

## Confocal Scanning Laser Microscopy 를 이용한 계란에서의 *Salmonella enteritidis* 오염 연구

장금일 · 박종현\* · 김광엽

충북대학교 식품공학과, \*경원대학교 식품생물공학과

### Studies on *Salmonella enteritidis* Contamination in Chicken Egg using Confocal Scanning Laser Microscopy

Keum-Il Jang, Jong-Hyun Park\* and Kwang-Yup Kim

Department of Food Science and Technology, Chungbuk National University

\*Department of Food and Bioengineering, Kyungwon University

#### Abstract

The structural function of three egg membrane layers and cuticle layer, and the effectiveness of 5 film coatings (chitosan, starch, gelatin, dextrin, mineral oil) on the prevention of *Salmonella enteritidis* penetration was investigated using confocal scanning laser microscopy (CSLM). Diameters of outer membrane fibers, inner membrane fibers and limiting membrane particles in eggshell were 1.5~7.2, 0.8~2.0 and 0.1~1.4  $\mu\text{m}$ , respectively and average thicknesses were 10.0, 3.5, 3.6  $\mu\text{m}$ , respectively. Average thickness of cuticle layer was 6.0  $\mu\text{m}$  and cuticle layer covered 40~80% of total eggshell surface. Average coating films thickness for chitosan, starch, gelatin, dextrin and mineral oil were 2.2, 2.5, 3.9, 3.6 and 5.0  $\mu\text{m}$ , respectively. After immersion process eggshell surface was almost completely covered by coating films. Chitosan coating was most effective among 5 film coatings in inhibiting growth of *Salmonella enteritidis*. Penetration process of *Salmonella enteritidis* through eggshell was investigated by multicolor imaging using CSLM and plate counting. Cuticle layer was the most important structure in blocking the penetration. Among 5 film coatings, chitosan showed the best and similar effectiveness with cuticle layer.

Key words: Confocal Microscopy, *Salmonella enteritidis*, egg, cuticle layer, egg membrane, film-coating

## 서 론

*Salmonella* 균에 의한 가공류 식품의 오염은 전세계적으로 가장 많이 발생하는 식중독의 원인이며<sup>(1-3)</sup>, 우리나라에서도 육류섭취 증가에 의하여 그 심각성이 가중되고 있다. 세균의 오염에 의한 식중독은 위생환경이 매우 잘 갖추어진 선진국에서도 근절되지 못하고 있는 문제로, 미국의 경우 전체 세균성 식중독사고의 60% 가량을 *Salmonellosis*가 차지하고 있으며<sup>(2)</sup>, 우리나라의 경우도 경제발전과 더불어 외식의 증가와 대규모 급식 등으로 식중독사고의 규모가 커졌다. 특히, *Salmonella enteritidis*에 의한 식중독사고의 주요 오염원은 계란으로 밝혀져있고, *Salmonella typhimurium*,

*Salmonella heidelberg* 등도 계란에 있어서 문제가 되고 있다<sup>(3-6)</sup>. 계란은 최외부에 존재하는 얇은 cuticle 층, 난각, 3중의 난막(outer-membrane, inner-membrane, limiting-membrane), 난백, 난황으로 구성되어 있고, 미국 식품의약국(FDA)에서는 계란을 보관중 냉장과 특별한 주의를 요하는 식품으로 규정하고 있으며<sup>(7)</sup>, 계란의 *Salmonella* 균 오염은 산란시 난각에 부착된 뒤 내부로 이동하는 수평적 이동이 주된 오염 경로로 밝혀져있다<sup>(3,8,9)</sup>.

공초점 레이저 현미경(CSLM, confocal scanning laser microscopy) 기술은 광학현미경이나 형광현미경보다 명확한 입체적인 조직영상을 얻을 수 있고<sup>(10)</sup>, 레이저 광투과에 의한 표본내부의 '스캔' 기능, 다양한 면역학적 형광염료를 사용하여 얻어지는 다색영상화(multi-color imaging), 비파괴적 전처리에 의한 생세포의 관찰, 컴퓨터그래픽을 이용한 3차원 영상 구성 등

Corresponding author: Kwang-Yup Kim, Department of Food Science and Technology, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea

의 장점이 많은 신기술이다<sup>(11-15)</sup>. 이 기술을 이용하여 닭의 표피 모공에 포집된 *Salmonella* 균의 공간적인 영상이 3차원적으로 관찰되었으며<sup>(11)</sup>, 전자현미경에서는 얻지 못했던 계란 난막의 limiting membrane 입체 영상도 보고되었다<sup>(15)</sup>.

