</i>	-2.23	1.61 x 10 <sup>-14</sup>	<0.01
		<i>B. cereus</i>	-2.23	1.04 x 10 <sup>-11</sup>	<0.01

## 나. 농산물에 대한 미생물학적 모니터링 결과에 대한 통계학적 오염수준 정량화

(1) 모니터링 결과 및 과거 분석자료 활용

(가) 오염수준 정량화 방법 결정

□ 최종적인 오염수준 추정 방법으로 농산물 미생물에 대한 정량적 오염수준은 식(13)과 같이 평균( $\mu$ )과 표준편차( $\sigma^2$ )를 가지는 정규분포(Normal distribution)를 한다고 가정하였으며, 여기에 통계적으로 “Maximum Likelihood Estimates: MLEs”(최대가능도법)를 적용하여 검출한계를 포함하는 통계적 오염수준 식(14-17)를 산출하였음(Busschaert 등, 2010)

○ 평균( $\mu$ )과 표준편차( $\sigma^2$ )를 가지는 정규분포의 확률밀도 함수  $f(x)$ 는 식(13)과 같음

$$f(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} \exp\left(-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}\right) \dots \text{식(13)}$$

○ 이를 Likelihood function ( $L(\mu, \sigma)$ )으로 대체하면

$$L(\mu, \sigma) = \left(\frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}}\right)^n \exp\left(-\sum_{i=1}^n \frac{(x_i - \mu)^2}{2\sigma^2}\right) \dots \text{식(14)}$$

○  $I(\beta) = \ln L(\beta)$ 을 이용하여 자연로그로 전환하면

$$I(\mu, \sigma) = -\frac{n}{2} \ln(2\pi) - n \ln \sigma - \sum_{i=1}^n \frac{(x_i - \mu)^2}{2\sigma^2} \dots \text{식(15)}$$

○  $I(\mu, \sigma)$ 에서의 평균( $\mu$ )과 분산( $\sigma$ )은 다음 식을 만족하는 평균( $\mu$ )과 분산( $\sigma$ )이 됨

$$\frac{\partial I(\mu, \sigma)}{\partial \mu} \Big|_{\hat{\mu}} = -2 \sum_{i=1}^n x_i + 2\hat{\mu}n = 0 \dots \text{식(16)}$$

$$\frac{\partial I(\mu, \sigma)}{\partial \sigma} \Big|_{\hat{\sigma}} = \frac{-n}{\hat{\sigma}} + \sum_{i=1}^n \frac{(x_i - \mu)^2}{\hat{\sigma}^3} = 0 \dots \text{식(17)}$$

□ 이들 식은 엑셀(Excel)의 “Solver: 해찾기” 기능을 활용하여 계산할 수

있으며(Finkelstein, M.M. et al., 2001), 이를 통해 농산물에서 주요 식중독 원인균에 대한 모니터링 결과에서 검출한계(detection limit)이하를 포함하는 최적의 평균( $\mu$ )과 표준편차( $\sigma^2$ )를 산출할 수 있었음

□ 주요 농산물에 대한 모니터링 결과에 대한 통계적 오염수준 정량화는 위에 제시한 방법을 직접적인 산술 계산 적용에 어려움이 있어, 제시된 수학적식들을 엑셀에서 시용가능한 프로그램으로 이미 개발한 것을 보완 수정하여 활용하였음(그림 3-3-2)

□ MLE에 대한 엑셀 프로그램상의 결과에 대한 신뢰성 검증은 관련 프로그램(Busschaert 등, 2010)의 결과와 비교를 통해 이루어 졌으며, 동일 자료를 이용한 본 엑셀 프로그램상의 결과와 참고문헌에서의 결과는 정확하게 일치하는 것으로 나타났음(그림 3-3-3)

□ 그림 3-3-2에 제시한 프로그램은 본 연구에서 수행한 주요 농산물에 대한 모니터링 결과에 따른 최종 오염수준에 활용될 예정임

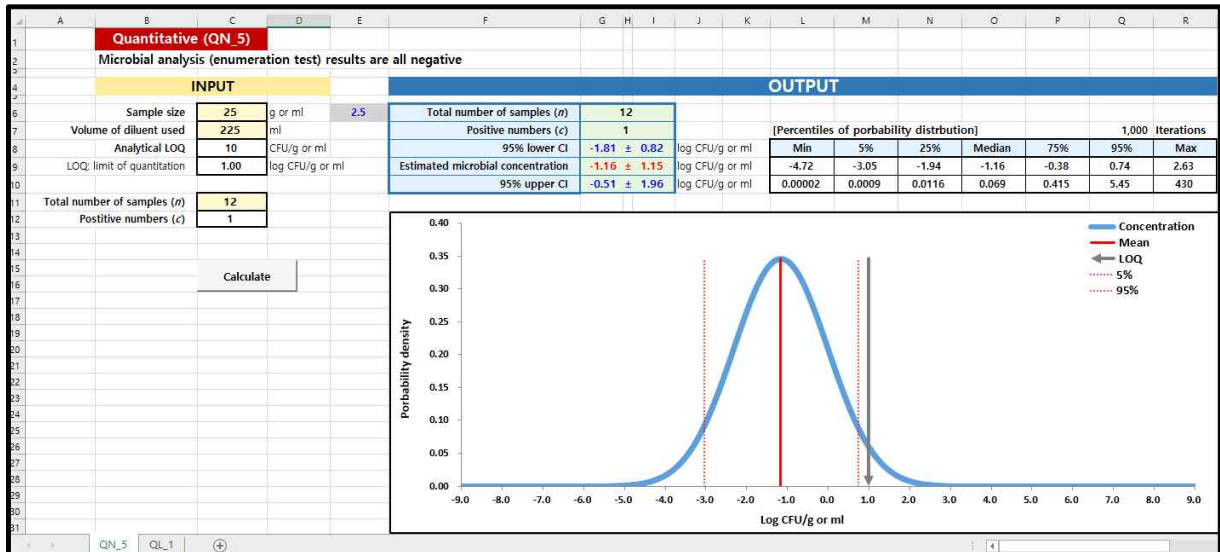


그림 3-3-2. 엑셀을 활용한 검출한계를 포함하는 정량적 오염수준 산출 프로그램 개발

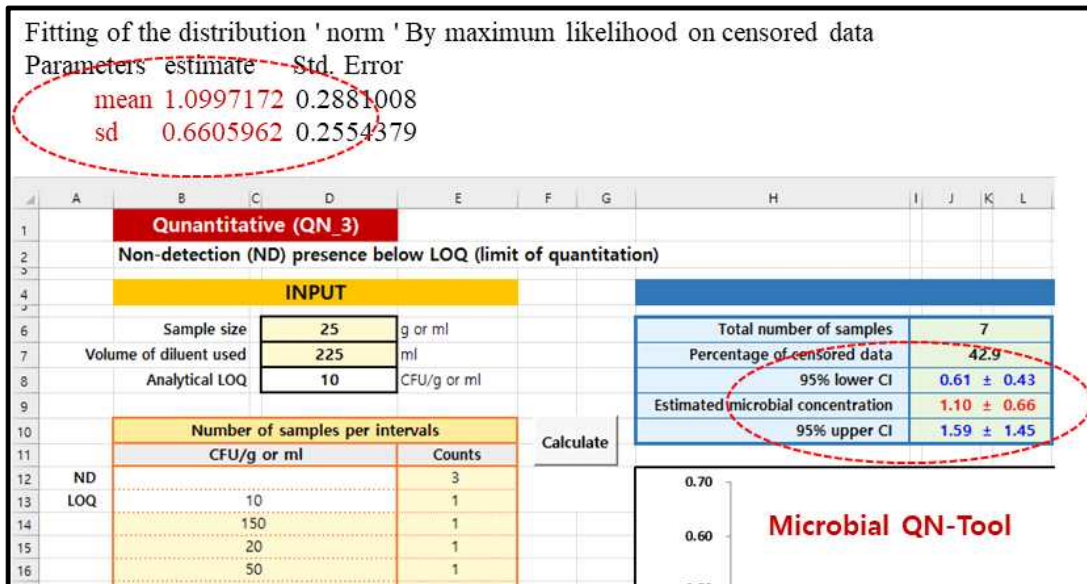


그림 3-3-3. 엑셀을 활용한 정량적 오염수준 결과와 관련문헌 결과 비교

(2) 통계적 방법 및 모니터링 결과에 대한 오염수준 정량화

□ 문헌상의 모니터링 자료의 정량화

○ 제시된 오염수준 정량화 방법을 이용하여 문헌상의 자료를 바탕으로 표 3-3-4과 같은 추정을 우선적으로 수행하였음

□ 국립농산물품질관리원의 모니터링 자료의 정량화

○ 2015년 국립농산물품질관리원에서 수행한 모니터링 결과는 표 3-3-6과 같으며, 본 연구에서 제시한 검출한계 이하를 포함하는 주요 농산물에 대한 오염수준을 정량화하였음 (예) 대표적으로 가장 오염수준이 높은(78건중 22건에서 양성) 상추에서 *B. cereus*에 대한 오염수준 정량화 수준은 그림 3-3-4과 같이 검출한계 이하부분까지 추정하여 약

0.45±0.68 Log cfu/g(본 추정 결과는 최종적으로 변경될 수 있음)로 추정되었음. 추가적으로 오이(29건중 2건에서 양성)와 얼갈이배추(9건중 6건에서 양성)에 대한 오염수준 정량화는 그림 3-3-5, 6과 같이 오염수준이 정량 추정되었음

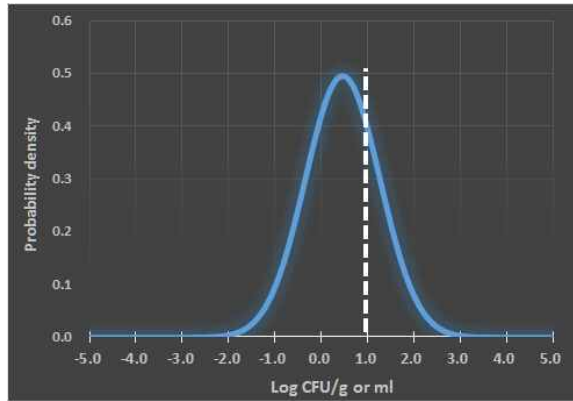


그림 3-3-4. 상추에서 *B. cereus*에 대한 오염수준 정량화( $0.45 \pm 0.68$  Log cfu/g)  
(흰색 점선이 검출한계)

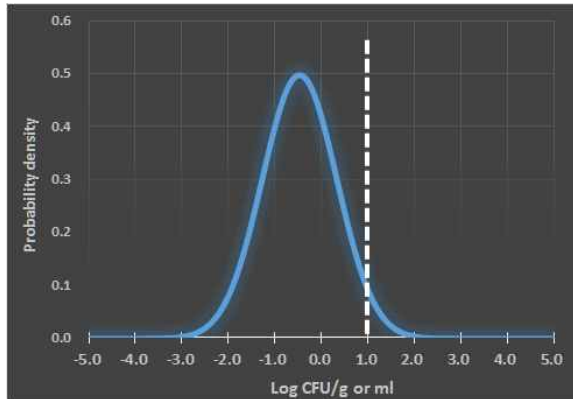


그림 3-3-5. 오이에서 *B. cereus*에 대한 오염수준 정량화( $-0.48 \pm 0.80$  Log cfu/g)  
(흰색 점선이 검출한계)

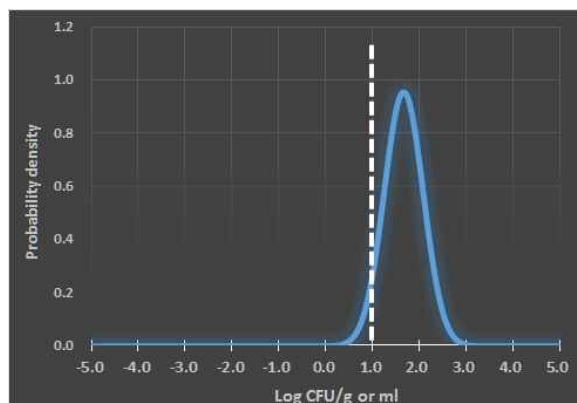


그림 3-3-6. 얼갈이배추에서 *B. cereus*에 대한 오염수준 정량화( $1.65 \pm 0.42$  Log cfu/g)  
(흰색 점선이 검출한계)

표 3-3-6. 2015년 국립농산물품질관리원에서 수행한 주요 농산물에 대한 모니터링 결과

품목	<i>B. cereus</i>		<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>Cl. perfringenes</i>		<i>Salmonella</i>		Pathogenic <i>E. coli</i>		<i>L. monocytogenes</i>	
	시료수	양성수	시료수	양성수	시료수	양성수	시료수	양성수	시료수	양성수	시료수	양성수	시료수	양성수
상추	78	22	78	2	78	1	78	0	78	0	78	0	78	0
새싹채소	58	11	58	0	58	0	58	0	58	0	58	0	58	0
들깨잎	36	8	36	1	36	0	36	0	36	0	36	0	36	0
얼갈이배추	9	6	9	0	9	0	9	0	9	0	9	0	9	0
토마토	63	6	63	0	63	0	63	0	63	0	63	0	63	0
시금치	7	4	7	0	7	0	7	0	7	0	7	0	7	0
열무	9	3	9	0	9	0	9	0	9	0	9	0	9	0
호박	25	2	25	1	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
셀러리	2	2	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0
오이	29	2	29	0	29	0	29	0	29	0	29	0	29	0
케일	8	2	8	0	8	0	8	0	8	0	8	0	8	0
풋고추	49	2	49	0	49	0	49	0	49	0	49	0	49	0
가지	11	1	11	0	11	0	11	0	11	0	11	0	11	0
감자	2	1	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0
근대	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
당근	8	1	8	0	8	0	8	0	8	0	8	0	8	0
대파	8	1	8	0	8	0	8	0	8	0	8	0	8	0
미나리	12	1	12	0	12	0	12	0	12	0	12	0	12	0
부추	18	1	18	0	18	0	18	0	18	0	18	0	18	0
쑥갓	3	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0
양상추	7	1	7	0	7	0	7	0	7	0	7	0	7	0
취나물	5	1	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0
치커리	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
홍고추	38	1	38	0	38	0	38	0	38	0	38	0	38	0
계	487	82	487	4	487	1	487	0	487	0	487	0	487	0

□ 국립농산물품질관리원의 보도자료 자료의 정량화

- 2016년 3월 16일자로 국립농산물품질관리원의 "농산물 및 세척용수의 병원성 미생물 오염"이라는 보도자료 결과를 바탕으로 통계학적 오염수준 정량화 방법을 활용하여 실제 오염수준을 그림 3-3-7과 같이 추정하였음
- 정량화된 오염수준 추정결과를 보면 생식 채소류에서 *B. cereus* -  $1.23 \pm 0.05$ , *S. aureus* -  $2.94 \pm 0.20$  Log CFU/g으로 추정되었으며, 특히 오염수준이 가장 높은 *B. cereus*에 대한 세부적인 추정수준에서는 생식 채소류, 단순처리 농산물, 가축 매몰지 농산물 각각에  $5.9 \pm 0.7$ ,  $2.1 \pm 0.5$ ,  $1.6 \pm 0.8$  Log CFU/kg으로 추정되었음

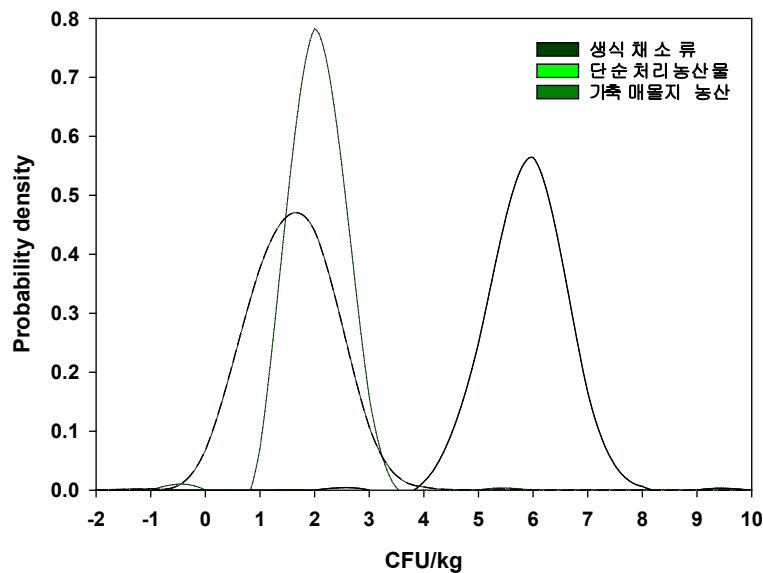


그림 3-3-7. 모니터링 결과 바탕 바실러스 세레우스에 대한 추정된 오염수준(CFU/kg) (생식 채소류, 단순처리 농산물, 가축 매몰지 농산물 각각  $5.9 \pm 0.7$ ,  $2.1 \pm 0.5$ ,  $1.6 \pm 0.8$  cfu/kg으로 추정)

2. 농산물 관련 미생물학적 안전성 평가를 위한 QMRA-동태 모델 개발

가. 안전성 평가를 위한 재배부터 유통까지 동태학적 (Fate & Transport) 모델 개발

(1) 모니터링 결과 정리 및 확률분포 모델화

□ 모니터링 결과

- 1세부에서 진행된 토양과 관개수, 농산물에 대한 오염수준을 추정을 위한 모니터링 결과를 확률분포 모델화를 위해 양성이 나온 농산물을 중심으로 요약 정리하면 세균의 경우는 표 3-3-7, 바이러스의 경우는 표 3-3-8과 같음



표 3-3-7. 토양과 관개수, 농산물에 대한 오염수준 모니터링 결과(세균)

농산물	세균	총수(n)			양성수(p)			양성율(p/n)		
		토양	관개수	농산물	토양	관개수	농산물	토양	관개수	농산물
배추	<i>B. cereus</i>	87	42	134	7	3	1	0.081	0.071	0.008
	<i>S. aureus</i>	87	42	134	2	1	2	0.023	0.023	0.015
	기타세균 <sup>2)</sup>	87	42	134	0	0	0	-	-	-
기타 농산물 <sup>1)</sup>	<i>B. cereus</i>	123	53	95	10	0	3	0.081	-	0.032
	<i>S. aureus</i>	123	53	95	1	3	1	0.008	0.019	0.011
	기타세균 <sup>2)</sup>	123	53	95	0	0	0	-	-	-

1) 기타농산물: 상추, 오이, 딸기, 고추, 토마토

2) 기타 세균: *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *C. perfringenes*

- 모니터링 결과 양성율의 범위는 세균의 경우 토양에서의 *B. cereus*가 가장 높게 나타나고 있으며, 일부 관개수에서도 *S. aureus*가 검출되었으며, 배추를 비롯한 농산물에서도 이들 2종의 세균은 양성으로 나타났으나, 기타세균은 어느 곳에서도 검출되지 않았음
- 바이러스의 경우 사용된 장갑과 관개수에서 Noro와 HAV가 양성으로 나왔으며, 딸기의 경우 HAV가 검출되었으며, 기타 농산물 및 기타 바이러스는 모두 검출되지 않았음

표 3-3-8. 모니터링한 토양과 관개수, 이용 장갑, 농산물에 대한 오염도(바이러스)

농산물	바이러스	총수(n)				양성수(p)				양성율(p/n)			
		토양	관개수	장갑	농산물	토양	관개수	장갑	농산물	토양	관개수	장갑	농산물
배추	Noro	120	10	27	148	0	2	0	0	-	0.2	-	-
	HAV	120	10	27	148	0	0	1	0	-	-	0.037	-
	기타 바이러스 <sup>2)</sup>	120	10	27	148	0	0	0	0	-	-	-	-
딸기	Noro	120	10	27	120	0	0	0	0	-	-	-	-
	HAV	120	10	27	120	0	0	1	1	-	-	0.037	0.008
	기타 바이러스 <sup>2)</sup>	120	10	27	120	0	0	0	0	-	-	-	-
기타 농산물 <sup>1)</sup>	Noro	120	10	27	41	0	0	0	0	-	-	-	-
	HAV	120	10	27	41	0	0	1	0	-	-	0.037	-
	기타 바이러스 <sup>2)</sup>	120	10	27	41	0	0	0	0	-	-	-	-

1) 기타농산물: 상추, 오이, 고추, 토마토

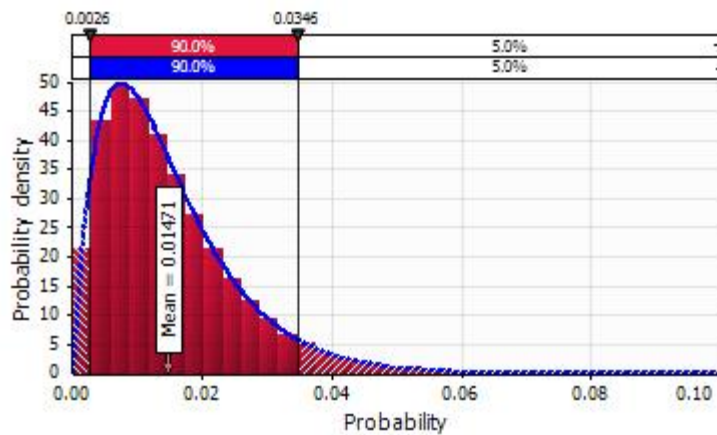
2) 기타 바이러스: Astro, Adeno, Rota

□ 모니터링 결과에 대한 확률분포 모델화

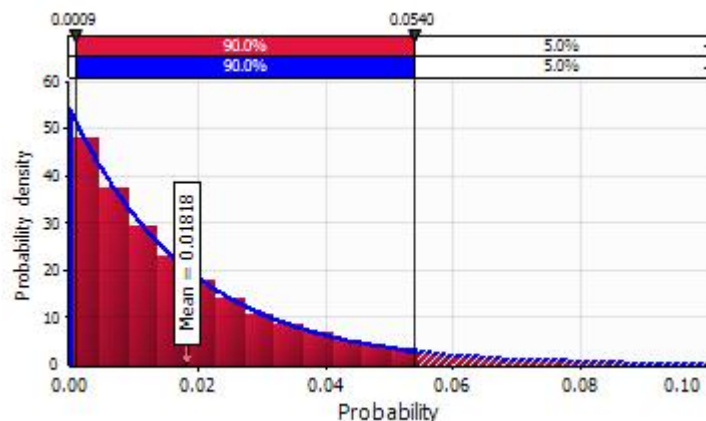
- 본 연구에서는 확률론적으로 베이저안 네트워크(Bayesian network: BN)에 적용(본 연구에서 획득한 모니터링 결과 중 음성이 나온 경우는 양성율을 추정할 수 없음)하여 양성율 수준 추정은 다음 식(1)과 같이 Beta distribution을 활용하였음

$$P = \text{Beta}(p+1, n-p+1) \quad \text{식(1)}$$

- 식(1)에서, P는 양성율, p는 양성수, n은 총 시료수임
- 베타 분포를 사용하는 이유는 음성인 경우에도 양성율을 추정할 수 있는 장점 외에도 개체 간 시료 수의 차이를 통계적으로 보정하는 측면도 있음
  - (예) 배추에서 *B. cereus* 양성율은 0.0075(1/134)에서 그림 3-3-7에서 보는 바와 같이 0.015로 증가하게 됨. 특히, 양성 수가 전혀 없는 경우인 기타 농산물에서 *B. cereus*와 관련한 관개수의 경우(0/52) 양성율이 0.018로 나타남. 이와 같은 방법으로 베타분포에 의해 변경된 주요 농산물에서 세균과 바이러스의 양성율은 각각 다음 표 3-3-9, 10과 같음



(A)



(B)

그림 3-3-8. 배추(A)와 기타 농산물 관개수(B)에서 *B. cereus*에 대한 베타분포에 의해 변경된 양성율

표 3-3-9. 베타분포에 의한 변경된 양성율(세균)

농산물	세균	변경된 양성율(mean)		
		토양	관개수	농산물
배추	<i>B. cereus</i>	0.090	0.091	0.015
	<i>S. aureus</i>	0.034	0.046	0.022
	기타세균 <sup>2)</sup>	0.011	0.023	0.007
기타 농산물 <sup>1)</sup>	<i>B. cereus</i>	0.088	0.018	0.041
	<i>S. aureus</i>	0.016	0.073	0.021
	기타세균 <sup>2)</sup>	0.008	0.018	0.010

1) 기타농산물: 상추, 오이, 딸기, 고추, 토마토

2) 기타 세균: *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *C. perfringens*

표 3-3-10. 베타분포에 의한 변경된 양성율(바이러스)

농산물	바이러스	변경된 양성율(mean)			
		토양	관개수	장갑	농산물
배추	Noro	0.008	0.250	0.035	0.007
	HAV	0.008	0.083	0.069	0.007
	기타 바이러스 <sup>2)</sup>	0.008	0.083	0.035	0.007
딸기	Noro	0.008	0.083	0.035	0.008
	HAV	0.008	0.083	0.069	0.016
	기타 바이러스 <sup>2)</sup>	0.008	0.083	0.035	0.008
기타 농산물 <sup>1)</sup>	Noro	0.008	0.083	0.035	0.023
	HAV	0.008	0.083	0.069	0.023
	기타 바이러스 <sup>2)</sup>	0.008	0.083	0.035	0.023

1) 기타농산물: 상추, 오이, 고추, 토마토

2) 기타 바이러스: Astro, Adeno, Rota

(2) 베이저안 네트워크를 이용한 재배에서 유통단계까지 오염원 및 동태학적 이동경로 조사·분석 및 모형 개발

□ 농산물 생산에서의 베이저안 네트워크 기반 동태모델 및 오염 확률

○ 베타분포를 이용하여 다음 그림 3-3-9에서 보는 바와 같이 원인과 결과(causes and effects) 형태로 특정 농산물의 오염 확률 산출을 위한 베이저안 네트워크를 구성하였음

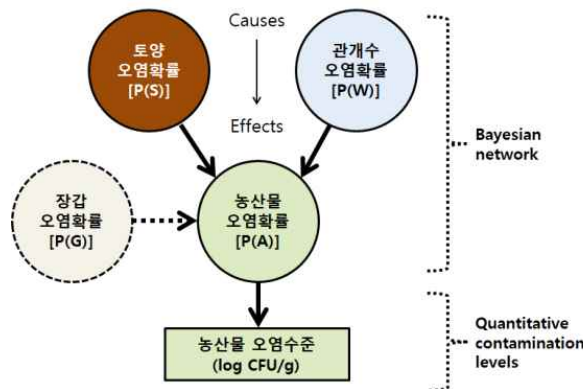


그림 3-3-9. 농산물 생산에서의 베이저안 네트워크 기반 동태모델 및 정량적 오염수준 추정 (바이러스는 장갑 포함)

○ 실제 동태 모델의 범위를 농산물 생산 환경에 맞추어 연차 계획서에 제시한 축산분뇨, 하수 등으로 확대하여야 하나 연구 진척단계에서 현실적인 모니터링 수준의 한계로 범

위를 토양, 관개수, 사용 장갑 등을 대상으로만 진행하였음

- 이들 관계에서 즉, 특정 세균의 토양 오염 확률(P(S))과 관개수 오염 확률(P(W)) 조건에서 특정 세균이 농산물에 오염될 확률(P(A=True))은 다음 베이저안 식(2)을 이용하여 산출하였음

$$P(A=True) = \sum_{S,W} P(A=True | S,W)P(S)P(W) \quad \text{식(2)}$$

- 바이러스의 경우 위의 식에 장갑 오염 확률(P(G))을 추가하여 농산물에서 바이러스 오염 확률을 산출하였음
- 식(2)의 베이저안 추론에 의한 모니터링 결과에 기반을 두어 추정된 주요 농산물별 세균성 식중독 원인균의 오염 확률과 바이러스에 의한 오염 확률은 각각 표 3-3-11, 12와 같음
- 예로, 배추에서 *B. cereus*의 경우 앞서 표 3-3-9에 제시된 베타분포 기반 양성율을 조건으로 즉, 토양과 관개수에서 *B. cereus*의 오염 확률을 조건으로 배추에서 *B. cereus*가 양성일 확률은 표 3-3-9에서 보는 바와 같이 베타분포 양성율  $0.015 \pm 0.01$ 에서 최종적으로  $0.010 \pm 0.0073$ 로 나타났음

표 3-3-11. 베이저안 네트워크에 의한 토양과 관개수의 오염 확률 바탕 농산물에서 세균성 식중독 원인균의 양성 확률

농산물	세균	베이저안 네트워크에 의한 양성율		
		5 <sup>th</sup> percentile	mean ± SD	95 <sup>th</sup> percentile
배추	<i>B. cereus</i>	0.0018	0.010 ± 0.007	0.024
	<i>S. aureus</i>	0.0052	0.019 ± 0.011	0.040
	기타세균 <sup>2)</sup>	0.0004	0.007 ± 0.007	0.021
기타 농산물 <sup>1)</sup>	<i>B. cereus</i>	0.0012	0.034 ± 0.017	0.064
	<i>S. aureus</i>	0.0031	0.017 ± 0.012	0.041
	기타세균 <sup>2)</sup>	0.0005	0.009 ± 0.009	0.029

1) 기타농산물: 상추, 오이, 딸기, 고추, 토마토

2) 기타 세균: *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *C. perfringens*

표 3-3-12. 베이저안 네트워크에 의한 토양과 관개수의 오염 확률 바탕 농산물에서 바이러스의 양성 확률

농산물	바이러스	베이저안 네트워크에 의한 양성율		
		5 <sup>th</sup> percentile	mean ± SD	95 <sup>th</sup> percentile
배추	Noro	0.0002	0.0040 ± 0.004	0.012
	HAV	0.0002	0.0049 ± 0.005	0.015
	기타 바이러스 <sup>2)</sup>	0.0003	0.0053 ± 0.005	0.016
딸기	Noro	0.0003	0.0065 ± 0.006	0.020
	HAV	0.0021	0.0121 ± 0.009	0.029
	기타 바이러스 <sup>2)</sup>	0.0020	0.0117 ± 0.009	0.029
기타 농산물 <sup>1)</sup>	Noro	0.0009	0.0184 ± 0.018	0.055
	HAV	0.0009	0.0172 ± 0.017	0.052
	기타 바이러스 <sup>2)</sup>	0.0009	0.0167 ± 0.017	0.050

1) 기타농산물: 상추, 오이, 고추, 토마토

2) 기타 바이러스: Astro, Adeno, Rota

- 세균성 식중독의 경우 기타 농산물에서 *B. cereus*에서 가장 높은 오염 확률을 나타냈으며, 다음이 배추에서 *S. aureus*, 기타 농산물에서 *S. aureus*, 배추에서 *B. cereus* 순으로 나타났음
- 바이러스의 경우 기타 농산물에서 Norovirus에서 가장 높은 오염 확률을 나타냈으며, 다음이 기타 농산물에서 HAV 등의 순으로 나타났음. 세균과 바이러스의 비교에서는 모든 품목에서 세균이 더 높은 오염 확률을 보여주고 있음
- 하지만 본 연구의 경우 이들의 차이는 시료수의 차이에 기인 한 것으로 볼 수 있어 차기 모니터링에서는 모든 품목에 대해 되도록 시료수를 동일하게 적용하여 수행 할 필요가 있음

□ 베이지안 네트워크를 통한 농산물 오염수준 추정

- 베이지안 네트워크를 통하여 각 품목별로 정량적 오염수준을 추정하였으며, 농산물별 세균과 바이러스에 대한 정량적 오염수준 추정 방법은 1차년도 연구결과 제시된 방법론을 이용하였음
- 예로, 배추에서 *B. cereus*의 경우 앞서 표 3-3-13에 제시된 베이지안 네트워크에 의한 토양과 관개수의 오염 확률을 바탕으로 추정된 오염 확률을 바탕으로 정량적 오염수준을 추정하였으며, 최종적으로 배추에서 *B. cereus*의 오염수준은 그림 3-3-1에서 보는 바와 같이  $-1.98 \pm 1.10$  Log CFU/g으로 추정되었음

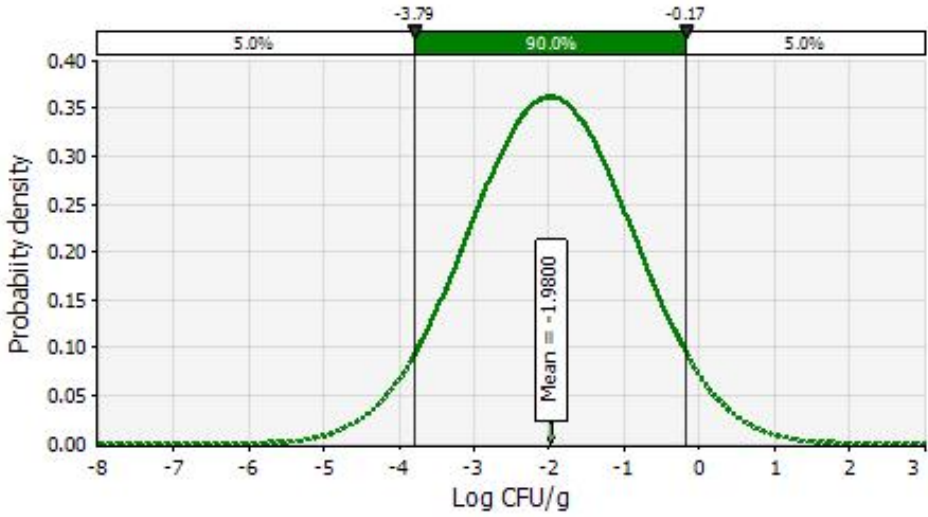


그림 3-3-10. 베이지안 네트워크에 의한 토양과 관개수의 *B. cereus*의 오염 확률 추정된 배추에서의 *B. cereus* 오염수준

표 3-3-13. 베이지안 네트워크에 의한 토양과 관개수의 오염 확률 바탕 농산물에서 세균성 식중독 원인균들의 정량적 오염수준

농산물	세균	정량적 오염수준 (Log CFU/g)		
		5 <sup>th</sup> percentile	mean ± SD	95 <sup>th</sup> percentile
배추	<i>B. cereus</i>	-3.79	-1.98 ± 1.10	-0.17
	<i>S. aureus</i>	-3.27	-1.56 ± 1.04	0.15
	기타세균 <sup>2)</sup>	-3.66	-2.16 ± 0.91	-0.67
기타 농산물 <sup>1)</sup>	<i>B. cereus</i>	-3.05	-1.32 ± 1.05	0.41
	<i>S. aureus</i>	-3.19	-1.53 ± 1.10	0.13
	기타세균 <sup>2)</sup>	-5.50	-3.41 ± 1.27	-1.32

1) 기타농산물: 상추, 오이, 딸기, 고추, 토마토

2) 기타 세균: *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *C. perfringens*

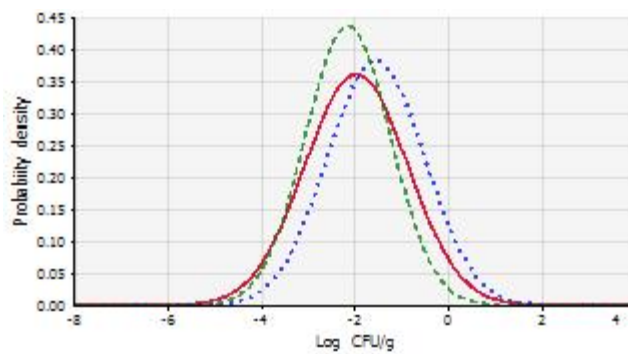


그림 3-3-11. 배추에서의 *B. cereus* (적색 직선), *S. aureus* (청색 점선), 기타세균(녹색 긴점선)에 대한 오염수준 비교

표 3-3-14. 베이지안 네트워크에 의한 토양과 관개수의 오염 확률 바탕 농산물에서 바이러스의 정량적 오염수준

농산물	바이러스	정량적 오염수준 (Log particles/g)		
		5 <sup>th</sup> percentile	mean ± SD	95 <sup>th</sup> percentile
배추	Noro	-6.53	-4.05 ± 1.50	-1.61
	HAV	-6.41	-3.96 ± 1.47	-1.57
	기타 바이러스 <sup>2)</sup>	-6.36	-3.93 ± 1.39	-1.56
딸기	Noro	-6.22	-3.84 ± 1.43	-1.51
	HAV	-5.58	-3.43 ± 1.30	-1.30
	기타 바이러스 <sup>2)</sup>	-6.21	-3.84 ± 1.44	-1.51
기타 농산물 <sup>1)</sup>	Noro	-5.58	-3.38 ± 1.32	-1.25
	HAV	-5.60	-3.41 ± 1.32	-1.26
	기타 바이러스 <sup>2)</sup>	-5.57	-3.38 ± 1.32	-1.24

1) 기타농산물: 상추, 오이, 고추, 토마토

2) 기타 바이러스: Astro, Adeno, Rota

○ 농산물별 세균성 식중독의 오염수준의 경우 베이지안 네트워크에 의한 토양과 관개수의 오염 확률과 유사한 순서로, 기타 농산물에서 *B. cereus*에서 가장 높은 오염수준을 나타냈으며, 다음이 배추에서 *S. aureus*, 기타 농산물에서 *S. aureus*, 배추에서 *B. cereus* 순으로 나타났음(표 3-3-13, 그림 3-3-11)

- 농산물별 바이러스의 경우 역시 베이지안 네트워크에 의한 토양과 관개수의 오염 확률과 유사한 순서로, 기타 농산물에서 Norovirus에서 가장 높은 오염수준을 나타냈으며, 다음이 기타 농산물에서 HAV 등의 순으로 나타났음(표 3-3-14). 세균과 바이러스의 비교에서는 모든 품목에서 세균이 더 높은 오염수준을 보여주고 있음
- 이들 오염수준의 값들은 미생물 위해평가에서 농산물별/식중독 원인균 또는 바이러스별 오염수준에 대한 입력변수로 활용되었음

### 3. 유해미생물 관리 우선순위 목록화 및 기준·규격, 위생안전관리방안 개선안 제안

#### 가. 농산물의 생물학적 유해미생물 관리 우선순위 목록화

##### (1) 관개수 및 재배지 토양에서의 미생물 오염수준 정량화

##### (가) 관개수에서의 미생물 오염수준 정량화

- 2016년부터 2018년까지 토마토, 고추, 배추, 상추, 오이, 열무 재배지에서 사용한 관개수(n=98)에서의 일반세균수, 곰팡이-효모, 대장균군, 대장균, *B. cereus*, *S. aureus*, other pathogens(*L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *C. perfringens*) 모니터링 결과를 바탕으로 통계학적 오염수준을 정량화한 결과는 아래와 같음

##### ○ 일반세균수

- 각 농산물 재배지에서 사용한 관개수의 일반세균의 오염수준을 정량화한 결과, 평균  $2.50 \pm 1.72$  Log CFU/ml이었으며, 토마토 재배시 사용한 관개수에서는  $3.70 \pm 1.80$  Log CFU/ml, 고추 재배시 사용한 관개수에서는  $3.34 \pm 1.23$  Log CFU/ml, 배추 재배시 사용한 관개수에서는  $2.27 \pm 0.95$  Log CFU/ml, 상추 재배시 사용한 관개수에서는  $2.08 \pm 2.20$  Log CFU/ml, 오이 재배시 사용한 관개수에서는  $1.81 \pm 2.50$  Log CFU/ml, 열무 재배시 사용한 관개수에서는  $1.80 \pm 1.05$  Log CFU/ml으로 오염수준이 정량화되었음

##### ○ 곰팡이, 효모

- 각 농산물 재배지에서 사용한 관개수의 곰팡이-효모의 오염수준을 정량화한 결과, 평균  $0.44 \pm 1.48$  Log CFU/ml이었으며, 토마토 재배시 사용한 관개수에서는  $0.79 \pm 2.51$  Log CFU/ml, 고추 재배시 사용한 관개수에서는  $0.79 \pm 0.68$  Log CFU/ml, 배추 재배시 사용한 관개수에서는  $0.78 \pm 1.48$  Log CFU/ml, 상추 재배시 사용한 관개수에서는  $-0.67 \pm 1.63$  Log CFU/ml, 오이 재배시 사용한 관개수에서는  $1.36 \pm 1.12$  Log CFU/ml, 열무 재배시 사용한 관개수에서는  $-0.42 \pm 0.45$  Log CFU/ml으로 오염수준이 정량화되었음

##### ○ 대장균군

- 각 농산물 재배지에서 사용한 관개수의 대장균군의 오염수준을 정량화한 결과, 평균  $0.28 \pm 1.17$  Log CFU/ml이었으며, 토마토 재배시 사용한 관개수에서는  $0.09 \pm 2.13$  Log CFU/ml, 고추 재배시 사용한 관개수에서는  $0.71 \pm 1.52$  Log CFU/ml, 배추 재배시 사용한 관개수에서는  $0.26 \pm 1.23$  Log CFU/ml, 상추 재배시 사용한 관개수에서는  $-0.26 \pm 0.64$  Log CFU/ml, 오이 재배시 사용한 관개수에서는  $1.29 \pm 0.62$  Log CFU/ml, 열무 재배시 사용한



관개수에서는  $-0.40 \pm 0.73$  Log CFU/ml으로 오염수준이 정량화되었음

○ 대장균

- 각 농산물 재배지에서 사용한 관개수의 대장균 오염수준을 정량화한 결과, 평균  $-1.35 \pm 1.04$  Log CFU/ml이었으며, 토마토 재배시 사용한 관개수에서는  $-1.50 \pm 0.84$  Log CFU/ml, 고추 재배시 사용한 관개수에서는  $-0.30 \pm 1.30$  Log CFU/ml, 배추 재배시 사용한 관개수에서는  $-1.86 \pm 1.51$  Log CFU/ml, 상추 재배시 사용한 관개수에서는  $-1.68 \pm 1.51$  Log CFU/ml, 오이 재배시 사용한 관개수에서는  $-0.62 \pm 0.85$  Log CFU/ml, 열무 재배시 사용한 관개수에서는  $-2.12 \pm 0.85$  Log CFU/ml으로 오염수준이 정량화되었음

○ *B. cereus*

- 각 농산물 재배지에서 사용한 관개수의 *B. cereus*의 오염수준을 정량화한 결과, 평균  $-2.39 \pm 0.99$  Log CFU/ml이었으며, 토마토 재배시 사용한 관개수에서는  $-2.21 \pm 0.86$  Log CFU/ml, 고추 재배시 사용한 관개수에서는  $-2.21 \pm 0.86$  Log CFU/ml, 배추 재배시 사용한 관개수에서는  $-2.97 \pm 0.71$  Log CFU/ml, 상추 재배시 사용한 관개수에서는  $-2.23 \pm 1.58$  Log CFU/ml, 오이 재배시 사용한 관개수에서는  $-2.60 \pm 0.82$  Log CFU/ml, 열무 재배시 사용한 관개수에서는  $-2.12 \pm 0.85$  Log CFU/ml으로 오염수준이 정량화되었음

○ *S. aureus*

- 각 농산물 재배지에서 사용한 관개수의 *S. aureus*의 오염수준을 정량화한 결과, 평균  $-2.39 \pm 1.03$  Log CFU/ml이었으며, 토마토 재배시 사용한 관개수에서는  $-2.21 \pm 0.86$  Log CFU/ml, 고추 재배시 사용한 관개수에서는  $-2.21 \pm 0.86$  Log CFU/ml, 배추 재배시 사용한 관개수에서는  $-2.97 \pm 0.71$  Log CFU/ml, 상추 재배시 사용한 관개수에서는  $-2.25 \pm 0.87$  Log CFU/ml, 오이 재배시 사용한 관개수에서는  $-2.56 \pm 1.72$  Log CFU/ml, 열무 재배시 사용한 관개수에서는  $-2.12 \pm 0.85$  Log CFU/ml으로 오염수준이 정량화되었음

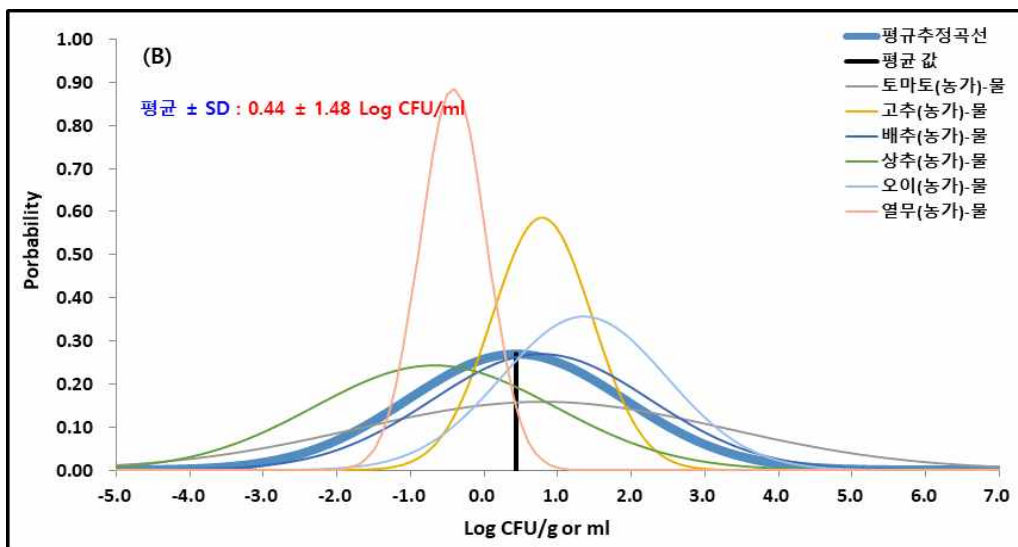
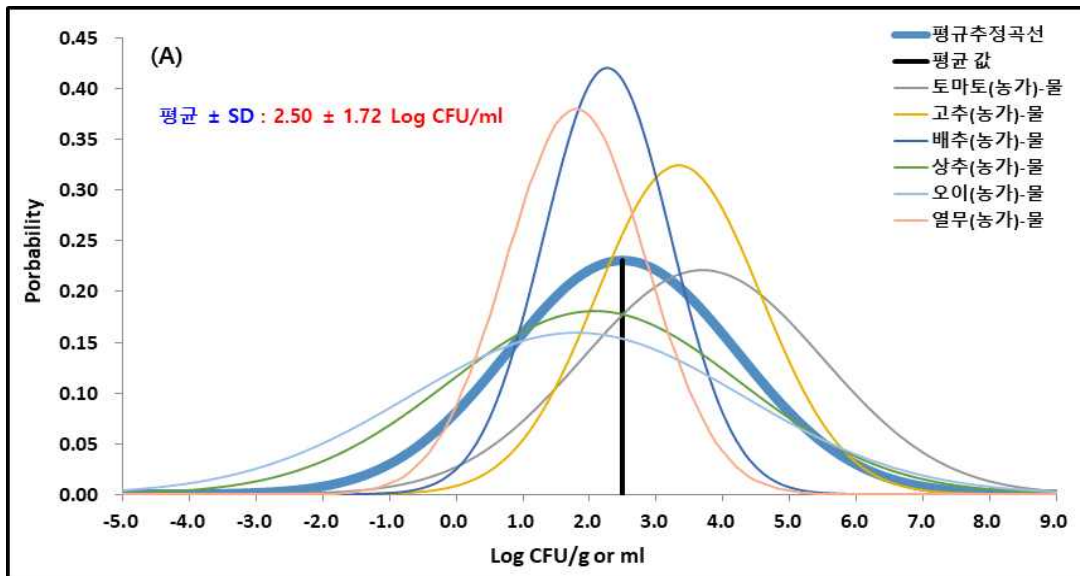
○ Other pathogens(*L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *C. perfringens*)

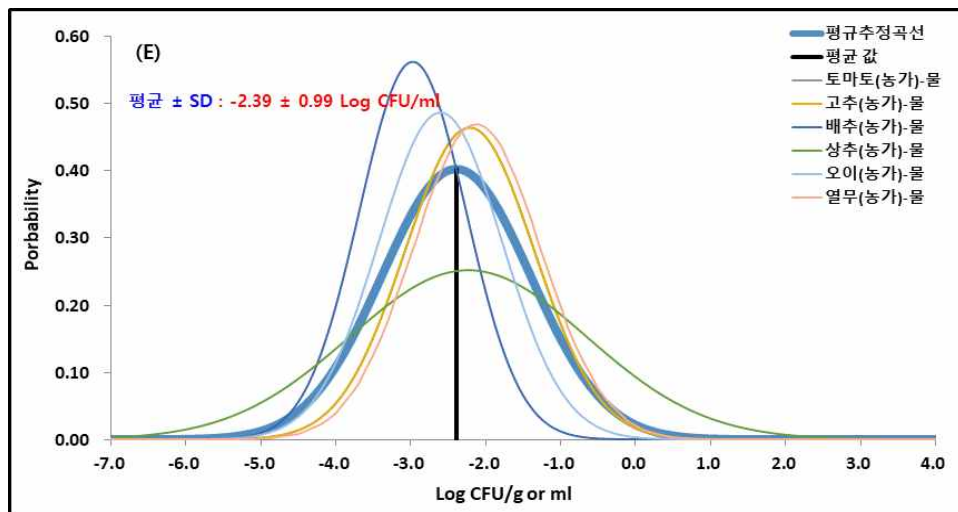
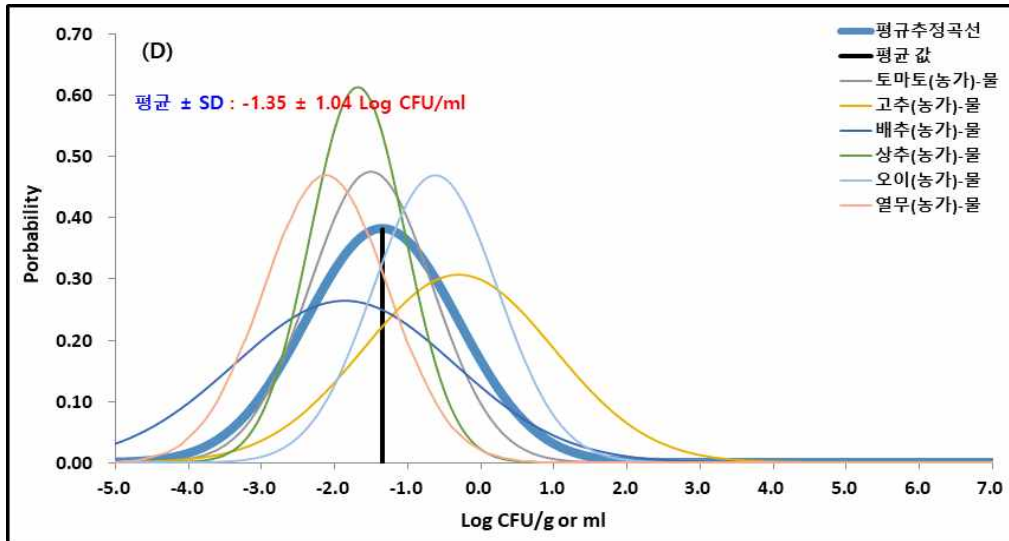
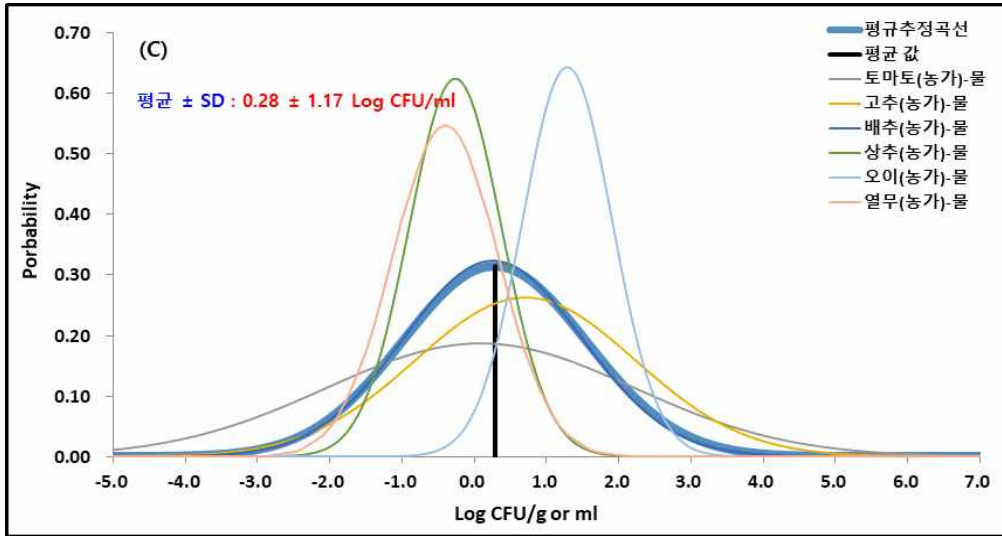
- 각 농산물 재배지에서 사용한 관개수의 other pathogens(*L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *C. perfringens*)의 오염수준을 정량화한 결과, 평균  $-2.39 \pm 0.83$  Log CFU/ml이었으며, 토마토 재배시 사용한 관개수에서는  $-2.21 \pm 0.86$  Log CFU/ml, 고추 재배시 사용한 관개수에서는  $-2.21 \pm 0.86$  Log CFU/ml, 배추 재배시 사용한 관개수에서는  $-2.97 \pm 0.71$  Log CFU/ml, 상추 재배시 사용한 관개수에서는  $-2.25 \pm 0.87$  Log CFU/ml, 오이 재배시 사용한 관개수에서는  $-2.60 \pm 0.82$  Log CFU/ml, 열무 재배시 사용한 관개수에서는  $-2.12 \pm 0.85$  Log CFU/ml으로 오염수준이 정량화되었음

표 3-3-15. 농산물 재배시 사용한 관개수에서의 미생물 오염수준 정량화

농산물 재배지	일반세균	곰팡이-효모	대장균군	대장균	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	Other pathogens *
	Mean±SD (Log CFU/ml)						
토마토	3.70±1.80	0.79±2.51	0.09±2.13	-1.50±0.84	-2.21±0.86	-2.21±0.86	-2.21±0.86
고추	3.34±1.23	0.79±0.68	0.71±1.52	-0.30±1.30	-2.21±0.86	-2.21±0.86	-2.21±0.86
배추	2.27±0.95	0.78±1.48	0.26±1.23	-1.86±1.51	-2.97±0.71	-2.97±0.71	-2.97±0.71
상추	2.08±2.20	-0.67±1.63	-0.26±0.64	-1.68±1.51	-2.23±1.58	-2.25±0.87	-2.25±0.87
오이	1.81±2.50	1.36±1.12	1.29±0.62	-0.62±0.85	-2.60±0.82	-2.56±1.72	-2.60±0.82
열무	1.80±1.05	0.42±1.12	-0.40±0.73	-2.12±0.85	-2.12±0.85	-2.12±0.85	-2.12±0.85
평균	2.50±1.72	0.44±1.48	0.28±1.17	-1.35±1.04	-2.39±0.99	-2.39±1.03	-2.39±0.83

\*Other pathogens : *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *C. perfringens*





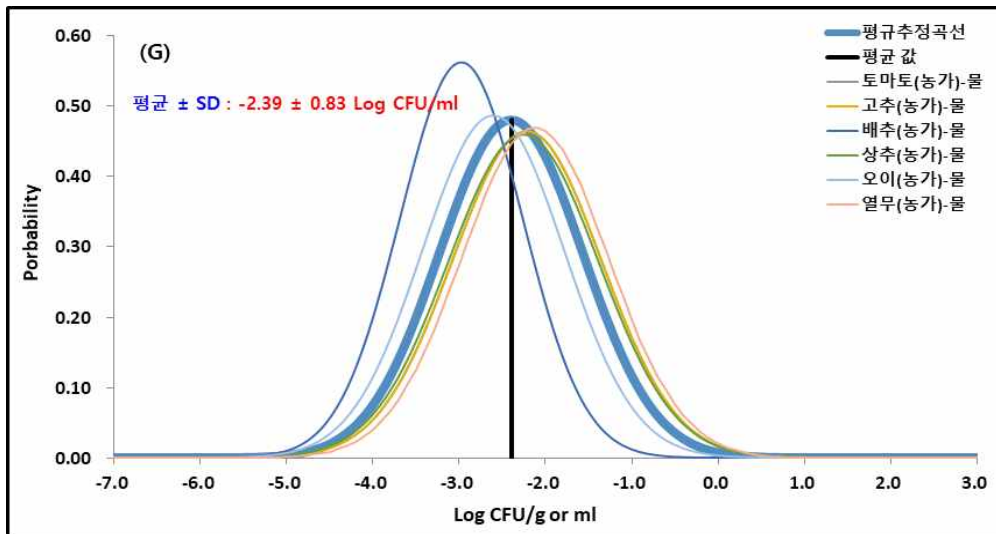
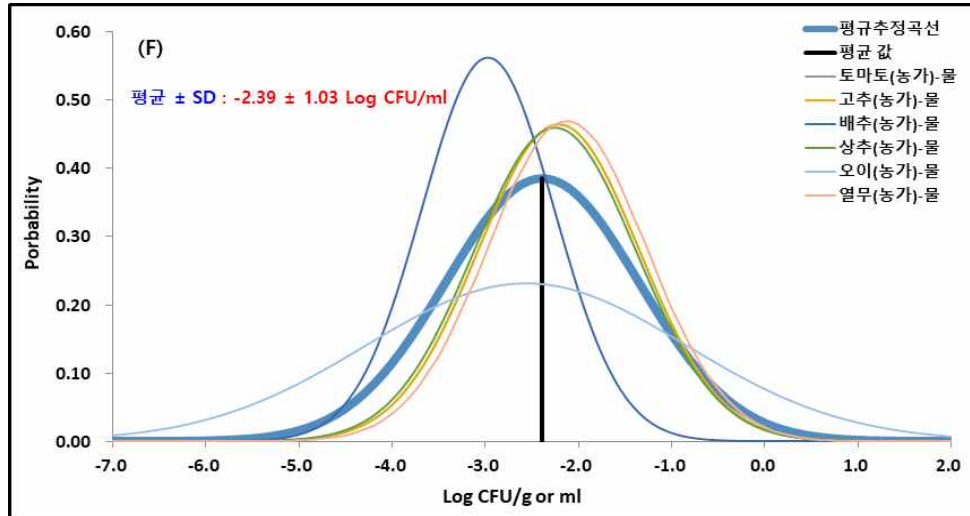


그림 3-3-12. 농산물 재배시 사용한 관개수에서의 미생물 오염수준 정량화  
 [(A) 일반세균수, (B) 곰팡이-효모, (C) 대장균군, (D) 대장균, (E) *B. cereus* (F) *S. aureus*, (G) Other pathogens(*L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *C. perfringens*)]

(나) 재배지 토양에서의 미생물 오염수준 정량화

□ 2016년부터 2018년까지 열무, 상추, 오이, 배추, 사과, 고추, 토마토 재배지 토양(n=164)에서의 일반세균수, 곰팡이-효모, 대장균군, 대장균, *B. cereus*, *S. aureus*, other pathogens (*L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *C. perfringens*) 모니터링 결과를 바탕으로 통계학적 오염수준을 정량화한 결과는 아래와 같음

○ 일반세균수

- 각 농산물 재배지 토양에서의 일반세균의 오염수준을 정량화한 결과, 평균  $6.93 \pm 1.15$  Log CFU/g이었으며, 열무 재배지 토양에서는  $7.40 \pm 0.47$  Log CFU/g, 상추 재배지 토양에서는  $7.08 \pm 1.30$  Log CFU/g, 오이 재배지 토양에서는  $6.91 \pm 0.38$  Log CFU/g, 배추 재배지 토양에서는  $6.85 \pm 0.94$  Log CFU/g, 사과 재배지 토양에서는  $6.84 \pm 1.10$  Log CFU/g,

고추 재배지 토양에서는  $6.79 \pm 1.30$  Log CFU/g, 토마토 재배지 토양에서는  $6.63 \pm 1.86$  Log CFU/g으로 오염수준이 정량화되었음

○ 곰팡이, 효모

- 각 농산물 재배지 토양에서의 곰팡이-효모의 오염수준을 정량화한 결과, 평균  $4.67 \pm 0.63$  Log CFU/g이었으며, 열무 재배지 토양에서는  $4.44 \pm 0.75$  Log CFU/g, 상추 재배지 토양에서는  $4.69 \pm 0.59$  Log CFU/g, 오이 재배지 토양에서는  $4.71 \pm 0.83$  Log CFU/g, 배추 재배지 토양에서는  $4.83 \pm 0.59$  Log CFU/g, 사과 재배지 토양에서는  $5.15 \pm 0.47$  Log CFU/g, 고추 재배지 토양에서는  $4.46 \pm 0.40$  Log CFU/g, 토마토 재배지 토양에서는  $4.38 \pm 0.65$  Log CFU/g으로 오염수준이 정량화되었음

○ 대장균군

- 농산물 재배지 토양에서의 대장균군의 오염수준을 정량화한 결과, 평균  $3.28 \pm 1.15$  Log CFU/g이었으며, 열무 재배지 토양에서는  $3.75 \pm 0.73$  Log CFU/g, 상추 재배지 토양에서는  $3.05 \pm 1.14$  Log CFU/g, 오이 재배지 토양에서는  $3.05 \pm 1.17$  Log CFU/g, 배추 재배지 토양에서는  $3.35 \pm 1.15$  Log CFU/g, 사과 재배지 토양에서는  $4.15 \pm 0.15$  Log CFU/g, 고추 재배지 토양에서는  $3.58 \pm 1.82$  Log CFU/g, 토마토 재배지 토양에서는  $2.01 \pm 1.15$  Log CFU/g으로 오염수준이 정량화되었음

○ 대장균

- 각 농산물 재배지 토양에서의 대장균의 오염수준을 정량화한 결과, 평균  $-1.23 \pm 1.12$  Log CFU/g이었으며, 열무 재배지 토양에서는  $-1.27 \pm 0.83$  Log CFU/g, 상추 재배지 토양에서는  $-1.36 \pm 1.10$  Log CFU/g, 오이 재배지 토양에서는  $-1.13 \pm 1.08$  Log CFU/g, 배추 재배지 토양에서는  $-2.09 \pm 0.97$  Log CFU/g, 사과 재배지 토양에서는  $-0.49 \pm 1.36$  Log CFU/g, 고추 재배지 토양에서는  $-1.31 \pm 1.09$  Log CFU/g, 토마토 재배지 토양에서는  $-0.95 \pm 1.34$  Log CFU/g으로 오염수준이 정량화되었음

○ *B. cereus*

- 각 농산물 재배지 토양에서의 *B. cereus*의 오염수준을 정량화한 결과, 평균  $-0.51 \pm 2.06$  Log CFU/g이었으며, 열무 재배지 토양에서는  $-1.13 \pm 1.29$  Log CFU/g, 상추 재배지 토양에서는  $-1.10 \pm 2.05$  Log CFU/g, 오이 재배지 토양에서는  $-0.90 \pm 2.17$  Log CFU/g, 배추 재배지 토양에서는  $-1.66 \pm 1.86$  Log CFU/g, 사과 재배지 토양에서는  $-1.10 \pm 2.05$  Log CFU/g, 고추 재배지 토양에서는  $1.26 \pm 2.66$  Log CFU/g, 토마토 재배지 토양에서는  $1.08 \pm 2.12$  Log CFU/g으로 오염수준이 정량화되었음

○ *S. aureus*

- 각 농산물 재배지 토양에서의 *S. aureus*의 오염수준을 정량화한 결과, 평균  $-4.15 \pm 0.77$  Log CFU/g이었으며, 열무 재배지 토양에서는  $-4.47 \pm 0.70$  Log CFU/g, 상추 재배지 토양에서는  $-4.57 \pm 0.68$  Log CFU/g, 오이 재배지 토양에서는  $-4.12 \pm 0.76$  Log CFU/g, 배추 재배지 토양에서는  $-4.00 \pm 0.79$  Log CFU/g, 사과 재배지 토양에서는  $-3.63 \pm 0.91$  Log

CFU/g, 고추 재배지 토양에서는  $-4.23 \pm 0.74$  Log CFU/g, 토마토 재배지 토양에서는  $-4.05 \pm 0.78$  Log CFU/g으로 오염수준이 정량화되었음

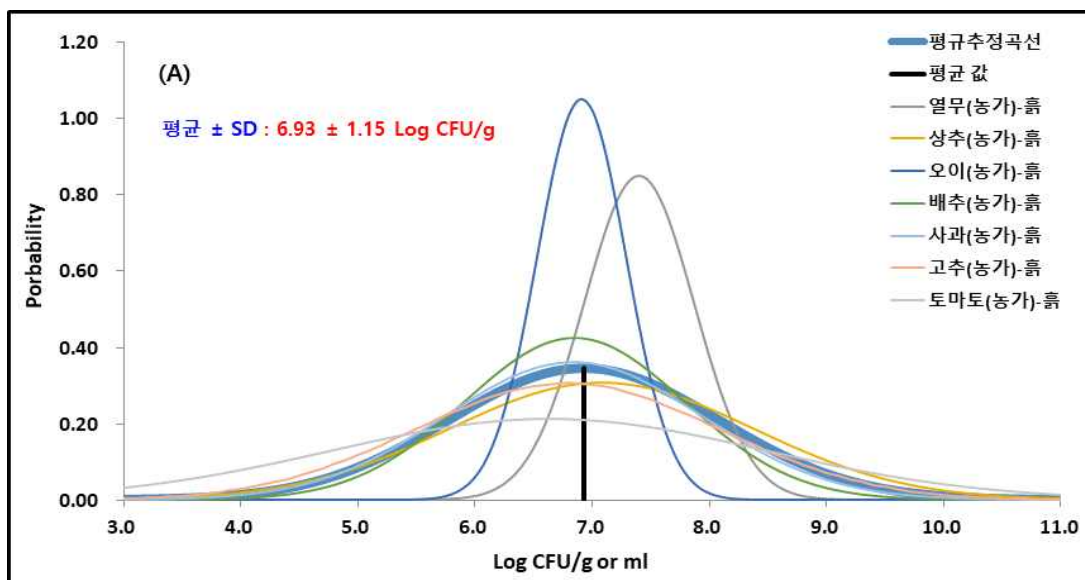
○ Other pathogens(*L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *C. perfringens*)

- 각 농산물 재배지 토양에서의 *S. aureus*의 오염수준을 정량화한 결과, 평균  $-4.25 \pm 0.76$  Log CFU/g이었으며, 열무 재배지 토양에서는  $-4.47 \pm 0.70$  Log CFU/g, 상추 재배지 토양에서는  $-4.57 \pm 0.68$  Log CFU/g, 오이 재배지 토양에서는  $-4.12 \pm 0.76$  Log CFU/g, 배추 재배지 토양에서는  $-4.70 \pm 0.69$  Log CFU/g, 사과 재배지 토양에서는  $-3.63 \pm 0.91$  Log CFU/g, 고추 재배지 토양에서는  $-4.23 \pm 0.74$  Log CFU/g, 토마토 재배지 토양에서는  $-4.05 \pm 0.78$  Log CFU/g으로 오염수준이 정량화되었음

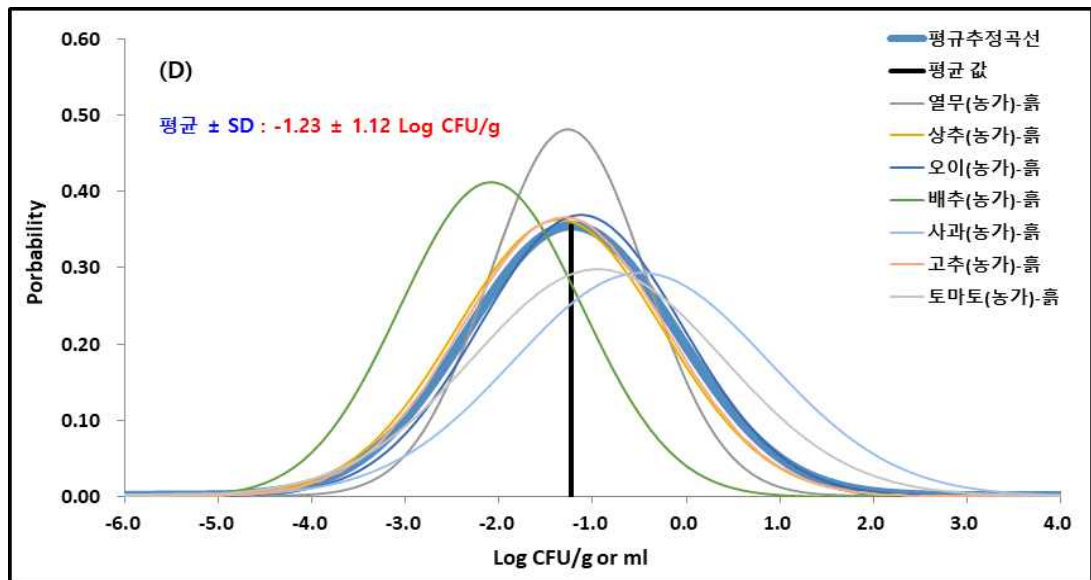
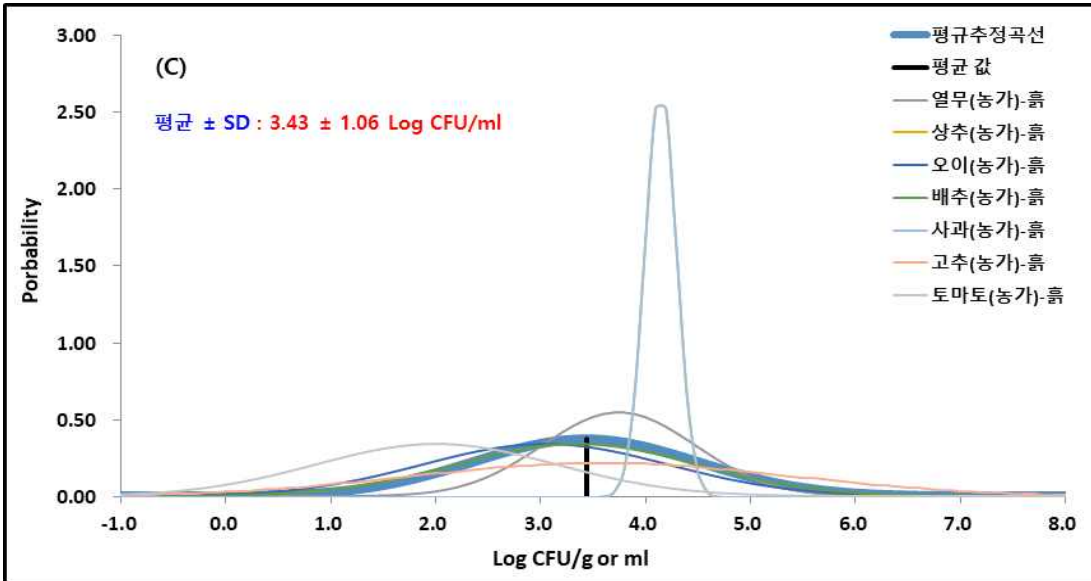
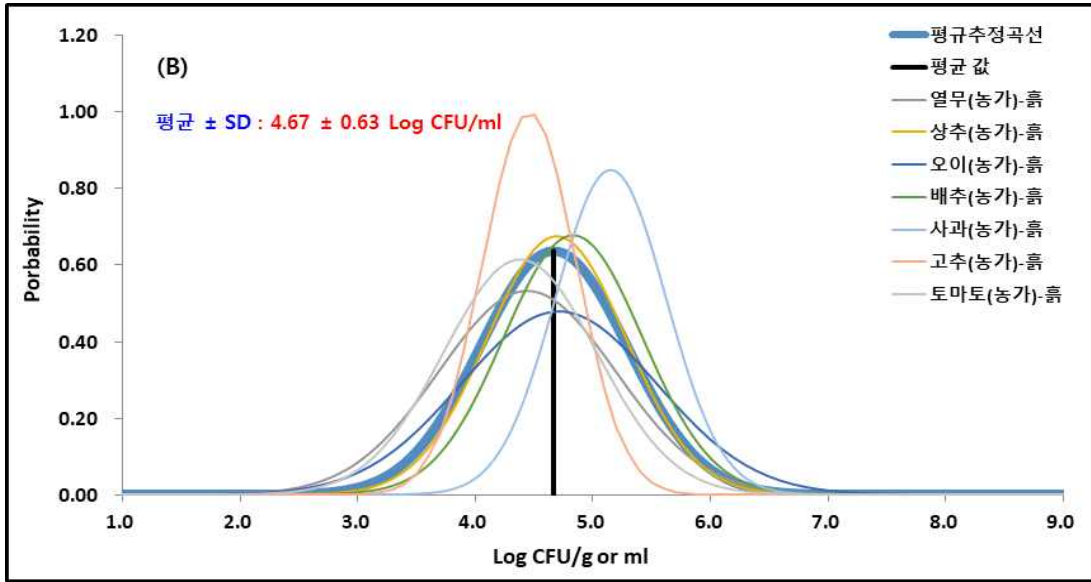
표 3-3-16. 농산물 재배지 토양에서의 미생물 오염수준 정량화

농산물 재배지	일반세균	곰팡이-효모	대장균군	대장균	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	Other pathogens*
	Mean±SD (Log CFU/g)						
열무	7.40±0.47	4.44±0.75	3.75±0.73	-1.27±0.83	-1.13±1.29	-4.47±0.70	-4.47±0.70
상추	7.08±1.30	4.69±0.59	4.15±0.15	-1.36±1.10	-1.10±2.05	-4.57±0.68	-4.57±0.68
오이	6.91±0.38	4.71±0.83	3.05±1.17	-1.13±1.08	-0.90±2.17	-4.12±0.76	-4.12±0.76
배추	6.85±0.94	4.83±0.59	3.35±1.15	-2.09±0.97	-1.66±1.86	-4.00±0.79	-4.70±0.69
사과	6.84±1.10	5.15±0.47	4.15±0.15	-0.49±1.36	-1.10±2.05	-3.63±0.91	-3.63±0.91
고추	6.79±1.30	4.46±0.40	3.58±1.82	-1.31±1.09	1.26±2.66	-4.23±0.74	-4.23±0.74
토마토	6.63±1.86	4.38±0.65	2.01±1.15	-0.95±1.34	1.08±2.12	-4.05±0.78	-4.05±0.78
평균	6.93±1.15	4.67±0.63	3.43±1.06	-1.23±1.12	-0.51±2.06	-4.15±0.77	-4.25±0.76

\*Other pathogens : *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *C. perfringens*







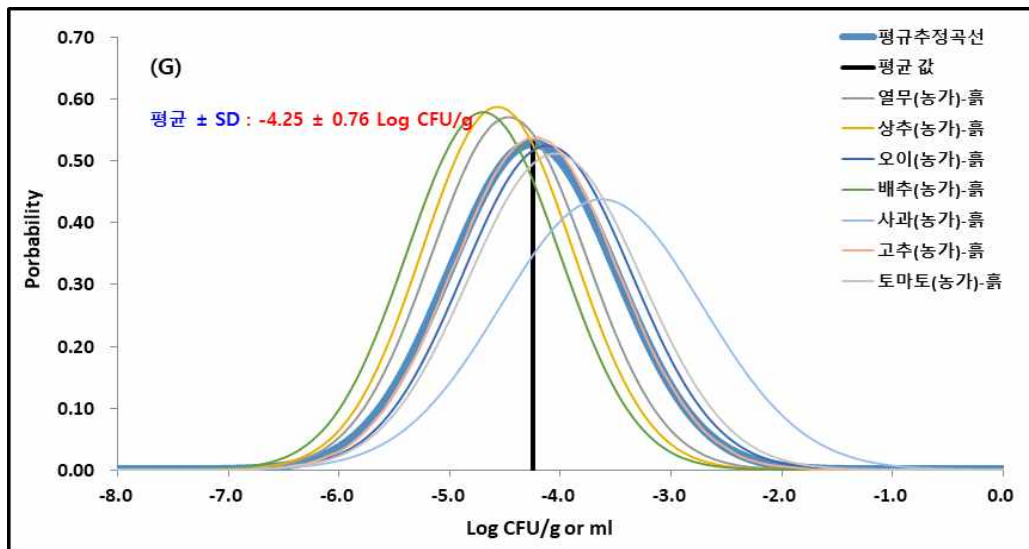
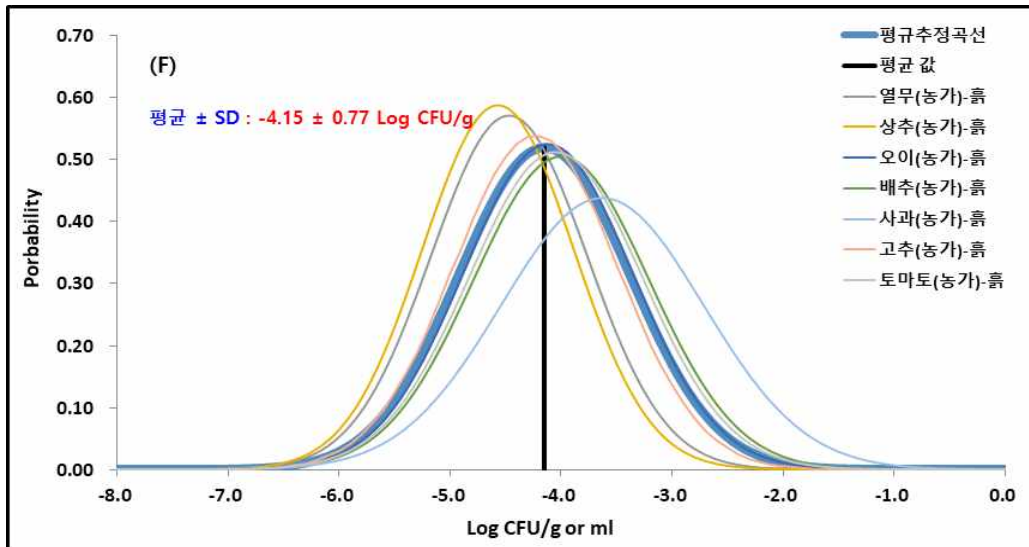
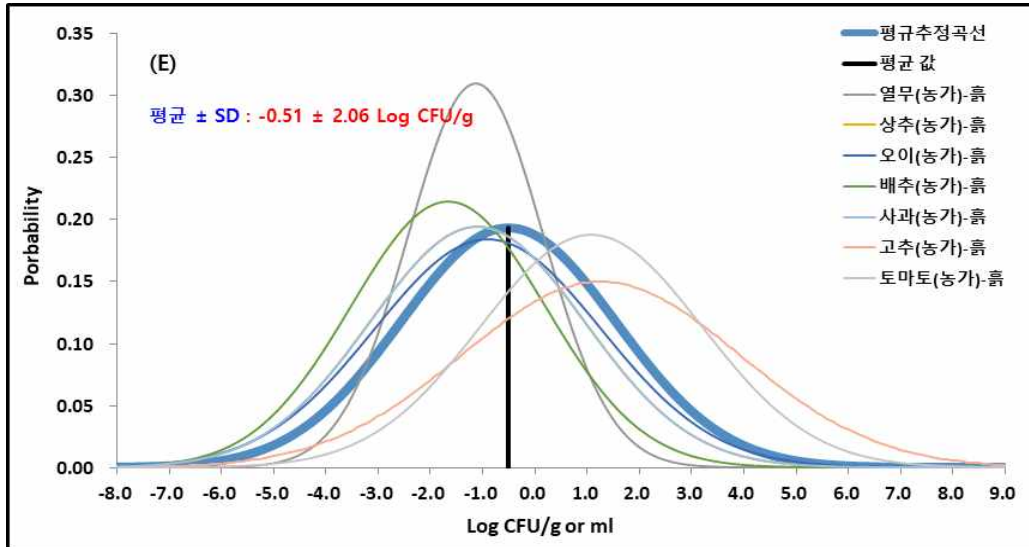


그림 3-3-13. 농산물 재배지 토양에서의 미생물 오염수준 정량화

[(A) 일반세균수, (B) 곰팡이-효모, (C) 대장균군, (D) 대장균, (E) *B. cereus* (F) *S. aureus*, (G) Other pathogens(*L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *C. perfringens*)]



(2) 농산물에서의 미생물 오염수준 정량화

- 2016년부터 2018년까지 무(n=12), 감자(n=13), 당근(n=13), 토마토(n=27), 고추(n=20), 오이(n=18), 상추(n=25), 열무(n=87), 사과(n=15), 배추(n=244)에서의 일반세균수, 곰팡이-효모, 대장균군, 대장균, *B. cereus*, *S. aureus*, other pathogens(*L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *C. perfringens*) 모니터링 결과를 바탕으로 통계학적 오염수준을 정량화한 결과는 아래와 같음

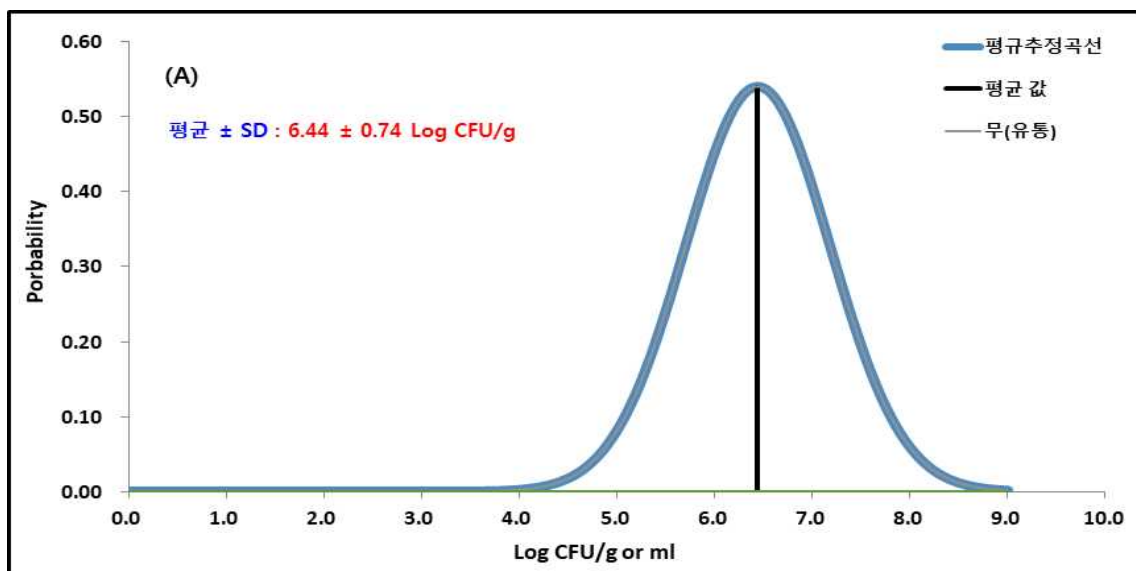
표 3-3-17. 농산물별 미생물 오염수준 정량화

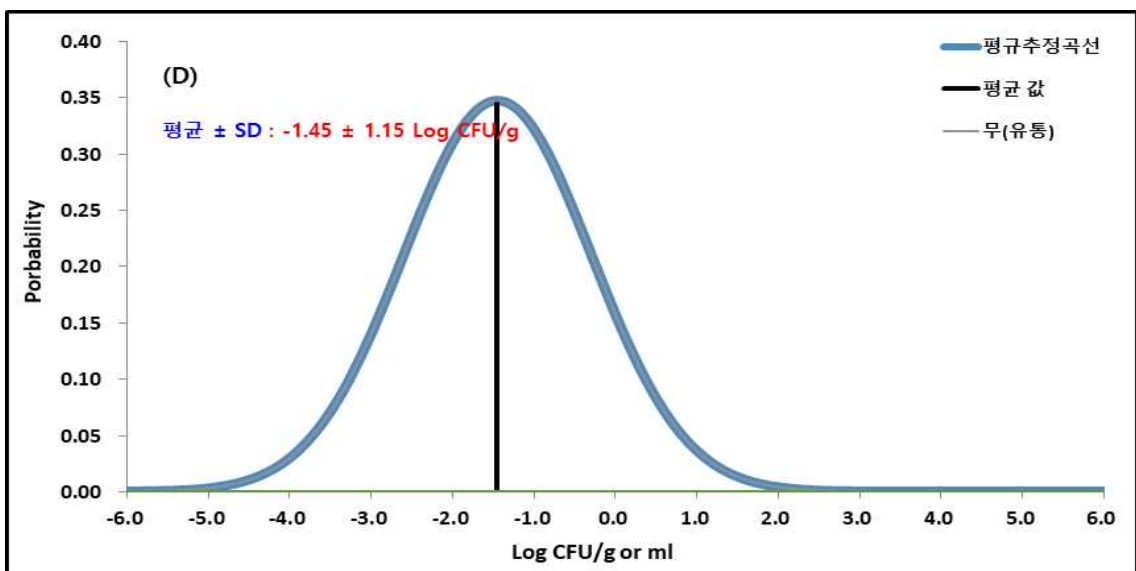
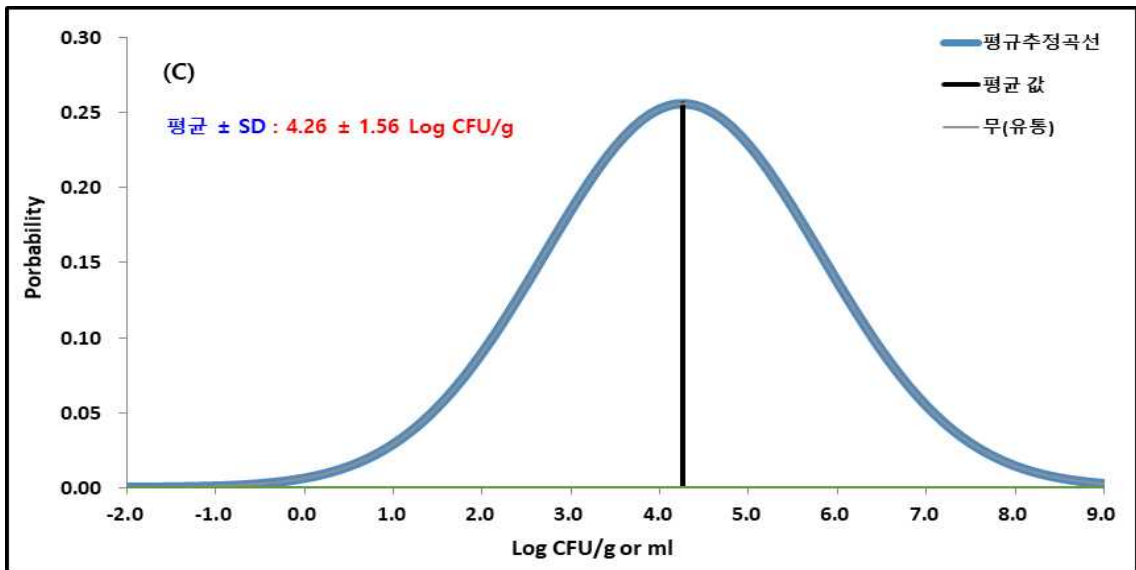
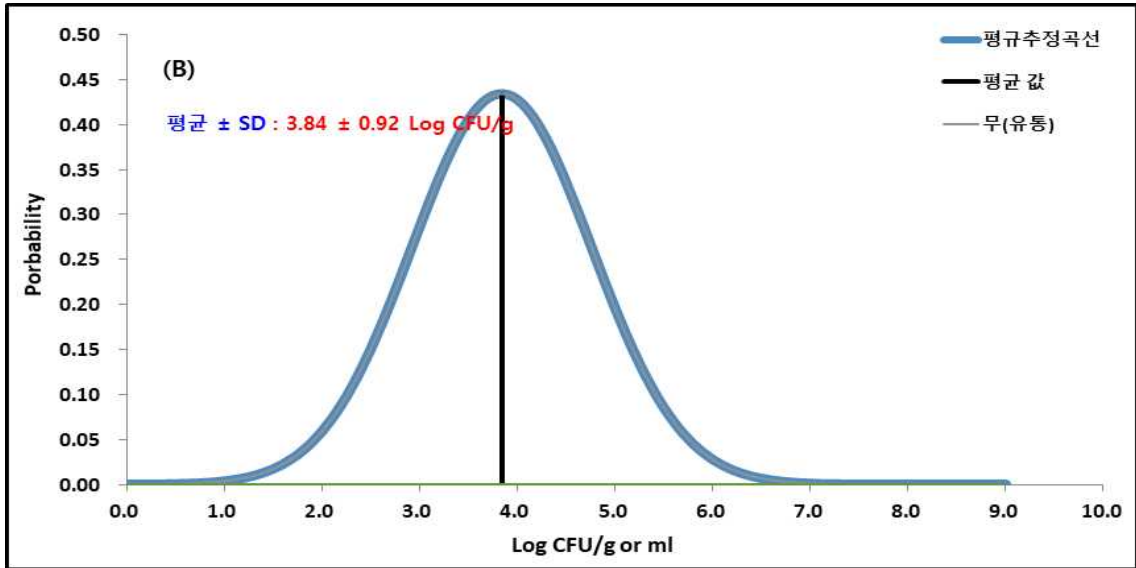
농산물	일반세균	곰팡이-효모	대장균군	대장균	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	Other pathogens*
	Mean±SD (Log CFU/g)						
무	6.44±0.74	3.84±0.92	4.26±1.52	-1.45±1.15	0.60±1.49	-3.62±0.85	-4.36±0.73
감자	6.25±0.73	3.63±0.62	3.75±1.47	-1.53±0.84	1.19±1.75	-4.39±0.72	-4.39±0.72
당근	6.40±1.63	3.52±1.08	4.08±1.25	-1.49±1.15	1.71±1.45	-4.39±0.72	-4.39±0.72
토마토	3.92±1.27	2.48±1.12	-0.98±2.20	-1.66±1.44	-1.67±0.87	-4.67±0.70	-4.67±0.70
고추	4.57±1.35	2.57±0.78	2.73±1.40	-1.76±0.88	-1.62±0.83	-4.53±0.69	-4.53±0.69
오이	4.87±0.92	4.20±1.10	0.52±1.41	-2.23±1.24	-2.07±0.87	-5.03±0.66	-5.03±0.66
상추	5.03±1.28	4.05±1.04	1.73±1.98	-1.85±1.16	-0.77±1.28	-3.88±0.78	-4.60±0.68
열무	6.81±0.71	4.26±0.90	3.70±1.01	-1.29±0.86	-1.27±1.03	-4.42±0.72	-4.42±0.72
사과	4.85±0.26	3.55±0.47	-0.49±1.20	-1.36±0.89	-1.36±0.89	-4.34±0.83	-4.34±0.83
배추	5.38±0.80	3.41±1.29	1.20±1.03	-2.09±1.16	-2.08±1.18	-4.20±0.75	-4.93±0.65

\*Other pathogens : *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *C. perfringens*

(가) 무

- 무에서의 일반세균수, 곰팡이-효모, 대장균군, 대장균, *B. cereus*, *S. aureus*, other pathogens(*L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *C. perfringens*)의 오염수준을 정량화한 결과, 각각 평균 6.44±0.74, 3.84±0.92, 4.26±1.52, -1.45±1.15, 0.60±1.49, -3.62±0.85, -4.36±0.73 Log CFU/g으로 오염수준이 정량화되었음





