



Analysis of Foodborne Pathogens in *Brassica campestris* var. *narinosa* microgreen from Harvesting and Processing Steps

Tae Young Oh · Seung-Youb Baek · Jeong Hee Choi · Moon Cheol Jeong ·
Ok Kyung Koo · Seung Min Kim · Hyun Jung Kim*

어린잎채소의 생산 및 가공 공정 중 식중독 미생물 분석

오태영 · 백승엽 · 최정희 · 정문철 · 구옥경 · 김승민 · 김현정*

Received: 26 August 2015 / Accepted: 30 December 2015 / Published Online: 31 March 2016
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2016

Abstract This study was performed to assess the microbiological quality of *Brassica campestris* var. *narinosa* microgreen from harvesting and processing steps. The samples were analyzed for total viable cell counts (TVC), coliforms, Enterobacteriaceae, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Bacillus cereus*, and *Staphylococcus aureus*. The total viable counts of microgreen (whole leaves) and environment samples from harvesting steps were higher than 6.8 log CFU/g and the contamination level of coliforms in the samples were 3.2 log CFU/g and 3.5 log CFU/g of microgreen and soil, respectively. In case of microgreen samples collected from processing steps, the contamination level of TVC and coliforms were higher in raw materials than samples obtained from later stages of processing, i.e. washing, drain, and final products. The contamination levels of *B. cereus* in raw materials and environments decreased approximately 1.4 log CFU/g in final products. *S. aureus* was detected in soil samples but *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus* and

pathogenic *E. coli* was not detected. In order to identify the sources of contamination for microgreen, the genetic similarity of *B. cereus* isolates obtained from harvesting and processing steps were compared using the repetitive-sequence-based polymerase chain reaction method. *B. cereus* isolates obtained from harvesting environments and microgreen were clustered with a similarity greater than 95%. In case of *B. cereus* isolates obtained from microgreen and environmental samples at processing steps showed low genetic similarity.

Keywords farm · foodborne pathogen · microgreen · processing · repetitive-sequence-based polymerase chain reaction

서론

식중독균, 바이러스 등 생물학적 위해인자에 의한 식중독은 전 세계적으로 주요 공중보건 및 식품안전 이슈이다. 과거에는 동물성 식품에 의해 대규모 식중독 사고가 발생한 반면 최근 유럽에서 발생한 대규모 STEC O104 감염사례와 같이 채소류 섭취로 인한 식중독 가능성이 증가하고 있다(EFSA, 2011). 식중독 발생은 생활수준이 높은 유럽이나 미국과 같은 선진국에서도 증가하는 추세이며, 미국의 경우 1970년대 1%에 불과하던 농산물관련 식중독이 1990년부터 2004년 사이에 21%로 발생 빈도가 증가하였고(Sivapalasingam 등, 2004), 2008년 환자수를 기준으로 원인 식품별로 식중독 발생 현황을 분석한 결과, 농산물에 의한 식중독이 가장 많았다고 보고된 바 있다(Painter 등, 2013).

샐러드, 새싹채소 등 신선편의 식품은 조리시간의 절약과 간편성 그리고 가열로 인한 영양소의 파괴가 없다는 장점이 있지

T. Y. Oh · S.-Y. Baek · J. H. Choi · M. C. Jeong · O. K. Koo · S. M. Kim ·
H. J. Kim
Korea Food Research Institute, Sungnam 463-746, Republic of Korea

O. K. Koo · H. J. Kim
Department of Food Biotechnology, University of Science and Technology,
Daejeon 305-350, Republic of Korea

*Corresponding author (H. J. Kim: hjkim@kfri.re.kr)

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

만, 최소한의 비가열적 가공공정만을 거쳤기 때문에 원료 농산물의 생산 및 유통과정 중 세균, 바이러스 등에 노출되기 쉬우며, 식품자체가 식중독 매개체로서의 역할을 할 수 있다(Chang 등, 2004; Cho 등, 2007; Berger 등, 2010). 최소 가공된 신선 채소와 과일 섭취에 대한 소비자의 요구가 증가함에 따라 이들 식품의 안전성에 대해서도 우려가 제기되고 있다. 국내 신선편의 샐러드류의 식중독균 오염도에 대한 연구는 대부분 시판 식품에 대한 모니터링을 중심으로 수행되었으며(Bae 등, 2011; Jo 등, 2011; Kang 등, 2011) 가공공정 중 미생물 오염 추이에 대한 연구, 특히 생산단계부터 오염도를 분석한 결과는 미흡한 실정이다.