최근 계란의 세척 기술이 도입되어 국내에서도 그 이용이 점차 증가하는 실정이다. 그러나 이는 세척과정 중 계란의 최외부 방어기능인 cuticle 층을 파괴하여 비 세척란보다 저장성이 떨어진다는 단점이 있다<sup>(16)</sup>. 한편 기능이 좋은 여러 종류의 필름을 이용하여 다양한 식품에 피복함으로써 그 저장성이 향상된다는 결과가 보고 된 바 있다<sup>(17,18)</sup>. 또한 chitosan 피복으로 딸기의 저장성이 향상되었다고 하며<sup>(19)</sup>, mineral oil, starch, gelatin, dextrin, chitosan의 피복으로 계란에서 균에 의한 오염 방지 및 저장성이 향상된다고 보고 된 바 있다<sup>(16,20)</sup>.

본 연구에서는 CSLM을 이용하여 계란의 *Salmonella enteritidis* 오염 기작을 관찰하였고 필름 피복에 의한 계란의 *Salmonella enteritidis* 오염 방지 효과를 조사 하였다.

## 재료 및 방법

### 사용균주와 계란

계란은 충남 조치원에 있는 금강농장에서 구입한 하이라인종 25~30주령 닭의 대란을 사용하였고, GFP (Green Fluorescent Protein) 유전자가 삽입된 *Salmonella enteritidis*<sup>(21)</sup>를 LB배지(Difco, Detroit, Michigan, USA)에서 Ampicillin (100 µg/mL, Sigma)를 첨가하여 1개월 마다 계대배양하여 사용하였다.

### 계란의 난막과 cuticle층 관찰

계란의 난막은 난각에서 분리한 상태로, 그리고 cuticle 층은 난각에 부착된 상태로 각각 0.03% Fluorescein isothiocyanate (FITC, Sigma)에 1시간 침지한 후 1분간 수세한 뒤 CSLM (MRC-1024, Bio-Rad Inc, Hemel hempstead, England, Kr/Ar Ion laser)을 이용하여 emission filter 522DF32에서 난막은 0.2 µm 간격으로 optical sectioning하여 관찰하였고, cuticle층은 optical sectioning과 vertical sectioning을 병행하여 관찰하였다.

### 필름 피복 및 관찰

계란의 cuticle 층을 제거하기 위하여 5% trisodium phosphate (TSP, pH 12.6, sodium phosphate tribasic 12 hydrate, Kanto chemical Co. Inc, Japan)<sup>(22)</sup>를 사용하여

계란을 43.3°C (110°F)로 3.5분간 침지한 뒤, 2.5분동안 증류수로 수세하고 1분간 건조한 후 1% chitosan solution (Sigma, 1% acetic acid)<sup>(16)</sup>, 10% starch solution (Sigma), 5% gelatin solution (Sigma), 10% dextrin solution (Sigma) 와 mineral oil (Sigma)<sup>(19)</sup>로 각각의 계란을 30 초동안 침지하여 피복한 후 35°C에서 24시간 방치한 뒤 CSLM의 reflection mode를 이용하여 관찰 하였다.

### *Salmonella*균에 대한 피복 필름의 생육억제효과 측정

10<sup>3</sup> CFU/mL의 *Salmonella enteritidis*를 0.1 mL 도말 접종한 평판 배지(SS Agar, Difco) 위에 1% chitosan solution (Sigma, 1% acetic acid)<sup>(16)</sup>, 10% starch solution (Sigma), 5% gelatin solution (Sigma), 10% dextrin solution (Sigma) 와 mineral oil (Sigma)<sup>(19)</sup>을 피복시킨 후 35°C에서 24시간 배양하여 균에 대한 생육 억제 효과를 측정하였다.