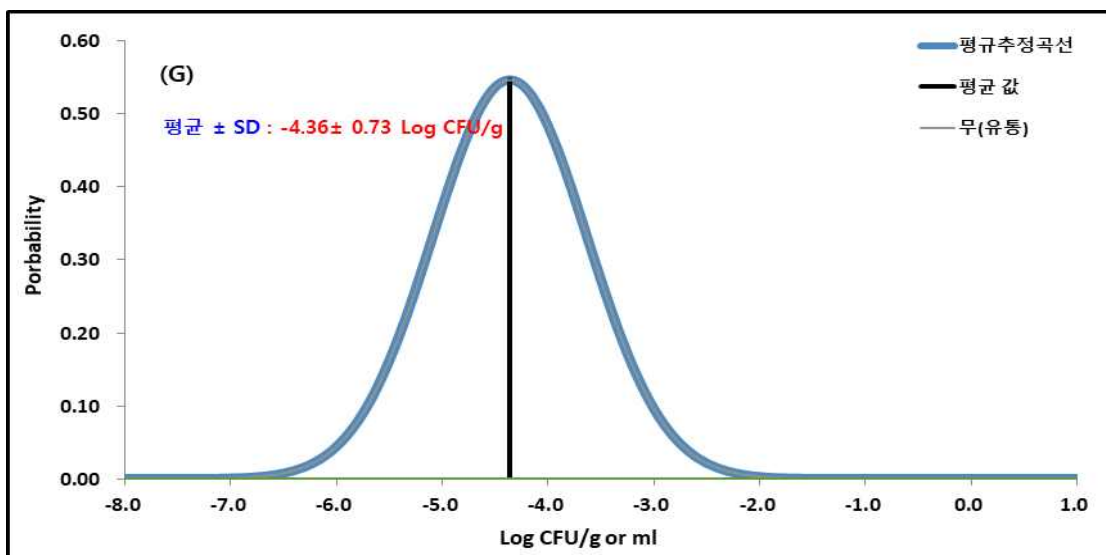
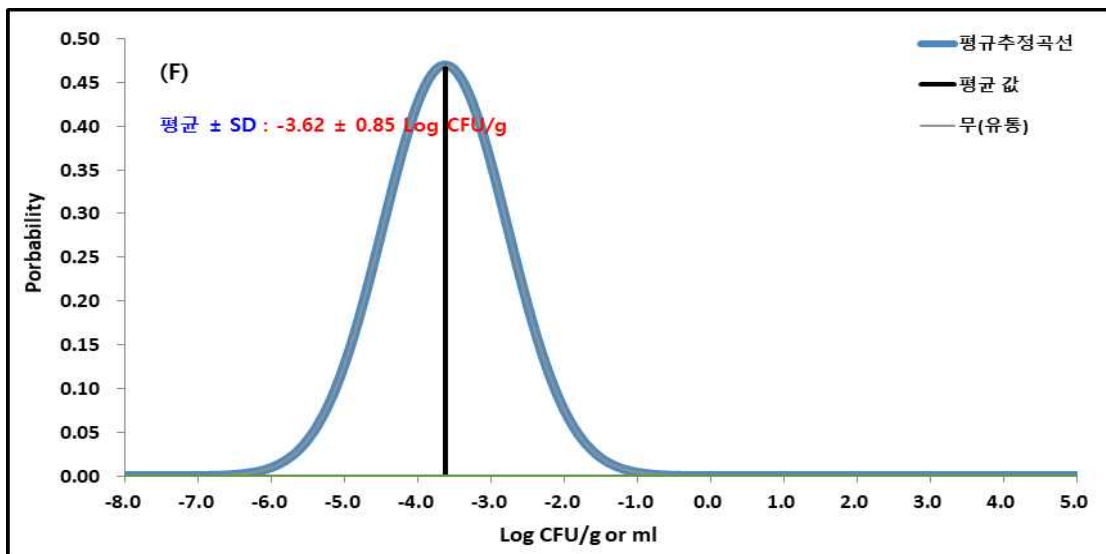
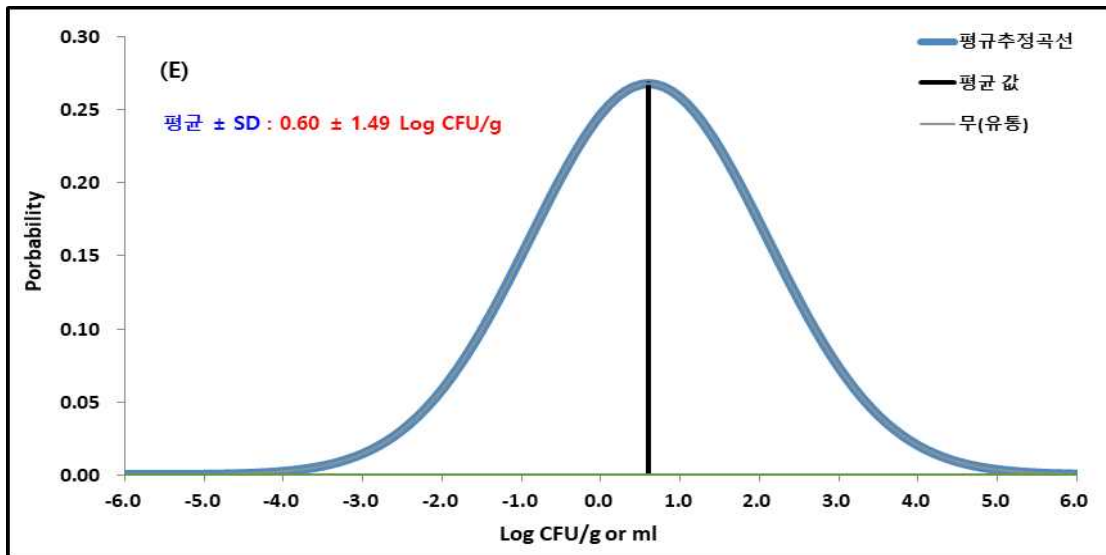
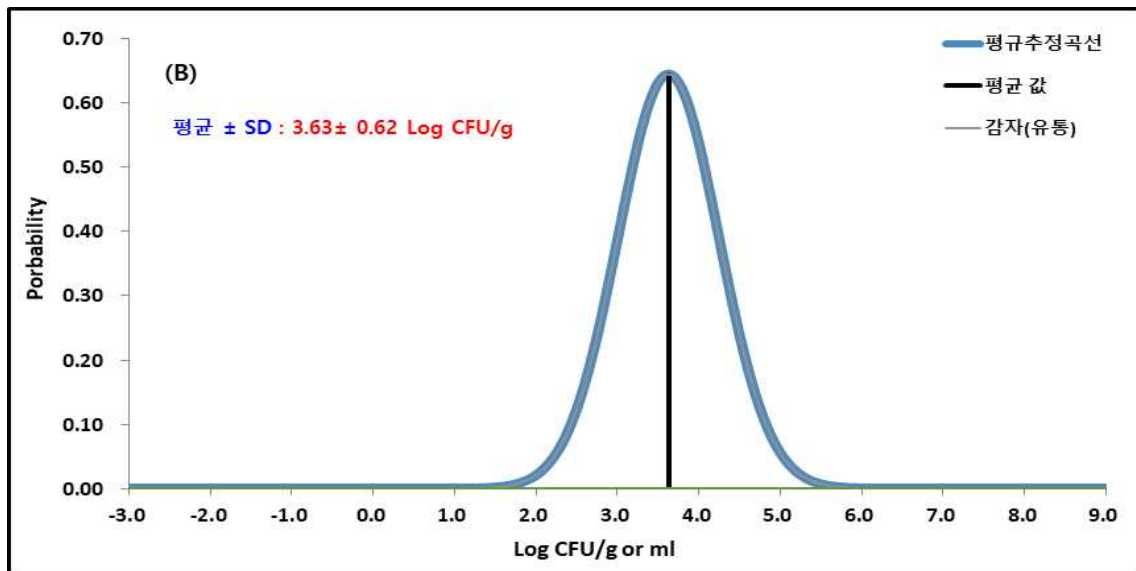
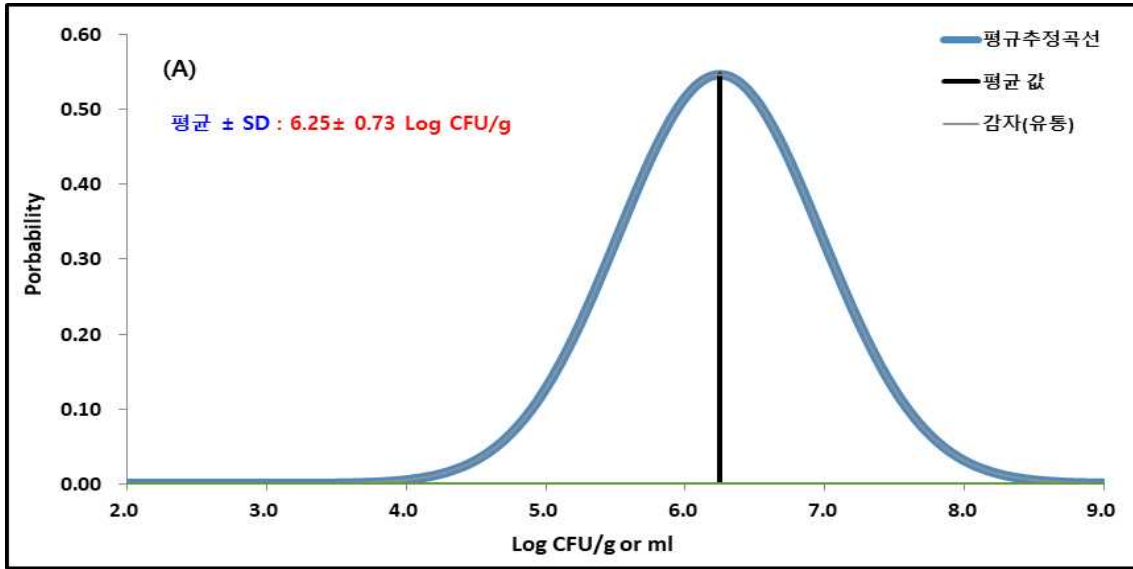


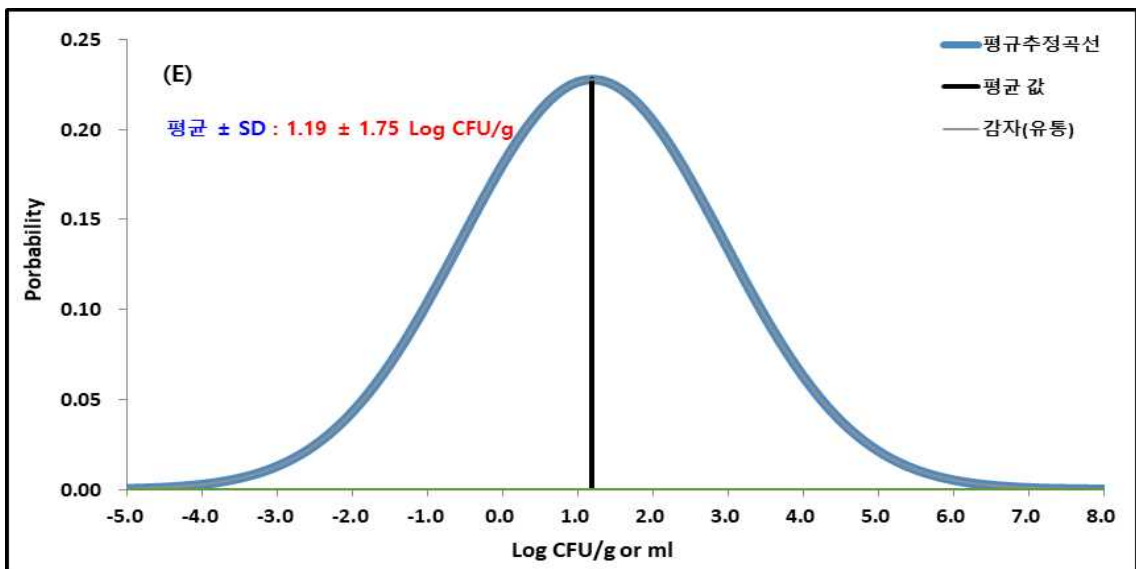
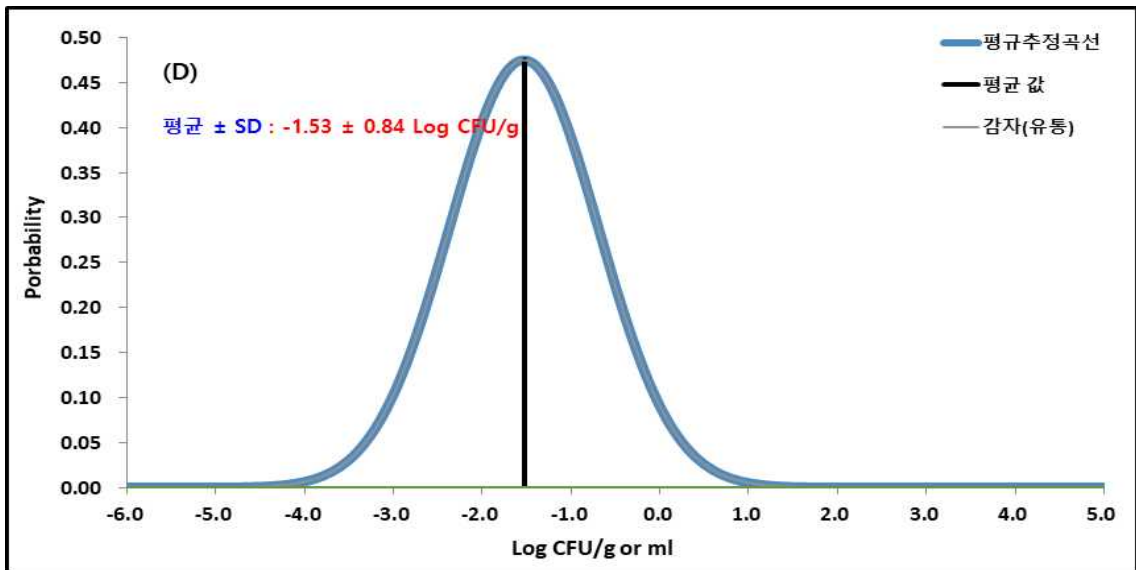
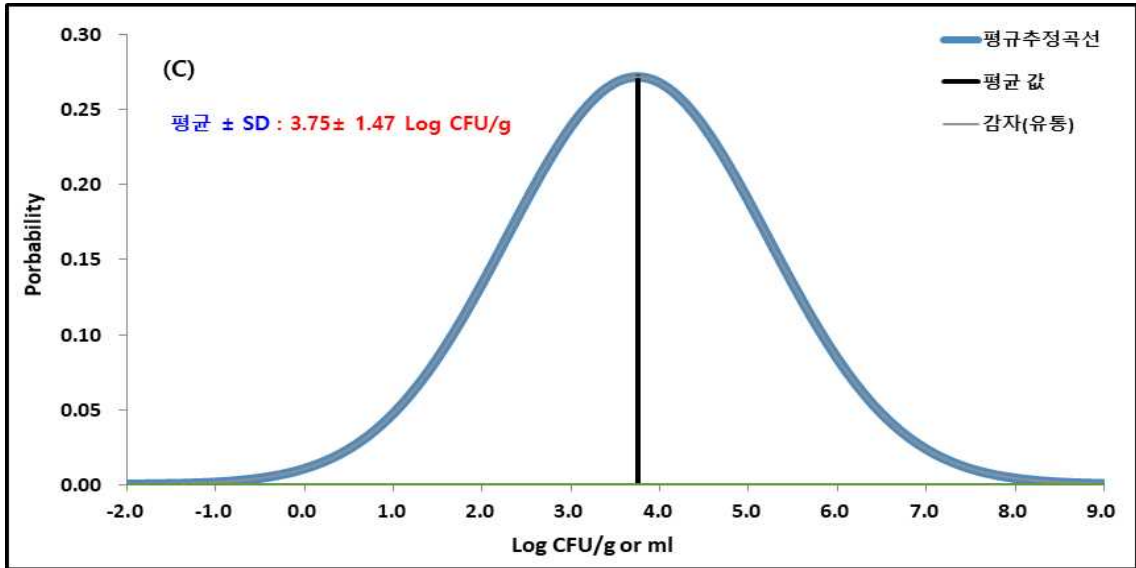
그림 3-3-14. 무에서의 미생물 오염수준 정량화

[(A) 일반세균수, (B) 곰팡이-효모, (C) 대장균군, (D) 대장균, (E) *B. cereus* (F) *S. aureus*, (G) Other pathogens(*L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *C. perfringens*)]

(나) 감자

□ 감자에서의 일반세균수, 곰팡이-효모, 대장균군, 대장균, *B. cereus*, *S. aureus*, other pathogens(*L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *C. perfringens*)의 오염수준을 정량화한 결과, 각각 평균  $6.25 \pm 0.73$ ,  $3.63 \pm 0.62$ ,  $3.75 \pm 1.47$ ,  $-1.53 \pm 0.84$ ,  $1.19 \pm 1.75$ ,  $-4.39 \pm 0.72$ ,  $-4.39 \pm 0.72$  Log CFU/g으로 오염수준이 정량화되었음





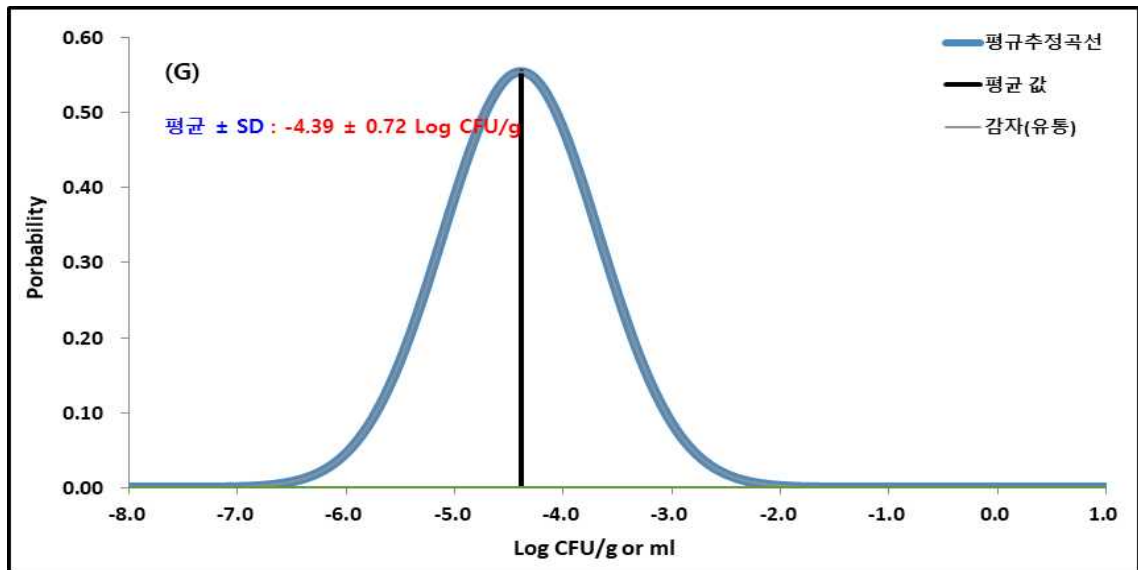
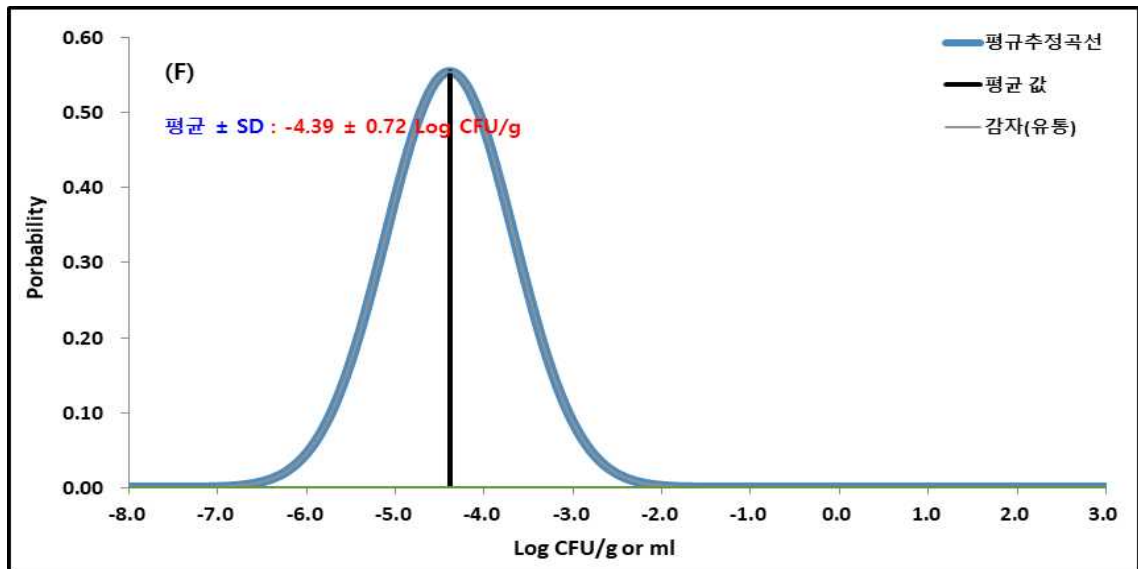
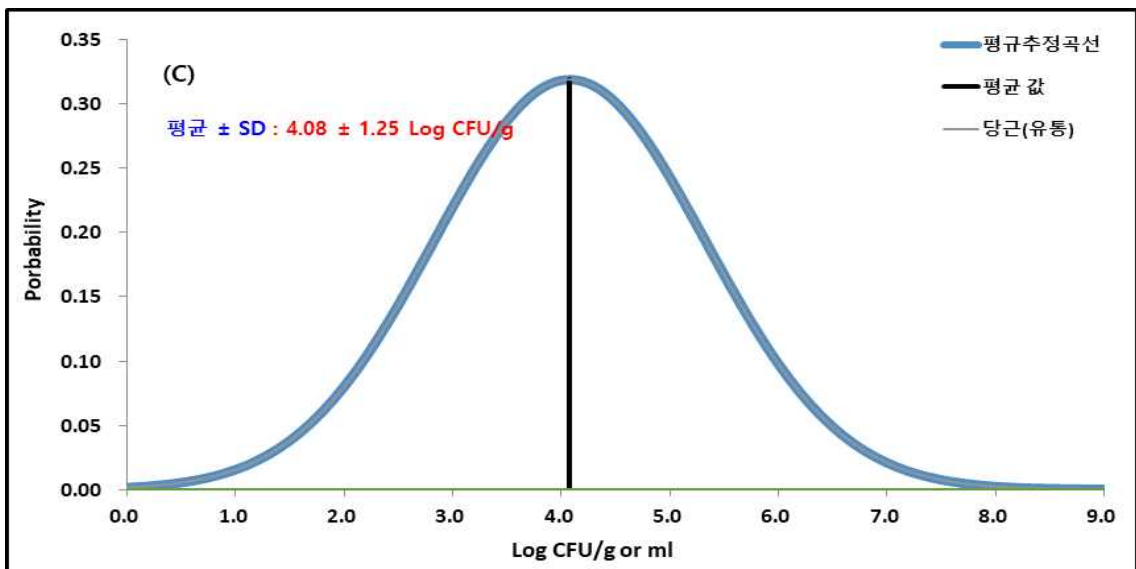
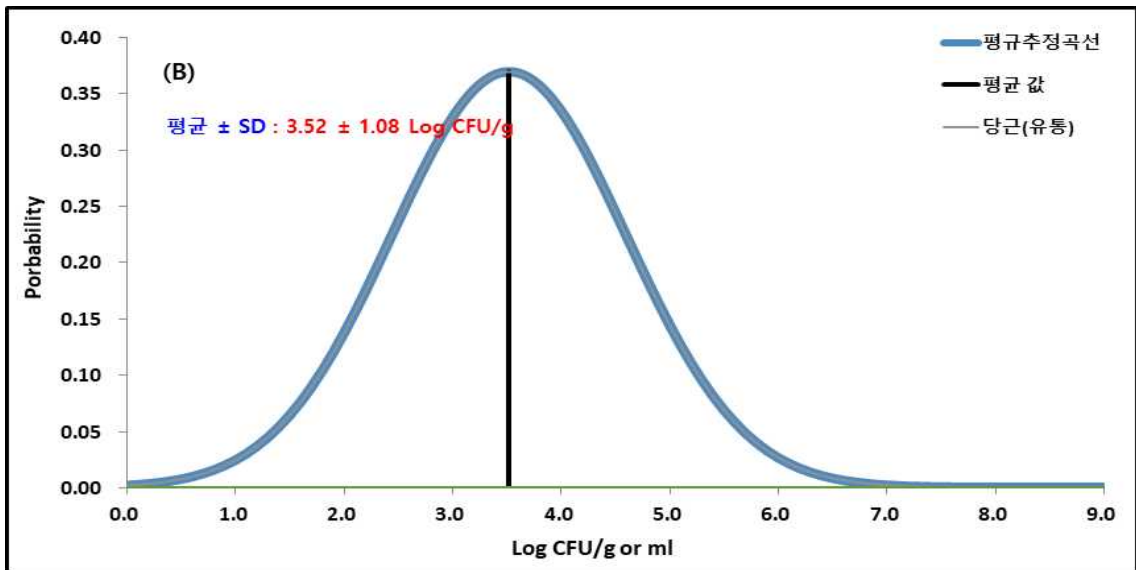
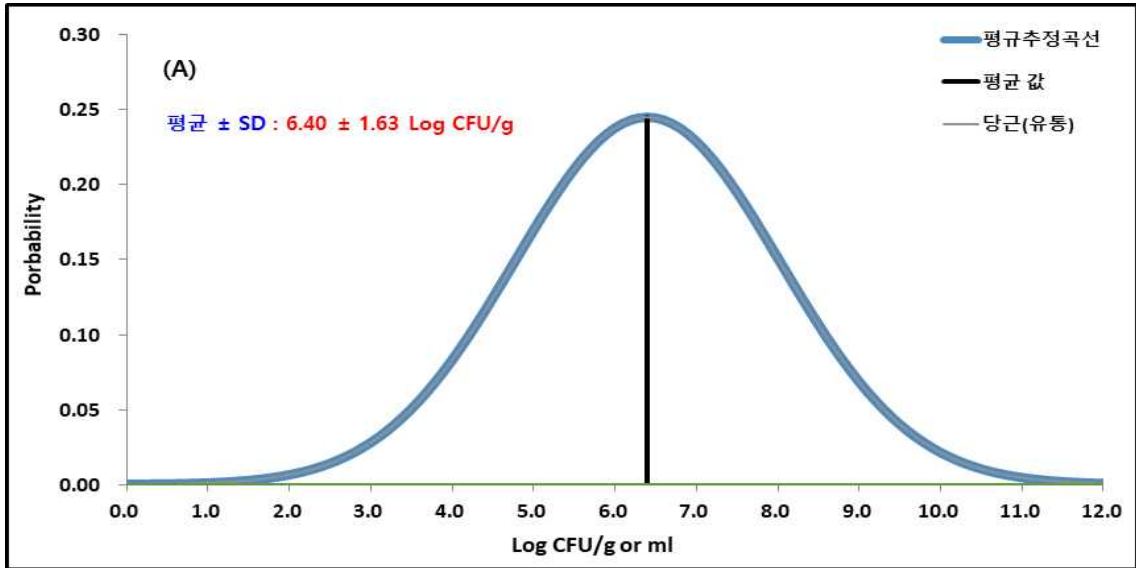


그림 3-3-15. 감자에서의 미생물 오염수준 정량화

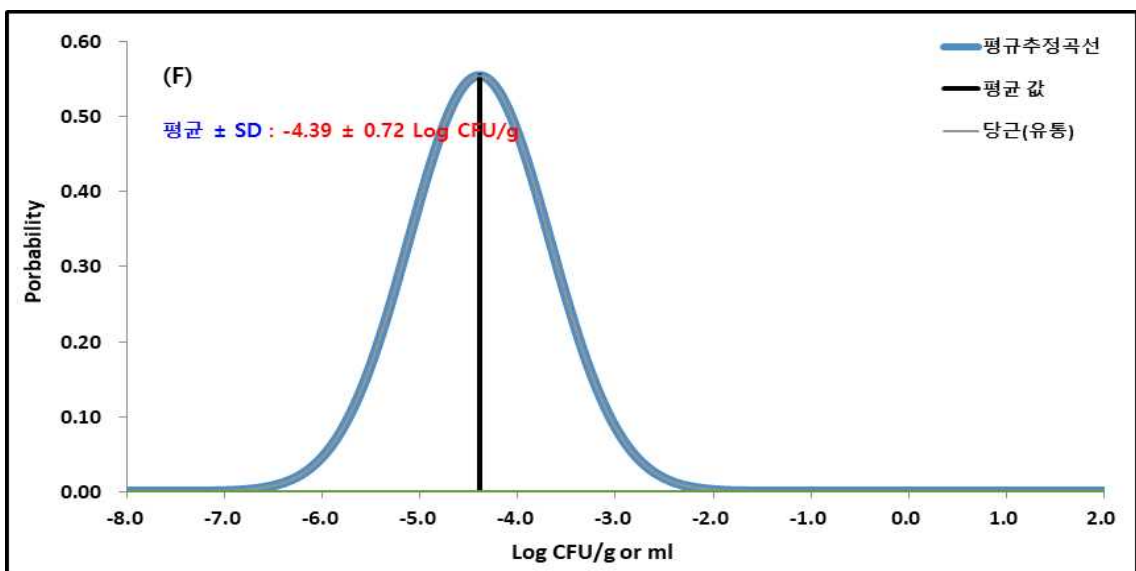
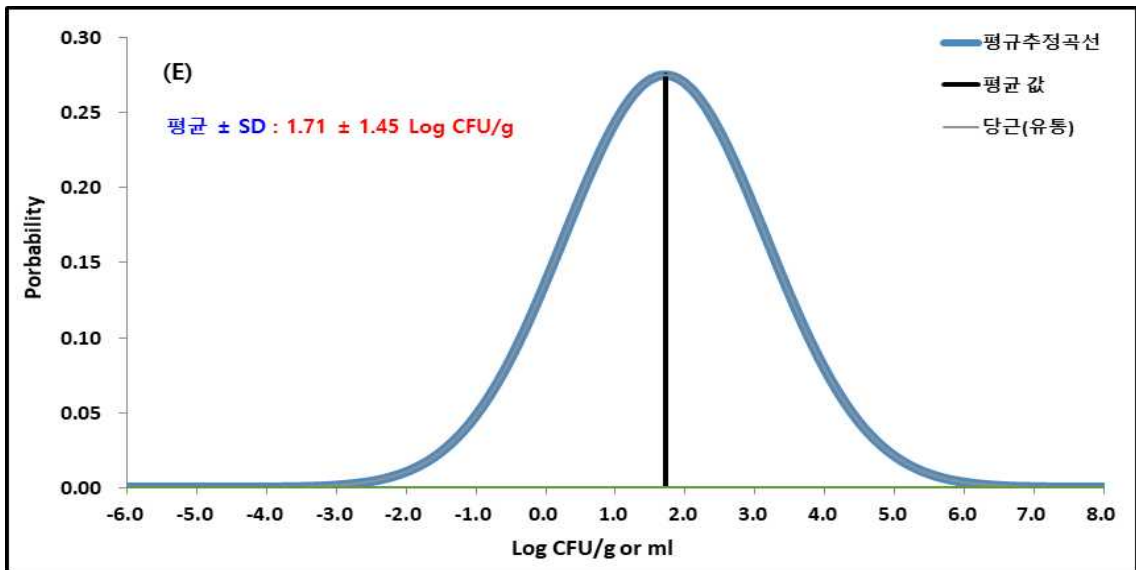
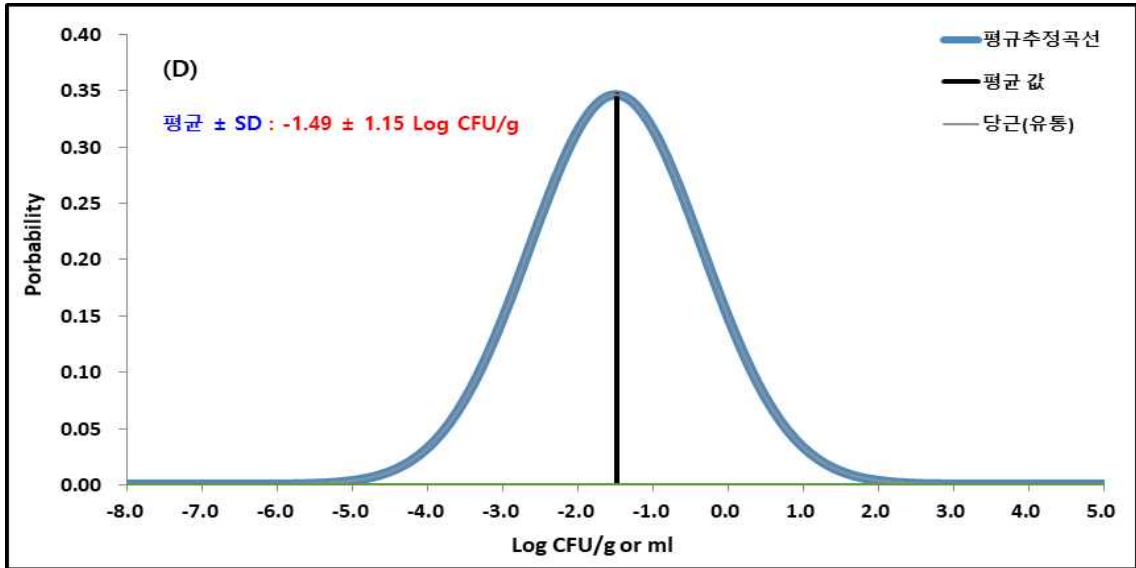
[(A) 일반세균수, (B) 곰팡이-효모, (C) 대장균군, (D) 대장균, (E) *B. cereus* (F) *S. aureus*, (G) Other pathogens(*L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *C. perfringens*)]

(다) 당근

□ 당근에서의 일반세균수, 곰팡이-효모, 대장균군, 대장균, *B. cereus*, *S. aureus*, other pathogens(*L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *C. perfringens*)의 오염수준을 정량화한 결과, 각각 평균 6.40±1.63, 3.52±1.08, 4.08±1.25, -1.49±1.15, 1.71±1.45, -4.39±0.72, -4.39±0.72 Log CFU/g으로 오염수준이 정량화되었음









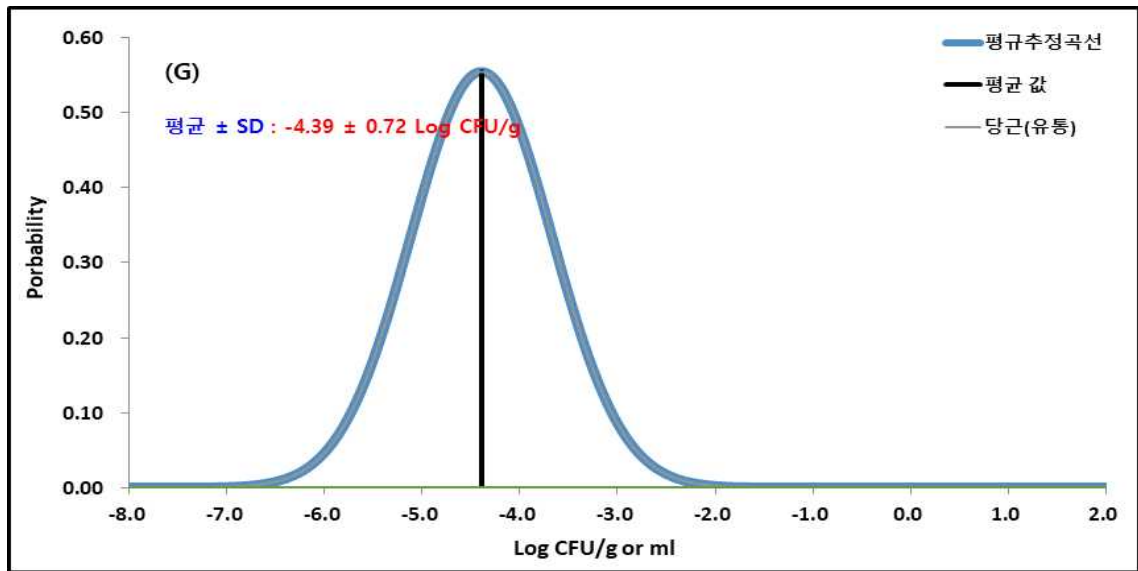
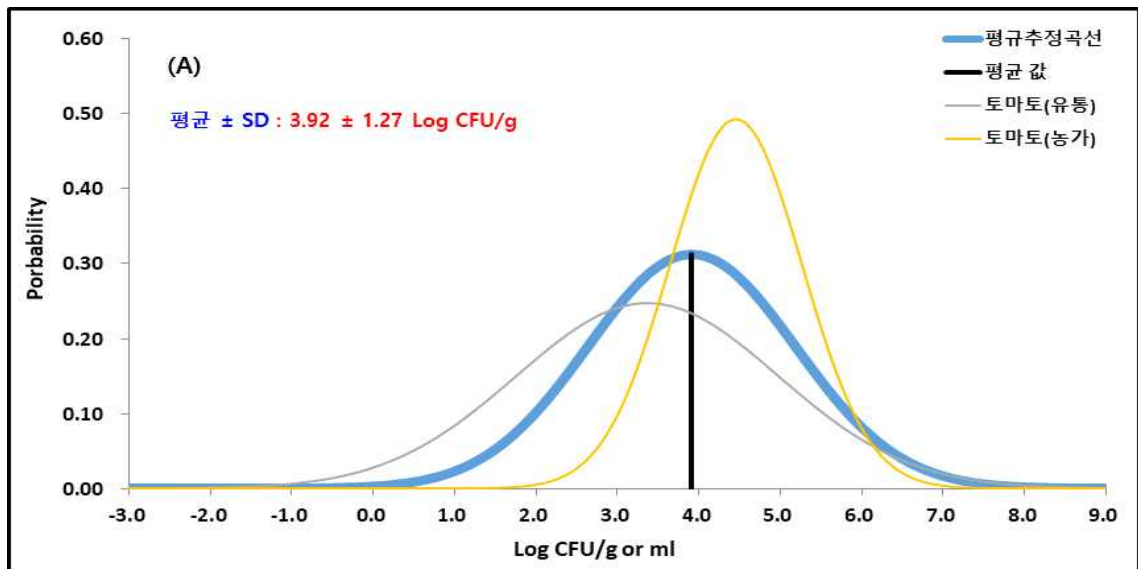


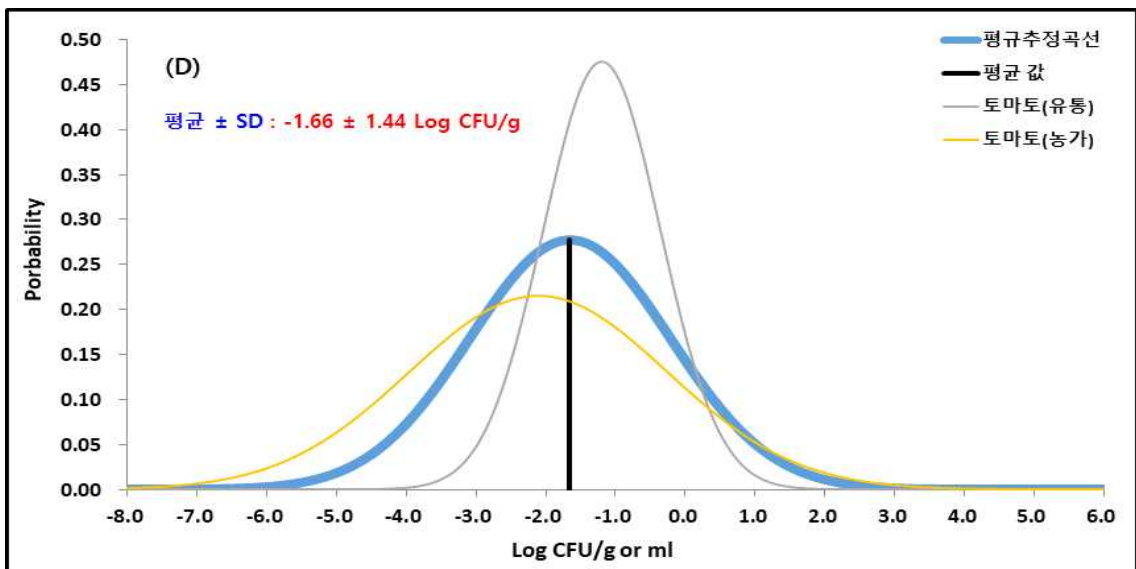
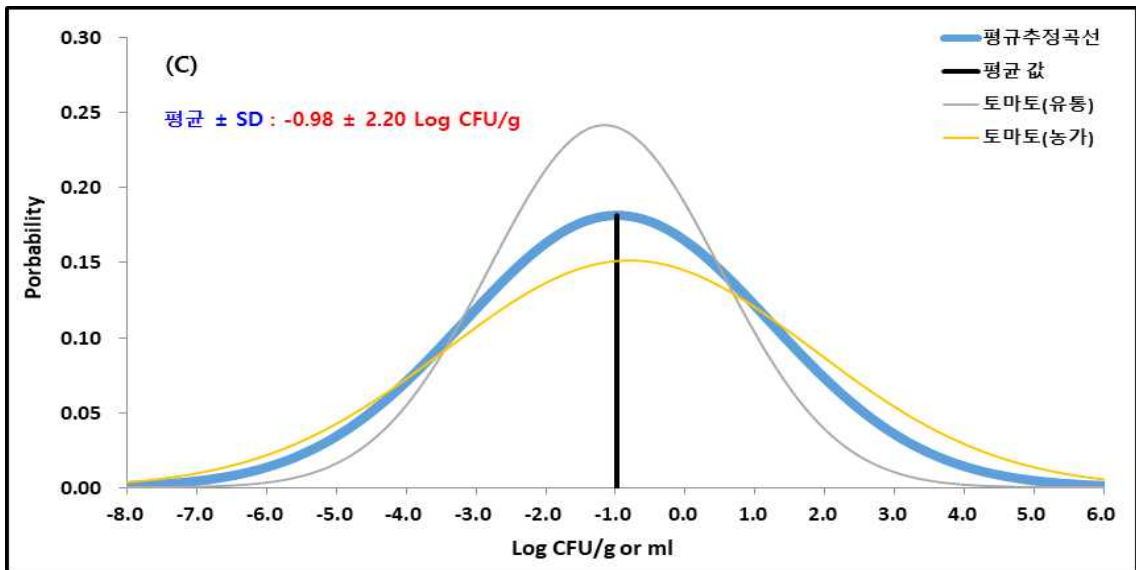
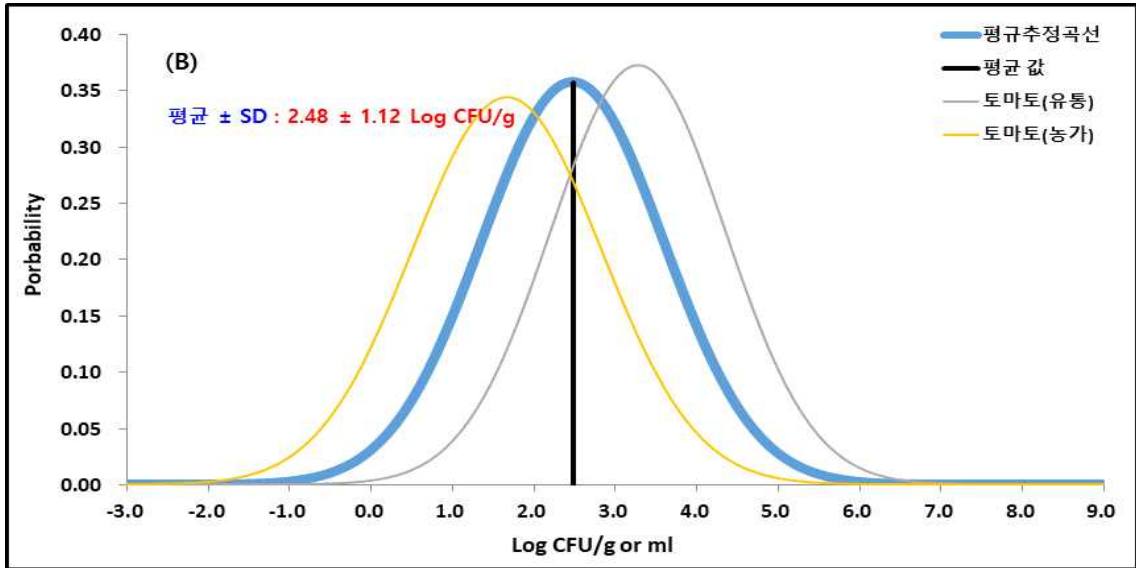
그림 3-3-16. 당근에서의 미생물 오염수준 정량화

[(A) 일반세균수, (B) 곰팡이-효모, (C) 대장균군, (D) 대장균, (E) *B. cereus* (F) *S. aureus*, (G) Other pathogens(*L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *C. perfringens*)]

(라) 토마토

□ 토마토에서의 일반세균수, 곰팡이-효모, 대장균군, 대장균, *B. cereus*, *S. aureus*, other pathogens(*L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *C. perfringens*)의 오염수준을 정량화한 결과, 각각 평균  $3.92 \pm 1.27$ ,  $2.48 \pm 1.12$ ,  $-0.98 \pm 2.20$ ,  $-1.66 \pm 1.44$ ,  $-1.67 \pm 0.87$ ,  $-4.67 \pm 0.70$ ,  $-4.67 \pm 0.70$  Log CFU/g으로 오염수준이 정량화되었음





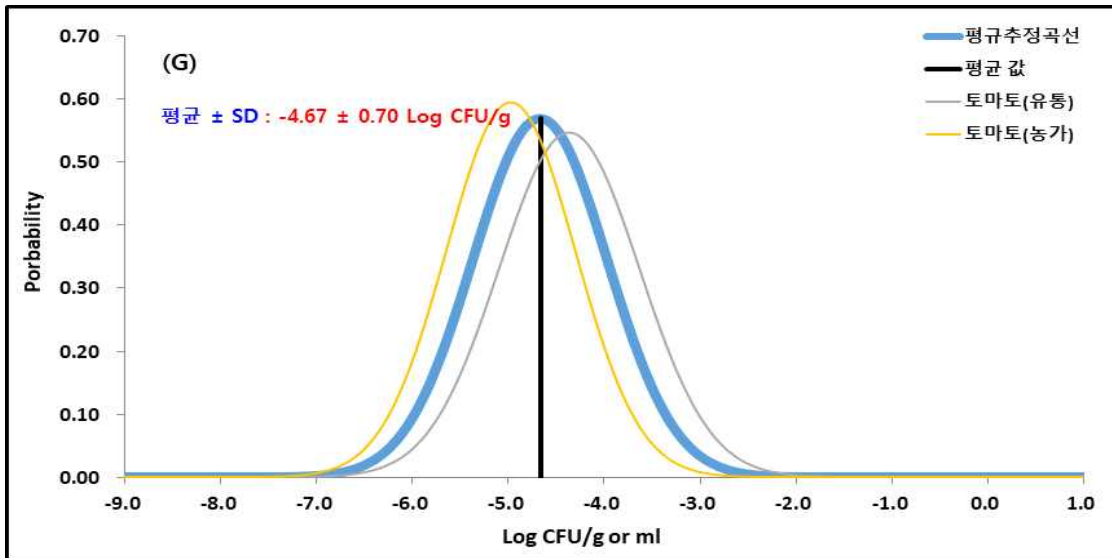
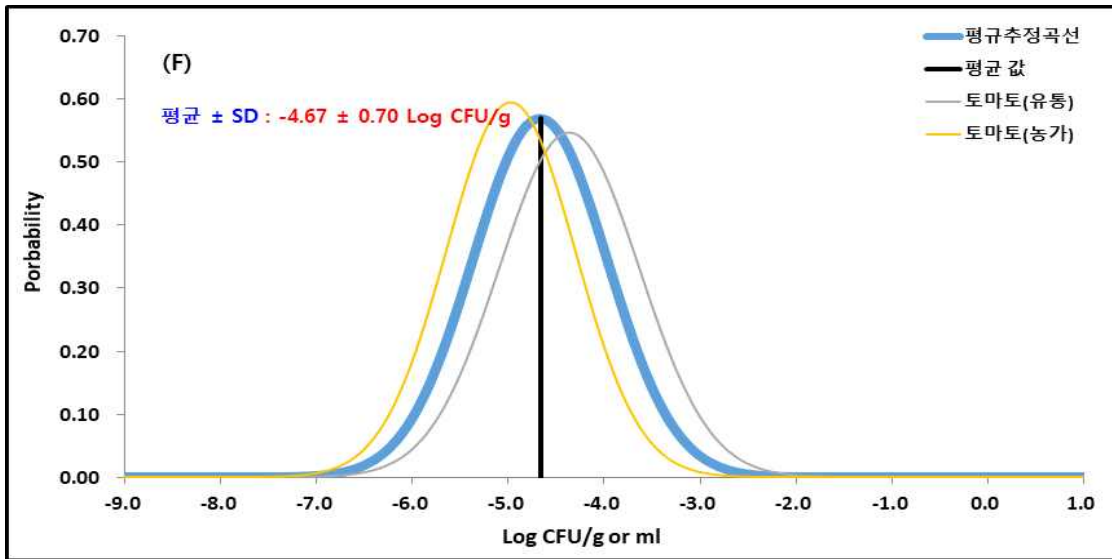
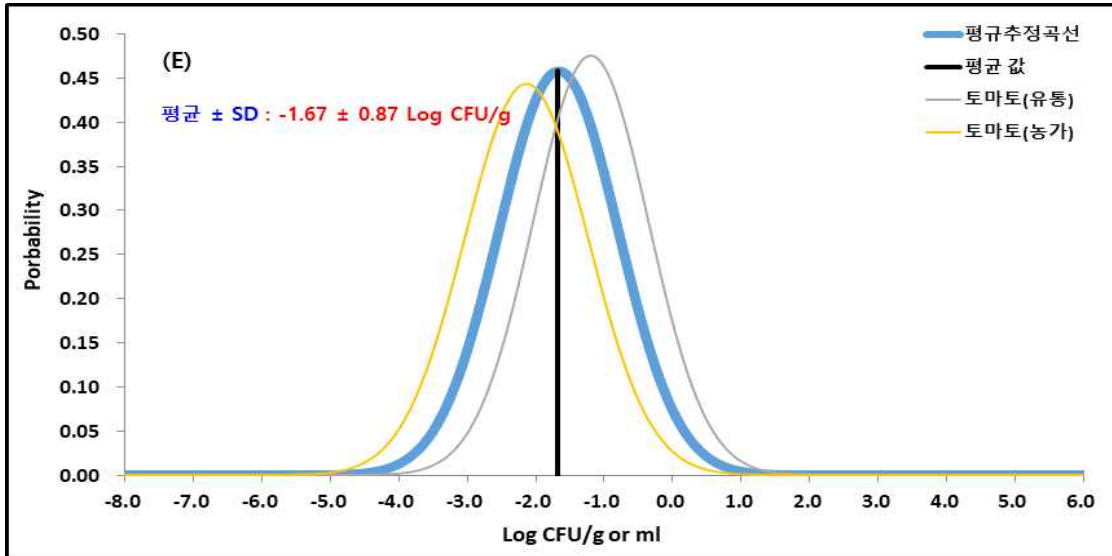
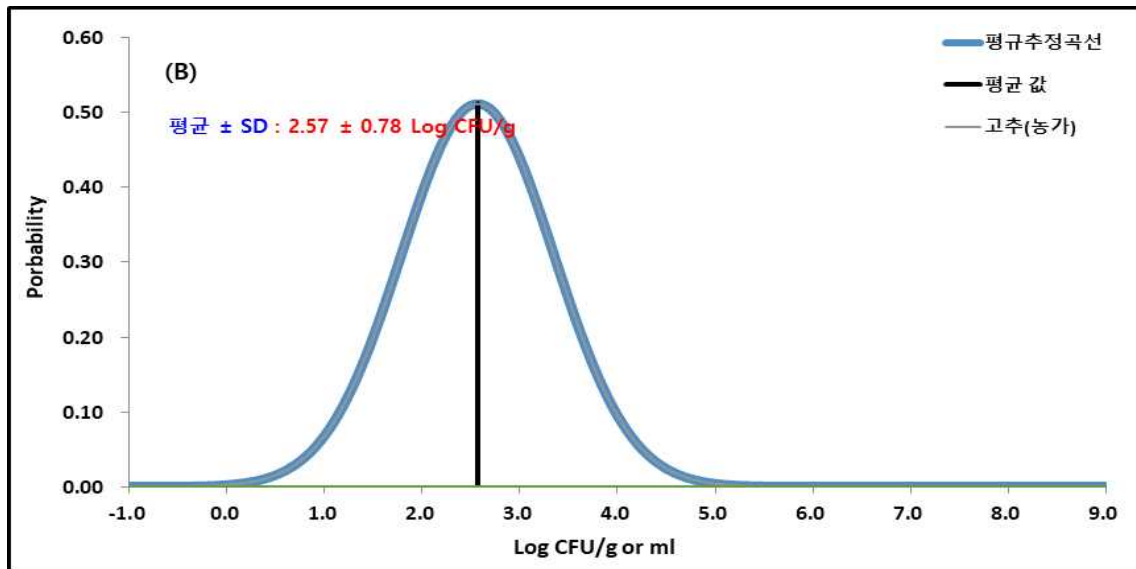
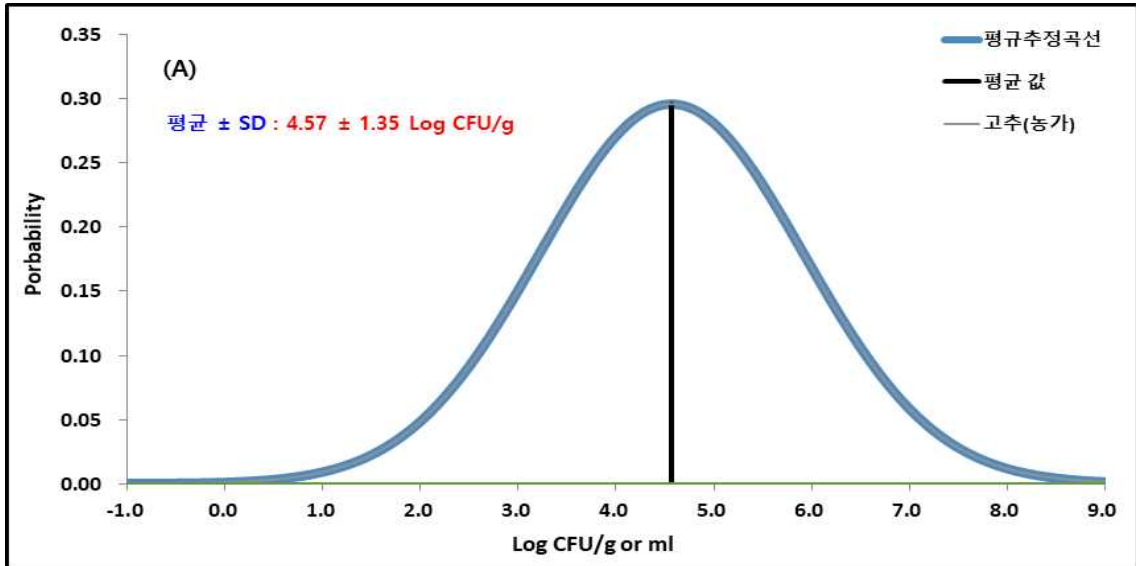


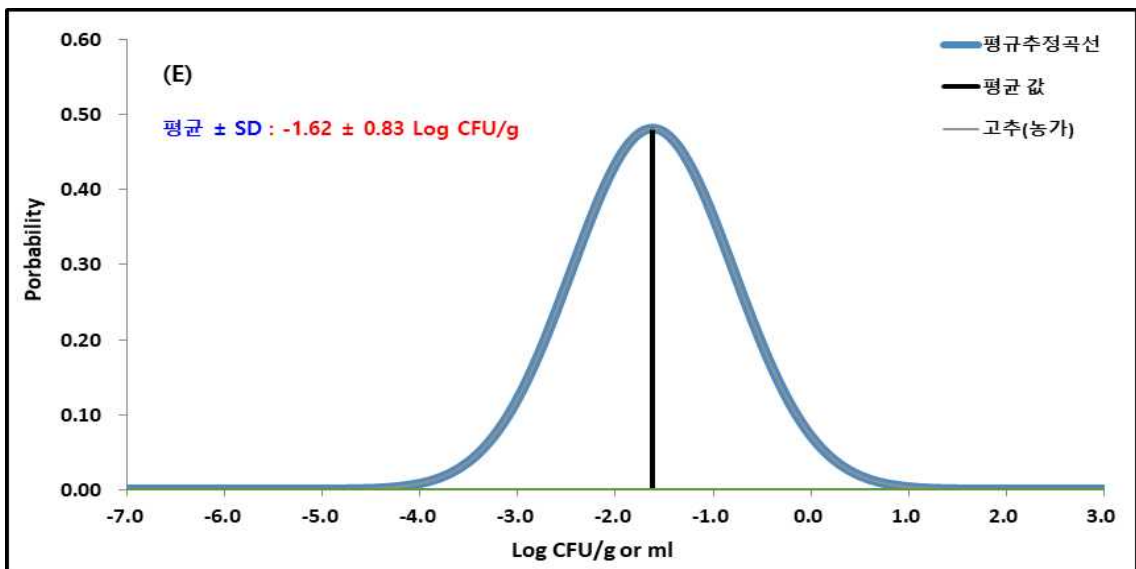
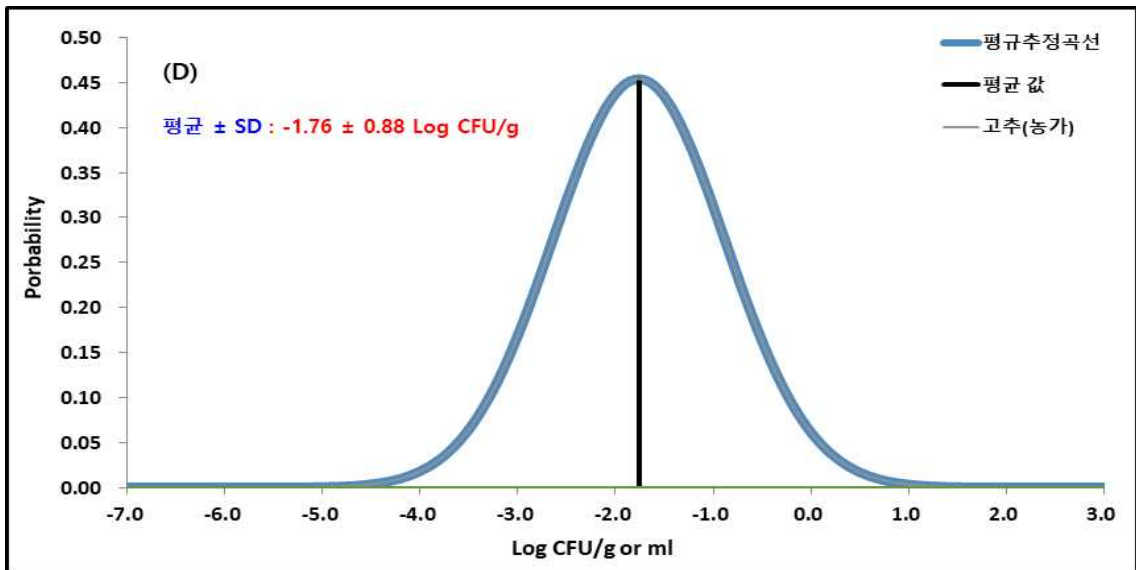
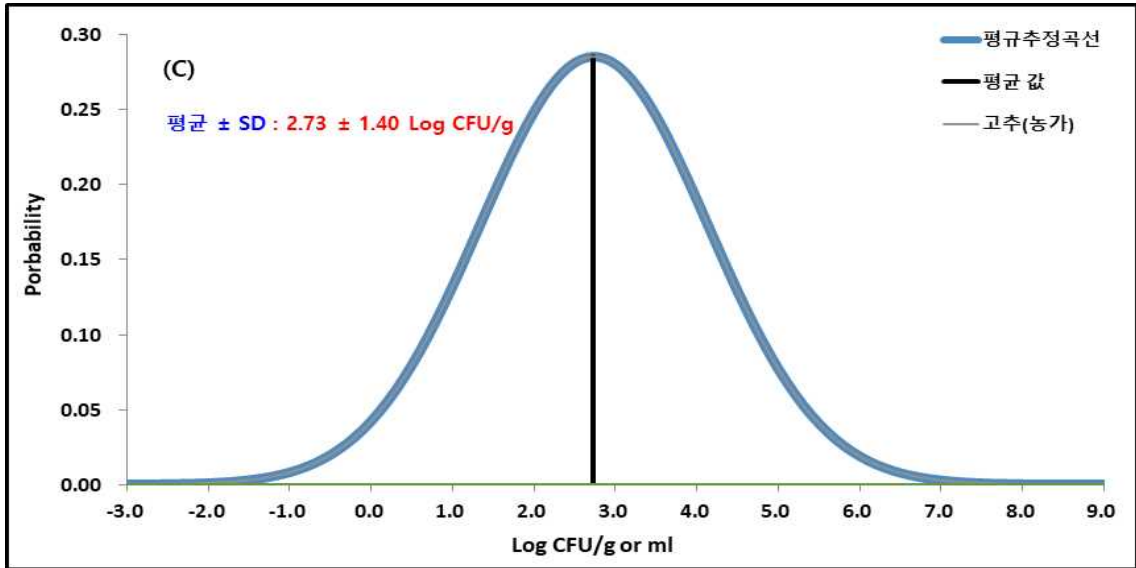
그림 3-3-17. 당근에서의 미생물 오염수준 정량화

[(A) 일반세균수, (B) 곰팡이-효모, (C) 대장균군, (D) 대장균, (E) *B. cereus* (F) *S. aureus*, (G) Other pathogens(*L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *C. perfringens*)]

(마) 고추

□ 고추에서의 일반세균수, 곰팡이-효모, 대장균군, 대장균, *B. cereus*, *S. aureus*, other pathogens(*L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *C. perfringens*)의 오염수준을 정량화한 결과, 각각 평균  $4.57 \pm 1.35$ ,  $2.57 \pm 0.78$ ,  $2.73 \pm 1.40$ ,  $-1.76 \pm 0.88$ ,  $-1.62 \pm 0.83$ ,  $-4.53 \pm 0.69$ ,  $-4.53 \pm 0.69$  Log CFU/g으로 오염수준이 정량화되었음





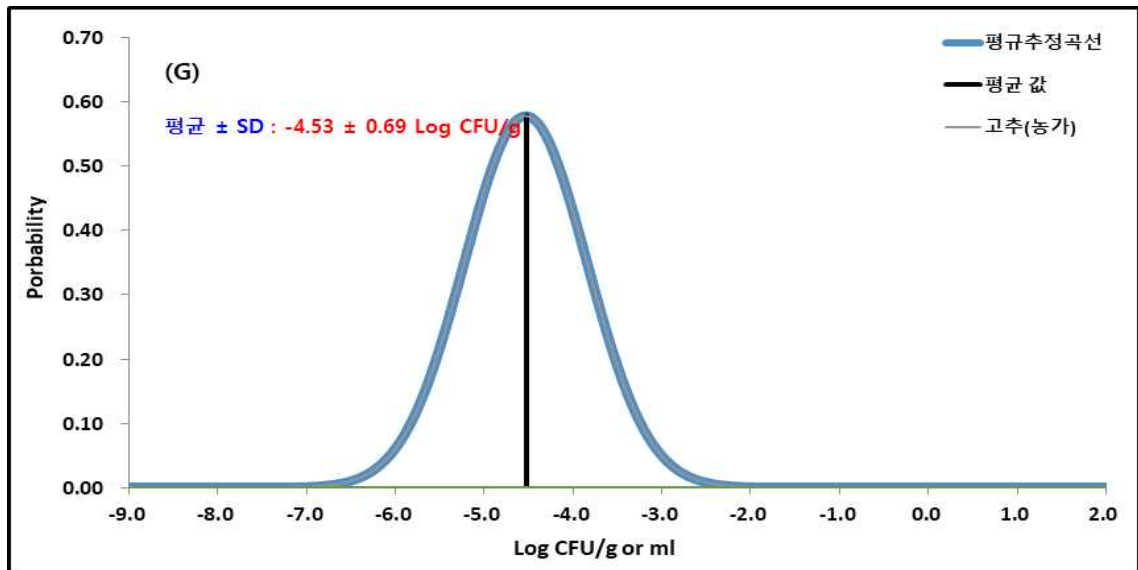
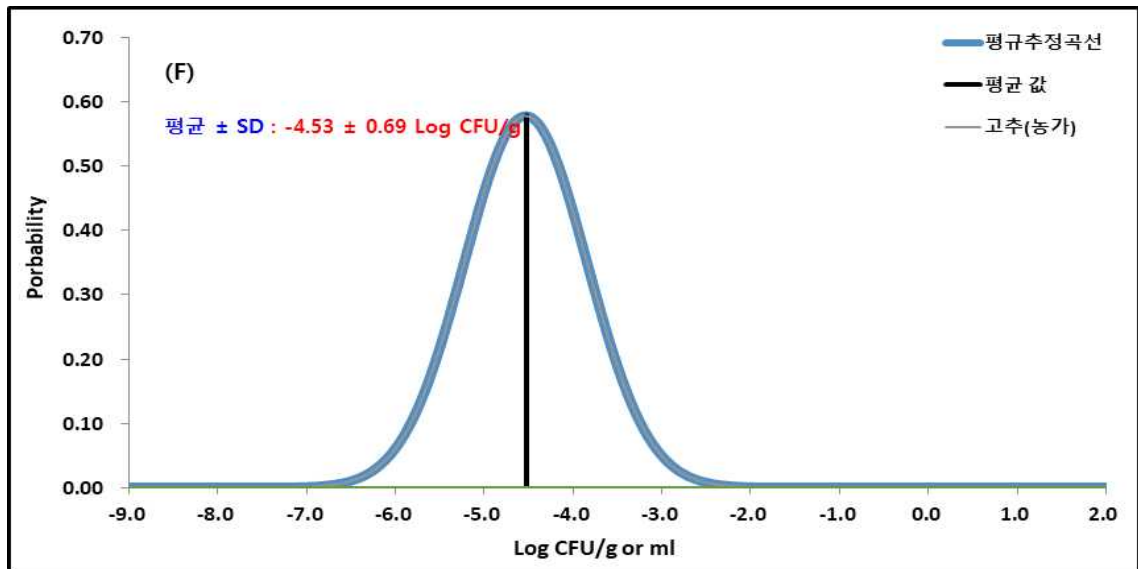
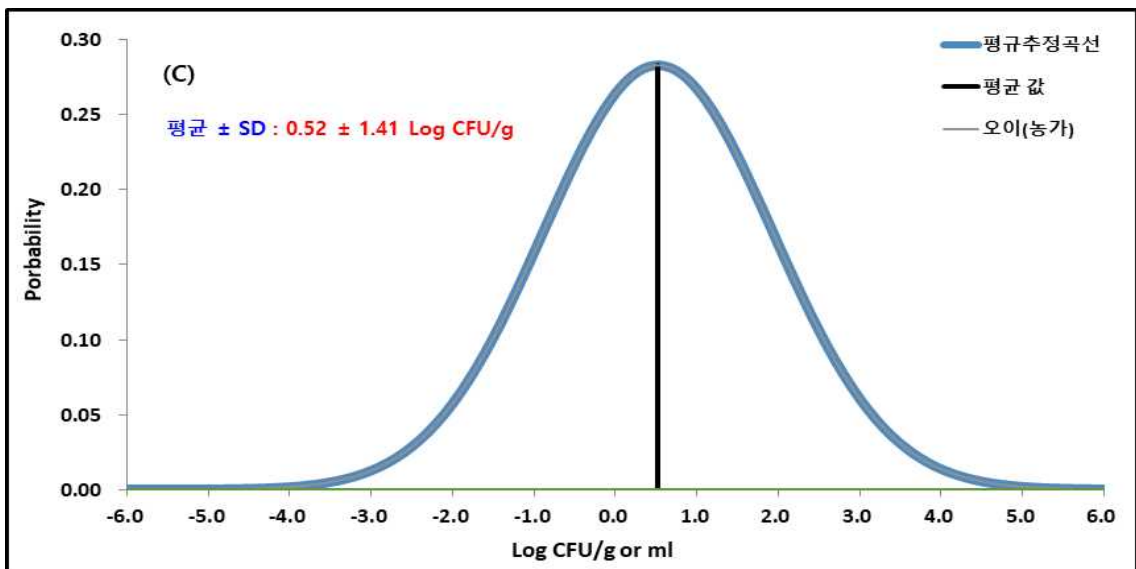
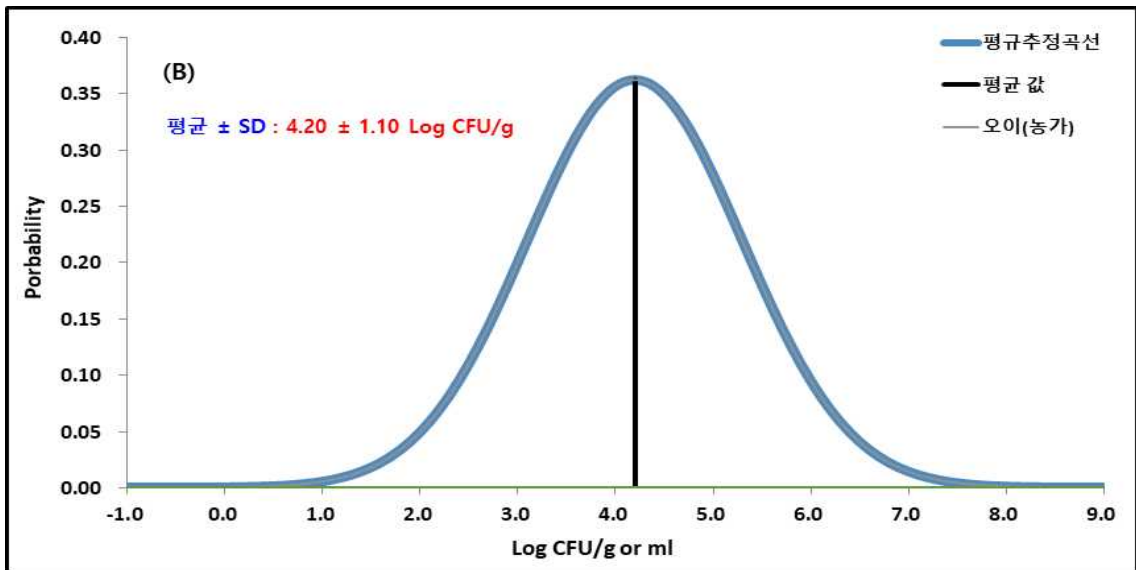
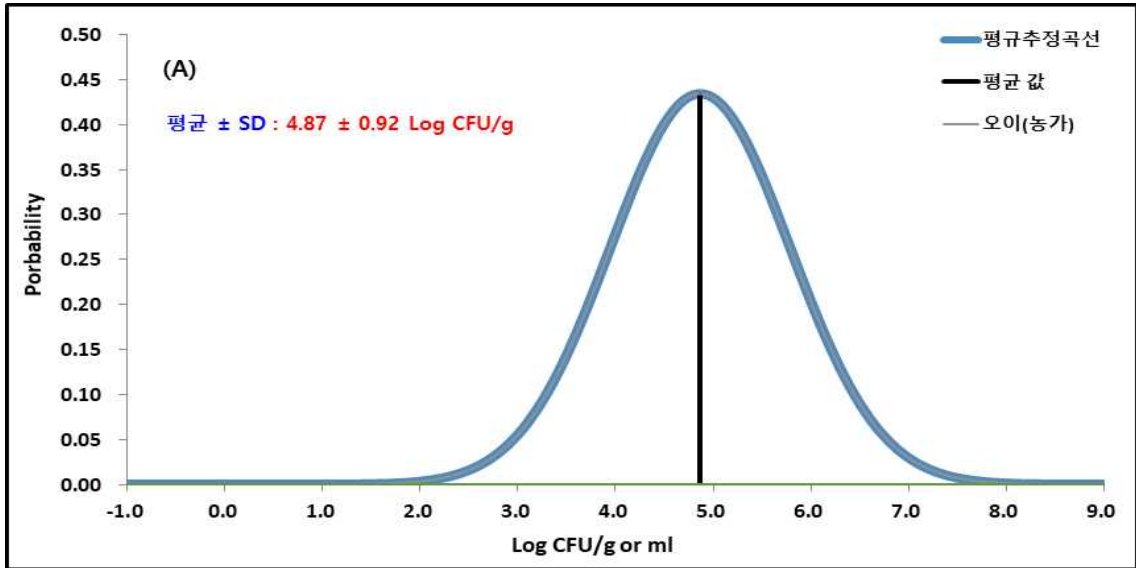


그림 3-3-18. 고추에서의 미생물 오염수준 정량화

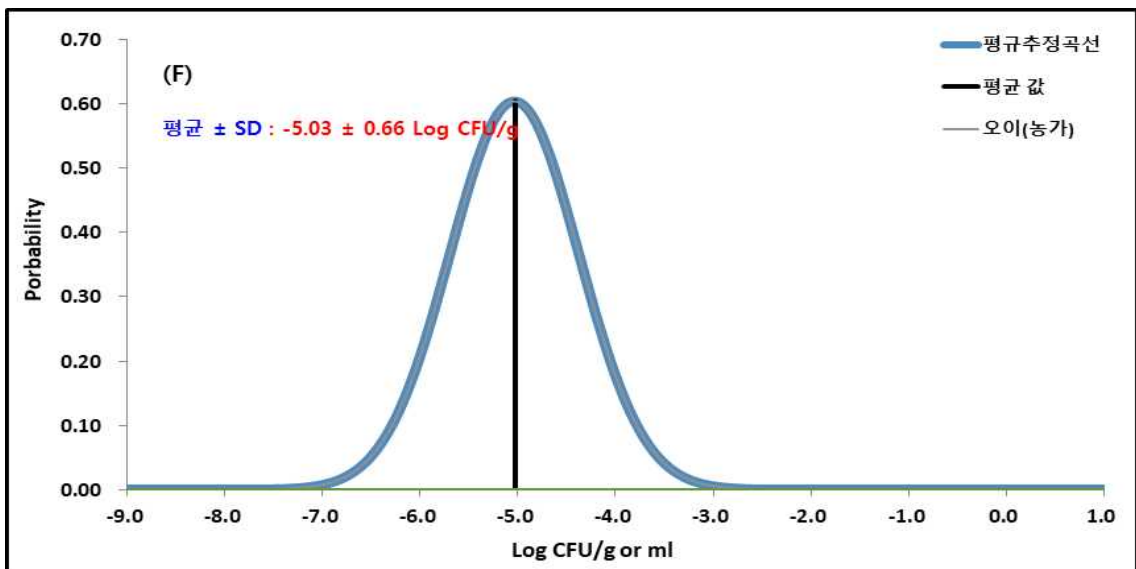
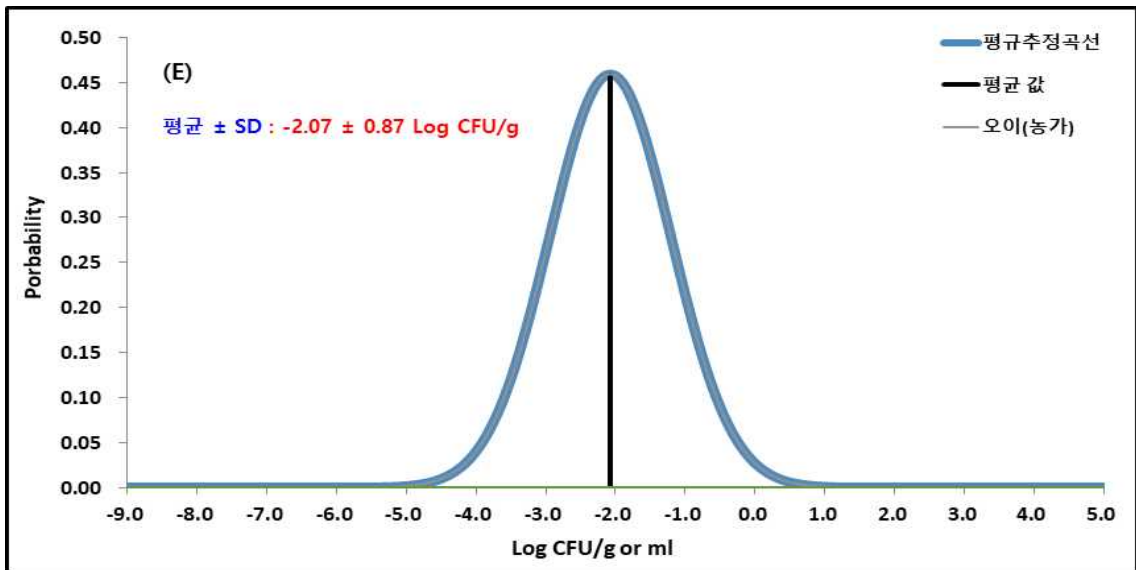
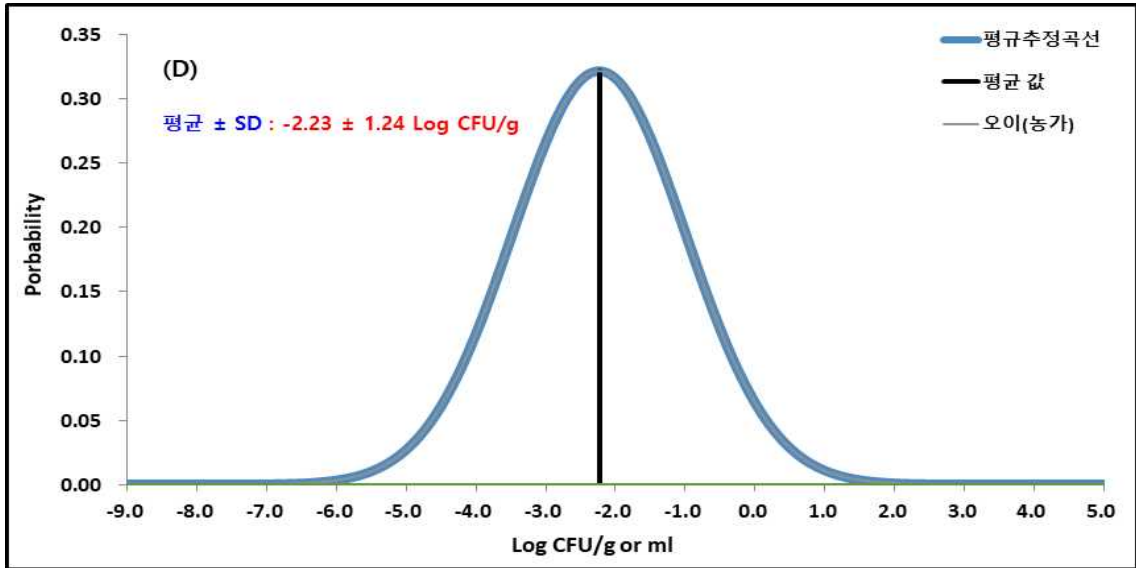
[(A) 일반세균수, (B) 곰팡이-효모, (C) 대장균군, (D) 대장균, (E) *B. cereus* (F) *S. aureus*, (G) Other pathogens(*L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *C. perfringens*)]

(바) 오이

□ 오이에서의 일반세균수, 곰팡이-효모, 대장균군, 대장균, *B. cereus*, *S. aureus*, other pathogens(*L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *C. perfringens*)의 오염수준을 정량화한 결과, 각각 평균  $4.87 \pm 0.92$ ,  $4.20 \pm 1.10$ ,  $0.52 \pm 1.41$ ,  $-2.23 \pm 1.24$ ,  $-2.07 \pm 0.87$ ,  $-5.03 \pm 0.66$ ,  $-5.03 \pm 0.66$  Log CFU/g으로 오염수준이 정량화되었음









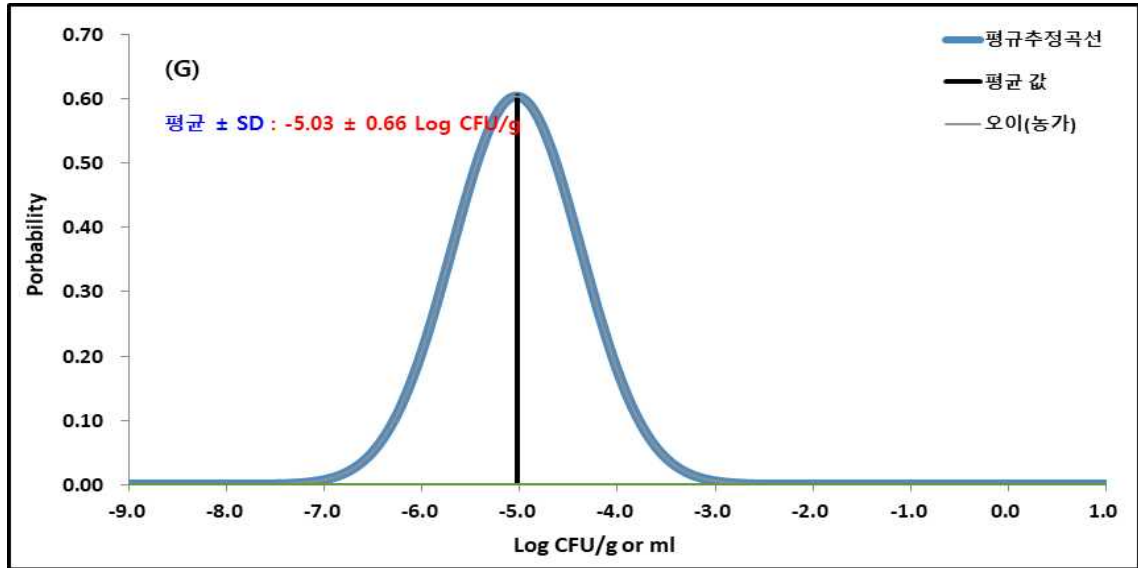
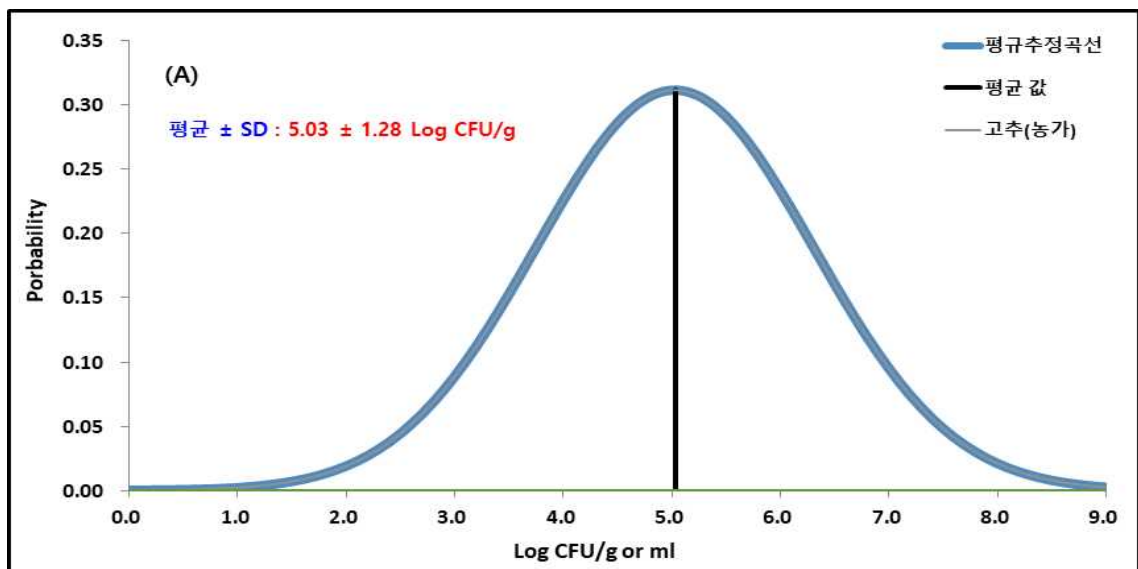


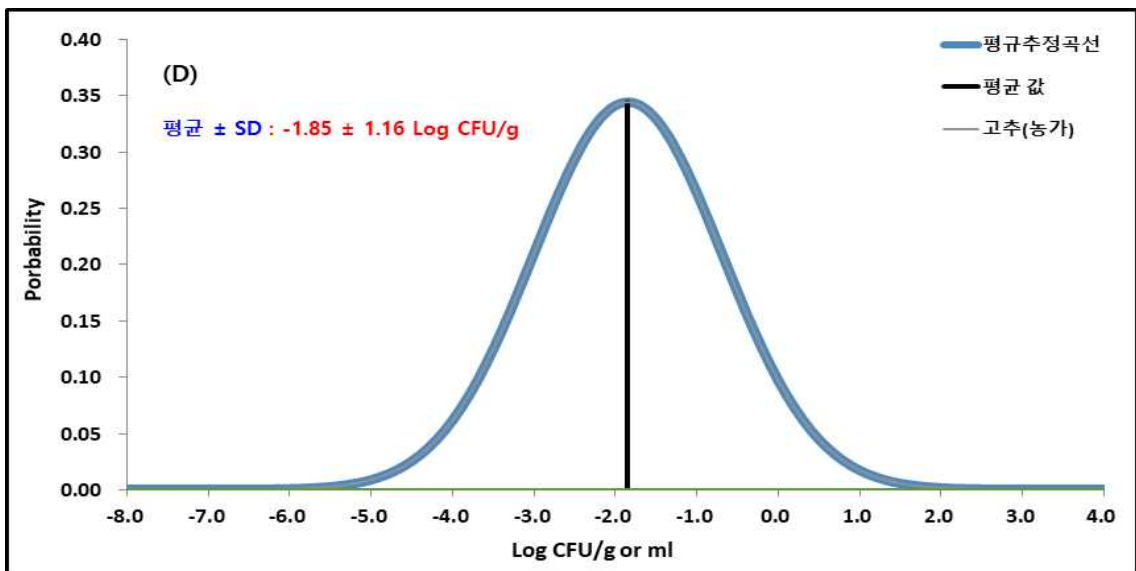
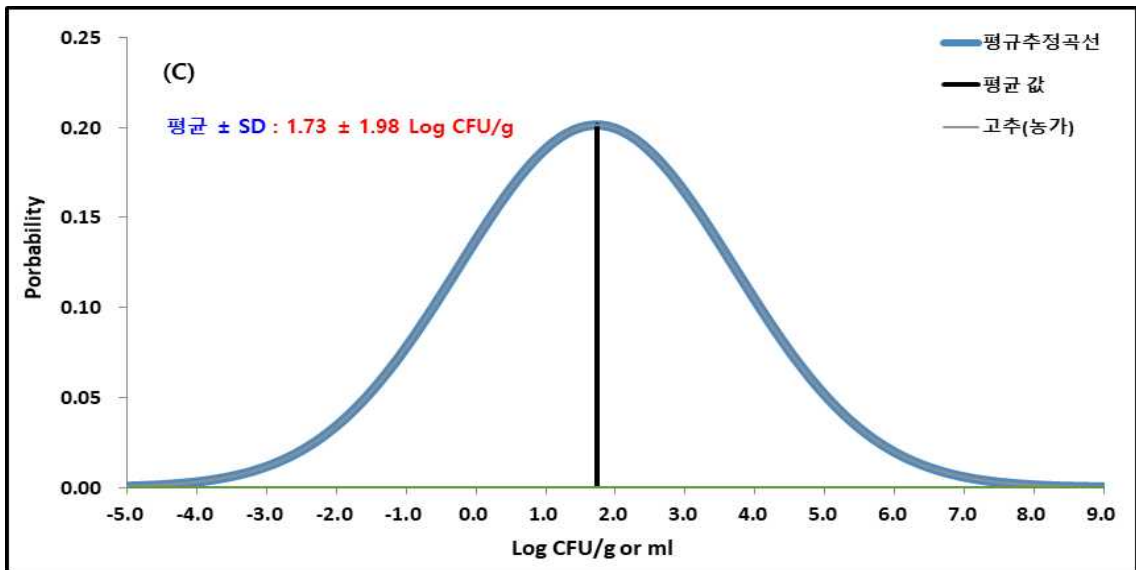
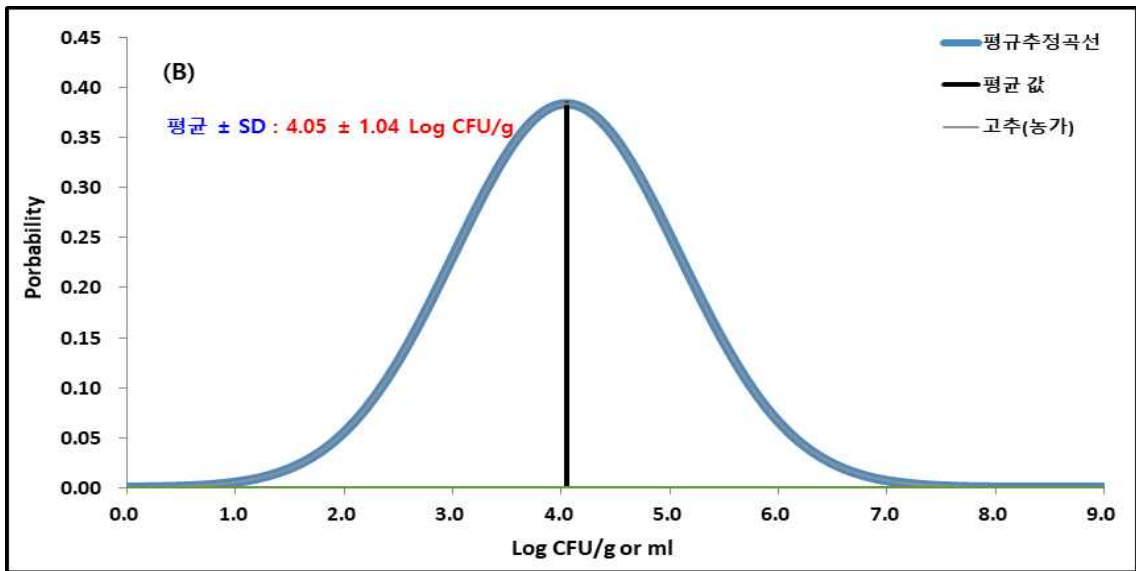
그림 3-3-19. 오이에서의 미생물 오염수준 정량화

[(A) 일반세균수, (B) 곰팡이-효모, (C) 대장균군, (D) 대장균, (E) *B. cereus* (F) *S. aureus*, (G) Other pathogens(*L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *C. perfringens*)]

(사) 상추

- 상추에서의 일반세균수, 곰팡이-효모, 대장균군, 대장균, *B. cereus*, *S. aureus*, other pathogens(*L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *C. perfringens*)의 오염수준을 정량화한 결과, 각각 평균  $5.03 \pm 1.28$ ,  $4.05 \pm 1.04$ ,  $1.73 \pm 1.98$ ,  $-1.85 \pm 1.16$ ,  $-0.77 \pm 1.28$ ,  $-3.88 \pm 0.78$ ,  $-4.60 \pm 0.68$  Log CFU/g으로 오염수준이 정량화되었음