본 연구에서는 어린잎 채소 생산과 가공공정에서 원료농산물과 가공단계별 원료 및 환경을 채취하여 미생물학적 품질을 평가하고, 식중독을 유발시킬 수 있는 주요 병원성 미생물을 분석함으로써 생산 및 가공 단계에서의 오염 실태를 파악하고자 하였다. 아울러 어린잎 채소의 생산 및 가공 단계에서 분리된 균주의 유전적 상동성 분석을 통해 오염원을 추정하여 최종 식품의 미생물 안전성을 제고하고 식중독 미생물에 대한 잠재적인 위험성을 평가하는 미생물 위해평가의 기초자료로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

신선편의 식품 시료채취. 어린잎 채소(비타민, *Brassica campestris* var. *narinosa*)의 생산 및 가공 공정 중 미생물학적 품질 및 식중독균 오염을 분석하기 위하여 생산단계의 시료는 2013년 6월부터 7월까지 경기도, 충청남도 및 충청북도 소재 어린잎 채소 생산 농가를 방문하여 원료농산물(종자 및 어린잎 채소)과 환경 시료(토양, 용수, 영양액)를 채취하였다. 어린잎 채소와 토양(지토)의 경우 생산면적의 1/4에 해당하는 위치마다 시료를 채취하였다. 가공단계의 미생물 분석을 위하여 2012년 4월부터 2013년 7월까지 충청남도 소재의 신선편의 식품 가공공장을 총 4회 방문하여 원료, 세척, 행균, 탈수, 완제품 등 총 5단계의 공정에서 어린잎 채소 시료를 채취하였다(Fig. 1). 각 단계에서 멸균 장갑과 멸균 플라스틱 백을 이용하여 시료를 채취한 후 4-10°C의 아이스박스에 보관하여 이동하였으며, 시료 채취 후 6시간 이내에 실험을 진행하였다.

일반세균수 정량분석. 일반세균수는 MFDS(2014)에 따라 시료

25 g에 phosphate-buffered saline (PBS) 225 mL를 가하여 균질기(Stomacher[®] 400Circulator, Seward Laboratory Systems Inc., Port Saint Lucie, FL, USA)를 이용하여 260 rpm에서 2분간 균질화 시킨 후 시험액 1 mL를 취하여 PBS 9 mL에 단계 희석하였다. 각 단계 희석액 1 mL를 평판에 분주하고 Plate Count Agar (PCA, Merck, Darmstadt, Germany)를 약 15 mL씩 부어 고르게 혼합한 후 37°C에서 24-48시간 배양하여 성장한 집락수를 측정하였다.

대장균군 정량 분석. 대장균군(coliforms)은 일반세균수와 동일한 시험액 10, 1, 0.1 mL씩 5개를 튜브관을 넣은 Brilliant-green bile lactose broth (BGLB, Merck)에 접종하고 37°C에서 48시간 배양하여 가스의 발생이 확인되면 Endo agar(Merck)에 희석 배양하였다. 전형적인 집락이 확인되면 Nutrient agar (Merck)에 희석 배양하여 성장한 집락이 그람 음성, 무아포성 간균이 확인되면 대장균군 양성으로 확정하고, 최확수표(most probable number, MPN)에 따라 대장균군수를 산출하였다.

장내세균(Enterobacteriaceae) 분석. 장내세균은 ISO 방법(2004)에 따라 분석하였다. 일반세균수와 동일한 시험액 1 mL를 평판에 분주하고 Crystal-violet neutral-red bile glucose agar (VRBD, Merck)를 약 15 mL씩 부어 고르게 혼합하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 평판에서 성장한 집락 중에서 분홍색, 빨강색, 보라색을 띠는 5개의 집락을 취하여 Tryptic soy agar(TSA, Merck)에 희석 도말하고 37°C에서 24시간 배양하여 VITEK2[®] compact(BioMerieux, Marcy l'Etoile, France)로 동정하였다.

Bacillus cereus 정량 분석. *B. cereus*의 분석은 MFDS(2014)에 따라 실시하였다. 일반세균수 분석과 동일한 시험액 1 mL를 단계 희석한 후, Mannitol-egg-yolk-polymyxine agar (MYEP, Merck)에 각 단계 희석액을 0.2 mL씩 5장에 도말하여 총 접종액이 1 mL이 되게 한 후 30°C에서 24시간 배양하였다. 성장한 집락 주변에 lecithinase를 생성하는 혼탁한 환이 있는 분홍색 집락을 계수하였다. 계수한 평판에서 5개 이상의 전형적인 집락을 선별하여 TSA (Merck)에 희석 도말하여 VITEK2[®] compact로 확인한 후 MFDS에 따라 *B. cereus*를 최종확인하고 정량 결과값에 반영하였다.

