

식품중 *Listeria Monocytogenes*의 분포 및
분리균의 특성에 관한 연구

차인호 · 박은희 · 진성현 · 조현철 · 박성아 · 이영숙 ·
이주현 · 이미옥 · 민상기

미 생 물 과

식품중 *Listeria Monocytogenes*의 분포 및 분리균의 특성에 관한 연구

미 생 물 과

차인호 · 박은희 · 진성현 · 조현철 · 박성아 · 이영숙 · 이주현 ·
이미옥 · 민상기

Distribution and Characterization of *Listeria monocytogenes* in Commercial Frozen and Refrigerated Foods

Microbiology Division

I. H. Cha, E. H. Park, S. H. Jin, H. C. Jo, S. A. Park, Y. S. Lee,
J. H. Lee, M. O. Lee, S. K. Min

Abstract

As a part of investigation for listeriosis, we attempted isolation of *Listeria* spp.

from commercial freezing and refrigeration foods. Seven(8.3%) strains and 10(9.5%) strains of *Listeria* spp. were isolated from commercial freezing and refrigeration foods, respectively. Isolation ratio of each species was 6(3.2%) strains of *L. grayi* and *L. innocua* respectively, 1(0.5%) strain of *L. welshimeri* and 4(2.1%) strains of *L. monocytogenes*. In the isolation ratio of *Listeria* spp. originated from each class of food, 2(2.4%) strains of *L. grayi*, 3(3.6%) strains of *L. innocua* and 2(2.4%) strains of *L. monocytogenes* were isolated from 84 freezing foods, and 4(3.8%) strains of *L. grayi*, 3(2.9%) strains of *L. innocua*, 1(1.0%) strain of *L. welshimeri* and 2(1.9%) strains of *L. monocytogenes* were isolated from 105 refrigeration foods. In the biochemical properties such as fermentation of dextrose, esculin and D-arabitol were presented positive, and α -mannosidase, α -methyl-D-glucoside, growth at 4°C, methyl red, VP, catalase and motility test were presented positive reaction. However, all isolates were presented negative reaction in the tests such as glucose-1-phosphate, indole, urease, nitrate reduction and oxidase test. Also, all isolates except 4 strains of *L. monocytogenes* were not presented β -hemolysis on blood agar, and presented negative reaction in CAMP test with *Staphylococcus aureus*. In the antimicrobial susceptibility, most isolate of *Listeria* spp. were susceptible to 12 antibiotics such as ampicillin, cephalothin, penicillin, amikacin, gentamicin, erythromycin, kanamycin, vancomycin, tobramycin, carbenicillin, tetracycline and trimethoprim/sulfamethoxazole. Four strains of *L. monocytogenes* were susceptible to all antibiotics used in this study except nitrofurantoin. Of the 4 strains of *L. monocytogenes*, one strain was noted to harbor plasmid DNA of approximately 48 Kb molecular weight. The serotype of 3 strains and one strain of *L. monocytogenes* were classified into serotype 1 and 4, respectively. Four strains of *L. monocytogenes* could grow at various temperature such as 4, 10, 20, 30 and 40°C. Particularly, these strains were recognized the growth at refrigerant temperature, 4°C, by incubation for 48 hours, and reached almost at stationary phase by incubation for 96 hours. Also *L. monocytogenes* was presented growth at wide pH range, pH 5.0 to pH 10.0, and not allowed the growth at pH

4.0 and pH 11.0. We were conducted to explore the growth effects of *L. monocytogenes* on various chemical factors used for preservatives such as sorbic acid, propionic acid, dehydroacetic acid, sodium nitrite and sodium chloride. The inhibitory extent of *L. monocytogenes* against these chemical was shown in order of dehydroacetic acid, sodium nitrite, propionic acid, sorbic acid and sodium chloride. In particular, *L. monocytogenes* was presented entire inhibition with 1.5% sodium nitrite and dehydroacetic acid, respectively.

Key Words : Listeria, Frozen food, Refrigerated food

I. 서 론

식품에서의 미생물오염과 오염된 식품을 섭취함으로써 발생하는 식중독은 인간의 건강을 위협하는 가장 중요한 원인중의 하나이며, 경제 생산성을 저하시키는 요인이 되기때문에 식품중의 미생물을 제거시키거나 감소시키기 위한 가공처리 및 보존 방법에 대한 연구가 끊임없이 계속되고 있다. 그러나 가공처리된 식품으로부터 병원성 미생물과 부패성 미생물이 계속적으로 분리되어지고 이로 인한 식중독이 계속 발생되고 있는 실정이다^{1,2)}.