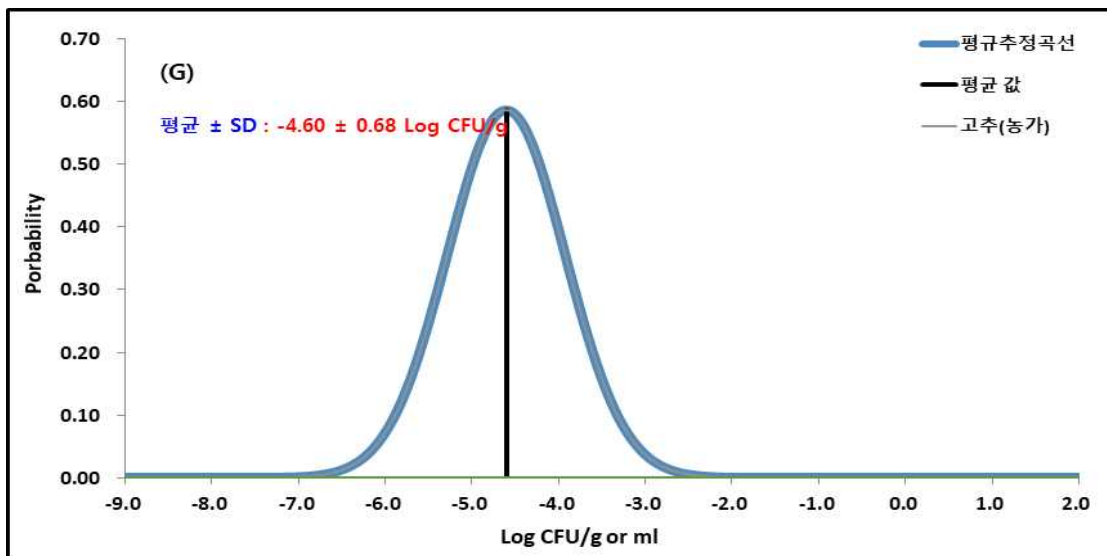
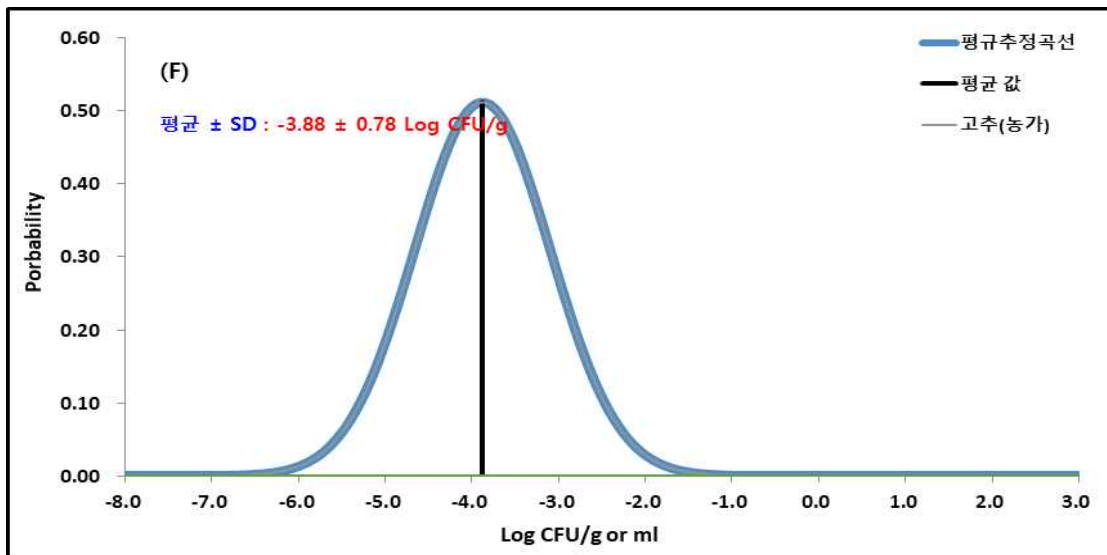
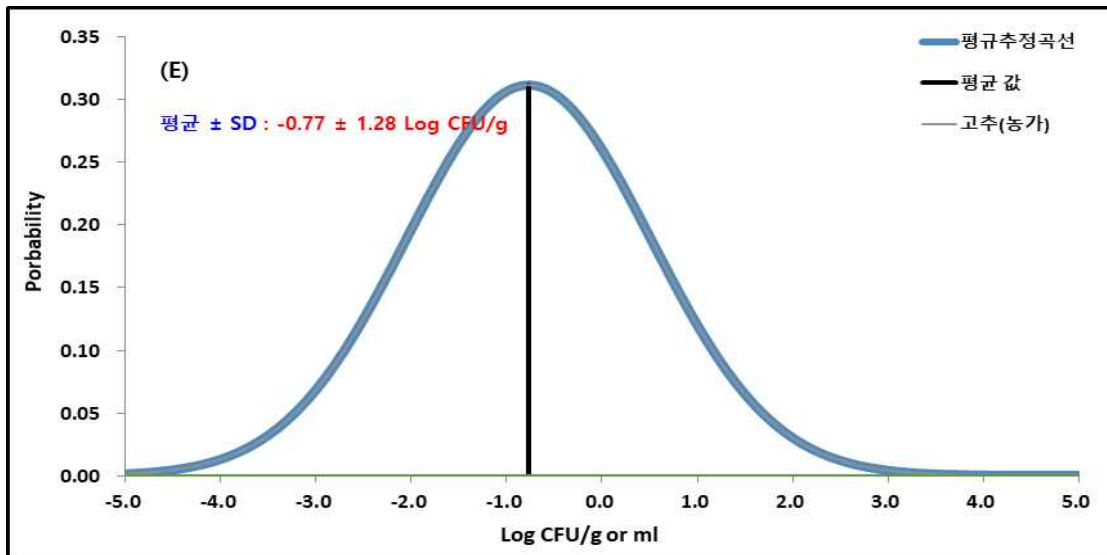
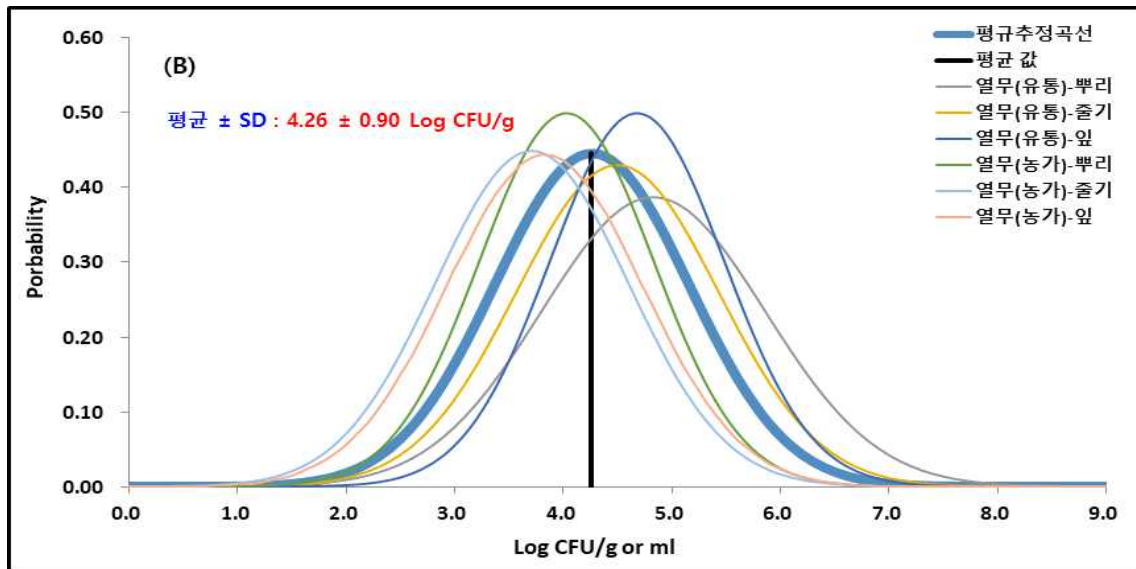
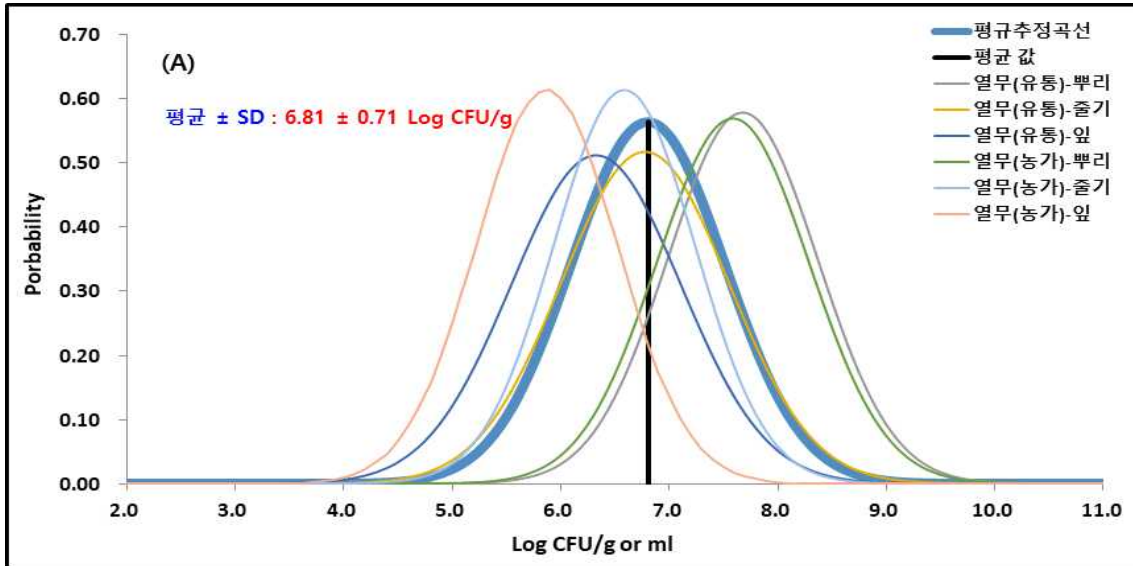


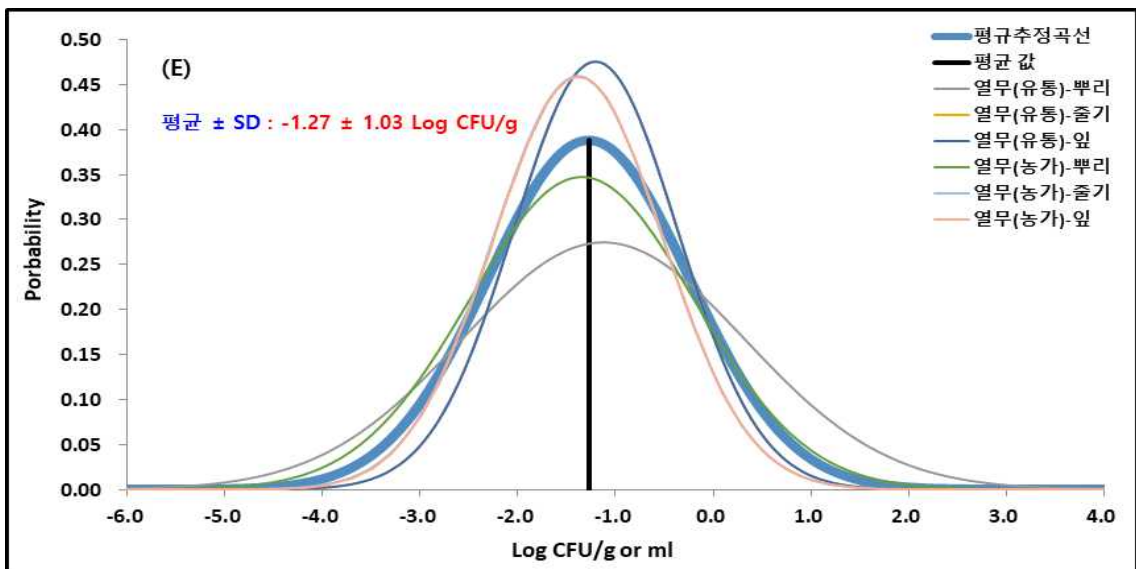
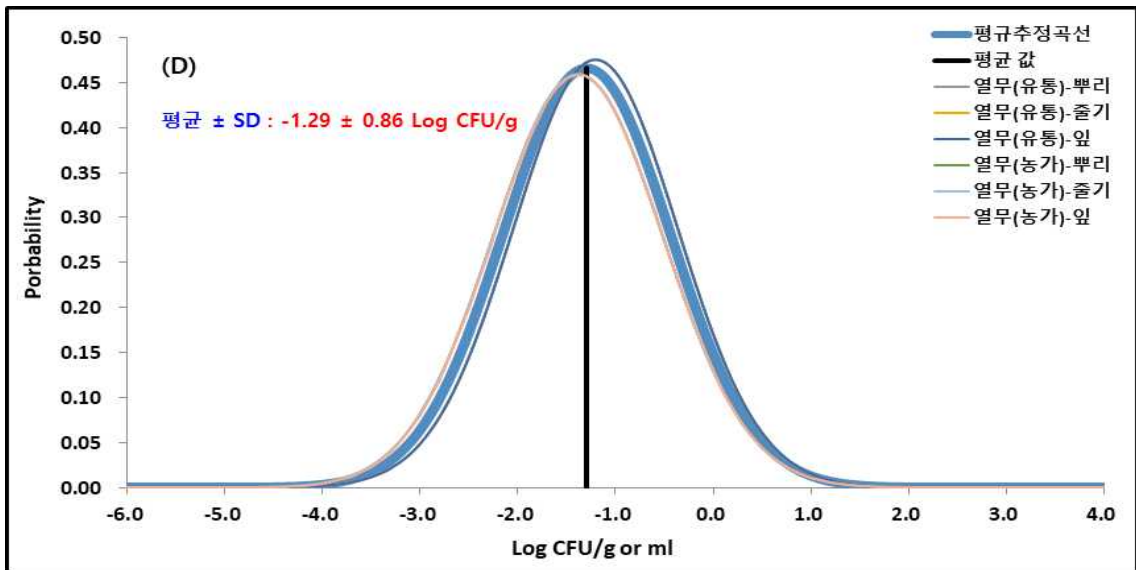
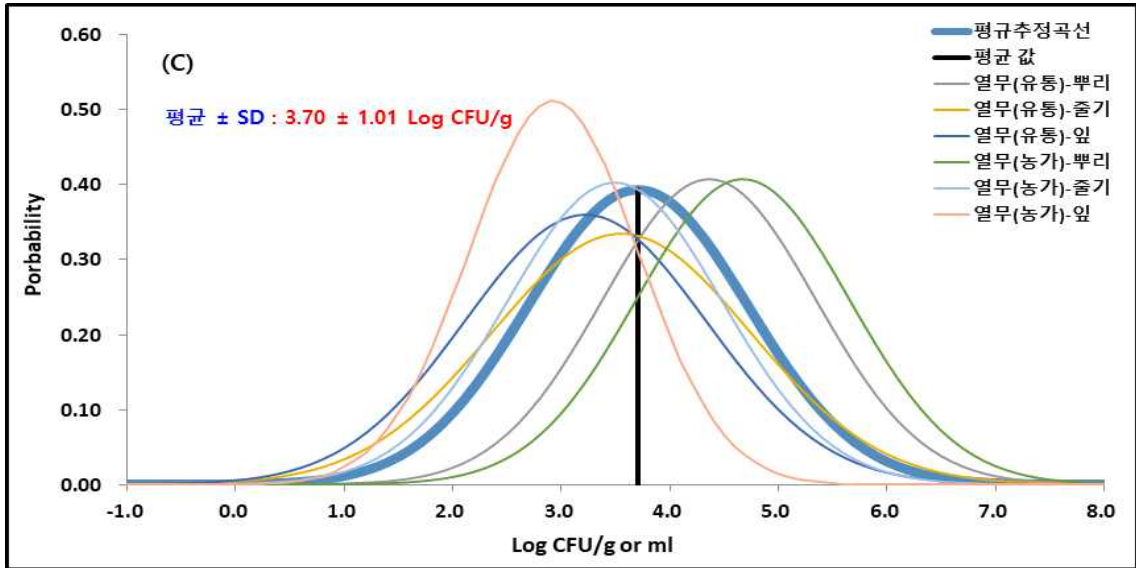
그림 3-3-20. 상추에서의 미생물 오염수준 정량화

[(A) 일반세균수, (B) 곰팡이-효모, (C) 대장균군, (D) 대장균, (E) *B. cereus* (F) *S. aureus*, (G) Other pathogens(*L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *C. perfringens*)]

(아) 열무

□ 열무에서의 일반세균수, 곰팡이-효모, 대장균군, 대장균, *B. cereus*, *S. aureus*, other pathogens(*L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *C. perfringens*)의 오염수준을 정량화한 결과, 각각 평균  $6.81 \pm 0.71$ ,  $4.26 \pm 0.90$ ,  $3.70 \pm 1.01$ ,  $-1.29 \pm 1.03$ ,  $-1.27 \pm 1.03$ ,  $-4.42 \pm 0.72$ ,  $-4.42 \pm 0.72$  Log CFU/g으로 오염수준이 정량화되었음





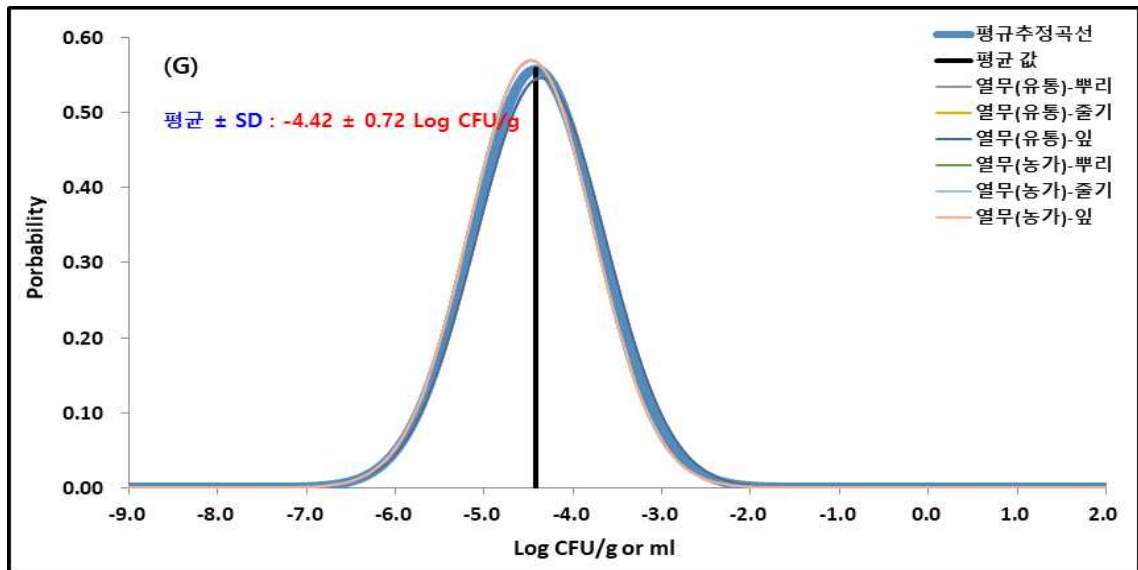
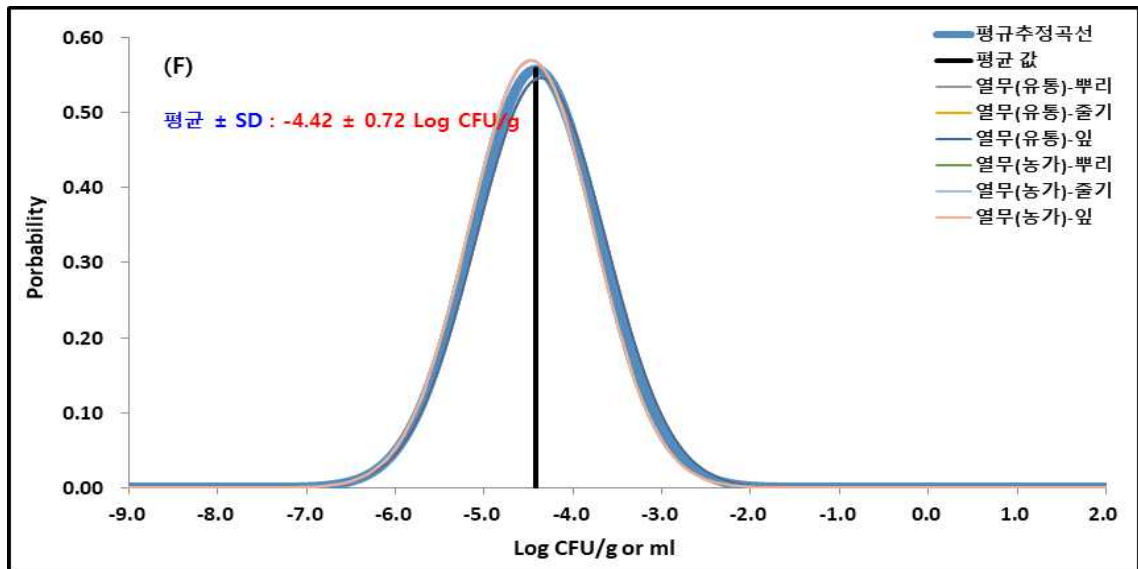


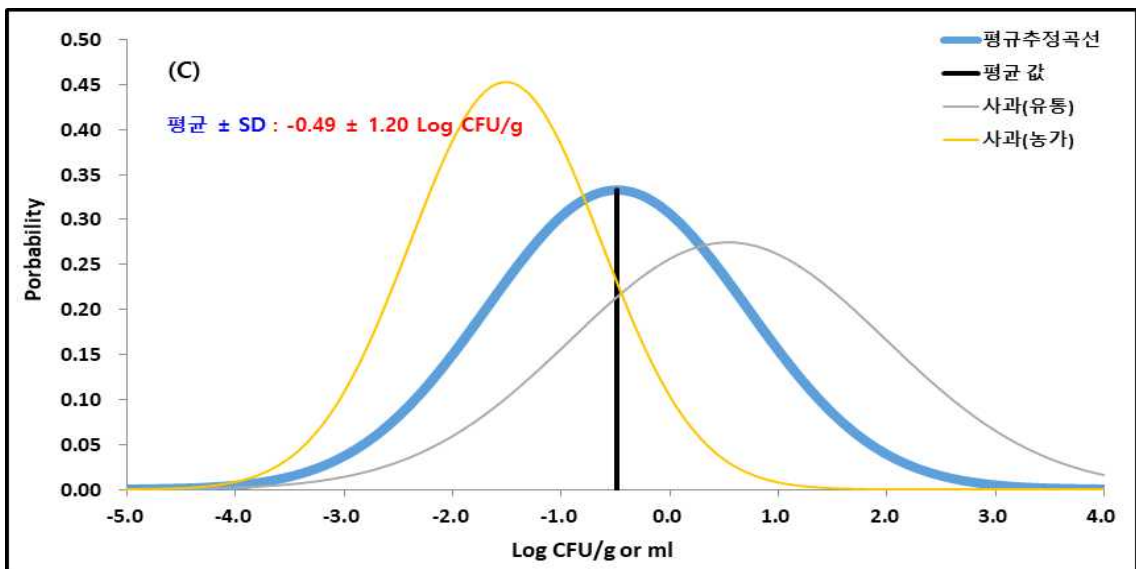
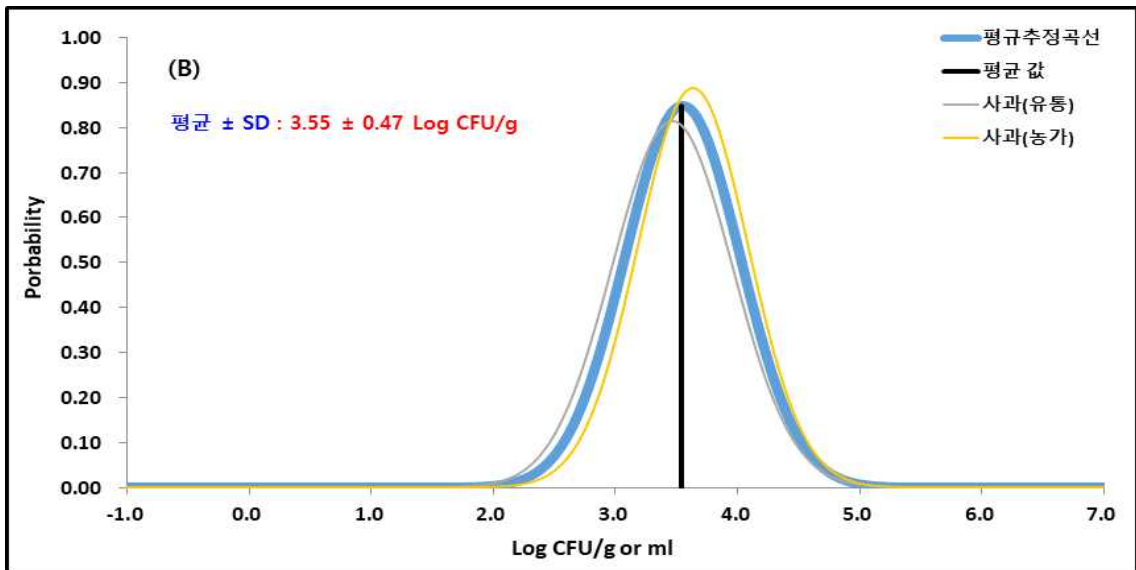
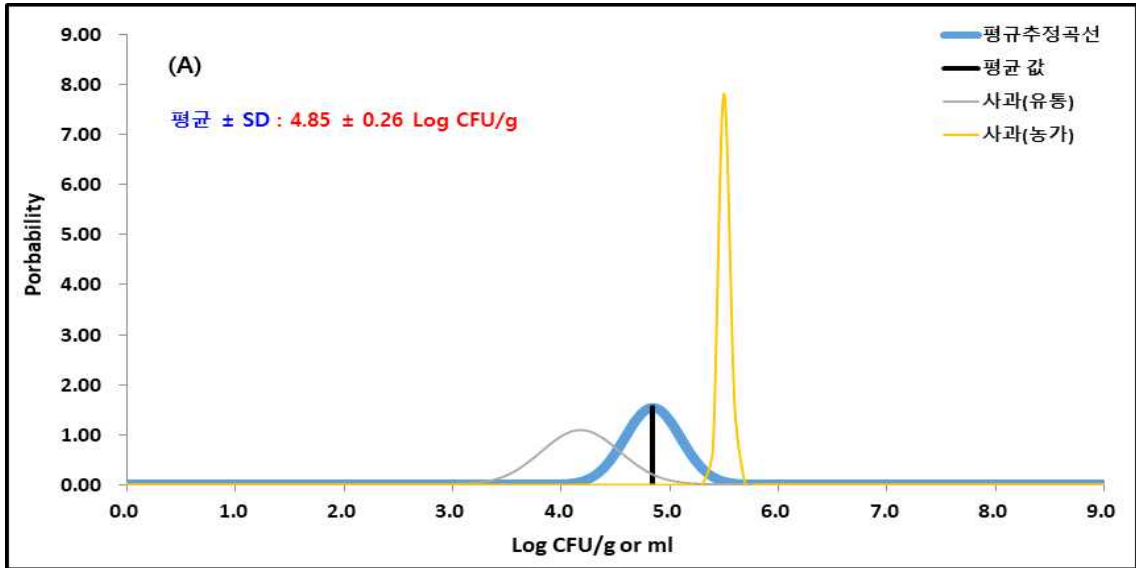
그림 3-3-21. 열무에서의 미생물 오염수준 정량화

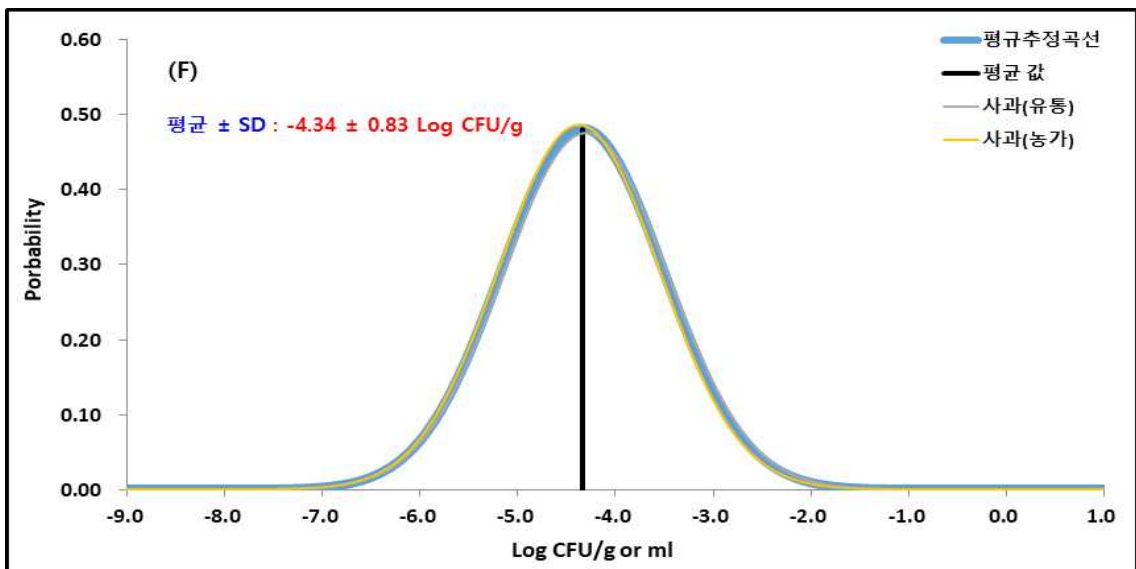
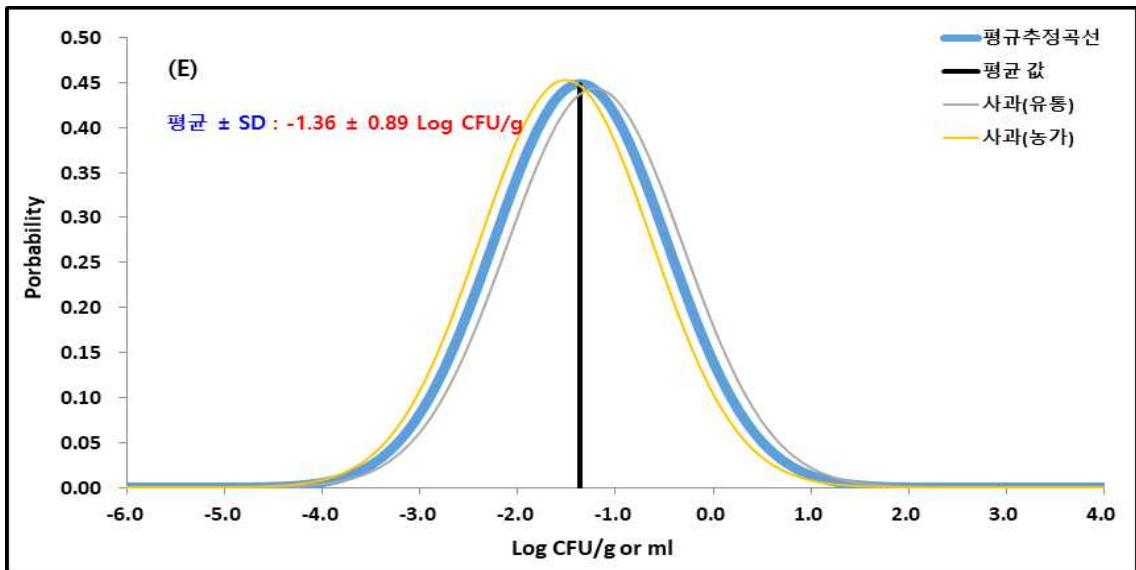
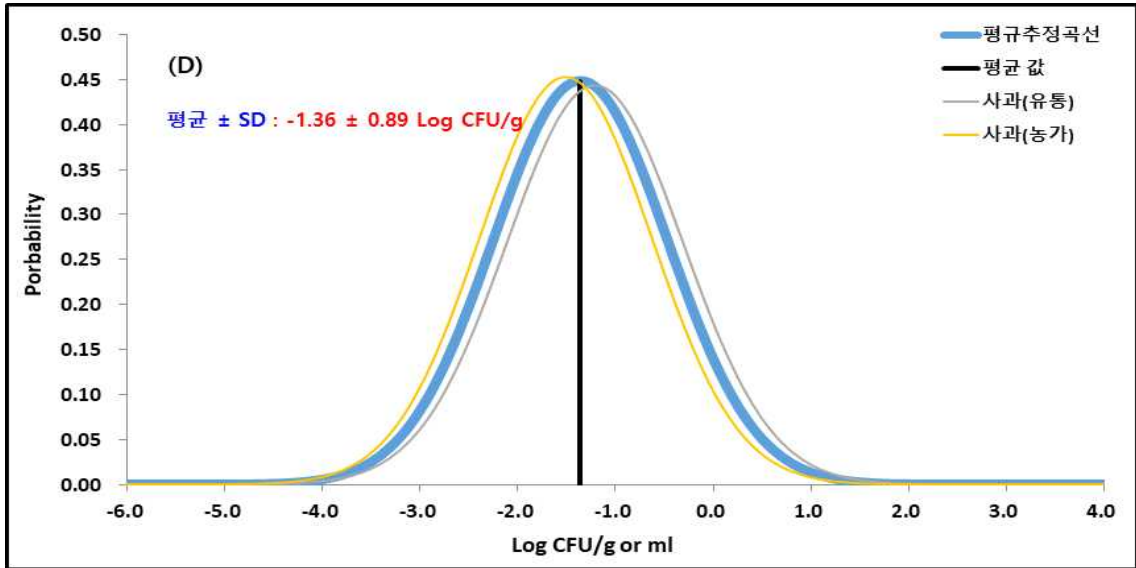
[(A) 일반세균수, (B) 곰팡이-효모, (C) 대장균군, (D) 대장균, (E) *B. cereus* (F) *S. aureus*, (G) Other pathogens(*L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *C. perfringens*)]

(자) 사과

□ 사과에서의 일반세균수, 곰팡이-효모, 대장균군, 대장균, *B. cereus*, *S. aureus*, other pathogens(*L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *C. perfringens*)의 오염수준을 정량화한 결과, 각각 평균  $4.85 \pm 0.26$ ,  $3.55 \pm 0.47$ ,  $-0.49 \pm 1.20$ ,  $-1.36 \pm 0.89$ ,  $-1.36 \pm 0.89$ ,  $-4.34 \pm 0.83$ ,  $-4.34 \pm 0.83$  Log CFU/g으로 오염수준이 정량화되었음









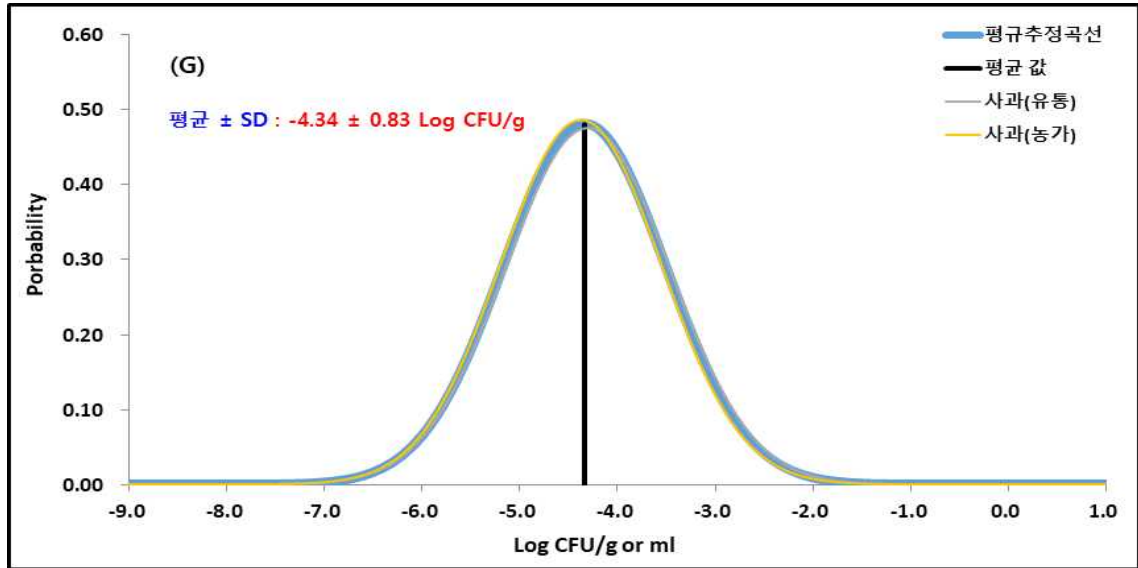
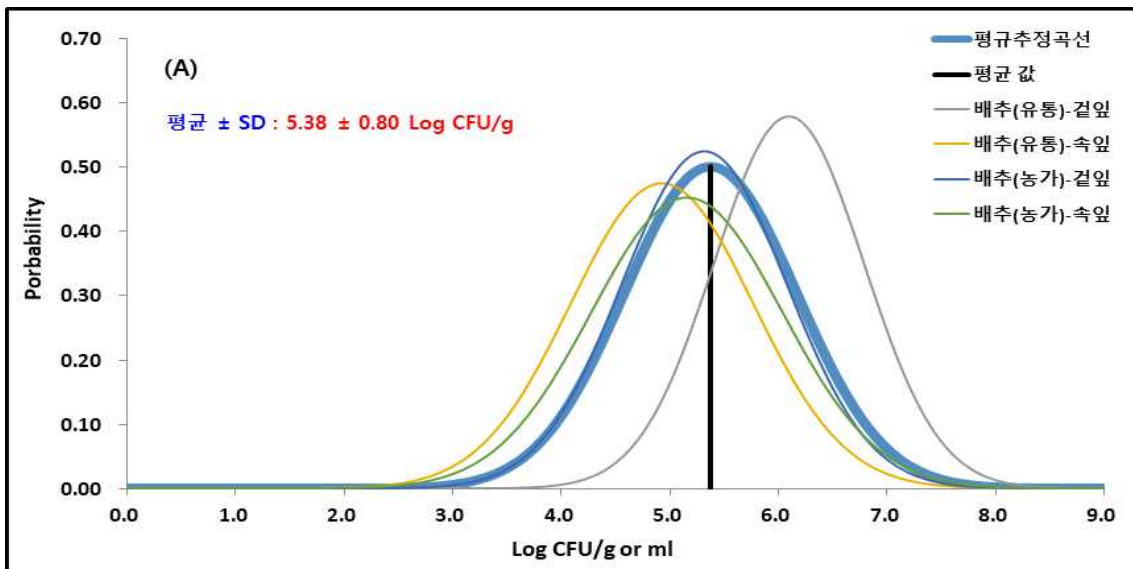


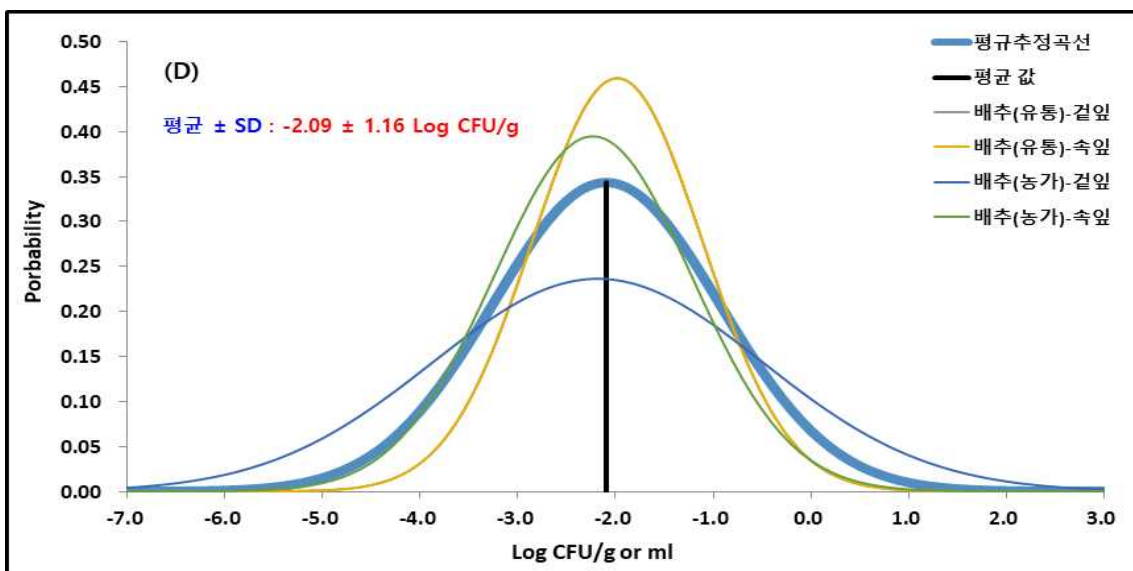
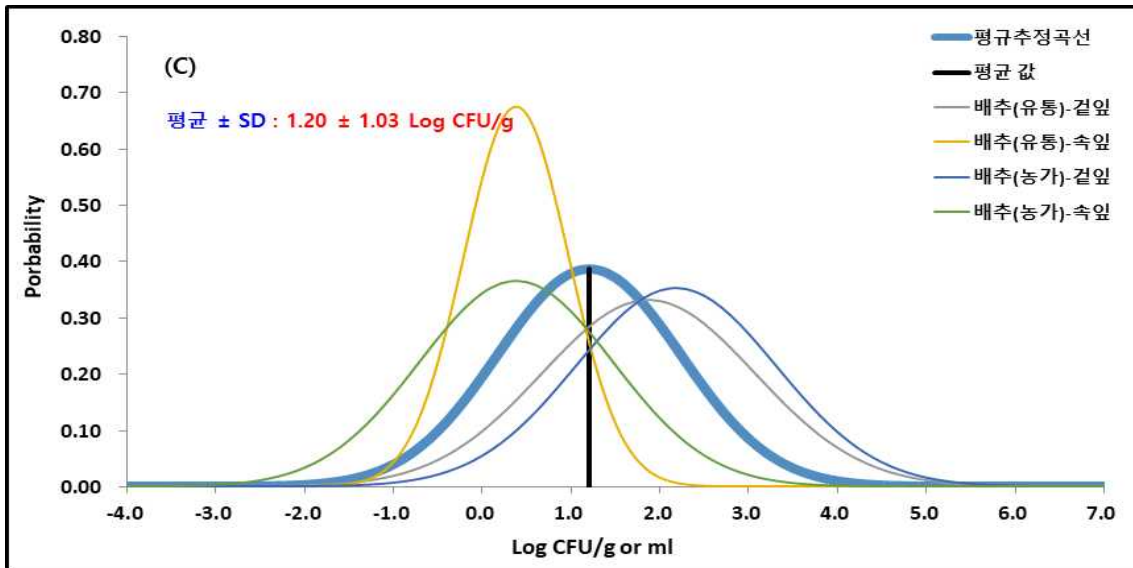
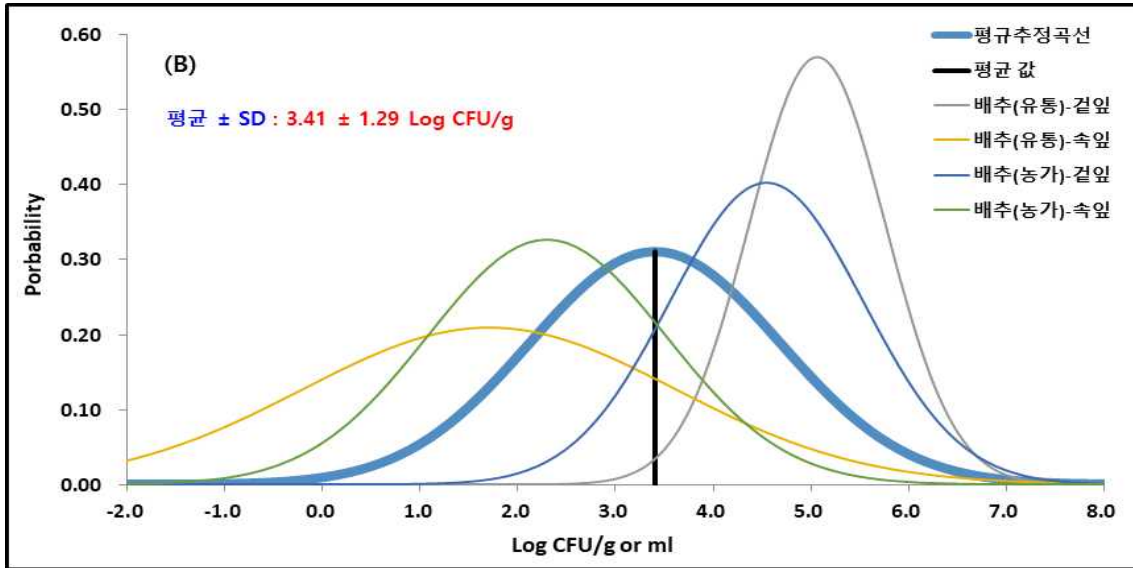
그림 3-3-22. 사과에서의 미생물 오염수준 정량화

[(A) 일반세균수, (B) 곰팡이-효모, (C) 대장균군, (D) 대장균, (E) *B. cereus* (F) *S. aureus*, (G) Other pathogens(*L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *C. perfringens*)]

(차) 배추

□ 배추에서의 일반세균수, 곰팡이-효모, 대장균군, 대장균, *B. cereus*, *S. aureus*, other pathogens(*L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *C. perfringens*)의 오염수준을 정량화한 결과, 각각 평균  $5.38 \pm 0.80$ ,  $3.41 \pm 1.29$ ,  $1.20 \pm 1.03$ ,  $-2.09 \pm 1.16$ ,  $-2.08 \pm 1.18$ ,  $-4.20 \pm 0.75$ ,  $-4.93 \pm 0.65$  Log CFU/g으로 오염수준이 정량화되었음





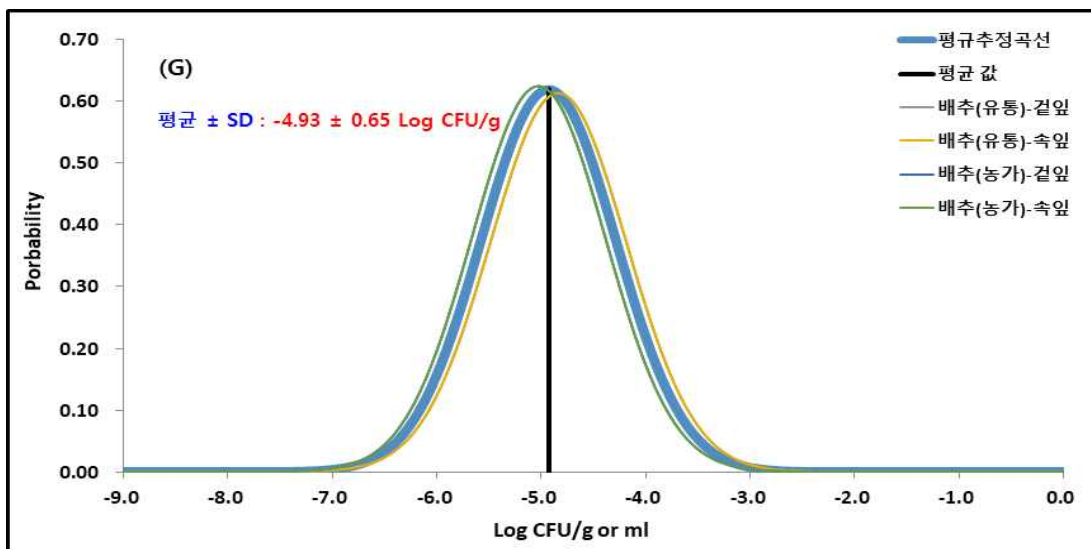
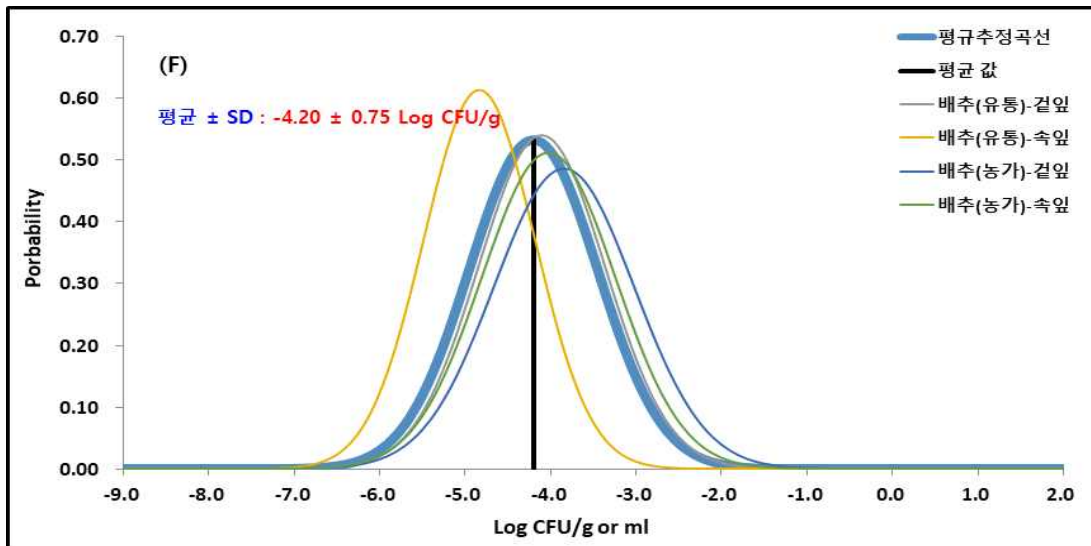
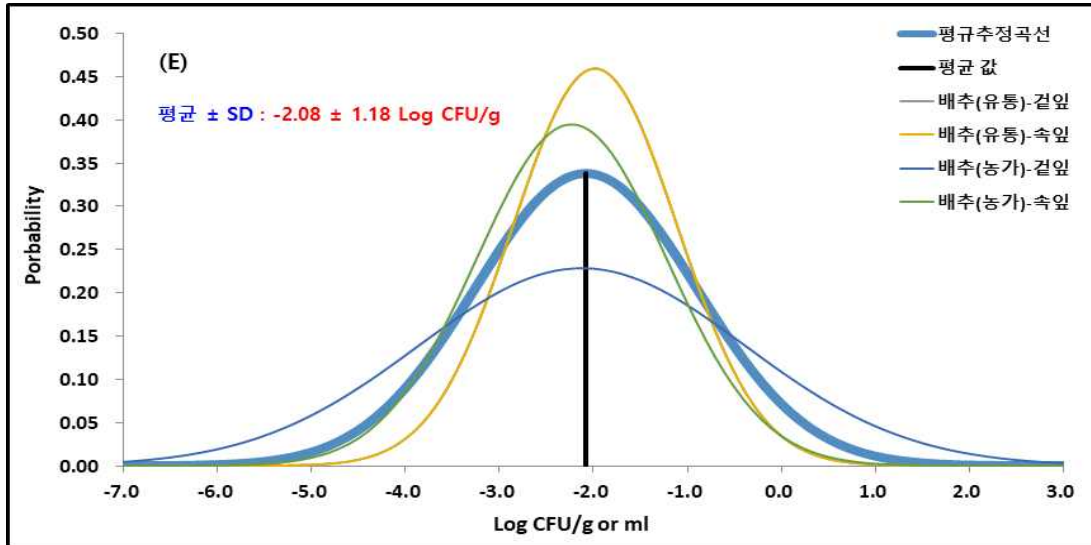


그림 3-3-23. 배추에서의 미생물 오염수준 정량화

[(A) 일반세균수, (B) 곰팡이-효모, (C) 대장균군, (D) 대장균, (E) *B. cereus* (F) *S. aureus*, (G) Other pathogens(*L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *C. perfringens*)]

## 나. 농산물에 대한 안전수준 평가를 위한 QMRA 모델 구성

### (1) 미생물 위해평가 모델 구성

- 농산물 재배(농가) 및 유통 단계에서 추정된 오염수준을 바탕으로 위해수준 추정을 위한 미생물 위해평가용 모델은 그림 3-3-24에서 보는 바와 같음. 즉, 추정된 재배 및 유통단계 오염수준과 섭취를 위한 세척단계에서의 미생물 감소수준을 바탕으로 농산물1별 1회 섭취량을 이용하여 섭취직전 오염수준을 추정하고, 이를 양-반응 모델에 대입하여 섭취된 균의 수준에 따른 위해수준을 산출하고, 여기에 국내 1일 섭취자 비율을 대입하여 최종적인 위해수준(probability of illness)을 추정하였음

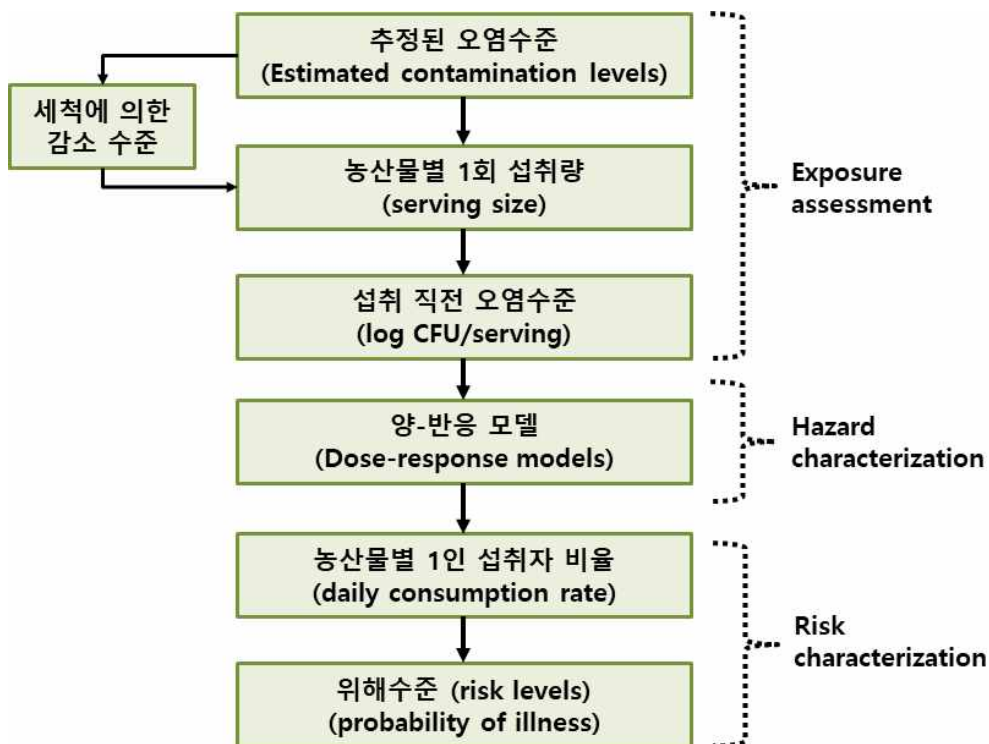


그림 3-3-24. 농산물 대상 미생물 위해평가용 모델 구성도

### (2) 미생물 위해평가 모델에서의 가정(assumption) 및 이용 자료

- 본 모델에서는 이용 가능한 자료의 부족 및 관련 모델 등의 부재로 다음과 같은 가정 하에 미생물 위해평가를 수행하였음
  - 본 연구의 3년 모니터링 결과에 따라 추정된 오염수준 결과를 생산 및 유통단계에서의 결과로 보고 이들 농산물을 바로 또는 세척 후 섭취한다는 가정 하에 위해수준을 추정하였으며, 추후 유통 또는 보관단계에서의 주요 농산물 관련 식중독 원인균 등의 성장 및 감소 등은 본 연구에서 포함하지 않았음
  - 세척의 경우 식중독균 등 유해미생물의 종류에 관계없이 일반적인 세척과정에 최소, 중위수, 최대 70, 80, 90% 감소한다고 가정하였으며, 감소 수준은 Log 값으로 산출하였음
  - 농산물별 1회 섭취량 및 1일 섭취자 비율은 다음 표 3-3-18과 같이 국민영양통계(2016:

<https://info.khidi.or.kr/kps/dhraStat/result13?menuId=MENU01666&year=2010>) 자료를 이용하여 평균 섭취량과 5, 50, 95 percentile에 해당되는 섭취량 수준을 정리하였으며, 1일 섭취자 비율도 전체 조사 대상자중 해당 농산물에 대한 섭취자 수를 이용하여 산출하였음. 이들 농산물 중 당근과 무, 감자를 제외한 나머지 농산물의 섭취수준은 바로 섭취한다는 가정 하에 이들 값을 이용하였으며, 당근과 무은 이들 섭취량의 10%만이 생으로 섭취한다고 가정하였으며, 감자의 경우 모두 조리 후 섭취한다는 가정 하에 섭취량 자료를 이용하였음

표 3-3-18. 농산물별 1일 섭취량 및 1일 1회 섭취자 비율(2016, 국민영양통계)

품목	1인 1회 섭취량(g)				1일 섭취자 비율(%)	비고
	평균	5 <sup>th</sup>	50 <sup>th</sup>	95 <sup>th</sup>		
당근	14.34	1.1	9.29	44.39	49.6	10%만 생으로 섭취
열무	45.3	2.47	31.48	146.21	0.8	
감자	49.1	0.49	25.72	176.75	33.1	조리후 섭취
배추	32.86	0.51	21.92	121.47	19.7	
무	42.18	1.01	24.59	144.79	41.8	10%만 생으로 섭취
오이	30.16	0.86	12.26	117.45	31.6	
토마토	120.15	2.36	45.68	426.83	14.4	
고추	6.43	0.06	1.54	26.01	54.8	
상추	42.56	0.33	30.73	133.89	17.2	
사과	190.5	0.26	151.36	581.83	30.5	

- 현재 농산물 대상 식중독 원인균 및 바이러스 중 이용할 수 있는 양-반응 모델은 표 3-3-19와 같으며 바이러스의 경우는 정확한 양-반응 모델을 이용할 수 없어 안전수준에 대한 위해평가에서 제외하였음. 바실러스 세레우스의 경우는 Exponential 모델 외에 최소 감염량으로 10<sup>5</sup> CFU/g도 동시에 고려하였음

표 3-3-19. 주요 식중독 원인균에 대한 양-반응 모델 및 최소감염량

Pathogens	Proper D-R model		비고 (최소감염량: CFU/g, Particle/g))
	Model	Parameters	
<i>Bacillus cereus</i>	Exponential	$r=3.82 \times 10^{-9}$	10 <sup>5</sup>
<i>Clostridium perfringens</i>	Exponential	$r=1.82 \times 10^{-11}$	
Pathogenic <i>E.coli</i> O157:H7	Beta-Poisson	$\alpha=0.17, \beta=1.61 \times 10^6$	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Exponential	$r=1.18 \times 10^{-10}$	
<i>Salmonella</i> spp.	Beta-Poisson	$\alpha=0.3136, \beta=3,008$	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Exponential	$r=7.64 \times 10^{-8}$	

(3) 미생물 위해평가용 프로그램

- 상기 기술된 가정된 자료를 이용하여 본 연구에서는 그림 3-3-25에서 보는 바와 같이 엑셀 기반 시뮬레이션 프로그램을 이용하여 각각의 농산물별 유해 미생물별 위해수준을 추



정하였음. 본 시뮬레이션의 결과는 전문 프로그램인 @RISK 등과 동일한 결과를 나타냄

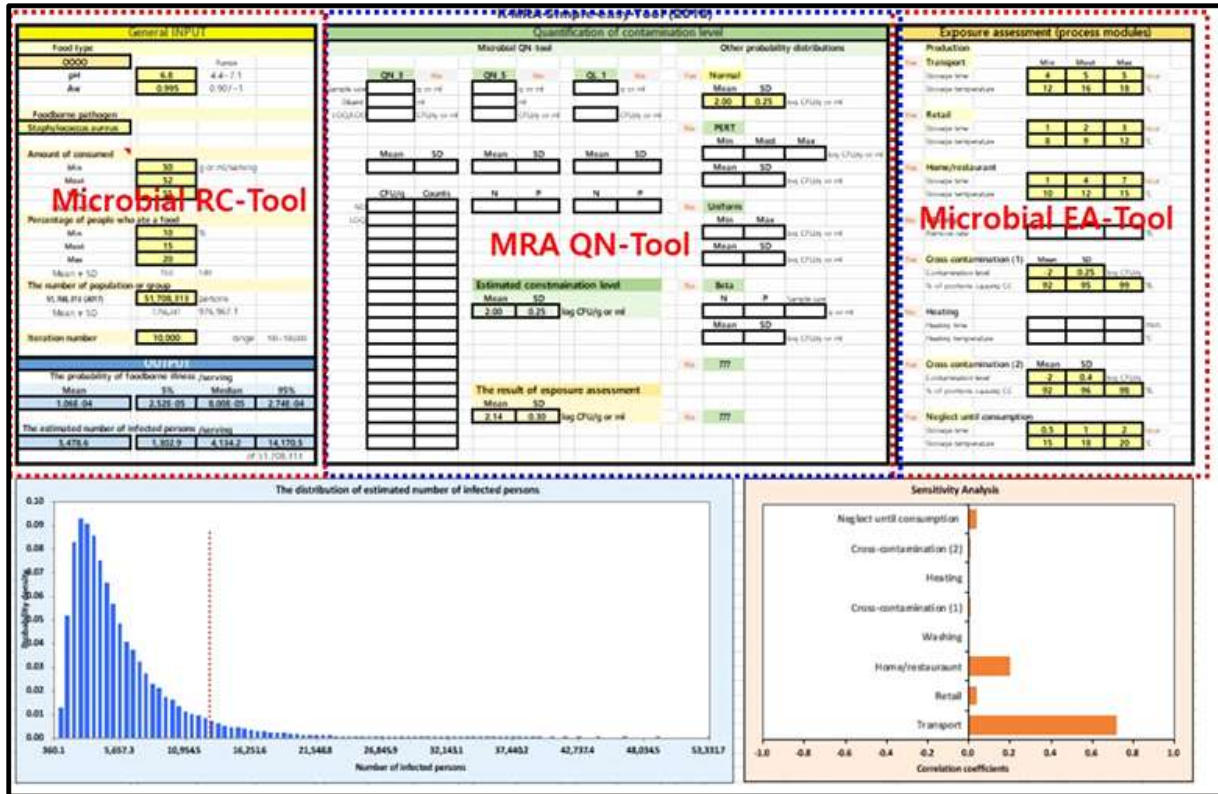


그림 3-3-25. 이용된 엑셀 기반 미생물 위해평가용 프로그램

#### 4. 농산물 관련 미생물학적 안전수준 평가 및 우선순위 목록화

##### 가. QMRA 모델을 활용한 농산물별 주요 유해 미생물에 대한 안전수준 평가

###### (1) 농산물별 주요 유해 미생물에 대한 안전수준 평가

□ 농산물 9종(감자 제외)과 이들 농산물에서의 6종 유해 미생물에 대한 안전수준으로 위해 수준(risk level)을 추정하였으며 그 결과 표 3-3-20에서 표 3-3-25와 같음

###### ○ *B. cereus*

- 주요 농산물 별 *B. cereus*에 대한 위해수준을 정량화한 결과, 초기오염수준은 배추에서 평균  $-2.09 \pm 1.16$  Log CFU/g 이었으며, 열무는  $-1.27 \pm 1.03$  Log CFU/g, 무는  $0.60 \pm 1.49$  Log CFU/g, 당근은  $1.71 \pm 1.45$  Log CFU/g, 오이는  $-2.07 \pm 0.87$  Log CFU/g, 상추는  $-0.77 \pm 1.28$  Log CFU/g, 고추는  $-1.62 \pm 0.83$  Log CFU/g, 사과는  $-1.36 \pm 0.89$  Log CFU/g, 토마토는  $-1.67 \pm 0.87$  Log CFU/g으로 정량화되었음. 세척 후 오염수준은 배추에서 평균  $-2.80 \pm 1.08$  Log CFU/g, 열무는  $-1.98 \pm 0.95$  Log CFU/g, 무는  $-0.11 \pm 1.41$  Log CFU/g, 당근은  $1.00 \pm 1.37$  Log CFU/g, 오이는  $-2.78 \pm 0.79$  Log CFU/g, 상추는  $-1.48 \pm 1.20$  Log CFU/g, 고추는  $-2.33 \pm 0.75$  Log CFU/g, 사과는  $-2.07 \pm 0.81$  Log CFU/g, 토마토는  $-2.38 \pm 0.79$  Log CFU/g으로 정량화되었음. 초기 오염수준에 따른 농산물 별 *B. cereus*에

의한 식중독 환자 수는 50% percentile 값으로 당근에서 가장 높은 0.64로 나타났고, 사과 0.49, 상추는 0.23, 무는 0.12, 토마토는 0.05, 배추 및 오이, 고추는 0.01, 열무는 0.00 으로 측정되었으며, 세척 후 오염수준에서는 당근에서 0.13, 사과 0.10, 상추는 0.05, 무는 0.02, 토마토는 0.01, 그 외 농산물은 0.00명으로 추정되었음.

○ *S. aureus*

- 주요 농산물 별 *S. aureus*에 대한 위해수준을 정량화한 결과, 초기오염수준은 배추에서 평균  $-4.20 \pm 0.75$  Log CFU/g 이었으며, 열무는  $-4.42 \pm 0.72$  Log CFU/g, 무는  $-3.62 \pm 0.85$  Log CFU/g, 당근은  $-4.39 \pm 0.72$  Log CFU/g, 오이는  $-5.03 \pm 0.66$  Log CFU/g, 상추는  $-3.88 \pm 0.78$  Log CFU/g, 고추는  $-4.53 \pm 0.69$  Log CFU/g, 사과는  $-4.34 \pm 0.83$  Log CFU/g, 토마토는  $-4.67 \pm 0.70$  Log CFU/g 으로 정량화되었음. 세척 후 오염수준은 배추에서 평균  $-4.91 \pm 0.67$  Log CFU/g, 열무는  $-5.13 \pm 0.64$  Log CFU/g, 무는  $-4.33 \pm 0.77$  Log CFU/g, 당근은  $-5.10 \pm 0.64$  Log CFU/g, 오이는  $-5.74 \pm 0.58$  Log CFU/g, 상추는  $-4.59 \pm 0.70$  Log CFU/g, 고추는  $-5.24 \pm 0.61$  Log CFU/g, 사과는  $-5.05 \pm 1.37$  Log CFU/g, 토마토는  $-5.38 \pm 0.62$  Log CFU/g 으로 정량화되었음. 초기오염수준에 따른 농산물 별 *S. aureus*에 의한 식중독 환자 수는 50% percentile 값으로 사과에서 가장 높은 0.10로 나타났고, 상추는 0.04, 배추는 0.02, 토마토는 0.01, 그 외 농산물은 0.00 으로 측정되었으며, 세척 후 오염수준에서는 사과에서 0.10, 상추는 0.04, 배추는 0.02, 토마토는 0.01, 그 외 농산물은 0.00명으로 추정되었음.

○ *Salmonella spp.*

- 주요 농산물 별 *Salmonella spp.*에 대한 위해수준을 정량화한 결과, 초기오염수준은 배추에서 평균  $-4.93 \pm 0.65$  Log CFU/g 이었으며, 열무는  $-4.42 \pm 0.72$  Log CFU/g, 무는  $-4.36 \pm 0.73$  Log CFU/g, 당근은  $-4.39 \pm 0.72$  Log CFU/g, 오이는  $-5.03 \pm 0.66$  Log CFU/g, 상추는  $-4.60 \pm 0.68$  Log CFU/g, 고추는  $-4.53 \pm 0.69$  Log CFU/g, 사과는  $-4.34 \pm 0.83$  Log CFU/g, 토마토는  $-4.67 \pm 0.70$  Log CFU/g 으로 정량화되었음. 세척 후 오염수준은 배추에서 평균  $-5.64 \pm 0.57$  Log CFU/g, 열무는  $-5.13 \pm 0.64$  Log CFU/g, 무는  $-5.07 \pm 0.65$  Log CFU/g, 당근은  $-5.10 \pm 0.64$  Log CFU/g, 오이는  $-5.74 \pm 0.58$  Log CFU/g, 상추는  $-5.31 \pm 0.60$  Log CFU/g, 고추는  $-5.24 \pm 0.61$  Log CFU/g, 사과는  $-5.05 \pm 1.37$  Log CFU/g, 토마토는  $-5.38 \pm 0.62$  Log CFU/g 으로 정량화되었음. 초기오염수준에 따른 농산물 별 *Salmonella spp.*에 의한 식중독 환자 수는 50% percentile 값으로 사과에서 가장 높은 9.71로 나타났고, 토마토는 1.02, 상추는 0.64, 배추 및 오이, 고추는 0.27, 열무는 0.05, 무는 0.03, 당근은 0.01으로 측정되었으며, 세척 후 오염수준에서는 사과 1.94, 토마토는 0.20, 상추 0.13, 배추 및 오이, 고추 0.05, 열무 및 무는 0.01, 당근은 0.00명으로 추정되었음.

○ *E. coli* O157:H7

- 주요 농산물 별 *E. coli* O157:H7에 대한 위해수준을 정량화한 결과, 초기오염수준은 배추에서 평균  $-4.93 \pm 0.65$  Log CFU/g 이었으며, 열무는  $-4.42 \pm 0.72$  Log CFU/g, 무는  $-4.36 \pm 0.73$  Log CFU/g, 당근은  $-4.39 \pm 0.72$  Log CFU/g, 오이는  $-5.03 \pm 0.66$  Log CFU/g,

상추는  $-4.60 \pm 0.68$  Log CFU/g, 고추는  $-4.53 \pm 0.69$  Log CFU/g, 사과는  $-4.34 \pm 0.83$  Log CFU/g, 토마토는  $-4.67 \pm 0.70$  Log CFU/g 으로 정량화되었음. 세척 후 오염수준은 배추에서 평균  $-5.64 \pm 0.57$  Log CFU/g, 열무는  $-5.13 \pm 0.64$  Log CFU/g, 무는  $-5.07 \pm 0.65$  Log CFU/g, 당근은  $-5.10 \pm 0.64$  Log CFU/g, 오이는  $-5.74 \pm 0.58$  Log CFU/g, 상추는  $-5.31 \pm 0.60$  Log CFU/g, 고추는  $-5.24 \pm 0.61$  Log CFU/g, 사과는  $-5.05 \pm 1.37$  Log CFU/g, 토마토는  $-5.38 \pm 0.62$  Log CFU/g 으로 정량화되었음. 초기오염수준에 따른 농산물 별 *E. coli* O157:H7에 의한 식중독 환자 수는 50% percentile 값으로 사과에서 가장 높은 0.36로 나타났고, 토마토는 0.04, 상추는 0.02, 배추 및 오이, 고추는 0.01, 그 외 농산물은 0.00으로 측정되었으며, 세척 후 오염수준에서는 사과는 0.07, 토마토는 0.01, 그 외 농산물에서는 0.00명으로 추정되었음.

○ *L. monocytogenes*

- 주요 농산물 별 *L. monocytogenes*에 대한 위해수준을 정량화한 결과, 초기오염수준은 배추에서 평균  $-4.93 \pm 0.65$  Log CFU/g 이었으며, 열무는  $-4.42 \pm 0.72$  Log CFU/g, 무는  $-4.36 \pm 0.73$  Log CFU/g, 당근은  $-4.39 \pm 0.72$  Log CFU/g, 오이는  $-5.03 \pm 0.66$  Log CFU/g, 상추는  $-4.60 \pm 0.68$  Log CFU/g, 고추는  $-4.53 \pm 0.69$  Log CFU/g, 사과는  $-4.34 \pm 0.83$  Log CFU/g, 토마토는  $-4.67 \pm 0.70$  Log CFU/g 으로 정량화되었음. 세척 후 오염수준은 배추에서 평균  $-5.64 \pm 0.57$  Log CFU/g, 열무는  $-5.13 \pm 0.64$  Log CFU/g, 무는  $-5.07 \pm 0.65$  Log CFU/g, 당근은  $-5.10 \pm 0.64$  Log CFU/g, 오이는  $-5.74 \pm 0.58$  Log CFU/g, 상추는  $-5.31 \pm 0.60$  Log CFU/g, 고추는  $-5.24 \pm 0.61$  Log CFU/g, 사과는  $-5.05 \pm 1.37$  Log CFU/g, 토마토는  $-5.38 \pm 0.62$  Log CFU/g 으로 정량화되었음. 농산물 별 *L. monocytogenes*에 의한 식중독 환자 수는 초기오염수준 및 세척 후 오염수준 모두 50% percentile 값으로 모두 0.00명으로 측정되었음.

○ *C. perfringens*

- 주요 농산물 별 *C. perfringens*에 대한 위해수준을 정량화한 결과, 초기오염수준은 배추에서 평균  $-4.93 \pm 0.65$  Log CFU/g 이었으며, 열무는  $-4.42 \pm 0.72$  Log CFU/g, 무는  $-4.36 \pm 0.73$  Log CFU/g, 당근은  $-4.39 \pm 0.72$  Log CFU/g, 오이는  $-5.03 \pm 0.66$  Log CFU/g, 상추는  $-4.60 \pm 0.68$  Log CFU/g, 고추는  $-4.53 \pm 0.69$  Log CFU/g, 사과는  $-4.34 \pm 0.83$  Log CFU/g, 토마토는  $-4.67 \pm 0.70$  Log CFU/g 으로 정량화되었음. 세척 후 오염수준은 배추에서 평균  $-5.64 \pm 0.57$  Log CFU/g, 열무는  $-5.13 \pm 0.64$  Log CFU/g, 무는  $-5.07 \pm 0.65$  Log CFU/g, 당근은  $-5.10 \pm 0.64$  Log CFU/g, 오이는  $-5.74 \pm 0.58$  Log CFU/g, 상추는  $-5.31 \pm 0.60$  Log CFU/g, 고추는  $-5.24 \pm 0.61$  Log CFU/g, 사과는  $-5.05 \pm 1.37$  Log CFU/g, 토마토는  $-5.38 \pm 0.62$  Log CFU/g 으로 정량화되었음. 농산물 별 *C. perfringens*에 의한 식중독 환자 수는 초기오염수준 및 세척 후 오염수준 모두 50% percentile 값으로 모두 0.00명으로 추정되었음



표 3-3-20. 주요 농산물 별 바실러스 세레우스(*B. cereus*)에 대한 위해 수준

품목	초기오염수준 (Log CFU/g) Mean±S.D	세척 전 섭취 시				세척 후 오염수준 (Log CFU/g) Mean±S.D	세척 직후 그대로 섭취 시			
		The probability of foodborne illness/day					The probability of foodborne illness/day			
		The estimated number of infected persons/day					The estimated number of infected persons/day			
		Mean	5 <sup>th</sup>	50 <sup>th</sup>	95 <sup>th</sup>		Mean	5 <sup>th</sup>	50 <sup>th</sup>	95 <sup>th</sup>
배추	-2.09±1.16	1.40×10 <sup>-8</sup>	6.07×10 <sup>-13</sup>	1.94×10 <sup>-10</sup>	3.12×10 <sup>-8</sup>	-2.80±1.08	1.68×10 <sup>-9</sup>	1.60×10 <sup>-13</sup>	3.88×10 <sup>-11</sup>	4.30×10 <sup>-9</sup>
		0.72	0.00	0.01	1.61		0.09	0.00	0.00	0.22
열무	-1.27±1.03	2.27×10 <sup>-9</sup>	4.03×10 <sup>-13</sup>	6.62×10 <sup>-11</sup>	6.46×10 <sup>-9</sup>	-1.98±0.95	2.82×10 <sup>-10</sup>	1.06×10 <sup>-13</sup>	1.32×10 <sup>-11</sup>	8.91×10 <sup>-10</sup>
		0.12	0.00	0.00	0.33		0.01	0.00	0.00	0.05
무	0.60±1.49	1.37×10 <sup>-6</sup>	2.14×10 <sup>-12</sup>	2.34×10 <sup>-9</sup>	1.31×10 <sup>-6</sup>	-0.11±1.41	1.56×10 <sup>-7</sup>	5.62×10 <sup>-13</sup>	4.67×10 <sup>-10</sup>	1.80×10 <sup>-7</sup>
		70.60	0.00	0.12	67.63		8.08	0.00	0.02	9.32
당근	1.71±1.45	4.90×10 <sup>-6</sup>	1.70×10 <sup>-11</sup>	1.23×10 <sup>-8</sup>	5.48×10 <sup>-6</sup>	1.00±1.37	5.72×10 <sup>-7</sup>	4.46×10 <sup>-12</sup>	2.46×10 <sup>-9</sup>	7.55×10 <sup>-7</sup>
		253.14	0.00	0.64	283.33		29.56	0.00	0.13	39.06
오이	-2.07±0.87	4.26×10 <sup>-9</sup>	1.97×10 <sup>-12</sup>	2.48×10 <sup>-10</sup>	1.50×10 <sup>-8</sup>	-2.78±0.79	5.50×10 <sup>-10</sup>	5.16×10 <sup>-13</sup>	4.96×10 <sup>-11</sup>	2.07×10 <sup>-9</sup>
		0.22	0.00	0.01	0.78		0.03	0.00	0.00	0.11
상추	-0.77±1.28	6.09×10 <sup>-7</sup>	9.82×10 <sup>-12</sup>	4.44×10 <sup>-9</sup>	1.05×10 <sup>-6</sup>	-1.48±1.20	7.16×10 <sup>-8</sup>	2.57×10 <sup>-12</sup>	8.88×10 <sup>-10</sup>	1.45×10 <sup>-7</sup>
		31.47	0.00	0.23	54.46		3.70	0.00	0.05	7.51
고추	-1.62±0.83	3.52×10 <sup>-9</sup>	1.54×10 <sup>-12</sup>	2.24×10 <sup>-10</sup>	1.29×10 <sup>-8</sup>	-2.33±0.75	4.59×10 <sup>-10</sup>	4.04×10 <sup>-13</sup>	4.49×10 <sup>-11</sup>	1.77×10 <sup>-9</sup>
		0.18	0.00	0.01	0.67		0.02	0.00	0.00	0.09
사과	-1.36±0.89	1.36×10 <sup>-7</sup>	9.86×10 <sup>-11</sup>	9.46×10 <sup>-9</sup>	4.85×10 <sup>-7</sup>	-2.07±0.81	1.77×10 <sup>-8</sup>	2.58×10 <sup>-11</sup>	1.89×10 <sup>-9</sup>	6.69×10 <sup>-8</sup>
		7.05	0.01	0.49	25.10		0.92	0.00	0.10	3.46
토마토	-1.67±0.87	1.83×10 <sup>-8</sup>	7.86×10 <sup>-12</sup>	1.04×10 <sup>-9</sup>	6.42×10 <sup>-8</sup>	-2.38±0.79	2.36×10 <sup>-9</sup>	2.06×10 <sup>-12</sup>	2.08×10 <sup>-10</sup>	8.85×10 <sup>-9</sup>
		0.94	0.00	0.05	3.32		0.12	0.00	0.01	0.46

표 3-3-21. 주요 농산물 별 황색포도상구균(*S. aureus*)에 대한 위해 수준

품목	초기오염수준 (Log CFU/g) Mean±S.D	세척 전 섭취 시				세척 후 오염수준 (Log CFU/g) Mean±S.D	세척 직후 그대로 섭취 시			
		The probability of foodborne illness/day					The probability of foodborne illness/day			
		The estimated number of infected persons/day					The estimated number of infected persons/day			
		Mean	5 <sup>th</sup>	50 <sup>th</sup>	95 <sup>th</sup>		Mean	5 <sup>th</sup>	50 <sup>th</sup>	95 <sup>th</sup>
배추	-4.20±0.75	2.58×10 <sup>-9</sup>	4.45×10 <sup>-12</sup>	3.01×10 <sup>-10</sup>	1.03×10 <sup>-8</sup>	-4.91±0.67	3.48×10 <sup>-10</sup>	1.17×10 <sup>-12</sup>	6.02×10 <sup>-11</sup>	1.41×10 <sup>-9</sup>
		0.13	0.00	0.02	0.53		0.02	0.00	0.00	0.07
열무	-4.42±0.72	7.01×10 <sup>-11</sup>	1.84×10 <sup>-13</sup>	9.37×10 <sup>-12</sup>	2.83×10 <sup>-10</sup>	-5.13±0.64	9.58×10 <sup>-12</sup>	4.83×10 <sup>-14</sup>	1.87×10 <sup>-12</sup>	3.90×10 <sup>-11</sup>
		0.00	0.00	0.00	0.01		0.00	0.00	0.00	0.00
무	-3.62±0.85	3.82×10 <sup>-10</sup>	2.91×10 <sup>-13</sup>	2.81×10 <sup>-11</sup>	1.40×10 <sup>-9</sup>	-4.33±0.77	4.99×10 <sup>-11</sup>	7.63×10 <sup>-14</sup>	5.63×10 <sup>-12</sup>	1.92×10 <sup>-10</sup>
		0.02	0.00	0.00	0.07		0.00	0.00	0.00	0.01
당근	-4.39±0.72	1.36×10 <sup>-11</sup>	4.28×10 <sup>-14</sup>	1.95×10 <sup>-12</sup>	5.48×10 <sup>-11</sup>	-5.10±0.64	1.86×10 <sup>-12</sup>	1.12×10 <sup>-14</sup>	3.90×10 <sup>-13</sup>	7.56×10 <sup>-12</sup>
		0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00
오이	-5.03±0.66	3.58×10 <sup>-10</sup>	9.56×10 <sup>-13</sup>	5.44×10 <sup>-11</sup>	1.48×10 <sup>-9</sup>	-5.74±0.58	4.95×10 <sup>-11</sup>	2.51×10 <sup>-13</sup>	1.09×10 <sup>-11</sup>	2.05×10 <sup>-10</sup>
		0.02	0.00	0.00	0.08		0.00	0.00	0.00	0.01
상추	-3.88±0.78	6.29×10 <sup>-9</sup>	1.01×10 <sup>-11</sup>	6.89×10 <sup>-10</sup>	2.46×10 <sup>-8</sup>	-4.59±0.70	8.45×10 <sup>-10</sup>	2.65×10 <sup>-12</sup>	1.38×10 <sup>-10</sup>	3.39×10 <sup>-9</sup>
		0.33	0.00	0.04	1.27		0.04	0.00	0.01	0.18
고추	-4.53±0.69	4.55×10 <sup>-10</sup>	6.44×10 <sup>-13</sup>	5.52×10 <sup>-11</sup>	1.86×10 <sup>-9</sup>	-5.24±0.61	6.19×10 <sup>-11</sup>	1.69×10 <sup>-13</sup>	1.10×10 <sup>-11</sup>	2.57×10 <sup>-10</sup>
		0.02	0.00	0.00	0.10		0.00	0.00	0.00	0.01
사과	-4.34±0.83	2.14×10 <sup>-8</sup>	2.59×10 <sup>-11</sup>	1.98×10 <sup>-9</sup>	8.10×10 <sup>-8</sup>	-5.05±1.37	2.84×10 <sup>-9</sup>	6.79×10 <sup>-12</sup>	3.96×10 <sup>-10</sup>	1.12×10 <sup>-8</sup>
		1.11	0.00	0.10	4.19		0.15	0.00	0.02	0.58
토마토	-4.67±0.70	1.65×10 <sup>-9</sup>	2.99×10 <sup>-12</sup>	2.08×10 <sup>-10</sup>	6.74×10 <sup>-9</sup>	-5.38±0.62	2.25×10 <sup>-10</sup>	7.84×10 <sup>-13</sup>	4.17×10 <sup>-11</sup>	9.30×10 <sup>-10</sup>
		0.09	0.00	0.01	0.35		0.01	0.00	0.00	0.05

표 3-3-22. 주요 농산물 별 살모넬라(*Salmonella spp.*)에 대한 위해 수준

품목	초기오염수준 (Log CFU/g) Mean±S.D	세척 전 섭취 시				세척 후 오염수준 (Log CFU/g) Mean±S.D	세척 직후 그대로 섭취 시			
		The probability of foodborne illness/day					The probability of foodborne illness/day			
		The estimated number of infected persons/day					The estimated number of infected persons/day			
		Mean	5 <sup>th</sup>	50 <sup>th</sup>	95 <sup>th</sup>		Mean	5 <sup>th</sup>	50 <sup>th</sup>	95 <sup>th</sup>
배추	-4.93±0.65	2.99×10 <sup>-8</sup>	1.15×10 <sup>-10</sup>	5.32×10 <sup>-9</sup>	1.24×10 <sup>-7</sup>	-5.64±0.57	4.18×10 <sup>-9</sup>	3.01×10 <sup>-11</sup>	1.06×10 <sup>-9</sup>	1.71×10 <sup>-8</sup>
		1.54	0.01	0.27	6.41		0.22	0.00	0.05	0.88
열무	-4.42±0.72	6.65×10 <sup>-9</sup>	1.75×10 <sup>-11</sup>	8.88×10 <sup>-10</sup>	2.68×10 <sup>-8</sup>	-5.13±0.64	9.08×10 <sup>-10</sup>	4.58×10 <sup>-12</sup>	1.78×10 <sup>-10</sup>	3.70×10 <sup>-9</sup>
		0.34	0.00	0.05	1.39		0.05	0.00	0.01	0.19
무	-4.36±0.73	3.80×10 <sup>-9</sup>	7.91×10 <sup>-12</sup>	4.85×10 <sup>-10</sup>	1.53×10 <sup>-8</sup>	-5.07±0.65	5.17×10 <sup>-10</sup>	2.07×10 <sup>-12</sup>	9.71×10 <sup>-11</sup>	2.11×10 <sup>-9</sup>
		0.20	0.00	0.03	0.79		0.03	0.00	0.01	0.11
당근	-4.39±0.72	1.29×10 <sup>-9</sup>	4.06×10 <sup>-12</sup>	1.85×10 <sup>-10</sup>	5.20×10 <sup>-9</sup>	-5.10±0.64	1.76×10 <sup>-10</sup>	1.06×10 <sup>-12</sup>	3.70×10 <sup>-11</sup>	7.17×10 <sup>-10</sup>
		0.07	0.00	0.01	0.27		0.01	0.00	0.00	0.04
오이	-5.03±0.66	3.39×10 <sup>-8</sup>	9.07×10 <sup>-11</sup>	5.16×10 <sup>-9</sup>	1.41×10 <sup>-7</sup>	-5.74±0.58	4.69×10 <sup>-9</sup>	2.38×10 <sup>-11</sup>	1.03×10 <sup>-9</sup>	1.94×10 <sup>-8</sup>
		1.75	0.00	0.27	7.28		0.24	0.00	0.05	1.00
상추	-4.60±0.68	7.40×10 <sup>-8</sup>	2.67×10 <sup>-10</sup>	1.24×10 <sup>-8</sup>	3.04×10 <sup>-7</sup>	-5.31±0.60	1.03×10 <sup>-8</sup>	7.00×10 <sup>-11</sup>	2.49×10 <sup>-9</sup>	4.20×10 <sup>-8</sup>
		3.82	0.01	0.64	15.74		0.53	0.00	0.13	2.17
고추	-4.53±0.69	4.31×10 <sup>-8</sup>	6.11×10 <sup>-11</sup>	5.24×10 <sup>-9</sup>	1.77×10 <sup>-7</sup>	-5.24±0.61	5.87×10 <sup>-9</sup>	1.60×10 <sup>-11</sup>	1.05×10 <sup>-9</sup>	2.43×10 <sup>-8</sup>
		2.23	0.00	0.27	9.13		0.30	0.00	0.05	1.26
사과	-4.34±0.83	2.03×10 <sup>-6</sup>	2.46×10 <sup>-9</sup>	1.88×10 <sup>-7</sup>	7.68×10 <sup>-6</sup>	-5.05±1.37	2.69×10 <sup>-7</sup>	6.44×10 <sup>-10</sup>	3.76×10 <sup>-8</sup>	1.06×10 <sup>-6</sup>
		104.99	0.13	9.71	397.05		13.93	0.03	1.94	54.74
토마토	-4.67±0.70	1.57×10 <sup>-7</sup>	2.83×10 <sup>-10</sup>	1.98×10 <sup>-8</sup>	6.39×10 <sup>-7</sup>	-5.38±0.62	2.14×10 <sup>-8</sup>	7.43×10 <sup>-11</sup>	3.95×10 <sup>-9</sup>	8.81×10 <sup>-8</sup>
		8.11	0.01	1.02	33.06		1.11	0.00	0.20	4.56

표 3-3-23. 주요 농산물 별 병원성 대장균(*E. coli* O157:H7)에 대한 위해 수준

품목	초기오염수준 (Log CFU/g) Mean±S.D	세척 전 섭취 시				세척 후 오염수준 (Log CFU/g) Mean±S.D	세척 직후 그대로 섭취 시			
		The probability of foodborne illness/day					The probability of foodborne illness/day			
		The estimated number of infected persons/day					The estimated number of infected persons/day			
		Mean	5 <sup>th</sup>	50 <sup>th</sup>	95 <sup>th</sup>		Mean	5 <sup>th</sup>	50 <sup>th</sup>	95 <sup>th</sup>
배추	-4.93±0.65	1.11×10 <sup>-9</sup>	4.26×10 <sup>-12</sup>	1.98×10 <sup>-10</sup>	4.60×10 <sup>-9</sup>	-5.64±0.57	1.55×10 <sup>-10</sup>	1.12×10 <sup>-12</sup>	3.95×10 <sup>-11</sup>	6.35×10 <sup>-10</sup>
		0.06	0.00	0.01	0.24		0.01	0.00	0.00	0.03
열무	-4.42±0.72	2.47×10 <sup>-10</sup>	6.49×10 <sup>-13</sup>	3.30×10 <sup>-11</sup>	9.96×10 <sup>-10</sup>	-5.13±0.64	3.37×10 <sup>-11</sup>	1.70×10 <sup>-13</sup>	6.60×10 <sup>-12</sup>	1.37×10 <sup>-10</sup>
		0.01	0.00	0.00	0.05		0.00	0.00	0.00	0.01
무	-4.36±0.73	1.41×10 <sup>-10</sup>	2.94×10 <sup>-13</sup>	1.80×10 <sup>-11</sup>	5.68×10 <sup>-10</sup>	-5.07±0.65	1.92×10 <sup>-11</sup>	7.70×10 <sup>-14</sup>	3.61×10 <sup>-12</sup>	7.83×10 <sup>-11</sup>
		0.01	0.00	0.00	0.03		0.00	0.00	0.00	0.00
당근	-4.39±0.72	4.78×10 <sup>-11</sup>	1.51×10 <sup>-13</sup>	6.87×10 <sup>-12</sup>	1.93×10 <sup>-10</sup>	-5.10±0.64	6.56×10 <sup>-12</sup>	3.95×10 <sup>-14</sup>	1.37×10 <sup>-12</sup>	2.66×10 <sup>-11</sup>
		0.00	0.00	0.00	0.01		0.00	0.00	0.00	0.00
오이	-5.03±0.66	1.26×10 <sup>-9</sup>	3.37×10 <sup>-12</sup>	1.92×10 <sup>-10</sup>	5.23×10 <sup>-9</sup>	-5.74±0.58	1.74×10 <sup>-10</sup>	8.83×10 <sup>-13</sup>	3.83×10 <sup>-11</sup>	7.21×10 <sup>-10</sup>
		0.07	0.00	0.01	0.27		0.01	0.00	0.00	0.04
상추	-4.60±0.68	2.75×10 <sup>-9</sup>	9.91×10 <sup>-12</sup>	4.62×10 <sup>-10</sup>	1.13×10 <sup>-8</sup>	-5.31±0.60	3.82×10 <sup>-10</sup>	2.60×10 <sup>-12</sup>	9.25×10 <sup>-11</sup>	1.56×10 <sup>-9</sup>
		0.14	0.00	0.02	0.58		0.02	0.00	0.00	0.08
고추	-4.53±0.69	1.60×10 <sup>-9</sup>	2.27×10 <sup>-12</sup>	1.94×10 <sup>-10</sup>	6.56×10 <sup>-9</sup>	-5.24±0.61	2.18×10 <sup>-10</sup>	5.95×10 <sup>-13</sup>	3.89×10 <sup>-11</sup>	9.04×10 <sup>-10</sup>
		0.08	0.00	0.01	0.34		0.01	0.00	0.00	0.05
사과	-4.34±0.83	7.55×10 <sup>-8</sup>	9.12×10 <sup>-11</sup>	6.98×10 <sup>-9</sup>	2.85×10 <sup>-7</sup>	-5.05±1.37	1.00×10 <sup>-8</sup>	2.39×10 <sup>-11</sup>	1.40×10 <sup>-9</sup>	3.93×10 <sup>-8</sup>
		3.90	0.00	0.36	14.75		0.52	0.00	0.07	2.03
토마토	-4.67±0.70	5.83×10 <sup>-9</sup>	1.05×10 <sup>-11</sup>	7.34×10 <sup>-10</sup>	2.37×10 <sup>-8</sup>	-5.38±0.62	7.94×10 <sup>-10</sup>	2.76×10 <sup>-12</sup>	1.47×10 <sup>-10</sup>	3.27×10 <sup>-9</sup>
		0.30	0.00	0.04	1.23		0.04	0.00	0.01	0.17

표 3-3-24. 주요 농산물 별 리스테리아 모노사이토제네스(*L. monocytogenes*)에 대한 위해 수준

품목	초기오염수준 (Log CFU/g) Mean±S.D	세척 전 섭취 시				세척 후 오염수준 (Log CFU/g) Mean±S.D	세척 직후 그대로 섭취 시			
		The probability of foodborne illness/day					The probability of foodborne illness/day			
		The estimated number of infected persons/day					The estimated number of infected persons/day			
		Mean	5 <sup>th</sup>	50 <sup>th</sup>	95 <sup>th</sup>		Mean	5 <sup>th</sup>	50 <sup>th</sup>	95 <sup>th</sup>
배추	-4.93±0.65	4.86×10 <sup>-14</sup>	1.82×10 <sup>-16</sup>	8.67×10 <sup>-15</sup>	2.02×10 <sup>-13</sup>	-5.64±0.57	6.81×10 <sup>-15</sup>	5.18×10 <sup>-17</sup>	1.74×10 <sup>-15</sup>	2.78×10 <sup>-14</sup>
		0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00
열무	-4.42±0.72	1.08×10 <sup>-14</sup>	2.83×10 <sup>-17</sup>	1.45×10 <sup>-15</sup>	4.37×10 <sup>-14</sup>	-5.13±0.64	1.48×10 <sup>-15</sup>	7.78×10 <sup>-18</sup>	2.89×10 <sup>-16</sup>	6.02×10 <sup>-15</sup>
		0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00
무	-4.36±0.73	6.19×10 <sup>-15</sup>	1.13×10 <sup>-17</sup>	7.91×10 <sup>-16</sup>	2.49×10 <sup>-14</sup>	-5.07±0.65	8.42×10 <sup>-16</sup>	5.42×10 <sup>-18</sup>	1.57×10 <sup>-16</sup>	3.43×10 <sup>-15</sup>
		0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00
당근	-4.39±0.72	2.09×10 <sup>-15</sup>	6.68×10 <sup>-18</sup>	3.01×10 <sup>-16</sup>	8.47×10 <sup>-15</sup>	-5.10±0.64	2.87×10 <sup>-16</sup>	0	6.02×10 <sup>-17</sup>	1.17×10 <sup>-15</sup>
		0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00
오이	-5.03±0.66	5.53×10 <sup>-14</sup>	1.65×10 <sup>-16</sup>	8.40×10 <sup>-15</sup>	2.29×10 <sup>-13</sup>	-5.74±0.58	7.65×10 <sup>-15</sup>	4.21×10 <sup>-17</sup>	1.68×10 <sup>-15</sup>	3.16×10 <sup>-14</sup>
		0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00
상추	-4.60±0.68	1.20×10 <sup>-13</sup>	4.29×10 <sup>-16</sup>	2.03×10 <sup>-14</sup>	4.96×10 <sup>-13</sup>	-5.31±0.60	1.68×10 <sup>-14</sup>	1.13×10 <sup>-16</sup>	4.06×10 <sup>-15</sup>	6.84×10 <sup>-14</sup>
		0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00
고추	-4.53±0.69	7.03×10 <sup>-14</sup>	7.53×10 <sup>-17</sup>	8.52×10 <sup>-15</sup>	2.88×10 <sup>-13</sup>	-5.24±0.61	9.56×10 <sup>-15</sup>	0	1.69×10 <sup>-15</sup>	3.96×10 <sup>-14</sup>
		0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00
사과	-4.34±0.83	3.31×10 <sup>-12</sup>	3.99×10 <sup>-15</sup>	3.06×10 <sup>-13</sup>	1.25×10 <sup>-11</sup>	-5.05±1.37	4.39×10 <sup>-13</sup>	1.06×10 <sup>-15</sup>	6.12×10 <sup>-14</sup>	1.72×10 <sup>-12</sup>
		0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00
토마토	-4.67±0.70	2.56×10 <sup>-13</sup>	4.69×10 <sup>-16</sup>	3.22×10 <sup>-14</sup>	1.04×10 <sup>-12</sup>	-5.38±0.62	3.48×10 <sup>-14</sup>	1.13×10 <sup>-16</sup>	6.44×10 <sup>-15</sup>	1.44×10 <sup>-13</sup>
		0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00