병원성 미생물 정성분석. *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus* 및 *E. coli* O157:H7와 같은 병원성 미생물은 MFDS(2014)에 따라 정성 분석하였다. 즉, 시료 25 g에 분석할 각 병원성 미생물별 배양액을 225 mL 가한 후 균질기를 이용하여 1분간 균질화 시킨 후

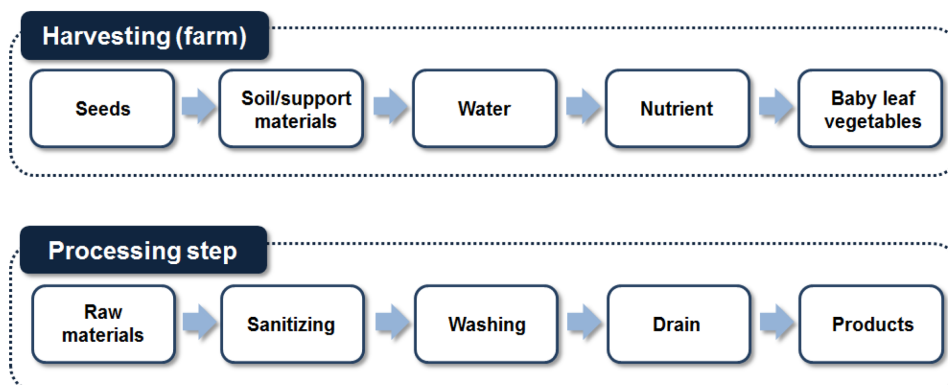


Fig. 1 Major sampling steps of microgreen harvesting and processing steps.

*L. monocytogenes*는 30°C, 나머지 균주는 37°C에서 18-24시간 배양하였다. 각 병원성 미생물별 증균 배양액을 취하여 각 균별 선택배지에 접종하여 *L. monocytogenes*는 30°C, 나머지 균주는 37°C에서 24시간 배양하였다. 의심되는 집락을 TSA에 희석 도말한 후 37°C에서 24시간 배양한 다음 VITEK2® compact로 최종 확인 하였다. 병원성대장균의 경우 분리된 대장균에 대하여 병원성 인자 보유 유무를 Kim 등(2014)의 방법에 의하여 분석하였다.

Repetitive-sequence-based polymerase chain reaction (Rep-PCR) 기반 genotyping. 어린잎 채소 생산 및 가공공정에서 분리된 *B. cereus*를 배양하여 UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories Inc., Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 DNA를 추출하고 모든 DNA 농도가 25 ng/μL이 되도록 하였다. Genomic DNA 중 non-coding intergenic repetitive elements의 rep-PCR 증폭을 위하여 diversilab DNA kit (BioMerieux)를 사용하였다. Rep-PCR master mix 18 μL, GeneAmp 10x PCR buffer 2.5 μL, Primer mix 2 μL, AmpliTaq DNA polymerase 0.5 μL 그리고 template DNA 2 μL를 혼합하여 총 25 μL가 되게 준비한 후 원심분리하여 Mastercycler® pro (Eppendorf, Hamburg, Germany)로 PCR을 수행하였다. PCR 분석 후 증폭된 DNA는 Diversilab system(BioMerieux)을 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

일반세균수와 대장균군 분석. 어린잎 채소의 생산 및 가공 단계에서 수집한 시료의 일반세균수와 대장균군은 Fig. 2와 같다. 농장에서 생산된 어린잎 채소와 종자의 일반세균수는 각각 8.2-8.5 log CFU/g, 6.9-7.2 log CFU/g이며 환경시료인 용수와 토양의 일반세균수는 각각 3.6-6.8 log CFU/g와 8.2 log CFU/g 수준이었다. 대장균군은 어린잎 채소에서 2.9-3.5 log CFU/g, 종자에서 1.5-4.2 log CFU/g이 검출되었으며, 환경시료에서 평균 3.0 log CFU/g이상이 검출되어 환경시료와 원료 어린잎 채소의 오염도 차이가 크지 않았다.

어린잎 채소의 신선편의 가공공정 단계에서 수집한 시료의 일반세균수를 분석한 결과 원료, 세척, 행균, 탈수 및 최종 제품 단계 중 원료에서 일반세균수가 7.3 log CFU/g로 가장 높았으며 세척 및 행균에 의해서 1.2-1.9 log CFU/g 정도 감소되었다. 가공 공정 중 시료의 대장균군 오염도를 살펴본 결과 원료의 대장균군 오염 수준은 3.4 log CFU/g였으나 세척 및 탈수 공정을 거쳐 최종제품에서는 1.6 log CFU/g로 감소되는 경향을 보였다. 기존 국내 시판 샐러드 시료를 대상으로 한 연구에 따르면 일반세균수의 경우 약 6.0-7.9 log CFU/g, 대장균군은 2.0-5.4 log CFU/g으로 본 연구와 비슷한 수준으로 검출되었다(Bae 등, 2011; Jo 등, 2011; Kang 등, 2011). 일반세균수

