

## 진주 지역 딸기 주스 상점에서의 *Staphylococcus aureus*의 분리와 staphylococcal enterotoxin a, b, c gene 검색

김세리<sup>†</sup> · 박선자\* · 심원보 · 김형갑\*\* · 정덕화

경상대학교 응용생명과학부, \*경상대학교 의과대학, \*\*진주산업대학교 환경공학과

### Detection of *Staphylococcus aureus* and Screening Staphylococcal Enterotoxin a, b, c genes in Strains Isolated from Strawberry Juice Shops in Jinju

Se-Ri Kim<sup>†</sup> · Seon-Ja Park\* · Won-Bo Shim · Hyoung-Kab Kim\*\* · Duck-Hwa Chung

Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University

\*Department of Anatomy, College of Medicine, Gyeongsang National University

\*\*Department of Environmental Engineering, Jinju National University

(Received December 29, 2004; Accepted March 7, 2005)

#### ABSTRACT

*Staphylococcus aureus* is one of the important pathogenic agents, which are related to the hygienic condition. This study performed for the detection of *Staphylococcus aureus* and screening staphylococcal enterotoxin a, b, c genes in strains isolated from the environment for production of non-pasteurized strawberry juice. A total of 44 samples were collected from utensils, machinery, employees, raw materials, and strawberry juices in 3 strawberry juice shops in Jinju, western Gyeongnam. The isolation rate of *Staphylococcus aureus* was 26%. Specially *Staphylococcus aureus* was frequently isolated from employee's hands, strawberry and strawberry juices. The sea, seb, and sec genes were also investigated by polymerase chain reaction (PCR). One hundred and 55% of each isolate had found sea gene and seb gene, respectively. However, sec gene was not detected anywhere. To prevent food-borne disease associated with juice, the accomplishment of HACCP to be more efficient and systematic is necessary.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, non-pasteurized strawberry juice, polymerase chain reaction (PCR), juice HACCP

#### I. 서 론

식중독이란 오염된 식품을 섭취함으로써 일어나는 질병을 광범위하게 말하는 것으로 문화의 발달과 문명의 진보, 생활수준의 향상과 과학기술의 발전에 따라 그 발병 양상이 변한다. 식품소비에 있어 질적, 양적인 변화와 함께 외식과 국제 교류가 증가함에 따라 식품의 오염과 변질의 기회가 급증하고 식품 위생의 종류와 원인들이 점차 다양해지고 있는 실정이다. 과거의 식중독 사례를 보면 고기류와 생선 등 단백질이 풍부한 식품

에 의한 식중독이 대부분을 차지하고 있었으나 최근에는 이들 식품과 더불어 과일과 야채 그리고 주스 등에서 비롯된 식중독 사례가 증가하고 있다는 점은 주목할 만하다.<sup>1)</sup>

생과일주스는 그 신선함 때문에 전 세계적으로 널리 판매되고 있다.<sup>2)</sup> 하지만 생과일주스의 생산은 전통적인 주스 생산방식과는 달리 과일의 향과 신선함을 유지하기 위하여 미생물을 사멸시키거나 효소를 불활성화시킬 수 있는 가열공정이 없다. 따라서 생과일주스의 안전성은 원료생산에서부터 제품에 이르는 전 단계에서 결정지어진다고 할 수 있다.<sup>3)</sup> 그러나 최근 생과일주스의 부적절한 취급으로 인하여 미국을 비롯한 여러 국가에서 주스에 의한 식중독 사례가 보고되고 있으며 최근 몇 년 동안 병원성 미생물에 오염된 주스로 인해

<sup>†</sup>Corresponding author : Division of Applied Life Sciences, Gyeongsang National University, Tel: 82-55-751-5480, Fax: 82-55-757-5485 E-mail : seri81@hanmail.net