표 3-3-25. 주요 농산물 별 클로스트리디움 퍼프린젠스(C. perfringens)에 대한 위해 수준

품목	초기오염수준 (Log CFU/g) Mean±S.D	세척 전 섭취 시				세척 후 오염수준 (Log CFU/g) Mean±S.D	세척 직후 그대로 섭취 시			
		The probability of foodborne illness/day					The probability of foodborne illness/day			
		The estimated number of infected persons/day					The estimated number of infected persons/day			
		Mean	5 <sup>th</sup>	50 <sup>th</sup>	95 <sup>th</sup>		Mean	5 <sup>th</sup>	50 <sup>th</sup>	95 <sup>th</sup>
배추	-4.93±0.65	7.50×10 <sup>-15</sup>	2.62×10 <sup>-17</sup>	1.33×10 <sup>-15</sup>	3.11×10 <sup>-14</sup>	-5.64±0.57	1.05×10 <sup>-15</sup>	0	2.62×10 <sup>-16</sup>	4.29×10 <sup>-15</sup>
		0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00
열무	-4.42±0.72	1.67×10 <sup>-15</sup>	4.80×10 <sup>-18</sup>	2.23×10 <sup>-16</sup>	6.74×10 <sup>-15</sup>	-5.13±0.64	2.28×10 <sup>-16</sup>	9.85×10 <sup>-19</sup>	4.47×10 <sup>-17</sup>	9.29×10 <sup>-16</sup>
		0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00
무	-4.36±0.73	9.54×10 <sup>-16</sup>	0	1.20×10 <sup>-16</sup>	3.84×10 <sup>-15</sup>	-5.07±0.65	1.30×10 <sup>-16</sup>	0	2.32×10 <sup>-17</sup>	5.28×10 <sup>-16</sup>
		0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00
당근	-4.39±0.72	3.23×10 <sup>-16</sup>	0	4.89×10 <sup>-17</sup>	1.31×10 <sup>-15</sup>	-5.10±0.64	4.42×10 <sup>-17</sup>	0	1.08×10 <sup>-17</sup>	1.80×10 <sup>-16</sup>
		0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00
오이	-5.03±0.66	8.53×10 <sup>-15</sup>	4.06×10 <sup>-17</sup>	1.29×10 <sup>-15</sup>	3.54×10 <sup>-14</sup>	-5.74±0.58	1.18×10 <sup>-15</sup>	0	2.46×10 <sup>-16</sup>	4.87×10 <sup>-15</sup>
		0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00
상추	-4.60±0.68	1.86×10 <sup>-14</sup>	6.76×10 <sup>-17</sup>	3.13×10 <sup>-15</sup>	7.65×10 <sup>-14</sup>	-5.31±0.60	2.59×10 <sup>-15</sup>	2.22×10 <sup>-17</sup>	6.26×10 <sup>-16</sup>	1.05×10 <sup>-14</sup>
		0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00
고추	-4.53±0.69	1.08×10 <sup>-14</sup>	0	1.33×10 <sup>-15</sup>	4.43×10 <sup>-14</sup>	-5.24±0.61	1.47×10 <sup>-15</sup>	0	2.44×10 <sup>-16</sup>	6.13×10 <sup>-15</sup>
		0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00
사과	-4.34±0.83	5.10×10 <sup>-13</sup>	6.10×10 <sup>-16</sup>	4.72×10 <sup>-14</sup>	1.93×10 <sup>-12</sup>	-5.05±1.37	6.77×10 <sup>-14</sup>	1.63×10 <sup>-16</sup>	9.43×10 <sup>-15</sup>	2.66×10 <sup>-13</sup>
		0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00
토마토	-4.67±0.70	3.94×10 <sup>-14</sup>	7.49×10 <sup>-17</sup>	4.96×10 <sup>-15</sup>	1.61×10 <sup>-13</sup>	-5.38±0.62	5.37×10 <sup>-15</sup>	1.88×10 <sup>-17</sup>	9.88×10 <sup>-16</sup>	2.22×10 <sup>-14</sup>
		0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00

(2) 감자에서의 주요 유해 미생물에 대한 안전수준 평가

- 감자의 경우 세척 등의 단계를 거쳐 생으로 섭취하지 않고 가열조리 후 섭취하는 것으로 가정하여 현재의 위해수준(안전수준)을 평가하였음. 즉, 농장 및 유통단계에서의 오염수준을 초기오염수준으로 하고, 이후 세척 단계를 거쳐 감소한 후 가열조리 과정을 거치는 것으로 하였으며, 가열조리에 대한 값은 *B. cereus*에 대한 열저항 값(D-value)를 이용하여 위해수준을 산출하였음
- 감자에서 *B. cereus*의 초기 오염수준은  $1.19 \pm 1.75 \log \text{CFU/g}$  이었으나 세척 후  $0.48 \pm 1.67 \log \text{CFU/g}$ 로 감소하였으며, 95°C에서 10분 이상 가열시  $-3.52 \pm 0.76 \log \text{CFU/g}$ 로 감소하는 것으로 추정되었으며, 이들 각각의 수준에서 위해수준은 그림 3-3-25에서 보는 바와 같이 50% percentile (median) 값으로  $8.15 \times 10^{-7}$ 에서 세척 후  $1.63 \times 10^{-7}$ 로, 가열조리 후  $2.59 \times 10^{-10}$ 으로 감소하는 것으로 나타났으며, 1일 감염자수의 분포도 가열조리 후에는 50% percentile 값으로 우리나라 전체인구 중 0.01명 수준으로 추정되어 위해수준은 상당히 낮은 것으로 볼 수 있음
- 감자에서 *B. cereus*를 제외한 나머지 유해미생물은 상기 *B. cereus*에서와 같은 가열 조건에서 모두 사멸되는 것으로 나타남

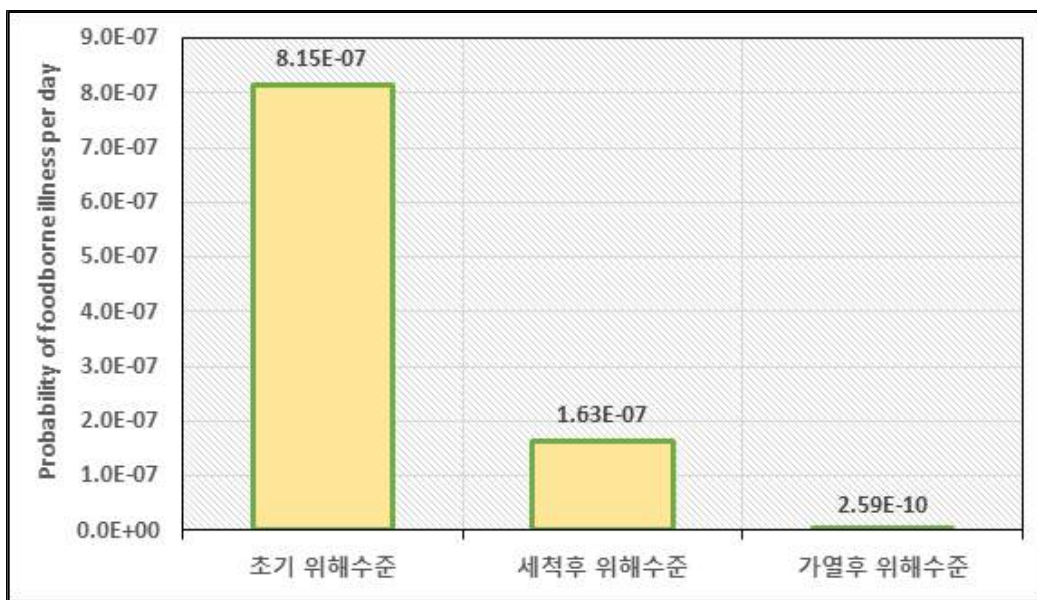


그림 3-3-26. 감자에서 *B. cereus*에 대한 초기 위해수준부터 가열조리 단계까지의 위해수준 변화

나. 농산물별 유해미생물 관리 우선순위 목록화

(1) 농산물별 위해수준 순위

- 주요 농산물에서 6종의 유해 미생물에 대한 QMRA 결과 추정된 50% percentile (median) 값을 바탕으로 제시된 위해순위는 다음과 같음
- 배추에서 주요 식중독 균의 위해수준은 *Salmonella spp.*, *S. aureus*, *E. coli O157:H7*, *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *C. perfringens*의 순서로 높았으며 각각  $5.32 \times 10^{-9}$ ,  $3.01 \times 10^{-10}$ ,  $1.98 \times 10^{-10}$ ,  $1.94 \times 10^{-10}$ ,  $8.67 \times 10^{-15}$ ,  $1.33 \times 10^{-15}$ 로 나타남

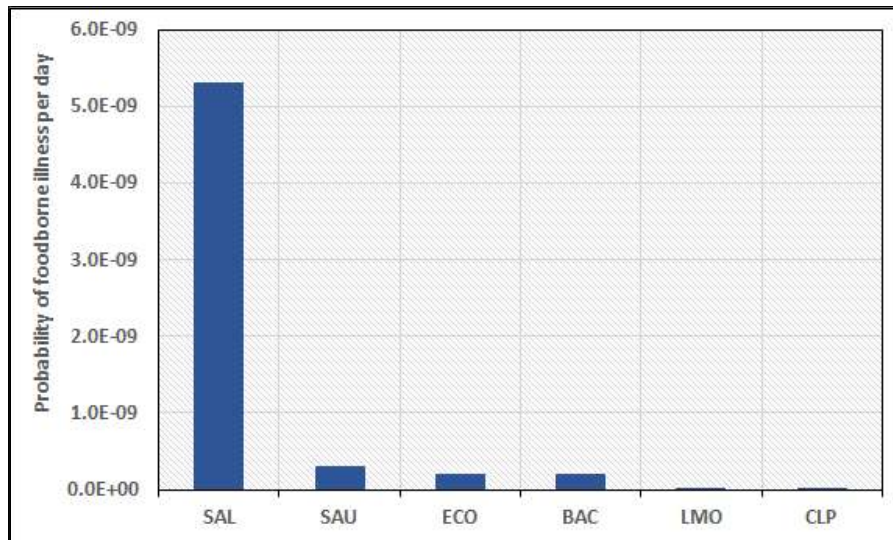


그림 3-3-27. 배추에서 주요 식중독균에 대한 위해수준 순위  
 [BAC: *B. cereus*, SAU: *S. aureus*, SAL: *Salmonella* spp., ECO: *E. coli* O157:H7, LMO: *L. monocytogenes*, CLP: *C. perfringens*]

- 열무에서 주요 식중독 균의 위해수준은 *Salmonella* spp., *B. cereus*, *E. coli* O157:H7, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *C. perfringens*의 순서로 높았으며 각각  $8.88 \times 10^{-10}$ ,  $6.62 \times 10^{-11}$ ,  $3.30 \times 10^{-11}$ ,  $9.37 \times 10^{-12}$ ,  $1.45 \times 10^{-15}$ ,  $2.23 \times 10^{-16}$ 으로 나타남

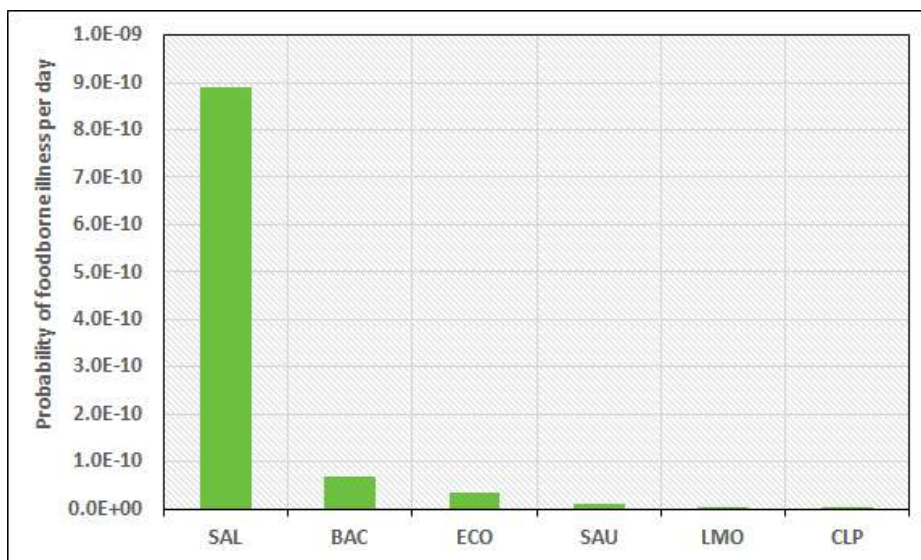


그림 3-3-28. 열무에서 주요 식중독균에 대한 위해수준 순위  
 [BAC: *B. cereus*, SAU: *S. aureus*, SAL: *Salmonella* spp., ECO: *E. coli* O157:H7, LMO: *L. monocytogenes*, CLP: *C. perfringens*]

- 무에서 주요 식중독 균의 위해수준은 *B. cereus*, *Salmonella* spp., *S. aureus*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *C. perfringens*의 순서로 높았으며 각각  $2.34 \times 10^{-9}$ ,  $4.85 \times 10^{-10}$ ,



2.81×10<sup>-11</sup>, 1.80×10<sup>-11</sup>, 7.91×10<sup>-16</sup>, 1.20×10<sup>-16</sup>으로 나타남

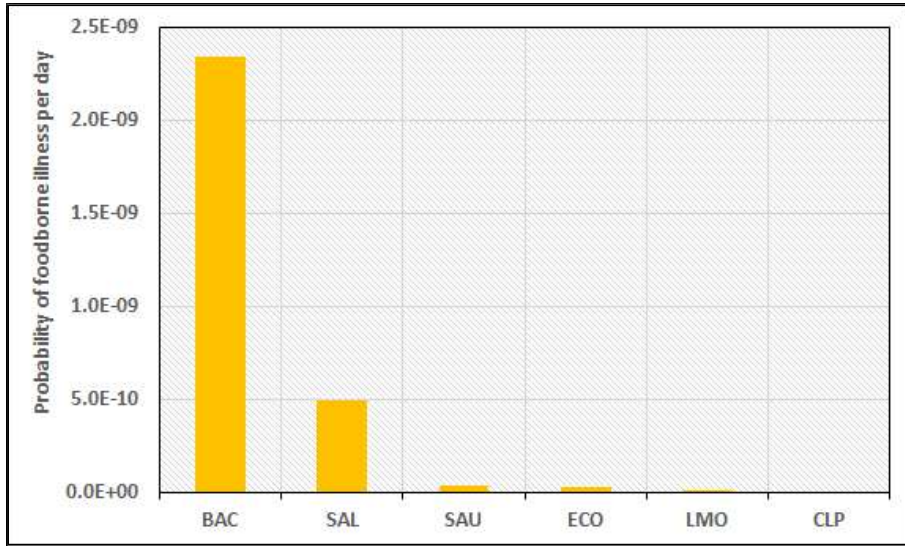


그림 3-3-29. 무에서 주요 식중독균에 대한 위해수준 순위  
[BAC: *B. cereus*, SAU: *S. aureus*, SAL: *Salmonella* spp., ECO: *E. coli* O157:H7, LMO: *L. monocytogenes*, CLP: *C. perfringens*]

- 당근에서 주요 식중독 균의 위해수준은 *B. cereus*, *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *C. perfringens*의 순서로 높았으며 각각 1.23×10<sup>-8</sup>, 1.85×10<sup>-10</sup>, 6.87×10<sup>-12</sup>, 1.95×10<sup>-12</sup>, 3.01×10<sup>-16</sup>, 4.89×10<sup>-17</sup>으로 나타남

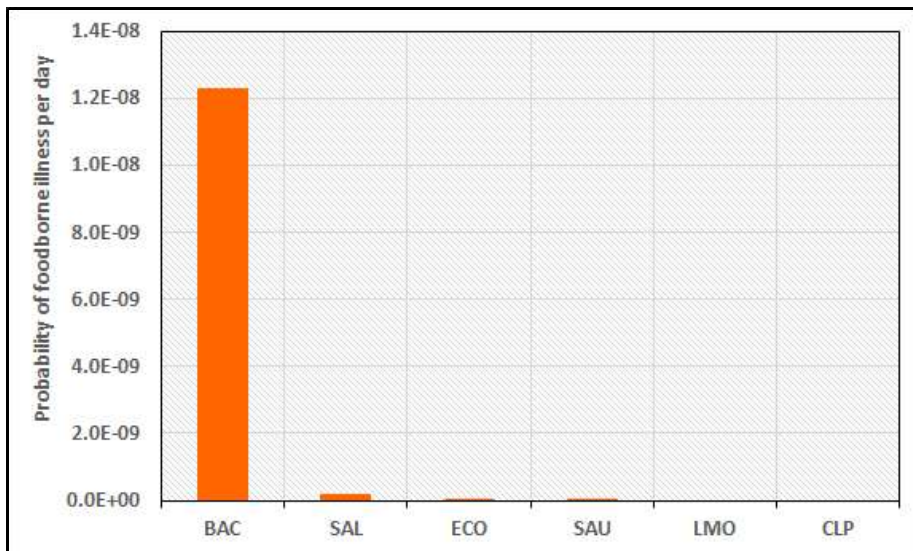


그림 3-3-30. 당근에서 주요 식중독균에 대한 위해수준 순위  
[BAC: *B. cereus*, SAU: *S. aureus*, SAL: *Salmonella* spp., ECO: *E. coli* O157:H7, LMO: *L. monocytogenes*, CLP: *C. perfringens*]

- 오이에서 주요 식중독 균의 위해수준은 *Salmonella* spp., *B. cereus*, *E. coli* O157:H7, *S.*

*aureus*, *L. monocytogenes*, *C. perfringens*의 순서로 높았으며 각각  $5.16 \times 10^{-9}$ ,  $2.48 \times 10^{-10}$ ,  $1.92 \times 10^{-10}$ ,  $5.44 \times 10^{-11}$ ,  $8.40 \times 10^{-15}$ ,  $1.29 \times 10^{-15}$ 으로 나타남

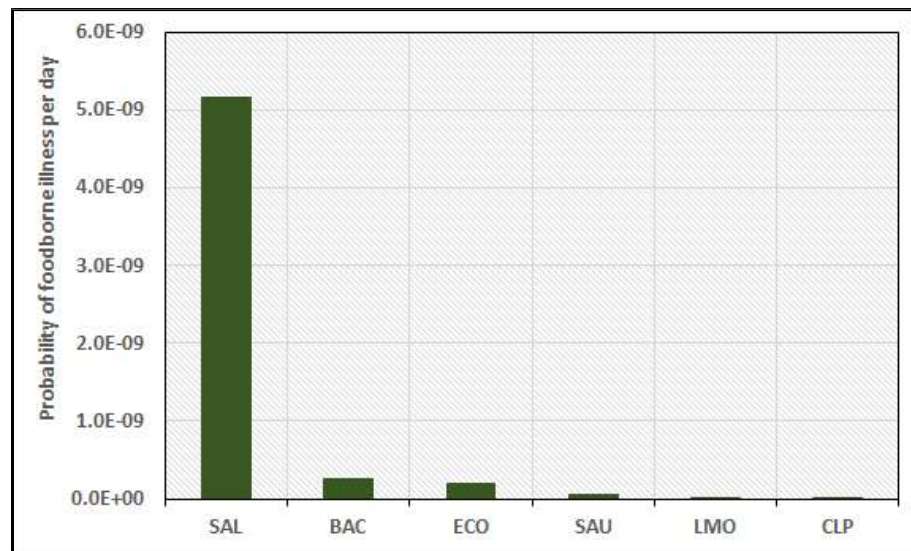


그림 3-3-31. 오이에서 주요 식중독균에 대한 위해수준 순위  
[BAC: *B. cereus*, SAU: *S. aureus*, SAL: *Salmonella* spp., ECO: *E. coli* O157:H7, LMO: *L. monocytogenes*, CLP: *C. perfringens*]

- 상추에서 주요 식중독 균의 위해수준은 *Salmonella* spp., *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *C. perfringens*의 순서로 높았으며 각각  $1.24 \times 10^{-8}$ ,  $4.44 \times 10^{-9}$ ,  $6.89 \times 10^{-10}$ ,  $4.62 \times 10^{-10}$ ,  $2.03 \times 10^{-14}$ ,  $3.13 \times 10^{-15}$ 으로 나타남

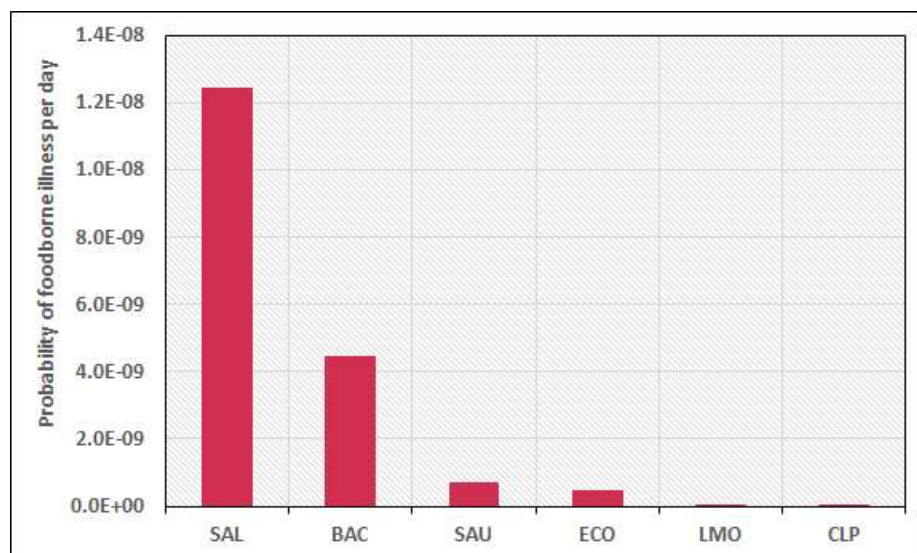


그림 3-3-32. 상추에서 주요 식중독균에 대한 위해수준 순위  
[BAC: *B. cereus*, SAU: *S. aureus*, SAL: *Salmonella* spp., ECO: *E. coli* O157:H7, LMO: *L. monocytogenes*, CLP: *C. perfringens*]

- 고추에서 주요 식중독 균의 위해수준은 *Salmonella spp.*, *B. cereus*, *E. coli O157:H7*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *C. perfringens*의 순서로 높았으며 각각  $5.24 \times 10^{-9}$ ,  $2.24 \times 10^{-10}$ ,  $1.94 \times 10^{-10}$ ,  $5.52 \times 10^{-11}$ ,  $8.52 \times 10^{-15}$ ,  $1.33 \times 10^{-15}$ 으로 나타남

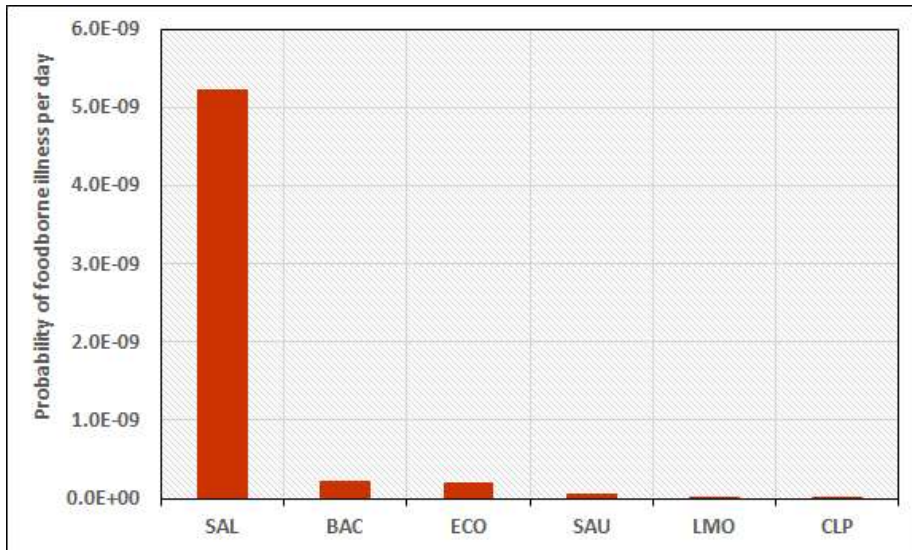


그림 3-3-33. 고추에서 주요 식중독균에 대한 위해수준 순위  
[BAC: *B. cereus*, SAU: *S. aureus*, SAL: *Salmonella spp.*, ECO: *E. coli O157:H7*, LMO: *L. monocytogenes*, CLP: *C. perfringens*]

- 사과에서 주요 식중독 균의 위해수준은 *Salmonella spp.*, *B. cereus*, *E. coli O157:H7*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *C. perfringens*의 순서로 높았으며 각각  $1.88 \times 10^{-7}$ ,  $9.46 \times 10^{-9}$ ,  $6.98 \times 10^{-9}$ ,  $1.98 \times 10^{-9}$ ,  $3.06 \times 10^{-13}$ ,  $4.72 \times 10^{-14}$ 으로 나타남

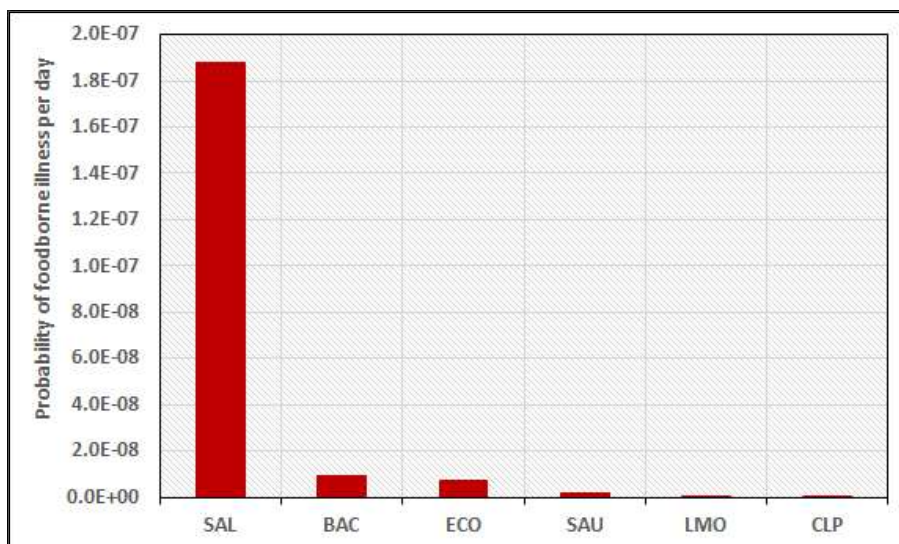


그림 3-3-34. 사과에서 주요 식중독균에 대한 위해수준 순위  
[BAC: *B. cereus*, SAU: *S. aureus*, SAL: *Salmonella spp.*, ECO: *E. coli O157:H7*, LMO: *L. monocytogenes*, CLP: *C. perfringens*]

- 토마토에서 주요 식중독 균의 위해수준은 *Salmonella spp.*, *B. cereus*, *E. coli O157:H7*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *C. perfringens*의 순서로 높았으며 각각  $1.98 \times 10^{-8}$ ,  $1.04 \times 10^{-9}$ ,  $7.34 \times 10^{-10}$ ,  $2.08 \times 10^{-10}$ ,  $3.22 \times 10^{-14}$ ,  $4.96 \times 10^{-15}$ 으로 나타남

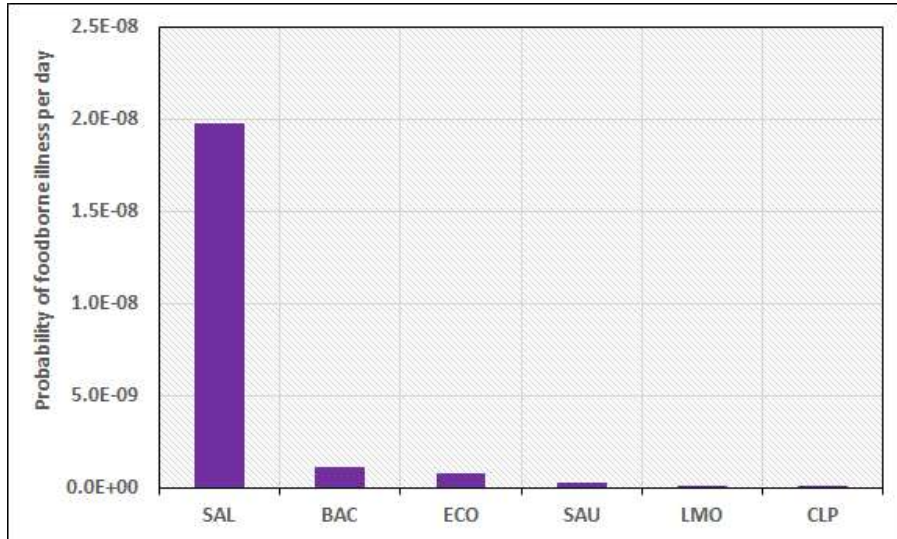


그림 3-3-35. 토마토에서 주요 식중독균에 대한 위해수준 순위  
 [BAC: *B. cereus*, SAU: *S. aureus*, SAL: *Salmonella spp.*, ECO: *E. coli O157:H7*, LMO: *L. monocytogenes*, CLP: *C. perfringens*]

(2) 유해 미생물별 위해수준 순위

- 6종의 유해 미생물별 9종의 농산물에 대한 QMRA 결과 추정된 50% percentile (median) 값을 바탕으로 제시된 위해수위는 다음과 같음
- *B. cereus*의 경우 주요 농산물을 대상으로 한 위해수준은 당근, 상추, 무, 토마토, 사과, 오이, 고추, 배추, 열무 순으로 높았으며 각각  $1.23 \times 10^{-7}$ ,  $4.43 \times 10^{-8}$ ,  $2.33 \times 10^{-8}$ ,  $1.03 \times 10^{-8}$ ,  $9.45 \times 10^{-9}$ ,  $2.48 \times 10^{-9}$ ,  $2.24 \times 10^{-9}$ ,  $1.92 \times 10^{-9}$ ,  $6.92 \times 10^{-10}$ 으로 나타남

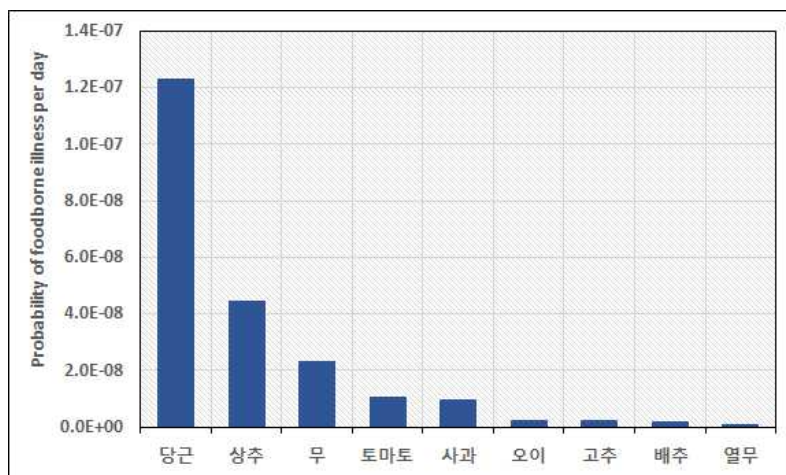


그림 3-3-36. 바실러스 세레우스(*B. cereus*)에 대한  
 주요 농산물에서의 위해수준 순위



- *S. aureus*의 경우 주요 농산물을 대상으로 한 위해수준은 사과, 상추, 배추, 토마토, 고추, 오이, 무, 열무, 당근 순으로 높았으며 각각  $1.98 \times 10^{-9}$ ,  $6.89 \times 10^{-10}$ ,  $3.01 \times 10^{-10}$ ,  $2.08 \times 10^{-10}$ ,  $5.52 \times 10^{-11}$ ,  $5.44 \times 10^{-11}$ ,  $2.81 \times 10^{-11}$ ,  $9.37 \times 10^{-12}$ ,  $1.95 \times 10^{-12}$ 으로 나타남



그림 3-3-37. 황색포도상구균(*S. aureus*)에 대한 주요 농산물에서의 위해수준 순위

- *Salmonella* spp.의 경우 주요 농산물을 대상으로 한 위해수준은 사과, 토마토, 상추, 배추, 고추, 오이, 열무, 무, 당근 순으로 높았으며 각각  $1.88 \times 10^{-7}$ ,  $1.98 \times 10^{-8}$ ,  $1.24 \times 10^{-8}$ ,  $5.32 \times 10^{-9}$ ,  $5.24 \times 10^{-9}$ ,  $5.16 \times 10^{-9}$ ,  $8.88 \times 10^{-10}$ ,  $4.85 \times 10^{-10}$ ,  $1.85 \times 10^{-10}$ 으로 나타남

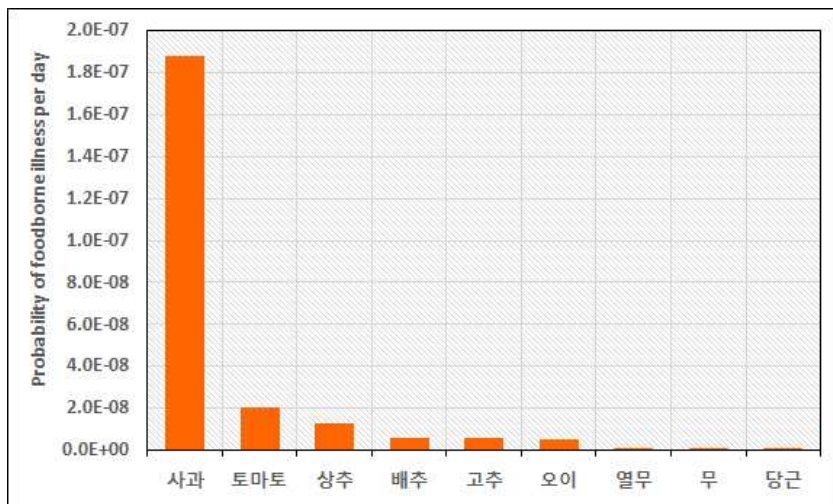


그림 3-3-38. 살모넬라(*Salmonella* spp.)에 대한 주요 농산물에서의 위해수준 순위

- *E. coli* O157:H7의 경우 주요 농산물을 대상으로 한 위해수준은 사과, 토마토, 상추, 배추, 고추, 오이, 열무, 무, 당근 순으로 높았으며 각각  $6.98 \times 10^{-9}$ ,  $7.34 \times 10^{-10}$ ,  $4.62 \times 10^{-10}$ ,  $1.98 \times 10^{-10}$ ,  $1.94 \times 10^{-10}$ ,  $1.92 \times 10^{-10}$ ,  $3.30 \times 10^{-11}$ ,  $1.80 \times 10^{-11}$ ,  $6.87 \times 10^{-12}$ 으로 나타남



그림 3-3-39. 병원성 대장균(*E. coli* O157:H7)에 대한 주요 농산물에서의 위해수준 순위

- *L. monocytogenes*의 경우 주요 농산물을 대상으로 한 위해수준은 사과, 토마토, 상추, 배추, 고추, 오이, 열무, 무, 당근 순으로 높았으며 각각  $3.06 \times 10^{-13}$ ,  $3.22 \times 10^{-14}$ ,  $2.03 \times 10^{-14}$ ,  $8.67 \times 10^{-15}$ ,  $8.52 \times 10^{-15}$ ,  $8.40 \times 10^{-15}$ ,  $1.45 \times 10^{-15}$ ,  $7.91 \times 10^{-16}$ ,  $3.01 \times 10^{-16}$  으로 나타남



그림 3-3-40. 리스테리아 모노사이토제네스(*L. monocytogenes*)에 대한 주요 농산물에서의 위해수준 순위

- *C. perfringens*의 경우 주요 농산물을 대상으로 한 위해수준은 사과, 토마토, 상추, 배추, 고추, 오이, 열무, 무, 당근 순으로 높았으며 각각  $4.72 \times 10^{-14}$ ,  $4.96 \times 10^{-15}$ ,  $3.13 \times 10^{-15}$ ,  $1.328 \times 10^{-15}$ ,  $1.327 \times 10^{-15}$ ,  $1.29 \times 10^{-15}$ ,  $2.23 \times 10^{-16}$ ,  $1.20 \times 10^{-16}$ ,  $4.89 \times 10^{-17}$  으로 나타남

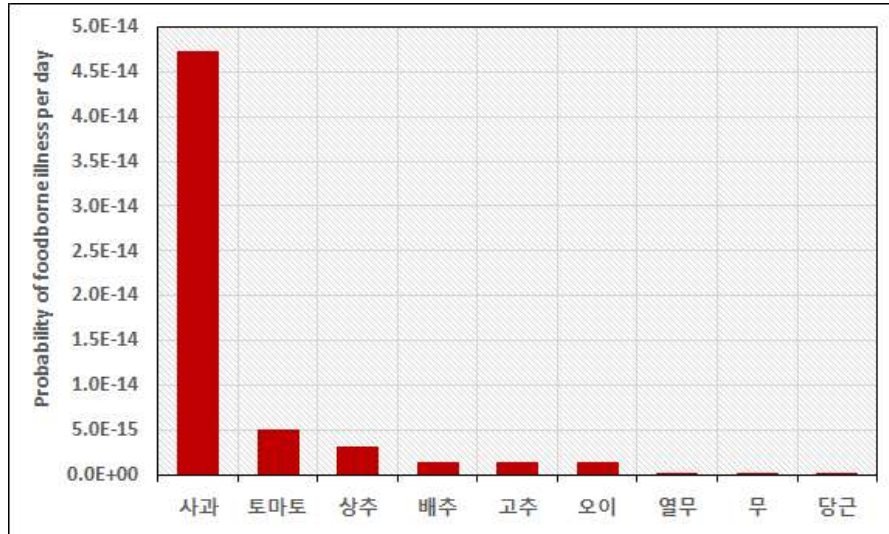


그림 3-3-41. 클로스트리디움 퍼프린젠스(*C. perfringens*)에 대한 주요 농산물에서의 위해수준 순위

(3) 농산물별/유해 미생물별 위해수준 전체 순위

- 본 연구의 대상 농산물(9종)과 유해 미생물(6종)에 대한 QMRA 결과 추정된 50% percentile (median) 값을 바탕으로 제시된 전체 위해순위는 표 3-3-26과 같으며, 사과에서 *Salmonella* spp.가 가장 높은 위해수준을 나타냈으며, 다음이 역시 *Salmonella* spp.에서 토마토와 상추 등의 순위로 나타났음
- 하지만 본 위해평가에서는 대상 농산물을 그대로 섭취한 경우를 가정한 경우로 세척하는 경우 그 위해수준은 더욱 감소할 것이며, 특히 사과의 경우 본 연구에서는 껍질째 섭취하는 것으로 가정하였기 때문에 일상적인 섭취하는 껍질 제거 후 섭취할 경우 그 위해수준은 더 감소할 수 있다고 볼 수 있음. 또한 당근이나 무의 경우 역시 1일 섭취량의 10%만이 그대로 섭취하는 것으로 가정하였고 조리해서 섭취할 경우 역시 그 위해수준은 더 감소할 것임

표 3-3-26. 주요 농산물별/주요 위해미생물별 전체 위해순위

순위	농산물	유해 미생물	위해수준 50% percentile (median) 값
1	사과	<i>Salmonella</i> spp.	$1.88 \times 10^{-7}$
2	토마토	<i>Salmonella</i> spp.	$1.98 \times 10^{-8}$
3	상추	<i>Salmonella</i> spp.	$1.24 \times 10^{-8}$
4	당근	<i>B. cereus</i>	$1.23 \times 10^{-8}$
5	사과	<i>B. cereus</i>	$9.46 \times 10^{-9}$
6	사과	<i>E. coli</i> O157:H7	$6.98 \times 10^{-9}$
7	배추	<i>Salmonella</i> spp.	$5.32 \times 10^{-9}$
8	고추	<i>Salmonella</i> spp.	$5.24 \times 10^{-9}$
9	오이	<i>Salmonella</i> spp.	$5.16 \times 10^{-9}$
10	상추	<i>B. cereus</i>	$4.44 \times 10^{-9}$

순위	농산물	유해 미생물	위해수준 50% percentile (median) 값
11	무	<i>B. cereus</i>	$2.34 \times 10^{-9}$
12	사과	<i>S. aureus</i>	$1.98 \times 10^{-9}$
13	토마토	<i>B. cereus</i>	$1.04 \times 10^{-9}$
14	열무	<i>Salmonella</i> spp.	$8.88 \times 10^{-10}$
15	토마토	<i>E. coli</i> O157:H7	$7.34 \times 10^{-10}$
16	상추	<i>S. aureus</i>	$6.89 \times 10^{-10}$
17	무	<i>Salmonella</i> spp.	$4.85 \times 10^{-10}$
18	상추	<i>E. coli</i> O157:H7	$4.62 \times 10^{-10}$
19	배추	<i>S. aureus</i>	$3.01 \times 10^{-10}$
20	오이	<i>B. cereus</i>	$2.48 \times 10^{-10}$
21	고추	<i>B. cereus</i>	$2.24 \times 10^{-10}$
22	토마토	<i>S. aureus</i>	$2.08 \times 10^{-10}$
23	배추	<i>E. coli</i> O157:H7	$1.98 \times 10^{-10}$
24	고추	<i>E. coli</i> O157:H7	$1.94 \times 10^{-10}$
25	배추	<i>B. cereus</i>	$1.94 \times 10^{-10}$
26	오이	<i>E. coli</i> O157:H7	$1.92 \times 10^{-10}$
27	당근	<i>Salmonella</i> spp.	$1.85 \times 10^{-10}$
28	열무	<i>B. cereus</i>	$6.62 \times 10^{-11}$
29	고추	<i>S. aureus</i>	$5.52 \times 10^{-11}$
30	오이	<i>S. aureus</i>	$5.44 \times 10^{-11}$
31	열무	<i>E. coli</i> O157:H7	$3.30 \times 10^{-11}$
32	무	<i>S. aureus</i>	$2.81 \times 10^{-11}$
33	무	<i>E. coli</i> O157:H7	$1.80 \times 10^{-11}$
34	열무	<i>S. aureus</i>	$9.37 \times 10^{-12}$
35	당근	<i>E. coli</i> O157:H7	$6.87 \times 10^{-12}$
36	당근	<i>S. aureus</i>	$1.95 \times 10^{-12}$
37	사과	<i>L. monocytogenes</i>	$3.06 \times 10^{-13}$
38	사과	<i>C. perferingens</i>	$4.72 \times 10^{-14}$
39	토마토	<i>L. monocytogenes</i>	$3.22 \times 10^{-14}$
40	상추	<i>L. monocytogenes</i>	$2.03 \times 10^{-14}$
41	배추	<i>L. monocytogenes</i>	$8.67 \times 10^{-15}$
42	고추	<i>L. monocytogenes</i>	$8.52 \times 10^{-15}$
43	오이	<i>L. monocytogenes</i>	$8.40 \times 10^{-15}$
44	토마토	<i>C. perferingens</i>	$4.96 \times 10^{-15}$
45	상추	<i>C. perferingens</i>	$3.13 \times 10^{-15}$
46	열무	<i>L. monocytogenes</i>	$1.45 \times 10^{-15}$
47	배추	<i>C. perferingens</i>	$1.33 \times 10^{-15}$
48	고추	<i>C. perferingens</i>	$1.33 \times 10^{-15}$
49	오이	<i>C. perferingens</i>	$1.29 \times 10^{-15}$
50	무	<i>L. monocytogenes</i>	$7.91 \times 10^{-16}$
51	당근	<i>L. monocytogenes</i>	$3.01 \times 10^{-16}$
52	열무	<i>C. perferingens</i>	$2.23 \times 10^{-16}$



순위	농산물	유해 미생물	위해수준 50% percentile (median) 값
53	무	<i>C. perfringens</i>	$1.20 \times 10^{-16}$
54	당근	<i>C. perfringens</i>	$4.89 \times 10^{-17}$

## 5. 농산물별 위생안전관리방안 개선안 제안

### 가. 제외국 농산물관련 미생물 안전관리 기준·규격 비교 검토

- 국제적으로 ICMSF(International Commission on Microbiological Specification for Foods)를 중심으로 주요 식품별 관련 유해 미생물에 대한 Sampling plan 기준 설정을 권고하고 있음. 하지만 ICMSF의 본 연구 대상 농산물에 대한 Sampling plan 기준에 대한 권고 사항은 없음
- 미국의 경우 신선 농산물에 대해서는 표 3-3-27과 같은 허용기준을 설정하고 있음

표 3-3-27. 미국의 신선 농산물 유해미생물 허용기준

미생물	시료채취		기준(CFU/g)	
	N	C	m	M
호기성균	5	2	1,000	100,000
<i>E. coli</i>	5	2	100	1,000
Coliform	5	2	100	1,000
<i>Salmonella</i>	5	0	0/25g	
<i>E. coli</i> O157:H7	5	0	0/25g	
<i>S. aureus</i>	5	0	10	1,000
<i>B. cereus</i>	5	0	10	1,000
<i>C. perfringens</i>	5	0	10	1,000
Molds	5	2	10	100

- 유럽연합 및 Codex의 경우 신선 과일 및 채소류에 대해 미국과 유사한 기준을 설정하고 있음(표 3-3-28)

표 3-3-28. 유럽연합 및 Codex의 신선 농산물 유해미생물 허용기준

식품군(유형)		미생물	규격	
과일·채 소류	Precut, Ready-to-eat	호기성균	m=100 M=100,000	n=5, c=2
		<i>E. coli</i>	m=100 M=1,000	n=5, c=2
		Coliforms	m=100 M=1,000	n=5, c=2
		<i>B. cereus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Listeria</i> <i>spp.</i> , <i>Salmonella</i> spp. 등 모든 식중독 세균	m=M=0/25g	n=5, c=0

- 영국의 경우 식품을 1-5(신선과일 및 채소는 분류번호 5임)로 분류하여 그에 따른 세균기

준을 정하여 만족, 허용, 불만족, 불허용/확실한 위해 등 4단계로 나누어 규정하고 있음

표 3-3-29. 영국의 신선 농산물 유해미생물 허용기준

기준	미생물학적 품질 (cfu/g)			
	만족	허용	불만족	불허용/확실한 위해
호기성균	<10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup> -10 <sup>7</sup>	≥10 <sup>7</sup>	해당 없음.
<i>Enterobacteriaceae</i>	<100	100 ~ <10 <sup>4</sup>	≥10 <sup>4</sup>	해당 없음.
<i>E. coli</i> & <i>Listeria</i>	<20	20 ~ <100	≥100	해당 없음.
<i>Salmonella</i> <i>Campylobacter</i> <i>E.coli</i> O157	25g에서 불검출			25g에서 불검출
<i>L. monocytogenes</i>	<20	20 ~ <100	해당 없음	≥10 <sup>0</sup>
<i>S. aureus</i> <i>C. perfringens</i>	<20	20 ~ <100	100에서 <10 <sup>4</sup>	≥10 <sup>4</sup>
<i>B.cereus</i> & other Pathogenic <i>Bacillus</i>	<10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup> ~ <10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup> ~ <10 <sup>5</sup>	≥10 <sup>5</sup>

나. Sampling plan 기법을 활용한 국내 농산물에서의 미생물 기준·규격 설정(안)

(1) Sampling plan 작성 활용 방법

- 2016년부터 2018년까지 당근, 감자, 무, 토마토, 사과 고추, 배추, 상추, 오이, 열무 등 10종의 농산물에 대한 일반세균수, 곰팡이·효모, 대장균군, 대장균과 *B. cereus*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *C. perfringens* 등 유해미생물에 대한 미생물 기준·규격은 모니터링 결과 추정된 오염수준과 이를 바탕으로 추정된 안전수준을 바탕으로
- 국제 식품 미생물 규격 위원회인 ICMSF(International Commission on Microbiological Specifications for Foods)에서 제안(ICMSF, 1998)하고 있는 Microbiological Sampling Plan을 이용하여 본 연구의 모니터링 및 안전수준 기준으로 생산농가 및 유통업소에서 기준 수용도(95%)를 산출할 수 있는 프로그램을 이용하여 제안하였음

(2) 기준 수용도 95%에 맞춘 주요 농산물별 미생물 기준·규격 설정(안)

- 본 연구의 모니터링 및 안전수준 기준으로 생산농가 및 유통 업소에서 기준 수용도95%에 맞추어 당근, 감자, 무, 토마토, 사과 고추, 배추, 상추, 오이, 열무 등 10종의 농산물에 대한 일반세균수, 곰팡이·효모, 대장균군, 대장균과 *B. cereus*, *S. aureus*, 기타 식중도균 (*L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *C. perfringens*) 등 유해미생물에 대한 미생물 기준·규격 설정(안) 그림 3-3-41과 같음. 단 감자의 경우 반드시 조리하여 섭취하는 경우로 생산농가 및 유통 업소에서의 따로 미생물 기준 및 규격을 설정(안)을 제시하지 않았음

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
1													
2		<b>당근</b>					<b>3-Class counts</b>					기준 수용도	
3			<b>Mean</b>	<b>SD</b>			<b>n</b>	<b>c</b>	<b>m</b>	<b>M</b>			<b>P(accept)</b>
4		일반세균	6.40	1.63	log CFU/g		5	2	8.0	10.7	log CFU/g		0.9495
5		곰팡이-효모	3.52	1.08	log CFU/g		5	2	5.0	6.1	log CFU/g		0.9499
6		대장균군	4.08	1.25	log CFU/g		5	2	6.0	7.0	log CFU/g		0.9506
7		바실러스 세레우스	1.71	1.45	log CFU/g		5	2	4.0	5.1	log CFU/g		0.9498
8													
9													
10							<b>2-Class counts</b>						
11			<b>Mean</b>	<b>SD</b>			<b>n</b>	<b>c</b>	<b>m</b>				<b>P(accept)</b>
12		대장균	-1.49	1.15	log CFU/g		5	0	1.2	log CFU/g			0.9499
13													
14													
15													
16													
17							<b>2-Class counts with enrichment</b>						
18			<b>Mean</b>	<b>SD</b>			<b>n</b>	<b>c</b>	<b>m</b>				<b>P(accept)</b>
19		활색포도상구균	-4.39	0.72	log CFU/g		5	0	68	g			0.9501
20		기타 식중독균	-4.39	0.72	log CFU/g		5	0	68	g			0.9501
21													

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
1													
2		<b>무</b>					<b>3-Class counts</b>					기준 수용도	
3			<b>Mean</b>	<b>SD</b>			<b>n</b>	<b>c</b>	<b>m</b>	<b>M</b>			<b>P(accept)</b>
4		일반세균	6.44	0.74	log CFU/g		5	2	7.5	8.2	log CFU/g		0.9502
5		곰팡이-효모	3.84	0.92	log CFU/g		5	2	5.0	6.0	log CFU/g		0.9501
6		대장균군	4.26	1.56	log CFU/g		5	2	7.0	7.9	log CFU/g		0.9497
7		바실러스 세레우스	0.60	1.49	log CFU/g		5	2	3.0	4.1	log CFU/g		0.9499
8													
9													
10							<b>2-Class counts</b>						
11			<b>Mean</b>	<b>SD</b>			<b>n</b>	<b>c</b>	<b>m</b>				<b>P(accept)</b>
12		대장균	-1.45	1.15	log CFU/g		5	0	1.2	log CFU/g			0.9495
13													
14													
15													
16													
17							<b>2-Class counts with enrichment</b>						
18			<b>Mean</b>	<b>SD</b>			<b>n</b>	<b>c</b>	<b>m</b>				<b>P(accept)</b>
19		활색포도상구균	-3.62	0.85	log CFU/g		5	0	7	g			0.9504
20		기타 식중독균	-4.36	0.73	log CFU/g		5	0	61	g			0.9505
21													

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
1													
2		<b>토마토</b>					<b>3-Class counts</b>					기준 수용도	
3			<b>Mean</b>	<b>SD</b>			<b>n</b>	<b>c</b>	<b>m</b>	<b>M</b>			<b>P(accept)</b>
4		일반세균	3.92	1.27	log CFU/g		5	2	6.0	6.9	log CFU/g		0.9493
5		곰팡이-효모	2.48	1.12	log CFU/g		5	2	4.0	5.1	log CFU/g		0.9493
6		대장균군	-0.98	2.20	log CFU/g		5	2	3.0	4.1	log CFU/g		0.9497
7													
8													
9													
10							<b>2-Class counts</b>						
11			<b>Mean</b>	<b>SD</b>			<b>n</b>	<b>c</b>	<b>m</b>				<b>P(accept)</b>
12		대장균	-1.66	1.44	log CFU/g		5	0	1.7	log CFU/g			0.9502
13		바실러스 세레우스	-1.67	0.87	log CFU/g		5	0	0.3	log CFU/g			0.9503
14													
15													
16													
17							<b>2-Class counts with enrichment</b>						
18			<b>Mean</b>	<b>SD</b>			<b>n</b>	<b>c</b>	<b>m</b>				<b>P(accept)</b>
19		활색포도상구균	-4.67	0.70	log CFU/g		5	0	139	g			0.9505
20		기타 식중독균	-4.67	0.70	log CFU/g		5	0	139	g			0.9505
21													

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
1												
2	사과					3-Class counts						기준 수용도
3		Mean	SD			n	c	m	M			P(accept)
4	일반세균	4.85	0.26	log CFU/g		5	2	5.1	6.0	log CFU/g		0.9502
5	곰팡이-효모	3.55	0.47	log CFU/g		5	2	4.0	4.8	log CFU/g		0.9504
6	대장균군	-0.49	1.20	log CFU/g		5	2	1.0	2.4	log CFU/g		0.9499
7												
8												
9												
10						2-Class counts						
11		Mean	SD			n	c	m				P(accept)
12	대장균	-1.36	0.89	log CFU/g		5	0	0.7	log CFU/g			0.9505
13	바실러스 세레우스	-1.36	0.89	log CFU/g		5	0	0.7	log CFU/g			0.9505
14												
15												
16												
17						2-Class counts with enrichment						
18		Mean	SD			n	c	m				P(accept)
19	황색포도상구균	-4.34	0.83	log CFU/g		5	0	40	g			0.9502
20	기타 식중독균	-4.34	0.83	log CFU/g		5	0	40	g			0.9502
21												

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
1												
2	상추					3-Class counts						기준 수용도
3		Mean	SD			n	c	m	M			P(accept)
4	일반세균	5.03	1.28	log CFU/g		5	2	7.0	8.0	log CFU/g		0.9501
5	곰팡이-효모	4.05	1.04	log CFU/g		5	2	5.0	7.1	log CFU/g		0.9497
6	대장균군	1.73	1.98	log CFU/g		5	2	5.0	6.3	log CFU/g		0.9496
7												
8												
9												
10						2-Class counts						
11		Mean	SD			n	c	m				P(accept)
12	대장균	-1.85	1.16	log CFU/g		5	0	1.0	log CFU/g			0.9655
13	바실러스 세레우스	-0.77	1.28	log CFU/g		5	0	2.2	log CFU/g			0.9496
14												
15												
16												
17						2-Class counts with enrichment						
18		Mean	SD			n	c	m				P(accept)
19	황색포도상구균	-3.88	0.78	log CFU/g		5	0	17	g			0.9503
20	기타 식중독균	-4.60	0.68	log CFU/g		5	0	127	g			0.9503
21												

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
1												
2	고추					3-Class counts						기준 수용도
3		Mean	SD			n	c	m	M			P(accept)
4	일반세균	4.57	1.35	log CFU/g		5	2	6.0	8.0	log CFU/g		0.9494
5	곰팡이-효모	2.57	0.78	log CFU/g		5	2	3.5	4.4	log CFU/g		0.9497
6	대장균군	2.73	1.40	log CFU/g		5	2	5.0	6.0	log CFU/g		0.9501
7												
8												
9												
10						2-Class counts						
11		Mean	SD			n	c	m				P(accept)
12	대장균	-1.76	0.88	log CFU/g		5	0	0.3	log CFU/g			0.9491
13	바실러스 세레우스	-1.62	0.83	log CFU/g		5	0	0.3	log CFU/g			0.9500
14												
15												
16												
17						2-Class counts with enrichment						
18		Mean	SD			n	c	m				P(accept)
19	황색포도상구균	-4.53	0.69	log CFU/g		5	0	103	g			0.9508
20	기타 식중독균	-4.53	0.69	log CFU/g		5	0	103	g			0.9508
21												

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
1													
2		<b>오이</b>					<b>3-Class counts</b>					기준 수용도	
3			<b>Mean</b>	<b>SD</b>			<b>n</b>	<b>c</b>	<b>m</b>	<b>M</b>			<b>P(accept)</b>
4		일반세균	4.87	0.92	log CFU/g		5	2	5.7	8.0	log CFU/g		0.9501
5		곰팡이-효모	4.20	1.10	log CFU/g		5	2	5.2	8.0	log CFU/g		0.9493
6		대장균군	0.52	1.41	log CFU/g		5	2	2.1	4.0	log CFU/g		0.9492
7													
8													
9													
10							<b>2-Class counts</b>						
11			<b>Mean</b>	<b>SD</b>			<b>n</b>	<b>c</b>	<b>m</b>				<b>P(accept)</b>
12		대장균	-2.23	1.24	log CFU/g		5	0	0.6	log CFU/g			0.9494
13		바실러스 세레우스	-2.07	0.87	log CFU/g		5	0	0.1	log CFU/g			0.9688
14													
15													
16													
17							<b>2-Class counts with enrichment</b>						
18			<b>Mean</b>	<b>SD</b>			<b>n</b>	<b>c</b>	<b>m</b>				<b>P(accept)</b>
19		활석포도상구균	-5.03	0.66	log CFU/g		5	0	386	g			0.9502
20		기타 식중독균	-5.03	0.66	log CFU/g		5	0	386	g			0.9502
21													

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
1													
2		<b>열무</b>					<b>3-Class counts</b>					기준 수용도	
3			<b>Mean</b>	<b>SD</b>			<b>n</b>	<b>c</b>	<b>m</b>	<b>M</b>			<b>P(accept)</b>
4		일반세균	6.81	0.71	log CFU/g		5	2	7.5	9.0	log CFU/g		0.9499
5		곰팡이-효모	4.26	0.90	log CFU/g		5	2	5.1	7.0	log CFU/g		0.9494
6		대장균군	3.70	1.01	log CFU/g		5	2	5.0	6.1	log CFU/g		0.9496
7													
8													
9													
10							<b>2-Class counts</b>						
11			<b>Mean</b>	<b>SD</b>			<b>n</b>	<b>c</b>	<b>m</b>				<b>P(accept)</b>
12		대장균	-1.29	0.86	log CFU/g		5	0	0.7	log CFU/g			0.9503
13		바실러스 세레우스	-1.27	1.08	log CFU/g		5	0	1.2	log CFU/g			0.9496
14													
15													
16													
17							<b>2-Class counts with enrichment</b>						
18			<b>Mean</b>	<b>SD</b>			<b>n</b>	<b>c</b>	<b>m</b>				<b>P(accept)</b>
19		활석포도상구균	-4.42	0.72	log CFU/g		5	0	73	g			0.9502
20		기타 식중독균	-4.42	0.72	log CFU/g		5	0	73	g			0.9502
21													

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
1													
2		<b>배추</b>					<b>3-Class counts</b>					기준 수용도	
3			<b>Mean</b>	<b>SD</b>			<b>n</b>	<b>c</b>	<b>m</b>	<b>M</b>			<b>P(accept)</b>
4		일반세균	5.38	0.80	log CFU/g		5	2	6.1	8.0	log CFU/g		0.9499
5		곰팡이-효모	3.41	1.29	log CFU/g		5	2	5.0	6.5	log CFU/g		0.9496
6		대장균군	1.20	1.03	log CFU/g		5	2	2.2	4.0	log CFU/g		0.9493
7													
8													
9													
10							<b>2-Class counts</b>						
11			<b>Mean</b>	<b>SD</b>			<b>n</b>	<b>c</b>	<b>m</b>				<b>P(accept)</b>
12		대장균	-2.09	1.16	log CFU/g		5	0	0.6	log CFU/g			0.9497
13		바실러스 세레우스	-2.08	1.18	log CFU/g		5	0	0.7	log CFU/g			0.9496
14													
15													
16													
17							<b>2-Class counts with enrichment</b>						
18			<b>Mean</b>	<b>SD</b>			<b>n</b>	<b>c</b>	<b>m</b>				<b>P(accept)</b>
19		활석포도상구균	-4.20	0.75	log CFU/g		5	0	39	g			0.9502
20		기타 식중독균	-4.99	0.65	log CFU/g		5	0	363	g			0.9501
21													

그림 3-3-42. 주요 농산물별(6종) 오염수준 및 95% 수용에 근거한 Sampling plan 미생물 기준(안)

(3) 주요 농산물별 미생물 기준·규격 설정(안)

- 감자를 제외한 9종의 농산물을 개별품목으로 기준 및 규격을 설정하는 경우에는 많은 복잡성이 있어 근채류(당근, 무), 채소류(고추, 배추, 상추, 오이, 열무)와 과채류(사과, 토마토)로 구분하여 상기 95% 기준 수용도 값과 국외 및 다른 유사 식품군에 대한 기준 등을 바탕으로 잠정적으로 다음과 같이 주요 농산물별 미생물 기준·규격 설정(안)을 제안할 수 있음

표 3-3-30. 주요 농산물별 미생물 기준·규격 설정(안)

분류	농산물	미생물명	Sampling plan 기준(안)	단계
근채류	당근, 무	일반세균	n=5, c=2, m=7, M=9 log CFU/g	농장 및 유통
		곰팡이·효모	n=5, c=2, m=5, M=6 log CFU/g	
		대장균군	n=5, c=2, m=6, M=8 log CFU/g	
		대장균	n=5, c=0, m=1 log CFU/g	
		<i>B. cereus</i>	n=5, c=2, m=3, M=5 log CFU/g	
		<i>S. aureus</i>	n=5, c=0, m=0/10g	
		기타 식중독균	n=5, c=0, m=0/25g	
채소류	고추, 배추, 상추, 오이, 열무	일반세균	n=5, c=2, m=6, M=8 log CFU/g	농장 및 유통
		곰팡이·효모	n=5, c=2, m=5, M=7 log CFU/g	
		대장균군	n=5, c=2, m=5, M=6 log CFU/g	
		대장균	n=5, c=0, m=1 log CFU/g	
		<i>B. cereus</i>	n=5, c=0, m=2 log CFU/g	
		<i>S. aureus</i>	n=5, c=0, m=0/25g	
		기타 식중독균	n=5, c=0, m=0/25g	
과채류	사과, 토마토	일반세균	n=5, c=2, m=5, M=7 log CFU/g	농장 및 유통
		곰팡이·효모	n=5, c=2, m=4, M=5 log CFU/g	
		대장균군	n=5, c=2, m=2, M=4 log CFU/g	
		대장균	n=5, c=0, m=1 log CFU/g	
		<i>B. cereus</i>	n=5, c=0, m=1 log CFU/g	
		<i>S. aureus</i>	n=5, c=0, m=0/25g	
		기타 식중독균	n=5, c=0, m=0/25g	

\* 감자의 경우 조리 후 섭취하는 농산물로 따로 미생물 기준을 제안하지 않음

- 단, 상기의 잠정 제안(안)은 본 연구 결과를 중심으로 제안 된 것으로 주로 생산 및 유통 중의 농산물을 대상으로 제안한 것이며, 기준·규격의 적용을 위한 실제 행정집행에 있어서는 본 연구결과를 바탕으로 세척 후 등의 단계 또는 사회·경제적 여러 요인 및 관련 민원인의 의견 등을 감안하여 수정하여 사용될 수 있음



3-4. 농산물에서 식중독 세균 신속검출법 개발 및 표준화

3-4 연구요약

- 쥐세니젠은 EHEC, *S. aureus*, *C. perfringens*, *S. spp*, *L. monocytogenes*, *B. cereus* 6종의 식중독균에 대하여 표준균주 및 wild type에 모두 적용할 수 있는 유전자 Marker를 발견하였으며, EHEC, *C. perfringens*, *L. monocytogenes* 의 Group1 및 *S. aureus*, *S. spp*, *B. cereus*의 Group2의 각각에 대한 Multiplex Real time PCR kit 개발 및 최적화를 완료하여 제품화 하였음
- Multiplex Real time PCR 최적화 과정을 통해 6시간 증균만으로도 현장에서 신속하게 식중독균 감염여부를 판단할 수 있도록 하였으며, AOAC/ISO validation 방법을 기반으로 현장검증 및 검증실험을 완료하였음

1. 6종 식중독 세균 신속검출 특이 유전자 마커 탐색 및 multiplex real-time PCR Kit 최적 조건 확립

Pathogen (Target gene)	Reference
EHEC (stx2)	논문명 : "Multiplex Fluorogenic Real-Time PCR for Detection and Quantification of <i>Escherichia coli</i> O157:H7 in Dairy Wastewater Wetlands", <i>Appl Environ Microbiol.</i> 2002, 68(10), 4853-62.
	F primer : ATTAACCACACCCACCG
	R primer : GTCATGGAAACCGTTGCAC
	Probe : CAGTTATTTGCTGTGGATATACGAGGGCTTG
	Size : 200bp
EHEC (rfbE)	논문명 : "Presence of <i>Salmonella</i> spp., <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> and <i>Escherichia coli</i> O157:H7 in wild boars", <i>Epidemiology and Infection</i> (2014), 142, 2542-2547.
	F primer : TTTCACTTGGATGGTCTCAA
	R primer : CGATGAGTTTATCTGCAAGGTGAT
	Probe : AGGACCGCAGAGGAAAGAGAGGAATTAAGG
	Size : 88bp
<i>B. cereus</i> (hbl)	논문명 : "Simultaneous Detection of Food Pathogens, <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella</i> Enterica, <i>Bacillus cereus</i> and <i>Vibrio parahaemolyticus</i> by Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction", <i>Journal of Food and Drug Analysis</i> , Vol. 20, No. 1, 2012, Pages 66-73
	F primer : CCAGCCGCTGTTCTAAACC
	R primer : GTGGATTGGGAGCAGCTATTTAG
	Probe : TGCACCAAGAGCCGAGAGTCCACC
	Size : 145bp
<i>S. spp.</i> (ttr)	논문명 : "Diagnostic Real-Time PCR for Detection of <i>Salmonella</i> in Food", <i>APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY</i> , Dec. 2004, p. 7046-7052
	F primer : CTCACAGGAGATTACAACATGG
	R primer : AGCTCAGACCAAAAGTGACCATC
	Probe : CACCGACGGCGAGACCGACTTT
	Size : 95bp

그림 3-4-1. 선행 연구의 균주별 Target gene 및 Primer 등 정보

가. 위해 식중독 세균 6종에 대한 특이 유전자 마커 탐색

- (1) NCBI에 등록된 유전자 정보를 활용하여 6종의 식중독 표준균주와 wild type 균주에 공통적으로 적용 가능한 타겟 유전자 및 마커 탐색
  - (가) 위해 식중독 세균 6종에 대한 특이 유전자 마커 탐색
    - 1) 선행 연구의 Primer 검증

Pathogen (Target gene)	Reference
<i>S.aureus</i> (Sa442)	논문명: "Rapid and simultaneous detection of <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , and <i>Staphylococcus aureus</i> in fresh pork using a multiplex real-time PCR assay based on immunomagnetic separation", Food Control 42 (2014)
	F primer : TTCTTCACGACTAAATAACGCTCA
	R primer : GGTACTACTAAAGATTATCAAGACGGCT
	Probe : CAGAACACAATGTTCCGATGCAACGT
	Size : 160bp
<i>L.monocytogenes</i> (lssrA)	논문명: "Rapid real-time PCR detection of <i>Listeria monocytogenes</i> in enriched food samples based on the <i>ssrA</i> gene, a novel diagnostic target", Food Microbiol. 2008 Feb;25(1):75-84.
	F primer : GCATCGCCCATGTGCTAC
	R primer : TCTACGAGCGTAGTCACCG
	Probe : CCATTAGCTAGTCTGATTAAGCTCT
	Size : 103bp
<i>C.Perfringens</i> (plc)	논문명: "Comparison of chicken gut colonisation by the pathogens <i>Campylobacter jejuni</i> and <i>Clostridium perfringens</i> by real-time quantitative PCR", Mol Cell Probes. 2006 Oct;20(5):269-79. Epub 2006
	F primer : TTCTATCTTGGAGAGGCTATGCACTATTTT
	R primer : TCTACGAGCGTAGTCACCG
	Probe : CCATTAGCTAGTCTGATTAAGCTCT
	Size : 103bp
<i>C.Perfringens</i> (cpa)	논문명: "Comparison of chicken gut colonisation by the pathogens <i>Campylobacter jejuni</i> and <i>Clostridium perfringens</i> by real-time quantitative PCR", Mol Cell Probes. 2006 Oct;20(5):269-79. Epub 2006
	F primer : AAGAACTAGTAGCTTACATATCAACTAGTGGTG
	R primer : TTTCAAACCTAACATGTCCTGCGC
	Probe : TTGAATCAAACAAAGGATGGAAAACTCAAG
	Size : 103bp

그림 3-4-2. 선행 연구의 균주별 Target gene 및 Primer 등 정보

나) Target gene 내에서 Primer 탐색 및 Netprimer의 검증

□ Netprimer 결과 확인 기준은 아래와 같았음

- Tm 값 및 G-C contents 기준이 맞지 않을 경우 primer 길이는 길어질 수 있음
  - ① Rating: 80-100 사이
  - ② Tm값: 55-61℃ 사이
  - ③ primer의 길이: 20-25bp
  - ④ G-C contents: 40-60% 사이

□ Netprimer을 통한 primer 검증 결과

- Netprimer 검증을 통과한 6균주 8 target gene(EHEC의 stx2, rfbE, S. aureus의 Sa442, L. monocytogenes의 lssrA, B. cereus의 hbl, S. spp.의 ttr, C. perfringens의 plc, cpa) 선정하였음

- ① EHEC(stx2): Rating(F: 91.0, R: 90.0), Tm값(F: 55.75℃, R: 55.47℃), primer 길이(F: 19bp, R: 20bp), G-C contents(F: 55.56%, R: 50.0%)
- ② EHEC(rfbE): Rating(F: 90.0, R: 87.0), Tm값(F: 57.94℃, R: 60.44℃), primer 길이(F: 22bp, R: 24bp), G-C contents(F: 40.91%, R: 60.44%)





다) Singleplex PCR을 이용한 검증 결과

- 6균주 8 target gene(EHEC의 stx2, rfbE, S. aureus의 Sa442, L. monocytogenes의 lssrA, B. cereus의 hbl, S. spp.의 ttr, C. perfringens의 plc, cpa)에서 one band가 나타났음

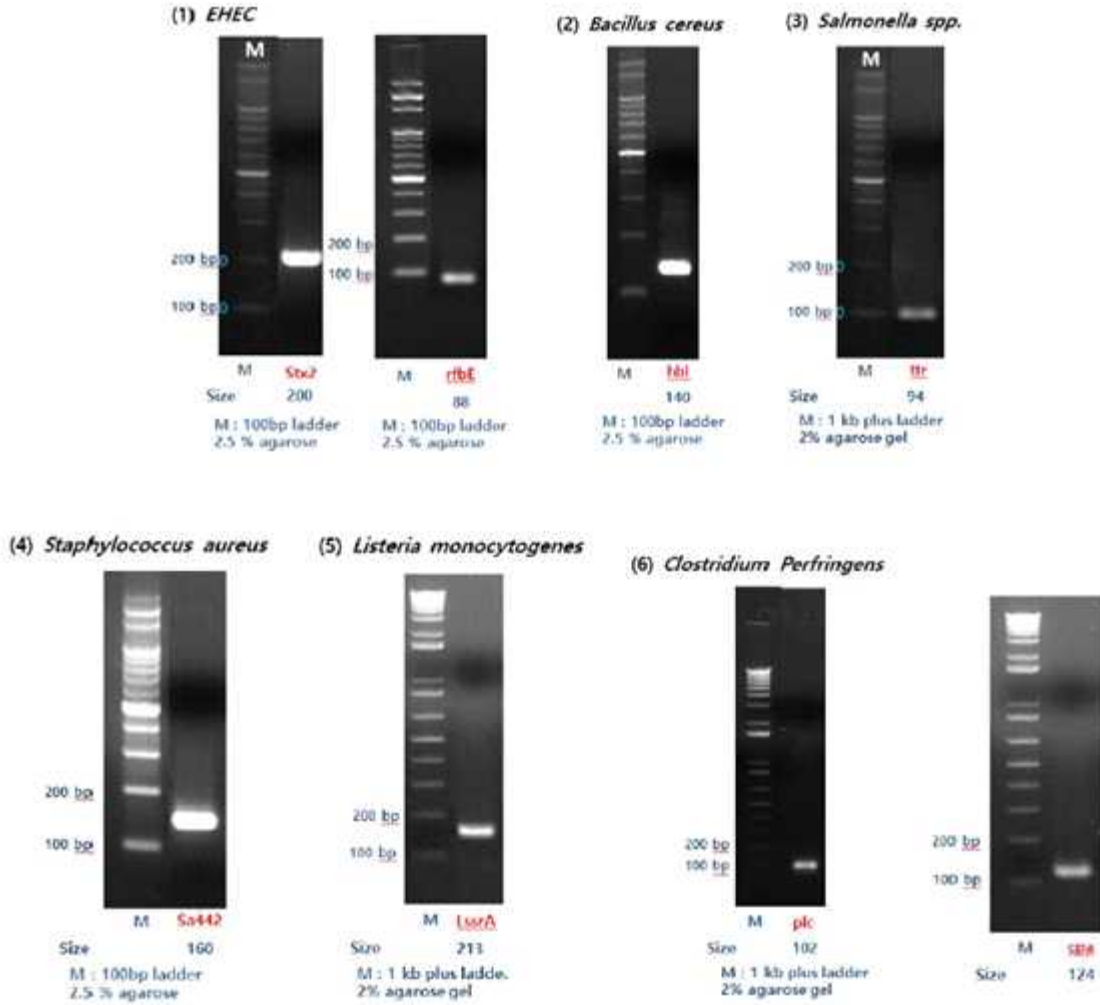


그림 3-4-4. 선행 연구 균주별 singleplex PCR

라) Cross check를 이용한 검증 결과

- 6균주 8 target gene(EHEC의 stx2, rfbE, S. aureus의 Sa442, L. monocytogenes의 lssrA, B. cereus의 hbl, S. spp.의 ttr, C. perfringens의 plc, cpa)에서 one band가 나타났음
- B. cereus hbl와 S. spp. ttr의 negative control에 활성이 나타났으나 band size가 다르므로 (전기영동 상 band가 나타난 위치가 다름) 적합한 primer라고 할 수 있음

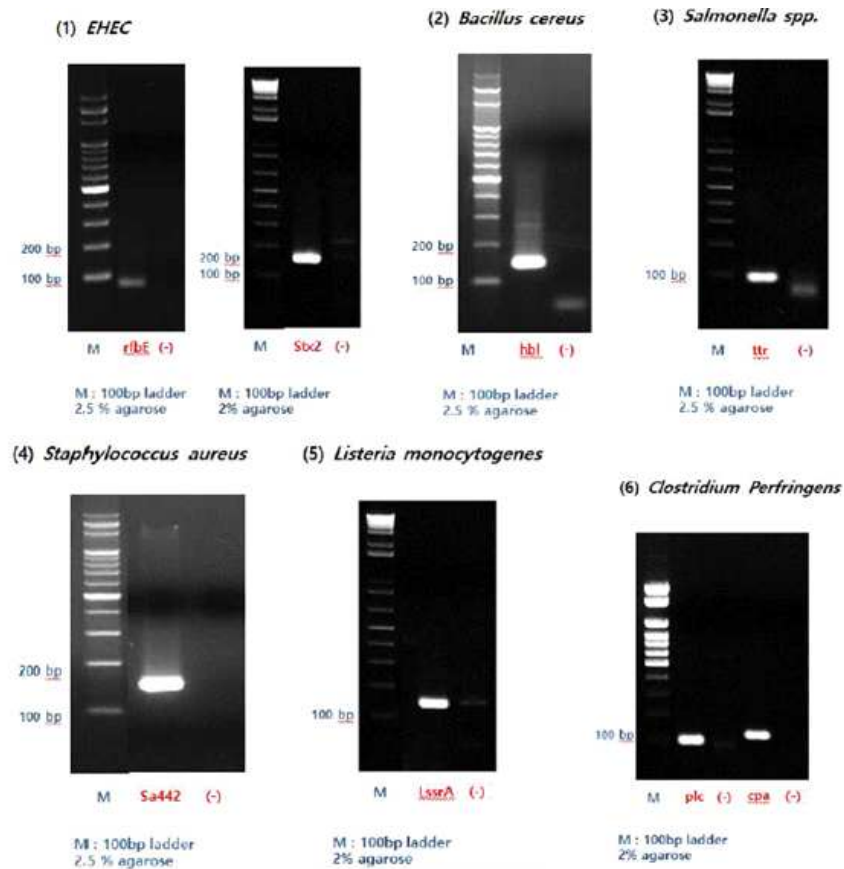


그림 3-4-5. 선행 연구 균주별 Cross check PCR

나. 1시간 이내 multiplex real-time PCR Kit 최적조건 확립

(1) 식중독균 특이적 반응성 multiplex real-time PCR 용 프라이머/프로브 세트 개발 및 선정

(가) 본 과제를 위한 신규 Primer 도출

1) Primer 탐색 및 Netprimer 검증

□ Netprimer 검증을 통과한 6균주 10 target gene(EHEC의 stx2, rfbE, S. aureus의 Sa442, femA, L. monocytogenes의 lssrA, B. cereus의 hbl, S. spp.의 ttr, invA, C. perfringens의 plc, cpa) 선정하였음

□ Netprimer을 통한 primer 검증 결과

- ① EHEC(stx2(1)): Rating(F: 88.0, R: 86.0), Tm값(F: 57.52℃, R: 58.5℃), primer 길이(F: 20bp, R: 21bp), G-C contents(F: 55.0%, R: 52.38%)
- ② EHEC(stx2(2)): Rating(F: 83.0, R: 83.0), Tm값(F: 59.44℃, R: 59.03℃), primer 길이(F: 22bp, R: 21bp), G-C contents(F: 50.0%, R: 42.86%)
- ③ EHEC(rfbE(1)): Rating(F: 100.0, R: 88.0), Tm값(F: 59.42℃, R: 59.32℃), primer 길이(F: 21bp, R: 22bp), G-C contents(F: 47.62%, R: 50.0%)
- ④ EHEC(rfbE(2)): Rating(F: 87.0, R: 88.0), Tm값(F: 58.85℃, R: 60.06℃), primer 길이(F: 23bp, R: 23bp), G-C contents(F: 47.83%, R: 47.83%)

- ⑤ *S. aureus*(Sa442(1)): Rating(F: 90.0, R: 100.0), T<sub>m</sub>값(F: 58.95℃, R: 58.13℃), primer 길이(F: 24bp, R: 23bp), G-C contents(F: 33.33%, R: 43.48%)
- ⑥ *S. aureus*(Sa442(2)): Rating(F: 86.0, R: 92.0), T<sub>m</sub>값(F: 56.25℃, R: 56.28℃), primer 길이(F: 23bp, R: 25bp), G-C contents(F: 34.78%, R: 36.0%)
- ⑦ *S. aureus*(femA(1)): Rating(F: 82.0, R: 88.0), T<sub>m</sub>값(F: 57.81℃, R: 57.31℃), primer 길이(F: 25bp, R: 23bp), G-C contents(F: 36.0%, R: 39.13%)
- ⑧ *S. aureus*(femA(2)): Rating(F: 100.0, R: 87.0), T<sub>m</sub>값(F: 59.66℃, R: 60.4℃), primer 길이(F: 24bp, R: 22bp), G-C contents(F: 45.83%, R: 45.45%)
- ⑨ *L. monocytogenes*(lssrA(1)): Rating(F: 91.0, R: 91.0), T<sub>m</sub>값(F: 58.53℃, R: 59.16℃), primer 길이(F: 21bp, R: 23bp), G-C contents(F: 52.38%, R: 43.48%)
- ⑩ *L. monocytogenes*(lssrA(2)): Rating(F: 76.0, R: 100.0), T<sub>m</sub>값(F: 59.27℃, R: 59.2℃), primer 길이(F: 23bp, R: 20bp), G-C contents(F: 39.13%, R: 45.0%)
- ⑪ *B. cereus*(hbl(1)): Rating(F: 89.0, R: 84.0), T<sub>m</sub>값(F: 58.18℃, R: 58.32℃), primer 길이(F: 23bp, R: 24bp), G-C contents(F: 39.13%, R: 37.50%)
- ⑫ *B. cereus*(hbl(2)): Rating(F: 80.0, R: 90.0), T<sub>m</sub>값(F: 59.82℃, R: 59.33℃), primer 길이(F: 24bp, R: 24bp), G-C contents(F: 41.67%, R: 59.33%)
- ⑬ *S. spp.*(ttr(1)): Rating(F: 81.0, R: 85.0), T<sub>m</sub>값(F: 60.31℃, R: 60.65℃), primer 길이(F: 20bp, R: 20bp), G-C contents(F: 60.0%, R: 55.0%)
- ⑭ *S. spp.*(ttr(2)): Rating(F: 88.0, R: 87.0), T<sub>m</sub>값(F: 59.67℃, R: 60.24℃), primer 길이(F: 22bp, R: 20bp), G-C contents(F: 45.45%, R: 60.0%)
- ⑮ *S. spp.*(invA(1)): Rating(F: 86.0, R: 88.0), T<sub>m</sub>값(F: 59.349℃, R: 59.17℃), primer 길이(F: 20bp, R: 23bp), G-C contents(F: 50.0%, R: 39.13%)
- ⑯ *S. spp.*(invA(2)): Rating(F: 88.0, R: 90.0), T<sub>m</sub>값(F: 59.86℃, R: 60.06℃), primer 길이(F: 20bp, R: 19bp), G-C contents(F: 50.0%, R: 57.89%)
- ⑰ *C. perfringens*(plc(1)): Rating(F: 87.0, R: 100.0), T<sub>m</sub>값(F: 59.81℃, R: 59.1℃), primer 길이(F: 23bp, R: 22bp), G-C contents(F: 43.48%, R: 45.45%)
- ⑱ *C. perfringens*(plc(2)): Rating(F: 100.0, R: 90.0), T<sub>m</sub>값(F: 56.14℃, R: 55.66℃), primer 길이(F: 21bp, R: 24bp), G-C contents(F: 38.1%, R: 33.33%)
- ⑲ *C. perfringens*(cpa(1)): Rating(F: 100.0, R: 80.0), T<sub>m</sub>값(F: 60.26℃, R: 60.54℃), primer 길이(F: 23bp, R: 23bp), G-C contents(F: 43.48%, R: 43.48%)
- ⑳ *C. perfringens*(cpa(2)): Rating(F: 86.0, R: 82.0), T<sub>m</sub>값(F: 60.34℃, R: 59.9℃), primer 길이(F: 21bp, R: 20bp), G-C contents(F: 52.38%, R: 55.0%)

The image displays a series of primer design reports for various genes. Each report includes a table with the following columns: Primer Name, Sequence, Start, End, GC Content, and other parameters. The genes shown are Stx2(1), Stx2(2), rfbE(1), rfbE(2), Sa442(1), Sa442(2), femA(1), and femA(2). The reports are organized into sections for each gene, with sub-sections for different primer sets (e.g., Forward, Reverse, and specific primer pairs).

그림 3-4-6. 본 과제용 균주별 Netprimer

The image displays a series of primer design reports for various genes. Each report includes a table with the following columns: Primer Name, Sequence, Start, End, GC Content, and other parameters. The genes shown are IssrA(1), IssrA(2), hbl(1), hbl(2), ttr(1), ttr(2), invA(1), and invA(2). The reports are organized into sections for each gene, with sub-sections for different primer sets (e.g., Forward, Reverse, and specific primer pairs).