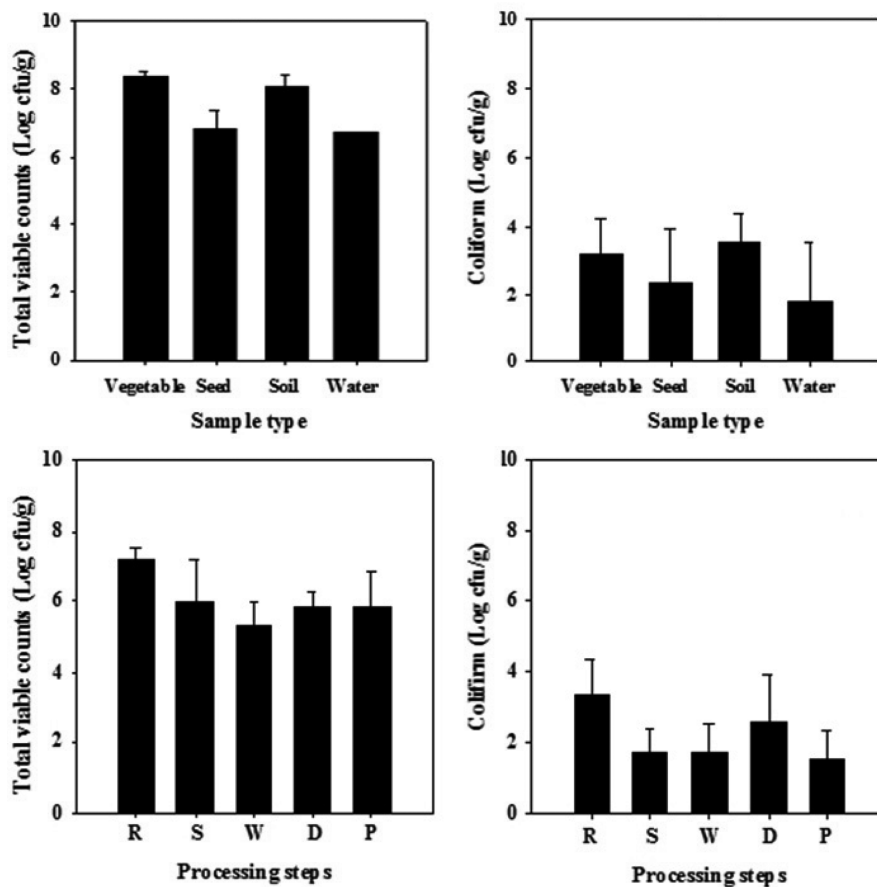


Fig. 2 Total viable cell counts and coliform in samples from microgreen harvesting and processing steps. (A) total viable cell counts in food and environmental samples of harvesting steps, (B) coliform level in food and environmental samples of harvesting steps, (C) total viable cell counts in samples of processing steps, (D) coliform level in samples of processing steps.

Table 1 Identification of Enterobacteriaceae isolates in samples from microgreen harvesting and processing

	Harvesting step (farm)							Processing step					Total	
	Micro-green	Seed	Soil	Support material	Nutrient	Water	subtotal	Final product	Raw material	Sanitizing	Washing	Drain		subtotal
<i>Aeromonas</i> spp.	1(0.9)	- ¹⁾	1(0.9)	-	-	1(0.9)	3(2.7)	-	-	-	-	-	-(0)	3(1.8)
<i>Enterobacter</i> spp.	25(22.3)	4(3.6)	31(27.7)	15(13.4)	-	3(2.7)	78(69.6)	2(3.6)	4(7.3)	4(7.3)	3(5.5)	3(5.5)	16(29.1)	94(56.3)
<i>Klebsiella</i> spp.	3(2.7)	-	-	-	-	-	3(2.7)	-	-	-	-	-	-(0)	3(1.8)
<i>Kluyvera</i> spp.	-	-	-	-	-	-	-(0)	-	1(1.8)	-	-	-	1(1.8)	1(0.6)
<i>Leclercia</i> spp.	-	-	-	-	-	-	-(0)	1(1.8)	-	-	1(1.8)	1(1.8)	3(5.5)	3(1.8)
<i>Pantoea</i> spp.	3(2.7)	10(8.9)	3(2.7)	4(3.6)	-	2(1.8)	22(19.6)	9(16.3)	3(5.5)	3(5.5)	9(16.3)	8(14.5)	32(58.2)	54(32.3)
<i>Rahnella</i> spp.	-	-	-	-	-	-	-(0)	-	-	1(1.8)	-	-	1(1.8)	1(0.6)
<i>Raoultella</i> spp.	-	-	-	-	-	-	-(0)	-	1(1.8)	-	-	-	1(1.8)	1(0.6)
<i>Serratia</i> spp.	-	-	-	1(0.9)	5(4.5)	-	6(5.4)	-	-	-	-	1(1.8)	1(1.8)	7(4.2)
Total	32	14	35	20	5	6	112(100)	12	9	8	13	13	55(100)	167(100)

¹⁾Not detected.