식중이 발생한 사례가 보고되고 있다.<sup>45)</sup> 비록 황색포도상구균(*S. aureus*)에 오염된 주스로 인한 식중독 사례는 보고된 바 없으나 주스의 원료가 되는 과채류에서 빈번하게 *S. aureus*가 검출되고 있다.<sup>67)</sup> Reina 등의 연구에서 나타난 바와 같이 *S. aureus*는 야채류에 부착력이 강하여 세척으로 제거되기 어려울 뿐만 아니라 환경에 대한 저항성이 강하다. 또한 공기, 토양 등의 자연계에 광범위하게 분포하고 있고 건강한 사람과 동물의 피부 등에도 상재하고 있어 식품에 쉽게 오염되기 때문에 식품 위생상 중요하게 다루어지고 있는 세균이다.<sup>8,9)</sup> *S. aureus*에 의한 식중독은 균이 식품에서 증식하면서 생성된 독소를 섭취함으로써 발생하는 독소형 식중독으로 자연계에는 여러 종류의 *S. aureus*가 있으나 enterotoxin을 생산하는 균종은 *S. aureus*에 한정된다.<sup>10)</sup> Enterotoxin은 분자량이 약 26,000~35,000 Da인 단일 폴리펩티드이며, 면역학적으로 서로 다른 9가지, 즉 enterotoxin A, B, E, D, E, F, G, H, I, J형이 있다.<sup>11)</sup> 독소형과는 관계없이 식중독을 일으키나, 주로 A형이나 D형에 의한 식중독 사례가 많은 것으로 보고되고 있다.<sup>12,13)</sup> 더욱이 enterotoxin은 trypsin, chymotrypsin, renin 및 papain과 같은 단백질 분해 효소에 의해 분해되지 않으며, 내열성이 강하여 독소형에 따라서는 100°C에서 30분간 가열해도 완전 파괴되지 않는다.<sup>14,15)</sup> 식중독을 일으킬 수 있는 enterotoxin의 양은 1 µg 이상인 것으로 알려져 있으며<sup>16,17)</sup> 이러한 독소의 생산은 온도에 민감하여 균의 증식에 적합한 온도와 일치한다. *S. aureus* 식중독의 예방법은 식품으로의 *S. aureus*의 오염방지, 오염균의 증식 및 enterotoxin 생성 억제 방법, 식품에 생산된 독소를 분해 해독하는 방법을 들 수 있다.<sup>14)</sup> 그러나 *S. aureus*는 자연계에 널리 분포되어 있을 뿐만 아니라 식품으로의 오염경로도 매우 다양하여 식품이 이 균에 오염될 기회가 대단히 높기 때문에 근본적으로 *S. aureus*의 오염방지는 거의 불가능하다.<sup>15)</sup> 하지만 주스에서 *S. aureus*를 비롯한 병원성 미생물 오염을 최소화할 수는 있으며 이러한 노력의 일환으로 미국에서는 2002년 1월부터 주스 산업에 의무적으로 HACCP를 도입할 것을 법으로 규제해 놓고 있는 실정이다.<sup>18)</sup> HACCP system은 예방적인 차원으로서 즉 산지에서 식탁까지 ("from farm to table")의 모든 식품, 모든 생산과정에서 적용할 수 있으며 문제점이 발생되기 전 미연에 방지함으로써 보다 효율적이고 안전한 위생관리 제도라고 할 수 있다.<sup>19)</sup> 이 시스템을 도입하기 위해서는 우선 주스 생산 각 단계에서 발생할 수 있는 미생물학적 위해를 찾고 이해하는 것이 선행되어야 한다.

따라서 본 연구는 주스제조과정의 안전성과 위생관리 향상을 위한 기초자료를 마련하기 위한 연구의 일환으로 병원성 세균에 오염되기 쉬우나<sup>20)</sup> 미생물을 제거할 수 있는 가열공정이 없는 생 딸기 주스 제조 환경에서 *S. aureus*를 검색하였다. 아울러 PCR 법으로 분리된 *S. aureus*가 enterotoxin A, B, C 생성할 수 있는 균주인지를 조사하여 보고하고자 한다.

## II. 연구 방법

### 1. 장소 선정 및 시료채취

본 연구를 위하여 2004년 5월부터 6월 사이 테이크아웃 방식으로 판매하는 진주지역 딸기 주스 상점 3곳을 선정하여 제조 기구 및 기구, 작업자, 원료와 주스에 대한 미생물학적 위해평가를 실시하였다.

미생물 검사를 위한 시료 채취는 먼저 상점의 수도수는 얼음 제조와 딸기세척 및 기구 세척에 이용되고 있는 물로 수도에서 직접 1ℓ를 채수병에 채취하였다. 또한 제조도구 및 기구는 사용 중인 것을 채취하였으며 주스 용기는 사용 전의 것을 검체의 형태에 따라 가능한 면적 또는 100 cm<sup>2</sup>의 면적을 swab 하였다.<sup>21)</sup> 작업자의 손에 대해서는 작업 전 또는 작업 중일 경우에 물로 씻은 후 glove juice법<sup>22)</sup>에 준하여 채취하였다.

그리고 딸기와 딸기 주스는 멸균된 시료채취용 팩에 100 g 혹은 250 ml씩 담았다. B 상점의 경우는 2종류의 딸기(냉동딸기, 생딸기)를 주스 제조에 사용하고 있어 B 상점에 대해서는 2종류의 딸기와 주스를 채취하

**Table 1.** The kinds and number of samples collected for the microbial assessment from three strawberry juice shops

| Sources               | Type of samples  | The number of samples |
|-----------------------|------------------|-----------------------|
| Utensils              | Knife            | 3                     |
|                       | Chopping board   | 3                     |
|                       | Dish cloth       | 3                     |
|                       | Juice container  | 3                     |
| Machinery             | Refrigerator     | 3                     |
|                       | Ice maker        | 3                     |
|                       | Ice grinder      | 3                     |
|                       | Blender          | 3                     |
| Employees             | Hands            | 3                     |
|                       | Clothes          | 3                     |
| Raw materials & Juice | Water            | 3                     |
|                       | Ice              | 3                     |
|                       | Strawberry       | 4                     |
|                       | Strawberry juice | 4                     |
| Total                 |                  | 44                    |

었다. 얼음의 경우는 주스 상점의 냉장기내에 담긴 얼음을 약 100 g 정도 멸균된 시료채취용 팩에 채취하였다. 이렇게 채취된 44개의 시료는 얼음을 채운 아이스 박스에 담고 실험실로 냉장 운반한 후 사용하였으며 채취된 시료의 자세한 목록은 Table 1과 같다.

**2. 실험 재료**

1) 사용된 균주

병원성 미생물의 분리와 *S. aureus*의 enterotoxin gene 생성여부 검색에 양성 대조균으로 사용된 표준 균주는 *Staphylococcus aureus* ATCC 13565 (SEA), *Staphylococcus aureus* ATCC 14458 (SEB), *Staphylococcus aureus* ATCC 19095 (SEC)이다. 또한 음성 대조균으로는 *E. coli* O157 H:7 ATCC 43894, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Bacillus cereus* KCCM 11714를 사용하였으며 이들 균주는 식품의약품안전청으로부터 분양 받아 본 연구에 사용하였다.