### 계란의 cuticle 층과 피복 필름에 대한 *Salmonella*균의 투과오염 측정

TSP와 cetylpyridinium chloride (CPC, 100 ppm, pH 6.5~7.0, Sigma)를 처리하여<sup>(22)</sup> cuticle 층을 제거한 계란과 TSP 처리 후 각각 chitosan, starch, gelatin, dextrin, mineral oil 피복 처리한 계란 그리고 cuticle 층이 존재하는 무처리 계란을 35°C에서 24시간 방치한 뒤 10<sup>8</sup> CFU/mL의 GFP가 삽입된 *Salmonella enteritidis* solution에 침지한 상태로 2°C에서 보관하며 각각 1, 2, 3, 4, 5와 6시간 단위로 꺼내 접종부위의 난막을 1×1 cm<sup>2</sup>로 떼어 균의 투과 여부를 plate count 방법으로 확인(SS agar, Difco) 하고 동일한 방법으로 난막을 취하여 난막은 neutral red(Sigma)로 염색하여 CSLM으로 GFP는 emission filter 522DF32로 neutral red는 emission filter HQ598DF40을 이용하여 다색영상화(multi-color imaging)하였다.

## 결과 및 고찰

### 공초점현미경(CSLM)을 이용한 계란의 난막과 fiber 관찰

CSLM을 이용하여 관찰한 결과 난각에 접해있는 outer membrane은 두께가 8.0~12.3 µm (평균 10 µm) 이고 지름이 1.5~7.2 µm인 fiber가 서로 얹혀져 있었고, inner membrane은 두께가 2.5~4.5 µm (평균 3.5 µm), 지름이 0.8~2.0 µm인 fiber가 매우 조밀하게 구성되어 outer membrane과 부분적으로 교차되어 있었

**Table 1. Confocal Scanning Laser Microscopy measurements of eggshell membranes and fibers**

Structure	Layer thickness ( $\mu\text{m}$ )	Fiber/Particle diameter ( $\mu\text{m}$ )
Outer membrane	8.0~12.3	1.5~7.2
Inner membrane	2.5~4.5	0.8~2.0
Limiting membrane	3.2~3.9	0.1~1.4

**Fig. 1. Confocal Scanning Laser Microscopy images of three layers in eggshell membrane (magnification  $63\times 10$ , scale bar= $50\ \mu\text{m}$ ). (a) outer membrane (b) inner membrane (c) limiting membrane**

으며, limiting membrane은 두께가  $3.2\sim 3.9\ \mu\text{m}$  (평균  $3.55\ \mu\text{m}$ )이고 지름이  $0.1\sim 1.4\ \mu\text{m}$ 인 입자들이 매우 밀집되어 inner membrane과 부분적으로 중첩되어 있었다(Table 1, Fig. 1). 전자현미경을 사용한 Tullett<sup>(23)</sup>와 Powrie<sup>(24)</sup>결과에서는 limiting membrane을 관찰하지 못하였고 Tan 등<sup>(25)</sup>의 결과에서는  $0.09\sim 0.15\ \mu\text{m}$ 로 limiting membrane의 매우 얇은 두께만이 관찰되었으나 CSLM으로 관찰한 Wong Liong<sup>(15)</sup>의 결과와 본 실험에서는 limiting membrane의 두께와 입자의 지름까지 측정되었

다. 이는 탈수과정 같은 전처리 과정을 거치는 전자현미경의 경우 난막의 수분 제거로 limiting membrane 층이 수축되어 관찰이 되지 않은 것으로 생각된다. 본 실험에서 측정된 outer membrane과 inner membrane의 두께는 각각  $50, 23\ \mu\text{m}$ 로 측정된 Tullett<sup>(23)</sup>과  $48, 22\ \mu\text{m}$ 로 측정한 Powrie<sup>(24)</sup> 결과보다 얇았으며, 구성 fiber의 지름은 Tullett<sup>(23)</sup>의  $1.3, 0.9\ \mu\text{m}$ , Powrie<sup>(24)</sup>의  $3, 1.5\ \mu\text{m}$ 와 비교할 때 더 두꺼운 것으로 나타났다. Wong Liong<sup>(15)</sup>의 결과와 비교해 볼 때 구성 fiber의 지름은 비슷하나 두께는  $59, 21\ \mu\text{m}$ 의 outer, inner membrane보다 매우 얇았다. 본 실험을 통하여 국내 계란이 외국의 계란에 비교하여 세균 침투를 방어하는 물리적 기능을 지닌 난막이 얇음을 알 수 있고, 이로 인해 같은 양의 균에 의한 계란의 오염시 좀더 빠르게 침투될 가능성이 높은 것으로 사료된다.