그림 3-4-7. 본 과제용 균주별 Netprimer  
(계속)

2) Singleplex PCR을 이용한 검증 결과

□ 1차 검증

① Singleplex PCR 결과 one band가 확인된 target gene은 *C. perfringens* cpa(1), cpa(2), plc(1), *S. aureus* Sa442(1), *B. cereus* hbl(2), *L. monocytogenes* lssrA(1), lssrA(2), *S. spp.* ttr(1), ttr(2), EHEC rfbE(1), rfbE(2), stx2(1), stx2(2)임

② one band가 확인되지 않은 target gene에 대해서는 Tm값을 재조정 후 Singleplex PCR 재실험을 실시하면 one band가 나타날 것으로 판단되었음

③ Singleplex PCR 결과 one band가 확인된 target gene에 대해서는 cross check를 통해 적합한 primer인지 확인 검증 가능할 것으로 판단됨

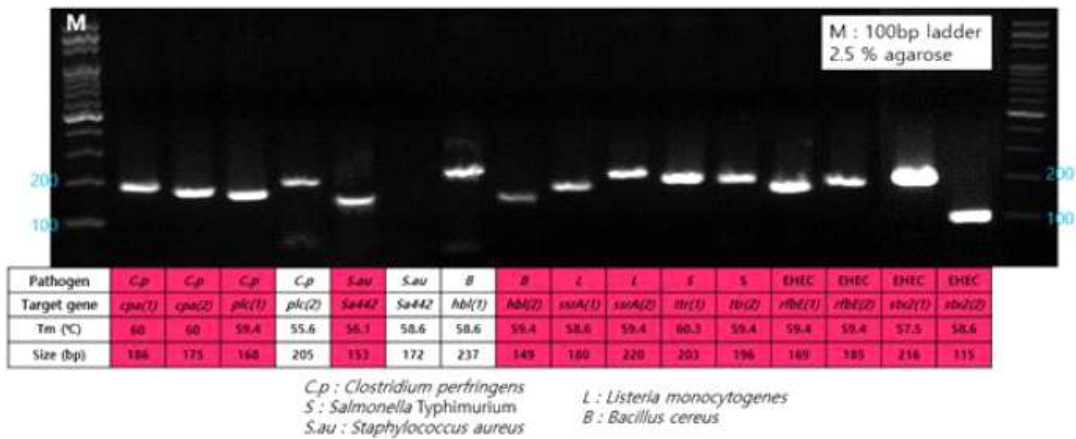


그림 3-4-8. 본 과제용 1차 Singleplex PCR을 이용한 검증

□ 2차 검증

① *S. spp.* invA(2)과 *S. aureus* femA(1)의 band가 흐리게 나타났으나 *S. spp.* invA(1)과 *S. aureus* femA(2)을 포함하여 one band 확인되었기 때문에 cross check 검증 가능함

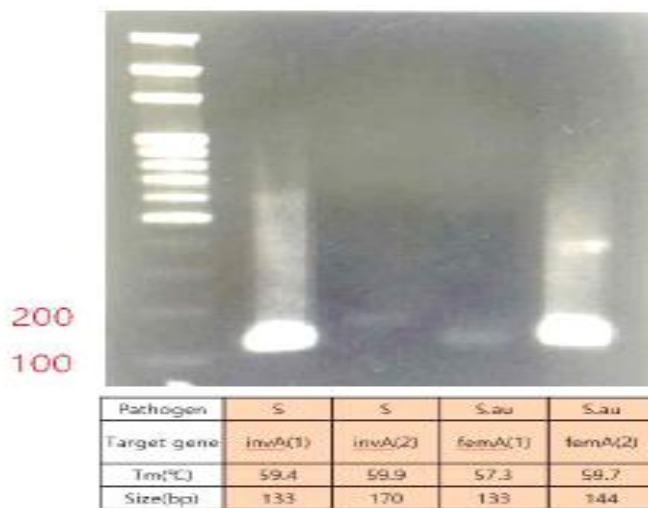


그림 3-4-9. 본 과제용 2차 SingleplexPCR을 이용한 검증



### 3) Cross check를 이용한 검증 결과

#### □ 1차 검증

- ① Cross check 결과 *S. spp.* ttr(1), ttr(2), *C. perfringens* plc(1), *S. aureus* Sa442(1)의 경우 Cross check를 통과하지 못하였음. Negative에서 같은 위치에 one band가 확인 되었고, 이는 합성한 primer가 다른 pathogen의 gene에 반응한다는 의미이므로 특이성이 없다고 간주하였음
- ② Cross check 결과 positive에만 band가 확인된 target gene의 경우(빨간색), Real-Time PCR로 primer 검증 실험 가능한 target gene으로 선정하였음
- ③ Singleplex PCR과 cross check를 통해 검증 실험에서 통과하지 못한 *S. spp.* ttr와 일부 *S. aureus* Sa442의 경우 새로운 primer를 합성 후 재검증 필요하였음

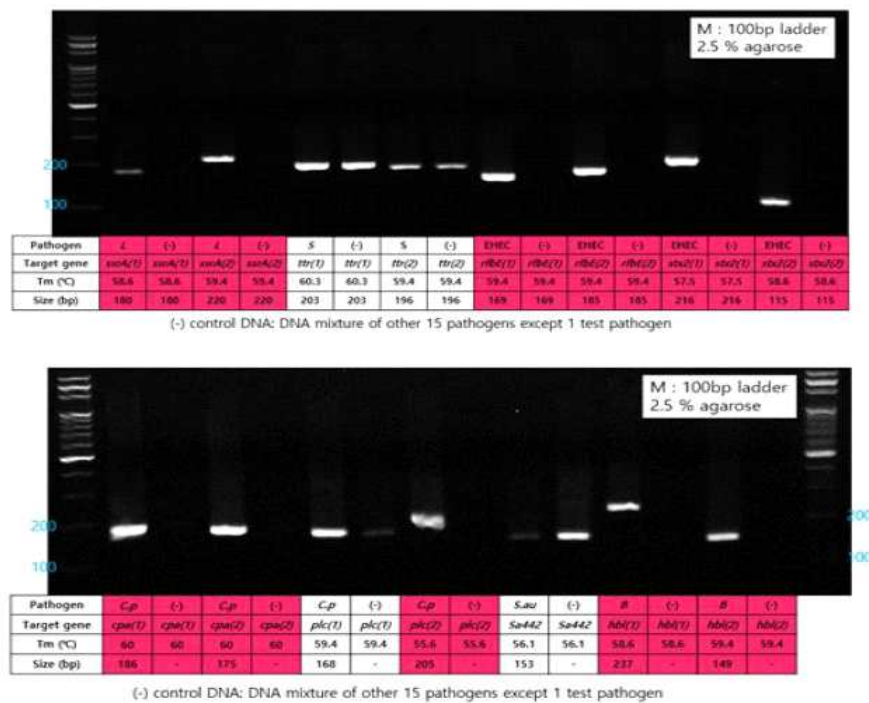


그림 3-4-10. 본 과제용 1차 Cross check PCR을 이용한 검증

#### □ 2차 검증

- ① *S. aureus* femA(2)의 negative에 band가 2개 확인되었으므로 cross check 검증 통과하지 못했음. 합성한 primer가 다른 pathogen의 gene에 반응한다는 의미이므로 특이성이 없다고 간주하였음
- ② *S. spp.* invA(2)의 negative에도 band가 여러 개 확인 되었는데, *S. spp.* 외 pathogen의 gene에 반응한다는 의미이므로 특이성이 없는 primer라고 간주하였음
- ③ *S. aureus* femA(1)과 *S. spp.* invA(1)의 경우 negative에서 band가 확인되지 않았으므로 Real-Time PCR로 검증 실험 가능하였음

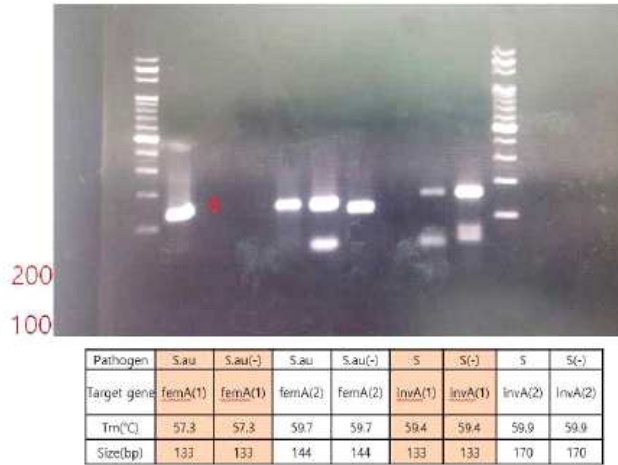


그림 3-4-11. 본 과제용 2차 Crosscheck PCR을 이용한 검증

4) 최종 Conventional PCR 검증 완료된 6군주의 Primer

- 총 Singleplex PCR과 Cross check 총 두 번의 검증을 통해 완료된 6군주의 primer는 아래와 같았음
- Singleplex PCR과 cross check 검증이 완료된 primer는 그에 맞는 probe를 합성한 후 Real-Time PCR을 통해 활성도 확인을 실시하였음

(2) 신규 Primer의 Singleplex Real-Time PCR 활성 결과

(가) Real-Time PCR 활성 결과 데이터

- *L. monocytogenes*(lssrA(2)): positive와 negative 활성이 잘 나타났으며, 16 cycle에서부터 활성이 나타났음. 38 cycle 반응 종결에서 최종적으로 나타난  $\Delta Rn$ 값은 1.3임
- EHEC(Stx2(2)): positive와 negative 활성이 잘 나타났으며, 16 cycle에서부터 활성이 나타났음. 40 cycle 반응 종결에서 최종적으로 나타난  $\Delta Rn$ 값은 5.3임
- *C. perfringens*(cpa(1)): positive와 negative 활성이 잘 나타났으며, 20 cycle에서부터 활성이 나타났음. 34 cycle 반응 종결에서 최종적으로 나타난  $\Delta Rn$ 값은 0.52임
- *C. perfringens*(cpa(2)): positive와 negative 활성이 잘 나타났으며, 20 cycle에서부터 활성이 나타났음. 34 cycle 반응 종결에서 최종적으로 나타난  $\Delta Rn$ 값은 1.35임
- *B. cereus*(hbl(1)): positive와 negative 활성이 잘 나타났으며, 24 cycle에서부터 활성이 나타났음. 34 cycle 반응 종결에서 최종적으로 나타난  $\Delta Rn$ 값은 0.63임
- EHEC(rfbE(1)): positive와 negative 활성이 잘 나타났으며, 18 cycle에서부터 활성이 나타났음. 32 cycle에서  $\Delta Rn$  최대값으로 0.91 확인되었고, 40 cycle 반응 종결 후 최종적으로 나타난  $\Delta Rn$ 값은 0.8임
- EHEC(rfbE(2)): positive와 negative 활성이 잘 나타났으며, 19 cycle에서부터 활성이 나타났음. 38 cycle에서 반응 종결 후 최종적으로 나타난  $\Delta Rn$ 값은 1.25임
- EHEC(stx2(1)): positive와 negative 활성이 잘 나타났으며, 17 cycle에서부터 활성이 나타났음. 40 cycle에서 반응 종결 후 최종적으로 나타난  $\Delta Rn$ 값은 0.65임
- *L. monocytogenes*(lssrA(1)): positive와 negative 활성이 잘 나타났으며, 17 cycle에서부



- 터 활성이 나타났음. 40 cycle에서 반응 종결 후 최종적으로 나타난  $\Delta Rn$ 값은 3.5임
- S. aureus(femA(1)): positive와 negative 활성이 잘 나타났으며, 22 cycle에서부터 활성이 나타났음. 40 cycle에서 반응 종결 후 최종적으로 나타난  $\Delta Rn$ 값은 1.2임
  - S. spp. (invA(1)): positive와 negative 활성이 잘 나타났으며, 22 cycle에서부터 활성이 나타났음. 40 cycle에서 반응 종결 후 최종적으로 나타난  $\Delta Rn$ 값은 1임
  - positive 활성이 제대로 확인되었으며, 비교군과 활성 비교 가능한 데이터임
  - B. cereus hbl(1), S. aureus femA(1), S. spp. invA(1) 외의 target gene 모두 20 cycle 이내 활성이 나타났음
  - 한 시간 이내 target으로 하는 균주가 detection 되었다 할 수 있음  
(Real Time PCR 반응: 40cycle, 약 2시간 이내 이므로 20 cycle이면 약 1시간 이내)
  - negative control에서 활성이 확인되지 않았음

표 3-4-1. 본 과제용 균주별 검증

실험차수	Pathogens	Target gene	Singleplex PCR	Cross check
1 차	<i>L. monocytogenes</i>	lssrA(1)	○	○
		lssrA(2)	○	○
	S. spp.	ttr(1)	○	X
		ttr(2)	○	X
	EHEC	rfbE(1)	○	○
		rfbE(2)	○	○
		stx2(1)	○	○
		stx2(2)	○	○
	<i>C. perfringens</i>	cpa(1)	○	○
		cpa(2)	○	○
		plc(1)	○	X
		plc(2)	○	○
	<i>S. aureus</i>	Sa442(1)	X	X
		Sa442(2)	○	X
<i>B. cereus</i>	hbl(1)	○	○	
	hbl(1)	○	○	
2 차	S. spp.	invA(1)	○	○
		invA(2)	○	X
	<i>S. aureus</i>	femA(1)	○	○
		femA(2)	○	X

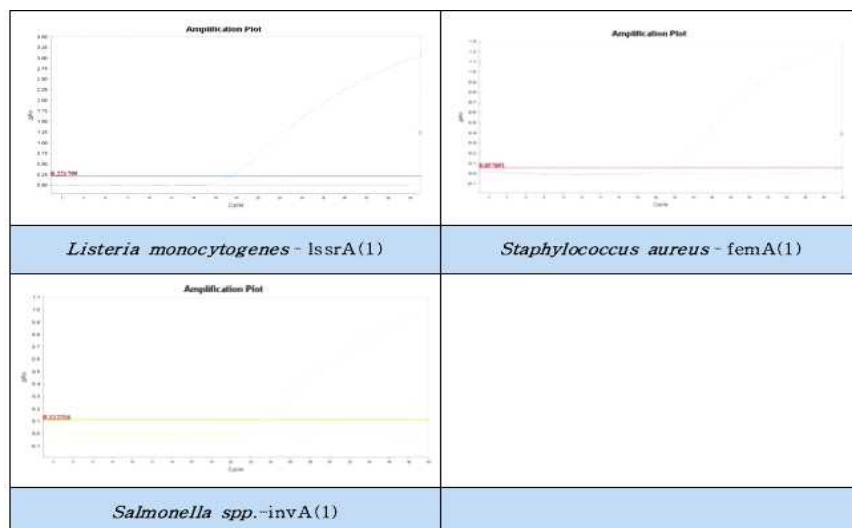


그림 3-4-12. 본 과제용 균주별 Real-Time PCR 활성

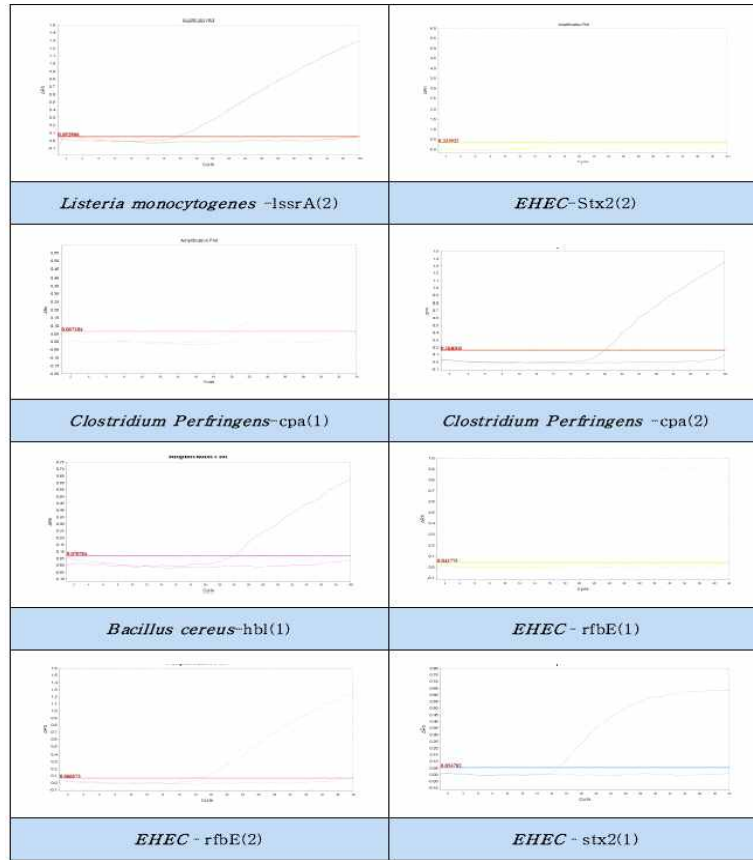


그림 3-4-13. 본 과제용 균주별 Real-Time PCR  
활성

(나) 타 primer와 활성 비교

□ Target gene 비교

- ① 비교균 1은 “2014년 식중독 원인조사 검사지침(식약처)” 보고서 내 6균주 자료이고, 비교균 2는 논문 조사를 통해 도출한 자료임
- ② 각각의 비교균에서 primer를 도출하여 테스트한 결과 최종적으로 결정된 Target gene은 EHEC stx2와 rfbE, S. aureus femA, S. spp. invA, L. monocytogenes lssrA, B. cereus hbl, C. perfringens cpa으로 총 6균주 7 Target gene으로 확인하였음

표 3-4-2. Target gene 비교

비교균 1		비교균 2		본 과제용 신규 Primer	
균주	target gene	균주	target gene	균주	target gene
<i>S. aureus</i>	femA	<i>S. aureus</i>	Sa442	<i>S. aureus</i>	femA
<i>L. monocytogenes</i>	iap	<i>L. monocytogenes</i>	lssrA	<i>L. monocytogenes</i>	lssrA
<i>B. cereus</i>	16s rRNA	<i>B. cereus</i>	hbl	<i>B. cereus</i>	hbl
<i>S. spp.</i>	ttr	<i>S. spp.</i>	ttr	<i>S. spp.</i>	invA
<i>C. perfringens</i>	cpa	<i>C. perfringens</i>	cpa	<i>C. perfringens</i>	cpa
EHEC	X	EHEC	rfbE	EHEC	stx2 rfbE

표 3-4-3. 본 과제용 균주별 Primer 정보

균주		Primer sequence
<i>EHEC stx2(1)</i>	F-Primer R-Primer	TACCACTCTGCAACGTGTCG GCAGTTTCAGACAGTGCCTGA
<i>EHEC stx2(2)</i>	F-Primer R-Primer	GGACTGTGGCCGTTATACTGAA ATTTTATAACGGGCCTGTCG
<i>EHEC rfbE(1)</i>	F-Primer R-Primer	GGTGAATGGTTGTCACGAAT CATCAGCTTGTCTAACTGGGC
<i>EHEC rfbE(2)</i>	F-Primer R-Primer	AATATCTGCGCTGCTATAGGATTAG CTTTCCTCTGCGGTCCTAGTTAG
<i>Lmo lssrA(1)</i>	F-Primer R-Primer	GGGATCGTCTCTCGTTATCAAC TCTATTTAACCCAGACGGAGAT
<i>Lmo lssrA(2)</i>	F-Primer R-Primer	GTCAAAGCCAATAATAACTGGCA GCATTTTCGCATAAACATCGG
<i>C.P cpa(1)</i>	F-Primer R-Primer	TAATGTTACTGCCGTTGATAGCG CCTGTTTTAGCAAAACCTCTTGC
<i>C.P cpa(2)</i>	F-Primer R-Primer	CCTGACACAGGGGAATCACAA CATGTCCTGCGCTATCAACG
<i>C.P plc(2)</i>	F-Primer R-Primer	AAACTCAAGAATGGGAAATGG TCTACTACAACTTTTCCATTGCT

□ 균주별 활성 비교 결과

- ① 비교균과 본 과제 신규 primer 비교는 가장 활성이 좋은 target gene의 primer만 이용하여 활성을 비교하였음
- ② 비교균 1, 2와 본 과제용 primer를 비교한 결과 EHEC는 본 과제용 제품의 활성이 비교균 2보다 높게 나타났고, C. perfringens는 본 과제용>비교균 2>비교균 1 순으로 활성이 좋게 나타났음
- ③ B. cereus는 비교균 1>비교균 2 > 본 과제용 제품 순으로 활성이 높았고, L. monocytogenes는 비교균 2>비교균1>본 과제용 제품의 순으로 cycle 수에 차이가 나타났으나, 거의 유사한 활성을 보였음
- ④ S. spp.는 비교균1, 2>본 과제용 제품 순으로 활성이 나타났고, S. aureus는 비교균2>본 과제용 제품>비교균 1 순으로 활성이 나타났음
- ⑤ Real-Time PCR에서 본 과제용 제품이 비교균 2, 비교균 1보다 활성이 높은 것은 EHEC와 C. perfringens 이며, 나머지 4개 중 2개(L. monocytogenes, S. aureus)는 활성에는 차이가 있으나 검출되는 cycle은 유사하였음
- ⑥ 활성이 다소 낮은 S. spp.와 B. cereus 의 경우 추가 연구를 통해 새로운 Primer의 도출이 필요할 것으로 보임

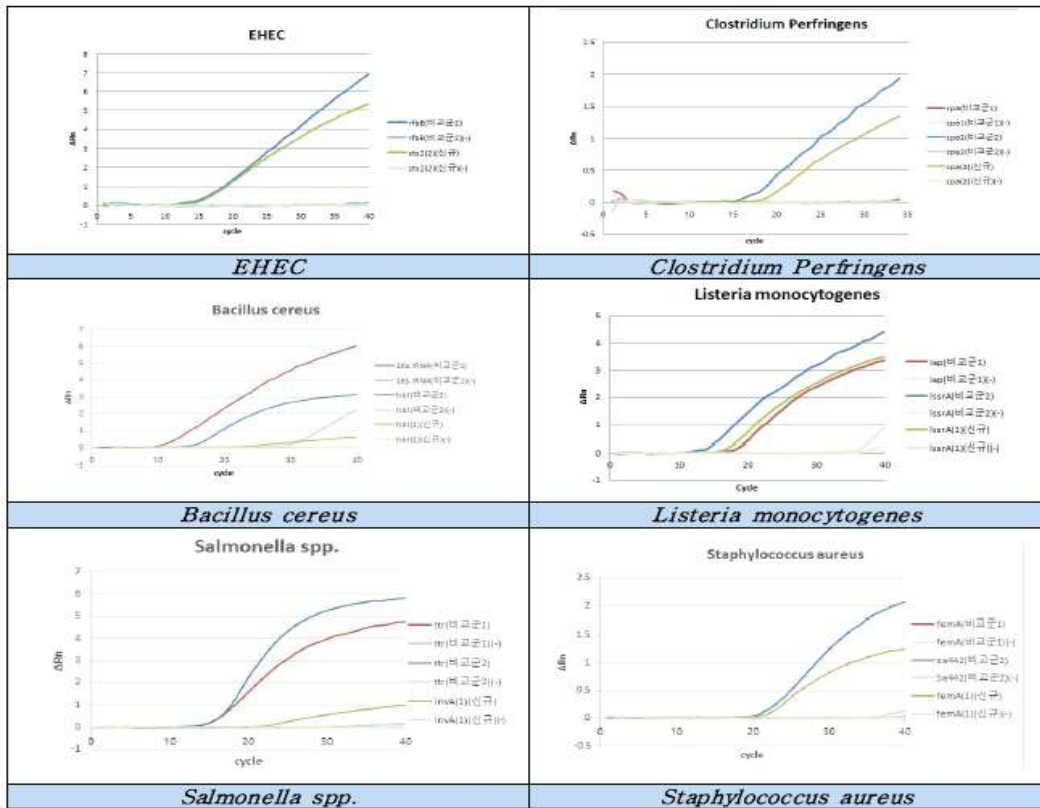


그림 3-4-14. 균주별 비교균1, 비교균2, 본 과제용 Primer의 Real-Time PCR 활성 비교

(2) 식중독균 진단용 프라이머의 특이성 검정 및 multiplex real-time PCR kit의 최적조건 확립

- 아래의 그림 3-4-15에서 빨간색으로 표시된 것은 band가 확인된 target gene을 나타내고, 흰색으로 표시된 것은 band가 확인되지 않은 target gene임

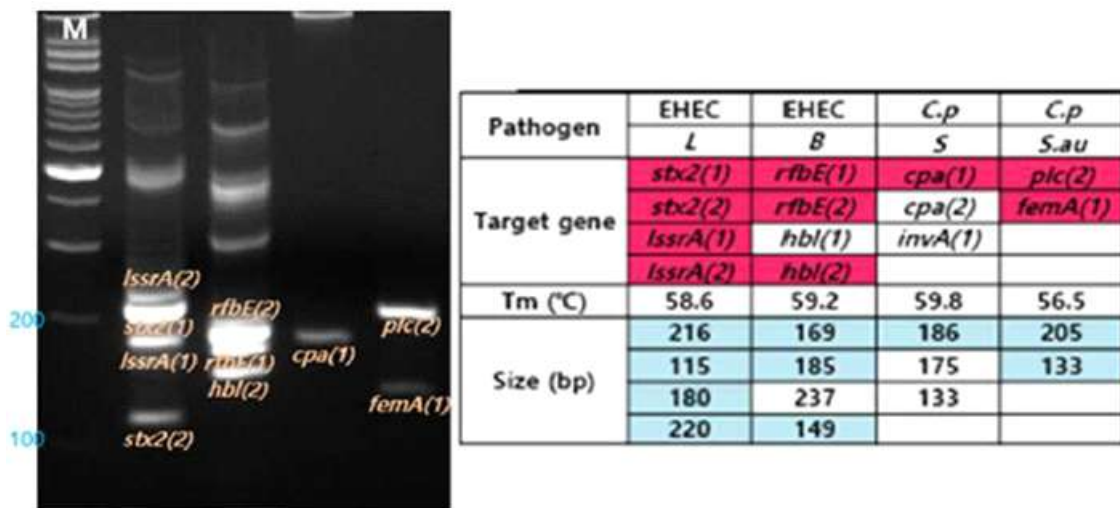


그림 3-4-15. 균주별 신규 primer의 multiplex PCR 검증

- 각 균주별 size가 다르고, Tm값도 유사하여 각 균주별로 band가 나타날 것으로 보였지만, 일부 균주에서 band가 나타나지 않은 것은 primer 간의 간섭이 일어나 전기영동 상에서 확인되지 않는 것으로 판단됨
- Tm값의 영향일 수도 있으므로 Tm값을 재조정하여 추가적인 실험이 필요함
- Tm값 조정 후에도 각 target gene에 대한 band가 나타나지 않을 경우, 다른 균주끼리 grouping 필요함
- Multiplex real time PCR 개발을 위한 최적 조건 확립은 2차년도에 이어 진행할 예정

## 2. 위해 식중독 세균 6종 신속검출 전처리 방법 개선 및 multiplex real-time PCR kit 개발

### 가. 식중독 세균 신속검출을 위한 증균배지 개발기술 활용 전처리 방법 개선안 도출

(1) 6시간 이내 증균할 수 있는 증균배지 개발기술 조사 및 적용평가

(가) 위해 식중독 세균 6종 신속검출 전처리 방법 개선

- 탈리 용매 및 탈리 시간에 따른 회수율 확인 결과
  - 10<sup>6</sup> CFU/mL 농도의 식중독 세균이 접종된 상추를 stomacher백에 넣고 0.1% Buffered peptone water, Phosphate buffered saline(pH 7.4), Sterile distilled water 90 ml(10배 희석)를 가함
  - 단순히 탈리만 한 용액과 stomacher로 10, 30, 60, 120초간 균질화 시킨 각각의 용액 1 ml를 취하여 9 ml의 Sterile distilled water로 희석 후 각 희석농도에 대하여 100 µl씩 각각의 선택배지에 접종한 후 37°C에서 24-48시간 배양한 후 집락을 계수함
  - 실험 결과 각 탈리 용매 및 탈리시간에 따른 큰 결과 차이는 없었으나 phosphate buffered saline을 이용하여 60초간 탈리를 진행하였을 때 식중독 세균 6종 모두 전반적으로 회수율이 고르게 높음을 확인할 수 있었음

#### ① *B. cereus*

표 3-4-4. *B. cereus* 탈리 용매 및 탈리 시간에 따른 회수율

		탈리 용액 및 탈리시간								
		0.1% Buffered peptone water			Phosphate buffered saline			Sterile distilled water		
		10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>
단순 탈리	Colony	298	35	4	287	29	2	290	31	4
	cfu/g	298000	350000	400000	287000	290000	200000	290000	310000	400000
	log cfu/g	5.47	5.54	5.60	5.46	5.46	5.30	5.46	5.49	5.60
	M	5.54			5.41			5.52		
	SD	0.05			0.08			0.06		
	회수율 (%)	92.34			90.12			91.98		
10초	Colony	278	40	2	255	35	7	301	36	9
	cfu/g	278000	400000	200000	255000	350000	700000	301000	360000	900000
	log cfu/g	5.44	5.60	5.30	5.41	5.54	5.85	5.48	5.56	5.95
	M	5.45			5.60			5.66		

탈리 용액 및 탈리시간										
		0.1% Buffered peptone water			Phosphate buffered saline			Sterile distilled water		
		10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>
	SD	0.12			0.18			0.21		
	회수율 (%)	90.82			93.31			94.38		
30초	Colony	330	41	6	346	35	4	277	36	5
	cfu/g	330000	410000	600000	346000	350000	400000	277000	360000	500000
	log cfu/g	5.52	5.61	5.78	5.54	5.54	5.60	5.44	5.56	5.70
	M	5.64			5.56			5.57		
	SD	0.11			0.03			0.10		
	회수율 (%)	93.94			92.70			92.77		
60초	Colony	299	44	9	288	24	10	311	28	8
	cfu/g	299000	440000	900000	288000	240000	1000000	311000	280000	800000
	log cfu/g	5.48	5.64	5.95	5.46	5.38	6.00	5.49	5.45	5.90
	M	5.69			5.61			5.61		
	SD	0.20			0.28			0.21		
	회수율 (%)	94.85			93.55			93.57		
120초	Colony	288	20	7	345	44	10	269	29	5
	cfu/g	288000	200000	700000	345000	440000	1000000	269000	290000	500000
	log cfu/g	5.46	5.30	5.85	5.54	5.64	6.00	5.43	5.46	5.70
	M	5.54			5.73			5.53		
	SD	0.23			0.20			0.12		
	회수율 (%)	92.25			95.45			92.17		

② *L. monocytogenes*

표 3-4-5. *L. monocytogenes* 탈리 용액 및 탈리 시간에 따른 회수율

탈리 용액 및 탈리시간										
		0.1% Buffered peptone water			Phosphate buffered saline			Sterile distilled water		
		10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>
단순탈리	Colony	302	43	2	301	25	3	389	23	2
	cfu/g	302000	430000	200000	301000	250000	300000	389000	230000	200000
	log cfu/g	5.48	5.63	5.30	5.48	5.40	5.48	5.59	5.36	5.30
	M	5.47			5.45			5.42		
	SD	0.14			0.04			0.12		
	회수율 (%)	91.19			90.85			90.29		
10초	Colony	299	45	3	279	39	8	287	23	2
	cfu/g	299000	450000	300000	279000	390000	800000	287000	230000	200000
	log cfu/g	5.48	5.65	5.48	5.45	5.59	5.90	5.46	5.36	5.30
	M	5.54			5.65			5.37		
	SD	0.08			0.19			0.06		
	회수율 (%)	92.26			94.11			89.56		
30초	Colony	299	36	7	321	43	3	288	32	3
	cfu/g	299000	360000	700000	321000	430000	300000	288000	320000	300000
	log cfu/g	5.48	5.56	5.85	5.51	5.63	5.48	5.46	5.51	5.48
	M	5.63			5.54			5.48		
	SD	0.16			0.07			0.02		
	회수율 (%)	93.76			92.32			91.34		
60초	Colony	300	34	7	302	32	3	288	28	3

탈리 용액 및 탈리시간										
		0.1% Buffered peptone water			Phosphate buffered saline			Sterile distilled water		
		10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>
	cfu/g	300000	340000	700000	302000	320000	300000	288000	280000	300000
	log cfu/g	5.48	5.53	5.85	5.48	5.51	5.48	5.46	5.45	5.48
	M	5.62			5.49			5.46		
	SD	0.16			0.01			0.01		
	회수율 (%)	93.63			91.46			91.02		
120 초	Colony	303	33	8	299	34	8	289	30	5
	cfu/g	303000	330000	800000	299000	340000	800000	289000	300000	500000
	log cfu/g	5.48	5.52	5.90	5.48	5.53	5.90	5.46	5.48	5.70
	M	5.63			5.64			5.55		
	SD	0.19			0.19			0.11		
회수율 (%)	93.91			93.95			92.43			

③ *S. aureus*

표 3-4-6. *S. aureus* 탈리 용액 및 탈리 시간에 따른 회수율

탈리 용액 및 탈리시간										
		0.1% Buffered peptone water			Phosphate buffered saline			Sterile distilled water		
		10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>
단순 탈리	Colony	322	39	5	299	34	5	299	30	1
	cfu/g	322000	390000	500000	299000	340000	500000	299000	300000	100000
	log cfu/g	5.51	5.59	5.70	5.48	5.53	5.70	5.48	5.48	5.00
	M	5.60			5.57			5.32		
	SD	0.08			0.09			0.22		
회수율 (%)	93.32			92.81			88.63			
10초	Colony	302	40	8	288	28	6	299	14	2
	cfu/g	302000	400000	800000	288000	280000	600000	299000	140000	200000
	log cfu/g	5.48	5.60	5.90	5.46	5.45	5.78	5.48	5.15	5.30
	M	5.66			5.56			5.31		
	SD	0.18			0.15			0.13		
회수율 (%)	94.36			92.69			88.46			
30초	Colony	300	40	8	331	35	6	299	29	3
	cfu/g	300000	400000	800000	331000	350000	600000	299000	290000	300000
	log cfu/g	5.48	5.60	5.90	5.52	5.54	5.78	5.48	5.46	5.48
	M	5.66			5.61			5.47		
	SD	0.18			0.12			0.01		
회수율 (%)	94.35			93.57			91.20			
60초	Colony	299	24	9	288	24	5	287	30	2
	cfu/g	299000	240000	900000	288000	240000	500000	287000	300000	200000
	log cfu/g	5.48	5.38	5.95	5.46	5.38	5.70	5.46	5.48	5.30
	M	5.60			5.51			5.41		
	SD	0.25			0.14			0.08		
회수율 (%)	93.39			91.88			90.20			
120 초	Colony	310	34	6	301	41	4	299	34	2
	cfu/g	310000	340000	600000	301000	410000	400000	299000	340000	200000
	log cfu/g	5.49	5.53	5.78	5.48	5.61	5.60	5.48	5.53	5.30
	M	5.60			5.56			5.44		

탈리 용액 및 탈리시간										
		0.1% Buffered peptone water			Phosphate buffered saline			Sterile distilled water		
		10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>
	SD	0.13			0.06			0.10		
	회수율 (%)	93.34			92.74			90.60		

④ *S. spp.*

표 3-4-7. *S. spp.* 탈리 용매 및 탈리 시간에 따른 회수율

탈리 용액 및 탈리시간										
		0.1% Buffered peptone water			Phosphate buffered saline			Sterile distilled water		
		10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>
단순 탈리	Colony	301	42	3	300	33	6	288	29	4
	cfu/g	301000	420000	300000	300000	330000	600000	288000	290000	400000
	log cfu/g	5.48	5.62	5.48	5.48	5.52	5.78	5.46	5.46	5.60
	M	5.53			5.59			5.51		
	SD	0.07			0.13			0.07		
	회수율 (%)	92.11			93.19			91.80		
10초	Colony	299	38	6	299	34	7	300	30	4
	cfu/g	299000	380000	600000	299000	340000	700000	300000	300000	400000
	log cfu/g	5.48	5.58	5.78	5.48	5.53	5.85	5.48	5.48	5.60
	M	5.61			5.62			5.52		
	SD	0.13			0.16			0.06		
	회수율 (%)	93.52			93.62			91.98		
30초	Colony	302	33	5	300	22	2	288	30	1
	cfu/g	302000	330000	500000	300000	220000	200000	288000	300000	100000
	log cfu/g	5.48	5.52	5.70	5.48	5.34	5.30	5.46	5.48	5.00
	M	5.57			5.37			5.31		
	SD	0.10			0.08			0.22		
	회수율 (%)	92.76			89.56			88.54		
60초	Colony	288	34	10	301	36	3	300	28	4
	cfu/g	288000	340000	1000000	301000	360000	300000	300000	280000	400000
	log cfu/g	5.46	5.53	6.00	5.48	5.56	5.48	5.48	5.45	5.60
	M	5.66			5.50			5.51		
	SD	0.24			0.04			0.07		
	회수율 (%)	94.39			91.73			91.81		
120초	Colony	300	40	2	298	38	5	288	29	3
	cfu/g	300000	400000	200000	298000	380000	500000	288000	290000	300000
	log cfu/g	5.48	5.60	5.30	5.47	5.58	5.70	5.46	5.46	5.48
	M	5.46			5.58			5.47		
	SD	0.12			0.09			0.01		
	회수율 (%)	91.00			93.07			91.11		

⑤ EHEC

표 3-4-8. EHEC 탈리 용매 및 탈리 시간에 따른 회수율

탈리 용액 및 탈리시간				
		0.1% Buffered peptone water	Phosphate buffered saline	Sterile distilled water



		10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>
단순 탈리	Colony	298	35	4	287	29	2	290	31	4
	cfu/g	298000	350000	400000	287000	290000	200000	290000	310000	400000
	log cfu/g	5.47	5.54	5.60	5.46	5.46	5.30	5.46	5.49	5.60
	M	5.54			5.41			5.52		
	SD	0.05			0.08			0.06		
	회수율(%)	92.34			90.12			91.98		
10초	Colony	299	45	3	279	39	8	287	23	2
	cfu/g	299000	450000	300000	279000	390000	800000	287000	230000	200000
	log cfu/g	5.48	5.65	5.48	5.45	5.59	5.90	5.46	5.36	5.30
	M	5.54			5.65			5.37		
	SD	0.08			0.19			0.06		
	회수율(%)	92.26			94.11			89.56		
30초	Colony	300	40	8	331	35	6	299	29	3
	cfu/g	300000	400000	800000	331000	350000	600000	299000	290000	300000
	log cfu/g	5.48	5.60	5.90	5.52	5.54	5.78	5.48	5.46	5.48
	M	5.66			5.61			5.47		
	SD	0.18			0.12			0.01		
	회수율(%)	94.35			93.57			91.20		
60초	Colony	288	23	9	299	33	7	280	37	5
	cfu/g	288000	230000	900000	299000	330000	700000	280000	370000	500000
	log cfu/g	5.46	5.36	5.95	5.48	5.52	5.85	5.45	5.57	5.70
	M	5.59			5.61			5.57		
	SD	0.26			0.16			0.10		
	회수율(%)	93.20			93.55			92.86		
120초	Colony	288	34	10	301	36	3	300	28	4
	cfu/g	288000	340000	1000000	301000	360000	300000	300000	280000	400000
	log cfu/g	5.46	5.53	6.00	5.48	5.56	5.48	5.48	5.45	5.60
	M	5.66			5.50			5.51		
	SD	0.24			0.04			0.07		
	회수율(%)	94.39			91.73			91.81		

⑥ *C. perfringens*

표 3-4-9. *C. perfringens* 탈리 용매 및 탈리 시간에 따른 회수율

		탈리 용액 및 탈리시간								
		0.1% Buffered peptone water			Phosphate buffered saline			Sterile distilled water		
		10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>
단순 탈리	Colony	299	45	3	279	39	8	287	23	2
	cfu/g	299000	450000	300000	279000	390000	800000	287000	230000	200000
	log cfu/g	5.48	5.65	5.48	5.45	5.59	5.90	5.46	5.36	5.30
	M	5.54			5.65			5.37		
	SD	0.08			0.19			0.06		
	회수율(%)	92.26			94.11			89.56		
10초	Colony	298	35	4	287	29	2	290	31	4
	cfu/g	298000	350000	400000	287000	290000	200000	290000	310000	400000
	log cfu/g	5.47	5.54	5.60	5.46	5.46	5.30	5.46	5.49	5.60
	M	5.54			5.41			5.52		
	SD	0.05			0.08			0.06		
	회수율(%)	92.34			90.12			91.98		
30초	Colony	299	24	9	288	24	5	287	30	2
	cfu/g	299000	240000	900000	288000	240000	500000	287000	300000	200000
	log cfu/g	5.48	5.38	5.95	5.46	5.38	5.70	5.46	5.48	5.30

	M	5.60			5.51			5.41		
	SD	0.25			0.14			0.08		
	회수율(%)	93.39			91.88			90.20		
60초	Colony	288	20	7	345	44	10	269	29	5
	cfu/g	288000	200000	700000	345000	440000	1000000	269000	290000	500000
	log cfu/g	5.46	5.30	5.85	5.54	5.64	6.00	5.43	5.46	5.70
	M	5.54			5.73			5.53		
	SD	0.23			0.20			0.12		
	회수율(%)	92.25			95.45			92.17		
120초	Colony	300	34	7	302	32	3	288	28	3
	cfu/g	300000	340000	700000	302000	320000	300000	288000	280000	300000
	log cfu/g	5.48	5.53	5.85	5.48	5.51	5.48	5.46	5.45	5.48
	M	5.62			5.49			5.46		
	SD	0.16			0.01			0.01		
	회수율(%)	93.63			91.46			91.02		

(나) 농축 방법 개선

□ 농축 방법 개선을 위한 실험 방법별 확인 결과

- Membrane filtration과 Membrane filtration 및 syringe filter를 결합한 two-step filtration 그리고 two-step filtration에 원심분리를 결합한 총 3가지 농축 방법에 대한 회수율을 확인하기 위한 실험을 진행하였음
- 실험 결과, 모든 균주에서 two-step filtration에 원심분리를 적용한 방법이 회수율이 가장 높음을 확인할 수 있었음

표 3-4-10. 농축 방법에 따른 회수율

균주명		Membrane filtration			two-step filtration			two-step filtration +centrifugation		
		10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>
<i>B. cereus</i>	Colony	267	29	2	288	24	10	330	41	6
	cfu/g	267000	290000	200000	288000	240000	100000	330000	410000	600000
	log cfu/g	5.43	5.46	5.30	5.46	5.38	6.00	5.52	5.61	5.78
	M	5.40			5.61			5.64		
	SD	0.07			0.28			0.11		
	회수율(%)	89.94			93.55			93.94		
<i>L. monocytogenes</i>	Colony	233	23	2	303	33	8	279	39	8
	cfu/g	233000	230000	200000	303000	330000	800000	279000	390000	800000
	log cfu/g	5.37	5.36	5.30	5.48	5.52	5.90	5.45	5.59	5.90
	M	5.34			5.63			5.65		
	SD	0.03			0.19			0.19		
	회수율(%)	89.06			93.91			94.11		
<i>S. aureus</i>	Colony	244	20	2	322	39	5	300	40	8
	cfu/g	244000	200000	200000	322000	390000	500000	300000	400000	800000
	log cfu/g	5.39	5.30	5.30	5.51	5.59	5.70	5.48	5.60	5.90
	M	5.33			5.60			5.66		
	SD	0.04			0.08			0.18		
	회수율(%)	88.83			93.32			94.35		
<i>S. spp.</i>	Colony	267	23	2	301	42	3	288	34	10
	cfu/g	267000	230000	200000	301000	420000	300000	288000	340000	100000
	log cfu/g	5.43	5.36	5.30	5.48	5.62	5.48	5.46	5.53	6.00

균주명		Membrane filtration			two-step filtration			two-step filtration +centrifugation		
		10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>
	M	5.36			5.53			5.66		
	SD	0.05			0.07			0.24		
	회수율(%)	89.38			92.11			94.39		
EHEC	Colony	202	25	3	331	35	6	288	34	10
	cfu/g	202000	250000	300000	331000	350000	600000	288000	340000	1000000
	log cfu/g	5.31	5.40	5.48	5.52	5.54	5.78	5.46	5.53	6.00
	M	5.39			5.61			5.66		
	SD	0.07			0.12			0.24		
	회수율(%)	89.89			93.57			94.39		
<i>C. perfringens</i>	Colony	234	28	3	288	20	7	279	39	8
	cfu/g	234000	280000	300000	288000	200000	700000	279000	390000	800000
	log cfu/g	5.37	5.45	5.48	5.46	5.30	5.85	5.45	5.59	5.90
	M	5.43			5.54			5.65		
	SD	0.05			0.23			0.19		
	회수율(%)	90.52			92.25			94.11		

(다) 증균 배지 개선

□ 실험 조건에 따라 배양된 표준균주액을 0.1% BPW(Buffered Peptone Water)로 단계 희석하여, 대조군(기존 선택배지)과 실험군(기존 선택배지+생육촉진인자(첨가성분))에 초기 접종 농도가 10<sup>2</sup> CFU/mL 수준이 되도록 9ml의 선택배지에 각 균주 1 ml를 접종한 후, 온도별 (25℃, 30℃, 35℃), 증균시간별(4hr, 6hr)로 증균한 후 균수를 측정된 결과는 아래와 같음

① *B. cereus*

○ 각 생육인자 조건별 증균 배지에 *B. cereus* 초기 균수 1.98 log cfu/mL로 접종하여 생육도를 측정된 결과, 35℃에서 6시간 배양된 *B. cereus*의 생육도가 5.78 log cfu/mL로 현저하게 증가하는 것을 확인할 수 있었음

표 3-4-11. 생육인자조건별, 증균온도별 및 증균시간별 *B. cereus* 생육도

(단위 : log cfu/ml)

실험 조건	25℃		30℃		35℃	
	4hr	6hr	4hr	6hr	4hr	6hr
BHI	2.15	2.45	2.43	2.68	2.65	2.89
1	3.42	4.96	3.68	5.16	3.68	5.30
2	3.45	4.97	3.49	5.26	3.67	5.26
3	3.57	5.00	3.56	5.30	3.62	5.27
4	3.60	5.05	3.59	5.31	3.60	5.28
5	3.90	5.26	3.97	5.35	3.96	5.37
6	<b>4.25</b>	<b>5.72</b>	<b>4.26</b>	<b>5.77</b>	<b>4.28</b>	<b>5.78</b>
7	4.20	5.41	4.24	5.47	4.24	5.47
8	4.17	5.37	4.19	5.48	4.23	5.47

○ *B. cereus* 증균배지의 최적 증균배지의 조성비율은 기존 증균배지 BHI에 magnesium s

ulfate 0.4 g/L, sodium pyruvate 10 g/L, yeast extract 1.5 g/L을 첨가한 배지가 탁월할 것으로 판단됨

표 3-4-12. 기존 증균배지에 첨가될 생육인자 조건 (단위 : g/L)

	Magnesium sulfate	yeast extract	sodium pyruvate
1	0.2	1.5	8
2	0.2	1.5	10
3	0.2	2.5	8
4	0.2	2.5	10
5	0.4	1.5	8
<b>6</b>	<b>0.4</b>	<b>1.5</b>	<b>10</b>
7	0.4	2.5	8
8	0.4	2.5	10

○ 따라서, 개발된 증균배지는 6시간 이내에 PCR 방법을 사용하여 해당 식중독균을 신속하게 검출할 수 있는 증균 배지로 활용할 수 있을 것임

② *L. monocytogenes*

○ 각 생육인자 조건별 증균배지에 *L. monocytogenes* 초기 균수 1.95 log cfu/mL로 접종하여 생육도를 측정한 결과, 35°C에서 6시간 배양된 *L. monocytogenes*의 생육도가 5.90 log cfu/mL로 현저하게 증가하는 것을 확인할 수 있었음

표 3-4-13. 생육인자조건별, 증균온도별 및 증균시간별 *L. monocytogenes* 생육도

(단위 : log cfu/ml)

실험조건	25°C		30°C		35°C	
	4hr	6hr	4hr	6hr	4hr	6hr
BHI	2.12	2.34	2.32	2.54	2.32	2.46
<b>1</b>	<b>4.27</b>	<b>5.74</b>	<b>4.27</b>	<b>5.79</b>	<b>4.33</b>	<b>5.95</b>
2	3.9	5.41	4.24	5.48	4.23	5.47
3	4.2	5.26	4.19	5.47	4.28	5.37
4	4.17	5.37	3.97	5.32	3.96	5.47
5	3.9	5.23	3.96	5.35	4.05	5.36
6	4.1	5.22	4.14	5.38	4.23	5.69
7	4.01	5.15	4.12	5.31	4.24	5.46
8	3.95	5.09	4.04	5.35	4.23	5.47

○ *L. monocytogenes* 증균배지의 최적 증균배지의 조성비율은 기존 증균배지 BHI에 magnesium sulfate 6.0 g/L, sodium pyruvate 3.0 g/L, yeast extract 7.0 g/L을 첨가한 배지가 탁월할 것으로 판단됨

표 3-4-14. 기존 증균배지에 첨가될 생육인자 조건

(단위 : g/L)

	Magnesium sulfate	yeast extract	sodium pyruvate
1	6	3	7
2	6	3	10
3	6	6	7
4	6	6	10
5	9	3	7
6	9	3	10
7	9	6	7
8	9	6	10

○ 따라서, 개발된 증균배지는 6시간 이내에 PCR 방법을 사용하여 해당 식중독균을 신속하게 검출할 수 있는 증균 배지로 활용할 수 있을 것임

③ *S. aureus*

○ 각 생육인자 조건별 증균배지에 *S. aureus* 초기 균수 1.92 log cfu/mL로 접종하여 생육도를 측정한 결과, 35°C에서 6시간 배양된 *S. aureus*의 생육도가 6.04 log cfu/mL로 현저하게 증가하는 것을 확인할 수 있었음

표 3-4-15. 생육인자조건별, 증균온도별 및 증균시간별 *S. aureus* 생육도

(단위 : log cfu/ml)

실험조건	25°C		30°C		35°C	
	4hr	6hr	4hr	6hr	4hr	6hr
BHI	2.14	2.33	2.29	2.43	2.33	2.59
1	4.22	5.7	4.26	5.73	4.28	5.7
2	<b>4.28</b>	<b>5.76</b>	<b>4.31</b>	<b>5.92</b>	<b>4.39</b>	<b>6.04</b>
3	4.2	5.27	4.18	5.4	4.27	5.39
4	4.18	5.36	3.99	5.36	3.96	5.47
5	3.97	5.22	3.98	5.36	4.09	5.41
6	4.12	5.24	4.17	5.41	4.21	5.52
7	4.04	5.22	4.16	5.31	4.26	5.44
8	3.95	5.12	4.1	5.37	4.26	5.32

○ *S. aureus* 증균배지의 최적 조성비율은 기존 증균배지 BHI에 magnesium sulfate 0.1 g/L, sodium pyruvate 8.0 g/L, mannitol 20.0 g/L을 첨가한 배지가 탁월할 것으로 판단됨

표 3-4-16. 기존 증균배지에 첨가될 생육인자 조건

(단위 : g/L)

	Magnesium sulfate	sodium pyruvate	mannitol
1	0.1	8	10
2	0.1	8	20
3	0.1	12	10
4	0.1	12	20
5	0.3	8	10
6	0.3	8	20
7	0.3	12	10
8	0.3	12	20

○ 따라서, 개발된 증균배지는 6시간 이내에 PCR 방법을 사용하여 해당 식중독균을 신속하게 검출할 수 있는 증균 배지로 활용할 수 있을 것임

④ *S. spp.*

○ 각 생육인자 조건별 증균배지에 *S. spp.* 초기 균수 1.93 log cfu/mL로 접종하여 생육도를 측정할 결과, 35°C에서 6시간 배양된 *S. spp.*의 생육도가 6.08 log cfu/mL로 현저하게 증가하는 것을 확인할 수 있었음

표 3-4-17. 생육인자조건별, 증균온도별 및 증균시간별 *S. spp.* 생육도

(단위 : log cfu/ml)

실험조건	25°C		30°C		35°C	
	4hr	6hr	4hr	6hr	4hr	6hr
BPW	2.45	2.67	2.88	3	2.99	3.16
1	4.21	5.3	4.26	5.65	3.97	5.02
2	4.30	5.33	4.31	5.81	4.02	5.00
3	4.34	5.71	4.30	5.83	4.37	5.72
4	<b>4.35</b>	<b>5.79</b>	<b>4.40</b>	<b>5.98</b>	<b>4.54</b>	<b>6.08</b>
5	4.30	5.49	4.22	5.35	3.80	4.94
6	4.11	5.29	4.12	5.25	3.73	4.71
7	3.91	5.18	4.15	5.00	3.69	4.50
8	3.87	5.00	4.04	5.01	3.60	4.40

○ *S. spp.* 증균배지의 최적 증균배지의 조성비율은 기존 증균배지 BPW에 D-mannitol 5.0 g/L, peptone 5.0 g/L를 첨가한 배지가 탁월할 것으로 판단됨

표 3-4-18. 기존 증균배지에 첨가될 생육인자 조건 (단위 : g/L)

	D-mannitol	peptone
1	0	5
<b>2</b>	<b>0</b>	<b>10</b>
3	5	0
4	5	5
5	5	10
6	10	0
7	10	5
8	10	10

○ 따라서, 개발된 증균배지는 6시간 이내에 PCR 방법을 사용하여 해당 식중독균을 신속하게 검출할 수 있는 증균 배지로 활용할 수 있을 것임

⑤ EHEC

○ 각 생육인자 조건별 증균배지에 EHEC 초기 균수 1.90 log cfu/mL로 접종하여 생육도를 측정 한 결과, 35℃에서 6시간 배양된 EHEC의 생육도가 6.10 log cfu/mL로 현저하게 증가하는 것을 확인할 수 있었음

표 3-4-19. 생육인자조건별, 증균온도별 및 증균시간별 EHEC 생육도

(단위 : log cfu/ml)

실험조건	25℃		30℃		35℃	
	4hr	6hr	4hr	6hr	4hr	6hr
BPW	2.65	2.90	3.04	3.17	3.13	3.78
1	3.80	5.02	3.91	4.96	3.95	5.01
2	4.09	5.03	4.16	5.01	4.00	4.98
3	4.11	4.99	4.16	5.10	3.98	5.08
4	3.77	5.07	3.98	5.16	4.00	4.99
5	4.34	5.45	4.33	5.52	4.46	5.74
<b>6</b>	<b>4.43</b>	<b>5.92</b>	<b>4.48</b>	<b>6.04</b>	<b>4.52</b>	<b>6.10</b>
7	4.25	5.35	4.32	5.52	4.42	5.75
8	4.34	5.74	4.43	5.97	4.45	5.75

○ EHEC 증균배지의 최적 증균배지 조성비율은 기존 증균배지 BPW에 Sodium pyruvate 2.0 g/L, yeast extract 3.0 g/L, lactose 10.0 g/L을 첨가한 배지가 탁월할 것으로 판단됨

표 3-4-20. 기존 증균배지에 첨가될 생육인자 조건

(단위 : g/L)

	Sodium pyruvate	yeast extract	lactose
1	0.5	3	5
2	0.5	3	10
3	0.5	6	5
4	0.5	6	10
5	2	3	5
<b>6</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>10</b>
7	2	6	5
8	2	6	10

○ 따라서, 개발된 증균배지는 6시간 이내에 PCR 방법을 사용하여 해당 식중독균을 신속하게 검출할 수 있는 증균 배지로 활용할 수 있을 것임

⑥ *C. perfringens*

○ 각 생육인자 조건별 증균배지에 *C. perfringens* 초기 균수 1.92 log cfu/mL로 접종하여 생육도를 측정한 결과, 35°C에서 6시간 배양된 *C. perfringens*의 생육도가 6.01 log cfu/mL로 현저하게 증가하는 것을 확인할 수 있었음

표 3-4-21. 생육인자조건별, 증균온도별 및 증균시간별 *C. perfringens* 생육도 측정결과

(단위 : log cfu/ml)

실험조건	25°C		30°C		35°C	
	4hr	6hr	4hr	6hr	4hr	6hr
RCM	2.24	2.54	2.65	2.98	3.01	3.45
1	4.14	5.08	4.23	5.00	4.32	5.54
<b>2</b>	<b>4.21</b>	<b>5.11</b>	<b>4.28</b>	<b>5.09</b>	<b>4.33</b>	<b>6.01</b>
3	4.14	5.03	4.25	5.01	4.30	5.51
4	4.16	5.05	4.12	5.05	4.28	5.57

○ *C. perfringens* 증균배지의 최적 증균배지의 조성비율은 기존 증균배지 RCM에 yeast extract 2.0 g/L, neomycin 0.2 g/L을 첨가한 배지가 탁월할 것으로 판단됨

표 3-4-22. 기존 증균배지에 첨가될 생육인자 조건

(단위 : g/L)

	yeast extract	neomycin
1	3	0.1
<b>2</b>	<b>3</b>	<b>0.2</b>
3	5	0.1
4	5	0.2

○ 따라서, 개발된 증균배지는 6시간 이내에 PCR 방법을 사용하여 해당 식중독균을 신속하게 검출할 수 있는 증균 배지로 활용할 수 있을 것임



- 최종적으로 기존 증균배지에 각 세균의 성장 또는 회복을 돕는 첨가 성분들을 추가하여 6시간 증균을 하여 증균 배지 기술 개선안을 도출하였음

표 3-4-23. 증균 배지 개선안

Pathogen	Medium	첨가생육촉진인자(g/L)	온도(℃)	시간(hr)
<i>B. cereus</i>	BHI	Magnesium sulfate: 0.4 Yeast extract: 1.5 sodium pyruvate: 10	35	6
<i>L. monocytogenes</i>	BHI	Magnesium sulfate: 6 Yeast extract: 3 Sodium pyruvate: 7	35	6
<i>S. aureus</i>	BHI	Magnesium sulfate: 0.1 Sodium pyruvate: 8 Mannitol: 20	35	6
<i>S. spp.</i>	BPW	D-mannitol: 0 Peptone: 10	35	6
EHEC	BPW	Sodium pyruvate: 2 Yeast extract: 3 Lactose: 10	35	6
<i>C. perfringens</i>	RCM	Yeast extract: 3 Neomycin: 0.2	35	6

나. 위해 식중독 세균 6종 동시 검출 multiplex real-time PCR kit개발

(1) 현재 구축된 Fluidigm사의 multiplex real-time PCR system 응용

(가) 1차 실험 결과

- Multiplex real time PCR 조건은 아래와 같음

Sample	Volume
DNA template	1 ul
각 target gene F primer (20uM)	0.75 ul
각 target gene R primer (20uM)	0.75 ul
*qPCRmix(2X)	5 ul
TaqMan probe (10uM)	0.75 ul
ROX II	0.4 ul
Molecular Water	6.85 ul
Total	20 ul

단계	Temp.(℃)	Time	Cycle
Initial denaturation	95	5min	1
Denaturation	95	10sec	35
Annealing/ Extension	60	30s	

- triplex real time PCR group의 구성은 아래와 같음

표 3-4-24. 1차 triplex real time PCR group 조합

Group 1			Group 2		
Pathogen	Target gene	Fluorescent	Pathogen	Target gene	Fluorescent
<i>C. perfringens</i>	cpa	FAM-TAMRA	<i>S. aureus</i>	femA	FAM-TAMRA
EHEC	stx2	VIC-MGB	<i>S. spp.</i>	ttr	VIC-MGB
<i>L. monocytogenes</i>	lssrA	Cy5-BHQ2	<i>B. cereus</i>	hbl	Cy5-BHQ2

- 자료 조사를 통해 multiplex real time PCR 효율을 높일 수 있는 방안들을 참고하여 실험 조건을 변경하여 개선을 진행하고자 함. 조건은 qPCR mix, primer 및 probe의 농도 조절, fluorescent dye의 영향 총 3가지를 적용하여 실험을 진행하였음

1) qPCR mix

- Real-time PCR 효율 개선 관련 기존 자료 확인 결과 PCR mixture에 첨가물인 Mg, glycerol 등을 추가로 첨가하면 PCR 효율이 더 좋아진다고 함
- 기존 사용하던 qPCR mix의 경우 위의 성분들을 포함하고 있기 때문에 real time PCR 시, qPCR mix 사용량을 늘리고, 각 회사마다 qPCR mix의 첨가물 또는 조성이 조금씩 다를 것으로 생각되어 타 회사 제품도 소량 섞어봄으로서 triplex 활성이 나타나는지 확인하였음
- 기존 real time PCR 반응액 조성 과 변경 적용한 조성은 아래 표와 같음

표 3-4-25. 기존 real time PCR 반응 조성      표 3-4-26. 변경 real time PCR 반응 조성

기존		변경	
Sample	Volume	Sample	Volume
DNAtemplate	1 ul	DNAtemplate	1 ul
각 target gene F primer (20uM)	0.75 ul	각 target gene F primer (20uM)	0.75 ul
각 target gene R primer (20uM)	0.75 ul	각 target gene R primer (20uM)	0.75 ul
qPCRmix(엠지메드 사)	5 ul	qPCRmix(엠지메드 사)	8 ul
TaqMan probe (10uM)	0.75 ul	qPCRmix(바이오니아 사)	2 ul
ROX II	0.4 ul	TaqMan probe (10uM)	0.75 ul
Molecular Water	6.85 ul	ROX II	0.4 ul
Total	20 ul	Molecular Water	6.85 ul
		Total	20 ul

- 변경 적용하여 triplex real time PCR 확인 결과, 모든 target gene의 활성이 확인되었으나, cy5 dye에 해당하는 *L. monocytogenes*(lssrA)와 *B. cereus*(hbl)의 활성이 다른 target gene에 비해 낮게 확인되었음

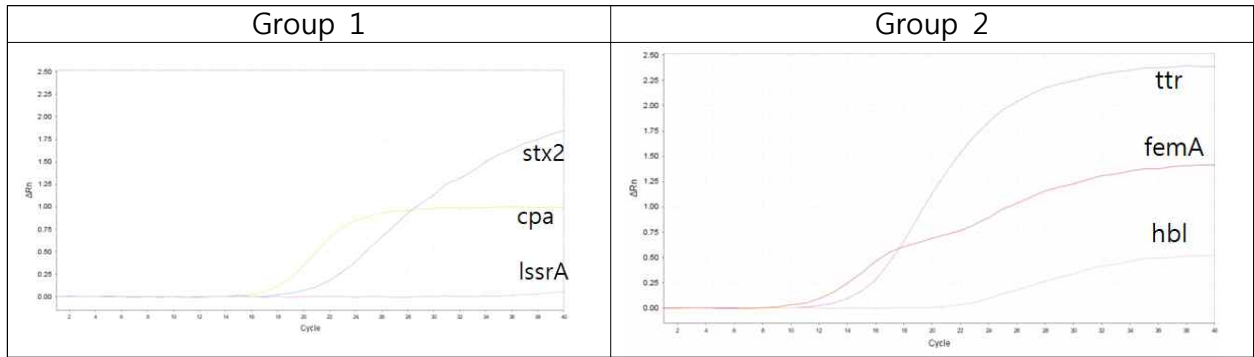


그림 3-4-16. 1차 실험 qPCR mix 조성 변경 실험 결과

2) Primer 및 probe의 농도 조절

- 기존 논문 자료 확인 결과, multiplex real time PCR에서 사용되는 각기 다른 primer set 중 효율이 낮은 primer의 경우 효율이 좋은 primer에 의해 반응이 저해되어 그 효율이 더 낮게 나타날 수 있다고 함

표 3-4-27. 기존 primer 및 probe 농도

기존				
	Pathogen	Target gene	primer 농도	probe 농도
Group1	<i>C. perfringens</i>	cpa	15	7.5
	EHEC	stx2	15	7.5
	<i>L. monocytogens</i>	lssrA	15	7.5
Group2	<i>S.aureus</i>	femA	15	7.5
	<i>S. spp.</i>	ttr	15	7.5
	<i>B.cereus</i>	hbl	15	7.5

- 기존 primer 및 probe의 농도는 모든 target gene이 동일하였으나 기존 효율이 높은 primer set 의 경우 농도를 낮추고 효율이 낮은 primer set의 경우 농도를 높임으로서 농도 변화가 결과에 영향을 주는지 확인하였음

표 3-4-28. 변경 primer 및 probe 농도

변경				
	Pathogen	Target Gene	primer 농도	probe 농도
Group1	<i>C. perfringens</i>	cpa	10	5
	EHEC	stx2	10	5
	<i>L. monocytogens</i>	lssrA	20	10
Group2	<i>S.aureus</i>	femA	10	5
	<i>S. spp.</i>	ttr	10	5
	<i>B.cereus</i>	hbl	20	10

- 실험 결과, primer 및 probe 농도를 조절하였을 때 각 target gene 간 활성 간극을 줄일 수 있었으나 cy5 dye에 해당하는 *L. monocytogenes*(lssrA)와 *B. cereus*(hbl)의 활성이

다른 target gene에 비해 여전히 낮게 확인되었음

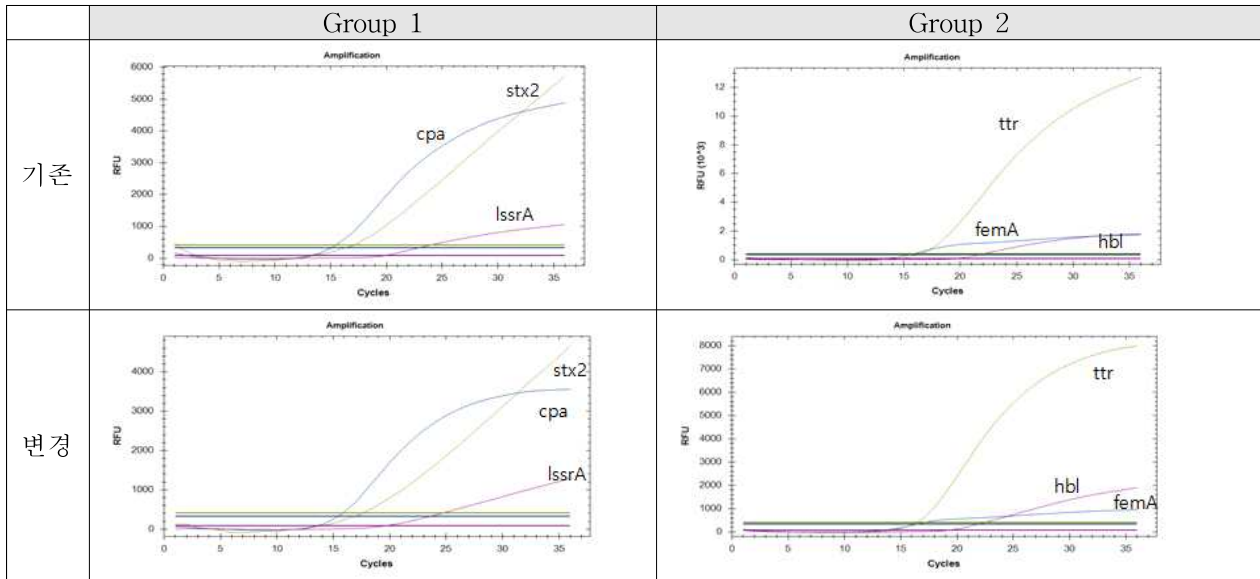


그림 3-4-17. 1차 실험 primer 및 probe 농도 조절 영향

### 3) Fluorescent dye 영향 확인

- 자료 조사 결과 probe 형광 dye의 종류에 따라 형광값이 다름을 확인하였음. FAM>VI C>cy5 순으로 형광의 강도가 큼
- 기존 cy5 dye에 해당하는 *L. monocytogenes*(lssrA)와 *B. cereus*(hbl)의 probe sequence에 FAM dye를 적용하여 singleplex real time PCR을 통해 서로 다른 dye의 형광 강도 차이를 확인하였음

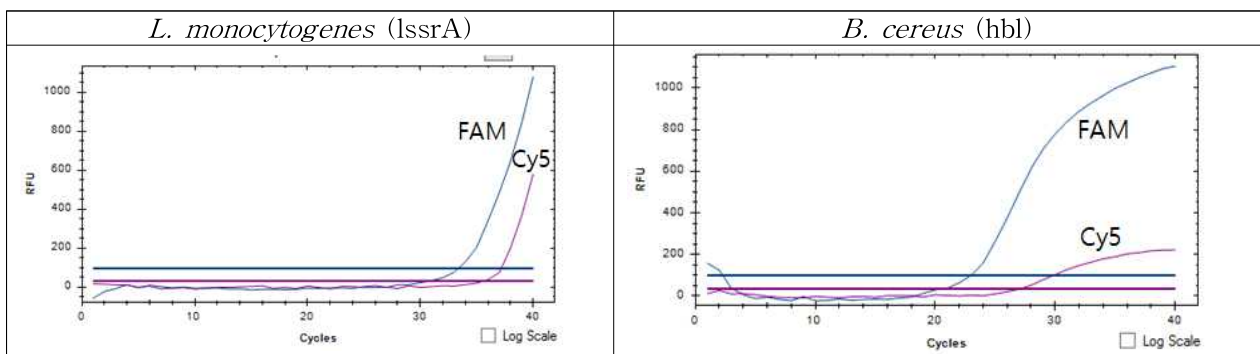


그림 3-4-18. 1차 실험 Fluorescent dye 영향

- 실험 결과, FAM dye를 적용한 결과가 기존 cy5 보다 형광 강도가 더 세며, ct 값도 앞당겨짐을 확인하였음. 4차 실험에서는 *L. monocytogenes*(lssrA)와 *B. cereus*(hbl)의 dye를 FAM으로 변경하고 기존 활성이 높았던 target gene 중 하나를 cy5로 변경하여 결과를 확인하고자 함

(나) 2차 실험 결과

□ 지난 실험 결과 여러 조건을 변경 적용하여 triplex real time PCR의 결과를 확인하였으나 각 target gene별 활성차가 크기 때문에 이를 보완하기 위해 fluorescent dye 변경, primer 및 probe 농도 조건 변경하여 확인 실험을 진행하였음

1) Fluorescent dye 변경

- 지난 3차 실험에서 FAM의 형광 강도가 cy5보다 강함을 확인하였음
- 활성이 낮은 *L. monocytogenes*(lssrA)와 *B. cereus*(hbl)을 FAM dye로 변경하고 가장 활성이 높은 target gene은 cy5 dye로, 그다음 순은 VIC dye로 각각 변경 진행하였음

표 3-4-29. 기존 fluorescent dye

기존					
Group1			Group2		
Pathogen	Target gene	Fluorescent	Pathogen	Target gene	Fluorescent
EHEC	stx2	VIC-MGB	<i>S. aureus</i>	femA	FAM-TAMRA
<i>C. perfringens</i>	cpa	FAM-TAMRA	<i>S. spp</i>	ttr	VIC-MGB
<i>L. monocytogenes</i>	lssrA	Cy5-BHQ2	<i>B. cereus</i>	hbl	Cy5-BHQ2

표 3-4-30. 변경 fluorescent dye

변경					
Group1			Group2		
Pathogen	Target gene	Fluorescent	Pathogen	Target gene	Fluorescent
EHEC	stx2	VIC-MGB	<i>S. aureus</i>	femA	VIC-MGB
<i>C. perfringens</i>	cpa	Cy5-BHQ2	<i>S. spp</i>	ttr	Cy5-BHQ2
<i>L. monocytogenes</i>	lssrA	FAM-TAMRA	<i>B. cereus</i>	hbl	FAM-TAMRA

□ 실험 결과, 이전 결과보다 각 target gene의 활성차가 개선되었음

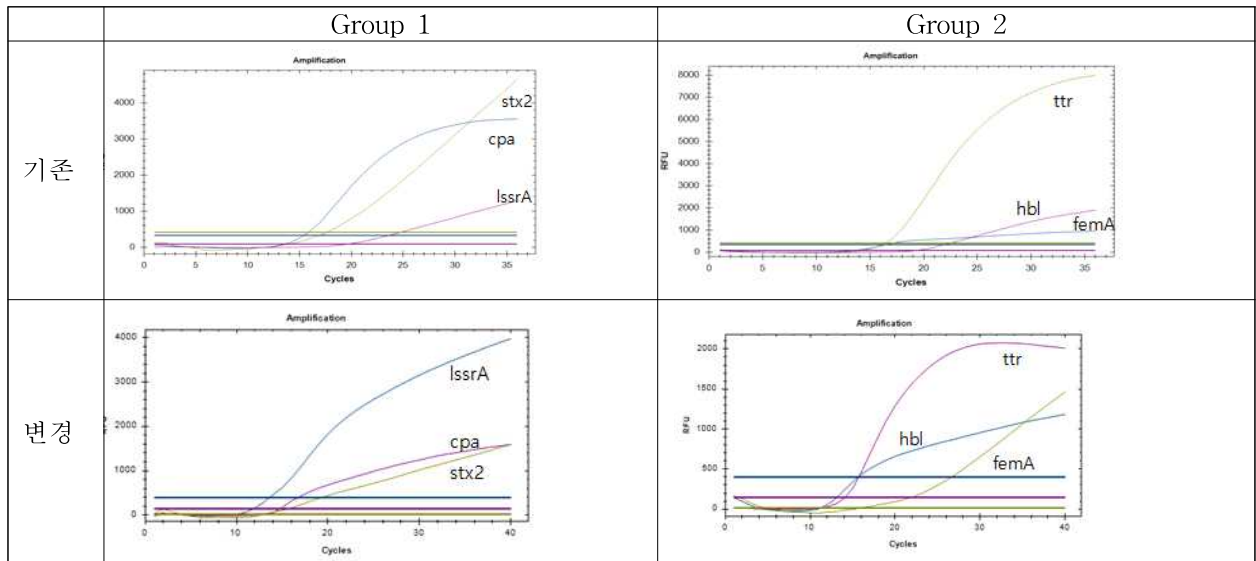


그림 3-4-19. 2차 실험 fluorescent dye 변경 확인

○ 그러나 Group 2의 *S. spp.* (*ttr*)의 활성이 여전히 다른 target gene에 비해 튀는 경향이 있어 primer 및 probe 농도 조절을 통해 보완이 가능한지 확인해보았음

2) primer 및 probe 농도 조절

- Target gene 간의 활성 간극을 조절하기 위해 primer 및 probe 농도를 조절하였음
- 농도 조절 조건 및 최종 결과는 아래 표와 같음

표 3-4-31. primer 및 probe 농도 조절 조건

Group 1			Group 2		
Dye	Target gene	용량 (ul)	Dye	Target gene	용량 (ul)
FAM	<i>lssrA</i>	0.5	FAM	<i>hbl</i>	0.75
VIC	<i>stx2</i>	0.5	VIC	<i>femA</i>	0.75
Cy5	<i>cpa</i>	1	Cy5	<i>ttr</i>	0.5

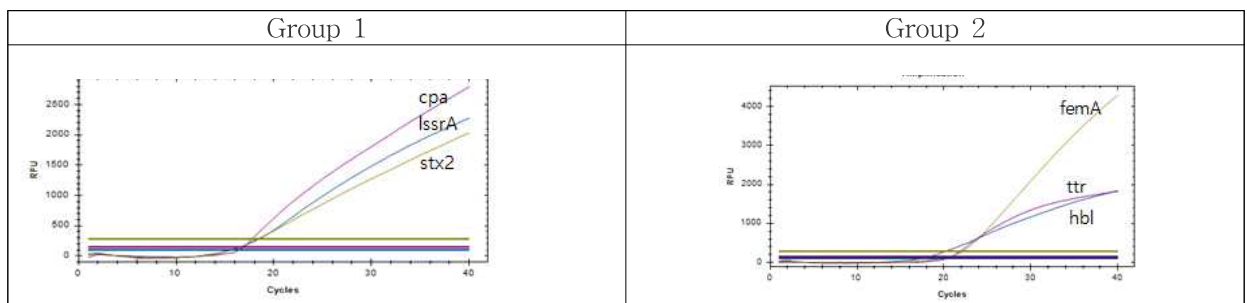


그림 3-4-20. 최종 multiplex real time PCR

다. 증균 배지 기술과 multiplex real-time PCR 기술을 활용한 신속 검출 분석 평가

(1) 8시간 이내 6종의 식중독 세균의 분석 평가

- 농산물에서 탈리, 농축의 전처리 과정을 거쳐 증균 후 multiplex real time PCR을 적용하여 8시간 이내 식중독 세균을 검출할 수 있는 process를 확립하였음. 이에 대한 모식도는 아래 그림과 같음



(가) 탈리

- 검사하고자 하는 식품 샘플에 대해 식품 샘플 10 g과 Phosphate buffered saline(PBS) 90 ml를 첨가하여 1분간 스토마커를 이용하여 탈리를 진행

(나) 농축

- 탈리 용액을 40 um membrane filter를 이용하여 food matrix 등을 걸러내고 해당 용액을 centrifuge를 이용하여 농축

(다) 증균

- 기존 증균 배지에 특정 식중독 세균의 생육 촉진에 도움이 되는 첨가 성분들을 추가하여 6시간 이내 증균 가능하도록 함

(라) Multiplex real time PCR

- triplex multiplex real time PCR로 총 2 그룹으로 구성되어 있으며, 한 번의 run으로 동시에 주요 식중독균 6종을 검출 가능함
- 초기 접종 농도 및 각 식품 샘플 별 6시간 증균 결과는 아래와 같음

(가) Group 1

단위: log CFU/ml

Pathogen	초기접종	6시간 증균 후		두 시료의 균수 증가 평균	초기 균수 대비 균수 증가 평균
		고추	토마토		
EHEC	1.79	6.04	7.14	6.59±0.55	4.80±0.55
<i>Clostridium perfringens</i>	2.17	4.96	4.74	4.85±0.11	2.68±0.11
<i>Listeria monocytogenes</i>	1.37	4.35	6.95	5.65±1.3	4.29±1.3

(나) Group 2

단위: log CFU/ml

Pathogen	초기접종	6시간 증균 후		두 시료의 균수 증가 평균	초기 균수 대비 균수 증가 평균
		고추	토마토		
<i>Staphylococcus aureus</i>	2.34	6.93	6.61	6.77±0.32	4.43±0.32
<i>Salmonella</i> spp.	1.62	5.31	5.26	5.29±0.05	3.67±0.05
<i>Bacillus cereus</i>	2.84	5.30	6.34	5.82±1.04	2.98±1.04

□ DNA 추출

- 인트론 사의 G-spin genomic DNA extraction kit를 이용하여 DNA 추출
- 배양한 균액 1-2 ml를 1분간 원심분리하여 상등액을 모두 버리고 pellet을 풀어줌
- Gram-positive 해당: 50 ul의 pre-buffer와 3 ul의 lysozyme을 넣고 섞어준 뒤 37 °C 에서 15분간 incubation 진행
- G-buffer 250 ul(Gram-positive) 또는 300 ul(Gram-negative)를 넣어주고 invert 하여 섞어준 뒤 65 °C에서 15분간 incubation 진행
- Binding buffer 250 ul를 넣어주고 pipetting으로 섞어줌
- 용액을 column tube에 옮긴 후 1분간 원심분리
- washing buffer A 500 ul를 넣어주고 1분간 원심분리
- washing buffer B 500 ul를 넣어주고 1분간 원심분리
- 빈 column을 1분간 원심분리한 뒤 column을 새로운 tube에 옮겨준 뒤 elution buffer 50 ul 넣어준 후 1분간 상온에 둔 후 1분간 원심분리하여 DNA 추출

□ Multiplex real time PCR 진행

- Multiplex real time PCR 반응액에 필요한 성분들을 각 tube에 넣고 섞어줌
- F-primer, R-primer, Taqman probe, 엠지메드 사 qPCR mix, ROX dye, molecular water 첨가함
- 실험 결과, 최종적으로 확인한 multiplex real time PCR 조성 및 반응 조건은 아래와 같음



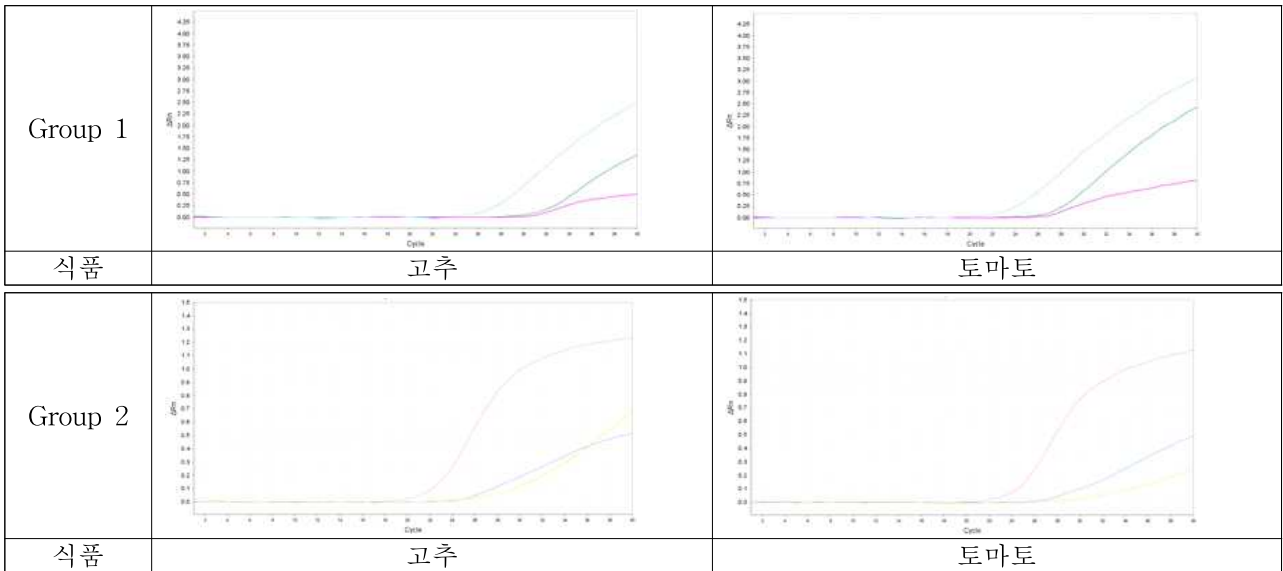
표 3-4-32. Multiplex real time PCR 조성

Group	Target gene(dye)	Sample	volume	기타
Group1	lssrA (FAM-TAMRA)	F primer	0.5 ul	20 uM
		R primer	0.5 ul	20 uM
		probe	0.5 ul	20 uM
	stx2 (VIC-MGB)	F primer	0.5 ul	20 uM
		R primer	0.5 ul	20 uM
		probe	0.5 ul	20 uM
	cpa (Cy5-BHQ2)	F primer	1 ul	20 uM
		R primer	1 ul	20 uM
		probe	1 ul	20 uM
		qPCR mix	8 ul	엠지메드 사
			2 ul	바이오니아 사
		Molecular water	3 ul	
		DNA	1 ul	
	Total		20 ul	
Group2	hbl (FAM-TAMRA)	F primer	0.75 ul	20 uM
		R primer	0.75 ul	20 uM
		probe	0.75 ul	20 uM
	femA (VIC-MGB)	F primer	0.75 ul	20 uM
		R primer	0.75 ul	20 uM
		probe	0.75 ul	20 uM
	ttr (Cy5-BHQ2)	F primer	0.5 ul	20 uM
		R primer	0.5 ul	20 uM
		probe	0.5 ul	20 uM
		qPCR mix	8 ul	엠지메드 사
			2 ul	바이오니아 사
		Molecular water	1 ul	
		DNA	3 ul	
	Total		20 ul	

Temperature(°C)	Time	Cycle
50	2 min	1
95	10 min	1
95	15 sec	40
60	1 min	

□ Multiplex real time PCR 결과 분석

- 총 40 cycle까지 real time PCR run 후 결과 확인하였음. 35 cycle 이내 검출 여부는 ct 값 및 증폭 그래프를 통해 확인함
- *Clostridium perfringens* 및 *Bacillus cereus*의 경우 초기 균수 대비 균수 증가 평균이 다른 4종에 비해 적은 편이나 6시간 증균 후 농도가 Real time PCR 검출 한계 이상이였음
- 식품 적용 실험 결과 8시간 이내 검출이 가능함을 확인하였음



#### 라. 개발기술을 활용한 multiplex real-time PCR 자동분석시스템 구축

(1) 식중독 세균 신속검출용 multiplex real-time PCR 키트 개발 및 이를 활용한 자동분석시스템 구축

- 개선된 전처리 방법과 Multiplex real time PCR kit를 적용하여 농산물을 샘플링하여 8시간 이내에 탈리, 농축, 증균 및 real time PCR로 농산물에 있는 6종의 식중독 세균을 분석할 수 있는 프로세스를 구축

(가) 탈리

- 검사하고자 하는 식품 샘플에 대해 식품 샘플 10 g과 Phosphate buffered saline(PBS) 90 ml를 첨가하여 1분간 스토마커를 이용하여 탈리를 진행

(나) 농축

- 탈리 용액을 40 um membrane filter를 이용하여 food matrix 등을 걸러내고 0.65 um syringe filter를 이용하여 세균을 filter에 농축

(다) 증균

- 기존 증균 배지에 특정 식중독 세균의 생육 촉진에 도움이 되는 첨가 성분들을 추가하여 6시간 이내 증균 가능하도록 함

(라) Multiplex real time PCR

- Triplex multiplex real time PCR로 총 2 그룹으로 구성되어 있으며, 한 번의 run으로 동시에 주요 식중독균 6종을 검출 가능함
- 해당 샘플에서 DNA 추출 후 개발된 multiplex real time PCR kit에 적용하여 실험 결과를 확인 시 아래 그림 ①과 같이 증폭 그래프를 확인할 수 있으며, 그림 ②와 같이 ct값의 확인을 통해서도 쉽게 검출 여부를 확인할 수 있음. 아래 예시는 ABI Real time PCR software로 확인한 결과이나, 타사 장비 real time PCR software에서 또한 증폭 그래프 및 ct 값으로 확인이 가능함

- 해당 식중독 세균의 검출 판정은 샘플 DNA를 포함한 well에서 ct값 기준 35 cycle 이전으로 검출 여부를 누구든 쉽게 확인할 수 있음
- 아래 예시는 Group 1 multiplex real time PCR 실험 결과로 왼쪽 그래프는각 EHEC, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens* 증폭 결과이며 오른쪽은 해당 well에 해당하는 각 균의 ct값 (EHEC: 11.55, *Listeria monocytogenes*: 22.06, *Clostridium perfringens*: 14.33)임. 두 가지 결과로 해당 균의 검출 확인이 가능함

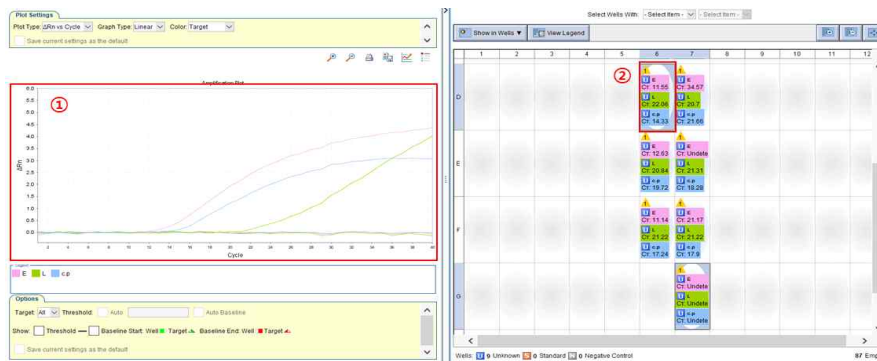


그림 3-4-21. Real time PCR software

### 3. 식중독 세균 신속검출 키트의 AOAC 인증 및 Field test

#### 가. 개발된 PCR 키트의 현장적용 평가를 위한 민감도 및 특이도 검사

(1) AOAC 방법을 준용한 농산물 및 재배환경에서의 민감도/특이도/검출한계/검출시간 분석

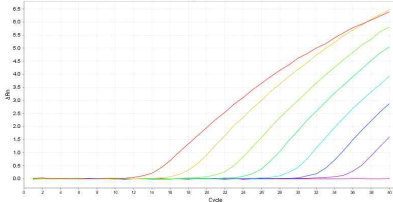
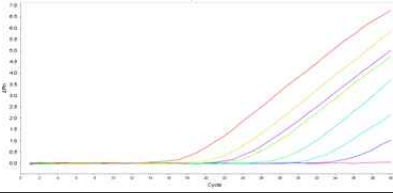
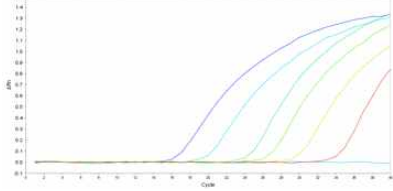
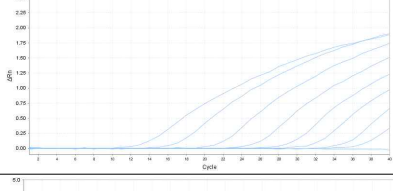
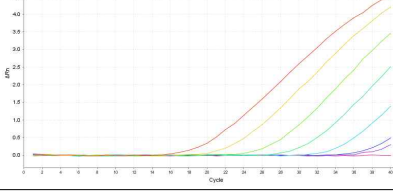
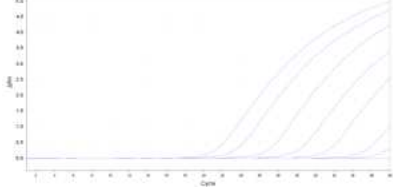
(가) 민감도, 검출한계 및 검출시간 분석

- 균주별 민감도 실험을 위해 자체적으로 샘플링한 환경분리 균주 및 대학병원을 통해 구한 임상분리 균주를 준비하였음
- 균주 별 선택 증균배지에 단일 콜로니만을 키운 후, DNA를 추출하여 민감도 실험을 진행하였음
- 민감도 실험 결과는 아래와 같음

균주이름	환경분리균주 민감도 실험 결과	임상분리균주 민감도 실험 결과
<i>Clostridium perfringens</i>	40/42(95.23%)	10/10(100%)
<i>Listeria monocytogenes</i>	51/53(96.22%)	31/31(100%)
<i>Salmonella</i> spp.	61/61(100%)	25/25(100%)
<i>Bacillus cereus</i>	31/31(100%)	7/7(100%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	28/29(96.55%)	14/14(100%)
EHEC	45/45(100%)	27/27(100%)

- 1시간 이내 검출 여부를 확인하기 위하여 총 40 cycle 반응 중 35 cycle 이내 ct 확인을 진행함
- 민감도 및 검출 한계 확인을 위하여 순수 증균 배양한 균액으로부터 DNA를 추출하여 10

진 회석 후 검출한계를 확인한 결과, 개발된 real time PCR kit의 검출한계는 1-2 log CFU/ml 수준으로 확인되었으며, 35 cycle 이내 검출 기준 각 해당 균주의 검출 한계는 아래와 같음

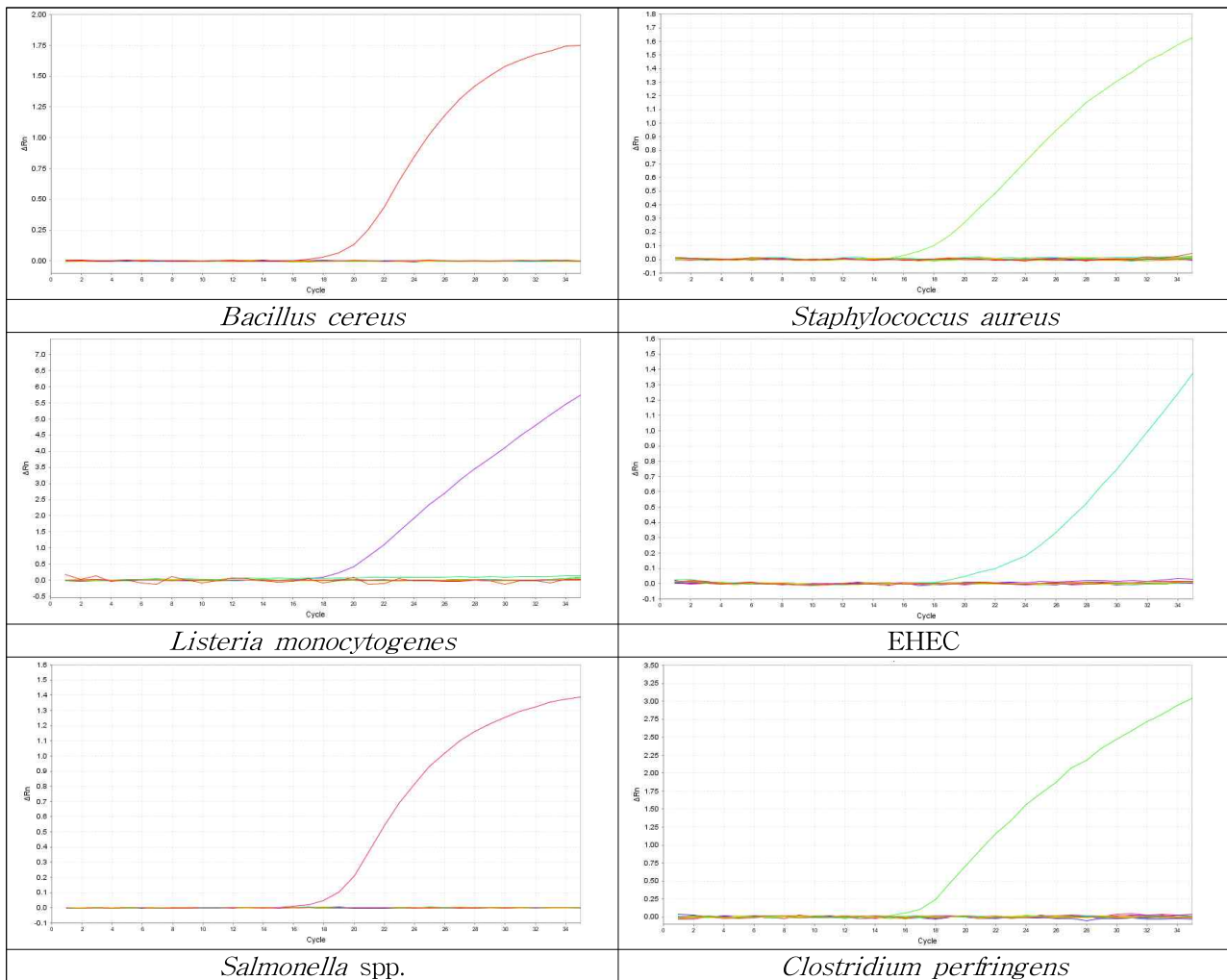
1	<i>Listeria monocytogenes</i>		초기 농도: 8 log CFU/ml
			검출 한계: 2 log CFU/ml
2	EHEC		초기 농도: 7 log CFU/ml
			검출 한계: 1 log CFU/ml
3	<i>Clostridium perfringens</i>		초기 농도: 6 log CFU/ml
			검출 한계: 1 log CFU/ml
4	<i>Bacillus cereus</i>		초기 농도: 8 log CFU/ml
			검출 한계: 2 log CFU/ml
5	<i>Staphylococcus aureus</i>		초기 농도: 7 log CFU/ml
			검출 한계: 2 log CFU/ml
6	<i>Salmonella</i> spp.		초기 농도: 7 log CFU/ml
			검출 한계: 2 log CFU/ml

(나) 특이도 분석

- 특이도 확인을 위하여 주요 식중독균 16종의 DNA를 추출하여 개발된 real time PCR kit에 적용한 결과, target 균주에서만 증폭 반응이 일어남을 확인하였음
- 제작된 primer 및 probe의 특이도를 확인하기 위하여 실험에 사용된 16종 식중독균에 대한 정보는 다음과 같음

균주이름	균주의 출처
<i>Campylobacter jejuni</i>	KCTC 15212

<i>Campylobacter coli</i>	NCTC 11168
<i>Clostridium perfringens</i>	NCCP 15911
<i>Vibrio vulnificus</i>	CMCP6
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	KCTC 2471
<i>Vibrio cholerae</i>	NCCP 14552
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 15313
<i>Salmonella</i> spp.	ATCC 700720
<i>Bacillus cereus</i>	KCTC 3624
<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC 55076
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 27664
EHEC	ATCC 43895
EAEC	NCCP 14039
ETEC	NCCP 15732
EPEC	NCCP 15661
EIEC	NCCP 15663



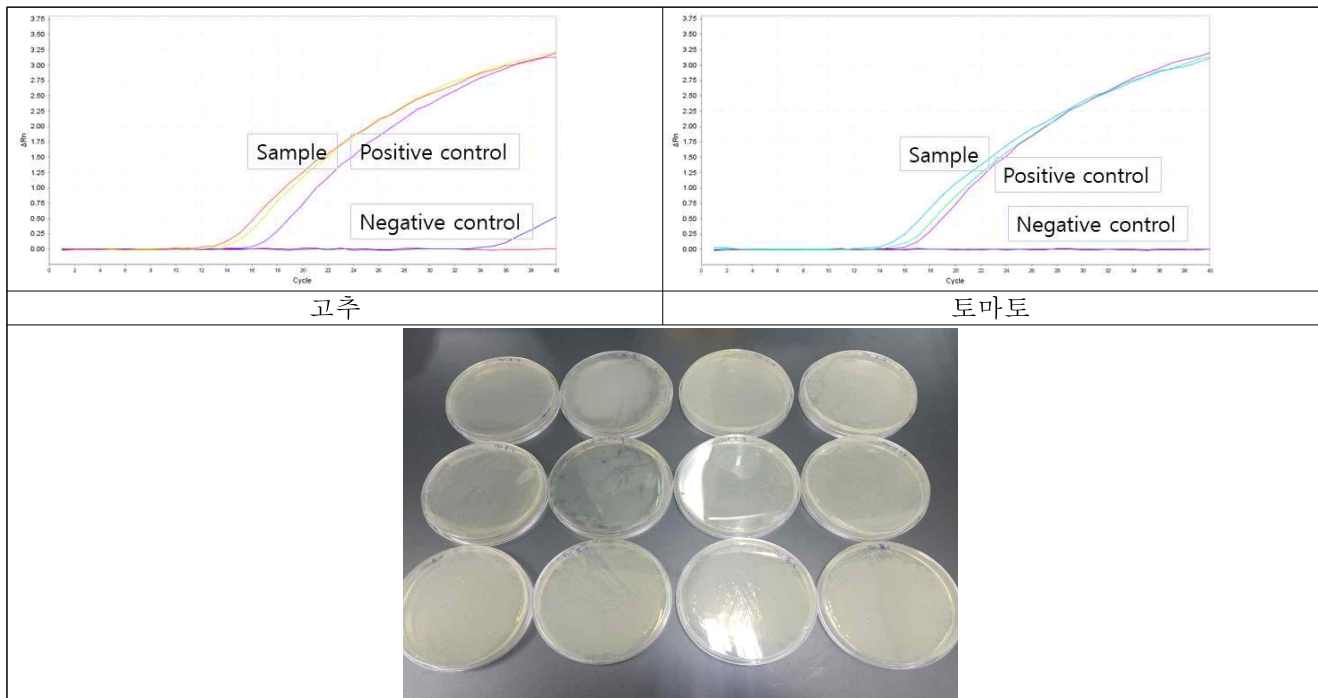
나. AOAC/ISO validation 방법을 준용한 농산물 및 재배환경에서의 개발된 신속검출 kit 현장 적용 검증

(1) 개발된 kit를 활용하여 다소비 농산물 및 재배환경에서의 유해미생물 민감도/특이도/검출한계 검증

(가) AOAC 방법을 기반으로 하여 검증 실험 프로토콜 개발

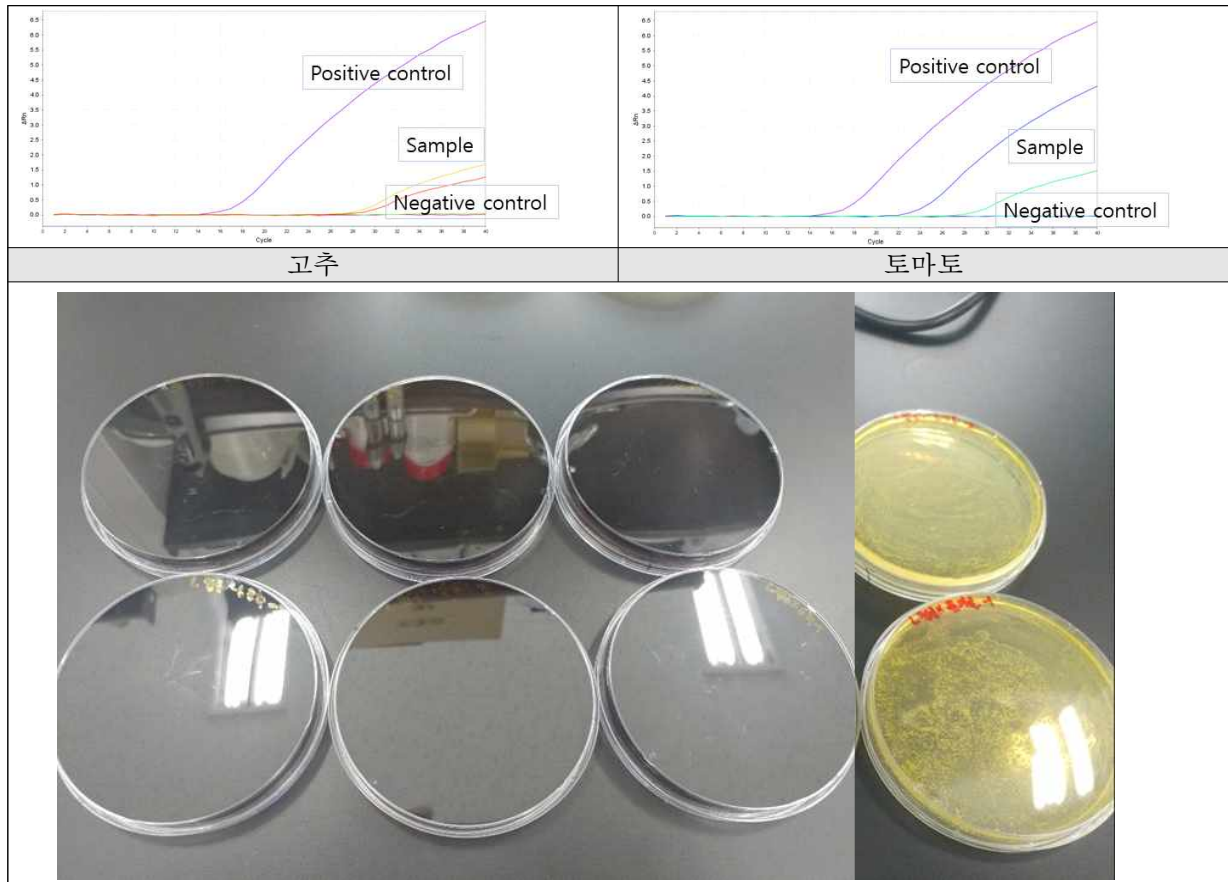
1) *Clostridium perfringens*

- ❑ 샘플: 저농도 (0.78 log CFU/ml), 고농도 (1.78 log CFU/ml) 로 균액을 식품 샘플에 인위 오염시킴
- ❑ Positive control: 표준 균주로부터 추출한 DNA 사용
- ❑ Negative control: 아무것도 접종하지 않은 식품 샘플
  
- ❑ 실험 결과
  - Real time PCR 결과, 인위오염 시킨 고추 및 토마토 샘플과 positive control에서 증폭이 되었으며 negative control에서는 증폭이 되지 않았음
  - *Clostridium perfringens*의 선택배지인 TSC agar 결과, 인위오염시킨 토마토 샘플에서 검정 콜로니가 확인되었으나 고추 샘플에서 확인되지 않았음. Negative control에서도 검정 콜로니가 확인되지 않았음



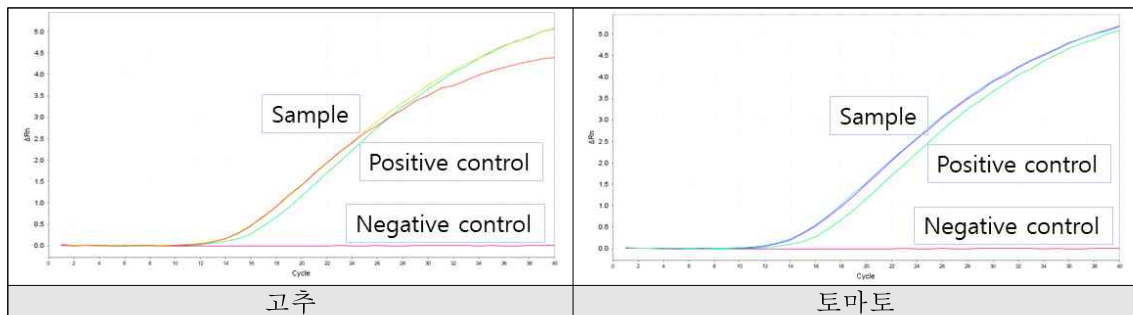
## 2) *Listeria monocytogenes*

- ❑ 샘플: 저농도 (1.08 log CFU/ml), 고농도 (2.08 log CFU/ml) 로 균액을 식품 샘플에 인위 오염시킴
- ❑ Positive control: 표준 균주로부터 추출한 DNA 사용
- ❑ Negative control: 아무것도 접종하지 않은 식품 샘플
  
- ❑ 실험 결과
  - Real time PCR 결과, 인위오염 시킨 고추 및 토마토 샘플과 positive control에서 증폭이 되었으며 negative control에서는 증폭이 되지 않았음
  - *Listeria monocytogenes*의 선택배지인 OAB agar 결과, 인위오염시킨 고추 및 토마토 샘플에서 검정 콜로니가 확인되었으며 Negative control에서도 검정 콜로니가 확인되지 않았음

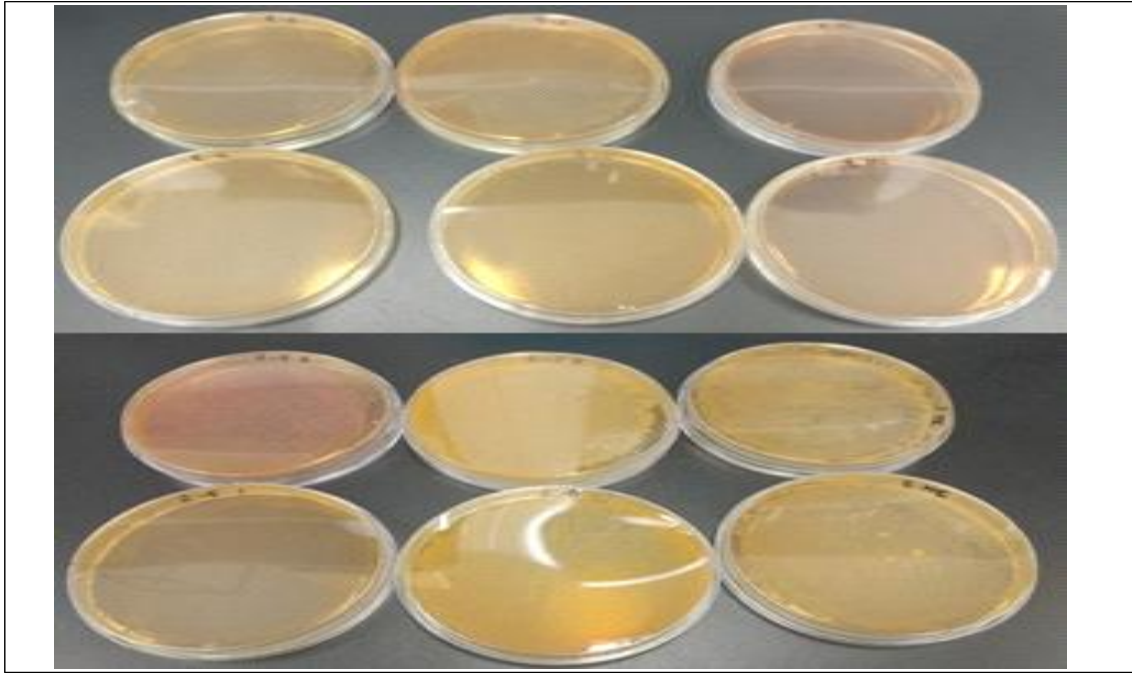


### 3) EHEC

- ❑ 샘플: 저농도 (0.95 log CFU/ml), 고농도 (1.95 log CFU/ml) 로 균액을 식품 샘플에 인위 오염시킴
- ❑ Positive control: 표준 균주로부터 추출한 DNA 사용
- ❑ Negative control: 아무것도 접종하지 않은 식품 샘플
  
- ❑ 실험 결과
  - Real time PCR 결과, 인위오염 시킨 고추 및 토마토 샘플과 positive control에서 증폭이 되었으며 negative control에서는 증폭이 되지 않았음
  - EHEC의 선택배지인 TC-smac agar 결과, 인위오염 시킨 고추 및 토마토 샘플에서 투명한 콜로니가 확인되었으며 Negative control에서는 토마토 샘플의 경우 아무것도 자라지 않았으나 고추 샘플의 경우 불투명한 콜로니가 확인되었음

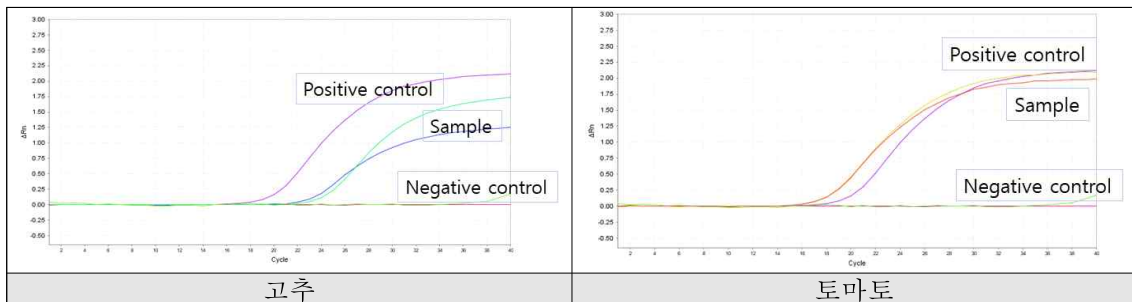






4) *Bacillus cereus*

- ❑ 샘플: 저농도 (0.69 log CFU/ml), 고농도 (1.69 log CFU/ml) 로 균액을 식품 샘플에 인위 오염시킴
- ❑ Positive control: 표준 균주로부터 추출한 DNA 사용
- ❑ Negative control: 아무것도 접종하지 않은 식품 샘플
  
- ❑ 실험 결과
  - Real time PCR 결과, 인위오염 시킨 고추 및 토마토 샘플과 positive control에서 증폭이 되었으며 negative control에서는 증폭이 되지 않았음
  - *Bacillus cereus*의 선택배지인 MYP agar 결과, 인위오염 시킨 고추 및 토마토 샘플에서 분홍색 환의 콜로니가 확인되었으며 Negative control에서는 고추 및 토마토에서 일부 분홍색으로 변했으나 환이 확인되지 않아 미검출로 판정하였음

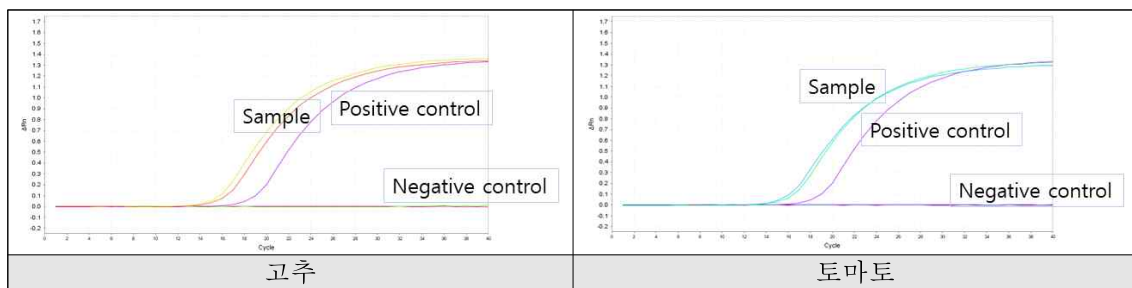


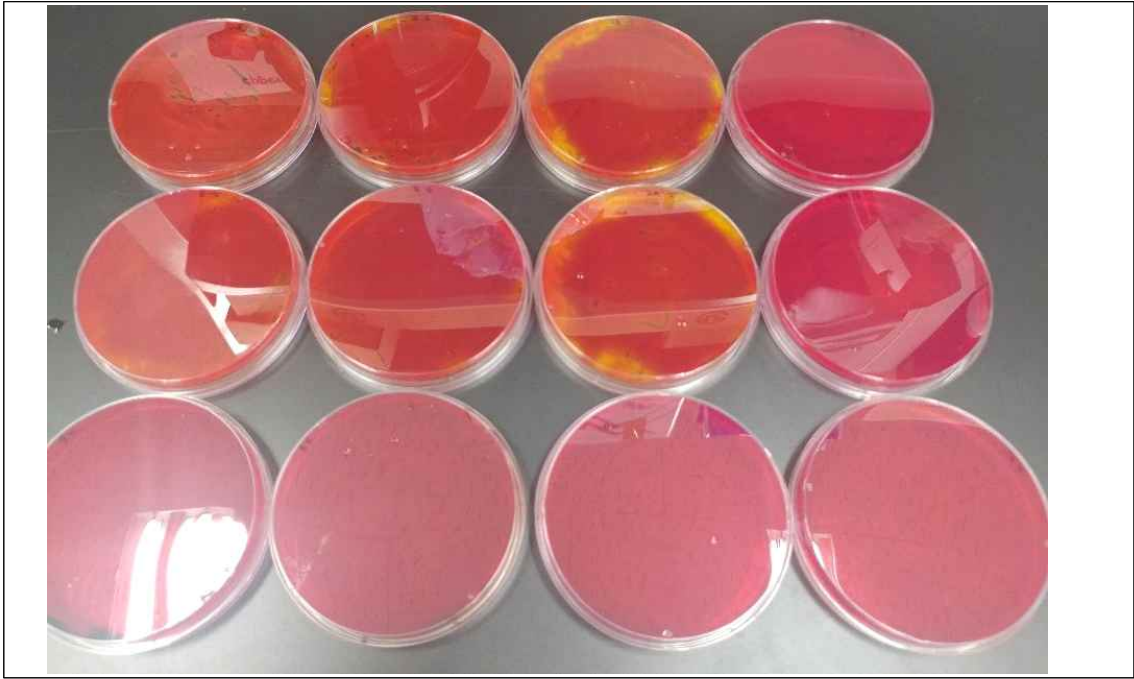




5) *Salmonella* spp.