Table 2 Detection of foodborne pathogens in samples from microgreen harvesting and processing steps

Samples	No. of detected samples/No. of total samples (Contamination level, log CFU/g)						
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella</i> spp.	<i>V. paranaemolyticus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> O157:H7
Production step							
Baby leaf	8/12(2.81±0.47 ¹⁾)	0/12 ND ²⁾	0/12 ND	0/12 ND	0/12 ND	2/12 NA ³⁾	0/12 ND
Seeds	4/6(1.70±0.37)	0/3 ND	0/3 ND	0/3 ND	0/3 ND	0/3 ND	0/3 ND
Water	1/3(1.0±0)	0/3 ND	0/3 ND	0/3 ND	0/3 ND	0/3 ND	0/3 ND
Nutrients	0/2 ND	0/3 ND	0/3 ND	0/3 ND	0/3 ND	0/3 ND	0/3 ND
Soil	8/8(2.77±0.44)	1/8 NA	0/8 ND	0/8 ND	0/8 ND	0/8 ND	0/8 ND
Supporting material	4/4(3.21±0.30)	0/4 ND	0/4 ND	0/4 ND	0/4 ND	1/4 NA	0/4 ND
Subtotal	25/35(2.61±0.61)	1/33 NA	0/33 ND	0/33 ND	0/33 ND	3/33 NA	0/33 ND
Processing step							
Raw materials	2/4(3.89±2.11)	0/4 ND	0/4 ND	0/4 ND	0/4 ND	0/4 ND	0/4 ND
Sanitizing	2/4(2.50±1.70)	0/4 ND	0/4 ND	0/4 ND	0/4 ND	0/4 ND	0/4 ND
Washing	2/4(2.44±2.04)	0/4 ND	0/4 ND	0/4 ND	0/4 ND	0/4 ND	0/4 ND
Drain	2/2(3.44±2.80)	0/4 ND	0/4 ND	0/4 ND	0/4 ND	0/4 ND	0/4 ND
Final products	3/4(2.45±2.25)	0/4 ND	0/4 ND	0/4 ND	0/4 ND	0/4 ND	0/4 ND
Subtotal	11/18(3.10±2.45)	0/20 ND	0/20 ND	0/20 ND	0/20 ND	0/20 ND	0/20 ND
Total	36/53(2.86±1.30)	1/53 NA	0/53 ND	0/53 ND	0/53 ND	3/53 NA	0/53 ND

¹⁾Mean±stdev.

²⁾Not detected.

³⁾Not available.

의 검출은 식중독이나 각종 위해에 직접적인 원인이 되는 것은 아니지만 잠재적으로 식품의 생산이나 유통 과정 등의 위생조건, 식품 부패 등을 판정할 수 있는 지표가 될 수 있기 때문에 중요하다. 또한 대장균군은 식품위생상 분변오염의 지표로 사용된다(Jo 등, 2011).

장내세균 분석. 어린잎 채소 생산 단계의 식품 및 환경 시료에서 분리한 장내세균 112주를 생화학적 방법으로 동정한 결과, *Aeromonas* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Pantoea* spp. 및 *Serratia* spp. 등이 분석되었다(Table 1). 전반적으로 *Enterobacter* spp.가 69.6%으로 가장 빈번하게 분석되었으며, *Pantoea* spp.가 19.6%, *Serratia*, *Aeromonas*, *Klebsiella* spp. 순으로 분석되었다. 종자에서는 *Pantoea* spp.가 전체 분리된 장내세균 14주 중 10주로 가장 많이 분석된 반면, 생산된 어린잎 채소에서는 토양, 지지도, 물 등에서 가장 많이 분석된 *Enterobacter* spp.의 분석 빈도가 가장 높아 *Enterobacter* spp.

가 이들 환경으로부터 식품 시료로 이행이 되었음을 보여주고 있다.

가공 공정에서 분리된 장내세균 55주를 동정한 결과, 전반적으로 *Pantoea* spp.가 58.2%를 차지하였으며 *Enterobacter* spp.가 29.1%로 그 뒤를 이었고, *Leclercia*, *Kluyvera*, *Rahnella*, *Raoultella* 그리고 *Serratia* spp.도 검출되었다. 공정의 각 단계 별로 장내세균이 고르게 분석되었으며, 세척공정에서 가장 낮게 검출되었으나 행균 및 탈수단계로 진행되는 동안 장내세균의 검출 빈도가 증가하였다. 장내세균 중 *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Yersinia* spp. 등은 사람에게서 감염을 유발시킬 수 있는 것으로 알려져 있어 이에 대한 안전성을 고려할 필요가 있다(HPA, 2007).