2) 기기 및 시약

*S. aureus*의 증균배양을 위하여 10% NaCl이 첨가된 Trypticase Soy Broth(Difco, USA)를 사용하였으며 선택배지로 Mannitol Salt Agar(Difco, USA)와 Baird-Parker Agar(Oxoid, England)를 사용하였다. 또한 생화학적 동정을 위하여 DNase agar(Difco, USA), 1N-HCl, Sheep blood agar(BioMerieux, France), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Rabbit plasma(BBL, USA), API Staph(BioMerieux, France)가 사용되었다. 분리된 *Staphylococcus aureus*가 enterotoxin을 생성할 수 있는 gene을 가지는가에 대한 여부를 PCR법으로 검색하였으며 PCR에 사용된 시약은 다음과 같다. 먼저 DNA 추출에는 Brain Heart Infusion(Difco, USA) Broth, 2% Triton X-100, lysostaphin(Sigma chemical Co., USA), Proteinase K (Sigmachemical Co., USA), phenol/chloroform/isoamylalcohol (25:24:1), 0.3 M sodium acetate, Isopropanol, 70% cold ethanol 그리고 TE buffer(10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)를 사용하였다. 또한,

PCR 분석에는 10x PCR buffer (Takara, Japan), 2.5 mM deoxynucleotide triphosphate (Takara, Ostu, Japan) 25 mM MgCl<sub>2</sub>, (Takara, Japan) primers (Bioneer, Korea) 그리고 AmpliTaq DNA polymerase (Takara, Japan)을 사용하였으며 PCR 생성물 확인을 위한 전기영동에 agarose gel (SeaKem agarose, FMC Bioproducts, Rockland, USA)을 사용하였다.

그리고 PCR 분석에 사용된 기기로는 PCR 증폭기 (GeneAmp PCR System 2400; Applied Biosystem, Norwalk, CT)와 전기영동장치(BioRad, USA) 그리고 UV-visible spectrophotometer (SHIMADZU, Japan)가 사용되었다.

**3. *Staphylococcus aureus*의 분리**

모든 시료는 clean bench에서 무균적으로 처리하였으며, *S. aureus* 분리를 위하여 수도수는 멸균된 감압 여과 장치를 이용하여 시료 250 ml를 여과지(Advantec MFS, Inc. 0.45 µm)에 막 여과한 후 egg-york tellurite emulsion이 함유된 Baird-Parker agar에 접종한 후 37°C 24시간 배양하였고<sup>23)</sup> 각종 기기와 기구 및 환경에서 채취된 시료와 손 시료의 경우 각각 1 ml를 취하여 10% NaCl이 함유된 TSB 10 ml에 접종하였다. 또한 딸기와 주스는 멸균된 시약 스푼 혹은 10 ml 피펫을 이용하여 10 g 혹은 10 ml을 취하여 10% TSB 90 ml과 혼합하고 균질화 시킨 후 37°C에서 24시간 증균 배양하였다. 증균된 균액을 Mannitol salt agar에 37°C, 24시간 희석 배양한 후 mannitol 분해능이 있는 황색불투명 집락을 선택하여 다시 2차 선택 배지로서 Egg-yolk tellurite emulsion을 첨가한 Baird-Parker agar에 37°C, 24시간 희석 배양한 다음 tellurite 저해효과에 의해 검은색 침전을 형성하며 단백질 분해(proteolysis) 작용으로 집락주위에 밝은 환(clear zone)이 나타나는 단일 집락을 취하여 생화학적 확인실험에 사용하였다. 생화학적 확인 실험으로는 분리 배양된 단일 집락에서 Gram positive와 포도상의 배열을 갖는 구균(cocci)임을 확인하였고 *Streptococcus* sp.와의 구분을 위해 catalase

**Table 2.** Sequences and location of primers for the amplification of each gene

| Gene | Primers | Oligonucleotides (5' to 3')        | Location  | Products (bp) |
|------|---------|------------------------------------|-----------|---------------|
| SEA  | sea-1   | AAG TGC CGA TCA ATT TAT GGC TA     | 443-465   | 219           |
|      | sea-2   | GTA ATT AAC CGA AGG TTC TGT AGA    | 637-660   |               |
| SEB  | seb-1   | TCG CAT CAA ACT GAC AAA CG         | 634-653   | 477           |
|      | seb-2   | GCA GGT ACT CTA TAA GTG CCT        | 1088-1100 |               |
| SEC  | sec-1   | CTC AAG AAC TAG ACA TAA AAG CTA GG | 665-690   | 271           |
|      | sec-2   | TCA AAA TCG GAT TAA CAT TAT CC     | 913-935   |               |

test를 실시하였으며 deoxyribonuclease 생성능 확인을 위하여 DNase test,  $\beta$ -용혈을 확인하기 위하여 sheep blood agar, 그리고 혈액 응고성 균주 판별을 위해 coagulase test를 실시하였다. Coagulase 실험에 사용한 방법은 tube coagulase test(표준방법)로서 37°C, 16시간 동안 BHI broth에서 배양한 균액 500  $\mu$ l와 동량의 rabbit plasma를 서로 혼합한 후 37°C, 16~18시간 반응 시킨 후 최종 관찰하여 응집반응이 나타나는 것을 양성으로 판단하였다. 이러한 여러 가지 생화학적 성상들을 *S. aureus* 표준균주 ATCC 25923과 비교하여 실험하였으며 API staph kit를 사용하여 재확인하였다.<sup>24)</sup>