공초점현미경(CSLM)을 이용한 계란의 cuticle 층과 피복 필름의 관찰

CSLM을 이용하여 계란의 cuticle 층을 관찰하여 얻은 영상들을 MRC-1024 System의 내장 소프트웨어를 이용하여 계산한 결과, cuticle층은 전체 계란 난각 표면의  $40\sim 80\%$  (평균  $60\%$ )로 난각을 덮고 있었으며, 두께는 평균  $6.0\ \mu\text{m}$ 이었다(Table 2). cuticle층의 수직단면 영상을 얻기 위하여 vertical sectioning 기능을 사용하여 관찰한 결과 Fig. 2와 같이 난각 표면의 cuticle 층과 cuticle 층이 결손된 부위에서는 평균 지름  $18.9\ \mu\text{m}$ 인 공극이 노출된 채 나타났다. 본 실험에서 관찰된 계란의 최외부 방어막인 cuticle 층의 두께는 Tullett<sup>(23)</sup>의  $10\ \mu\text{m}$ 과 비교해 볼 때 상대적으로 얇아 균에 노출시 국내 계란의 수평적 전이가 더 빠르게 될 것으로 사료된다. 그리고 cuticle 층이 결손된 부위의 공극은 Haigh와 Betts<sup>(26)</sup>의 avian egg에서 평균  $60\sim 65\ \mu\text{m}$ 보다 작았으나 균의 주요 내부 침투 방법인 수분

**Table 2. Confocal Scanning Laser Microscopy measurements of cuticle and coating film thickness**

Classification	Thickness ( $\mu\text{m}$ )
Cuticle <sup>1)</sup>	$5.1\sim 6.9/6.067\pm 0.371^{3)}$
Chitosan <sup>2)</sup>	$1.9\sim 2.4/2.167\pm 0.118^{3)}$
Starch <sup>2)</sup>	$2.2\sim 2.8/2.533\pm 0.146^{3)}$
Dextrin <sup>2)</sup>	$2.0\sim 4.3/3.622\pm 0.430^{3)}$
Gelatin <sup>2)</sup>	$2.0\sim 6.0/3.878\pm 0.797^{3)}$
Mineral oil <sup>2)</sup>	$3.2\sim 6.1/5.022\pm 0.522^{3)}$

<sup>1)</sup>Area ratio of Cuticle:  $40\sim 80\%$ /avg.  $60\%$ .

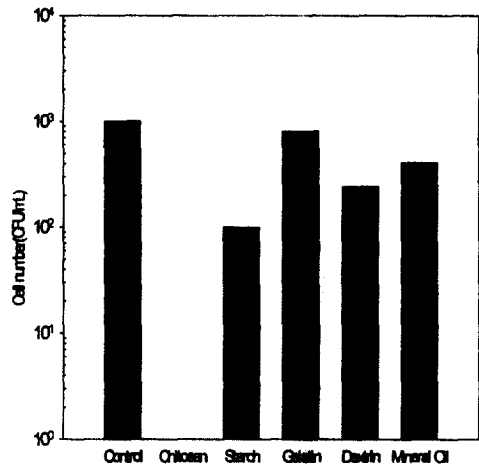
<sup>2)</sup>Area ratio of Films: almost  $100\%$ .

<sup>3)</sup>Values (mean $\pm$ SD) with different superscripts are significantly different ( $P<0.05$ ).