***B. cereus*의 정량 분석.** 어린잎 채소의 생산단계 시료에서 *B. cereus*를 분석한 결과 분석된 35점 시료 중 71%에서 *B. cereus*가 검출되었다. 토양과 지지도에서는 분석한 시료에서 모두 검

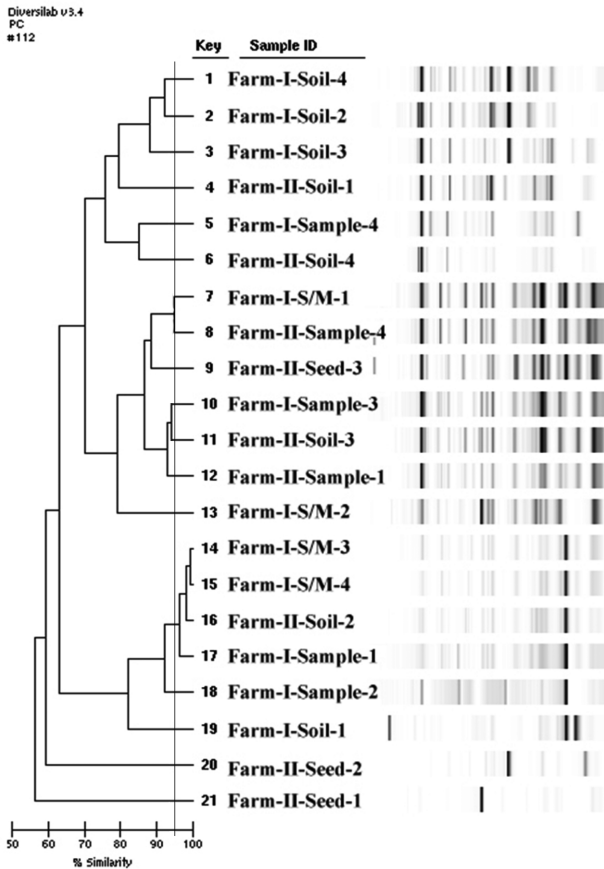


Fig. 3 PCR-generated dendrogram and virtual gel image of the 21 *B. cereus* isolates typed with rep-PCR. *B. cereus* isolates were obtained from food and environmental samples during harvesting steps of microgreen.

출되었으며 어린잎 채소와 종자의 약 67%에서 *B. cereus*가 검출되었다. 물과 영양액에서는 1.0 log CFU/g 이하의 *B. cereus*가 분석된 반면 토양, 지지토 및 어린잎 채소에서는 2.77±0.44–3.21±0.30 log CFU/g이 분석되어 종자나 재배용수 및 영양액 보다는 재배과정 중 토양으로부터 *B. cereus*가 이행될 가능성이 높음을 시사하고 있다(Table 2). Kim 등(2011)은 상추농장 토양의 *B. cereus*의 수가 62일 동안 시간의 경과에 따른 유의적인 차이 없이 3.5 log CFU/g 수준을 유지하였고, 상추가 토양에서 멀어질수록 위해 미생물의 수가 줄어든다고 보고한 바 있다. 가공공정 단계에서 어린잎 채소 중 *B. cereus*를 분석한 결과(Table 2) 원료의 오염 수준은 3.89±2.11 log CFU/g, 최종제품은 2.45±2.25 log CFU/g로 분석되어 세척 가공이 진행될수록 *B. cereus*의 오염도는 감소하였으나 그 수준이 낮았다. *B. cereus*는 그람 양성균의 호기성 세균으로 토양, 공기, 물 등 환경에 널리 분포되어 있어 각종 식품에 오염될 가능성이 높다. Bae 등(2009)에 따르면 *B. cereus*는 일반적인 세균이 생존하기 어려운 조건에서 포자를 생성하여 오랜 시간 생존이 가능하며, 가공공정에서 각종 설비의 표면에 생물막(Biofilm)을 형성하여 가열이나 세척 등의 공정에서도 생존하면서 안전한 식품생산에 영향을 미친다. 이와 같은 특성을 고려하여 공정의 각 단계에서 효율적인 저감화 방법을 개발할 필요가 있다.

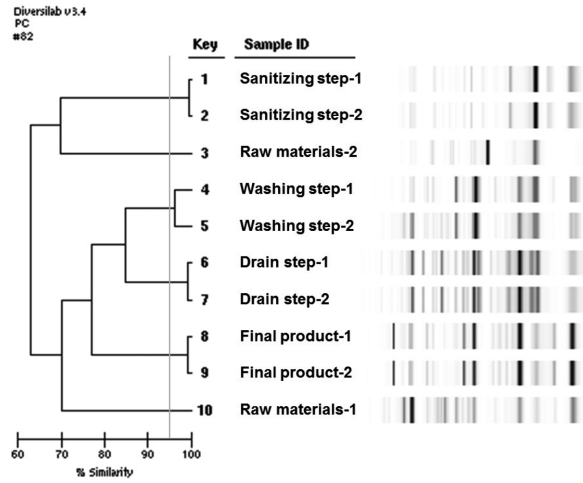


Fig. 4 PCR-generated dendrogram and virtual gel image of the *B. cereus* isolated from processing steps of microgreen.