#### 4. PCR을 이용한 staphylococcal enterotoxin a, b, c gene의 검색

Enterotoxin gene 검색을 위한 PCR에 사용될 DNA는 Johnson 등의 방법<sup>25)</sup>으로 추출하였다. BHA에 보관된 *S. aureus*를 한 백금이 취하여 BHI (Brain Heart Infusion) broth에 접종한 후 37°C, 16시간 배양하였다. 배양액 1 ml를 취하여 10,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후 배양액으로부터 얻은 pellet은 190  $\mu$ l의 2% Triton X-100에 현탁시켰다. 현탁액은 95°C에서 15분간 반응시켰으며 반응이 끝난 후 세포에 25 mg/ml 농도의 lysostaphin 10  $\mu$ l를 혼합한 후 37°C에서 30분간 세포용해를 시켰다. 그 후 1  $\mu$ l의 proteinase K(200 mg/ml)를 첨가하고 65°C에서 15분 동안 반응한 후 100  $\mu$ l의 phenol과 동량의 chloroform/isoamylalcohol (24:1)을 첨가하여 시료와 혼합한 후 4°C, 13,000 rpm에서 15분간 원심분리 하였다. 상층액은 새로운 tube에 옮기고, 이 조작을 두 번 더 반복하여 단백질이 제거되고 DNA가 함유된 수용액 층을 얻었다. 이 수용액 층에 0.3 M sodium acetate(10%, 20  $\mu$ l)와 120  $\mu$ l의 isopropanol를 첨가한 후 4°C, 14000rpm에서 20분간 원심 분리하였고, 상층액을 제거하여 얻은 pellet에

두 배 부피의 70% cold ethanol을 가하여 세척 후 공기 중에서 자연 건조하였다. Pellet은 30  $\mu$ l의 TE buffer(10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 용해시켰고 이렇게 얻은 2  $\mu$ l의 수용액은 PCR 분석을 위한 template DNA로 사용되었다.

Primer는 Tsen 등<sup>26)</sup> (Staphylococcal enterotoxinA)과 Becker 등<sup>27)</sup>(Staphylococcal enterotoxinB, Staphylococcal enterotoxinC)에 의해 밝혀진 염기서열을 참고로 하여 선택하였다. 세 종류 enterotoxin에 대한 primers의 특이적 염기서열은 Table 2에 나타난 바와 같으며 각각의 primer는 Bioneer사(Chengwon, Chungbuk, Korea)에서 합성하였다.

PCR 반응 용액은 10x PCR buffer 5  $\mu$ l, 200  $\mu$ M의 deoxynucleotide triphosphate, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 pM primers, 2  $\mu$ l의 DNA 그리고 *AmpliTaq* DNA polymerase (*Takara*) 1.2 units을 첨가하고 3차 멸균 증류수를 사용하여 최종 반응용액을 50  $\mu$ l로 조절하였다.

또한 PCR thermal cycler의 반응 조건은 94°C에서 5분간 pre denaturation을 실시한 후, 94°C에서 1분간 denaturation, *sea* 56°C, *seb* 55°C, *sec* 52°C에서 40초간 각각 primer annealing, 72°C에서 1분간 extension의 조건으로 30cycles을 수행하고, final extension을 72°C에서 7분간 실시하였다. PCR에 의한 증폭생성물은 1.8% agarose gel 전기영동에 의해 확인하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. *Staphylococcus aureus*의 검색

##### 1) 제조 기구와 기기

주스 제조에 필요한 기구와 기기에서 *S. aureus*의 검색 결과 3곳에서 채취된 기구와 기기 12점 중 1점(8%)이 *S. aureus*에 오염되어 있었으며 그 시료는 C상점의 칼이었다(Table 3). 주스 제조 시 원료와 직접

Table 3. Detection of *Staphylococcus aureus* in three strawberry juice shops

| Farms          | Items | Utensils & Machinery | Employee     | Raw-material & Juice   | Isolation rate |
|----------------|-------|----------------------|--------------|--|----------------|
| A              |       | -                    | Hands        | Strawberry<br>Strawberry juice   | 21% (3of 14)   |
| B              |       | -                    | Hands        | Strawberry <sup>1)</sup><br>Strawberry juice <sup>2)</sup><br>Strawberry juice | 25% (4 of 16)  |
| C              |       | Knife                | Hands        | Strawberry<br>Strawberry juice   | 29% (4 of 14)  |
| Isolation rate |       | 8% (1 of 12)         | 50% (3 of 6) | 50% (7 of 14)  | 25% (11 of 44) |

<sup>1)</sup>Frozen strawberry. <sup>2)</sup>Strawberry juice made of frozen strawberry.

접촉하는 제조 기구 및 기기의 *S. aureus*의 오염은 주스로 직접 교차 오염시킬 수 있다. Bisbini<sup>28)</sup> 등에 의하면, 확인되어진 가장 중요한 미생물학적 위험요인은 음식물과 준비기구 표면과의 교차오염이라고 보고하고 있어 제조 기구와 기기의 청결은 안전한 주스 생산에 있어서 필수라고 판단된다.

따라서 이를 개선하기 위하여 박<sup>29)</sup> 등이 제시한 바와 같이 세척한 후 소독제에 담가 일정시간 동안 소독한 후 말려 재사용하여 교차오염을 미연에 방지할 수 있는 중점적인 위생관리가 필요하다. 아울러 제조도구를 위생적으로 관리하는 체계적인 프로그램의 개발과 실천이 이루어져야 할 것으로 생각된다.