**Fig. 2. Confocal Scanning Laser Microscopy images of vertical sectioning on cuticle layer at different locations (magnification  $63\times 10$ , scale bar= $50\text{ }\mu\text{m}$ ). A: outside of eggshell, B: inside of eggshell, C: pore (arrow)**

흡입은 계란이 냉각될 때의 온도차에 의하여 생성되는 수분이 계란내부의 수축에 의해 흡수되어 일어나며, 이와 공극간에 관계성이 없다는 Sparks와 Board<sup>(27)</sup>의 결과를 감안할 때 공극이 작아도 수분 흡입을 통한 세균침투와는 상관이 없을 것으로 판단된다. Cuticle 층이 계란 표면을 평균 60% 만 덮고 있는데 반하여, 표면을 필름 피복할 경우 cuticle 층이 결손된 부위까지 거의 100% 피복되므로 cuticle 층이 결손된 부위를 통한 균침투를 막기 위해서는 필름 피복이 필요할 것으로 사료된다.

계란을 각각 chitosan, starch, gelatin, dextrin-용액, 그리고 mineral oil에 30초간 침지하여 피복시킨 후 측정된 필름의 두께는 Table 2와 같다. 필름 두께의 측정은 CSLM의 reflection mode에서  $0.1\text{ }\mu\text{m}$  간격으로 optical sectioning하여 측정하였다. 필름 두께는 최초



**Fig. 3. Inhibition of *Salmonella enteritidis* growth by different film coatings. Chitosan coating showed no growth after 24 hr incubation.**

나타나는 해당 영상의 초점으로부터 그 영상 부위가 사라지는 초점까지의 이동거리로서 여러 위치에서 측정하였다.

#### *Salmonella*균에 대한 피복필름의 생육억제효과 측정

*Salmonella enteritidis*에 대한 각각의 필름 피복의 생육억제효과를 배지상에서 관찰한 결과 gelatin, mineral oil, dextrin, starch 필름 피복시 24시간 배양 후 각각  $8.0\times 10^2$ ,  $4.1\times 10^2$ ,  $2.4\times 10^2$ ,  $1.0\times 10^2$  CFU/mL로 성장한 반면, chitosan 피복은 24시간 배양 후 균이 전혀 자라지 않았으므로 chitosan 피복에 의한 *Salmonella enteritidis*의 생육억제가 다른 필름 피복보다 효과적인 것으로 판단된다(Fig. 3). Chang 등<sup>(28)</sup>과 Wang<sup>(29)</sup>의 결과에서도 Chitosan은 본 실험에서와 같이 세균에 대한 항균효과를 나타내었다. Chitosan의 *Salmonella*균 증식 억제에 1% 농도, pH 5.5에서 뚜렷하였다는 Wang<sup>(29)</sup>의 결과와 본 실험 결과 등을 종합할 때, chitosan 피복은 방란시 계란의 외부에 부착되어진 *Salmonella*균에 대하여도 항균효과를 나타낼 것으로 사료된다.

#### 계란의 cuticle 층과 피복 필름에 대한 *Salmonella*균 투과 오염 측정

*Salmonella enteritidis*의 난막 침투 과정을 CSLM을 이용하여 다색 영상화(multi-color imaging)로 관찰한 결과(Fig. 4) *Salmonella*균이 난막에 부착된 상태를 관찰할 수 있었다. 침투된 *Salmonella enteritidis*균은 limiting membrane까지 도달하여 존재하고 난막사이의 공간 속에 떠있는 상태로 볼 때 *Salmonella*균은 난

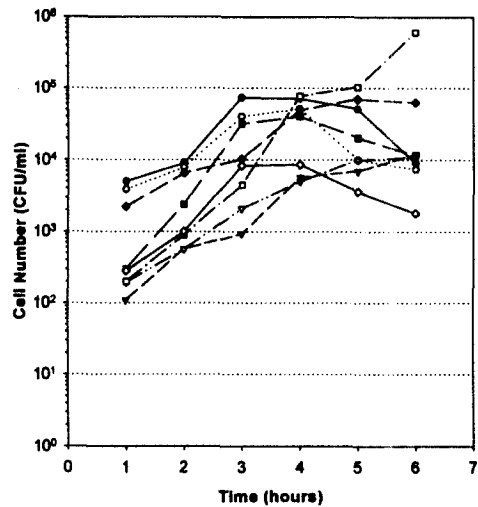


Fig. 5. *Salmonella enteritidis* penetration across eggshell during storage at 2°C after drying overnight at 35°C after various film coatings. ●—●: TSP, ○—○: CPC, ▼—▼: Cuticle, △—△: Chitosan, ■—■: Gelatin, □—□: Starch, ◆—◆: Dextrin, ◇—◇: Mineral Oil