병원성 미생물의 정성 분석. 일반적으로 채소류에서 발견되는 대표적 식중독 세균으로 *S. aureus*, *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7, *Yersinia enterocolitica* 그리고 *Campylobacter jejuni* 등을 들 수 있다(Beuchat, 2002). 이 미생물들은 물과 토양 등 환경에 널리 분포되어 있기 때문에 식중독 사고의 원인이 되는 병원성 미생물의 오염은 각각 신선편의 샐러드 농장의 재배부터 유통에 이르는 전 단계에서 일어날 수 있으며, 특히 생산과정에서 육묘단계의 상토, 재배과정의 토양 및 오염된 관개용수를 사용한 경우 신선편의 식품의 병원성 미생물오염의 주요한 원인이 될 수 있다(Burnett과 Beuchat, 2001). 어린잎 채소 생산단계의 식품 및 환경시료에서 *S. aureus*, *Salmonella* spp., *V. parahaemolyticus*, *L. monocytogenes* 및 *E. coli* O157:H7과 같은 병원성 미생물 오염을 분석한 결과 토양에서 *S. aureus*가 1건 분석되었으나 시료에는 오염되지 않았으며 위생지표인자로 활용되는 *E. coli*의 경우 일부 시료와 환경에서 분석되었다. 검출된 *E. coli*의 경우 동일한 위치의 시료와 토양에서 공통적으로 분석되어 토양으로부터 어린잎 채소로 오염이 전이되었을 가능성을 보여주었다. 한편 분리된 대장균의 병원성 인자는 음성이었다(Table 2). 그 외 *Salmonella* spp., *V. parahaemolyticus*, *L. monocytogenes* 및 *E. coli* O157:H7은 음성이었다(Table 2). 어린잎 채소의 가공 공정 중 식품 및 환경시료에서 *S. aureus*, *Salmonella* spp., *V. parahaemolyticus*, *L. monocytogenes* 및 *E. coli* O157:H7과 같은 병원성 식중독균 오염을 분석한 결과 시료 채취 시기 여부와 관계없이 모두 음성으로 분석되었다(Table 2).

***B. cereus*의 genotyping.** Rep-PCR은 지문 유전자 패턴 분석법으로 코딩되지 않은 반복배열의 primer를 이용하여 전기영동으로 다수의 DNA 조각을 분리할 수 있다. 세균 간의 분류와 계통 발생관계를 정하기 위한 분자 타이핑 방법으로 알려져 있으며 다른 subtyping 방법에 비해 신속하고 간편한 장점이 있다(Rameshkumar와 Nair, 2009; Hyeon 등, 2011). 어린잎 채소 생산단계의 식품 및 환경 시료에서 분리된 *B. cereus* 21주의 유전적 상동성을 rep-PCR을 이용하여 분석한 결과 Key no. 14, 15, 16 및 17과 같이 95% 이상의 상동성을 보인 2개 균주 이상으로 구성된 그룹이 분석되었다(Fig. 3). 이들은 총 3곳의 어

린잎 생산농장 중 2개의 농장(Farm I, II)의 지지토와 토양에서 분리된 균주로 이중 한 농장(Farm I)의 경우 간이형 수경재배를 위하여 용수에 잠긴 지지토 위에 토양에 식재된 어린잎 채소를 생산하는 방식으로 운영되고 있으며 이 경우 여러 번 생산에 이용되는 지지토에 오염된 *B. cereus*가 재배되는 어린잎 채소로 오염될 가능성이 있음을 보여주고 있다. 그 외의 균주들은 유전적 상동성이 낮아 특정 균주가 어린잎 생산 농장에 전반적으로 오염되어 있지는 않음을 시사하고 있다.

가공공정에서 분리된 *B. cereus*의 유전적 상동성은 Fig. 4와 같다. 분리된 균주들의 상동성은 95% 수준 이하로 낮아 단일 균주의 clone이 원료로부터 최종제품으로 이행되거나 공정 중 보편적으로 오염되어있지 않은 것으로 사료되었고 유전적으로 상동성을 보이는 균주(Key No. 4, 5)는 동일 샘플에서 얻어진 것으로, 공정단계 진행 중 재 오염되고 있을 가능성은 낮음을 보여주고 있다.