2) 작업자

주스제조에 참여하는 작업자들의 위생상태 및 *S. aureus* 오염정도를 확인하기 위한 실험에서 모든 상점에 종사하는 작업자의 손에서 혈장 응고 효소 양성 *S. aureus*로 확인되었다(Table 3). 손을 비롯한 작업자의 신체에서 *S. aureus*의 빈번한 검출은 Hatakka 등을 비롯한 많은 학자들의 연구결과 일치하였다.<sup>30,31)</sup> 한편, Wei<sup>32)</sup> 등은 2000년 5월 6일 고등학교에서 아침 급식 후 발생한 집단 식중독에서 10개의 *S. aureus*를 분리하였으며 특히, 이들 중 조리 종사자의 손에서 2개의 뚜렷한 유전형질을 갖는 *S. aureus*가 검출되었고, 이러한 조사로 미루어 *S. aureus*는 식품 자체와 주위환경뿐만 아니라 작업자의 개인위생이 차지하는 비율이 크다는 것을 알 수 있다. 또한 본 연구에서 작업자의 손의 *S. aureus*의 오염은 다른 여러 곳으로의 전파경로를 가질 수 있음을 시사한다. 따라서 작업자의 개인위생을 향상시키기 위해서는 우선 주기적인 위생교육으로 작업자 스스로 개인위생의 중요성에 대한 인식의 전환이 이루어져야 하며 또한 딸기 주스를 제조하는 작업에 장갑을 착용하지 않는 경우가 많기 때문에 손은 직접적인 오염원으로 작용할 수 있어 작업 전 후로 손을 씻고 소독하는 작업은 필수적이라 사료된다. 이를 위하여 올바른 손 씻기와 작업습관 개선 그리고 상점내의 별도의 세척과 소독을 위한 시설 설치와 운영이 이루어져야 할 것으로 보인다.<sup>29)</sup>

4) 원료와 딸기주스

*S. aureus*를 주스 원료와 주스에서 *S. aureus*를 검색한 결과 Table 3에서 보는 바와 같이 원료와 딸기주스에 관한 항목에서 *S. aureus*가 50% 검출되었으며 검출된 시료는 모든 상점의 딸기와 딸기 주스였다. 따라서 본 연구에서 생딸기주스와 그 원료가 되는 딸기에서의 *S. aureus*의 검출은 원료의 오염이 곧 생과일주스의 오염으로 직결된다는 것과 딸기주스에 의한 *S. aureus*에

의한 식중독 가능성을 시사하고 있다.

따라서 안전한 딸기 주스의 생산을 위해서는 원료의 안전성부터 확보되어야 하며 이와 더불어 딸기의 적절한 세척이 요구된다. 현재 생딸기 주스를 제조하고 있는 상점에서는 과채류 세척에 수도물이나 주방용 세제를 이용하고 있다. 그러나 수도물은 흙 등의 불순물을 제거하는 역할을 할 수 있지만 식중독 원인균 등의 미생물 위해요소를 제거하는 효능은 기대하기 어렵다.<sup>33,34)</sup> 주방용 세제는 어느 정도 그 효능이 있는 것으로 보여 지나 완전히 제거되지 않을 경우 잔류하여 안전성 문제를 야기할 수 있고 또 과채류의 질적 손상을 초래할 수 있으므로 5분 이상 적용하지 말 것을 제조업체에서 권장하고 있다. 현재 미국 Centers for Disease Control and Prevention(CDC)이나 Environmental Protection Agency(EPA)의 경우는 과채류의 세척에 있어서 50 ppm~200 ppm 염소 용액을 사용할 것을 권장하고 있으며 그 외에도 여러 문헌에서 효과적인 세제와 소독제가 소개되고 있다.<sup>35)</sup> 따라서 딸기를 적절한 세제와 소독제를 선택 사용하여 부착된 미생물을 감소시킨 후 주스 제조에 사용하는 것이 바람직하다고 판단된다.

2. Staphylococcal enterotoxin a, b, c gene의 검색

1) sea gene 검색

3곳의 딸기 주스상점으로부터 분리된 *S. aureus*에 대한 enterotoxin A gene 생성(sea gene) 여부를 PCR 법으로 증폭하여 확인하였다. 결과 Fig. 1에서 나타난 바와 같이 분리된 *S. aureus*의 100%가 표준균주인 ATCC 13565와 같은 위치인 219bp의 뚜렷한 증폭 생성물을 확인 할 수 있었다. 이는 *S. aureus*에 의한 식중독이 주로 A형이나 D형에 의해 일어난다는 보고들과 일치하였다.<sup>12)</sup> 분리된 모든 균주가 sea 생성 가능한 것으로 나타남에 따라 *S. aureus*에 의한 주스의 오염을 방지할 수 있는 대책이 수립되어야 할 것으로 사료된다.

2) seb gene 검색

딸기 주스상점으로부터 분리된 *S. aureus*에 대한 enterotoxin B gene (seb gene)을 검색한 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 분리된 *S. aureus*의 55%가 enterotoxin B를 생성할 수 있는 gene을 가지는 것으로 나타났으며 주로 검출된 시료가 딸기, 딸기 주스 그리고 작업자의 손이었다. 따라서 작업장 내의 손 씻기 시설과 소독시설의 마련이 시급하며 또한 안전한 원료의 공급과 주스 상점의 위생이 보다 강화되어야 할 것이다.