Fig. 4. Confocal Scanning Laser Microscopy images of *Salmonella enteritidis* (arrow) penetration through eggshell membrane after incubation during 2 hr (magnification 63×10, scale bar=10 μm). (a) outer membrane (b) inner membrane (c) limiting membrane

막사이의 공간을 통하여 내부로 전이됨을 알 수 있었다. *Salmonella enteritidis*가 피복 필름, cuticle 층, 난각을 통과한 후 난막을 통한 내부전이 정도를 측정된 결과는 Fig. 5와 같고 여기서 투과하고 있는 균수는 시간에 따라 증가 후 일정 수치로 유지되고 그 후 감소하는 경향이 나타났으며, TSP 처리, CPC 처리, 각각의 필름 피복 처리와 cuticle 층을 비교해 볼 때, TSP와 CPC를 처리한 경우는 균수가 많으면서 매우 빠르게 계란의 내부로 전이됨을 볼 수 있었다. 각각의 필름 피복의 경우 dextrin 피복처리에서는 가장 많은 양의 균수가 초기에 침투되어 시간의 경과에 따라 서서히 증가하는 경향을 보였고, gelatin 처리에서는 cuticle 층이 제거된 경우보다 균수가 초기에는 적었으나, 시간의 경과에 따라 비슷하게 나타났고, mineral oil 처리에서는 gelatin 처리 경우보다 적은 균수를 유지하였으나

cuticle 층 보다는 많은 균수가 내부로 이동하였다. Starch 피복에서는 chitosan 피복 처리와 cuticle 층으로 덮여있는 무처리 계란과 비슷한 경향을 보이나 최종적으로는 가장 많은 균수를 보였다. chitosan 피복 처리는 cuticle 층과 비슷한 효과를 나타내어 피복 필름 중에서 균의 내부이동 방지 효과가 가장 높았다. Lee 등<sup>(16)</sup>은 chitosan 피복 처리가 계란의 저장 중 무처리구에 비해 품질보존 효과가 뚜렷하였다고 보고하였으며, chitosan은 *Salmonella*균 뿐만 아니라 여러 종류의 균에 대하여 자체 항균력에 좋다는 보고가 있다<sup>(28-31)</sup>. 또한 저분자의 chitosan이 고분자의 chitosan보다 항균력이 좋으므로 저분자의 chitosan을 사용할 때 그 효과가 훨씬 높을 것으로 보아<sup>(28,30,31)</sup>, chitosan이 난각 표면에 존재하는 균의 내부전이 억제와 계란의 cuticle 층이 결손된 난각 부위를 피복하는데 적합할 것으로 판단된다.

## 요 약

CSLM 기술을 이용하여 *Salmonella enteritidis*에 의한 계란 오염 과정을 관찰하여 난막의 3중막 구조, cuticle 층 그리고 5가지 필름 피복의 침투 방어효과를 조사하였다. 난막을 구성하는 fiber의 지름은 각각 outer membrane 1.5~7.2 μm, inner membrane 0.8~2.0 μm이었고, limiting membrane을 구성하는 입자의 지