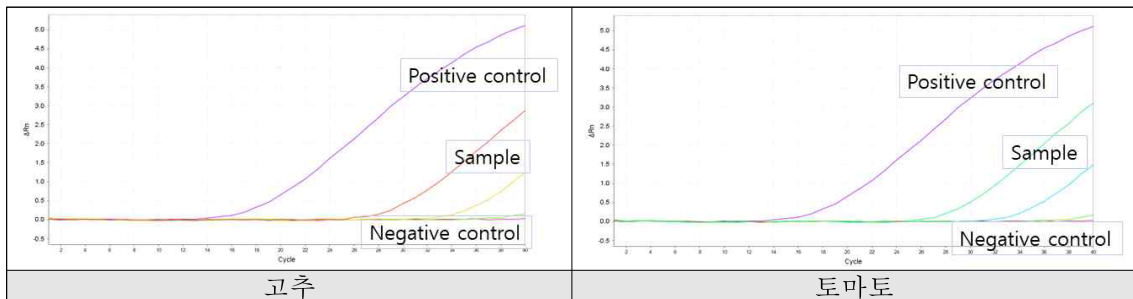
- 샘플: 저농도 (0.43 log CFU/ml), 고농도 (1.43 log CFU/ml) 로 균액을 식품 샘플에 인위 오염시킴
- Positive control: 표준 균주로부터 추출한 DNA 사용
- Negative control: 아무것도 접종하지 않은 식품 샘플
- 실험 결과
  - Real time PCR 결과, 인위오염 시킨 고추 및 토마토 샘플과 positive control에서 증폭이 되었으며 negative control에서는 증폭되지 않았음
  - *Salmonella* spp.의 선택배지인 XLD agar 결과, 인위오염 시킨 고추 및 토마토 샘플에서 검정색 콜로니가 확인되었으며 Negative control에서는 고추 및 토마토에서 콜로니가 확인되지 않았음

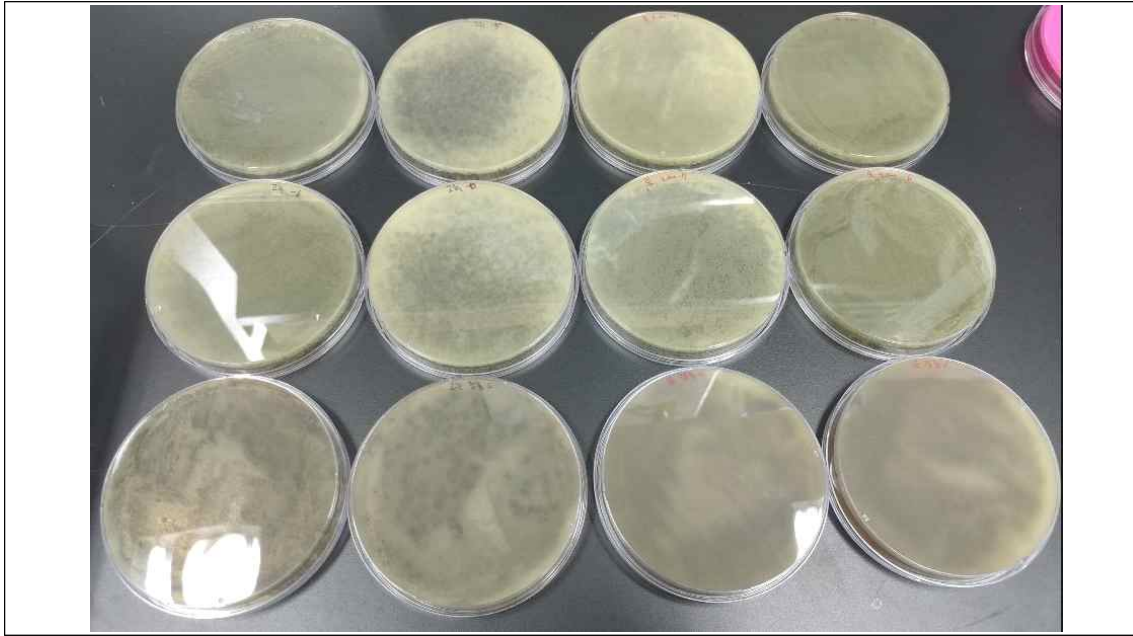




6) *Staphylococcus aureus*

- ❑ 샘플: 저농도 (1.32 log CFU/ml), 고농도 (2.32 log CFU/ml) 로 균액을 식품 샘플에 인위 오염시킴
- ❑ Positive control: 표준 균주로부터 추출한 DNA 사용
- ❑ Negative control: 아무것도 접종하지 않은 식품 샘플
- ❑ 실험 결과
  - Real time PCR 결과, 인위오염 시킨 고추 및 토마토 샘플과 positive control에서 증폭이 되었으며 negative control에서는 증폭되지 않았음
  - *Staphylococcus aureus*의 선택배지인 BPA agar 결과, 인위오염 시킨 고추 및 토마토 샘플에서 검정색 콜로니가 확인되었으며 Negative control에서도 고추 및 토마토에서 콜로니가 확인되었음





□ 결론

- 저농도(0-1 log CFU/ml) 및 고농도(1-2 log CFU/ml)의 식중독 균액을 식품에 인위접종 하여 증균 후 기존 배지법 및 Real time PCR 법으로 식중독 세균 검출 여부를 확인한 결과 real time PCR 검출법은 기존과 동등 이상의 효율을 가지는 것으로 확인하였음
- 실험 완료 후 AOAC 검증을 위한 실험 프로토콜을 정리하여 중앙대에 송부 후 검증 실험을 진행하였음

(나) AOAC 방법을 기반으로 하여 검증 실험 진행

1) 중앙대학교 검증 실험 결과

- 중앙대학교 박기환 교수님 연구실에서 세니젠에서 제공한 AOAC 기반 검증 실험 프로토콜에 따라 개발된 multiplex real time PCR kit 실험을 진행하였음

□ 각 균 별 초기 접종 농도

- 식중독 균액을 인위접종하기 위해 증균 배양 균주를 10배씩 9ml saline 용액에 희석하였음
- 초기 증균배양액의 농도를 7 log CFU/ml 수준으로 예상하고 각각 0-1 log CFU/ml (저농도), 1-2 log CFU/ml (고농도)의 균액을 접종하기 위해 희석 후 균액을 접종하였음
- 초기 농도를 확인하기 위해 각 선택배지에 도말하여 확인 결과 *Salmonella* spp. 및 *Staphylococcus aureus*의 경우 예상보다 초기 균 농도가 높았음

Group	Pathogen	저농도 (log CFU/ml)	고농도 (log CFU/ml)
Group 1	<i>Clostridium perfringens</i>	1.19	2.19
	<i>Listeria monocytogenes</i>	1.90	2.90
	EHEC	-0.69	0.3

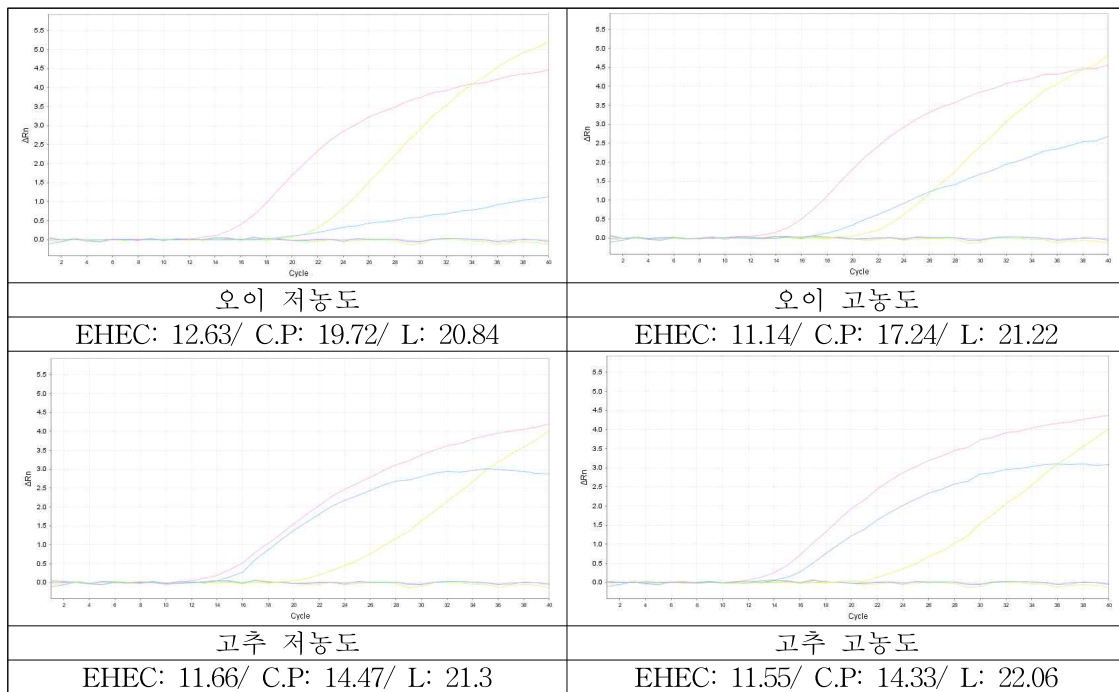
Group	Pathogen	저농도 (log CFU/ml)	고농도 (log CFU/ml)
Group 2	<i>Bacillus cereus</i>	1.95	2.95
	<i>Salmonella</i> spp.	2.49	3.49
	<i>Staphylococcus aureus</i>	2.50	3.50

○ 실험 식품은 오이 및 고추를 선정하였고 각 식품 샘플은 10 g에 해당 균액을 인위접종 후 세니젠에서 전달한 AOAC 프로토콜에 따라 실험하였음

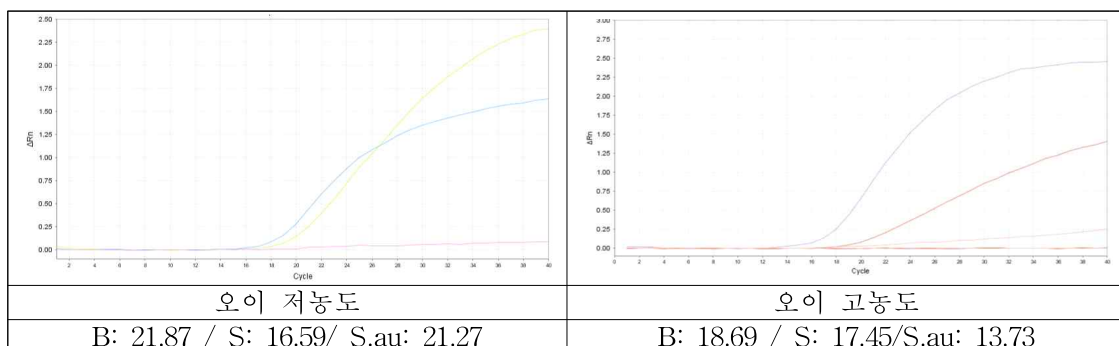
□ Multiplex real time PCR 결과

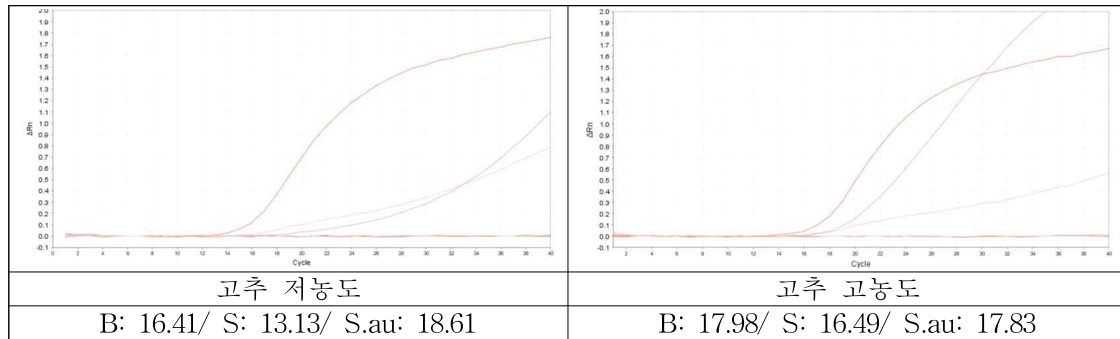
- 각 인위 접종한 증균배양액으로부터 1 ml를 추출하여 DNA 추출 후 해당 multiplex real time PCR group에 해당되는 균의 DNA 1 ul씩 섞어 총 3 ul의 반응 DNA를 만들었음
- 각 3 ul의 반응 DNA를 개발된 multiplex real time PCR kit 내 17 ul의 master mix와 섞어 Real time PCR 확인 결과 그래프 및 검출 ct값은 아래와 같음

① group 1



② group 2



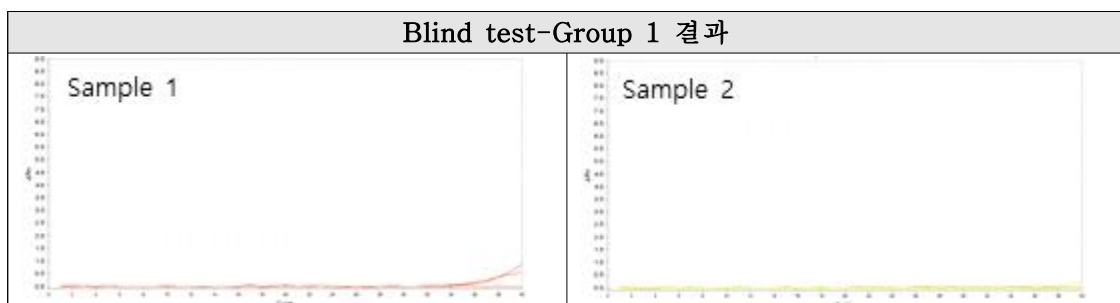


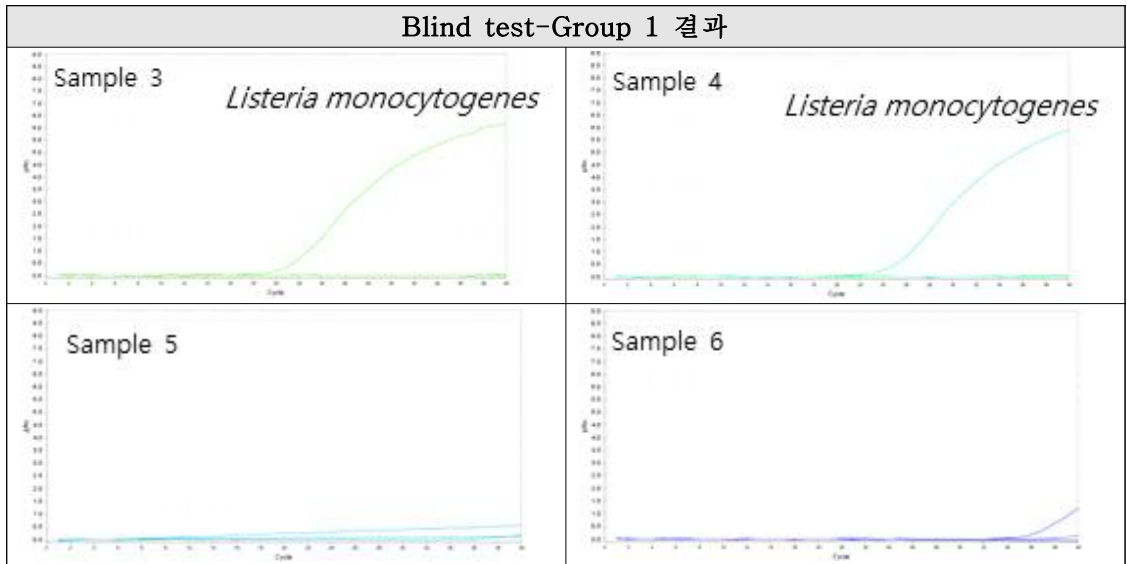
□ 결론

- Group 1 및 Group 2의 AOAC에 따른 실험 결과 모두 검출이 됨을 확인하였음
- 그러나 오이 저농도 *Bacillus cereus*의 경우 추출된 DNA의 농도 및 순도를 quickdrop으로 확인 결과 260/280 ratio: 1.2, 260/230 ratio: 0.1 로 DNA 추출이 제대로 되지 않음을 확인하였음
- Multiplex real time PCR 실험 시 DNA 추출 결과에 따른 영향이 있음을 확인하였으며, 적은 농도의 균이 접종된 경우 전처리 및 증균을 통해 real time PCR로 검출이 가능함을 확인하였음

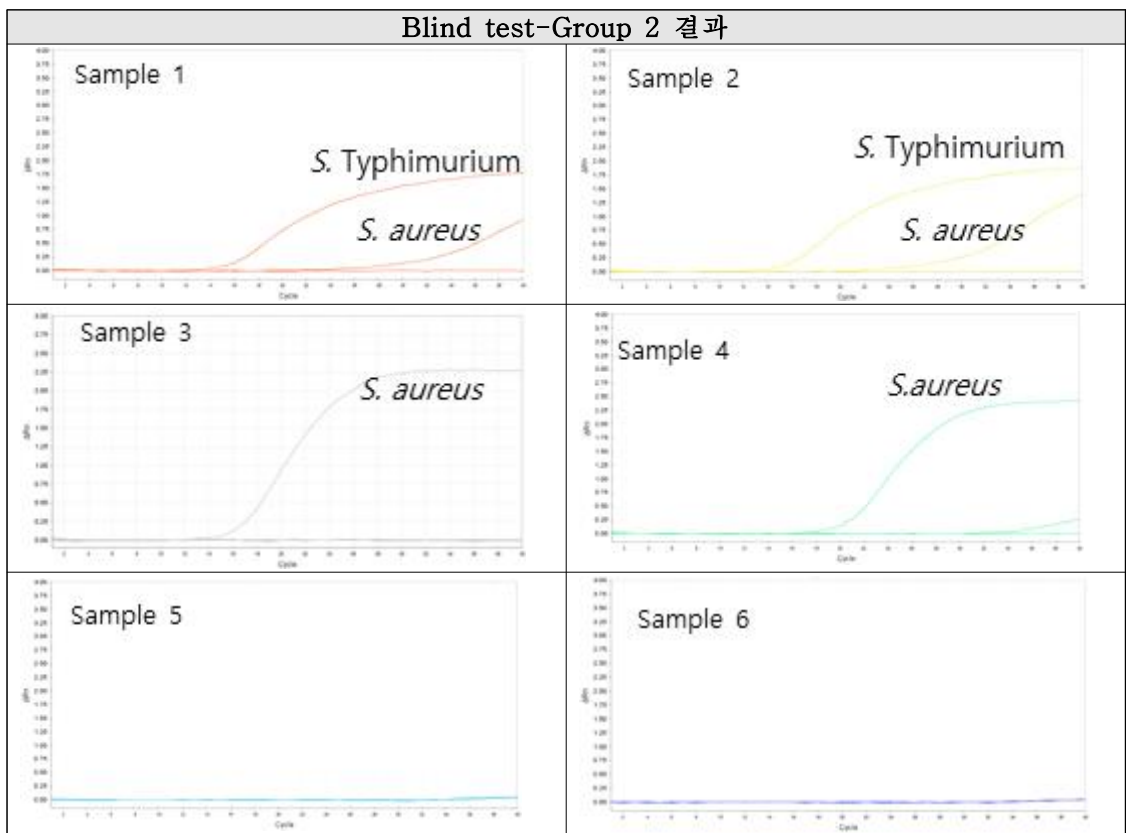
2) 경상대학교 검증 실험 결과

- 경상대 및 세니젠은 개발된 multiplex real time PCR kit의 특이성 검증을 위해 blind test 진행함
- 경상대에서 샘플링한 농산물 시료에 식중독 균을 인위오염 시킨 후 어떤 균을 오염시켰는지 세니젠에 알려주지 않은 상태로 AOAC 실험 프로토콜에 따라 전처리까지 완료한 실험 샘플을 세니젠에 전달하였으며, 세니젠에서는 경상대로부터 받은 전처리가 완료된 시료로부터 DNA를 추출하여 multiplex real time PCR로 결과를 확인하였음
- 전달받은 blind test 용 샘플은 총 6 종이며, 각 샘플로부터 추출한 DNA 3 ul를 개발된 multiplex real time PCR group 1 및 group 2 master mix 17 ul에 넣어 섞어준 후 40 cycle까지 반응시킨 multiplex real time PCR 확인 결과는 아래와 같음
- 결과 확인의 경우 ct 35 cycle 이전 검출만 해당 균의 검출로 보며 그 이후 cycle에서 확인된 결과는 불검출로 봄





Group	sample	Real time PCR Results		
		EHEC	<i>L. monocytogenes</i>	<i>C.perfringens</i>
G1	Sample 1	X	X	X
	Sample 2	X	X	X
	Sample 3	X	O	X
	Sample 4	X	O	X
	Sample 5	X	X	X
	Sample 6	X	X	X





Group	sample	Real time PCR Results		
		<i>S. spp.</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>
G2	Sample 1	O	O	X
	Sample 2	O	O	X
	Sample 3	X	O	X
	Sample 4	X	O	X
	Sample 5	X	X	X
	Sample 6	X	X	X

- Multiplex real time PCR kit를 이용한 blind test 결과를 경상대에 송부 후 실제 경상대에서 접종한 균의 항목은 아래와 같음

sample	Pathogen
Sample 1	<i>Salmonella spp.</i> + <i>Staphylococcus aureus</i>
Sample 2	<i>Salmonella spp.</i> + <i>Staphylococcus aureus</i>
Sample 3	<i>Listeria monocytogenes</i> + <i>Staphylococcus aureus</i>
Sample 4	<i>Listeria monocytogenes</i> + <i>E. coli</i> + <i>Staphylococcus aureus</i>
Sample 5	X
Sample 6	<i>E. coli</i>

- 실험 결과 각 blind test 결과 경상대에서 접종한 해당 균주들만 선택적으로 검출됨을 확인하였음. Sample 4 및 6의 경우 *E. coli*가 접종이 되었는에도 검출되지 않았는데, 이의 경우 verotoxin이 없는 *E. coli*를 접종하였기 때문에 real time PCR 검출이 되지 않는 것이 맞음

#### 다. 개발 제품의 사용자 편의 제품 설명서 제작 및 표준분석방법 개선안 도출

(1) 사용자 편의 제품 사용설명서 제작 및 표준분석방법 개선안 도출

- 개발된 multiplex real time PCR kit의 사용설명서 제작을 완료하였음

**Genelix™**  
Cat No. G102 (48 rxns)

Research Use only  
**multiplex Real-Time PCR Detection Kit**  
for agricultural products

**INTRODUCTION**

**Genelix™ M2 multiplex Real-Time PCR Detection Kit (Strip type)**는 ABI 7500 광비판판 미니나 Bio-Rad CFX Connect™ 장비까지 호환이 가능한 Real-Time PCR용 신속검출키트입니다.

- 균주에 최적의 신규 target gene을 선정하여 보다 더 효율적인 관용이 가능합니다.
- 본 제품에 사용된 target gene은 식물 또는 환경 내 존재하는 다양한 미생물 중 본 균주만을 특이적으로 검출할 수 있도록 민감한 관용 작업을 수행하였습니다.
- 극소량의 DNA 농도 (0.01 ng/μl)만 있어도 관용이 가능하도록 높은 민감도 관용 작업을 수행하였습니다.


**KIT CONTENTS**

TUBE	REAGENT	VOLUME
○	Real-Time PCR Premix (G1)	17 μl
○	Real-Time PCR Premix (G2)	17 μl
○	Control DNA	30 μl
○	Control DNA	30 μl

\* Genelix™ Real-Time PCR Detection Kit의 Premix는 ABI 7500, Bio-Rad CFX Connect™ 장비에 모두 호환 가능합니다.  
\* Primer, probe가 qPCR mix 모두 혼합되어 있습니다.

**APPLICATION**

※ 연구용 목적으로만 사용 가능합니다.  
※ DNA 인자의 취급은 사용설명서를 따릅니다.



**Genelix™**  
Cat No. G102 (48 rxns)

Research Use only  
**multiplex Real-Time PCR Detection Kit**  
for agricultural products

**EXPERIMENTAL PROTOCOL**

- 1. Template DNA 준비:** DNA 정제를 위해 Genelix™ DNA extraction kit를 이용하여 해당 template DNA를 준비합니다.
- 2. Genelix 제품:** 제품을 개봉할 때는 premix에 열손상이 일어나지 않도록 ice-lap top cooler를 이용하여 배송시킵니다.
- 3. Real-Time PCR 반응액 제조:** 아래 테이블을 참고하여 PCR 반응액을 제조합니다.
- 4. Real-Time PCR run:** 아래 테이블과 같이 Real-Time PCR 장비를 세팅하고 실험을 실시합니다.

COMPOSITION	VOLUME (μl)
Real-Time PCR Premix	17
Template DNA	3
Total	20

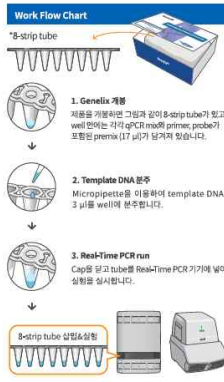
Pathogen	Fluorophore
<i>Listeria monocytogenes</i>	FAM
EHEC	VIC
<i>Clostridium perfringens</i>	CYS
<i>Bacillus cereus</i>	FAM
<i>Staphylococcus aureus</i>	VIC
<i>Salmonella spp.</i>	CYS

Temp. (°C)	Time	Cycle
50	2 min	1
95	10 min	1
95	15 sec	40
60	1 min	

**CAUTION**

1. Well에 반응액 제조 시 반드시 vortex 후 spin-down하여 사용하고, 각 strip에 기포가 생기지 않도록 유의하십시오.
2. Kit의 보관 온도는 -20°C입니다.
3. Probe는 빛에 민감하므로 빛이 투과되지 않도록 은박팩에 넣어 보관해 주십시오.

**Work Flow Chart**




**RESULTS**

양성시료의 경우 PCR 반응 후 Threshold 보다 높은 활성을 띠게 되며 이에 해당되는 시료는 해당 균주 유전자가 검출된 것으로 간주할 수 있습니다.

음성시료가 증폭되었을 경우 오염이나 간주하고 재실험을 실시합니다.

Control DNA를 이용한 양성대조군이 증폭되지 않았을 경우 재실험을 실시합니다.



**TROUBLE SHOOTING GUIDE**

- 1. 양성시료 활성이 올바르게 관측되지 않는 경우**
  - Template DNA의 quantity가 너무 많거나 적은 경우 활성이 아래 나오지 않거나, 그래프 모양이 왜곡하게 나오지 않을 수 있습니다.
  - DNA의 농도가 약 1-40 ng/μl 정도일 때 가장 깔끔한 그래프를 확인할 수 있습니다.
  - 제품을 올바르게 보관하지 않은 경우, probe가 빛에 오래 노출되어 반응되었을 가능성이 있습니다.
- 2. Negative control이 관측되었을 경우**
  - Molecular water(MW)가 오염되지 않았는지 확인하고 MW를 새로 바꾸어 다시 실험을 진행해 주십시오.

**Sanigen**

광기드 연방시 동남구 송학대로 423번길 16 (108동) | 영문: 디지탈벤처이아-411호  
대표: 1823-8010, 팩스: 050-9696-4276, FAX: 02-4973-3134  
홈페이지: www.sanigen.kr / 연락처: 02-4973-3134  
Copyright © 2016, SANIGEN Inc. All Rights Reserved.

□ 8시간 이내 식중독 세균 검출을 위한 표준분석방법 개선안 도출을 완료하였음

- 2차년도 연구 결과 바탕으로 8시간 이내 6종의 식중독 세균 분석 평가 실험을 완료하였음
- 관련 실험 프로토콜 제작 완료 후 중앙대에 전달하였으며, 중앙대에서 실험 프로토콜에 따라 검출 가능 여부 실험을 진행하였음

□ 각 균 별 초기 접종 농도

- 식중독 균액을 인위접종하기 위해 증균배양균주를 10배씩 9ml saline 용액에 희석하였음
- 초기 증균배양액의 농도를 7 log CFU/ml 수준으로 예상하고 각각 0-1 log CFU/ml (저농도), 1-2 log CFU/ml (고농도)의 균액을 접종하기 위해 희석 후 균액을 접종하였음
- 초기 농도를 확인하기 위해 각 선택배지에 도말하여 확인 결과 *Salmonella spp.* 및 *Staphylococcus aureus*의 경우 예상보다 초기 균 농도가 높았음

Group	Pathogen	저농도 (log CFU/ml)	고농도 (log CFU/ml)
Group 1	<i>Clostridium perfringens</i>	1.19	2.19
	<i>Listeria monocytogenes</i>	1.90	2.90
	EHEC	-0.69	0.3
Group 2	<i>Bacillus cereus</i>	1.95	2.95
	<i>Salmonella spp.</i>	2.49	3.49
	<i>Staphylococcus aureus</i>	2.50	3.50

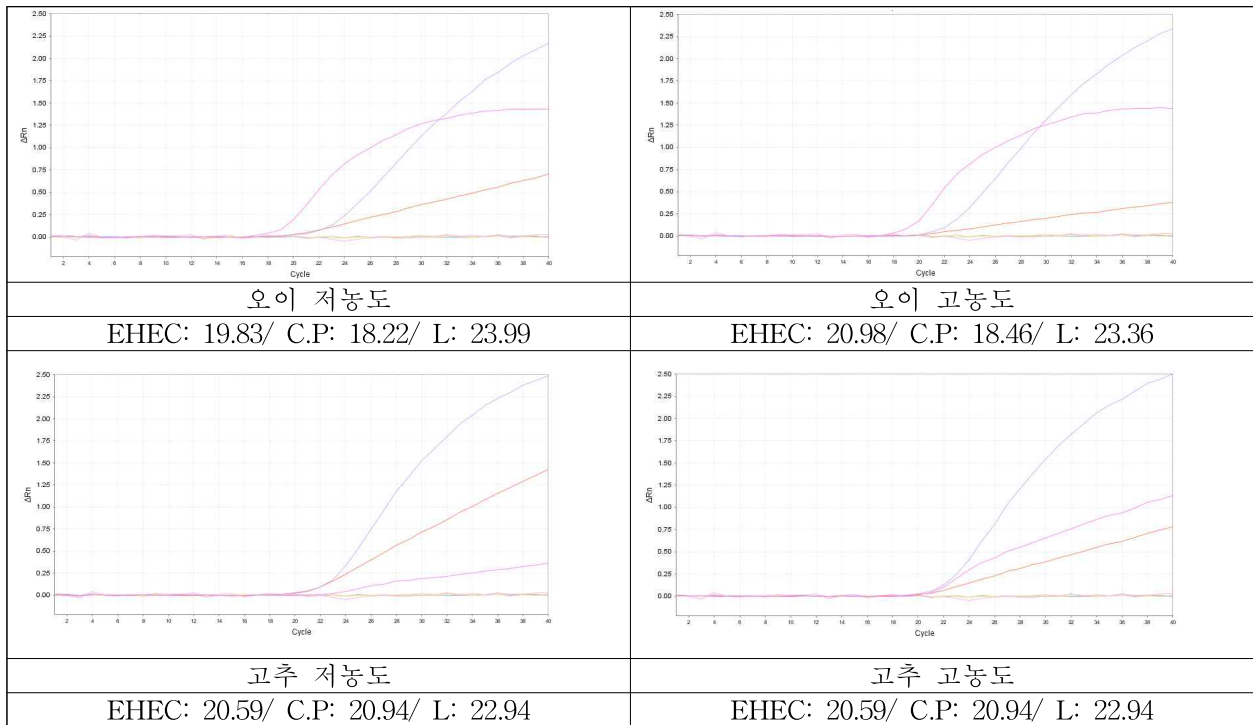
- 실험 식품은 오이 및 고추를 선정하였고 각 식품 샘플은 10 g에 해당 균액을 인위접종 후 세니젠에서 전달한 농산물에서 식중독 세균 신속 검출을 위한 실험 프로토콜에 따라 실험하였음



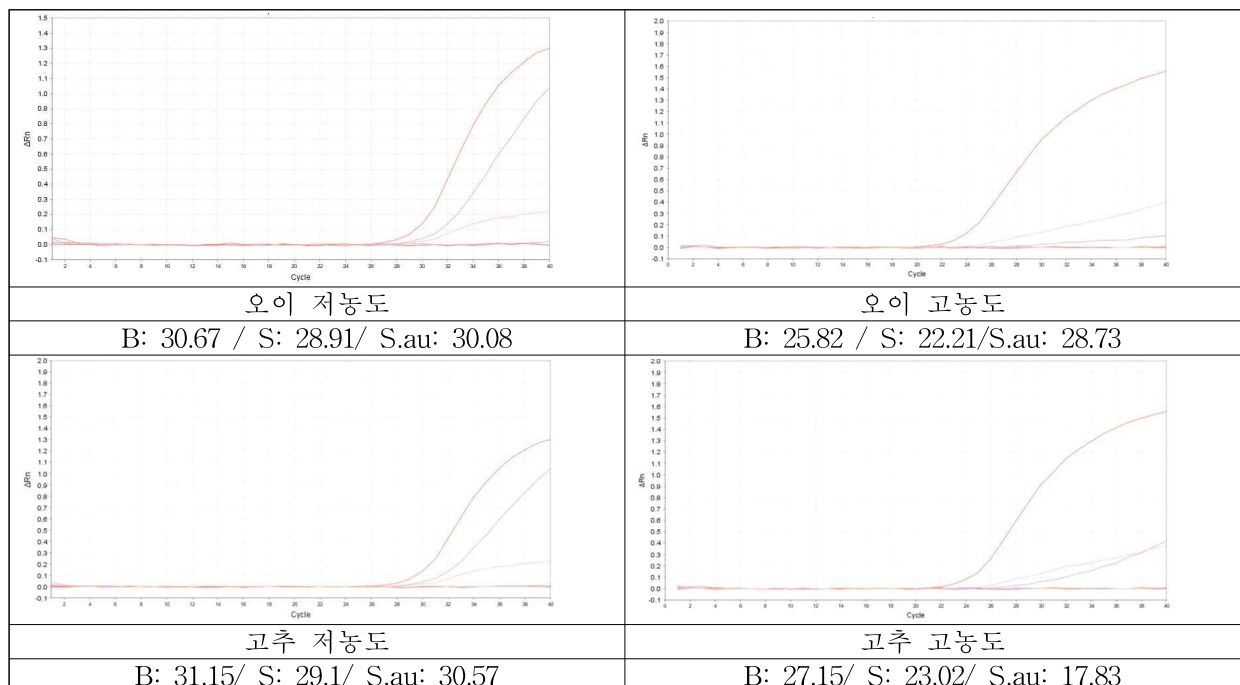
□ Multiplex real time PCR 결과

- 각 인위 접종한 증균배양액으로부터 1 ml를 추출하여 DNA 추출 후 해당 multiplex real time PCR group에 해당되는 균의 DNA 1 ul씩 섞어 총 3 ul의 반응 DNA를 만들었음
- 각 3 ul의 반응 DNA를 개발된 multiplex real time PCR kit 내 17 ul의 master mix와 섞어 Real time PCR 확인 결과 그래프 및 검출 ct값은 아래와 같음

① group 1



② group 2



□ 결론

- Group 1 및 Group 2의 8시간 이내 신속 검출 프로토콜에 따른 실험 결과 실험 샘플에 서는 모두 검출이 됨을 확인하였음
- 그러나 multiplex real time PCR 결과 일부 target의 증폭 signal이 약한데, 이는 DNA 추출이 제대로 되지 않았기 때문임
- Multiplex real time PCR 실험 시 DNA 추출 결과에 따른 영향이 있음을 확인하였으며, 적은 농도의 균이 접종된 경우 전처리 및 증균을 통해 식중독 세균의 신속검출이 가능 함을 확인하였음

라. 개발 기술의 상용화 및 수출기반 확립

- (1) 식중독균 총 6종을 동시 검출 가능한 2 그룹의 multiplex real time PCR kit 상용화 완료
- 제품의 구성에 Multiplex real time PCR kit의 총 2그룹 별로 positive control DNA를 포함하여 multiplex real time PCR master mix의 정상적인 작동 여부를 확인할 수 있도록 함
  - 사용자 편의를 고려하여 strip type으로 제품을 구성하여 사용자는 확인하고자 하는 샘플로부터 DNA만 추출하여 real time PCR을 진행할 수 있도록 함

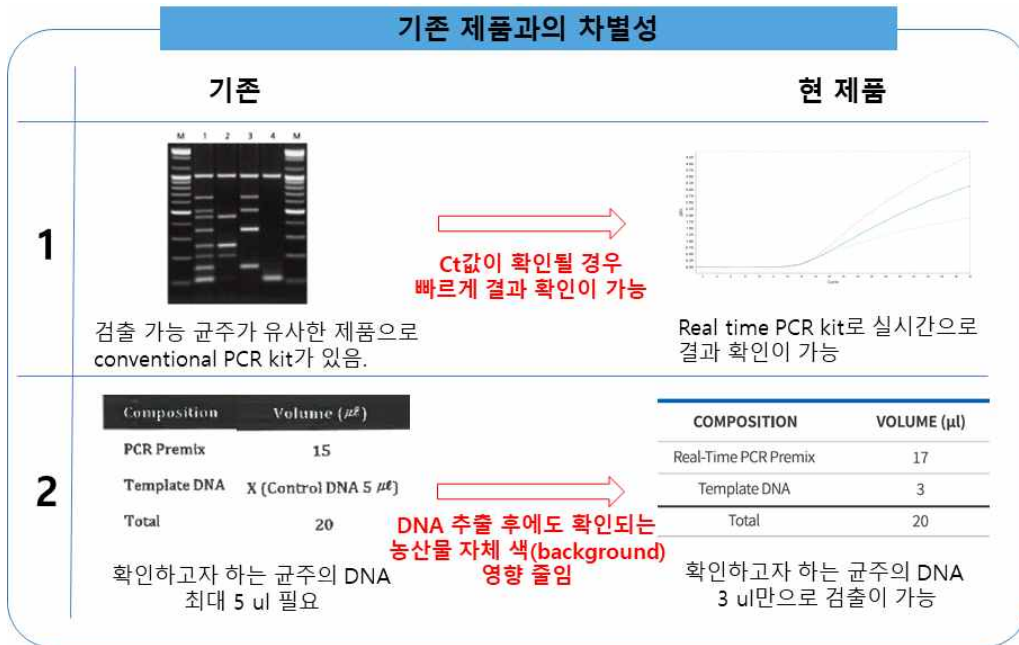


□ 개발된 본 제품은 기존 제품 대비 아래와 같은 차별성이 있음

(가) 기존 제품과의 차별성

① 실험의 편의성

- 본 과제를 통해 개발한 제품과 유사한 제품으로 A사의 multiplex PCR kit가 있음. conventional PCR 기술을 기반으로 한 A사의 제품의 경우, PCR이 완료된 후 전기영동을 통해 결과를 확인할 수 있음
- 반면 본 제품의 경우 multiplex real time PCR을 기반으로 실시간으로 PCR 진행과정을 확인할 수 있으며, 증폭 및 ct 값이 확인되는 경우 빠르게 결과 확인이 가능하며 PCR 산물에 대해 추가적인 실험이 필요 없음



② 시료 샘플에 의한 background 영향 줄임

- 색이 진한 식품 샘플로부터 DNA를 추출하여 PCR의 template으로 사용 시 PCR 반응액의 색이 변할 수 있음



그림 3-4-22. 샘플 DNA에 의해 변화된 PCR 반응액색

- 타사 제품에 비해 본사의 개발된 multiplex real time PCR kit는 적은 양의 DNA만으로 검출이 가능하도록 개발하였기 때문에 식품 샘플 자체의 색에 의한 background 영향을 낮출 수 있음

(나) 경제성

- multiplex real time PCR은 하나의 PCR 반응액에서 여러 target을 동시에 확인할 수 있는 장점이 있음
- Singlplex real time PCR에 비해 사용 샘플량 및 master mix의 사용량을 줄일 수 있으며, 실험 양을 줄일 수 있어 경제적임
- 타사 제품의 경우 소비자가 기준 30 만원 후반 대이나 본사 제품의 경우 소비자가 기준 30만원 중반대로 저렴함

(2) 매출액

- 2018년 2월 제품 출시 후 2018년 12월까지의 매출액은 19,120,000 원임

회사명 : 주식회사 세니젠 / Genetix™ Clostridium perfringens Real-time PCR Detection Kit / 2018(01)1 - 2018(12)17

순번	일자	내부코드	프린트	등록코드	종류명	규격명	단위	공급가격	취가세	합계	거래처코드	거래처명	담당자명
1	2018-02-08	A0041	SANGEN	GD11	Genetix™ Staphylococcus aureus Real-time PCR Detection Kit	488tp/kit	kit	290,000	25,000	275,000	99558	비알코리(여주)	윤세명
2	2018-03-07	A0043	SANGEN	GD12-2(V1 & V2)	Genetix™ EHEC Real-time PCR Detection Kit	488tp/kit	kit	840,000	84,000	924,000	04069	(주)그린유(여주)	전광일부장
3	2018-04-23	A0043	SANGEN	GD12-2(V1 & V2)	Genetix™ EHEC Real-time PCR Detection Kit	488tp/kit	kit	1,075,000	107,500	1,182,500	00777	주식회사 비연에스	전광일부장
4	2018-06-23	A0043	SANGEN	GD12-2(V1 & V2)	Genetix™ EHEC Real-time PCR Detection Kit	488tp/kit	kit	430,000	43,000	473,000	00777	주식회사 비연에스	전광일부장
5	2018-06-26	A0043	SANGEN	GD12-2(V1 & V2)	Genetix™ EHEC Real-time PCR Detection Kit	488tp/kit	kit	590,000	59,000	649,000	00549	(주)신화제약(여주)	이희복과장
6	2018-07-24	A0043	SANGEN	GD12-2(V1 & V2)	Genetix™ EHEC Real-time PCR Detection Kit	488tp/kit	kit	1,075,000	107,500	1,182,500	00777	주식회사 비연에스	전광일부장
7	2018-07-24	A0043	SANGEN	GD12-2(V1 & V2)	Genetix™ EHEC Real-time PCR Detection Kit	488tp/kit	kit	270,000	27,000	297,000	00926	주식회사 에스피씨삼립	김광민과장
8	2018-07-25	A0043	SANGEN	GD12-2(V1 & V2)	Genetix™ EHEC Real-time PCR Detection Kit	488tp/kit	kit	645,000	64,500	709,500	00777	주식회사 비연에스	전광일부장
9	2018-08-02	A0043	SANGEN	GD12-2(V1 & V2)	Genetix™ EHEC Real-time PCR Detection Kit	488tp/kit	kit	660,000	66,000	726,000	00777	주식회사 비연에스	전광일부장
10	2018-08-17	A0043	SANGEN	GD12-2(V1 & V2)	Genetix™ EHEC Real-time PCR Detection Kit	488tp/kit	kit	215,000	21,500	236,500	00777	주식회사 비연에스	전광일부장
11	2018-08-28	A0041	SANGEN	GD11	Genetix™ Staphylococcus aureus Real-time PCR Detection Kit	488tp/kit	kit	540,000	54,000	594,000	99843	(주)메스피라 지에프에스(용인시)	김정민과장
12	2018-09-06	A0043	SANGEN	GD12-2(V1 & V2)	Genetix™ EHEC Real-time PCR Detection Kit	488tp/kit	kit	645,000	64,500	709,500	00777	주식회사 비연에스	전광일부장
13	2018-09-14	A0043	SANGEN	GD12-2(V1 & V2)	Genetix™ EHEC Real-time PCR Detection Kit	488tp/kit	kit	270,000	27,000	297,000	03431	주식회사 산동식품	송유진부장
14	2018-10-16	A0032	SANGEN	GD03(ccp & cpe)	Genetix™ Clostridium perfringens Real-time PCR Detection Kit	488tp/kit	kit	250,000	25,000	275,000	00026	주식회사 에스피씨삼립	김광민과장
15	2018-10-16	A0043	SANGEN	GD12-2(V1 & V2)	Genetix™ EHEC Real-time PCR Detection Kit	488tp/kit	kit	810,000	81,000	891,000	00926	주식회사 에스피씨삼립	김광민과장
16	2018-10-16	A0038	SANGEN	GD09	Genetix™ Bacillus cereus Real-time PCR Detection Kit	488tp/kit	kit	250,000	25,000	275,000	00926	주식회사 에스피씨삼립	김광민과장
17	2018-10-23	A0043	SANGEN	GD12-2(V1 & V2)	Genetix™ EHEC Real-time PCR Detection Kit	488tp/kit	kit	860,000	86,000	946,000	00777	주식회사 비연에스	전광일부장
18	2018-10-23	A0043	SANGEN	GD12-2(V1 & V2)	Genetix™ EHEC Real-time PCR Detection Kit	488tp/kit	kit	1,350,000	135,000	1,485,000	00926	주식회사 에스피씨삼립	김광민과장
19	2018-10-23	A0009	SANGEN	GD09	Genetix™ Bacillus cereus Real-time PCR Detection Kit	488tp/kit	kit	750,000	75,000	825,000	00026	주식회사 에스피씨삼립	김광민과장
20	2018-11-09	A0043	SANGEN	GD12-2(V1 & V2)	Genetix™ EHEC Real-time PCR Detection Kit	488tp/kit	kit	645,000	64,500	709,500	00777	주식회사 비연에스	전광일부장
21	2018-11-14	A0043	SANGEN	GD12-2(V1 & V2)	Genetix™ EHEC Real-time PCR Detection Kit	488tp/kit	kit	1,350,000	135,000	1,485,000	00926	주식회사 에스피씨삼립	김광민과장
22	2018-11-15	A0043	SANGEN	GD12-2(V1 & V2)	Genetix™ EHEC Real-time PCR Detection Kit	488tp/kit	kit	910,000	91,000	991,000	000272	주식회사 에스피씨삼립	전광일부장
23	2018-11-15	A0043	SANGEN	GD12-2(V1 & V2)	Genetix™ EHEC Real-time PCR Detection Kit	488tp/kit	kit	270,000	27,000	297,000	000272	주식회사 에스피씨삼립	전광일부장
24	2018-11-21	A0043	SANGEN	GD12-2(V1 & V2)	Genetix™ EHEC Real-time PCR Detection Kit	488tp/kit	kit	270,000	27,000	297,000	99968	비알코리(여주)	윤희영
25	2018-11-21	A0043	SANGEN	GD12-2(V1 & V2)	Genetix™ EHEC Real-time PCR Detection Kit	488tp/kit	kit	645,000	64,500	709,500	00777	주식회사 비연에스	전광일부장
26	2018-11-21	A0041	SANGEN	GD11	Genetix™ Staphylococcus aureus Real-time PCR Detection Kit	488tp/kit	kit	425,000	42,500	467,500	00777	주식회사 비연에스	전광일부장
27	2018-11-29	A0043	SANGEN	GD12-2(V1 & V2)	Genetix™ EHEC Real-time PCR Detection Kit	488tp/kit	kit	645,000	64,500	709,500	00777	주식회사 비연에스	전광일부장
28	2018-12-07	A0043	SANGEN	GD12-2(V1 & V2)	Genetix™ EHEC Real-time PCR Detection Kit	488tp/kit	kit	1,350,000	135,000	1,485,000	00926	주식회사 에스피씨삼립	김광민과장
29	2018-12-11	A0043	SANGEN	GD12-2(V1 & V2)	Genetix™ EHEC Real-time PCR Detection Kit	488tp/kit	kit	1,075,000	107,500	1,182,500	00777	주식회사 비연에스	전광일부장
합계								19,120,000	1,912,000	21,032,000			

위탁방식 사상을 확인함 (인)

○ 주로 식품 제조 업체에 판매가 되었으나, 추후 식품 제조 업체 및 관련 검사 기관 등의 매출 발생을 기대함

구분		(2018년)	(2019년)	(2020년)	(2021년)
		수행 기간 내	종료 후 1년	종료 후 2년	종료 후 3년
국내	시장점유율(%)	1.0	1.2	1.5	2.0
	판매량(단위:Kit)	55	100	200	400
	판매단가(원)	350,000	350,000	350,000	350,000
해외	국내매출액(백만원)	19	35	70	140
	시장점유율(%)	-	-	-	-
	판매량(단위:Kit)	-	-	-	-
	판매단가(\$)	-	-	-	-
	해외매출액(만\$)	-	-	-	-

□ 홍보 관련

○ 상품화 완료 후 2018년 6월 26일부터 29일까지 여수에서 개최된 한국미생물생명공학회 및 부산 한국식품과학회 전시에 참가하여 제품 홍보를 하였음



전시회 부스 내 키트 모형 및 브로셔 전시

3-5. 농산물에서 주요 5종 바이러스의 신속검출을 위한 PCR kit 개발 및 상용화

3-5 연구요약

- Adenovirus, Astrovirus, Rotavirus, hepatitis A virus, Norovirus 5종 검출용 PCR primer를 탐색하고 최적 primer를 개발 및 선정함
- PCR product 표지법을 개발을 위해 저분자물질에 대한 항체(Digoxigenin, Biotin)를 개발하고 이를 이용하여 래피드 PCR 키트를 개발하였으며 최적 조건을 확립하였음
- 바이러스 검출 시간 단축을 위한 PCR 반응시간 단축 및 면역자기분리법(IMS)을 통한 전처리 개선 방법을 연구함

1. 식중독 바이러스 5종 신속검출 PCR 최적조건 확립

가. 위해 식중독 바이러스 5종에 대한 신속검출 PCR 마커 탐색 및 최적조건 확립

(1) 위해 식중독 바이러스 유전자 탐색

(가) National Center for Biotechnology Information (NCBI)에서 위해 식중독 바이러스 5종 (Norovirus, Rotavirus, Hepatitis A virus, Adenovirus, Astrovirus)에 대한 유전정보를 탐색하였음. Norovirus GI 10 종, GII 10 종, Rotavirus 8 종, Hepatitis A virus 9 종, A denovirus 11 종, Astrovirus 8 종을 무작위로 선정하여 핵산염기서열을 확보함. 각 바이러스의 GenBank 번호는 표 3-5-1과 같음

표 3-5-1. 본 연구의 핵산염기서열 분석에 사용된 위해 식중독 바이러스 GenBank 번호

Noro GI	Noro GII	Rota	HAV	Adeno	Astro
KF429765.1	KT779557.1	KP883198.1	AB279735.1	AB330121.1	DQ070852.1
KF039725.1	KF944111.3	X99126.1	AB279732.1	L19443.1	DQ344027.1
KF429789.1	KU561251.1	AB012079.1	AY644670.1	NC001454.1	AY720891.1
KF429783.1	KU561256.1	EF199724.1	KP879216.1	KU162869.1	FJ375759.1
KF429774.1	KT970377.1	AY816182.1	M14707.1	KF303071.1	KF211475.1
KF429773.1	KP998539.1	AY740736.1	KP879217.1	KF303069.1	AY720892.1
KF429737.1	KX079488.1	AY816184.1	EU251188.1	AB728839.1	NC001943.1
KJ196292.1	NC029646.1	AB272753.1	KP177964.1	AB610527.1	HQ398856.2
KP407450.1	KT202798.1		EU526088.1	AB610521.1	
KJ196298.1	KM272334.1			AB330122.1	
				HM56136.3	

(나) 신규 PCR 마커 (primer) 탐색

- 1) Clustal Omega 및 Primer blast를 이용하여 각각 10종의 노로바이러스 (GI 형, GII 형) 유전자 서열을 분석하고 상동성있는 부위를 선택하여 primer를 선정하였음(그림 3-5-1, 2). 선정 기준은 다음과 같음
- 가) Nested PCR이 가능한 부위일 것
- 나) Primer 길이: 20 bp 내외
- 다) Tm: 50-60℃

- 라) GC contents: 40-60%
- 마) PCR product: 약 200-600 bp



그림 3-5-1. Primer Blast를 이용한 Norovirus GI형 primer 디자인



그림 3-5-2. Primer Blast를 이용한 Norovirus GII형 primer 디자인

2) 그 결과 norovirus GI형 one-step RT-PCR 용 primer 2쌍(GI-F1, GI-R1; GI-F2, GI-R2), nested PCR 용 primer 1쌍(GI-nF1, GI-nR1), semi-nested PCR 용 1개 (GI-nF2)를 선정하였음. 또한, norovirus GII형 one-step RT-PCR 용 primer 1쌍 (GII-F1, GII-R1), semi-nested PCR 용 1개 (GII-nR1)를 선정하였음 (표 3-5-2)

표 3-5-2. Norovirus PCR primer

Type	프라이머	염기서열 (5' → 3')	적용	크기
GI	GI-F1	GACATGATCGAATTCTATGAAGG	One-step RT-PCR	146
	GI-R1	CCCATGAACGTCCTCAATCACA		
	GI-nF1	AAAGAATTAGAAAATGAACCATGGC	Nested PCR	
	GI-nR1	CAATCTTGGGTCTGGGTGG		
GI	GI-F2	GACAGGAGATCGCAATCT	One-step RT-PCR	321
	GI-R2	CCAACCCAACCATTATACAT	One-step RT-PCR	
	GI-nF2	GTAATGATGATGGCGTCTAAG	Semi-nested PCR	
GII	GII-F1	GGTATGAATATGAATGAGGATGGCCC	One-step RT-PCR	850
	GII-R1	GTCATTCGACGCCATCTTCATTCAC	One-step RT-PCR	
	GII-nR1	GAGCCAGATTGCGATCGCC	Semi-nested PCR	

3) 노로바이러스의 전체 유전자 서열은 약 7,800 bp였으며 디자인한 primer 위치는 그림 3-5-3과 같음



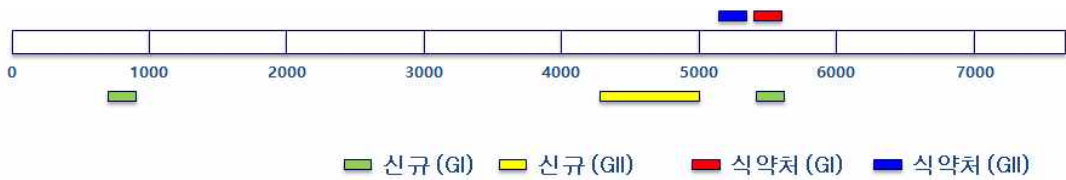


그림 3-5-3. 노로바이러스의 식품의약품안전처 및 신규 primer 위치

4) Clustal Omega 및 primer blast를 이용하여 9종의 A형 간염바이러스 유전자 서열을 분석하고 상동성있는 부위를 선택하여 primer를 선정하였음 (그림 3-5-4). 선정 기준은 다음과 같음.

- 가) Nested PCR이 가능한 부위일 것
- 나) Primer 길이: 20 bp 내외
- 다) Tm: 50-60℃
- 라) GC contents: 40-60%
- 마) PCR product: 약 200-600 bp



그림 3-5-4. Primer Blast를 이용한 A형 간염바이러스 primer 디자인

5) 그 결과 one-step RT-PCR 용 primer 2쌍(HAV F1, HAV R1; HAV F2, HAV R2), nested PCR 용 primer 2쌍(HAV nF1, HAV nR1; HAV nF2, HAV nR2)을 선정하였음 (표 3-5-3)

표 3-5-3. Hepatitis A virus PCR primer

프라이머	염기서열	적용	크기
HAV F1	CAGACTGTTGGGAGTGG	One-step RT-PCR	223
HAV R1	ACATCCAATTTTGCAACTTCATG		
HAV nF1	CCACATCCTGTCTTTGGCAGA	Nested PCR	
HAV nR1	CCAATCAGCAGAATGAATCAGGAAA		
HAV F2	CCTACAATTCCAAAATTTAGAGATAT	One-step RT-PCR	217
HAV R2	GGAGACCACATTCATTGAAC		
HAV nF2	CCTATGTTAATTTCTGAGGGACC	Nested PCR	
HAV nR2	AATTGAATTTGGTCCAGCAACATG		

6) A형 간염바이러스의 전체 유전자 서열은 약 7,500 bp였으며 디자인한 primer 위치는 그림 3-5-5과 같음

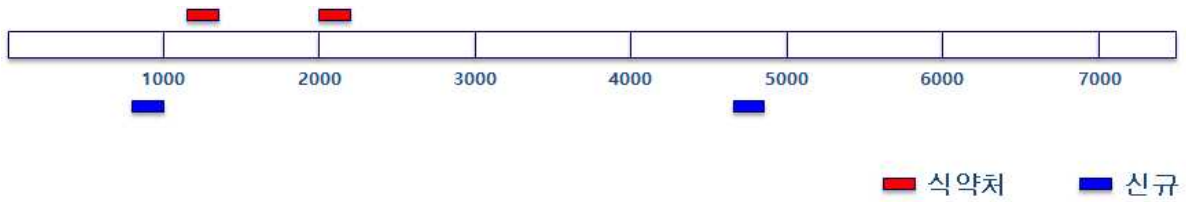


그림 3-5-5. A형간염바이러스의 식품의약품안전처 및 신규 primer 위치

7) Clustal Omega 및 primer blast를 이용하여 11종의 아데노바이러스 Hexon 유전자 서열을 분석하고 상동성 있는 부위를 선택하여 primer를 선정하였음 (그림 3-5-6). 선정기준은 다음과 같음

- 가) Primer 길이: 20 bp 내외
- 나) Tm: 50-60°C
- 다) GC contents: 40-60%
- 라) PCR product: 약 200-600 bp



그림 3-5-6. Primer Blast를 이용한 아데노바이러스 primer 디자인

8) 그 결과 PCR 용 primer 2쌍(Adeno F1, Adeno R1; Adeno F2, Adeno R2)을 선정하였음 (표 3-5-4)

표 3-5-4. Adenovirus PCR primer

프라이머	염기서열	적용	크기
Adeno F1	CAGCACCTACTTTGACATCCG	PCR	263
Adeno R1	CCACTTGAGGCTCTGGTTG		
Adeno F2	TTCGGGCACTGCATACT	PCR	814
Adeno R2	GCAATAGTTGGGGAGCTCGT		

9) 아데노바이러스 Hexon 유전자 염기 서열은 약 2,800 bp였으며 디자인한 primer 위치는 그림 3-5-7과 같음



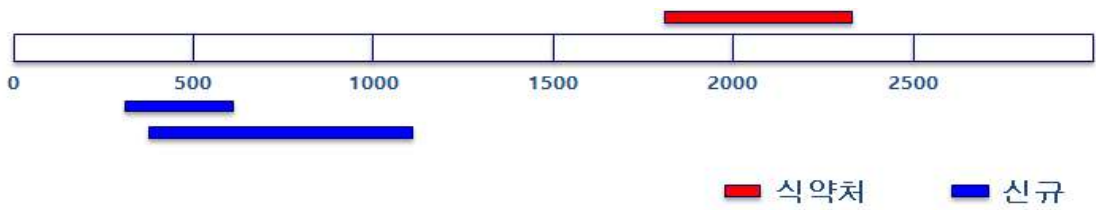


그림 3-5-7. 아데노바이러스의 식품의약품안전처 및 신규 primer 위치

10) Clustal Omega 및 primer blast를 이용하여 8종의 아스트로바이러스 유전자 서열을 분석하고 상동성있는 부위를 선택하여 primer를 선정하였음 (그림 3-5-8). 선정 기준은 다음과 같음

- 가) Primer 길이: 20 bp 내외
- 나) Tm: 50-60°C
- 다) GC contents: 40-60%
- 라) PCR product: 약 200-600 bp



그림 3-5-8. Primer Blast를 이용한 아스트로바이러스 primer 디자인

11) 그 결과 RT-PCR 용 primer 2쌍(Astro F1, Astro R1; Astro F2, Astro R2)을 선정하였음 (표 3-5-5)

표 3-5-5. Astrovirus PCR primer

프라이머	염기서열	적용	크기
Astro F1	GGTTGGTGATGATGTAGAATTTG	RT-PCR	354
Astro R1	GCATCATCCTCATCCAGTC		
Astro F2	CCTTCGGTGCCCGATGATTA	RT-PCR	361
Astro R2	CTGTGAGTCTGGCTGGAAGG		

12) 아스트로바이러스 유전자 염기 서열은 약 6,900 bp였으며 디자인한 primer 위치는 그림 3-5-9와 같음

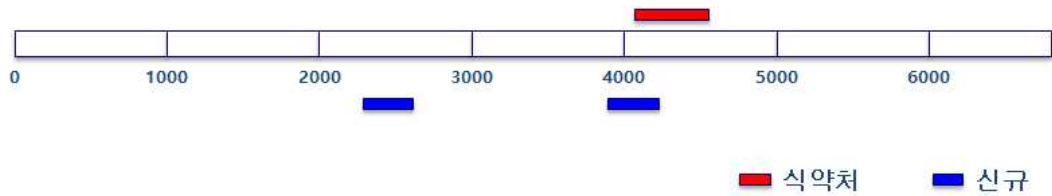


그림 3-5-9. 아스트로바이러스의 식품의약품안전처 및 신규 primer 위치

13) 로타바이러스의 VP7 유전자 상동성을 비교한결과 식품의약품안전처의 식중독 원인조사 검사지침에서 제공하는 Primer 외에 VP7을 검출하는 적절한 primer set을 찾을 수 없었음. 따라서 로타바이러스의 경우 식품의약품안전처가 제공하는 primer를 사용하였음

(다) A형 간염 바이러스 배양

1) A형 간염 바이러스를 African green monkey 신장세포인 Vero 세포에 감염시켜 증식시키고 RT-PCR을 통하여 바이러스의 증식 여부를 확인하였음. 증식여부는 RT-PCR 및 PCR을 통하여 확인하였음. RT-PCR시 식품의약품안전처 및 식품공전에서 제시하는 HAV 용 reverse primer (HAV 2, BR9) 및 본 연구를 통하여 새로 디자인한 primer (HAV R1, HAV R2)를 사용하였음 (표 3-5-3). PCR 결과 그림 3-5-10, 11과 같이 약 250, 360, 290, 440 bp 크기의 HAV 유전자가 증폭됨을 확인하였음

표 3-5-5. 식품의약품안전처 식중독 원인조사 검사지침의 HAV primer set

프라이머	염기서열	적용	크기
HAV1	GCTCCTCTTTATCATGCTATGGAT	One-step RT-PCR	244
HAV2	CAGGAAATGTCTCAGGTACTIONTCT		
HAV3	ATGTTACTACACAAGTTGGAGAT	Nested PCR	186
HAV4	GATCCTCAATTGTTGTGATAGCT		
BR5	TTGTCTGTCACAGAACAATCAG	One-step RT-PCR	361
BR9	AGTCACACCTCTCCAGGAAAACCTT		
RJ3	TCCCAGAGCTCCATTGAA	Nested PCR	234
BR6	AGGAGGTGGAAGCACTTCATTTGA		

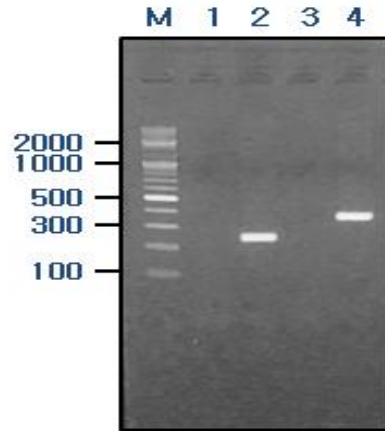


그림 3-5-10. 바이러스 배양액으로부터 HAV 바이러스 유전자 증폭 M: DNA marker; 1: un-infected vero cell (HAV1, HAV2 primer); 2: HAV-infected vero cell (HAV1, HAV2 primer); 3: un-infected vero cell (BR5, BR9 primer); 4: HAV-infected vero cell (BR5, BR9 primer)

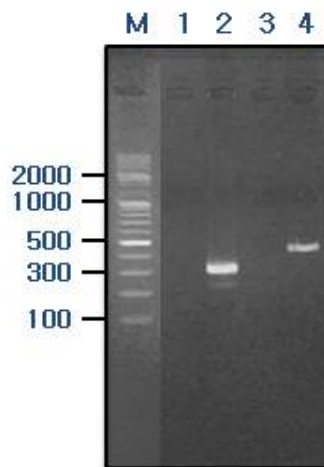


그림 3-5-11. 바이러스 배양액으로부터 HAV 바이러스 유전자 증폭 M: DNA marker; 1: un-infected vero cell (HAV F1, HAV R1 primer); 2: HAV-infected vero cell (HAV F1, HAV R1 primer); 3: un-infected vero cell (HAV F2, HAV R2 primer); 4: HAV-infected vero cell (HAV F2, HAV R2 primer)

(라) PCR 산물을 이용한 양성 대조물질 확보

- 1) A형 간염 바이러스 PCR 조건 확립, 검출한계 측정 그리고 PCR 시 양성 대조 물질로 사용하기 위하여 A형 간염 바이러스 PCR 산물을 클로닝하였음. HAV2, BR9, HAV R1, HAV R2 primer를 이용하여 cDNA를 합성 후 표 3-5-6과 같은 조성으로 PCR 반응액을 만들고 (TaKaRa) PCR을 수행하였음

표 3-5-6. HAV 양성 대조물질 클로닝을 위한 PCR 반응액 조성

	Name	volume
Template	c DNA	3 ul
F primer	HAV1, BR5, HAV F1, HAV F2	2 ul
R primer	HAV2, BR9, HAV R1, HAV R2	2 ul
10X buffer		5 ul
dNTP		8 ul
MgCl <sub>2</sub>		5 ul
LA Taq polymerase		1 ul
dH <sub>2</sub> O		24 ul

2) 그림 3-5-12, 13 같이 HAV1, HAV2 primer를 사용한 경우 약 240 bp, BR5, BR9 primer를 이용한 경우 약 360 bp, HAV F1, HAV R1 primer를 이용한 경우 약 290 bp 그리고 HAV F2, HAV R2 primer를 이용한 경우 약 440 bp의 PCR 산물을 확인할 수 있었음. Gel extraction kit (m biotech)을 이용하여 각각의 PCR 산물을 gel로부터 분리정제하고 T-vector (Promega)에 T4 DNA ligase를 이용하여 삽입하였음

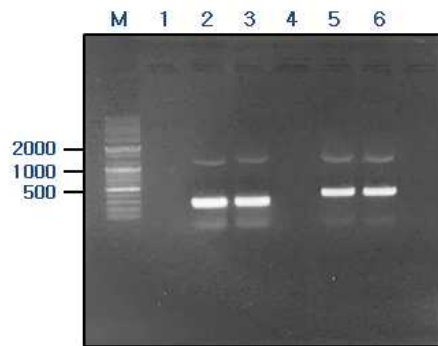


그림 3-5-12. HAV PCR product. M: DNA marker; 2,3: HAV 1, HAV 2 primer; 5,6: BR5, BR9 primer

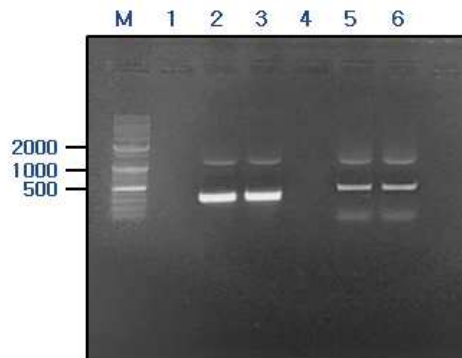


그림 3-5-13. HAV PCR product. M: DNA marker; 2,3: HAV F1, HAV R1 primer; 5,6: HAV F2, HAV R2 primer

3) T-vector에 ligation 된 각각의 DNA를 *E. coli*에 형질전환 시키고 형질 전환체를 선별 후 plasmid DNA를 prep 후 제한효소 처리를 하여 vector DNA에 insert DNA가 삽입되었는지 확인하였음 (그림 3-5-14). HAV1, HAV2 primer로 증폭된 DNA가 삽입된 벡터를 T-HAV 1/2; BR5, BR9 primer로 증폭된 DNA가 삽입된 벡터를 T-HAV BR5/BR9; HAV F1, HAV R1 primer로 증폭된 DNA가 삽입된 벡터를 T-HAV F1/R1; HAV F2, HAV R2 primer로 증폭된 DNA가 삽입된 벡터를 T-HAV F2/R2라 명하였음

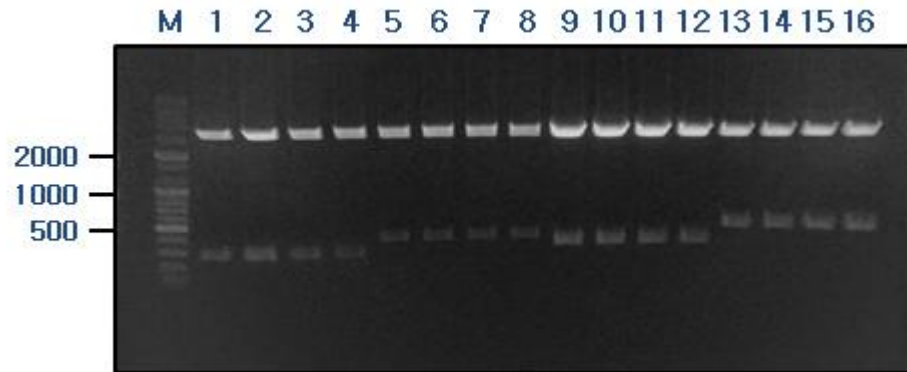


그림 3-5-14. T-vector에 삽입된 HAV 유전자 M: DNA marker; 1-4: T-HAV 1/2; 5-8: T-HAV BR5/BR9; 9-12: T-HAV F1/R1; 13-16: T-HAV F2/R2

(마) PCR 최적 조건확립

1) A형 간염 바이러스 유전자 증폭용 각 primer를 이용한 최적의 PCR조건을 확립하기 위하여 상기 연구를 통해 얻은 A형 간염바이러스 유전자가 삽입된 벡터를 사용하였음. Plasmid DNA의 copy 수를 결정하기 위하여 prep한 plasmid DNA의 농도를 nano photometer를 이용하여 측정하였음. 단위부피당 DNA copy 수는 다음 공식을 이용하여 계산하였음

$$\frac{(\text{ng DNA} \times \text{Avogadro's number}(6.022 \times 10^{23}))}{\text{length of DNA (bp)} \times 1 \times 10^9 \times 650}$$

2) Annealing 온도 조건확립

가) 상기에서 확보한 A형 간염바이러스 유전자가 삽입된 plasmid DNA를 위 계산법에 의해 단위부피당 DNA copy 수를 계산 후  $1 \times 10^4$  copies/ul 또는  $1 \times 10^9$  copies/ul로 희석 하고 PCR 온도 조건확립 실험에 사용하였음. 새로 디자인한 HAV F1, HAV R1; HAV F2, HAV R2; HAV nF1, HAV nR1; HAV nF2, HAV nR2 primer set을 이용한 PCR시 Annealing 온도 조건을 확립하기 위하여 PCR 수행 시 annealing 온도를 45-65°C로 다양하게 조절 한 후 PCR 산물을 agarose 전기영동으로 분석하였음 (그림 3-5-15). 전기영동 분석 결과 및 primer Tm 값을 고려하여 HAV F1, HAV R1 primer는 56°C, HAV F2, HAV R2 primer는 52°C, HAV nF1, HAV nR1 primer는 54°C, HAV nF2, HAV nR2 primer는 56°C로 Annealing 온도를 정하였음. 이 후 실험은 본 실험결과를 바탕으로 상기 조건하에서 진행하였음

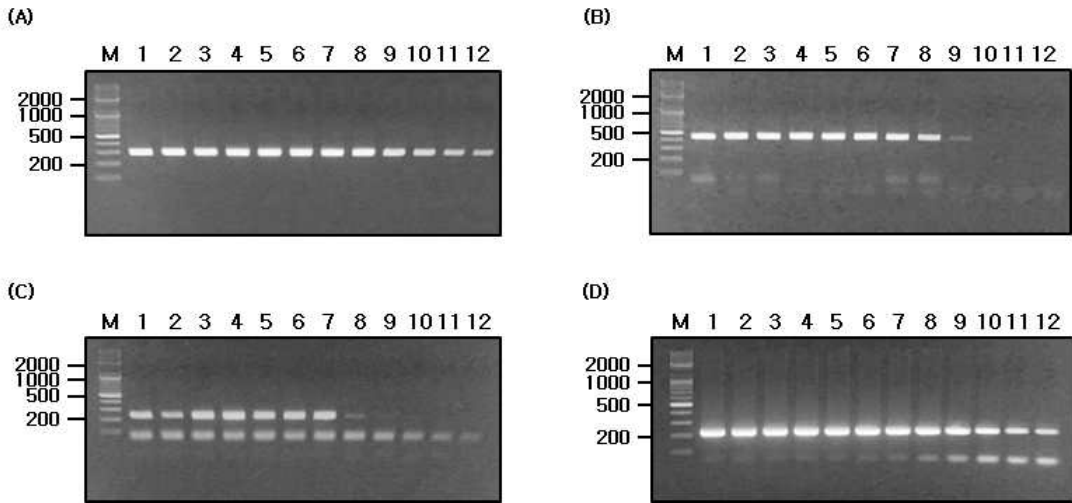


그림 3-5-15. Annealing 온도에 따른 PCR 산물 검출. (A): HAV F1, HAV R1; (B): HAV F2, HAV R2; (C): HAV nF1, HAV nR1; (D): HAV nF2, HAV nR2 primer set, 1-10: 45-65°C

### 3) 검출한계 측정

가) A형 간염바이러스 유전자가 삽입된 plasmid DNA를 단위부피당 DNA copy 수를 계산 후  $1 \times 10^6$  copies/ul 로 희석 하고 1/10씩 단계적으로 희석하여 다음 실험에 사용하였음. 우선, 식품의약품안전처에서 제시하는 primer set (표 3-5-5)으로 PCR하고 검출 한계를 측정하였음 (그림 3-5-16, 17). 주형은 상기 클로닝을 통하여 확보한 T-HAV 1/2, T-HAV BR5/BR9 DNA를 사용하였음. PCR 반응조건은 94°C에서 5분간 DNA를 변성 시키고 94°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 30초를 1회로 하여 30회를 반응시킨 후 72°C에서 5분간 연장 반응하였음. Nested PCR시에는 1차 PCR산물 1 ul를 주형으로 이용하였고 PCR 반응조건은 상기와 동일함. 실험 결과 HAV1, HAV2 primer를 이용한 1차 PCR 산물은  $1 \times 10^3$  copies까지 검출 하였고 HAV3, HAV4 primer를 이용한 nested PCR 산물은 10 copies까지 검출 가능하였음 (그림 3-5-16)

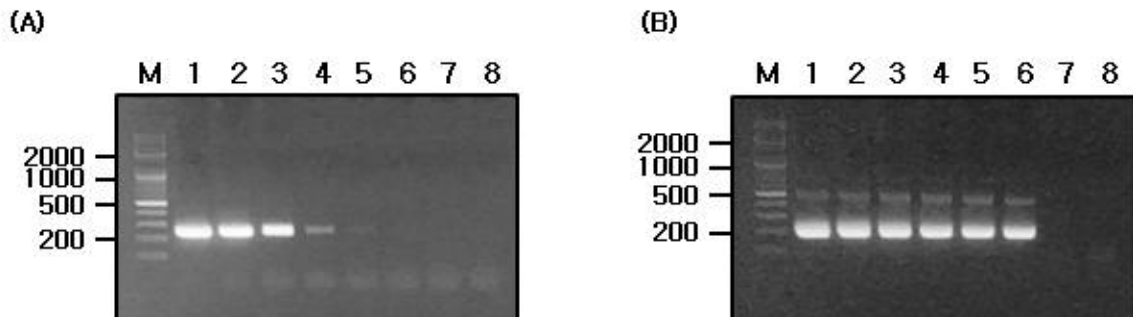


그림 3-5-16. HAV1, HAV2; HAV3, HAV4 primer를 이용한 A형 간염바이러스 유전자 검출한계 측정. (A): 1차 PCR, (B): Nested PCR. M: DNA marker; 1-7:  $1 \times 10^6$ -1 copies; 8: Negative control.

나) BR5, BR9 primer를 이용한 1차 PCR 산물은  $1 \times 10^3$  copies까지 검출 하였고 RJ3, BR6 primer를 이용한 nested PCR 산물은 1 copies까지 검출 가능하였음 (그림 3-5-17)

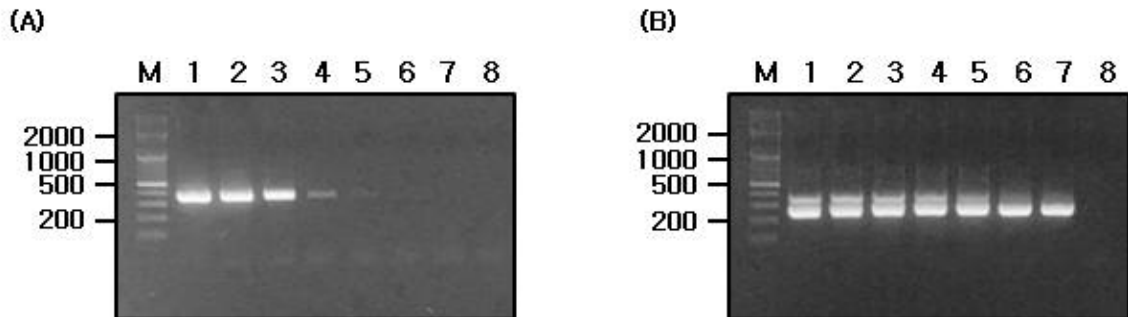


그림 3-5-17. BR5, BR9; RJ3, BR6 primer를 이용한 A형 간염바이러스 유전자 검출한계 측정. (A): 1차 PCR, (B): Nested PCR. M: DNA marker; 1-7:  $1 \times 10^6$ -1 copies; 8: Negative control.

다) HAV F1, HAV R1 primer를 이용한 1차 PCR 산물은  $1 \times 10^3$  copies까지 검출 하였고 HAV nF1, HAV nR1 primer를 이용한 nested PCR 산물은 1 copies까지 검출 가능하였음 (그림 3-5-18)

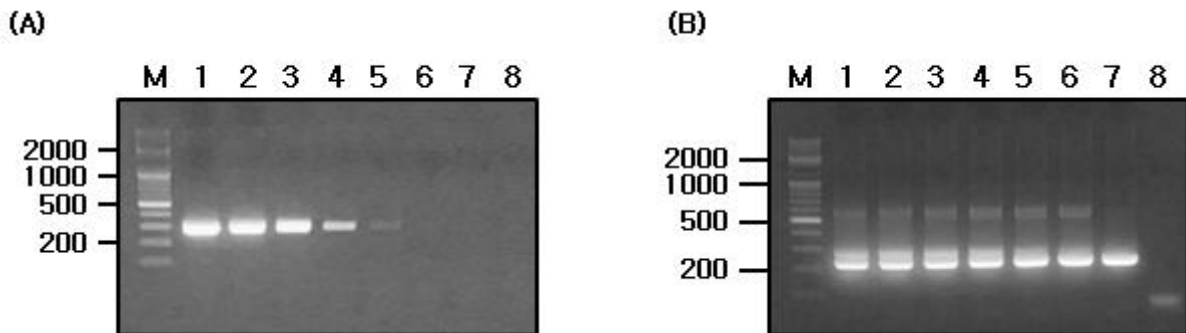


그림 3-5-18. HAV F1, HAV R1; HAV nF1, HAV nR1 primer를 이용한 A형 간염 바이러스 유전자 검출한계 측정. (A): 1차 PCR, (B): Nested PCR. M: DNA marker; 1-7:  $1 \times 10^6$ -1 copies; 8: Negative control.