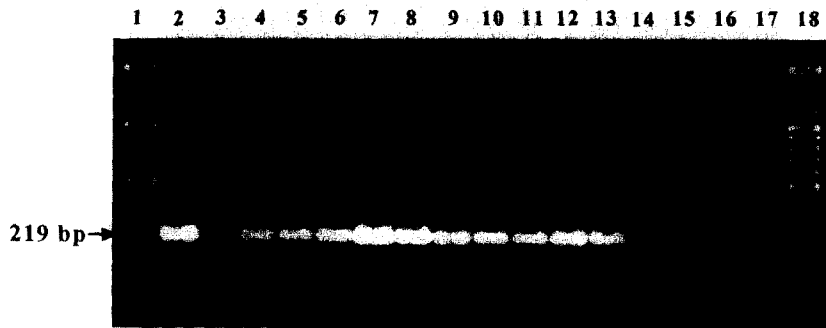


Fig. 1. The profile of the sea gene of *S. aureus* isolated from three strawberry juice shops.

1; Marker, 2; *S. aureus* (ATCC13565), 3; A Hands, 4; A Strawberry, 5; A Strawberry juice, 6; B Hands, 7; B Strawberry juice, 8; B Strawberry (frozen), 9; B Strawberry juice (frozen) 10; C Knife, 11; C Hands, 12; C Strawberry, 13; Strawberry juice, 14; *L. monocytogenes*, 15; *B. cereus*, 16; *E. coli*, 17; *S. enteritidis*, 18; Marker

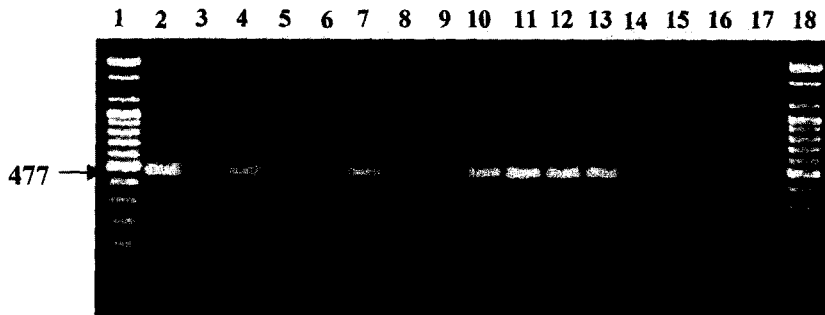


Fig. 2. The profile of the seb gene of *S. aureus* isolated from three strawberry juice shops.

1; Marker, 2; *S. aureus* (ATCC13565), 3; A Hands, 4; A Strawberry, 5; A Strawberry juice, 6; B Hands, 7; B Strawberry juice, 8; B Strawberry (frozen), 9; B Strawberry juice (frozen) 10; C Knife, 11; C Hands, 12; C Strawberry, 13; Strawberry juice, 14; *L. monocytogenes*, 15; *B. cereus*, 16; *E. coli*, 17; *S. enteritidis*, 18; Marker

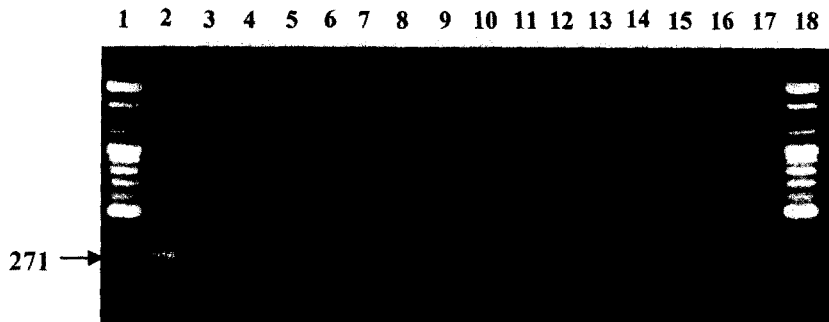


Fig. 3. The profile of the sec gene of *S. aureus* isolated from three strawberry juice shops.

1; Marker, 2; *S. aureus* (ATCC 19095), 3; A Hands, 4; A Strawberry, 5; A Strawberry juice, 6; B Hands, 7; B Strawberry juice, 8; B Strawberry (frozen), 9; B Strawberry juice (frozen) 10; C Knife, 11; C Hands, 12; C Strawberry, 13; Strawberry juice, 14; *L. monocytogenes*, 15; *B. cereus*, 16; *E. coli*, 17; *S. enteritidis*, 18; Marker

### 3) sec gene 검색

딸기 주스상점에서부터 분리된 *S. aureus*에 대한 enterotoxin C gene (sec gene)을 검색한 결과, Fig. 3에서 나타난 바와 같다. 분리된 *S. aureus*는 모두

enterotoxin C 생성 gene을 가지지 않는 것으로 나타났다.

Enterotoxin gene 검색 결과를 종합해 보면 Table 4와 같으며 enterotoxin A의 경우 주스 상점에서 분리된

**Table 4.** Screening staphylococcal enterotoxin a, b, c genes in strains isolated from three strawberry juice shops in Jinju

| Wild strains                      | Results |     |     |
|-----------------------------------|---------|-----|-----|
|                                   | sea     | seb | sec |
| A-Hands                           | +       | -   | -   |
| A-Strawberry                      | +       | +   | -   |
| A-Strawberry juice                | +       | -   | -   |
| B-Hands                           | +       | -   | -   |
| B-Strawberry <sup>(1)</sup>       | +       | -   | -   |
| B-Strawberry juice                | +       | +   | -   |
| B-Strawberry juice <sup>(2)</sup> | +       | -   | -   |
| C-Knife                           | +       | +   | -   |
| C-Hands                           | +       | +   | -   |
| C-Strawberry                      | +       | +   | -   |
| C-Strawberry juice                | +       | +   | -   |

<sup>(1)</sup>Frozen strawberry, <sup>(2)</sup>Strawberry juice made of frozen strawberry.