름은 0.1~1.4  $\mu\text{m}$ 이었으며, 두께는 각각 평균 10.0, 3.5, 3.6  $\mu\text{m}$ 이었다. 난각과 접해 있는 outer membrane은 다음 층인 inner membrane과 부분적으로 중첩되어 있고, limiting membrane의 입자들은 매우 밀집되어 inner membrane과 중첩된 상태로 존재하였다. Cuticle 층은 전체 계란 표면적 중 40~80% 를 덮고 있었으며, 두께는 평균 6.0  $\mu\text{m}$ 이었고 피복 필름들의 평균 두께는 각각 mineral oil 5.0  $\mu\text{m}$ , dextrin 3.6  $\mu\text{m}$ , gelatin 3.9  $\mu\text{m}$ , starch 2.5  $\mu\text{m}$ , chitosan 2.2  $\mu\text{m}$ 이었다. 필름 피복에 의한 *Salmonella enteritidis* 생육 억제효과를 관찰한 결과, chitosan이 가장 효과적이었다. 그리고 trisodium phosphate (TSP), cetylpyridinium chloride (CPC) 처리, 5종의 필름 피복 처리와 무처리한 계란표면에 *Salmonella enteritidis*를 접종한 후 내부 전이 과정을 CSLM을 이용하여 다색영상화(multi-color imaging)와 시간당 투과 균수에 대한 plate count로 비교한 결과, 난각이나 3중막 구조의 난각보다는 cuticle 층이 *Salmonella*균의 오염을 차단하는데 결정적인 역할을 하는 것으로 나타났으며, chitosan 피복이 cuticle 층과 비슷한 효과를 보였다. 따라서 피복 필름중에서 chitosan이 최외부 방어막인 cuticle 층이 결손된 난각 부위를 피복하는데 가장 적합할 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 논문은 보건복지부의 보건의료기술연구개발사업 연구비 지원에 의한 연구결과와 일부로서, 이에 감사드립니다.

## 문헌

1. Bean, N.H., Griffin, P.M., Goulding, J.S. and Ivey, C.B.: Foodborne disease outbreaks, 5-year summary, 1983-1987. *J. Food Prot.*, **53**, 711-728 (1990)
2. Bean, N.H., Griffin, P.M.: Foodborne disease outbreaks in United States, 1973-1987: pathogens, vehicles and trends. *J. Food Prot.*, **53**, 804-817 (1990)
3. Food and Drug Administration : Proposed rules-*Salmonella enteritidis* in eggs, *Federal Register*, **63**(96), Tuesday, May 19, 27502-27511(1998)
4. Schoeni, J.L., Glass, K.A., McDermott, J.L. and Wong A.C.L.: Growth and penetration of *Salmonella enteritidis*, *Salmonella heidelberg* and *Salmonella typhimurium* in eggs. *Int. J. Food Microbiol.*, **24**, 385-396 (1995)
5. Tauxe, R.V.: *Salmonella* : a postmodern pathogene, *J. Food Prot.*, **54**, 563-568 (1991)
6. Jones, F.T., Rives, D.V. and Carey J.B.: *Salmonella* contamination in commercial eggs and an egg production facility. *Poult. Sci.*, **74**, 753-757 (1995)
7. Center for Disease Control : *Salmonella* surveillance. Annual summary 1988. CDC, Atlanta, GA, USA (1990)
8. Gast, R.K. and Beard, C.W.: Detection and enumeration of *Salmonella enteritidis* in fresh and stored eggs laid by experimentally infected hens. *J. Food Prot.*, **55**, 152-156 (1992)
9. Himmack, T.S., Sherrod, P.S., Bruce, V.R., June, G.A., Satchell, F.B. and Andrews, W.H.: Growth of *Salmonella enteritidis* in grade A eggs during prolonged storage. *Poult. Sci.*, **72**, 373-377 (1993)
10. Vodovotz, Y., Vittadini, E., Coupland, J., McClements, D. J. and Chinavhoti, P.: Bridging the gap: use of confocal microscopy in food research. *Food Technol.*, **50**(6), 74-82 (1996)
11. Kim, K.Y., Frank, J.F. and Craven, S.E.: Three-dimensional visualization of *Salmonella* attachment to poultry skin using confocal scanning laser microscopy. *Letters in Applied Microbiology*, **22**, 280-282 (1996)
12. Caldwell, D.E., Korber, D.R. and Lawrence, J.R.: Imaging of bacterial cells by fluorescence exclusion using scanning confocal laser microscopy. *J. Microbiol. Meth.*, **15**, 249-261 (1992)
13. Hassan, A.N., Frank, J.F., Farmer, M.A., Schmidt, K.A. and Shalabi, S.I.: Observation of encapsulated lactic acid bacteria using confocal scanning laser microscopy. *J. Dairy Sci.*, **78**, 2624-2628 (1995)
14. Caldwell, D.E., Korber, D.R. and Lawrence, J.R.: Confocal laser microscopy and computer image analysis. In *Advance in Microbiol Ecology*, Marshall, K.C., (ed.), Plenum Press, New York, Vol. 12, p. 1-67 (1992)
15. Wong Liong, J.W., Frank, J.F. and Bailey, S.: Visualization of eggshell membranes and their interaction with *Salmonella enteritidis* using confocal scanning laser microscopy. *J. Food Prot.*, **60**, 1022-1028 (1997)
16. Lee, S.H., No, H.K. and Jeong, Y.H.: Effect of chitosan coating on quality of egg during storage (in Korean). *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **25**(2), 288-293 (1996)
17. John M.K. and Catherine De Mulder-Johnston : Edible films solve problems. *Food Technol.*, **51**(2), 60-74 (1997)
18. Baldwin, E.A., Nisperos, M.O., Hagenmaier, R.D. and Baker, R.A.: Use of lipids in coatings for food products. *Food Technol.*, **51**(6), 56-64 (1997)
19. El Ghouth, A., Arul, J., Ponnampalam, R. and Boulet, M.: Chitosan coating effect on storability and quality of fresh strawberries. *J. Food Sci.*, **56**, 1618-1620 (1991)
20. Farag, R.S., Daw, Z., Shallan, M.A. and Ebtesam A. Mahmoud : Biochemical and microbial studies on the efficiency of some coating materials for egg preservation. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, **45**, 263-273 (1994)
21. Hahn, T.W., Kim, K.Y. and Park, Y.H.: Expression of green fluorescent protein gene in *Salmonella enteritidis* (in Korean). *Korean J. veterinary publichealth*, **21**(4), 415-420 (1997)
22. Kim, J.W. and Slavik, M.F.: Changes in eggshell surface microstructure after washing with cetylpyridinium chloride or trisodium phosphate. *J. Food Prot.*, **59**, 859-863 (1996)
23. Tullett, S.G.: Egg shell formation and quality. In *Egg Quality-Current problems and recent advances*, Well, R. G. and Belyavin, C.G. (ed.), Butterworth & Co. Ltd, p. 123-146 (1987)