WHO (World Health Organization)³⁾와 USFDA (United States Food and Drug Administration)⁴⁾는 가공식품중에 미생물이 존재하는 주요인은 가공처리과정에서 균이 생존하기보다는 가공처리후의 오염이 주요인이라고 지적하고 있다.

미생물학적 측면에서 오염식품중의 미생물증식을 최소화하고 질병에 대한 위험성을 감소시키기 위한 목적으로 식품을 4℃, 혹은 10℃와 같은 저온에서 보관하고 있으며, 많은 사람들이 이러한 보관방법의 안전성을 과신하고 있는 실정이다. 그러나 많은 냉온성 병원 미생물과 냉온성 부패 미생물이 저온 또는 냉장보관식품을 통하여 식품의 부패나 감염성 질환을 유발시키며, 특히 자연계에 널리 분포하는 병원성 세균이면서 냉장온도에서도 증식이 가능한 *Listeria monocytogenes*에 의한 집단식중

독이 전 세계적으로 보고되고 있다^{5,7)}.

*Listeria*는 *Corynebacteriaceae*과(科)에 속하는 Genus로서 *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. innocua*, *L. grayi* 및 *L. murrayi* 등의 7종이 존재한다¹²⁾. 이들중 사람과 동물에서 리스테리아병(Listeriosis)의 원인이 되는 *Listria monocytogenes*는 저온성 통성 혐기성 Gram 양성 간균으로서 20~25℃에서 편모를 가지고 현저한 운동성을 나타낸다⁸⁾. 이 균은 1926년 Murray 등⁹⁾에 의해서 실험동물에 대한 병원성이 처음으로 소개된 이래, 최근 캐나다, 미국, 영국 등에서 *L. monocytogenes*로 오염된 식품에 기인되어 집단 식중독 사례가 빈번하게 보고되고 있어 식품위생학적인 측면에서 새로운 식중독의 원인균으로 부각되고 있다¹⁰⁾. 특히 *L. monocytogenes*에 의한 신생아 감염은 신생아 세균성 수막염의 16%정도를 차지하며, 노약자 및 면역력이 약화된 사람에게 70%정도의 치사율을 나타내는 독성이 강한 병원성 세균으로 알려져 왔다¹¹⁾.

신생아 리스테리아증은 B group *Streptococcus*의 감염과 유사하게 출생후 1주일 이내에 발병하는 조기형과 1주일 이후에 발병하는 후기형의 두가지 임상형을 위하여 패혈증 또는 수막염을 일으킨다. 성인의 경우 잠행성, 전격성 및 비특이적으로 다양한 수막염을 나타내고 드물게 아급성 심내막염, 내안구염, 복막염, 흉수, 골수염, 임파절염, 피부감염 등의 임상소견을 나타낸다. 특히 고령자나 임신부와 같이 면역기능이 저하된 사람이 감염되기 쉽고 임신기간중에 감염되면 유산, 사산 또는 감염된 미성숙 태아를 분만할 수 있으며, 비교적 높은 사망률을 나타내는 것으로 보고되어 있다^{11,13)}.

*L. monocytogenes*는 토양미생물 또는 환경미생물로서 세계 여러 지역의 지표수, 토양, 식물, 건강한 사람과 소의 분변에서 흔히 분리되어지며^{14,16)}, 사람으로의 감염은 이들 자연환경으로부터 주로 감염되며, 출생시의 감염을 제외하고는 사람과 사람 사이의 직접적인 전염은 없으나, 세계적으로 매년 많은 리스테리아병이 발병하고 있는 실정이다.

이와 같이 산발적이고 유행성으로 발생할 수 있는 리스테리아병은 현재까지 보고된 여러 역학적인 보고 자료를 고려해 볼때 *L. monocytogenes*로 오염된 식품이 주요 원인체인 것으로 추정되고 있다.