*S. aureus*의 100%가 sea를 생성할 수 있는 gene을 가지는 것으로 나타났다. 또한 주스 상점에서 분리된 *S. aureus*의 55%가 enterotoxin B 생성 gene을 지니는 것으로 나타났으며 분리된 균주 모두 enterotoxin C 생성할 수 있는 gene은 가지지 않는 것으로 나타났다. 하<sup>36)</sup>는 목장에서 분리한 96개의 시료에 대한 PCR 분석결과, seb(49.2%), MRSA(31.7%), ETA(41.2%), ETB(82.5%), TSST-A(15.8%)로 나타나 대부분의 *S. aureus*는 2개 내지 4개의 내독소를 함께 가지고 있는 것으로 보고하였으며 본 연구 결과에서도 55%의 분리된 균주가 2개 이상의 독소를 함께 가지는 것으로 나타났다.

#### IV. 결 론

*S. aureus*는 환경에 대한 저항성이 강하며 공기, 토양 등의 자연계에 광범위하게 분포하고 있다. 또한 건강한 사람과 동물의 피부 등에도 상재하고 있어 식품에 쉽게 오염되기 때문에 식품 위생상 중요하게 다루어지고 있는 세균이다. 따라서 본 연구에서는 진주지역 딸기 주스 상점 3곳을 선정하여 주스 제조기와 기구, 작업자 및 원료와 딸기주스 등에서 총 44개의 샘플을 채취하여 *S. aureus*를 검색하고 분리된 *S. aureus*에 대하여 PCR 법으로 enterotoxin a, b, c gene을 검색한 결과는 다음과 같다.

1. 수집된 시료의 26%에서 *S. aureus*가 빈번하게 검출되었으며 주로 검출된 시료로는 각 상점의 작업자의 손과 딸기, 딸기주스였다.

2. 분리된 *S. aureus*에 대하여 enterotoxin 검색결과,

모든 분리 균주에서 sea gene이 검출되었으며, 55%의 분리균주가 seb gene을 갖는 것으로 나타났다. 그러나 sec gene을 갖는 균주는 없었다.

이상의 결과로 미루어볼 때 내열성 독소를 생성할 수 있는 gene을 가진 *S. aureus*의 빈번한 검출로 딸기 주스에 의한 식중독이 우려된다. 따라서 안전한 딸기주스 생산을 위해서는 우선 원료의 안전성이 확보되어야 하며 이를 위하여 각 딸기 생산 농가에 GAP제도가 도입되어야 하고 딸기주스 제조과정과 환경을 개선하기 위해서는 HACCP가 도입되어야 할 것으로 사료된다. HACCP를 실시하기에 앞서 위생에 관한 적정제조기준 또는 위생표준관리기준(SSOP)이 선결되어야 할 것이며 이에 대한 연구, 투자 및 적용이 우선되어야 할 것이다. 또한 위생 검열 시 육안 검사뿐만 아니라 주기적인 미생물 검사를 통해 주스상점의 위생 상태를 확인해야 할 것으로 사료된다.

#### 검사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료기술 진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(03-PJ1-PG1-CH11-0003).

#### 참고문헌

1. 박희옥, 김창민, 우건조, 박선희, 이동하, 장은정, 박기환 : 최근 한국에서 발생한 식중독 모니터링 및 추이 분석. 한국식품위생안전성학회지, 16, 280-294, 2001.
2. Schmidt, R. H., Sims, C. A., Parish, M. E., Pao, S. and Ismail, N. A. : A model HACCP plan for small-scale, fresh-squeezed (not pasteurized) citrus juice operations. Available from: <http://hammock.ifas.ufl.edu>. Accessed from March, 1997.
3. Carter, R. D. : Florida Orange Juice (Commonly called Fresh-Squeezed Orange Juice) Production - Packing - Distribution, Fl. Dept. Citrus/Univ. Florida, IFAS-CREC, Lake Alfred, FL, 1989.
4. Schmidt, R. H., Sims, C. A., Parish, M. E., Pao, S. and Ismail, N. A. : Fresh Juice Processing GMPs, Available from: <http://hammock.ifas.ufl.edu>, 1999.
5. Food and Drug Administration. FDA publishes final rule to increase safety of fruit and vegetable juices. Available from: <http://www.cfsan.fda.gov/~Ird/hhsuic4.html>. Accessed January 18, 2001.
6. Baeuchat, L. R. : Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. *J. Food Prot.*, 59, 204-216, 1995.
7. Kim, H. J., Park, J. K., Lee, D. S. and Paik, H. D. : Changes of indicator microorganisms and pathogenic bacteria in spinach during cook-chill process. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 34, 927-930, 2002.
8. Laura, D. R., Henry, P. F. and Frederick Breidt, J. R. :