라) HAV F2, HAV R2 primer를 이용한 1차 PCR 산물은  $1 \times 10^3$  copies까지 검출 하였고 HAV nF2, HAV nR2 primer를 이용한 nested PCR 산물은 10 copies까지 검출 가능하였음 (그림 3-5-19)

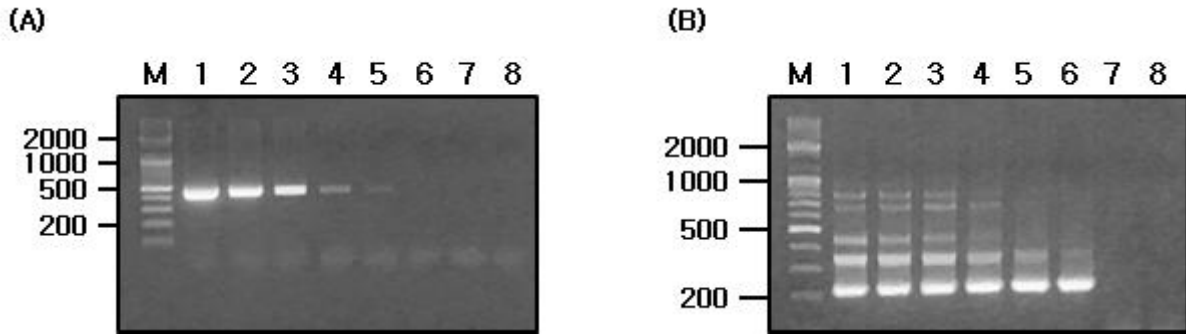


그림 3-5-19. HAV F2, HAV R2; HAV nF2, HAV nR2 primer를 이용한 A형 간염 바이러스 유전자 검출한계 측정. (A): 1차 PCR, (B): Nested PCR. M: DNA marker; 1-7:  $1 \times 10^6$ -1 copies; 8: Negative control.

마) A형 간염 바이러스 유전자 증폭시 1차 PCR 산물은 식약처에서 제공하는 primer와 본 연구를 통하여 디자인한 primer 모두  $1 \times 10^3$  copies에서 PCR 증폭산물이 명확히 관찰되어  $1 \times 10^3$  copies의 검출한계를 나타내었음. Nested PCR 결과 primer에 따라 1 copy 또는 10 copies로 검출 한계가 측정되었으나 1 copy의 경우 1 ul에 1 copy의 DNA가 반드시 존재한다고 볼 수 없으므로 네 가지 primer set 모두 1 copy의 검출한계를 가질 것으로 예상하였음. HAV nF2, HAV nR2 primer로 nested PCR시 타겟 밴드 이외의 다른 밴드가 관찰되었음. 실제 바이러스를 이용한 실험 결과를 추적할 필요가 있을 것으로 생각됨

#### 4) Digoxigenin, Biotin 단일클론 항체 생산

가) Digoxigenin 및 Biotin에 특이적인 항체를 개발하기 위하여 Digoxigenin-BSA conjugate, Biotin-BSA conjugate를 만들었음. 이 후 상기와 같은 방법으로 하이브리도마 세포를 만들었으며 ELISA (Enzyme-linked Immunosorbant Assay)를 통하여 Digoxigenin 및 biotin에 특이적인 IgG 항체를 생산하는 세포를 스크리닝 하여 선별하였음. 1차적으로 스크리닝 한 세포를 한계희석법으로 희석하고 배양 후 2차 스크리닝을 통하여 단일클론 항체를 생산하는 세포를 분리하였음. 선별한 anti-Digoxigenin 항체는 10종, anti-Biotin 항체는 4종임

## 2. 5종 식중독 바이러스 신속검출 전처리 방법 개선 및 래피드 PCR 키트 개발

### 가. 바이러스 PCR 조건 확립

#### (1) 바이러스를 이용한 PCR primer 성능 시험

(가) 1차년도 연구를 통하여 개발한 식중독 5종 바이러스 신규 프라이머를 이용하여 실제 바이러스에서 PCR을 통한 유전자 증폭이 되는지를 확인함

##### 1) Adenovirus

가) 병원성 바이러스은행으로부터 바이러스를 분양 받은 후 DNA를 추출하고 식약처 프라이머(AD1, AD2)와 본 연구를 통하여 신규 디자인한 프라이머(Adeno F1, Adeno R1/A



deno F2, Adeno R2)를 이용하여 PCR을 수행하였음. 그 결과 식약처 프라이머를 이용한 경우에만 약 500 bp의 DNA 증폭 산물을 확인할 수 있었음(그림 3-5-20).

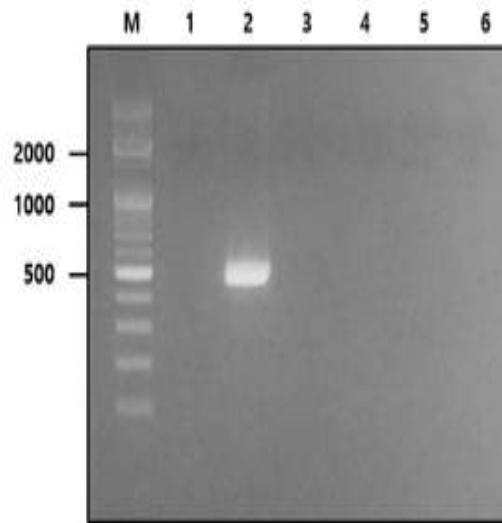


그림 3-5-20. Adenovirus PCR 결과. M: 100 bp DNA ladder; Lane 1: 식약처 AD1, AD2 primer(negative control); Lane 2: 식약처 AD1, AD2 primer(virus sample); Lane 3: Adeno F1, Adeno R1 primer(negative control); Lane 4: Adeno F1, Adeno R1 primer(virus sample); Lane 5: Adeno F2, Adeno R2 primer(negative control); Lane 6: Adeno F2, Adeno R2 primer(virus sample)

## 2) Norovirus (GII)

가) 주관기관으로부터 바이러스 배양액을 분양 받아 RNA를 추출하고 RT-PCR로 cDNA를 합성함. 식약처 primer(GII-F1M, GII-R1M(1차 PCR)/GII-F3M, GII-R1M(Semi-nested PCR))와 본 연구를 통하여 신규 디자인한 프라이머(NoroGII F1, NoroGII R1(1차 PCR)/NoroGII F1, NoroGII nR1(Semi-nested PCR))를 이용하여 PCR을 수행하였음. 그 결과 식약처 primer를 사용한 경우 1차 PCR에서 약 350 bp, semi-neste PCR에서 약 310 bp의 DNA 증폭산물을 확인하였고, 신규 primer를 이용한 경우 semi-nested PCR에서 약 850 bp의 DNA 증폭 산물을 확인할 수 있었음(그림 3-5-21)

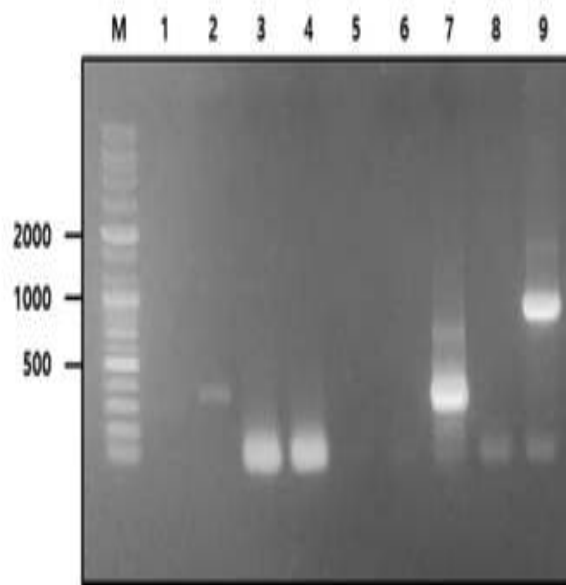


그림 3-5-21. Norovirus (GII) PCR 결과. M: 100 bp DNA ladder; Lane 1: 식약처 1차(GII-F1M, GII-R1M) primer(negative control); Lane 2: 식약처 1차(GII-F1M, GII-R1M) primer(virus sample); Lane 3: 신규 1차(NoroGII F1, Noro GII R1) primer(negative control); Lane 4: 신규 1차(NoroGII F1, Noro GII R1) primer(virus sample); Lane 6: 식약처 semi-nested(GII-F3M, GII-R1M) primer(negative control); Lane 7: 식약처 semi-nested(GII-F3M, GII-R1M) primer(virus sample); Lane 8: 신규 semi-nested(NoroGII F1, NoroGII nR1) primer(negative control); Lane 9: 신규 semi-nested(NoroGII F1, NoroGII nR1) primer(virus sample)

### 3) Astrovirus

가) 병원성 바이러스은행으로부터 바이러스를 분양 받아 RNA를 추출하고 RT-PCR로 cDNA를 합성함. 식약처 primer(Mon 269, Mon 270)와 본 연구를 통하여 신규 디자인한 프라이머(Astro F1, Astro R1/Astro F2, Astro R2)를 이용하여 PCR을 수행하였음. 그 결과 식약처 프라이머를 이용한 경우에만 약 550 bp의 DNA 증폭 산물을 확인할 수 있었음(그림 3-5-22)

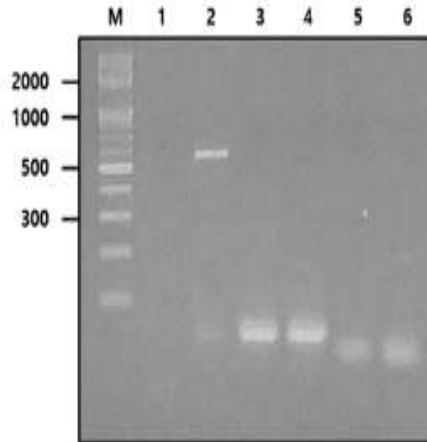


그림 3-5-22. Astrovirus PCR 결과. M: 100 bp DNA ladder; Lane 1: 식약처 Mon 269, Mon 270 primer(negative control); Lane 2: 식약처 Mon 269, Mon 270 primer(virus sample); Lane 3: Astro F1, Astro R1 primer(negative control); Lane 4: Astro F1, Astro R1 primer(virus sample); Lane 5: Astro F2, Astro R2 primer(negative control); Lane 6: Astro F2, Astro R2 primer(virus sample)

#### 4) Rotavirus

가) 주관기관으로부터 바이러스 배양액을 분양 받아 RNA를 추출하고 RT-PCR로 cDNA를 합성함. 식약처 primer(VP7-F, VP7-R(1차 PCR)/aBT1, aCT2, aET3, aDT4, aAT8, aFT9, G10 및 VP7-R(Semi-nested PCR))를 이용하여 PCR을 수행하였음. 그 결과 1차 PCR에서 약 900 bp, semi-nested PCR에서 약 600 bp의 DNA 증폭산물을 확인하였음 (그림 3-5-23)

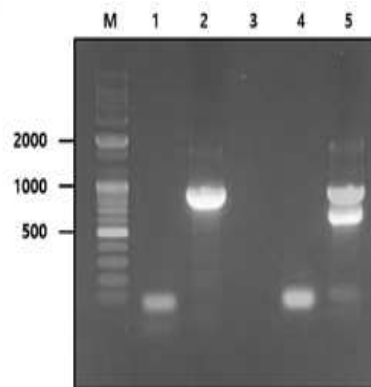


그림 3-5-23. Rotavirus PCR 결과. M: 100 bp DNA ladder; Lane 1: 식약처 1차(VP7-F, VP7-R) primer(negative control); Lane 2: 식약처 1차(VP7-F, VP7-R) primer(virus sample); Lane 4: 식약처 semi-nested (aBT1, aCT2, aET3, aDT4, aAT8, aFT9, G10 및 VP7-R) primer(negative control); Lane 5: 식약처 semi-nested (aBT1, aCT2, aET3, aDT4, aAT8, aFT9, G10 및 VP7-R) primer(virus sample)

(2) 바이러스 검출용 PCR primer 선정

(가) 상기 실험 결과를 바탕으로 바이러스 검출용 PCR primer를 1차적으로 선정하였음. HAV와 Norovirus(GII)는 본 연구를 통하여 새로 디자인한 primer를 사용하고 Adenovirus, Astrovirus, Rotavirus는 기존의 식품의약품안전처 primer를 사용할 예정임(표 3-5-8)

표 3-5-8. 바이러스 검출용 kit 개발을 위해 1차적으로 선정한 PCR primer

바이러스	프라이머명	서열 (5'→3')	비고
HAV	HAV F2	CCTACAATTCCAAAATTTAGAGATAT	
	HAV R2	GGAGACCACATTCATTGAAC	
	HAV nF2	CCTATGTTAATTTCTGAGGGACC	
	HAV nR2	AATTGAATTTGGTCCAGCAACATG	
Norovirus (GII)	GII-F1	GGTATGAATATGAATGAGGATGGCCC	
	GII-R1	GTCATTTCGACGCCATCTTCATTAC	
	GII-nR1	GAGCCAGATTGCGATCGCC	
Adenovirus	AD1	TTCCCCATGCICAYAACAC	식약처
	AD2	CCTGGTAKCCRTRTTGTA	
Astrovirus	Mon 269	CAACTCAGGAAACAGGGTGT	식약처
	Mon 270	TCAGATGCATTGTCATTGGT	
Rotavirus	VP7-F	ATGTATGGTATTGAATATACCAC	식약처
	VP7-R	AACTTGCCACCATTTTTTCC	
	aBT1	CAAGTAATAAAATCAATGATG	
	aCT2	CAATGATATTAACACATTTTCTGTG	
	aET3	ACGAACTCAACACGAGAGG	
	aDT4	CGTTTCTGGTGAGGAGTTG	
	aAT8	GTCACACCATTTGTAAATTCG	
	aFT9	CTTGATGTGACTAYAAATAC	
	G10	ATGTCAGACTACARATACTGG	

나. 증폭된 바이러스 유전자 검출용 Rapid Diagnostic Test kits(RDTs kit) 개발

(1) PCR product 검출법 개발

(가) Conventional PCR 수행 후 증폭된 DNA를 확인하기 위해서는 아가로즈 겔을 이용한 전기영동을 수행해야 함. 하지만 아가로즈 겔 전기영동을 위해서는 전원 공급 장치, 전기영동장치를 비롯하여 부수적인 시약 및 기구를 필요로 함. 이는 conventional PCR이 현장 진단(Point of care test, POCT)용으로 부적합하다고 판단되는 이유 중 하나임.

(나) 본 연구를 통하여 보다 간편한 방법인 RDTs 방식으로 증폭된 유전자를 검출하는 방법을 개발하였음. 기본적인 개념은 그림3-5-24와 같음. 증폭 유전자에 digoxigenin과 biotin을 표지하고 니트로 셀룰로오스 막(membrane)에 digoxigenin과 결합하는 항체를, 축합패드(cnjugate pad)에 금 나노입자가 축합된, 바이오틴과 결합하는 스트렙트아비딘을 분주하여 표지된 유전자 증폭산물이 샘플패드를 거쳐 흡수패드로 이동하면 니트로셀룰로오스막상의 테스트라인에 흡착되어 밴드가 나타나도록 함.

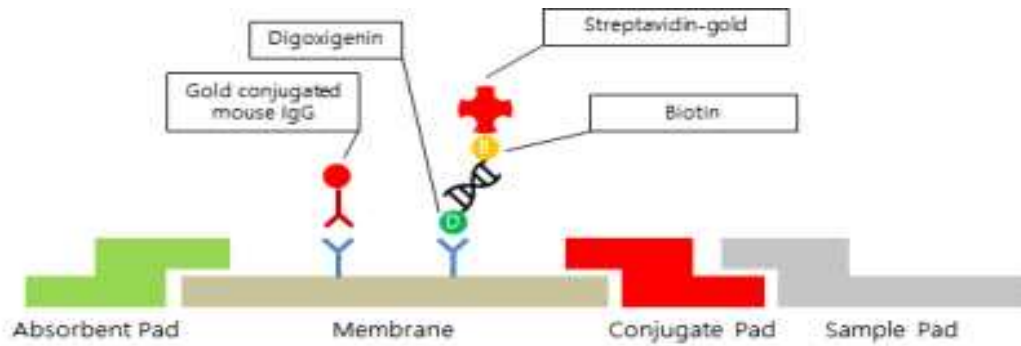


그림 3-5-24. 증폭 유전자 검출용 RDTs kit 사용 모식도

(2) Rapid kit 개발

(가) 상기 개념을 토대로 니트로 셀룰로오스 막 상에 검정선(test line)에는 항-digoxigenin 항체를 분주하고 대조선(control line)에는 항-마우스 IgG 항체를 분주 후 건조시킴. 축합패드에는 streptavidin-금 축합체와 마우스 IgG-금 축합체를 분주 후 건조시킴. 흡수패드와 샘플패드를 건조시킨 니트로 셀룰로오스 막, 축합패드와 함께 카세트에 조립하여 키트를 제작함(그림 3-5-25)



그림 3-5-25. 증폭유전자 산물 검출용 RDTs kit

(3) HAV 바이러스 양성시료를 이용하여 검출여부 확인

(가) PCR 결과 얻어진 유전자 증폭 산물을 상기 개발한 Rapid kit으로 검출 가능한지 시험하였음. 1차년도 연구를 통하여 확립한 HAV PCR 양성 대조물질인 plasmid DNA(T-HAV F1/R1, T-HAV F2/R2)를 이용하여 시험함. 각 plasmid DNA ( $1 \times 10^6$  copies/ul)를 1/10씩 희석하여 PCR시 주형 DNA로 사용하고 forward primer(HAV nF1, HAV nF2)와 reverse primer(HAV nR1, HAV nR2)로 PCR을 수행함. PCR이 완료된 후에는 바이오틴이 접합된 reverse primer와 forward primer에 상보적이고 Digoxigenin이 접합된 probe를 첨가하고 denaturation 및 annealing하여 PCR산물에 Digoxigenin 및 biotin을 표지함

(나) 상기 PCR 산물에 rapid kit용 buffer를 첨가하고 kit의 샘플패드에 적하하고 10분 후 테스트라인에 밴드가 생성되는지 확인함. 그 결과 그림 3-5-26과 같이 효과적으로 HAV P

CR산물을 검출하는 것을 확인하였으며 HAV nF1, HAV nR1 primer를 사용한 경우가 HAV nF2, HAV nR2 primer를 사용한 경우보다 민감도가 높았음

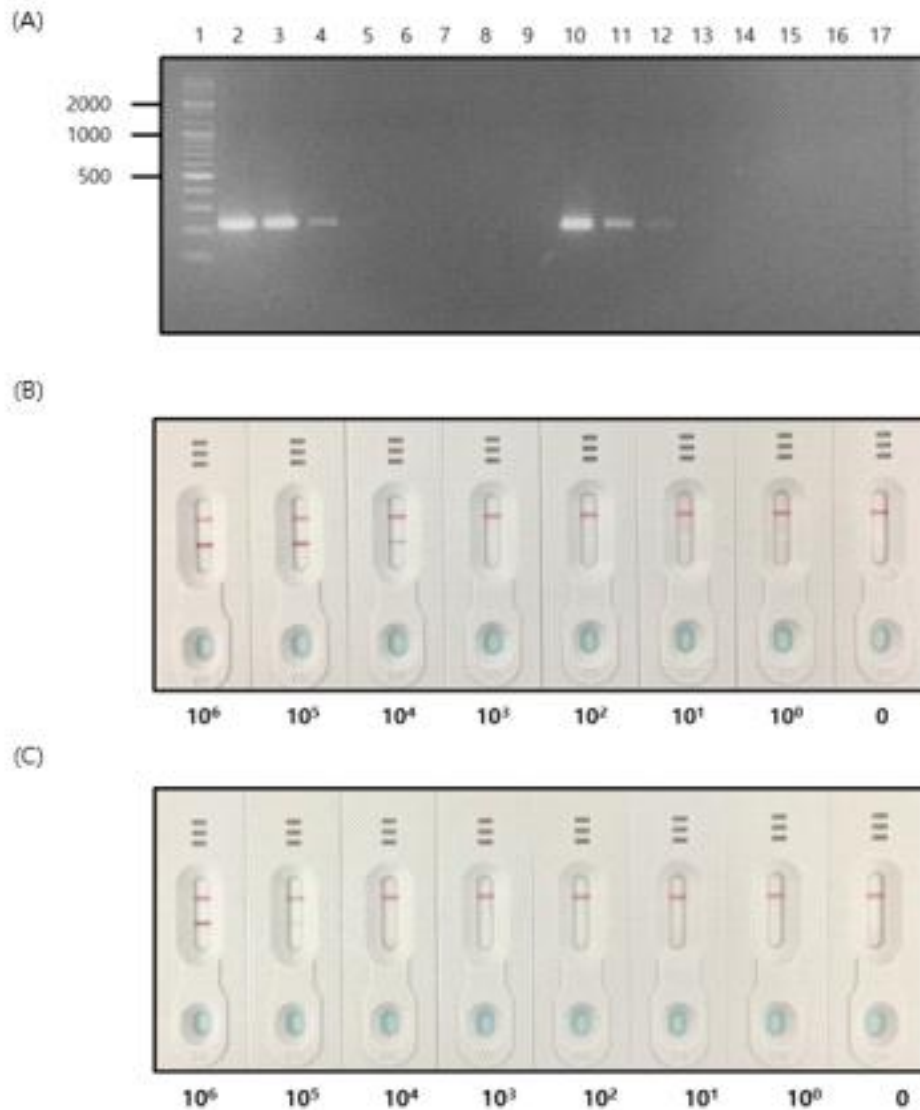


그림 3-5-26. HAV PCR 아가로스겔 전기영동 및 Rapid kit 결과 (A) Lane 1: 100 bp DNA ladder; Lane 2~Lane 9: T-HAV F1/R1  $1 \times 10^6 \sim 0$  copies/ul; Lane 10~17: T-HAV F2/R2  $1 \times 10^6 \sim 0$  copies; (B) T-HAV F1/R1 (lane 2~9) rapid kit; (C) T-HAV F2/R2 (lane 10~17) rapid kit

#### (4) HAV PCR 산물 검출법 개선

(가) 상기 방법으로 PCR산물을 rapid kit으로 검출하는 방법을 개발하였음. 하지만 PCR 수행 시 생성될 수 있는 primer dimer가 생성될 경우 위양성이 나타나는 경우가 있었음(그림 3-5-27)

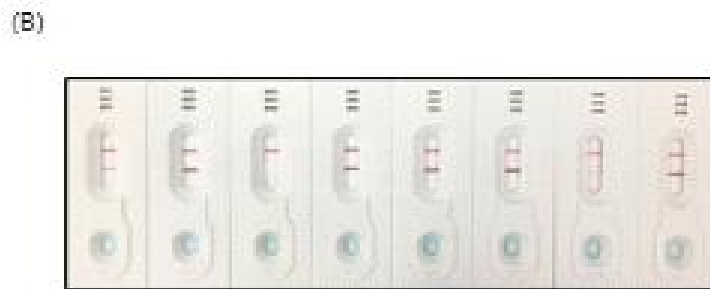
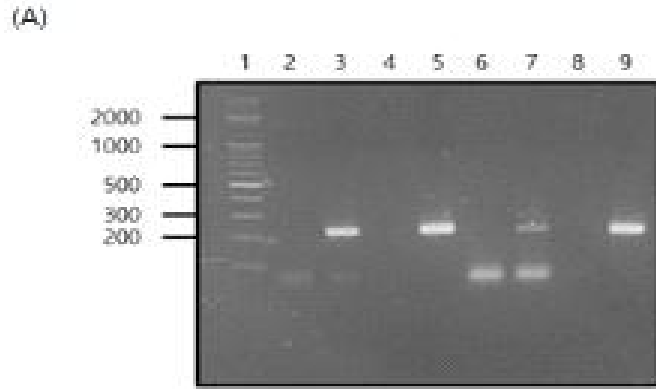


그림 3-5-27. primer dimer 생성시 위양성 발생 (A) Lane 1: 100 bp DNA ladder, lane 2, 3: T-HAV F1/R1 with primer dimer; Lane 4, 5: T-HAV F1/R1 without primer dimer; Lane 6, 7: T-HAV F2/R2 with primer dimer; Lane 8, 9: T-HAV F2/R2 without primer dimer; (B) Rapid kit test

(나) 상기문제를 해결하는 방법은 첫째, PCR시 primer dimer를 만들지 않도록 조건을 확립하는 것이 있으며 둘째, rapid kit의 성능을 개선하여 위양성이 나타나지 않도록 하는 것임. 하지만 근본적인 해결을 위해 probe를 기존 primer 부분이 아닌 PCR 산물 내에 위치하도록 실험방법을 수정하였고 그림 3-5-28과 같이 primer dimer가 생성되는 경우에도 위양성이 나타나지 않도록 조건을 개선하였음

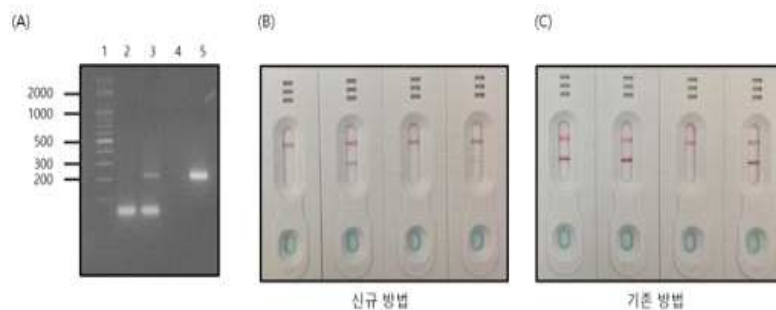


그림 3-5-28. PCR 산물 검출법 위양성 개선 (A) Lane 1: 100 bp DNA ladder, lane 2, 3: T-HAV F1/R1 with primer dimer; Lane 4, 5: T-HAV F1/R1 without primer dimer; (B), (C) Rapid kit test.

## 다. 바이러스 농축법 개선연구

### (1) HAV 항체 개발

- (가) 바이러스는 세균과 달리 증식이 어렵고 농산물에 오염된 바이러스의 양이 극미하여 바이러스 검지 반드시 농축 및 탈리 과정이 필요함. 식품이나 농산물에서 바이러스 농축시 PEG(polyethylene glycol) 농축방법이 주로 이용되고 있으나 소요시간이 매우 많음. 또한, 다양한 물질의 존재로 인해 RT-PCR을 위한 증합효소의 방해로 실제 바이러스가 존재함에도 불구하고 검출되지 않는 경우가 많을 수 있음. 면역자기분리법(IMS; Immunomagnetic separation)은 이러한 단점을 보완하여 바이러스 농축 시간에 드는 시간이 적고 항원-항체 반응을 이용하여 이물질을 제거함으로써 RT-PCR 저해물질을 효율적으로 제거할 수 있음
- (나) 따라서, 면역자기분리법이 효율적인 바이러스 농축법으로 예상되어지며 따라서 바이러스 농축법에 적용시험을 수행함. 면역자기분리법을 우선 HAV 농축에 적용하기 위해 HAV에 대한 항체를 개발하였음

### (2) Norovirus 항원 개발

- (가) Norovirus 재조합 항원을 개발하기 위하여 norovirus 검체로부터 RT-PCR을 통해 cDNA를 합성하고 PCR을 통해 유전자를 증폭함. 바이러스의 VP1 단백질 중 항원성이 높다고 알려진 유전자 부위(960 bp)를 타겟으로 하였음(그림 3-5-29)

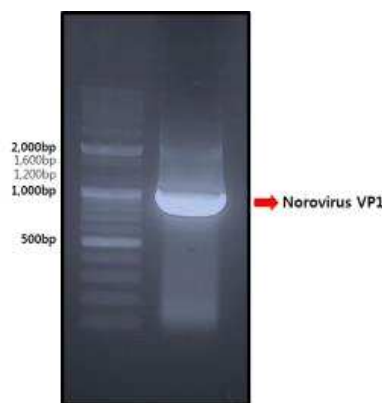


그림 3-5-29. Norovirus VP1 PCR product

- (나) 단백질 발현은 *E. coli* 시스템을 이용하였으며 단백질 발현벡터에 융합된 단백질에 따라 항원성 및 발현양이 달라지기 때문에 항원의 수용성을 향상시키기 위해 가용성 증강제(solubility enhancer)로 알려진 단백질이 융합되어 있는 발현벡터를 선정하였음. Trx(Thioredoxin)와 6개의 histidine이 융합되어 있는 pET31 vector(그림 3-5-30)를 사용함



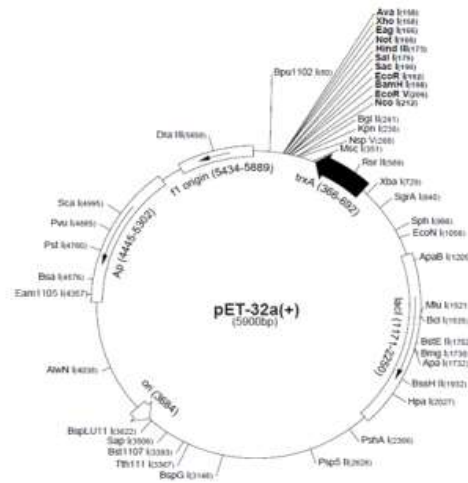


그림 3-5-30. 단백질 발현용 pET32 vector

(다) 유전자 증폭산물과 pET32 vector를 제한효소 처리 후 아가로스겔 전기영동하고 겔로부터 각각의 DNA를 분리 정제함. 정제한 각각의 DNA를 ligase를 이용하여 vector DNA에 VP1 유전자를 삽입 한 후 E. coli(DH5a)에 형질전환함. 형질전환된 E.coli를 배양하고 plasmid DNA를 분리한 후 제한효소 처리하여 pET32 vector와 VP1 유전자가 분리된 것을 확인함(그림 3-5-31)

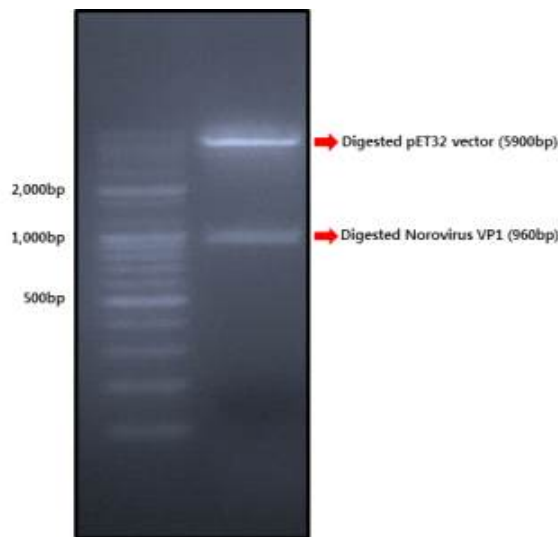


그림 3-5-31. Norovirus VP1 재조합 유전자 확인

(라) VP1 유전자와 pET32 vector가 ligation된 plasmid DNA를 재조합 단백질의 발현을 위한 수용 균주인 BL21(DE3)에 형질전환하고 항생제 배지에서 배양 후 IPTG로 단백질 발현을 유도함. 재조합 단백질이 발현된 세포를 원심분리로 회수하고 초음파 파쇄를 통해 세포를 lysis 시킨 후 SDS-PAGE로 단백질을 크기에 따라 분리하고 Coomassie blue 염색으로 단백질의 발현 여부를 확인함. 그 결과 수용성 단백질보다 불용성 단백질의 형태로

과잉발현된 것을 확인함(그림 3-5-32). 수용균주별 발현량의 차이를 확인하기 위해 발현 수용균주로 Rosetta(DE3) cell과 발현량의 차이를 비교하였고 확인결과 수용성, 불용성 단백질의 발현정도 차이는 없었음

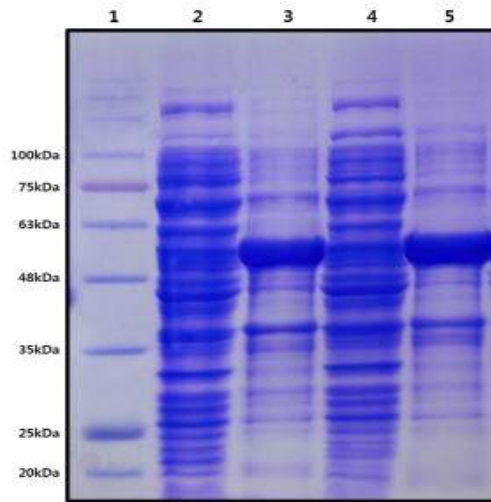


그림 3-5-32. VP1 단백질의 발현. 1: protein marker; 2: soluble VP1 (BL21 cell); 3: insoluble VP1 (BL21 cell); 4: soluble VP1 (Rosetta cell); 5: insoluble VP1 (Rosetta cell)

(마) 상기 재조합 VP1 단백질을 분리하기 위해 친화 크로마토그래피를 실시함. 발현 vector의 특성상 negative charge를 가지는 여분의 histidine아미노산을 타깃 단백질에 태그하므로 양이온인 Ni ion이 결합되어 있는 column을 이용함. Nickel column에 단백질을 흘려보내 결합 시킨 후 세척하고 imidazole을 이용하여 column과 결합한 타깃 단백질을 용출함. 그 결과 250 mM imidazole 농도에서 대부분의 VP1 단백질 용출되었음(그림 3-5-33)

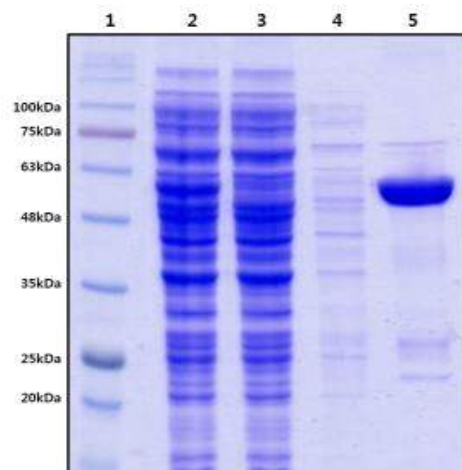


그림 3-5-33. VP1 단백질의 정제 1: protein marker; 2: Expressed VP1 protein; 3: Un-bounded VP1 protein; 4: washed protein; 5: Eluted VP1 protein

(3) 다양한 polymerase 및 PCR 반응 버퍼를 사용하여 PCR 반응시간 단축 및 최적조건 확립  
 (가) 상기 분리 정제한 Norovirus(GII) 재조합 VP1 단백질을 항원으로 하여 하이브리도마법을 이용해 norovirus 단일 클론 항체를 개발하였음

(4) 항체-IMS 접합

(가) 개발한 HAV 단일 클론 항체 중 바이러스와 반응성이 높은 두 개의 클론을 선정하고 ECD(1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide·HCL)를 이용하여 magnetic bead와 접합시킴. 접합한 항 HAV 바이러스 항체-magnetic bead 접합체를 바이러스 농축을 위한 IMS(immunomagnetic separation)시험에 사용하였음.

(5) IMS를 이용한 바이러스 회수율 시험

(가) 항 HAV 항체-magnetic bead 접합체의 바이러스 회수율을 실험하기 위해 PBS에 HAV 바이러스를 접종하고 항체-bead 접합체와 혼합 후 1시간 반응시킴. magnet을 이용하여 바이러스를 정제하고 RNA 추출 후 real-time PCR로 Ct 값을 및 회수율을 측정함. 그 결과 약 28-29의 Ct value값을 얻었으며 1번 클론은 7.58%, 2번 클론은 2.81%의 회수율을 보였음(표 3-5-9, 그림 3-5-34).

표 3-5-9. IMS 및 real-time PCR을 이용한 HAV 회수율

Sample	Ct value	Recovery rate(%)
1번	28.06	7.58%
2번	29.22	2.81%
Positive	25.05	

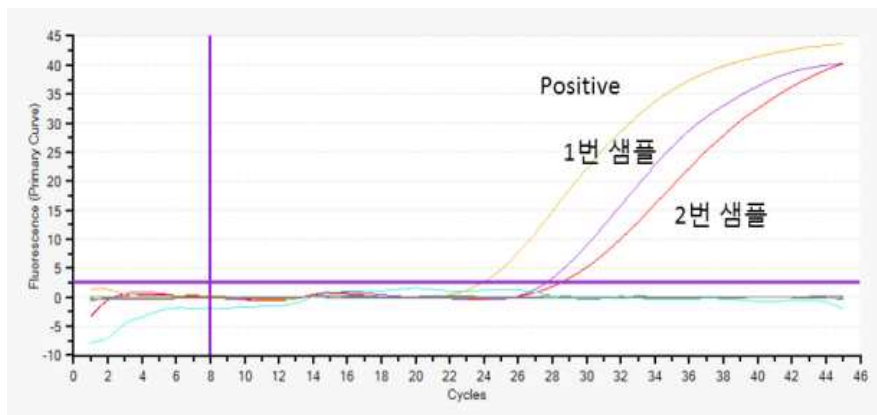


그림 3-5-34. IMS 및 real-time PCR을 이용한 HAV 회수율 시험 결과

#### 라. PCR 속도 개선 연구

(1) 다양한 polymerase를 이용한 PCR 반응 속도 감축

(가) 일반적인 PCR은 타겟 유전자 증폭을 위해 denaturation, annealing, extention 3가지 반

응을 25~30회 반복함. 각 스텝당 일반적으로 1분을 반응하므로 PCR을 수행하는데 평균적으로 2시간 정도 소요가 됨

- (나) 최근 다양한 DNA polymerase의 개발에 따라 효소의 반응 속도가 향상된 제품이 출시되고 있음. PCR 수행시간을 단축하는 방법은 cycle 수의 감소, 온도 조절시간 향상, PCR 각 스텝의 시간을 단축하는 등의 방법이 있음. 상기 방법 중 각 스텝의 시간을 단축하는 것이 가장 효율적인 방법으로 판단하고 다양한 polymerase를 이용하여 PCR 반응을 수행함. 일반적인 프로토콜인 1분의 각 스텝을 5초로 변경하여 PCR 후 산물을 아가로스겔 전기영동을 통해 확인함. 그 결과 효율적으로 유전자를 증폭시키는 DNA polymerase를 선별할 수 있었음(그림 3-5-35)

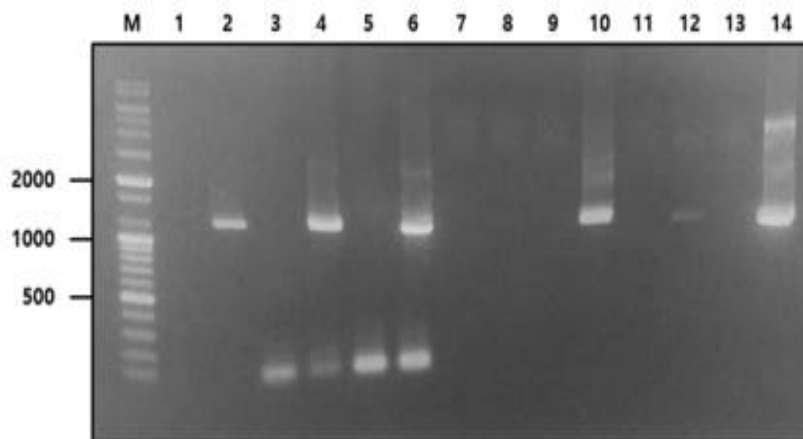


그림 3-5-35. PCR 반응시간 단축을 위해 각 PCR 스텝 반응시간을 감소시키고 다양한 polymerase를 이용하여 PCR. M: 100 bp DNA ladder; 1, 2: B사 (각각 negative, positive); 3, 4: E사 (각각 negative, positive); 5, 6: W사 (각각 negative, positive); 7, 8: G사 A제품 (각각 negative, positive); 9, 10: G사 B제품 (각각 negative, positive); 11, 12: G사 C제품 (각각 negative, positive); 13, 14: G사 D제품 (각각 negative, positive)

### 3. 개발된 바이러스 신속검출 키트의 AOAC 인증 및 Field test

#### 가. 바이러스 신속검출 키트 개발

- (1) 1차년도 연구를 통하여 위해 5종 바이러스 검출용 PCR primer를 신규 발굴하였으며 2차년도에 실제 바이러스를 이용하여 신규 발굴한 PCR primer의 성능을 평가하고 1차적으로 PCR primer를 선정하였음
- (2) 1차적으로 선정한 위해 5종 바이러스 검출용 PCR primer 및 RDTs kit을 이용하여 바이러스 신속검출 키트를 개발하였음
- (3) 증폭된 바이러스 유전자를 RDTs kit을 이용하여 검출할 때, 위양성을 줄이기 위하여 Ade

novirus, Astrovirus, Norovirus(GII)용 신규 probe를 디자인하였음(표 3-5-10)

표 3-5-10. 신규 디자인한 Probe sequence

Virus	Probe sequence (5'→3')
Adenovirus	CCATGGCGCACAACACCG
Astrovirus	GGTGTCACAGGACCAAAACCTG
Norovirus (GII)	TGCACCTCCCAATGGAAYTC

(4) 상기 개발한 바이러스 신속검출 키트를 바이러스에 적용하여 시험하였음

(가) Adenovirus는 병원성바이러스은행으로부터 분양받아 사용하였음. DNA를 추출하고 식약처 primer(AD1, AD2)를 이용해 PCR을 수행한 다음 PCR 산물을 아가로즈겔 전기영동을 통해 확인한 결과 약 500 bp의 DNA 증폭산물을 확인하였음(그림 3-5-36 A). 또한, 증폭한 바이러스 유전자에 상기 디자인한 probe를 혼성화한 후 RDTs kit을 통해 확인한 결과 양성으로 검출됨을 확인하였음(그림 3-5-36 B)

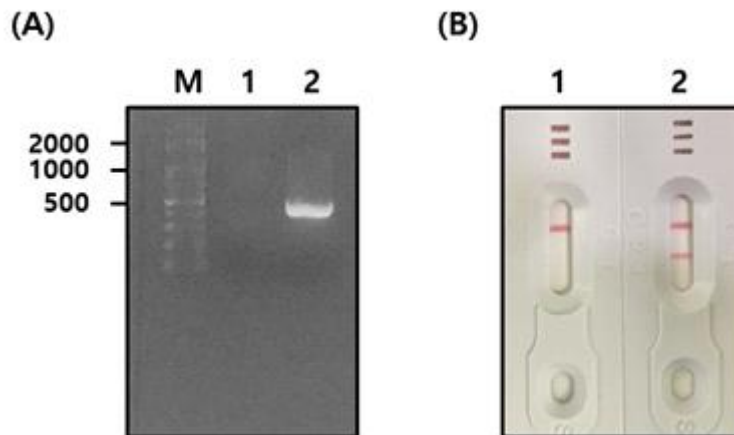


그림 3-5-36. Adenovirus PCR 산물의 전기영동(A) 및 RDTs kit(B) 결과. M: 100 bp DNA ladder; 1: Negative control; 2: virus sample

(나) Norovirus는 주관기관으로부터 분양받아 사용하였음. RNA를 추출하고 본 연구를 통하여 디자인한 primer(NoroGII F1, NoroGII R1(1차 PCR)/NoroGII F1, NoroGII nR1(Semi-nested PCR))를 이용하여 one-step RT-PCR 및 PCR을 수행한 다음 PCR 산물을 아가로즈겔 전기영동을 통해 확인한 결과 약 310 bp의 DNA 증폭산물을 확인하였음(그림 3-5-37 A). 또한, 증폭한 바이러스 유전자에 상기 디자인한 probe를 혼성화한 후 RDTs kit을 통해 확인한 결과 양성으로 검출됨을 확인하였음(그림 3-5-37 B)

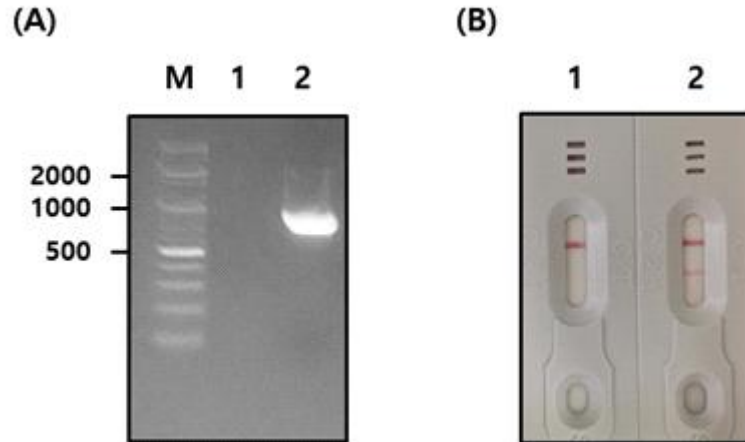


그림 3-5-37. Norovirus(GII) PCR 산물의 전기영동 (A) 및 RDTs kit(B) 결과. M: 100 bp DNA ladder; 1: Negative control; 2: virus sample

(다) Astrovirus는 병원성바이러스은행으로부터 분양받아 사용하였음. RNA를 추출하고 식약처 primer(Mon 269, Mon 270)를 이용하여 one-step RT-PCR을 수행한 다음 PCR 산물을 아가로스겔 전기영동을 통해 확인한 결과 약 450 bp의 DNA 증폭 산물을 확인할 수 있었음(그림 3-5-38 A). 또한, 증폭한 바이러스 유전자에 상기 디자인한 probe를 혼성화한 후 RDTs kit을 통해 확인한 결과 양성으로 검출됨을 확인하였음(그림 3-5-38 B)

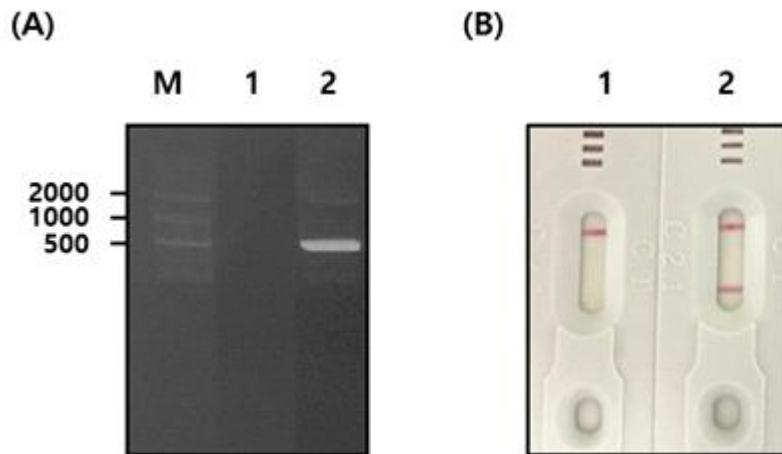


그림 3-5-38. Astrovirus PCR 산물의 전기영동(A) 및 RDTs kit(B) 결과. M: 100 bp DNA ladder; 1: Negative control; 2: virus sample

(라) Rotavirus는 주관기관으로부터 분양받아 사용하였음. RNA를 추출하고 식약처 primer(V P7-F, VP7-R(1차 PCR)/aBT1, aCT2, aET3, aDT4, aAT8, aFT9, G10 및 VP7-R(Semi-nested PCR))를 이용하여 one-step RT-PCR 및 PCR을 수행한 다음 PCR 산물을 아가로스겔 전기영동을 통해 확인한 결과 약 500 bp의 DNA 증폭산물을 확인하였음(그림 3-5-39 A). Rotavirus의 경우 다양한 type의 바이러스에서 공통으로 존재하는 부위를 찾는

것이 어렵다고 판단되어 probe를 사용하지 않고 nested-PCR용 primer에 디옥시게닌과 바이오틴을 접합하였음. 바이러스 유전자 증폭산물을 RDTs kit을 통해 확인한 결과 양성으로 검출됨을 확인하였음(그림 3-5-39 B)

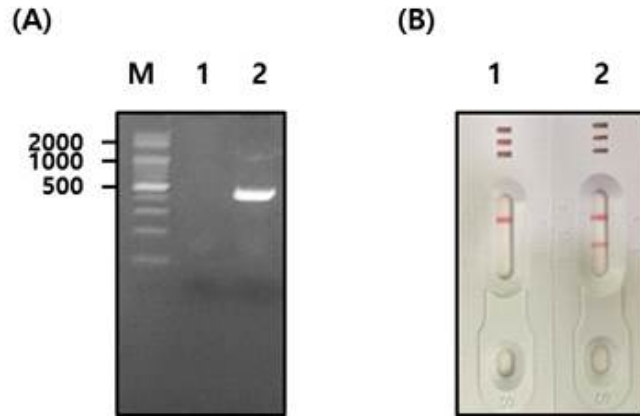


그림 3-5-39. Rotavirus PCR 산물의 전기영동(A) 및 RDTs kit(B) 결과. M: 100 bp DNA ladder; 1: Negative control; 2: virus sample

#### 나. 표준분석방법 개선안 도출

##### (1) 바이러스 항원 개발

(가) 2차년도 연구에 이어 바이러스 농축법 개선안 마련을 위해 지속적으로 노로바이러스 (GI)항원을 개발하였음

(나) 노로바이러스 (GI) 유전자의 VP1 부위를 합성하고 대장균용 발현 벡터에 삽입하였음. 대장균에서 재조합 단백질의 발현시 발생할 수 있는 문제인 inclusion body 형성을 억제하기 위하여 용해도가 높은 단백질을 tag로 붙였음. 발현 벡터에 삽입이 되었는지 확인한 결과 그림 3-5-40과 같이 노로바이러스 (GI)의 유전자가 대장균용 발현 벡터에 정확히 삽입되었음을 확인하였음

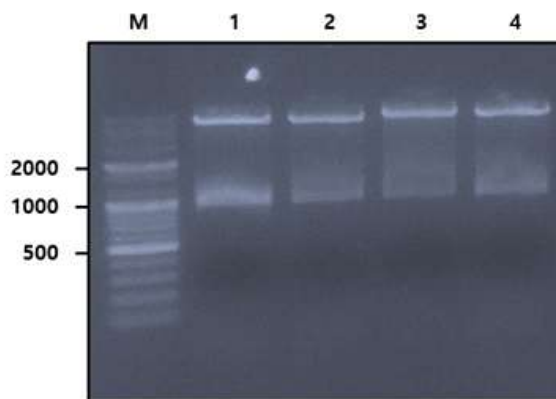


그림 3-5-40. Norovirus (GI) VP1 유전자 확인. M: 100 bp DNA ladder, 1~4: Enzymatically digested vector DNA

(다) 노로바이러스(GI)의 VP1 유전자가 삽입된 발현 벡터를 발현용 대장균주에 형질전환하고 항생제 배지에서 배양 후 IPTG를 이용하여 단백질의 발현을 유도하였음. 세포를 회수하고 수용성 단백질과 불용성 단백질을 회수하고 SDS-PAGE 및 Coomassie blue 염색을 통하여 단백질의 발현을 확인함. 그 결과 그림 3-5-41과 같이 용해도가 높은 단백질을 삽입한 단백질의 용해도가 삽입하지 않은 단백질보다 높았음

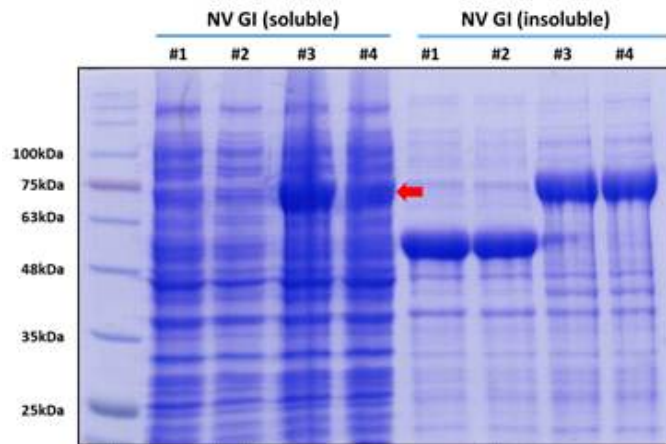


그림 3-5-41. 노로바이러스(GI) VP1 단백질의 발현. 1~2: Un-tagged VP1 protein; 3~4: Taged VP1 protein

(라) 재조합 VP1 단백질을 친화 크로마토그래피를 이용하여 분리, 정제하였음(그림 3-5-42)

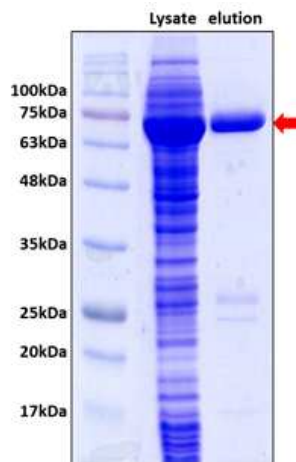


그림 3-5-42. 노로바이러스(GI) VP1 단백질의 정제

(2) 바이러스 항체 개발

(가) 분리 정제한 노로바이러스(GI) VP1 단백질을 항원으로 하여 하이브리도마법을 이용하여 항-norovirus VP1 단일클론 항체를 개발하였음



### (3) IMS 분석

- (가) 이미 언급한 대로 바이러스는 세균과 다르게 증식이 어렵고 농산물 또는 토양, 물환경에 존재하는 바이러스의 양이 극미하여 바이러스 농축 과정이 필요함. 현재 주로 사용되는 바이러스 농축법은 PEG를 이용한 침전법임. 하지만 바이러스와 PEG의 반응 시간이 긴 단점이 있음. 또다른 바이러스 농축법은 초고속 원심분리(Ultracentrifugation)를 이용한 것임. Sucrose cushion등을 이용하여 높은 순도로 바이러스를 농축할 수 있으나 PEG법과 같이 많은 시간이 소요되며 초고속 원심분리기를 사용해야 하는 단점이 있음. 항원-항체 반응은 매우 특이적이면서도 반응 시간이 짧은 장점이 있는데 이러한 항원-항체 반응을 이용한 면역자기분리법(IMS)은 상기 방법에 비하여 분리 시간이 적으며 방법이 쉽다는 장점이 있음
- (나) 따라서, 면역자기분리법이 농산물에서 바이러스를 농축하는 가장 효율적인 방법이라고 판단하고 연구를 진행하였음. 1, 2차년도 연구를 통하여 A형 간염바이러스 항체, Noro GII 바이러스 항체를 개발하였음. 3차년도 연구를 통하여 Noro GI 바이러스 항체를 개발하였음
- (다) 개발한 항체를 이용하여 RDTs kit를 제작하고 바이러스와의 반응성을 확인하였을 때 A형간염 바이러스 항체가 가장 반응성이 높았으며 Norovirus의 경우 반응성이 미약하였음
- (라) IMS 분석을 위하여 1, 2차년도 연구를 통하여 개발한 A형 간염바이러스 항체를 이용하였으며 아데노바이러스와 노로바이러스(GII) 항체는 상업적으로 판매하는 항체를 구입하여 시험하였음
- (마) 바이러스 용축액(TGBE) 버퍼 40 ml에 바이러스를 첨가하고 항-바이러스 항체가 접합된 IMS 50 ul를 첨가한 후 실온에서 10분간 반응하였음. 4,000 rpm으로 5분간 원심분리하고 상층액을 제거한 후 PBST 1 ml로 washing 하였음. Magnet을 이용하여 3회 세척 후 바이러스를 탈리하고 RNA를 추출 한 후 본 연구를 통해 개발한 바이러스 검출 키트를 사용하여 바이러스 유전자를 검출하였음. IMS protocol은 그림 3-5-43와 같음

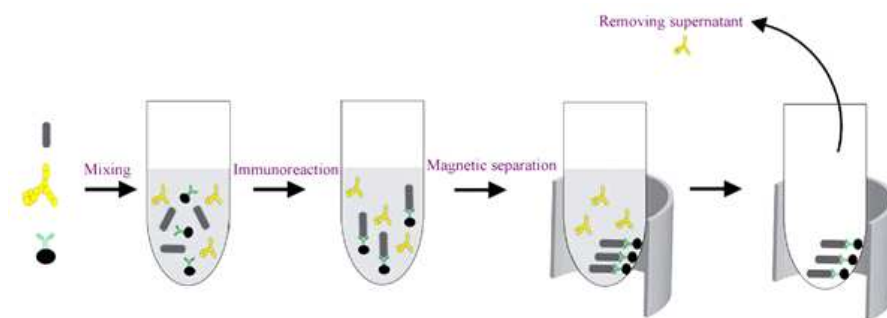


그림 3-5-43. IMS 농축과정 모식도

- (바) 그 결과 그림 3-5-44와 같이 A형 간염바이러스, 아데노바이러스, 노로바이러스(GII)가 IMS를 통하여 검출됨을 확인할 수 있었음

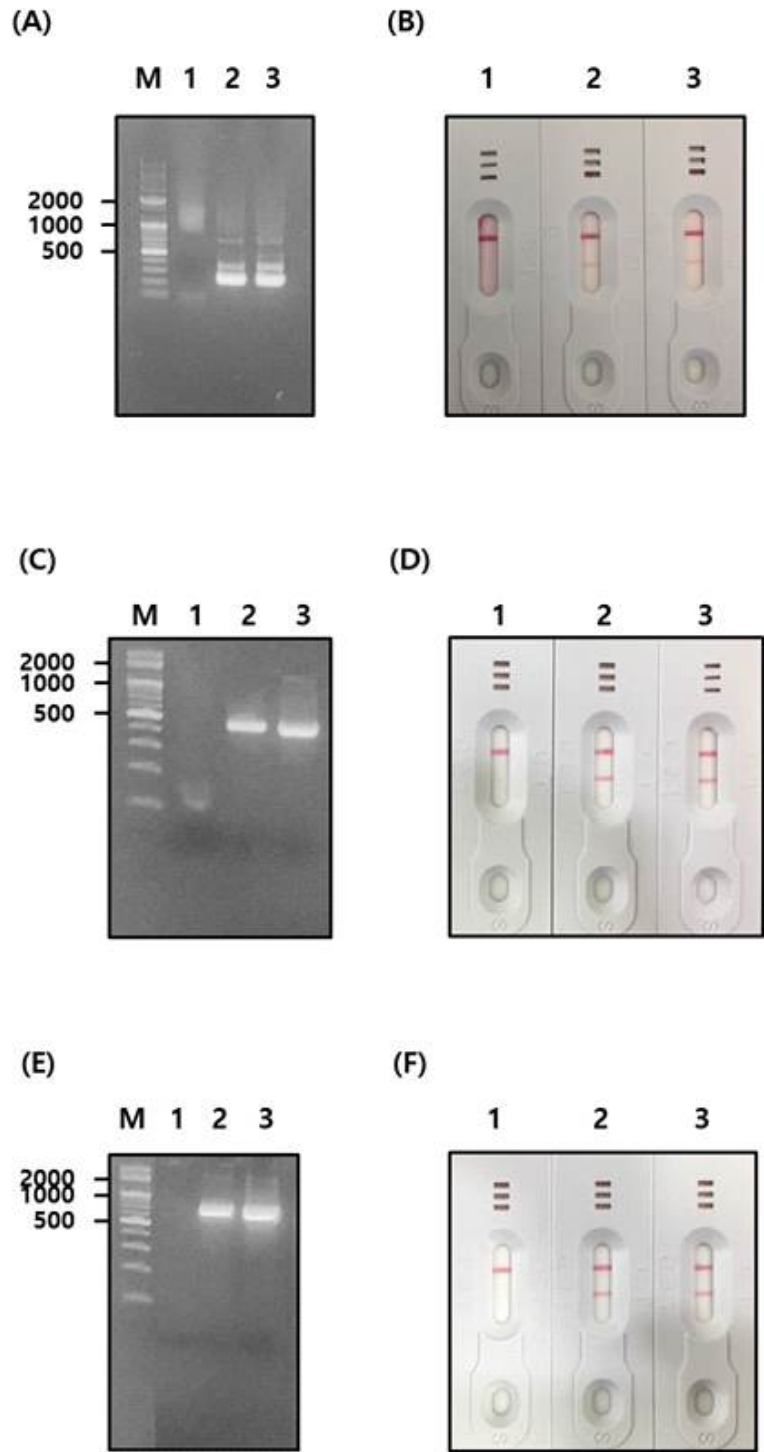


그림 3-5-44. IMS를 이용한 바이러스 회수 확인. A, B: HAV; C, D: Adenovirus; E, F: Norovirus(GII), M: 100 bp DNA ladder; 1: negative control; 2: viral solution(1 ul); 3: viral solution(10 ul)

다. 개발된 PCR 키트의 현장적용 평가를 위한 민감도 및 특이도 검사

- (1) 본 과제를 통하여 연구, 개발해 온 PCR 키트의 PCR 산물을 검출법은 probe를 사용하는 방법과 probe를 사용하지 않는 방법 두가지 있음
- (2) Probe를 사용하는 경우 특이도가 높았으나 민감도가 떨어지는 점이 있었음. 디콕시게닌과 바이오틴이 접합된 primer로 직접 PCR을 하는 경우 PCR 반응시 primer dimer가 다량 만들어질 때 RDTs kit에서 위양성 반응이 나타나는 것을 확인하였음(그림 3-5-45 A)
- (3) 높은 민감도와 특이도를 얻기 위하여 디콕시게닌과 바이오틴이 접합된 primer로 직접 PCR을 하며, primer dimer 생성을 최소화하는 것이 필요하였음. 본 연구를 통하여 디자인한 PCR primer와 probe, 식약처 primer간의 조합을 이용하여 PCR 산물을 RDTs kit으로 검출하였을 때 위양성이 적게 나오는 방법을 모색하였음. T-vector에 삽입된 Adenovirus, Norovirus(GII), HAV 바이러스 유전자의 copy 수를 계산하고  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^6$  또는  $1 \times 10^5$  copy를 PCR의 주형으로 하여 실험하였음. 그 결과 (그림 3-5-45 B)와 같이 민감도가 크게 증가하는 것을 확인할 수 있었음

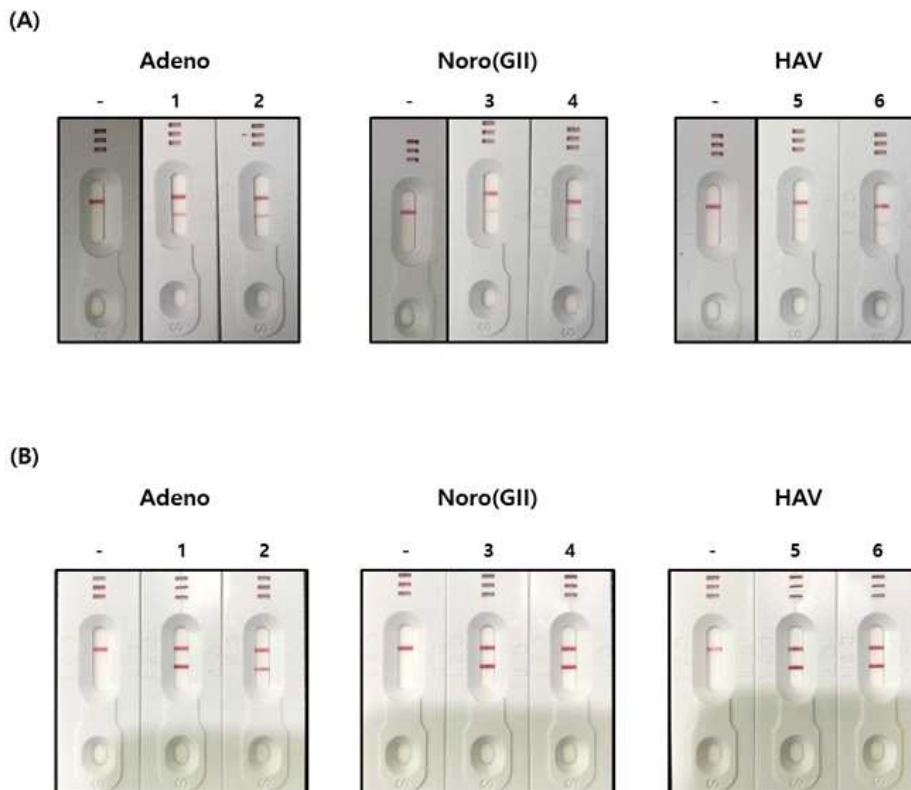


그림 3-5-45. PCR후 probe를 사용하는 경우(A)와 디콕시게닌 및 바이오틴이 접합된 primer를 이용하여 PCR을 하는 경우(B) kit의 민감도 차이. -: negative control(0 copy); 1: Adenovirus( $1 \times 10^7$  copies); 2: Adenovirus( $1 \times 10^6$  copies); 3: Norovirus( $1 \times 10^7$  copies); 4: Norovirus( $1 \times 10^6$  copies); 5: HAV( $1 \times 10^6$  copies); 6: HAV( $1 \times 10^5$  copies)

(4) 최종적으로 선정된 각 바이러스 kit의 PCR primer는 표 3-5-11과 같음

표 3-5-11. 바이러스 검출용 kit의 PCR primer

바이러스	프라이머명	서열 (5'→3')	비고
HAV	HAV F2	CCTACAATTCCAAAATTTAGAGATAT	1차 PCR
	HAV R2	GGAGACCACATTCATTGAAC	
	HAV probe	CAGGCATGGAGAGGAAAAGG	2차 PCR
	HAV nR2	AATTGAATTTGGTCCAGCAACATG	
Norovirus (GI)	GI-F1M	CTGCCCGAATTYGTAAATGATGAT	1차 PCR
	GI-R1M	CCAACCCARCCATTRTACATYTG	1, 2차 PCR
	GI-F2	ATGATGATGGCGTCTAAGGACGC	2차 PCR
Norovirus (GII)	Noro GII F1	GGTATGAATATGAATGAGGATGGCCC	1차 PCR
	Noro GII R1	GTCATTCGACGCCATCTTCATTCAC	
	Noro probe	TGCACCTCCCAATGGAAAYTC	2차 PCR
	Noro GII nR1	GAGCCAGATTGCGATCGCC	
Adenovirus	Adeno probe	ATGCTGCGCAACGACACCAACGA	RT-PCR
	AD2	CCTGGTAKCCRTRTTGTA	
Astrovirus	Mon 269	CAACTCAGGAAACAGGGTGT	PCR
	Mon 270	TCAGATGCATTGTCATTGGT	
Rotavirus	VP7-F	ATGTATGGTATTGAATATACCAC	1차 PCR
	VP7-R	AACTTGCCACCATTTTTTCC	1, 2차 PCR
	aBT1	CAAGTAATAAAAATCAATGATG	2차 PCR
	aCT2	CAATGATATTAACACATTTTCTGTG	
	aET3	ACGAACTCAACACGAGAGG	
	aDT4	CGTTTCTGGTGAGGAGTTG	
	aAT8	GTCACACCATTTGTAAATTTCG	
	aFT9	CTTGATGTGACTAYAAATAC	
	G10	ATGTCAGACTACARATACTGG	

(5) 개발한 PCR 키트의 민감도 및 특이도 검사를 위하여 바이러스로부터 유전물질을 추출하였음. 또한, 환경미생물연구소로부터 확보하거나 합성을 통해 확보한 바이러스 유전물질을 사용하였음. 음성 2종, HAV 2종, Norovirus(GI) 3종, Norovirus(GII) 2종, Adenovirus 2종, Astrovirus 3종, Rotavirus 2종을 사용하였음

(6) 민감도와 특이도 검사 결과 그림 3-5-46~51과 같이 민감도 100%, 특이도 100%가 나왔으나 분석 샘플의 개수가 적어 향후 샘플 확보를 통해 정확한 민감도와 특이도를 계산할 필요가 있다고 판단되며 공인 시험 기관을 통해 시험할 예정임

표 3-5-12. 바이러스 검출용 kit의 민감도 및 특이도 검사결과

	Astrov	Adenov	HAV	Noro(GI)	Noro(GII)	Rotav
민감도 (진양성/진양성 +위음성)×100	(3/3+0)×100 =100	(2/2+0)×100 =100	(2/2+0)×100 =100	(3/3+0)×100 =100	(2/2+0)×100 =100	(2/2+0)×100 =100
특이도(진음성/ 위양성+진음성) ×100	(13/0+13)×100 =100	(14/0+14)×100 =100	(14/0+14)×100 =100	(13/0+13)×100 =100	(14/0+14)×100 =100	(14/0+14)×100 =100

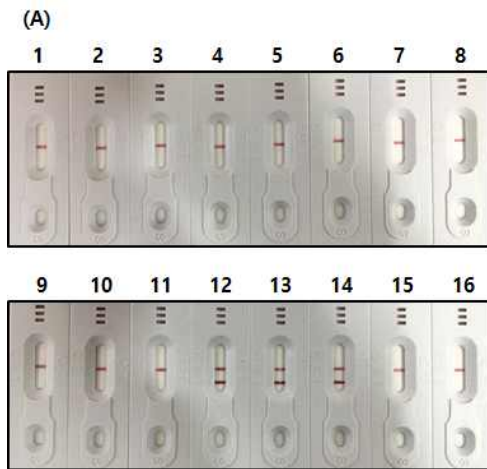


그림 3-5-46. Astrovirus 검출 키트의 민감도, 특이도 분석결과. 1: Negative control(1); 2: Negative control(2); 3: HAV(1); 4: HAV(2); 5: Norovirus(GI)(1); 6: Norovirus(GI)(2); 7: Norovirus(GI)(3); 8: Norovirus(GII)(1); 9: Norovirus(GII)(2); 10: Adenovirus(1); 11: Adenovirus(2); 12: Astrovirus(1); 13: Astrovirus(2); 14: Astrovirus(3); 15: Rotavirus(1); 16: Rotavirus(2)

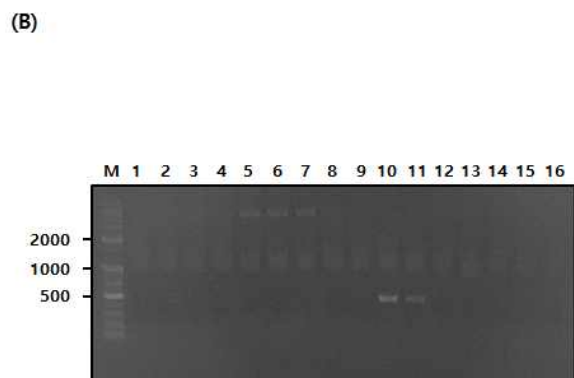
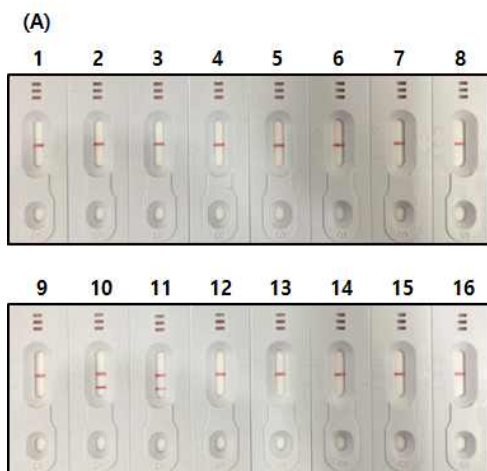


그림 3-5-47. Adenovirus 검출 키트의 민감도, 특이도 분석결과. 1: Negative control(1); 2: Negative control(2); 3: HAV(1); 4: HAV(2); 5: Norovirus(GI)(1); 6: Norovirus(GI)(2); 7: Norovirus(GI)(3); 8: Norovirus(GII)(1); 9: Norovirus(GII)(2); 10: Adenovirus(1); 11: Adenovirus(2); 12: Astrovirus(1); 13: Astrovirus(2); 14: Astrovirus(3); 15: Rotavirus(1); 16: Rotavirus(2)

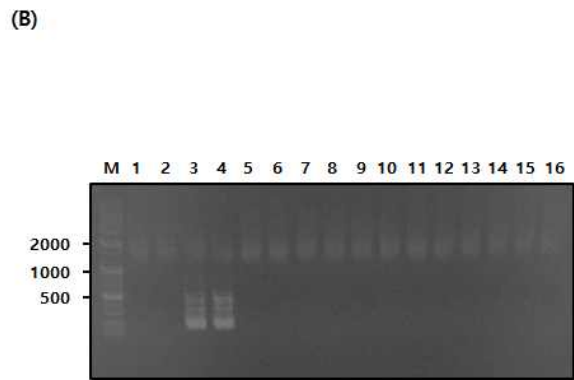
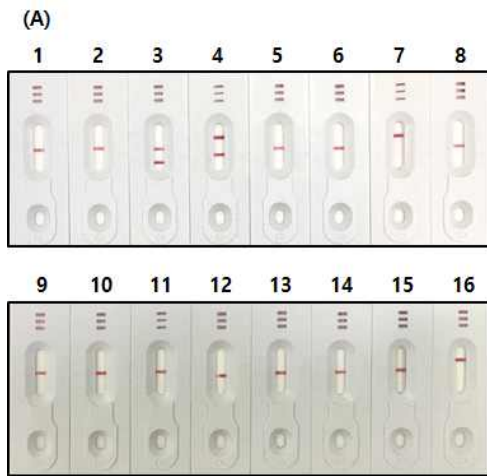


그림 3-5-48. HAV 검출 키트의 민감도, 특이도 분석결과. 1: Negative control(1); 2: Negative control(2); 3: HAV(1); 4: HAV(2); 5: Norovirus(GI)(1); 6: Norovirus(GI)(2); 7: Norovirus(GI)(3); 8: Norovirus(GII)(1); 9: Norovirus(GII)(2); 10: Adenovirus(1); 11: Adenovirus(2); 12: Astrovirus(1); 13: Astrovirus(2); 14: Astrovirus(3); 15: Rotavirus(1); 16: Rotavirus(2)

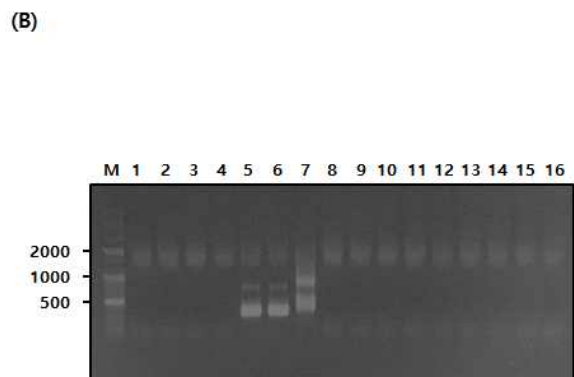
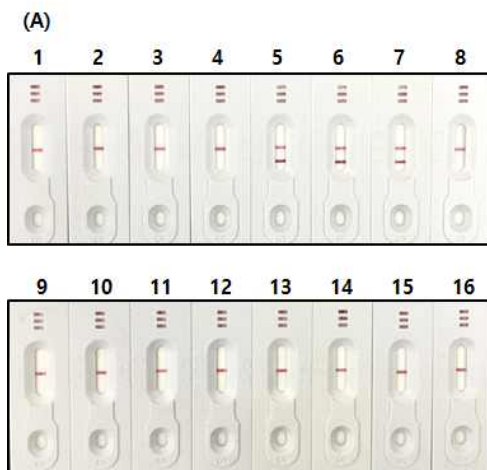


그림 3-5-49. Norovirus(GI) 검출 키트의 민감도, 특이도 분석결과. 1: Negative control(1); 2: Negative control(2); 3: HAV(1); 4: HAV(2); 5: Norovirus(GI)(1); 6: Norovirus(GI)(2); 7: Norovirus(GI)(3); 8: Norovirus(GII)(1); 9: Norovirus(GII)(2); 10: Adenovirus(1); 11: Adenovirus(2); 12: Astrovirus(1); 13: Astrovirus(2); 14: Astrovirus(3); 15: Rotavirus(1); 16: Rotavirus(2)

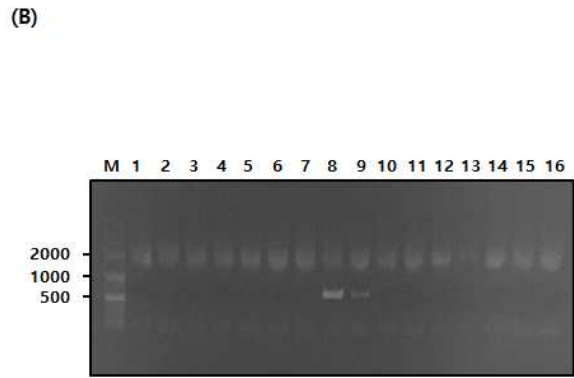
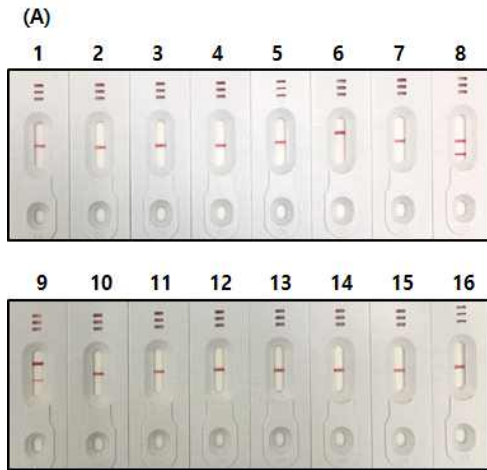


그림 3-5-50. Norovirus(GII) 검출 키트의 민감도, 특이도 분석결과. 1: Negative control(1); 2: Negative control(2); 3: HAV(1); 4: HAV(2); 5: Norovirus(GI)(1); 6: Norovirus(GI)(2); 7: Norovirus(GI)(3); 8: Norovirus(GII)(1); 9: Norovirus(GII)(2); 10: Adenovirus(1); 11: Adenovirus(2); 12: Astrovirus(1); 13: Astrovirus(2); 14: Astrovirus(3); 15: Rotavirus(1); 16: Rotavirus(2)

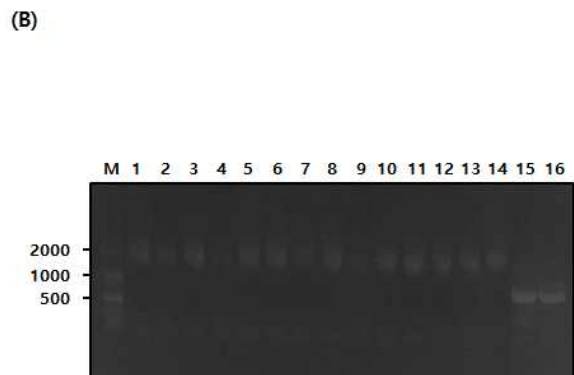
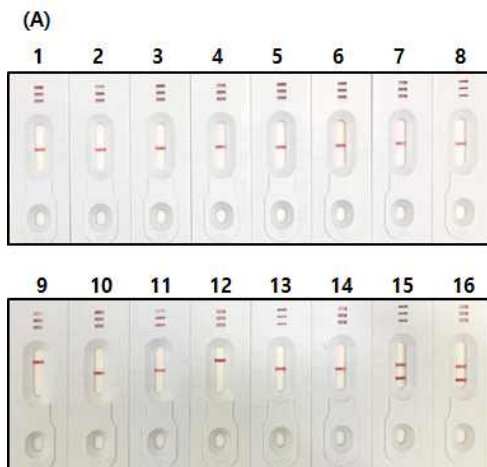


그림 3-5-51. Rotavirus 검출 키트의 민감도, 특이도 분석결과. 1: Negative control(1); 2: Negative control(2); 3: HAV(1); 4: HAV(2); 5: Norovirus(GI)(1); 6: Norovirus(GI)(2); 7: Norovirus(GI)(3); 8: Norovirus(GII)(1); 9: Norovirus(GII)(2); 10: Adenovirus(1); 11: Adenovirus(2); 12: Astrovirus(1); 13: Astrovirus(2); 14: Astrovirus(3); 15: Rotavirus(1); 16: Rotavirus(2)



라. 개발된 PCR 키트의 밸리데이션

(1) 반복성 측정

(가) 반복성, 즉 동일한 방법으로 동일한 측정대상을 같은 조건에서 반복 측정한 결과를 확인하였음. 각 바이러스 검출용 키트를 이용하여 같은 샘플을 대상으로 동일한 방법으로 3회 반복하여 결과를 확인하였음. 그 결과 그림 3-5-52와 같이 음성 및 양성의 반복성은 100%로 높은 반복성을 나타냈음

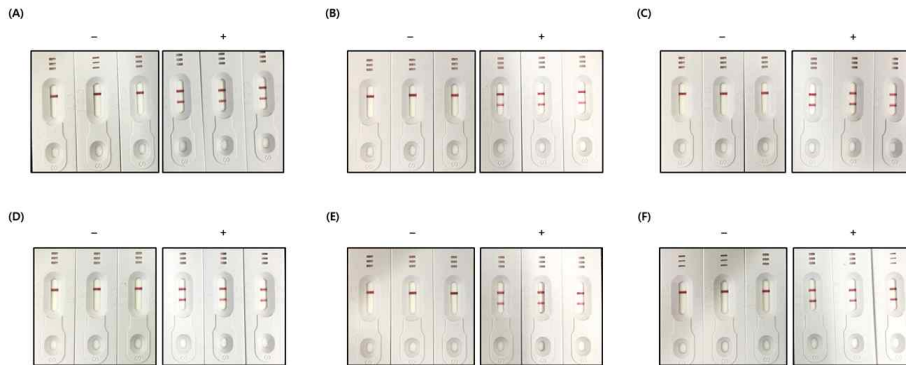


그림 3-5-52 바이러스 신속검출 키트의 반복성 측정 결과. (A): Norovirus (GI); (B): Norovirus (GII); (C): hepatitis A virus; (D): Adenovirus; (E): Rotavirus; (F): Astrovirus

(2) 정밀성 측정

(가) 정밀성, 즉 서로 다른 시험자가 같은 시료로 동일한 방법으로 실험을 실시하여 같은 결과가 나오는지 확인하였음. 각 바이러스 검출용 키트를 이용하여 같은 샘플을 세명의 시험자가 같은 방법으로 시험을 수행하여 양성 및 음성 결과를 확인하였음. 그 결과 그림 3-5-53과 같이 시험자간 정밀성은 100%로 높은 정밀성을 나타냈음

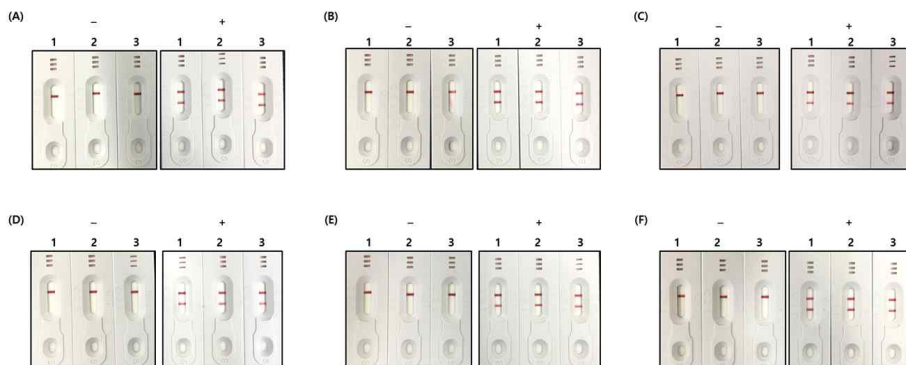


그림 3-5-53 바이러스 신속검출 키트의 시험자간 정밀성 측정 결과. (A): Norovirus (GI); (B): Norovirus (GII); (C): hepatitis A virus; (D): Adenovirus; (E): Rotavirus; (F): Astrovirus



#### 4. 개발 기술의 상용화 및 수출기반 확립

##### 가. 바이러스 신속검출 키트 시제품 개발 및 생산

###### (1) 시제품 개발 및 생산

(가) 바이러스 신속검출 키트 시제품을 개발하고 생산하였음(그림 3-5-54). 제품의 구성품은 크게 유전자 증폭시약, 디바이스, 사용버퍼로 나눌 수 있음. 유전자 증폭 시약은 RT-PCR 및 PCR을 위한 master mix 및 primer등으로 구성 되었으며, 디바이스 및 사용버퍼는 증폭한 유전자를 간편하게 확인하기 위한 용도임

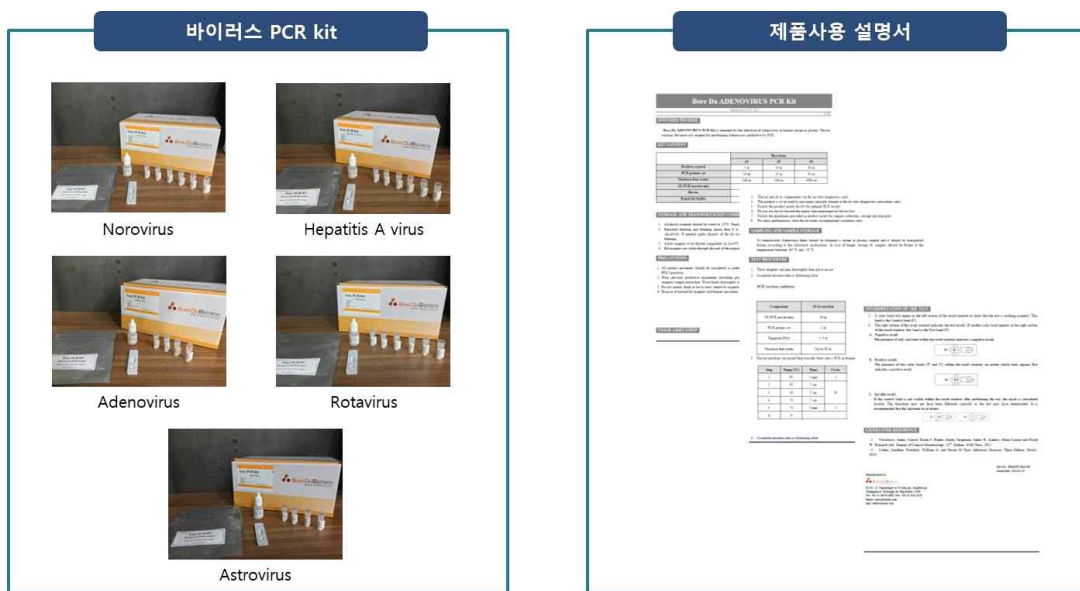


그림 3-5-54. 바이러스 신속검출 키트 시제품(좌) 및 사용 설명서(우)

###### (2) 기존 제품과의 차별성

- (가) 기존의 분자진단법인 conventional RT-PCR의 경우 유전자를 증폭 후 증폭 유전자를 확인하기 위하여 아가로스겔 전기영동을 수행하여야 함
- (나) 아가로스겔 전기영동을 위해서는 전기영동장치, 아가로스 겔이 필요하며 전기영동 후 UV illuminator가 필요하며 겔 제조시간을 포함하여 30~60분이 소요됨
- (다) 본 연구를 통해 개발한 키트는 기존의 conventional RT-PCR 후 면역크로마토그래피 방식의 래피드키트를 이용하여 증폭유전자를 확인하므로 결과확인을 위한 별도의 장비가 필요 없을 뿐만 아니라 5~10분에 결과를 확인할 수 있음
- (라) 또한, 기존의 conventional PCR의 경우 denaturation, annealing, extention 시간이 각각 30초에서 1분으로 30 cycle 기준으로 2~3시간이 소요됨
- (마) 본 연구를 통해 개발한 키트는 denaturation, annealing, extention 시간이 30초 각각 5 초로 30 cycle 기준으로 1시간 미만 소요됨

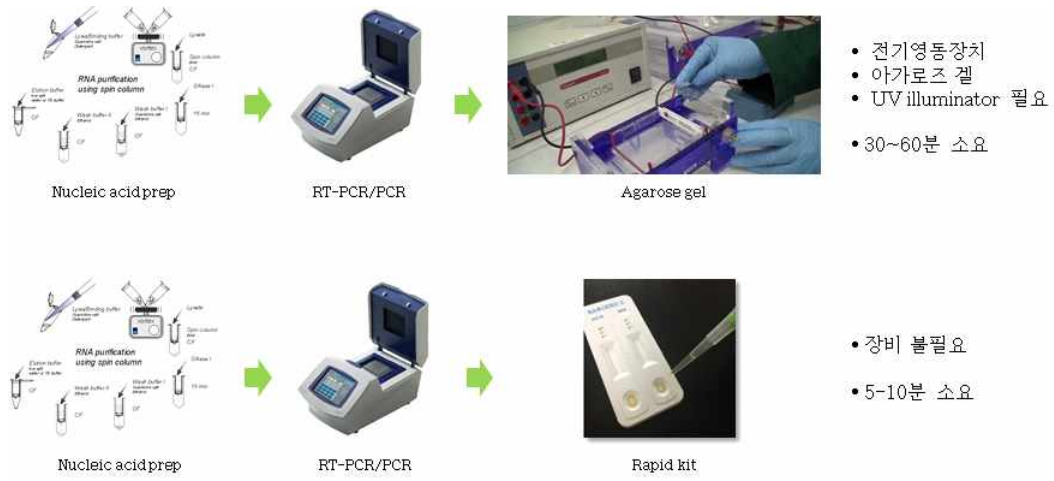


그림 3-5-55. 바이러스 신속검출키트의 간편·신속성

### 3-6. 농산물 안전관리를 위한 병원성미생물 검출법 검증 및 현장적용 시험

#### 3-6 연구요약

- 국내 농산물의 미생물학적 위해요소 및 안전관리 체계 분석
- 문헌조사 및 과거 미생물 자체 모니터링 자료 제공
- AOAC/ISO 방법에 준용한 실제 농산물에서 민감도/특이도/검출한계 분석 및 표준분석방법 개선안 도출
- 국내 농산물 및 재배환경에서 단계별 주요 미생물학적 위행안전 관리 개선방안 마련

#### 1. 농산물 관련 재배부터 유통까지 risk factor 탐색 및 모니터링 자료 조사

##### 가. 농산물 관련 재배에서 유통까지 risk factor 탐색

##### (1) 국내 농산물의 미생물학적 위해요소 탐색

##### (가) 국내·외 식중독 통계자료 분석

- 미국에서의 농산물로 인한 식중독 원인체로는 Norovirus에 의한 감염이 주를 이루고 있었으며, 특히 Green Salad에서 Norovirus와 Salmonella 모두가 검출되었는데, 이는 농식품 세척 및 음용수와 조리기구, 함께 조리하는 육류 등의 식품과의 교차오염에 의한 것으로 분석되었음(이채운 등, 2012)

표 3-6-1. 식품 구분별 병원체와 식중독 발생 통계

Rank	Food	Pathogen	Outbreaks	Illness	% Produce Outbreaks
1	Green Salad	Norovirus	139	5,139	24.6
2	Lettuce	Norovirus	29	949	5.1
3	"Fruit"	Norovirus	18	1,147	3.2
4	Sprouts	Salmonella	16	681	2.8
5	"Vegetables"	Norovirus	13	521	2.3
6	Green Salad	Salmonella	12	519	2.1
7	Fruit Salad	Norovirus	12	355	2.1
8	Tamato	Salmonella	11	1,512	2.0
9	Greens Salad	E.coli	11	560	2.0
10	Melon	Salmonella	11	401	2.0

(CSPI, 2007)

- 국내 농산물의 경우 농관원 농산물 미생물 실태조사에 따라 오염 빈도가 높은 미생물은 *B. cereus*, Pathogenic *E. coli*, *S. aureus* 순으로 나타났으며, 유해 미생물이 검출된 품목은 상추, 새싹채소, 깻잎, 배추, 시금치 등 엽채류가 다수로 나타났음
- 발생 질병의 빈도 및 심각성, 농식품 소비 빈도, 교차오염 가능성에 따른 국내 농식품 생물학적 관리 우선순위는 다음과 같음(이채운 등, 2012)
  - 식중독 사고 발생 빈도 및 위해도가 가장 높은 것으로 분석된 Norovirus, Pathogenic *E. coli*, *Salmonella* spp, *Cl. botulinum*, *L. monocytogenes*를 그룹 I으로 분류

표 3-6-2. 국내 농식품 생물학적 관리 우선순위

Priority group	Pathogen	Reason for select
I	Norovirus	- Most often the number of cases - Recently reported a lot of accidents involving
	Pathogenic <i>E.coli</i>	- The second largest number of cases and number of patients
	<i>Salmonella</i> spp.	- The third largest number of cases of domestic - Major priority in United States
	<i>Clostridium botulinum</i>	- The incidence is lower in South Korea but in developed countries, is the first managed target
	<i>Listeria monocytogenes</i>	- Interest in Korea is low but in developed countries, is the first managed target - Mainly related to meat, but recently occurred in the fruit(Melon)
II	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	- Occurred steadily - The possibility of cross contamination
	<i>Staphylococcus aureus</i>	- Occurred steadily - The possibility of cross contamination
	<i>Campylobacter jejuni</i>	- The number of cases low, but there are many number of patients per case
	<i>Bacillus cereus</i>	- High ranking in epidemiology survey
	<i>Clostridium perfringens</i>	
III	<i>Yersinia enterocolitica</i>	- Low incidence
	<i>Shigella</i> spp.	- Not currently being investigated but there is possibility of cross contamination
	<i>Cronobacter sakazakii</i>	- Surveyed in developed countries
	Hepatitis A virus	

(나) 생산단계에서의 risk factors 탐색

- 국내 농산물 생산에서부터 저장, 운송단계에서 발생할 수 있는 주요한 미생물학적 위해인 자(risk factors) 탐색과 관련하여 국내외에서 제시된 GAP 및 GMP 등의 관련 규정을 참조하여 다음과 같이 정리할 수 있음

표 3-6-3. 국내 농산물 미생물학적 risk factor

단계	주요 Risk factors 탐색과 관련한 확인 내용
토양	▶ 이전 사용용도 확인 ▶ 주변의 잠재적 오염원 존재 여부 등
용수	▶ 수원지 부근 잠재적 오염원 존재 여부 ▶ 위생처리 시설의 확인 및 분변오염 가능성 ▶ 지하수의 경우 지표면의 오염원 존재 여부 ▶ 사용 용수의 주기적 교체 확인 등
거름(퇴비)	▶ 거름 사용 여부 및 관리 현황 등
동물 및 해충	▶ 경작지 및 수원지의 동물 차단 시설 여부 ▶ 살충제 사용 수준 등
작업자	▶ 작업자의 건강 및 개인위생 수준(손씻기 등) 확인 ▶ 위생시설(화장실 등)의 존재 및 사용 등
수확	▶ 신선 농산물의 경우 직접 접촉하는 사용 기구의 청결성 및 위생수준 확인 ▶ 기계에 의한 수확인 경우 사용 기계의 청결성 및 위생수준 확인 ▶ 바로 포장되는 경우 포장재에 오염물질 존재 여부 확인 등
세척처리	▶ 먼지 등 이물제거 및 위생적 세척과정 확인 ▶ 사용 세척제의 용도 및 유효기간 등 사용 적정성 확인
냉각공정	▶ 냉각 방법의 확인(공냉 또는 수냉 등) ▶ 냉각 시설의 청결관리 및 주기적인 청소 여부 등
포장	▶ 포장 작업공간에 대한 분리 및 위생적 유지 여부 ▶ 포장설비의 세척 및 소독 방법 ▶ 포장용기의 세척 및 위생적 관리 여부 등
저장	▶ 저장 장소의 온도/습도 관리 여부 ▶ 저장제품의 바닥 및 벽과의 이격 여부 ▶ 냉각 저장시 저장시설에서의 응축수 발생 여부 등
운송	▶ 운송시의 온도/습도 유지 및 기록 여부 ▶ 운송시설의 위생적 관리 여부 등

(다) 수확 전 재배단계에서의 risk factors 탐색

□ 농산물 관련 미생물의 식중독과 관련된 특성 조사

- 농산물의 생산과정 중 오염원은 토양, 용수, 비료, 야생동물, 작업자에 기인한 교차오염 등이 요한 원인으로 밝혀져 있음(FDA, 2015)

표 3-6-4. 농산물 관련 식중독 원인 미생물의 특성

Microorganism	Typical Incubation Period	Symptoms	Infectious Dose (Number of cells)	Source
<i>Clostridium botulinum</i>	12 to 36 h	Nausea, vomiting, fatigue, dizziness, dryness of mouth and throat, muscle paralysis, difficulty swallowing, double or blurred vision, drooping eyelids, and breathing difficulties	intoxication growth and toxin production in food	soil, lakes, streams, decaying vegetation, reptiles
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	2 to 5 d	Bloody diarrhea, abdominal pain. Can lead to hemolytic uremic syndrome and kidney failure especially in children and the elderly	10 to 1000	animal feces, especially cattle, deer and human; cross contamination from raw meat
<i>Salmonella</i> spp.	18 to 72 h	Abdominal pain, diarrhea, chills, fever, nausea, vomiting	10 to 100,000	animal and human feces; cross contamination from raw meat, poultry, or eggs
<i>Shigella</i> spp.	1 to 3 d	Abdominal pain, diarrhea, fever, vomiting	~10	human feces
<i>Listeria monocytogenes</i>	1 d to 5 or more wk	Febrile gastroenteritis in healthy adults; may lead to spontaneous abortion or stillbirth in pregnant women; severe septicemia and meningitis in neonates and immunocompromised adults; mortality may be 20 to 40%	unknown dependent upon health of individual	soil, food processing environments
Hepatitis A	25 to 30 d	Fever, malaise, anorexia, nausea, abdominal pain, jaundice, dark urine	10 to 50	human feces and urine
Norwalk/Norwalk-like virus	12 to 48 h	Vomiting diarrhea, malaise, fever, nausea, abdominal cramps	unknown, probably low	human feces, vomitus

(라) 수확 후 유통단계에서의 risk factors 탐색

□ 농산물의 수확단계에서 미생물 오염도 현황

- 농산물의 수확 후 유통단계에서의 주요 오염원은 작업자의 손, 장갑, 작업복 등 작업하는 사람에 의한 교차오염이 주로 발생하는 것으로 나타남

- 실제로 깻잎의 수확단계에서 농산물, 재배환경, 개인위생을 대상으로 미생물 오염도 조사 결과에 따르면, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogens* 및 *Salmonella* spp.은 모든 농장에서 불검출 되었으나, *S. aureus*는 작업자 손에서 3.4 log CFU/g 확인되었으며, *B. cereus*는 깻잎과 줄기에서 2.0~2.4 및 1.4~2.1 log CFU/g, 관개용수 0.7 log CFU/ml, 토양 4.2~5.0 log CFU/g, 개인위생인 손에서는 3.0 log CFU/hand, 장갑과 작업복에서는 2.1~2.4 및 1.5~2.8 log CFU/100cm<sup>2</sup> 수준으로 확인(권우현 등, 2012)

표 3-6-5. 깻잎의 수확단계별 미생물 검출량

Samples (n = 4)		<i>S. aureus</i>			<i>B. cereus</i>		
		Farms			Farms		
		A	B	C	A	B	C
Crop	Perilla leaf (log CFU/g)	ND <sup>1)</sup>	ND	ND	ND	2.0 ± 0.2	2.4 ± 0.2
	Stem (log CFU/g)	ND	ND	ND	2.1 ± 0.1	ND	1.4 ± 0.6
Cultivation environment	Water (log CFU/ml)	ND	ND	ND	ND	ND	0.7 ± 0.1
	Soil (log CFU/g)	ND	ND	ND	4.6 ± 0.3	4.2 ± 0.1	5.0 ± 0.6
Personal hygiene	Hands (log CFU/hand)	3.4 ± 0.2	ND	ND	ND	ND	3.0 ± 0.3
	Gloves (log CFU/100 cm <sup>2</sup> )	ND	ND	ND	2.1 ± 0.2	2.4 ± 0.1	2.3 ± 0.3
	Clothes (log CFU/100 cm <sup>2</sup> )	ND	ND	ND	ND	2.8 ± 0.2	1.5 ± 0.1

<sup>1)</sup>ND : Not detected

## 나. 과거 농산물에서의 미생물학적 모니터링 자료 조사

### (1) 문헌조사 및 과거 자체 모니터링 자료·제공(제1협동 연계 연구)

- 국립농산물품질관리원의 생식 채소류에 대한 자체 모니터링(2015) 자료 등을 조사 및 분석하여 제1협동 연구기관인 군산대학교와 연계 연구하여 국내 주요 농산물에서의 유해미생물에 대한 전반적인 오염수준을 정량적으로 추정하였으며, 연구결과는 제1협동 연구기관의 연구결과에 수록되어 있음

## 2. 국내·외 농산물 안전관리 체계 및 실태 자료 조사

### 가. 국내·외 농산물 안전관리 체계 및 실태 자료 조사

#### (1) 국내·외 신선편이 농산물 재배부터 유통까지 미생물학적 위해요소 및 안전관리 체계 분석

- 2011년 미국에서는 농장에서 식탁까지 병원성미생물로부터 안전한 농산물 생산을 위하여 Good Agricultural Practice(GAP)를 기반으로 한 사전 예방적 안전관리 강화 규범인 Food Safety Modernization Act(FSMA)를 제정하여 단계적 시행 중에 있음
- 유럽연합안전청(EFSA)은 조기 경고시스템 확립을 위해 노력하고 있으며 2002년에는 식품안전기관 EFSA를 설립하여 식품안전, 동식물 위생 등 위해성 관리 기초자료를 제공함
- 일본의 경우 농수산성/후생성에서 2003년 식품안전위원회 설치를 설치하고 식품안전성 관련조치를 요청하고 농림수산성 소비안전국에서는 위해성 관리와 위해성 커뮤니케이션 등을 실시
- 식중독균의 경우 미국에서는 살모넬라 한 가지 세균성 식중독만으로 연간 12~16억 달러의 경제적 손실을 보았다고 보고(USDA)



- 미국에서는 식품안전성 연구를 위해 3,300만불, 범국가적 식품안전성 교육 캠페인 실시를 위해 1,400만불, 연방 식품안전성 감시체계 확대를 위해 700만불을 투자하였음
- 일본 후생성은 식품위생조사연구비 등으로 매년 약 50억원이상을 지속적으로 지원
- 영국 식품과학회는 매년 최근에 문제시되는 또는 주요 연구관심 분야를 'Hot Topics'로 정하여 제시하고 있으며, 2003년도에만 제시한 29개 핫토픽 중 식중독 유발 미생물 관련 주제가 45%(13개)를 차지함
- 재배환경(토양, 관개용수 등) 중 유해미생물의 생존, 이동성 등을 조사하고 조사결과를 작물체 오염을 예측하기 위한 자료로 활용하며 재배환경 중 오염물질의 이동성을 예측하기 위한 소프트웨어 개발이 활발히 이루어지고 있음
- 미국 농업연구청(ARS) 산하 US Salinity Lab에서는 농식품 안전성에 대한 연구가 강화되면서 오염물질에 의한 작물체 오염 예측모델을 가지고 유해미생물에 적용하기 위한 다음의 연구가 추진되고 있으며, 주요 연구내용으로는 유해미생물 검출방법, 오염원 규명, 재배환경중 이동, 행적 및 저감 방안, 토양에서 작물체로의 유해미생물 이동성 및 행적, 축산폐수 집수지역으로부터 유해미생물 이동성 및 행적 등임

### 3. 유해미생물 표준분석방법 개선안 도출 및 미생물학적 위생안전관리방안 개선안 제시

#### 가. 국내 농산물(GAP 포함)에서 미생물학적 위생안전관리방안 개선안 제시

##### (1) 제외국 농산물 미생물 안전관리 기준·규격 비교 검토

###### □ 국내(식품의약품안전처)

- 농·임산물을 세척, 박피, 절단 또는 세절 등의 가공공정을 거치거나 이에 단순히 식품 또는 식품첨가물을 가한 것으로서 그대로 섭취할 수 있는 샐러드, 새싹채소 등의 신선편의 식품에 대하여 미생물 기준 설정되어 있음

(3) 대장균 : $n=5, c=1, m=10, M=100$ (신선편의식품에 한한다)
(4) 황색포도상구균 : 1 g 당 100 이하
(5) 살모넬라 : $n=5, c=0, m=0/25$ g
(6) 장염비브리오 : 1 g당 100 이하(즉석섭취식품, 신선편의식품 중 해산물 함유 제품에 한한다).
(7) 바실러스 세레우스 : 1 g 당 1,000 이하(즉석섭취식품, 신선편의식품에 한한다)
(8) 장출혈성 대장균 : $n=5, c=0, m=0/25$ g(신선편의식품에 한한다)
(9) 클로스트리디움 퍼프린젠스 : 1 g 당 100 이하(즉석섭취식품, 신선편의식품에 한한다).