초 록

어린잎 채소의 생산 및 가공 공정에서 원료농산물과 토양 및 용수 등 환경 시료를 채취하여 미생물학적 품질을 평가하고 식중독을 유발시킬 수 있는 주요 병원성 미생물을 분석하였다. 생산단계 어린잎 채소와 환경 시료의 일반 세균수는 모두 6.8 log CFU/g 이상 분석되었으며 대장균군은 어린잎 채소와 토양에서 각각 3.2 log CFU/g 및 3.5 log CFU/g 수준으로 오염되어 있었다. 가공공정 단계에서는 일반세균수와 대장균군 모두 세척공정이 진행됨에 따라 최종제품 단계에서는 오염수준이 감소되었다. *B. cereus*의 경우 생산단계에서는 어린잎 채소와 토양 또는 지지토에서 오염도가 높았으며, 가공공정에서는 원료 대비 최종제품에서 약 1.4 log CFU/g 정도 감소되었다. 병원성 미생물의 정성분석 결과 생산단계에서는 *S. aureus*를 제외한 모든 병원성 미생물이 음성이었다. 본 연구에서 분리된 *B. cereus*를 이용하여 rep-PCR에 의한 유전적 상동성을 분석한 결과 생산단계의 경우 지지토와 시료에서 분리된 균주의 유전적 상동성이 높아 반복적으로 이용되는 지지토에 오염된 균주가 어린잎 채소로 이행되었을 가능성을 보여준 반면 가공공정에서 분리된 균주의 경우 유전적 상동성이 낮아 공정 중 재 오염될 가능성이 낮음을 시사하였다.

Keywords 가공, 농장, 식중독균, 어린잎채소, rep-PCR

감사의 글 본 연구는 농림축산식품부 수출전략기술개발사업과 한국식품연구원의 지원에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

References

Bae YM, Heu SG, and Lee SY (2009) Inhibitory effect of dry-heat treatment

- and chemical sanitizers against foodborne pathogens contaminated on the surfaces of materials. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **38**, 1265–70.
- Bae YM, Hong YJ, Kang DH, Heu SG, and Lee SY (2011) Microbial and pathogenic contamination of ready-to-eat fresh vegetables in Korea. *Korean J Food Sci Technol* **43**, 161–8.
- Berger CN, Sodha SV, Shaw RK, Griffin PM, Pink D, Hand P et al. (2010) Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environ Microbiol* **12**, 2385–97.
- Beuchat LR (2002) Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes and Infection* **4**, 413–23.
- Burnett SL and Beuchat LR (2001) Human pathogens associated with raw produce and unpasteurized juices, and difficulties in decontamination. *J Ind Microbiol Biotechnol* **27**, 104–10.
- Chang TE, Moon SY, Lee K, Park JM, Han JS, Song OJ et al. (2004) Microflora of manufacturing process and final products of saengshik. *Korean J Food Sci Technol* **36**, 501–6.
- Cho SD, Youn SJ, Kim DM, and Kim GH (2007) Quality evaluation of fresh-cut market products by season. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **20**, 295–303.
- EFSA (2011) Tracing seeds, in particular fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds, in relation to the Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) O104:H4 2011 Outbreaks in Germany and France. European Food Safety Authority, Italy.
- HPA (2007) Identification of Enterobacteriaceae. National Standard Method BSOP ID 16, Issue 2. Health Protection Agency, UK.
- Hyeon JY, Chon JW, Hwang IG, Kwak HS, Kim MS, Kim SK et al. (2011) Prevalence, antibiotic resistance, and molecular characterization of *Salmonella serovars* in retail meat products *J Food Prot* **1**, 161–6.
- ISO (2004) Microbiology of food and animal feeding stuffs—horizontal methods for detection and enumeration of Enterobacteriaceae. International Organization for Standardization, Switzerland.
- Jo MJ, Jeong AR, Kim HJ, Lee NR, Oh SW, Kim YJ et al. (2011) Microbiological quality of fresh-cut produce and organic vegetables. *Korean J Food Sci Technol* **43**, 91–7.
- Kang TM, Cho SK, Park JY, Song KB, Chung MS, and Park JH (2011) Analysis of microbial contamination of sprouts and fresh-cut salads in a market. *Korean J Food Sci Technol* **43**, 490–4.
- Kim HJ, Koo MS, Jeong AR, Baek SY, Cho JI, Lee SH et al. (2014) Occurrence of pathogenic *Escherichia coli* in commercially available fresh vegetable products in Korea. *J Korean Soc Appl Biol Chem* **57**, 367–70.
- Kim SR, Lee JY, Lee SH, Kim WI, Park KH, Yun HJ et al. (2011) Evaluation of microbiological safety of lettuce and cultivation area. *Korean J Fd Hyg Safety* **26**, 289–95.
- MFDS (2014) Food code. Ministry of Food and Drug Safety, Korea.
- Painter JA, Hoekstra RM, Ayers T, Tauxe RV, Braden CR, Angulo FJ et al. (2013) Attribution of foodborne illnesses, hospitalizations, and deaths to food commodities by using outbreak data, United States, 1998–2008. *Emerg Infect Dis* **19**, 407–15.
- Rameshkumar N and Nair S (2009) Isolation and molecular characterization of genetically diverse antagonistic, diazotrophic red-pigmented vibrios from different mangrove rhizospheres. *FEMS Microbiol Ecol* **67**, 455–67.
- Sivapalasingam S, Fridman CR, Cohen L, and Tauxe RV (2004) Fresh produce: A growing cause of outbreaks of food-borne illness in the United States, 1973 through 1997. *J Food Protect* **67**, 2342–53.