- Bacterial contamination of cucumber fruit through adhesion. *J. Food Prot.*, **65**, 1881-1887, 2002.
9. Kim, D. H., Kim, B. S., Lee, K. H., Ju, Y. R., Oh, K. S., Kim, H. S. and Choi, Y. K. : A study on diagnosis of Staphylococcal food poisoning and enterotoxin, The Report of National Institute of Health, **27**(1), 54-63, 1990.
  10. Shin, H. K., Kim, J. B., Lee, J. H., Kim, Y. K. and Kim, C. K. : Development of the simple immunoassays for the measurement of Staphylococcal enterotoxins. *J. Anim. Sci. Tech.*, 1993.
  11. Chen, T. R., Hsiao, M. H., Chiou, C. S. and Tsen, H. Y. : Development and use of PCR primers for the investigation of C1, C2 and C3 enterotoxin types of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food-borne outbreaks. *Int. Food Microbiol.*, **71**, 63-70, 2001.
  12. Hepner, E. : Food poisoning and *Salmonella* infectious in England and Wales, 1976-1978, Publ. Hlth. Lond., **94**, 337-379, 1980.
  13. 차옥주 : 병원내 공기감염과 물품의 멸균에 대한 상태 조사. *한국환경위생학회지*, **8**, 25, 1982.
  14. 김승곤, 김충환, 김태운, 이진섭, 정경석 : 최신병원위생학, 고문사, 서울, 251-256, 2000.
  15. Jung, H. K. : Ecological studies on the causative agents of food poisoning from food animals. *Kor. J. Env. Hlth. Soc.*, **20**, 90-98, 1994.
  16. Lee, E. J. : The effect of temperature and time on the multiplication of *Staphylococcus* in foods. *Korean Journal of Public Health*, **9**(2), 381-387, 1992.
  17. Brown, M. H. : Meat microbiology. Applied Science Publishers. London and New York, 269-486, 1982.
  18. Food and Drug Administration : Hazard analysis and critical control point (HACCP); procedures for the safe and sanitary processing and importing of juice. *Fed. Regist.*, **63**, 20450-20486, 2001.
  19. Norman G. Marriott : Principles of food processing sanitation. 4th edition, Aspen publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland, 1999.
  20. Yu, K., Newman, M. C. Archbold, D. D. and Hamilton-Kemp, T. R. : Survival of *Escherichia coli* O157 H:7 on strawberry fruit and reduction of the pathogen population by chemical agents. *J. Food Prot.*, **64**, 1334-1340, 2001.
  21. Sveum, W. H., Moberg, L. J., Rude, R. A. and Frank, J. F. : Microbiological monitoring of the food processing environment, In C. Vanderzant and E. E. Splittstoesser (ed.), Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3rd Ed. American Public Health Association, Washington D. C., 51-74, 1992.
  22. Anonymous, Guidelines for effectiveness testing of surgical hand scrub (glove juice test). *Fed. Regist.*, **43**, 1242-1243, 1978.
  23. 식품의약품안전청 : 식품공전, 문영사, 서울, 75-105, 2002.
  24. AOAC manual, 17th ed. In Horwitz W. (ed.), Association of Official Analytical Chemists, Inc., Arlington, 52-62, 2000.
  25. Johnson, W. M., Tyler, S. D., Ewan, E. P. Ashton, F. E., Pollard, D. R. and Rozee, K. R. : Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins and toxic shock syndrome toxin-1 in *S. aureus* by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, **29**, 426-430, 1991.
  26. Tsen, H. Y. and Chen, T. R. : Use of the polymerase chain reaction for specific detection of type A, D, and E enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in foods. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **37**, 685-690, 1992.
  27. Karsten Becker, Ricarda Roth, and Georg Peters : Rapid and specific detection of toxic *Staphylococcus aureus* : Use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of Staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene. *J. Clin. Microbiology*, 2548-2553, 1998.
  28. Bisbini, P., Leoni, E. and Nanetti, A. : An outbreak of *Salmonella* Hadar associated with roast rabbit in a restaurant. *European Journal of Epidemiology*, **16**, 613-618, 2000.
  29. Park, S. J., Ha, K. S., Shim, W. B., Park, M. K. and Chung, D. H. : Environmental Microbial Assessment of Food Services at Elementary Schools in Western Gyeongnam Province. *J. Fd Hyg. Safety*, **18**(1), 14-24, 2003.
  30. Hatakka, M., Bjorkoth, K. J., Asplund, K., Maki-Petays, N. and Korkeala, H. J. : Genotypes and enterotoxicity of *Staphylococcus aureus* isolated from the hands and nasal cavities of flight-catering employees. *J. Food Prot.*, **63**, 1487-1491, 2000.
  31. 정경석, 이희주 : 인천시내 일부 종합병원 종사자와 대학생의 비강내 *Staphylococcus aureus*의 보균상태 및 항균제에 대한 감수성. *한국환경위생학회지*, **19**, 71-76, 1993.
  32. Wei, H. L. and Chiou, C. S. : Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* from an outbreak association with a food handler. *Epidemiol Infect.*, **128**(1), 15-20, 2002.
  33. Beuchat, L. R. and Ryu, J. H. : Produce handling and processing practices. *Emerg. Infect. Dis.*, **3**, 459-465, 1997.
  34. Harris, L. J., Beuchat, L. R., Kais, T. M., Ward, T. E. and Taylor, C. H. : Efficacy and reproducibility of produce wash in killing *Salmonella* on the surface of Tomatoes assessed with a proposed standard method for produce sanitizers. *J. Food Prot.*, **64**, 1477-1482, 2001.
  35. Holliday, S. L., Scouten, A. J. and Beychat, L. R. : Efficacy of chemical treatments in eliminating *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on scarified and polished alfalfa seeds. *J. Food Prot.*, **64**, 1489-95, 2001.
  36. 하평수 : 서부경남지역의 목장에서 분리된 *Staphylococcus aureus*의 독소유전자 검색. 경상대학교 석사학위 청구 논문, 2002.