###### □ ICMSF(International Commission on Microbiological Specification for Foods)

- 식품미생물과 식품위생을 위한 전문가 국제기구인 International Union of Microbiological Societies(IUMS)를 통해 설립된 단체로 IUMS를 통해 International Union of biological Societies(IUBS)와 World Health Organization (WHO)과 연계하여 국제수준의 식품안전 확보를 미션으로 함

종류	기준	시료 채취		기준	
		N	C	m	M
frozen fruits	E.coli	5	2	100	100

□ 미국

- 미국은 자국의 식품안전 확보를 위해 관리대상 미생물에 관한 규제 기준을 강화하여 일부 고위험 식중독균에 대해 Zero tolerance 제도를 시행하고 있으며 특정 균에 대한 규격 설정보다 식품 자체에서 미생물이 검출되지 않아야 한다는 방식을 고수하고 있는 실정임
- 미국 FDA는 Aerobic plate counts, total coliforms, fecal coliforms, *E. coli* (including enteropathogenic strains), *Staphylococcus* spp., *Vibrio* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp., *Yersinia* spp., *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* 에 대해서는 10개의 샘플을 검사하며, *Salmonella* spp.는 Food Category I은 60개, Category II는 30, Category III은 15개 검사 실시

□ 일본

- 신선 채소 및 과일류 미생물 기준 규격 없음

□ 중국

종류	항목	기준
엽장채소	대장균군 (MPN//100g)	소분포장(≤90) 병·봉지포장(≤30)
	식중독균 (살모넬라, 쉬겔라, 황색포도상구균)	불검출
설탕에 저린 과일	일반세균수	≤1000
	대장균군 (MPN//100g)	≤30
	식중독균 (살모넬라, 쉬겔라, 황색포도상구균)	불검출

□ EU

종류	기준	시료 채취		기준	
		N	C	m	M
Precut, ready-to-eat	Salmonella	5	0	0/25g	0/25g
	E.coli	5	2	100	1000

(2) 모니터링 결과를 바탕으로 국내 농산물(GAP 포함) 및 재배환경에서의 단계별 주요 미생물학적 위생안전 관리방안 개선안 제시(위탁연구기관-경상대 연계 연구)

- 국내 농산물(GAP 포함) 및 재배환경에서의 단계별 주요 미생물학적 위생안전관리방안



개선안에 대해서는 위탁연구기관인 경상대학교와 연계 연구하여 아래의 품목별 위생안전 관리 방안을 도출하였음

## GAP 농산물 품목별 미생물학적 위생안전관리 가이드라인 (미생물학적 관리 개선 방안)

### ● 딸기의 매뉴얼을 통한 선행요건프로그램

#### 1) 수확단계

- 수확에 사용하는 장갑의 주기적인 세척 및 장갑 교체 등의 관리를 실시한다.
- 수확 작업 전·후 손 세척 및 손 소독을 실시한다.
- 수확에 사용하는 작업복은 청결한 상태를 유지하고 위생마스크와 위생모를 착용한다.
- 수확 작업자의 개인위생과 관련하여 설사증상이나 기타 질병 등에 대해 작업자 스스로 사전에 관리한다.
- 작업장과 농기구 및 농자재 보관 장소는 따로 분리한다.
- 야생동물이나 애완동물의 출입을 방지한다.
- 수확에 이용되는 바구니 및 신문지는 주기적인 세척과 교체를 실시한다.
- 작업자의 개인위생 관리와 수확 후 위생관리에 대해 주기적인 교육을 실시한다.

#### 2) 선별 및 포장단계

- 선별 및 포장에 사용하는 장갑의 주기적인 세척 및 장갑 교체 등의 관리한다.
- 선별 및 포장 작업 전·후 손 세척 및 손 소독을 실시한다.
- 선별에 사용하는 작업복은 청결한 상태를 유지하고 위생마스크와 위생모를 착용한다.
- 선별 및 포장 수확 작업자의 개인위생과 관련하여 설사증상이나 기타 질병 등에 대해 작업자 스스로 사전에 관리한다.
- 선별장 내 작업 도구의 보관 장소를 마련하고 작업장 내에서만 사용한다.
- 선별장 내 방충망을 설치하고 파리나 쥐의 유입을 차단한다.
- 야생동물이나 애완동물의 출입을 방지한다.
- 선별 시 병든 딸기를 제거하여 부패균으로부터 오염을 예방한다.
- 포장지와 포장 박스는 바닥과 일정 간격을 두고 사용하지 않을 때는 외부에 노출되지 않도록 보관한다.
- 작업장 및 작업대는 항상 깨끗한 상태로 먼지 제거와 소독을 실시한다.
- 선별에 이용되는 바구니 및 신문지는 주기적인 세척과 교체가 필요하다.
- 작업자의 개인위생 관리와 선별 후 위생관리에 대해 주기적인 교육을 실시한다.

#### 3) 유통단계

- 유통에 사용되는 보관 용기와 장비는 식품의 오염을 예방하도록 유지하고 청결하게 관리한다.
- 유통과정에서 냉장 온도는 4℃ 이하에서 보관하며 직사광선은 피한다.
- 운송 중 사용되는 온도계는 외부에서 온도변화를 확인할 수 있도록 임의 조작이 방지된 것을 사용한다.

● 오이의 매뉴얼을 통한 선행요건 프로그램

1) 수확단계

- 수확에 사용하는 장갑의 주기적인 세척 및 장갑 교체 등의 관리가 실시한다.
- 수확 작업 전·후 손 세척 및 손 소독을 실시한다.
- 수확에 사용하는 작업복은 청결한 상태를 유지하고 위생마스크와 위생모를 착용한다.
- 수확 작업자의 개인위생과 관련하여 설사증상이나 기타 질병 등에 대해 작업자 스스로 사전에 관리한다.
- 작업장과 농기구 및 농자재 보관 장소는 따로 분리한다.
- 야생동물이나 매완동물의 출입을 방지한다.
- 수확에 이용되는 바구니 및 집게 등의 도구는 주기적인 세척과 교체를 실시한다.
- 작업자의 개인위생 관리와 수확 후 위생관리에 대해 주기적인 교육을 실시한다.

2) 선별 및 포장단계

- 선별 및 포장에 사용하는 장갑의 주기적인 세척 및 장갑 교체 등의 관리한다.
- 선별 및 포장 작업 전·후 손 세척 및 손 소독을 실시한다.
- 선별에 사용하는 작업복은 청결한 상태를 유지하고 위생마스크와 위생모를 착용한다.
- 선별 및 포장 수확 작업자의 개인위생과 관련하여 설사증상이나 기타 질병 등에 대해 작업자 스스로 사전에 관리한다.
- 선별장 내 작업 도구의 보관 장소를 마련하고 작업장 내에서만 사용한다.
- 선별장 내 방충망을 설치하고 파리나 쥐의 유입을 차단한다.
- 야생동물이나 매완동물의 출입을 방지한다.
- 선별 시 병든 오이를 제거하여 부패균으로부터 오염을 예방한다.
- 포장지와 포장 박스는 바닥과 일정 간격을 두고 사용하지 않을 때는 외부에 노출되지 않도록 보관한다.
- 작업장 및 작업대는 항상 깨끗한 상태로 먼지 제거와 소독을 실시한다.
- 선별에 이용되는 바구니 및 신문지는 주기적인 세척과 교체가 필요하다.
- 작업자의 개인위생 관리와 선별 후 위생관리에 대해 주기적인 교육을 실시한다.

3) 유통단계

- 유통에 사용되는 보관 용기와 장비는 식품의 오염을 예방하도록 유지하고 청결하게 관리한다.
- 유통과정에서 냉장 온도는 4℃ 이하에서 보관하며 직사광선은 피한다.
- 운송 중 사용되는 온도계는 외부에서 온도변화를 확인할 수 있도록 임의 조적이 방지된 것을 사용한다.

● 고추의 매뉴얼을 통한 선행요건프로그램

1) 수확단계

- 수확에 사용하는 장갑의 주기적인 세척 및 장갑 교체 등의 관리가 실시한다.
- 수확 작업 전·후 손 세척 및 손 소독을 실시한다.
- 수확에 사용하는 작업복은 청결한 상태를 유지하고 위생마스크와 위생모를 착용한다.
- 수확 작업자의 개인위생과 관련하여 설사증상이나 기타 질병 등에 대해 작업자 스스로 사전에 관리한다.
- 작업장과 농기구 및 농자재 보관 장소는 따로 분리한다.
- 야생동물이나 애완동물의 출입을 방지한다.
- 수확에 이용되는 바구니 및 집게 등의 도구는 주기적인 세척과 교체를 실시한다.
- 작업자의 개인위생 관리와 수확 후 위생관리에 대해 주기적인 교육을 실시한다.

2) 선별 및 포장단계

- 선별 및 포장에 사용하는 장갑의 주기적인 세척 및 장갑 교체 등의 관리한다.
- 선별 및 포장 작업 전·후 손 세척 및 손 소독을 실시한다.
- 선별에 사용하는 작업복은 청결한 상태를 유지하고 위생마스크와 위생모를 착용한다.
- 선별 및 포장 수확 작업자의 개인위생과 관련하여 설사증상이나 기타 질병 등에 대해 작업자 스스로 사전에 관리한다.
- 선별장 내 작업 도구의 보관 장소를 마련하고 작업장 내에서만 사용한다.
- 선별장 내 방충망을 설치하고 파리나 쥐의 유입을 차단한다.
- 야생동물이나 애완동물의 출입을 방지한다.
- 선별 시 병든 고추를 제거하여 부패균으로부터 오염을 예방한다.
- 포장지와 포장 박스는 바닥과 일정 간격을 두고 사용하지 않을 때는 외부에 노출되지 않도록 보관한다.
- 작업장 및 작업대는 항상 깨끗한 상태로 먼지 제거와 소독을 실시한다.
- 선별에 이용되는 바구니 및 신문지는 주기적인 세척과 교체가 필요하다.
- 작업자의 개인위생 관리와 선별 후 위생관리에 대해 주기적인 교육을 실시한다.

3) 유통단계

- 유통에 사용되는 보관 용기와 장비는 식품의 오염을 예방하도록 유지하고 청결하게 관리한다.
- 유통과정에서 냉장 온도는 4℃이하에서 보관하며 직사광선은 피한다.
- 운송 중 사용되는 온도계는 외부에서 온도변화를 확인할 수 있도록 임의 조작이 방지된 것을 사용한다.

## 제 4 절. 연구성과

### 1. 연구성과 요약

성과목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학2술성과				교육지도	인력양성	정책 활용-홍보		기타 (타연구활용등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표	정책활용			홍보전시		
												SCI	비SCI						논문평균IF	
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명					
가중치	5	10		5	5	15	15	3	10	2				5	10	5				
최종목표	2	2		1	100	2	1,100	600	6	1,000		6	4	14	6	2				
연구기간내 달성실적	3	2		7	619	7	92.12	24	10	600		4	2	24	7	2	2			
연구종료후 성과창출 계획							1,000	500	2	1,000	2	1	1	2	1					
실적												2	1							

### 2. 기술실시

계약명	아스트로바이러스 검출용 PCR kit 제작기술
기술실시 내용	아스트로바이러스 유전자를 증폭하고 증폭된 유전자를 검출하는 키트를 제작하는 기술
기술실시 대상기관명	(주)보레다바이오텍
최초 기술실시 계약년도	2018
기술유형	노하우
기술실시 형태	영리법인 직접 실시
기술료 계약체결일	2019-01-03
기 장수 기술료	0원
당해연도 기술료	840000원

계약명	노로바이러스 검출용 PCR kit 제작기술
기술실시 내용	A형 간염바이러스 유전자를 증폭하고 증폭된 유전자를 검출하는 키트를 제작하는 기술
기술실시 대상기관명	(주)보레다바이오텍
최초 기술실시 계약년도	2018
기술유형	노하우
기술실시 형태	영리법인 직접 실시

기술료 계약체결일	2019-01-03
기 장수 기술료	0원
당해연도 기술료	840000원

계약명	아데노바이러스 검출용 PCR kit 제작기술
기술실시 내용	아데노바이러스 유전자를 증폭하고 증폭된 유전자를 검출하는 키트를 제작하는 기술
기술실시 대상기관명	(주)보레다바이오텍
최초 기술실시 계약년도	2018
기술유형	노하우
기술실시 형태	영리법인 직접 실시
기술료 계약체결일	2019-01-03
기 장수 기술료	0원
당해연도 기술료	840000원

계약명	아데노바이러스 검출용 PCR kit 제작기술
기술실시 내용	아데노바이러스 유전자를 증폭하고 증폭된 유전자를 검출하는 키트를 제작하는 기술
기술실시 대상기관명	(주)보레다바이오텍
최초 기술실시 계약년도	2018
기술유형	노하우
기술실시 형태	영리법인 직접 실시
기술료 계약체결일	2019-01-03
기 장수 기술료	0원
당해연도 기술료	840000원

계약명	로타바이러스 검출용 PCR kit 제작기술
기술실시 내용	로타바이러스 유전자를 증폭하고 증폭된 유전자를 검출하는 키트를 제작하는 기술
기술실시 대상기관명	(주)보레다바이오텍
최초 기술실시 계약년도	2018
기술유형	노하우
기술실시 형태	영리법인 직접 실시
기술료 계약체결일	2019-01-03
기 장수 기술료	0원
당해연도 기술료	840000원

계약명	A형 간염바이러스 검출용 PCR kit 제작기술
기술실시 내용	A형 간염바이러스 유전자를 증폭하고 증폭된 유전자를 검출하는 키트를 제작하는 기술
기술실시 대상기관명	(주)보레다바이오텍
최초 기술실시 계약년도	2018
기술유형	특허출원
기술실시 형태	영리법인 직접 실시
기술료 계약체결일	2019-01-03
기 장수 기술료	0원
당해연도 기술료	840000원

계약명	식중독 세균 신속검출을 위한 제품 개발 관련 특허
기술실시 내용	바실러스 세레우스, 황색포도상구균, 살모넬라균의 동시 검출을 위한 프

	라이머 세트 및 이를 포함하는 중합효소연쇄반응 키트
기술실시 대상기관명	(주)세니젠
최초 기술실시 계약년도	2019
기술유형	특허등록
기술실시 형태	영리법인 직접 실시
기술료 계약체결일	2019-01-07
기 장수 기술료	0원
당해연도 기술료	994000원

계약명	식중독 세균 신속검출을 위한 제품 개발 관련 특허
기술실시 내용	리스테리아 모노사이토제니스, 장출혈성 대장균, 가스피저균의 동시 검출을 위한 프라이머 세트 및 이를 포함하는 중합효소연쇄반응 키트
기술실시 대상기관명	(주)세니젠
최초 기술실시 계약년도	2019
기술유형	특허등록
기술실시 형태	영리법인 직접 실시
기술료 계약체결일	2019-01-07
기 장수 기술료	0원
당해연도 기술료	994000원

### 3. 사업화

#### 가. ㈜세니젠

##### (1) 사업화성과 및 매출실적

##### (가) 사업화 성과

항목	세부항목		성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0.19 억원
			향후 3년간 매출	3 억원
		관련제품	개발후 현재까지	억원
			향후 3년간 매출	억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 5 % 국외 : 0 %
			향후 3년간 매출	국내 : 20 % 국외 : 0 %
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %
			향후 3년간 매출	국내 : % 국외 : %
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		100 위권 안
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		50 위권 안

(나) 매출액

□ 2018년 2월 제품 출시 후 2018년 12월까지의 매출액은 19,120,000 원임

□ 주로 식품 제조업체에 판매가 되었으나, 추후 식품 제조업체 및 관련 검사 기관 등의 매출 발생을 기대함

회사명 : 주식회사 세나젠 / Genetix™ Clostridium perfringens Real-time PCR Detection kit / 2018/01/01 ~ 2018/12/31

순번	일자	내부코드	브랜드	용량코드	용량명	규격명	단위	공급가액	부가세	합계	거래처코드	거래처명	담당자명
1	2018-02-08	A0041	SANGEN	G011	Genetix™ Staphylococcus aureus Real-time PCR Detection Kit	48kit/pkt	kit	250,000	25,000	275,000	69658	비알코리(주)	윤세영
2	2018-03-07	A0043	SANGEN	G012-2(VT1 & VT2)	Genetix™ EHEC Real-time PCR Detection Kit	48kit/pkt	kit	640,000	64,000	704,000	04069	(주)그린유네인	전영일부장
3	2018-04-23	A0043	SANGEN	G012-2(VT1 & VT2)	Genetix™ EHEC Real-time PCR Detection Kit	48kit/pkt	kit	1,075,000	107,500	1,182,500	00777	주식회사 비엔에스	전영일부장
4	2018-06-23	A0043	SANGEN	G012-2(VT1 & VT2)	Genetix™ EHEC Real-time PCR Detection Kit	48kit/pkt	kit	430,000	43,000	473,000	00777	주식회사 비엔에스	전영일부장
5	2018-06-26	A0043	SANGEN	G012-2(VT1 & VT2)	Genetix™ EHEC Real-time PCR Detection Kit	48kit/pkt	kit	550,000	55,000	605,000	04069	(주)신원글로벌테크	이영희
6	2018-07-24	A0043	SANGEN	G012-2(VT1 & VT2)	Genetix™ EHEC Real-time PCR Detection Kit	48kit/pkt	kit	1,075,000	107,500	1,182,500	00777	주식회사 비엔에스	전영일부장
7	2018-07-24	A0043	SANGEN	G012-2(VT1 & VT2)	Genetix™ EHEC Real-time PCR Detection Kit	48kit/pkt	kit	270,000	27,000	297,000	00526	주식회사 에스피비삼	김정민부장
8	2018-07-25	A0043	SANGEN	G012-2(VT1 & VT2)	Genetix™ EHEC Real-time PCR Detection Kit	48kit/pkt	kit	645,000	64,500	709,500	00777	주식회사 비엔에스	전영일부장
9	2018-08-02	A0043	SANGEN	G012-2(VT1 & VT2)	Genetix™ EHEC Real-time PCR Detection Kit	48kit/pkt	kit	960,000	96,000	1,056,000	00777	주식회사 비엔에스	전영일부장
10	2018-08-17	A0043	SANGEN	G012-2(VT1 & VT2)	Genetix™ EHEC Real-time PCR Detection Kit	48kit/pkt	kit	215,000	21,500	236,500	00777	주식회사 비엔에스	전영일부장
11	2018-08-28	A0041	SANGEN	G011	Genetix™ Staphylococcus aureus Real-time PCR Detection Kit	48kit/pkt	kit	540,000	54,000	594,000	99643	(주)에스지피 차음프레스 용인지점	최정민부장
12	2018-09-06	A0043	SANGEN	G012-2(VT1 & VT2)	Genetix™ EHEC Real-time PCR Detection Kit	48kit/pkt	kit	645,000	64,500	709,500	00777	주식회사 비엔에스	전영일부장
13	2018-09-14	A0043	SANGEN	G012-2(VT1 & VT2)	Genetix™ EHEC Real-time PCR Detection Kit	48kit/pkt	kit	270,000	27,000	297,000	00341	주식회사 상용사용	심유찬주무
14	2018-10-16	A0032	SANGEN	G003(spa & qst)	Genetix™ Clostridium perfringens Real-time PCR Detection kit	48kit/pkt	kit	250,000	25,000	275,000	00526	주식회사 에스피비삼	김정민부장
15	2018-10-16	A0043	SANGEN	G012-2(VT1 & VT2)	Genetix™ EHEC Real-time PCR Detection Kit	48kit/pkt	kit	210,000	21,000	231,000	00526	주식회사 에스피비삼	김정민부장
16	2018-10-16	A0039	SANGEN	G009	Genetix™ Bacillus cereus Real-time PCR Detection kit	48kit/pkt	kit	250,000	25,000	275,000	00526	주식회사 에스피비삼	김정민부장
17	2018-10-23	A0043	SANGEN	G012-2(VT1 & VT2)	Genetix™ EHEC Real-time PCR Detection Kit	48kit/pkt	kit	860,000	86,000	946,000	00777	주식회사 비엔에스	전영일부장
18	2018-10-23	A0043	SANGEN	G012-2(VT1 & VT2)	Genetix™ EHEC Real-time PCR Detection Kit	48kit/pkt	kit	1,350,000	135,000	1,485,000	00526	주식회사 에스피비삼	김정민부장
19	2018-10-29	A0039	SANGEN	G009	Genetix™ Bacillus cereus Real-time PCR Detection kit	48kit/pkt	kit	750,000	75,000	825,000	00526	주식회사 에스피비삼	김정민부장
20	2018-11-09	A0043	SANGEN	G012-2(VT1 & VT2)	Genetix™ EHEC Real-time PCR Detection Kit	48kit/pkt	kit	645,000	64,500	709,500	00777	주식회사 비엔에스	전영일부장
21	2018-11-14	A0043	SANGEN	G012-2(VT1 & VT2)	Genetix™ EHEC Real-time PCR Detection Kit	48kit/pkt	kit	1,350,000	135,000	1,485,000	00526	주식회사 에스피비삼	김정민부장
22	2018-11-15	A0043	SANGEN	G012-2(VT1 & VT2)	Genetix™ EHEC Real-time PCR Detection Kit	48kit/pkt	kit	870,000	87,000	957,000	00272	주식회사 에스피비삼	전영일부장
23	2018-11-15	A0043	SANGEN	G012-2(VT1 & VT2)	Genetix™ EHEC Real-time PCR Detection Kit	48kit/pkt	kit	270,000	27,000	297,000	00272	주식회사 에스피비삼	전영일부장
24	2018-11-21	A0043	SANGEN	G012-2(VT1 & VT2)	Genetix™ EHEC Real-time PCR Detection Kit	48kit/pkt	kit	270,000	27,000	297,000	98658	비알코리(주)	윤세영
25	2018-11-21	A0043	SANGEN	G012-2(VT1 & VT2)	Genetix™ EHEC Real-time PCR Detection Kit	48kit/pkt	kit	645,000	64,500	709,500	00777	주식회사 비엔에스	전영일부장
26	2018-11-21	A0043	SANGEN	G012-2(VT1 & VT2)	Genetix™ EHEC Real-time PCR Detection Kit	48kit/pkt	kit	420,000	42,000	462,000	00777	주식회사 비엔에스	전영일부장
27	2018-11-29	A0043	SANGEN	G012-2(VT1 & VT2)	Genetix™ EHEC Real-time PCR Detection Kit	48kit/pkt	kit	645,000	64,500	709,500	00777	주식회사 비엔에스	전영일부장
28	2018-12-07	A0043	SANGEN	G012-2(VT1 & VT2)	Genetix™ EHEC Real-time PCR Detection Kit	48kit/pkt	kit	1,350,000	135,000	1,485,000	00526	주식회사 에스피비삼	김정민부장
29	2018-12-11	A0043	SANGEN	G012-2(VT1 & VT2)	Genetix™ EHEC Real-time PCR Detection Kit	48kit/pkt	kit	1,075,000	107,500	1,182,500	00777	주식회사 비엔에스	전영일부장
합계								19,120,000	1,912,000	21,032,000			



구분		( 2018년 )	( 2019년 )	( 2020년 )	( 2021년 )
		수행 기간 내	종료 후 1년	종료 후 2년	종료 후 3년
국내	시장점유율(%)	1.0	1.2	1.5	2.0
	판매량(단위:Kit)	55	100	200	400
	판매단가(원)	350,000	350,000	350,000	350,000
	국내매출액(백만원)	19	35	70	140
해외	시장점유율(%)	-	-	-	-
	판매량(단위:Kit)	-	-	-	-
	판매단가(\$)	-	-	-	-
	해외매출액(만\$)	-	-	-	-

(2) 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	3			
	소요예산(백만원)	400			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3	3년후	5년후
		단위(%)	0.1912	3	5
	시장 점유율	현재까지	3	3년후	5년후
		국내	5	20	45
	국외	-	-	-	
무역 수지 개선 효과	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획	본 과제의 성과를 바탕으로 식품안전과 관련된 전반적인 식중독균, 바이러스 ,GMO등을 검출할 수 있는 신속 분자진단키트를 개발할 계획임			
	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	0.1912	3	5	
	수출	-	-	-	

- 고객군 강화: 현재 당사 고객 중 PCR 장비를 보유하고 있는 가공식품업체 및 농산물 생산/유통관련 50개 회사를 대상으로 제품 promotion을 집중 수행하여 매출 목표 달성할 예정임
- 50개 사에 연간 600만원씩의 매출로 3년 후 3억원 매출 달성할 계획임
- 식품전시회 및 학회 참가를 통한 제품 홍보 강화: 서울 국제 식품산업대전, 부산 국제 식품대전, 대한민국 식품대전, 푸드위크 등의 대형 식품 전시회 및 식품과학회, 미생물생명공학회, 식품안전성학회 등의 대형 국내 학회에 각각 3 곳 이상 전시회 참가를 통해 제품홍보를 강화할 예정임
- 사업전문가 세미나: 사업전략 자문가들을 초빙하여 사업전략 자문회의를 가질 예정임

**나. ㈜보레다 바이오텍**

(1) 사업화성과 및 매출실적

(가) 사업화 성과

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0 억원
			향후 3년간 매출	3 억원
		관련제품	개발후 현재까지	0.97 억원
			향후 3년간 매출	3 억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 0 % 국외 : 0 %
			향후 3년간 매출	국내 : 0.2 % 국외 : 0.02 %
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 0.01 % 국외 : 0 %
			향후 3년간 매출	국내 : 0.02 % 국외 : 0 %
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		100위 이하
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		100위 이내



(2) 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	1			
	소요예산(백만원)	100			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		0	3	5	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	0	0.2	0.3
국외		0	0.02	0.03	
	향후 관련기술, 제품을 응용한 다 모델, 제품 개발계획	관련 기술을 이용하여 다양한 감염성 질병 질환 진단용 PCR 키트 개발을 계획하고 있음.(예: 말라리아 등)			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	0	0.5	1	
	수 출	0	2	3	

4. 정책활용

시책명	관리부처	기대효과	정책활용상태
국내 농산물의 미생물학적 안전성 평가 및 관리체계 개선 연구 (분석방법 개선)	국립농산물품질관리원 기획조정과	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 식중독 세균 및 바이러스 신속검출 PCR 키트 활용</li> <li>○ 농산물(GAP 포함) 모니터링</li> <li>○ 신선농산물 위생 안전관리 개선 방안 마련</li> <li>- 수확 후 관리에 중점을 둔 GAP 농산물 관리 개선 방안 마련</li> </ul>	정책 시행 (2019년 1월 1일)
GAP 농산물 품목별 미생물학적 위생안전관리 개선 방안 제안	국립농산물품질관리원 인증관리팀	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 미생물학적 안전성 확보를 위한 GAP 시설의 지정 기준 보완 방안 제시</li> <li>○ 농산물 안전관리를 통하여 농식품 관련 식중독 사전 차단</li> <li>○ 농산물 유통단계별 미생물학적 안전성 확보를 통한 국산 농산물의 경쟁력 강화, 국민건강 증진 및 농가 소득 증대</li> </ul>	정책 건의
농산물의 미생물학적 위해요인 분석 결과 활용	국립농산물품질관리원 소비안전과	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 농산물과 농업용수, 토양에 대한 식중독 세균, 바이러스 분석 결과 활용</li> <li>○ 농산물 품목별, 유해 미생물 성분별, 재배단계별 위해요인 분석 결과를 생산단계 농산물의 모니터링을 위한 계획 수립에 참고</li> </ul>	제안 예정

5. 연구인력활용 / 양성성과

인력양성명	학위	인력양성년도	인력양성대상수
정보름	석사	2016년	1
황진하	석사	2017년	1

변다래	석사	2017년	1
김가람	석사	2017년	1
김지연	석사	2018년	1
최윤희	석사	2017년	1
김하늘	석사	2018년	1

## 6. 특허

### 가. 특허 출원

특허 출원				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2017년	리스테리아 모노사이토제니스, 장출혈성 대장균, 가스피저균의 동시 검출을 위한 프라이머 세트 및 이를 포함하는 중합효소연쇄반응키트	(주)세니젠	대한민국	10-2017-0110405
2017년	바실러스 세레우스, 황색포도상구균, 살모넬라균의 동시 검출을 위한 프라이머 세트 및 이를 포함하는 중합효소연쇄반응키트	(주)세니젠	대한민국	10-2017-0110407
2017년	A형 간염 바이러스 검출용 PCR 프라이머 및 이를 응용한 래피드 키트	(주)보레다 바이오텍	대한민국	10-2017-0133443

### 나. 특허 등록

특허 등록				
등록연도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2018년	리스테리아 모노사이토제니스, 장출혈성 대장균, 가스피저균의 동시 검출을 위한 프라이머 세트 및 이를 포함하는 중합효소연쇄반응키트	(주)세니젠	대한민국	1018461820000
2018년	바실러스 세레우스, 황색포도상구균, 살모넬라균의 동시 검출을 위한 프라이머 세트 및 이를 포함하는 중합효소연쇄반응키트	(주)세니젠	대한민국	1018469520000

## 7. 논문

계재연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI 구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2016년	GAP 인증·미인증 상추 및 오이 농가의 미생물학적	김정숙	심원보	정덕화	Journal of Food Hygiene and	31(6)	국내	비SCI

계재연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내 외 구분	SCI 구분
		주저자	교신저 자	공동저자				
	오염도 평가				Safety			
2017년	Effect of the precutting process on sanitizing treatments for reducing pathogens in vegetables	황진하	박기환	윤재현 배영민 최미란	Food science and biotechnology	26(2)	국내	SCI
2017년	신선한 딸기의 생산 및 유통 단계에서의 미생물 모니터링 및 미생물 오염 방지 또는 저감화 방법 모색	김솔아 이정은	심원보	김고운 김수환	Journal of food hygiene and safety	32(6)	국내	비SCI
2017년	Combined influence of multiple climatic factors on the incidence of bacterial foodborne diseases	박명수	박경진	박기환	The Science of the total environment	610-611	국외	SCI
2018년	Identification of Cystoisospora ohioensis in a Diarrheal Dog in Korea	이상민	최창순	김준기 천두성 문은아 서동주 정순탁 신한샘	The Korean journal of parasitology	56(4)	국내	SCI
2018년	Interrelationships between Multiple Climatic Factors and Incidence of Foodborne Diseases	박명수		박기환 박경진	International journal of environmental research	15(11)	국외	SCI
2019년	Evaluation of the microbial contamination of fresh produces and their cultivation environments from farms in Korea	송하나	이선영	윤재현 최연선 한아름 김지연 김주희 현정은 배영민 압다тол허 크 최창순 박기환	foodscience and biotechnology	publish 예정	국내	SCI
2019년	Foodborne viruses detected sporadically in the fresh produce and its production environment in South	신한샘	최창순	박현경 서동주 정순탁 여다슬 왕조기 박기환	Foodborne Pathogens and Disease	publish 예정	국외	SCI

	Korea							
2019년	국내 식품냉동창고 온도분포 실태 및 확률분포모델 분석	박명수	박경진	김가람 박기환	Journal of Food Hygiene and Safety	Publish 예정	국내	비SCI

## 8. 학술대회 발표

계재연도	발표명	발표자	학술대회	국내·외
2016년	미생물 위해평가 활용 강화를 위한 기술적 접근 방안	박경진	한국식품위생안전성학회	국내
2016년	세척수 온도에 따른 유기농 상추에서의 Escherichia coli O157:H7 생장 예측모델 개발	김하늘	한국식품위생안전성학회	국내
2016년	Monitoring of the Contamination Levels of Foodborne pathogens in Agricultural Products	김성연	2016 KFN International Symposium and Annual Meeting	국내
2016년	Microbial Prevalence in Chinese Cabbage and Farming Field. The Annual Meeting of World Congress of The Korean Society of Food Hygiene and Safety	최윤희	2016 KFN International Symposium and Annual Meeting	국내
2016년	Effect of enzyme treatments on the texture and digestibility of vegetable foods	윤재현	한국식품위생안전성학회	국내
2016년	Evaluation of the Microbial Prevalence in Romain Lettuce and Surrounding Agricultural Fields	윤재현	(사)한국급식외식위생학회 추계 학술심포지움	국내
2016년	농산물우수관리제도(GAP) 인증개선을위한상추및오이농장미생물오염도조사	김정숙	한국식품위생안전성학회	국내
2017년	Prevalence of enteric RNA viruses and male-specific(F+) RNA coliphage in fresh vegetables and environmental samples	박현경 신한샘	한국식품과학회	국내
2017년	Assessment of the Microbiological Quality of Groundwater Used at Postharvest Facilities in Korea	김성연	한국식품과학회	국내
2017년	Resistance of Escherichia coli O157:H7 within a single or dual-species biofilm to dry condition and sanitizing treatments	최연선	한국식품과학회	국내
2017년	Evaluation of the microbial prevalence in strawberry and surrounding	최연선	한국식품과학회	국내

계재연도	발표명	발표자	학술대회	국내·외
	agricultural field			
2017년	Evaluation of Microbial Quality in Chinese cabbage and Environment	최윤희	한국식품과학회	국내
2017년	Modelling growth of Escherichia coli O157:H7 in fresh organic lettuce by various washing temperature	김가람	한국식품위생안전성학회	국내
2017년	Effect of pH and sodium chloride on the growth and cytotoxicity of Bacillus cereus	최연선	한국식품위생안전성학회	국내
2018년	Analysis of Microbiological Hazard in Chinese Cabbage and Growing	방성혁	IAFP	국외
2018년	Investigation and monitoring of norovirus from agricultural water	김성연	한국미생물학회	국내
2018년	Monitoring of foodborne virus in field-grown fresh produce and environmental samples in South Korea	신한샘	한국식품위생안전성학회	국내
2018년	Seasonal surveillance for the contamination of foodborne viruses in 10 reservoirs of irrigation water in Gyeonggi province	Zhao qi Wang	한국식품위생안전성학회	국내
2018년	재배 및 유통 단계 열무의 미생물학적 수준 평가	손지영	한국식품위생안전성학회	국내
2018년	Evaluation of the microbial contamination of fresh produce, irrigation water, and soil at farms in South Korea	송하나	한국식품과학회	국내
2018년	Effects of osmotic and acidic stresses on the behavior Salmonella enterica serovar Enteritidis in laboratory broth	송하나	한국식품과학회	국내
2018년	Induction of viable-but-nonculturable (VBNC) Escherichia coli O157:H7 in the presence of high salt concentration	송하나	한국식품위생안전성학회	국내
2018년	The establishment and risk assessment of microbiological hygienic management in agricultural products	이성준	한국식품위생안전성학회	국내
2018년	Microbial monitoring at the production and distribution stages of fresh strawberries and exploring ways to prevent or minimize microbial contamination	김솔아	한국식품위생안전성학회	국내

## 9. 전시회 참가

행사명칭	전시품목	장소	활용년도
MEDICA 2018	항체, PCR kit	Messe Dusseldorf/Dusseldorf/Germany	2018
한국미생물생명공학회	PCR kit	대한민국 여주시	2018

- 상품화 완료 후 2018년 6월 26일부터 29일까지 여수에서 개최된 한국미생물생명공학회 전시에 참가하여 제품 홍보를 하였음. 홍보 부스 내에 제품 모형을 전시, 홍보하였음



## 10. 고용창출

고용인력	고용기관명	고용창출일	고용형태
박은지	(주)보레다 바이오텍	2016-11-21	정규직
김영진	(주)세니젠	2016-12-01	정규직
한석원	(주)보레다 바이오텍	2017-01-09	정규직
김성수	(주)보레다 바이오텍	2018-04-01	정규직
김영희	(주)보레다 바이오텍	2018-06-11	정규직
이보경	(주)보레다 바이오텍	2018-06-11	정규직
권민성	(주)보레다 바이오텍	2018-07-10	정규직
이경근	(주)세니젠	2018-08-08	정규직
김민정	(주)보레다 바이오텍	2018-10-02	정규직
이현희	(주)보레다 바이오텍	2018-11-01	정규직

## 제 3 장. 목표 달성도 및 관련분야 기여도

### 제 1 절. 목표달성도

#### 1-1. 최종 성과 목표

- 안심 농산물 생산을 위한 농업용수, 세척용수, 토양 및 농산물 등 재배로부터 최종 유통까지 국내 농산물의 미생물학적 안전성 평가 및 농산물별 가이드라인 작성
  - 농산물 관련 식중독 등에 대한 사전 예방 및 관리 방안 마련
- 우수농산물관리제도(GAP)의 미생물학적 관리 개선 방안 마련
- 실제 농산물의 미생물학적 품질관리를 위한 표준분석방법의 개선 및 신뢰도 제고
- 현장적용이 가능한 유해미생물(세균/바이러스) 신속 검출법 개발

#### 1-2. 연차별 성과목표

구분 (년도)	세부과제명	세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도	[제1세부 : 중앙대학교]	주요 다소비 농산물 생산에서 소비까지 단계별 미생물학적 오염도 조사	100	○ 주요 다소비 농산물 재배부터 유통·소비까지 단계별 미생물학적 오염도 조사 - 농산물 및 환경시료에서의 모니터링 [세균 6종 / 바이러스 5종]
	[위탁기관 : 경상대학교]	신선농산물 대표작물 선정 및 위생안전관리 개선 방안 마련	100	○ 신선농산물(엽채류, 과채류, 근채류 및 과채류)의 대표작물 선정 - 최근 작물별 GAP 인증현황 조사 및 대표 GAP 농산물 선정 - GAP 농산물 품목별 농가 선정 및 현장방문(제3협동 연계)을 통한 미생물학적 위해요소 조사·분석 ○ 현장방문조사를 통한 미생물학적 위해요인 발생원인 분석 및 위생안전관리 개선 방안 마련 : 제1협동, 제3협동 연계 연구
	[제1협동 : 군산대학교]	신선농산물 관련 유해미생물과 국내 질병발생과의 관련성 분석 및 통계학적 오염수준 정량화	100	○ 신선농산물 관련 유해 미생물에 의한 국내 질병발생 현황과의 관련성 분석 - 국내 식중독 발생 동향 분석 - ALOP 개념 적용 국내 실제 식중독 발생 현황 분석 - 식중독 발생사례 자료로부터 농산물 관련 재배에서 유통까지 risk factor 탐색 : 제3협동 연계 연구 ○ 농산물에 대한 미생물학적 모니터링 결과에 대한 통계학적 오염수준 정량화 : 제1세부, 제3협동 연계 연구 - 제1세부 모니터링 결과 및 제3협동 과거 분석자료 활용 - 통계적 방법 및 모니터링 결과에 대한 오염수준 정량화

구분 (년도)	세부과제명	세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	달성도 (%)	연구개발 수행내용
	[제2협동 : ㈜세니젠]	6종 식중독 세균 신속검출 특이 유전자 마커 탐색 및 multiplex real-time PCR Kit 최적 조건 확립	100	○ 위해 식중독 세균 6종에 대한 특이 유전자 마커 탐색 - NCBI에 등록된 유전자 정보를 활용하여 6종의 식중독 표준균주와 wild type 균주에 공통적으로 적용 가능한 타겟 유전자 및 마커 탐색 ○ 1시간 이내 multiplex real-time PCR Kit 최적조건 확립 - 식중독균 특이적 반응성 multiplex real-time PCR 용 프라이머/프로브 세트 개발 및 선정 - 식중독균 진단용 프라이머의 특이성 검정 및 multiplex real-time PCR kit의 최적조건 확립
	[제3협동 : 국립농산물품질관리 원 시험연구소]	농산물 관련 재배부터 유통까지 risk factor 탐색 및 모니터링 자료 조사	100	○ 농산물 관련 재배에서 유통까지 risk factor 탐색 - 국내 농산물의 미생물학적 위해요소 탐색 ○ 과거 농산물에서의 미생물학적 모니터링 자료 조사 : 제1협동 연계 연구 - 문헌조사 및 과거 자체 모니터링 자료·제공
	[제4협동 : (주)보레다바이오텍]	식중독 바이러스 5종 신속검출 PCR 최적조건 확립	100	○ 위해 식중독 바이러스 5종에 대한 신속검출 PCR 마커 탐색 및 최적조건 확립 - NCBI에 등록된 유전자 정보를 활용한 타겟 바이러스 유전자 및 마커 탐색 - 식중독 바이러스 신속검출을 위한 최적 PCR primer 제작 및 특이성 검정 - 실제 바이러스를 이용한 PCR 조건 확립
2차 년도	[제1세부 : 증양대학교]	1차년도 모니터링 연구 지속적 수행 및 참여기관을 비롯한 자문위원회 개최	100	○ 1차년도 모니터링 연구 지속적 수행 - 농산물 및 환경시료에서의 모니터링 [세균 6종 / 바이러스 5종]
	[위탁기관 : 경상대학교]	GAP 농산물 유해미생물 저감 장치 및 시설 보완 방안 제시	100	○ 신선농산물 중 비세척 신선농산물에 대한 모니터링 및 현장조사 - 신선농산물의 수확단계 및 선별단계의 관리점 도출 및 관리방안 마련 ○ GAP 농산물에서 유해미생물 저감 장치 및 시설 보완 방안 확립 - 국내·외 장치 및 기술 조사·분석 및 장치·시설의 보완(안)제시 - 미생물 저감을 위한 플라즈마 발생장치를 이용한 저감화 효과 연구
	[제1협동 : 군산대학교]	농산물 관련 미생물학적 안전성 평가를 위한 QMRA-동태 모델 개발	100	○ 안전성 평가를 위한 재배부터 유통까지 동태학적 (Fate & Transport) 모델 개발 - 베이지안 네트워크를 이용한 재배에서 유통단계까지 오염원 및 동태학적 이동경로 조사·분석 및 모형 개발 ○ 동태학적 모델 기반 QMRA 활용 재배부터 유통까지의 미생물학적 (세균/바이러스) 안전성 평가 : 제3협동 연계 연구 - 정량적 미생물학적 위해평가(QMRA)를 이용한 농산물에서 미생물학적 위해안전성 평가
	[제2협동 : ]	위해 식중독 세균	100	○ 식중독 세균 신속검출을 위한 증균배지 개발기술 활용 전처리



구분 (년도)	세부과제명	세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	달성도 (%)	연구개발 수행내용
	(주)세니젠]	6종 신속검출 전처리 방법 개선 및 multiplex real-time PCR Kit 개발		<b>방법 개선안 도출</b> - 6시간 이내 증균할 수 있는 증균배지 개발기술 조사 및 적용평가 ○ 위해 식중독 세균 6종 동시 검출 multiplex real-time PCR kit개발 - 현재 구축된 Fluidigm사의 multiplex real-time PCR system 응용 ○ 증균 배지 기술과 multiplex real-time PCR 기술을 활용한 신속 검출 분석 평가 - 8시간 이내 6종의 식중독 세균의 분석 평가 ○ 개발기술을 활용한 multiplex real-time PCR 자동분석시스템 구축 - 식중독 세균 신속검출용 multiplex real-time PCR 키트 개발 및 이를 활용한 자동분석시스템 구축
	[제3협동 : 국립농산물품질관리 원 시험연구소]	국내·외 농산물 안전관리 체계 및 실태 자료 조사	100	○ 국내·외 농산물 안전관리 체계 및 실태 자료 조사 : 제1협동 연계 연구 - 국내·외 신선편이 농산물 재배부터 유통까지 미생물학적 위해요소 및 안전관리 체계 분석
	[제4협동 : (주)보레다바이오텍]	5종 식중독 바이러스 신속검출 전처리 방법 개선 및 래피드 PCR 키트 개발	100	○ 식중독 바이러스 탈리/농축기법 개발기술 활용을 통한 전처리 방법 개선안 도출 - 식중독 바이러스 선택적 농축을 자료 조사 및 적용 평가 - 열채류 등의 농산물에서 상용화된 식중독 바이러스 탈리용액 적용 - 신속검출을 위한 상용화된 항체필터 등을 활용한 식중독 바이러스 분리농축기술 적용 ○ 위해 식중독 바이러스 신속검출용 래피드 PCR 키트 개발 및 최적화 조건 수립 - PCR product 표지법 개발 - 개발기술을 이용하여 신속검출 래피드 PCR 키트 개발 - 다양한 polymerase 및 PCR 반응 버퍼를 사용하여 PCR 반응시간 단축 및 최적조건 확립
3차 년도	[제1세부 : 증양대학교]	개발된 신속검출 키트 field test 및 다소비 농산물 단계별 미생물학적 위생안전관리방안 개선안 확립	100	○ 1-2차년도 모니터링 연구 지속적 수행 ○ AOAC/ISO validation 방법을 준용한 농산물 및 재배환경에서의 개발된 신속검출 kit 현장 적용 검증 - 개발된 kit를 활용하여 다소비 농산물 및 재배환경에서의 유해미생물 민감도/특이도/검출한계 검증 ○ 다소비 농산물 생산/보관/유통/소비 과정에서의 단계별 주요 미생물학적 위해요소 분석 및 개선방안 도출 : 위탁기관, 제1협동, 제3협동 연계 연구 - 모니터링 결과를 바탕으로 다소비 농산물 전단계에 걸쳐 미생물학적 위해요소 분석 및 위생안전관리방안 개선안 확립
	[위탁기관 : 경상대학교]	GAP 농산물 미생물학적 위생안전관리 개선방안 제시 및 GAP 시설 기준 보안 방안 제시	100	○ GAP 인증 신선농산물의 미생물학적 위생안전관리 및 가이드라인 확립 ○ 신선농산물 재배 농가의 GAP 적용 전·후의 미생물 안전성 비교 분석 - GAP 농산물 처리 과정, 작업장 관리, 작업자 관리, 포장 및 유통 등 단계별 비교 분석 ○ 우수농산물관리인증제도(GAP) 미생물학적 위생안전관리 개선 방안 확립 : 제1세부, 제1협동, 제3협동 연계 연구 - 작업도구 관리, 위해요소관리프로그램 작성 내용 보완, 선행요건

구분 (년도)	세부과제명	세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	달성도 (%)	연구개발 수행내용
				관리 프로그램 실시 중심의 GAP 농산물 미생물학적 위생안전관리 개선방안 제시
	[제1협동 : 군산대학교]	유해미생물 관리 우선순위 목록화 및 기준·규격, 위생안전관리방안 개선안 제안	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 농산물의 생물학적 유해미생물 관리 우선순위 목록화 <ul style="list-style-type: none"> <li>- QMRA 기반 위해수준을 이용한 농산물에서 유해미생물 관리 우선순위 제안</li> </ul> </li> <li>○ 재배부터 유통까지 위생안전관리 및 미생물학적 위해안심관리 방안 확립 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 위해수준에 근거한 미생물 안전기준 설정</li> </ul> </li> <li>○ Sampling plan 기법을 활용한 유해미생물 기준·규격 설정 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 제외국 농산물 미생물 안전관리 기준·규격 비교 검토</li> </ul> </li> <li>○ 농산물에서 미생물학적 위생안전관리방안 개선안 확립 : 제1세부, 위탁기관, 제3협동 연계 연구 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 제외국 농산물 미생물 안전관리 기준·규격 비교 검토</li> <li>- 모니터링 결과를 바탕으로 다소비 농산물 및 환경에서의 단계별 주요 위해요소 분석 및 관리 개선방안 확립</li> </ul> </li> </ul>
	[제2협동 : ㈜세니젠]	식중독 세균 신속검출 키트의 AOAC 인증 및 Field test	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 개발된 PCR 키트의 현장적용 평가를 위한 민감도 및 특이도 검사 : 제1세부, 제3협동 연계 연구 <ul style="list-style-type: none"> <li>- AOAC 방법을 준용한 농산물 및 재배환경에서의 민감도/특이도/검출한계/검출시간 분석: QC test/현장담당자 등</li> </ul> </li> <li>○ 개발 제품의 사용자 편의 제품 설명서 제작 및 표준분석방법 개선안 도출 : 제1세부, 제3협동 연계 연구 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 사용자 편의 제품 사용설명서 제작 및 표준분석방법 개선안 도출</li> </ul> </li> <li>○ 개발 기술의 상용화 및 수출기반 확립</li> </ul>
	[제3협동 : 국립농산물품질관리 원 시험연구소]	유해미생물 표준분석방법 개선안 도출 및 미생물학적 위생안전관리방안 개선안 제시	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 농산물 신속분석법 현장 적용 평가 및 표준분석방법 개선안 도출 : 제1세부, 참여기업, 제2협동 연계 연구 <ul style="list-style-type: none"> <li>- AOAC/ISO 방법에 준용한 실제 농산물에서의 민감도/특이도/검출한계 분석 및 표준분석방법 개선방안 도출</li> </ul> </li> <li>○ 국내 농산물(GAP 포함)에서 미생물학적 위생안전관리방안 개선안 제시 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 제외국 농산물 미생물 안전관리 기준·규격 비교 검토</li> <li>- 모니터링 결과를 바탕으로 국내 농산물(GAP 포함) 및 재배환경에서의 단계별 주요 미생물학적 위생안전관리방안 개선안 제시</li> </ul> </li> </ul>
	[제4협동 : (주)보레다바이오텍]	개발된 바이러스 신속검출 키트의 AOAC 인증 및 Field test	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 개발된 PCR 키트의 현장적용 평가를 위한 민감도 및 특이도 검사 : 제1세부, 제3협동 연계 연구 <ul style="list-style-type: none"> <li>- ISO protocol을 준용한 농산물 및 재배환경에서의 민감도/특이도/검출한계/검출시간 검증</li> <li>- 검출하는 기관에서 QC test/현장담당자 등에 활용 : 검출효율 등을 실질적으로 평가</li> </ul> </li> <li>○ 개발 제품의 사용자 편의 제품 설명서 제작 및 표준분석방법 개선안 도출 : 제3협동 연계 연구 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 사용자 편의 제품 사용설명서 제작 및 표준분석방법 개선안 도출</li> </ul> </li> <li>○ 개발 제품의 상용화 및 수출기반 확립</li> </ul>

## 제 2 절. 관련분야기여도

### 1. 기술적 측면

- 국내 다소비 농산물에서 식품안전 평가기술인 미생물 위해평가(Microbial risk assessment) 발전에 기여
- 미생물 위해성 분석(Risk analysis)에 대한 과학적, 기술적 발전에 기여
- 국내 위해성 분석 및 식품위생관리 제도개발에 기초자료 제공
- ㈜세니젠은 식중독균 6종에 대한 Marker 탐색 및 1시간 이내 Multiplex Real time PCR kit의 개발 및 상품화를 완료하였으며 독자적으로 새롭게 개발 검출법을 통해 식품안전성 분야에 보다 신속하고 민감도와 정확도가 향상된 식품위해요소의 진단 및 평가방법을 제공

### 2. 경제적·산업적 측면

- 국내에서 생산되는 농산물의 안전성 향상 및 신뢰성 확보로 농산물의 시장성 및 수출 증대에 기여
- 국내 다소비 농산물 재배단계에서의 미생물학적 위해요소관리 중심의 농산물관리 제도 개선 및 보완으로 농산물의 안전성 확보
- 공정 시설별, 작업장의 미생물 제어를 통해 식품의 생물학적 안전성을 확보하며 위해요소의 신속한 검출을 통해 빠른 시간내에 원인을 파악하고 대응을 할 수 있어 살균공정 및 생산공정의 효율이 향상에 기여

### 3. 정책·사회적 측면

- 국내 다소비 농산물에서의 병원성 식중독 원인균 안전관리 방안에 대한 일관성 있는 보도자료, 설명자료 및 홍보자료로 제공될 수 있음
- 국내 다소비 농산물 식품안전 섭취 방법 및 기준은 식중독 발생에 대한 사전 예방 등 식품안전에 대한 사회적 인식 고취효과 제고

### 제 3 절. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

#### 1. 목표 미달성 시 원인(사유)

□ 해당없음

#### 2. 차후대책(후속연구의 필요성)

가. 신선섭취 농산물의 주요 생산시기 동안 식중독 바이러스 오염도 및 검출 빈도가 증가하므로, 이를 예방할 수 있는 식품안전 관리 기술 개발 및 실태 조사가 필요성이 확인되었음

기획주제명	샐러드, 김치 등의 주원료인 신선 농산물의 노로바이러스 안전관리를 위한 원재료, 생산시설(산지, 가공시설, 재배 및 가공 환경) 모니터링
제안배경	<p>국내 식중독 감염원 1위를 차지하고 있는 샐러드 등 채소류에 의한 노로바이러스 오염사고 지속발생에 따른 선제적 예방 조치를 위한 기초자료 확보</p> <p>□ 문제상황 / 이슈발생 현황</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 샐러드 등 신선채소류가 국내 식중독 감염원 1위 차지</li> <li>○ 학교급식 김치의 노로바이러스 오염 및 식중독 발생사례 지속             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 식품의약품안전처는 학교의 식중독 사고 원인으로 김치에 오염된 노로바이러스 확인 (SBS뉴스 등)</li> <li>- 식약처 연구사업 결과 김치의 발효과정이 노로바이러스 저감화에 충분하지 않으며, 생산단계, 원재료 관리가 중요함을 확인.</li> <li>- ipet 연구사업에서 매년 폭염, 한냉, 가뭄 등을 반복하는 기후변화가 신선채소류 및 김치 주재료의 미생물학적 오염과 높은 상관성이 있다는 조사 진행중</li> </ul> </li> </ul> <p>□ 문제점의 발생원인 또는 미해결 지점</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 중소규모 김치생산업체 및 샐러드가공업체에서 사용하는 지하수 오염             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 김치생산업체 대상 전수조사를 통하여 지하수 오염 여부 조사 실시</li> </ul> </li> <li>○ 계절 생산을 하는 배추, 열무, 무 등의 신선채소 생산단계에서 농업용수 오염으로 인한 원재료 오염발생             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 신선채소류 및 김치 주재료인 배추, 열무, 무 등을 대상으로 한 노로바이러스 모니터링 자료 부재</li> <li>- 신선채소류 및 배추, 열무, 무 등에 공급되는 농업용수의 오염도 모니터링 및 기초자료 확보 필요</li> <li>- 농업용수의 노로바이러스 안전관리 기술 개발 필요</li> <li>- 수입 김치 및 신선채소류 비율 증가에 따른 노로바이러스 모니터링 중요도 증가</li> <li>- 국내 신선샐러드 및 김치 생산업체 생산 공정별 노로바이러스</li> </ul> </li> </ul>

	<p>모니터링 기초자료 확보 필요</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>□ 제안주제에 대하여 연구개발이 이루어지지 않을 경우 예상되는 문제점 <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 기후변화에 따른 극심한 기상 변화가 농산물 오염을 유발할 가능성이 높아지고 있어 주소비 식품군 중 하나인 김치의 바이러스오염 가능성 지속</li> <li>○ 현재 녹황색 채소를 포함한 다양한 농산물의 바이러스 오염 및 식중독 발생위험 지속</li> </ul> </li> </ul>
기획목표	<ul style="list-style-type: none"> <li>□ 신선채소류 및 김치 주재료(배추, 무, 열무 등)에 대한 생산시기, 지역별 노로바이러스 모니터링 및 기후관련 정보 수집</li> <li>□ 신선채소류 및 김치 주재료(배추, 무, 열무 등)에 대한 생산시기, 지역별 식중독 세균 및 지표미생물 모니터링 및 기후관련 정보 수집</li> <li>□ 신선채소류 및 김치 주재료(배추, 무, 열무 등) 생산환경에서 토양, 농업용수에 대한 노로바이러스 모니터링 및 기후관련 정보 수집</li> <li>□ 신선채소류 및 김치생산업체 공정 라인별 노로바이러스 모니터링 및 제어연구</li> <li>□ 신선채소류 및 김치생산업체 공정 라인별 위해미생물 및 지표미생물 모니터링 및 제어연구</li> </ul>
추진체계	<ul style="list-style-type: none"> <li>□ 컨소시엄 구성(안) 등 제시 <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 농산물품질관리원 협조</li> <li>○ 샐러드 생산업체 또는 김치생산업체 포함</li> </ul> </li> </ul>

## 나. GAP 등 신선 농산물에서의 유해미생물 안전관리 방안연구 필요

### (1) 연구배경

#### (가) 국외 GAP 안전관리기준

- FAO는 신선 농산물이 '농장에서 식탁까지(Farm to Table)'공급되는 일련의 과정에서 오염 발생을 사전에 차단할 수 있는 GAP 권장지침을 확립하여 제시하고 있음
- Codex는 「신선 과일 및 채소류의 생산과 취급에 관한 위생관리 실행규범」을 비준하여 제시함과 동시에 위생규범인 GHP(Good Hygiene Practices), 그리고 산지가공 등의 과정에서 실행해야 하는 제조규범인 GMP(Good Manufacturing Practices)도 같이 제시하고 있음
- 미국에서는 식품의약국(FDA)와 미농무부(USDA)이 1998년 공동으로 GAP 개념에 근거한 「신선 과일류 및 채소류에 대한 미생물학적 위해요소 최소화 지침」을 마련하여 권장하고 있음
- 유럽에서는 EUREP(Euro Retailer Produce Working Group)을 결성하여 GAP 기준을 설정 및 구축하여 신선 농산물을 재배부터 소비까지 관리하고 있음

#### (나) GAP 신선 농산물 재배단계별 주요 위해요소 분석

- GAP 신선 농산물 재배단계별 위해요소는 크게 화학적 위해요소, 생물학적 위해요소, 물리적 위해요소로 구분할 수 있으며, 그 중 생물학적 위해요소인 유해미생물은 신선 농산물 재배단계에서부터 유입되므로 가장 중요한 위해요소라 할 수 있음
- 현재 식품에서는 수확 후 단계 위해요소 관리를 위하여 HACCP(위해요소중점관리기준)을

도입하여 모든 위해요소가 철저히 차단된 시설에서 식품이 생산되도록 하고 있으며, 미국, 일본, EU, 국제기구(Codex, WHO, FAO) 등에서도 모든 식품에 HACCP을 적용할 것을 적극 권장하고 있음

□ 농장과 공장에서의 위해요소 제어 시스템으로는 GAP, GMP, HACCP, ISO9000s가 있음

## (2) 추후 연구 방향

### (가) GAP 및 신선농산물에 대한 미생물학적 위해평가 연구 필요

□ 위해평가란, 식품에서 유해미생물에 의한 건강위해를 줄이고 소비자 보호우선, 식품유통 위험에 대한 대응, 과학적 분석에 기초한 대응, 이해관계자간의 정보교환과 의사소통, 의사결정과정의 투명성 등을 통하여 식품에서 유래되는 위해(hazard)요인에 노출되어 실제 인체에 부정적 효과를 미칠 수 있는 확률을 과학적 지식을 활용·측정하여 다양한 대응 방법을 모색하는 것임

□ 1999년 Codex 식품위생소위원회에서 식품에서의 미생물학적 위해평가에 관한 가이드라인이 발표되었고, 정량적인 위해평가가 FAO/WHO의 전문가소위원회에 의해 이루어졌다. 일반식품에서의 유해미생물에 대한 노출평가는 식약처가 주관하여 관리하고 있으나, 신선농산물에서는 유해미생물에 대한 위해평가가 전혀 이루어지지 않고 있음

□ 따라서, 향후 국민의 안전한 먹거리 확보와 건강을 위해서 신선 농산물 중 유해미생물의 노출평가가 정확하게 수행되어야 할 것이며, 이를 위해서 신선 농산물에서 발생하는 유해미생물의 모니터링자료와 국민들의 주요 신선 농산물 일일섭취량 등의 연구를 통한 신선농산물에서의 미생물학적 위해평가가 필요한 실정임

### (나) GAP 신선 농산물의 유해미생물 사전예방 안전관리 방안 연구 필요

#### 1) 생산단계에서 유해미생물 허용기준 설정연구 필요

□ 미국에서는 2010년 토마토, 상치, 브로콜리, 당근, 양배추, 파인애플, 포도, 멜론 등 가공처리하지 않고 날로 먹는 신선 농산물을 대상으로 유해미생물의 위해를 방지하기 위하여 FDA, USDA에서 마련한 유해미생물 관리 기준을 도입하여 시행중에 있으나, 우리나라 GAP 제도에는 현재 날로 먹는 신선 농산물에 대한 유해미생물 관리 기준은 전무한 실정임

□ 현재 우리나라는 수확 후 신선 농산물에 대한 유해미생물 관리기준은 마련되지 않았으나, 신선 농산물을 수확 후 가공 처리한 “신선편이 식품”에 대해서는 HACCP 기준에 준하여 식품의약품안전처가 제정한 식품위생법 “신선편이 식품” 유해 미생물 8종에 대한 포괄적 의미의 정량적 관리 기준만이 설정되어 있는 실정이므로, 향후 지속적인 모니터링을 통하여 GAP 제도에서의 신선 농산물에 대한 유해미생물 허용기준 설정에 대한 연구가 필요함

#### 2) 재배단계별 GAP 신선 농산물 유해미생물 안전관리 방안연구 필요

□ 특히, 국제 기준규격인 Codex 실행규범(Codex Recommended International Code of Practice - General Principles of Food Hygiene - CAC/RCP, Rev 3, 1997)과 GAP 및 GMP 개념에 기초하여 국내 GAP 신선 농산물을 생산부터 수확 후 선별, 포장까지 전 생산과정에 관련하는 미생물학적 위해요소를 관리할 수 있는 연구가 필요함

## 다. 신선 농산물에서의 GAP-HACCP 일원화 관리시스템 구축방안 연구 필요

### (1) 연구배경

#### (가) 국내 식품안전관리시스템 현황

##### 1) 국내 식품안전관리시스템의 현황

□ 보건복지가족부(식품의약품안전청), 교육과학기술부, 국방부, 기획재정부, 환경부 등 총 6개 부처에서 품목별, 관리단계별로 관리하는 다원적 분산관리 체계가 특징임

##### 2) 국내 식품안전관리시스템의 문제점

□ 우리나라의 품목별, 관리단계별 다원적 분산관리 체계는 품목별 관리에 따른 전문성이 있을 수는 있지만, 전반적인 식품안전관리 역량이 약한 실정임

□ 현재 식품안전업무는 품목별·단계별로 농림수산물식품부와 식품의약품안전처가 분산 수행하고 있음

□ 신이 가중되고 있는 실정임

□ 특히, 중복된 행정체계로 식품행정비용 및 인력 관리가 비효율적인 실정임

#### (나) 선진국의 식품안전관리시스템의 사례와 특징

##### 1) 국제기구의 권고사항

□ 농장에서 식탁까지(Farm to Table) 일원화 관리시스템

□ 위해분석(Risk analysis)을 통한 과학적 식품안전관리시스템

□ 투명하고 효율적인 시스템

##### 2) 주요 선진국의 식품안전관리체계

□ 단일기관 식품안전관리 시스템 : 독일, 덴마크, 네덜란드, 뉴질랜드, 스웨덴 등

□ 일원화 식품안전관리 시스템 : 캐나다, 영국, 프랑스, 일본 등

□ 다원화 식품안전관리 시스템 : 미국, 한국

#### (다) 선진국의 신선 농산물 일원화 시스템의 시사점

□ 선진국의 식품안전관리체계는 미국을 제외하고 대부분 「단일기관 시스템」 또는 「일원화 관리 시스템」이 대세를 이루고 있으며, 많은 선진국들에서 여러 부처로 분산된 식품안전행정기능을 농업식품부처로 일원화한 통합형 관리시스템으로 식품안전관리시스템을 개편하는 추세임

□ 선진국들은 공통적으로 신선 농산물에 대한 식품행정전담기관을 설치하고 있으며 미국 등 일부 예외적인 경우를 제외하고는 신선 농산물과 의약품을 동시에 다루는 행정기관을 가지고 있는 선진국은 없음

### (2) 추후 연구 방향

#### (가) 국내 신선 농산물의 GAP-HACCP 일원화 시스템 체계화 방안 연구 필요

□ 국내 신선 농산물 GAP-HACCP 일원화 시스템은 유럽연합(EU)을 비롯한 독일, 스웨덴, 캐나다 등 선진국들의 “농장에서 식탁까지(Farm to Table)” 원칙에 따라 “신선 농산물 농업식품부처” 중심으로 일원화하여 운영하고 있는 단일기관 시스템 모델로 개편되는 것이 가장 이상적 신선 농산물 식품안전관리시스템이지만, 현재 우리나라의 현실상 단기간

내에 일원화 하는 것은 어려울 것으로 예상되고, 통합비용 또한 상당히 클 것으로 판단됨  
□ 따라서, 향후, 우리나라의 GAP-HACCP 일원화 식품안전관리시스템 체계를 개선하기 위해 고려해야 할 사항은 다음과 같음

- i) 농장에서부터 시작되는 체계적 신선 농산물 안전관리
- ii) 검역·방역과 식품안전의 통합적 접근
- iii) 국제적 흐름에 맞는 식품행정 일원화
- iv) 식품안전관리 일원화 시스템 비용의 최소화
- v) 위해분석을 기반으로 한 식품안전 관리 및 평가
- vi) 식품 산업의 진흥 및 경쟁력 강화

## 라. 예방적 통제 요소의 준수 유도를 위한 생산주체 책임 강화 방안 연구 필요

### (1) 연구배경

(가) 신선 농산물 사전예방원칙

□ 신선 농산물로부터 유해미생물을 제거하거나 확연한 감소를 위한 기본 방법은 GAP, GMP, 위해요소중점관리기준(HACCP) 프로그램을 엄격하게 실천 및 의무화해야 할 것임

### (2) 추후 연구 방향

(가) 신선 농산물 생산자 주체 유해미생물 저감화 방안 연구 필요

1) 유해미생물 감소 또는 제거를 위한 저감 전략 연구

□ 신선 농산물 생산농장에서 생산자들이 주체적으로 유해미생물 안전관리방안을 실천하고, 우수농산물관리시설에서는 GMP, GHP, HACCP 기준 설비로서 신선 농산물을 관리해야 함

2) 화학적 저감화 방법 연구

□ 대표적인 화학적 저감화 방법에는 염소계 소독제, Chlorine dioxide(ClO<sub>2</sub>), 유기산(Lactic acid, Citric acid, Acetic acid, Tartaric acid 등), 오존(Ozone), 전해수 등이 있으며, 이러한 화학적 저감화 방안들을 GAP 및 신선농산물 재배 뿐만 아니라 GMP 시설에까지 적용할 수 있는 구체적인 연구가 필요함

3) 물리적 저감화 방법

□ 대표적인 물리적 저감화 방법에는 기체조절포장법(MAP), 방사선 조사, 초고압처리(HPP), 초음파(Ultrasound), 허들 기술(Hurdle Technology) 등이 있으며, 이러한 물리적 저감화 방안들을 GAP 및 신선농산물 재배뿐만 아니라 GMP 시설에까지 적용할 수 있는 구체적인 연구가 필요함

(나) 소규모 농어가 및 영세 가공업체 효율적 지원체계 구축 방안 연구 필요

□ 신선 농산물 생산 소규모 농어가 및 영세 가공업체들의 효율적 지원체계 구축 방안으로는 GAP 도입 농가 지원 확대, GAP 기준·절차 개선, GAP 생산자조직 육성, GAP 시설 확충, GAP 농산물 판로 확대, GAP인증 농산물 이용 가공식품 및 재포장 표시기준 도입, GAP 인증제 명칭 변경, GAP 생산자 교육 실질화, 소비 홍보·교육 강화 등이 있음



## 제 4 장. 연구 결과의 활용 계획

- GAP 농산물의 미생물학적 안전성 관리를 위한 현장 위생 가이드라인 개발에 활용
- 식품안전성 분야에서는 좀 더 신속하고 정확한 식품안전성 및 독성의 진단 및 평가방법을 제공할 것임
- 산업경제 발전 측면에서는 원료식품의 부가가치 향상과 농림수산업 전반의 활성화, 식품산업의 부가가치 및 생산성 증대, 국제기준의 안전성 확보에 따른 식품산업의 국제경쟁력 확보 및 수출 증대, 위해인자 진단 시약의 개발 및 수출, 식품 위해인자에 의한 질병의 치료 및 예방 기술로 활용할 계획임
- 바이러스 신속검출키트
  - 활용분야 및 활용방안
    - 본 연구를 통하여 개발한 식중독 바이러스 신속검출용 PCR 키트는 바이러스의 유전자를 검출하는 것으로 농산물에 존재하는 바이러스 검출에 이용할 수 있을 뿐만 아니라 감염성 질환 환자의 시료에 존재하는 바이러스 검출에 이용할 수 있음
    - 따라서, 각 바이러스 진단(확진)검사 키트로도 사업화할 수 있을 것으로 기대됨
    - 이를 위하여 진단용 의료기기 인허가를 위한 각종 기술문서 및 임상시험 등의 추가 자료 확보 및 추가 시험이 요구될 것으로 판단되며 향후 진행할 계획임
    - 한편, 바이러스 전처리법 개선 연구를 통해 개발한 A형 간염바이러스 항체를 이용하여 면역 스트립 형식의 A형 간염바이러스 바이러스 항원 검출 키트를 개발하였음
    - A형 간염 항원 검출 키트는 농산물에 존재하는 극미량의 바이러스를 검출할 수 있을 것으로 기대되지는 않으나 A형 간염 환자의 분변과 같이 바이러스 양이 많은 경우 검출 가능할 것으로 예상되어 A형 간염바이러스 항원 검출 키트 사업화를 계획하고 있음
  - 제품의 신뢰성 인증 및 제품 보완
    - 본 연구를 통하여 식중독 5종 바이러스의 신속검출 키트를 개발하였으며 바이러스 및 바이러스 유전자를 이용하여 개발한 키트의 성능을 자체적으로 평가하였음. 그 결과 만족할만한 결과를 얻었으나 보다 다양한 샘플을 이용한 테스트를 통하여 제품의 신뢰성을 확보할 필요가 있다고 판단됨
    - 바이러스 검출 kit의 민감도 및 특이도 분석을 위하여 바이러스별 2~3종, 총 16종의 시료를 이용하여 분석하였음
    - 통계적 유의성을 확보할 만큼의 시료를 분석해야할 필요가 있다고 판단되며 향후 지속적인 연구를 이어갈 계획임
    - 주관연구기관인 중앙대학교와 지속적인 산학협력을 통해 그리고 각종 바이러스 은행 및 유전자원 분양처(한국수의유전자원은행, 병원성바이러스은행, 물환경바이러스소재은행, 질병관리본부, ATCC 등)를 통해 바이러스 및 바이러스 유전자원을 분양받아 제품의 성능을 테스트할 예정임
    - 따라서, 지속적인 연구를 통하여 제품의 성능을 개선 및 보완하는 노력을 지속해 나갈

것임

- 또한, 제품 신뢰성 인증을 정확성, 반복성, 정밀성을 측정 할 것임. 정확성, 반복성 정밀성에 대한 정의는 다음과 같음
  - 정확성: 측정값이나 근삿값이 참값에 얼마나 가까운가를 나타내는 값
  - 반복성: 동일한 방법으로 동일한 측정대상을 같은 조건에서 반복 측정한 결과
  - 정밀성: 서로 다른 시험자가 같은 시료로 동일한 방법으로 실험을 실시하여 같은 결과가 나오는지 확인
- 제품 lot 별, lot 간 정확성, 반복성, 정밀성 측정을 통하여 밸리데이션 자료를 확보할 예정임
- 판로확보
  - 홈페이지, 카달로그 제작, 뉴스레터 등을 이용한 제품 홍보 및 마케팅을 진행할 예정임.
  - 개발제품의 국내 뿐만 아니라 해외 판매를 위하여 지속적으로 해외 의료기기 전시회인 MEDICA와 AACC등에 참여하여 제품을 홍보하고 카달로그 등을 통해 해외 바이어에게 소개하는 등 마케팅을 진행할 예정임
  - 상기 활용방안에 제시한 바대로 바이러스 검출 키트는 농산물, 식품으로부터 검사가 가능할 뿐만 아니라 감염성 질환 환자의 시료에 존재하는 바이러스 검출용으로도 활용할 수 있으므로 체외진단용 kit으로 사업화가 가능할 것으로 판단됨
  - 이를 위하여는 GMP(Good Manufacturing Practice) 시설 및 ISO13485 인증이 요구되며 식품의약품안전처로부터 인허가를 받아야 하므로 인허가를 위한 각종 기술문서작성 및 임상 등 추가 시험을 진행할 예정임
  - 또한, 5종 바이러스는 농산물, 식품으로부터 검사가 가능할 뿐만 아니라 용수로부터 검사가 가능하므로 수질검사에 사용될 수 있음. 따라서, 수자원공사와 각 지역의 보건환경 연구소에도 판매가 가능할 것으로 판단되어 향후 사업화를 위한 마케팅을 추진할 계획임

## 참고문헌

- Ayçiçek, H., Aydoğan, H., Küçükbaraaslan, A., Baysallar, M., & Basustaoglu, A. C. (2004) Assessment of the bacterial contamination on hands of hospital food handlers. *Food Control*, 15, 253 - 259.
- Beer. Bestimmung der Absorption des rothen Lichts in farbigen Flüssigkeiten (Determination of the absorption of red light in colored liquids). *Annalen der Physik und Chemie*, 1852, 86: 78 - 88.
- Busschaert, P., Geeraerd, A.H., Uyttendaele, M., Van Impe, J.F., (2010) Estimating distributions out of qualitative and (semi) quantitative microbiological contamination data for use in risk assessment. *Int. J. Food Microbiol.* 138, 260-269.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). (2015) Foodborne Disease Active Surveillance Network, FoodNet Surveillance Report, 2015.
- Codex. (1997) Principles for the establishment and application of microbiological criteria for foods (CAC/GL 21, 1997)
- Codex. (1999), Principle and guidelines for the conduct of microbiological risk assessment (CAC/GL-30, 1999)
- Corradini, M. G., & Peleg, M. (2005) Estimating non isothermal bacterial growth in foods from isothermal experimental data. *Journal of applied microbiology*, 99(1), 187-200.
- Cohen, N., Karib, H., Saied, J. A., Lemee, L., Guenole, A., & Quilici, M. L. (2007) Occurrence of potentially pathogens *Vibrio* from sea products marketed in Casablanca (Morocco). *Rev. Med. Vet.*, 158, 562 - 568.
- Codex Alimentarius Volume 1B:CAC/GL-30 (1999) Principles and Guidelines for the Conduct of Microbiological Risk Assessment.
- Corradini, M. G., & Peleg, M. (2005) Consistency of dispersed food systems and its evaluation by squeezing flow viscometry. *Journal of Texture Studies*. 36, 605-629.

- David W. Miles, Thomas Ross, June Olley, & Thomas A. McMeekin. (1997) Development and evaluation of a predictive model for the effect of temperature and water activity on the growth rate of *Vibrio parahaemolyticus*. *International Journal of Food Microbiology*, 38, 133-142.
- FDA (2015). Guidance for industry, Guide to minimize microbial food safety hazard for fresh fruits and vegetables.
- Fujikawa, H., & Morozumi, S., (2006) Modeling *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production in milk. *Food Microbiol.*, 23(3), 260-267.
- G. FRENS. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nature Physical Science* 1973, 241(105):20-22.
- Haas, C. N., Rose, J. B., & Gerba, C. P. (1999). Quantitative microbial risk assessment. John Wiley & Sons.
- Halpin-Dohnalek, M. I., and Marth, E.H. (1989) Growth of *Staphylococcus aureus* in milks and cream with various amount of milk fat. *J. Food Protect.*, 52(8), 540-543.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods) (1996) *Microorganisms in Foods 5. Microbiological Specifications of Food Pathogens*. Blackie Academic & Professional. New York, NY.
- ICMSF. (1998) Potential application of risk assessment techniques to microbiological issues related to international trade in food and food products. *J. Food Prot.*, 61, 1075-1086.
- Jarbis, B. (2008) *Statistical Aspects of the microbiological examination of foods*, 2nd edition, Academic Press.
- Jin, Y. G., Kim, T. W., Ding, T., & Oh, D. H. (2009). Effect of electrolyzed water and citric acid on quality enhancement and microbial inhibition in head lettuce. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 41(5), 578-586.
- Johnson, K. M., Nelson, C.L., & Busta, F.F. (1983) Influence of temperature on germination and growth of spores of emetic and diarrheal strains of *Bacillus cereus* in a growth medium and in rice. *J. Food Sci.*, 48, 286.
- Kim, H. J., Lee, D. S., & Paik, H. D. (2004) Characterization of *Bacillus cereus* isolates

- from raw soybean sprouts. *J. Food. Prot.*, 67, 1031 - 1035.
- Kim, H. M., Woo, S. W., Kim, A. N., Heo, H. J., Chun, J. Y., & Choi, S. G. (2015). Effect of Supercritical Carbon Dioxide on Physicochemical Properties and Microbial Reduction of Freeze-Dried Bovine Liver. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 44(12), 1847-1855.
- Kim, J. E., Kim, I. H., & Min, S. C. (2013). Microbial decontamination of vegetables and spices using cold plasma treatments. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 45(6), 735-741.
- Kim, J. S., Chung, D. H., & Shim, W. B. (2016). Investigation of Microbial Contamination Levels between GAP and non-GAP Certified Farms of Lettuce and Cucumber. *Journal of Food Hygiene and Safety*.
- Kim, S. A., Lee, J. E., Kim, G. U., Kim, S. H., & Shim, W. B. (2017). Microbial Monitoring and Exploring Ways to Prevent or Minimize Microbial Contamination at the Production and Distribution Stages of Fresh Strawberries. *Journal of Food Hygiene and Safety*.
- Koutsoumanis, K. (2001) Predictive modeling of the shelf-life of fish under nonisothermal condition. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(4), 1821-1829.
- Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, 227: 680-685.
- Lindley, D. V. (2011). Introduction to Probability and Statistics from a Bayesian Viewpoint, Part 2, Inference. CUP Archive.
- Mckellar, R.C. & Delaquis, P. (2011) Development of a dynamic growth-death model for *Escherichia coli* O157:H7 in minimally processed leafy green vegetables. *International Journal of food microbiology*, 151, 7-14.
- Mckellar, R. C., & Lu, X. (2003) Modeling microbial responses in Foods. (Eds.) Boca Raton, FL: CRC Press.
- Notermans, S. & Teunis, P., (1996) Quantitative risk analysis and the production of microbiologically safe food: an introduction. *Int. J. Food Microbiol.*, 30, 3-7.
- NZFSA (New Zealand Food Safety Authority). (2001) Microbial Pathogen Data Sheets.

Prepared for the Ministry of Health (New Zealand) by ESR Ltd.  
<http://www.nzfsa.govt.nz/science/data-sheets/index.htm>.

- Pérez-Rodríguez, F. et al., (2008) Understanding and modelling bacterial transfer to foods: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 19(3), 131–144.
- Quick, J., Ashton, P., Calus, S., Chatt, C., Gossain, S., Hawker, J., ... & De Pinna, E. (2015) Rapid draft sequencing and real-time nanopore sequencing in a hospital outbreak of *Salmonella*. *Genome biology*, 16(1), 114.
- Roy, R. J., Busta, F.F., & Thompson, D. R. (1981) Thermal inactivation of *Clostridium perfringens* after growth at several constant and linearly rising temperatures. *J. Food Sci.*, 46(5), 1586–1591.
- Sambrook & Russell (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.)
- Schneusner, D. L., Hood, L. L., & Harmon, L. G. (1973) Effect of temperature and pH on growth and enterotoxin production by *Staphylococcus aureus*. *J. Milk Food Technol.*, 36, 249–252.
- Shim, W. B., Lee, C. W., Jeong, M. J., Kim, J. S., Ryu, J. G., & Chung, D. H. (2014). An investigation of the hazards associated with cucumber and hot pepper cultivation areas to establish a good agricultural practices (GAP) model. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 46(1), 108–114.
- Shorten, P. R. et al., (2006) Estimation of microbial growth using population measurements subject to detection limit. *Int. J. Food Microbiol.*, 108, 369–375.
- Shorten, P. R., Pleasants, A. B., Soboleva, T.K., (2006) Estimation of microbial growth using population measurements subject to a detection limit. *Int. J. Food Microbiol.* 108, 369–375.
- Smets, P. (1993) Belief functions: the disjunctive rule of combination and the generalized Bayesian theorem. *International Journal of approximate reasoning*, 9(1), 1–35.
- Snyder Jr, O. P. (1995) HACCP-TQM for retail and food service operations. In *HACCP in Meat, Poultry, and Fish Processing* (pp. 230–299). Springer US.
- Tatini, S. R. (1973) Influence of food environments of growth of *Staphylococcus aureus* and production of various enterotoxins. *J. Milk Food Technol.*, 36, 474.

- Tony, J., Fang, Que-King Wei, Chia-Wei Liao, Min-Ju Hung, & Tzu-Hui Wang (2003) Microbiological quality of 18°C ready-to-eat food products sold in Taiwan. J. Food Microbiol., 80, 241 - 250.
- US Food and Drug Administration. (2004) Approximate pH of foods and food products.
- USDA (United States Department of Agriculture). (2017) Pathogen Modelling Program-Models.
- Van Asselt, E. D., & Zwietering, M. H. (2006) A systematic approach to determine global thermal inactivation parameters for various food pathogens. Int. J. Food Microbiol, 107(1), 73-82.
- Willardsen, R. R., Busta, F. F. Allen, C. E., & Smith, L. B. 1977. Growth and survival of *Clostridium perfringens* during constantly rising temperatures. J. Food Sci., 43, 470.
- Wong, H. C., Chen, Y. L., & Chen, C. L. F. (1988) Growth, germination and toxigenic activity of *Bacillus cereus* in milk products. J. Food Protect., 51(9), 707.
- Yoon, J. H., & Ko, S. B. (2008). A Study on the supplementary measures for food safety certification system of GAP. In Proceedings of the KAIS Fall Conference. The Korea Academia-Industrial cooperation Society.
- 권우현, 이원경, 송정언, 김경열, 심원보, 윤요한, 김윤식, 정덕화 (2012). 깻잎의 농산물우수 관리제도(GAP) 적용을 위한 수확단계에서 미생물학적 위해요소 분석. 한국식품위생안전성학회지, 27(3) 295-300.
- 이채운, 성동은, 오상석 (2012). 국내 신선 농산물 생물학적 위해요소 우선순위 설정. 한국식품위생안전성학회지, 27(4) 356-365.
- 정덕화. (2015). 농산물 안전성과 위해요소관리 중심의 GAP 제도. 한국농약과학회 학술발표대회 논문집, 14-18.

## <뒷면지>

### 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 첨단생산기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 첨단생산기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.