24. Powrie, W.D.: Chemistry of eggs and egg products. In *Egg Science & Technology*, 2nd ed., Stadelman, W.J. and Cotterill, O.J. (ed.), The AVI publishing Co., Inc., Westport, p. 65-91 (1977)
25. Tan, C.K., Chen, T.W., Chan, H.L. and Ng, L.S.: A scanning and transmission electron microscopic study of the membranes chicken egg. *Histol. Histopathol.*, **7**, 339-345, (1992)
26. Haigh, T. and Betts, W.B.: Microbial barrier properties of hen egg shells. *Microbios*, **68**, 137-146 (1991)
27. Sparks, N.H.C. and Board, R.G.: Cuticle, shell porosity and water uptake through hen's eggshells. *British Poult. Sci.*, **25**, 267-276 (1984)
28. Chang, D.S., Cho, H.R., Goo, H.Y. and Choe, W.K.: A development of food preservative with the waste of crab processing (in Korean). *Bull. Korean Fish. Sco.*, **22**, 70-78 (1989)
29. Wang, G.H.: Inhibition and inactivation of five species of foodborne pathogens by chitosan. *J. Food Prot.*, **55**, 916-919 (1992)
30. Son, Y.M., Kim, K.O., Jeon, D.O. and Kyung, K.H.: The effect of low molecular weight chitosan with and without other preservative on the characteristics of kimchi during fermentation (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **28**, 888-896 (1996)
31. Kim, K.O., Moon, H.A. and Jeon, D.W.: The effect of low molecular weight chitosans on the characteristics of kimchi during fermentation (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **27**, 420-427 (1995)

---

(1999년 1월 18일 접수)