본 균은 인수공통질환(zoonosis) 원인균의 하나로서 식품으로의 오염은 주로 동

물성 식품원료와 토양에서 생산되는 식품의 원료로부터 시작되며, 이들 원료의 가공과정에서 본 균을 완전히 제거하지 못하기 때문에 가공식품으로까지 오염이 이루어지게 된다. 따라서 가공식품으로의 오염을 방지할 수 있는 최선의 방법은 원료식품에 대한 본 균의 오염을 최대한 방지하는 것과 가공과정중 균을 저감 또는 멸살시키는 것으로 이에 대한 연구가 시급히 요구되고 있다^{27,28)}.

최근 식생활 문화가 급변하고 식품 종류의 다양화로 인하여 자연환경으로부터 식품으로의 오염기회가 많아졌기 때문에 근년 본 균에 의한 감염증이 점차로 증가하고 있다. 특히 외국의 경우 연치즈, 우유, 양배추, 샐러드 및 칠면조 고기 등이 주요 원인식품인 것으로 보고되어 있다^{21,20)}. 따라서 많은 연구자들은 계육, 우육 등의 식육^{21,22)}과 원유 및 치즈와 같은 유제품^{20,23,24)} 그리고 소세지나 햄과 같은 육가공품²⁵⁾에서 분리 보고하고 있으며, 또한 식육으로의 오염경로를 규명하기 위하여 강물, 폐수, 동물의 사료와 분변 등의 환경재료로부터 *L. monocytogenes*의 분리를 시도하고 있다²⁶⁾. 그러나 국내에서의 연구는 동물의 분변이나 식품의 원료로부터 *L. monocytogenes*의 분리를 및 균 자체의 특성에 관하여는 다수 보고되어 있으나, 시중의 유통식품에 대한 분포조사는 이루어져 있지 않은 실정이다.

본 연구는 시중에서 유통되고 있는 식품중 냉장 및 냉동식품에 대하여 *Listeria monocytogenes*의 분포를 조사하고, 분리균의 화학적 물리적 인자에 대한 다양한 특성을 조사하여 식품중 *L. monocytogenes*의 저감대책 및 리스테리아병에 대한 역학의 기초자료를 확립하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시재료

공시재료는 1996년 1월부터 11월에 걸쳐 시중에서 유통되고 있는 냉동 또는 냉장식품 189건을 무작위로 구입하여 공시재료로 하였고, 시료채취시 유통되는 완포장의 재료를 저온보존상태로 실험실에 운반하여 균분리를 실시하였다. 공시재료의

식품군별 종류는 Table 1과 같다.

Table 1. Kinds of collected sample in this study

Class	Sub-class	No. of sample	Total
Refrigeration foods	Cheese	18	105
	Milk	17	
	Ham	22	
	Sausage	23	
	Processed fish meat	25	
Freezing foods	Icecream	16	84
	Processed meat products	30	
	Mixed fish & meat products	17	
	Freezed Mandoo	16	
	Freezed Pizza	5	
Total		189	189

2. *Listeria* 속균의 분리 및 동정

균 분리는 Fig. 1과 같이 식품공전²⁶⁾, Lovett²⁷⁾ 및 USDA²⁸⁾방법에 준하여 실시하였다. 즉, 멸균된 시료분쇄용 Stomacher bag에 실험재료 25g과 UVM modified *Listeria* enrichment broth (Difco) 225ml을 첨가하여 Stomacher(Pro-media SH-001, Japan)로 균질하게 마쇄한 후 밀봉하여, 30℃ 항온기에서 24시간 증균배양하였다. 이 배양액을 Oxford-*Listeria*-selective agar plate에 도말하여 35℃, 48시간 배양하는 동시에 배양액 0.1ml을 0.05% ferric ammonium citrate가 첨가된 Fraser broth 9.9ml에 접종하여 35℃, 48시간 선택 증균하였다.

Fraser broth에서 증균된 배양액중 esculin을 가수분해하여 검정색으로 변한 시험관의 시료를 *Listeria* 양성으로 추측하고 이를 Oxford-*Listeria*-selective agar plate에 도말하여 35℃, 48시간 배양하였다. 이 선택배지상에서 *Listeria* 속균 특유의 검정색

집박 3~4개를 조판하여 0.6% yeast extract가 첨가된 Tryptic Soy agar 및 혈액배지에 도말하고 35℃, 24시간 배양한 다음, 생화학적 성상검사를 실시하고 *Listeria* 동정용 API kit (bioMerieux sa)를 이용하여 동정하였다.

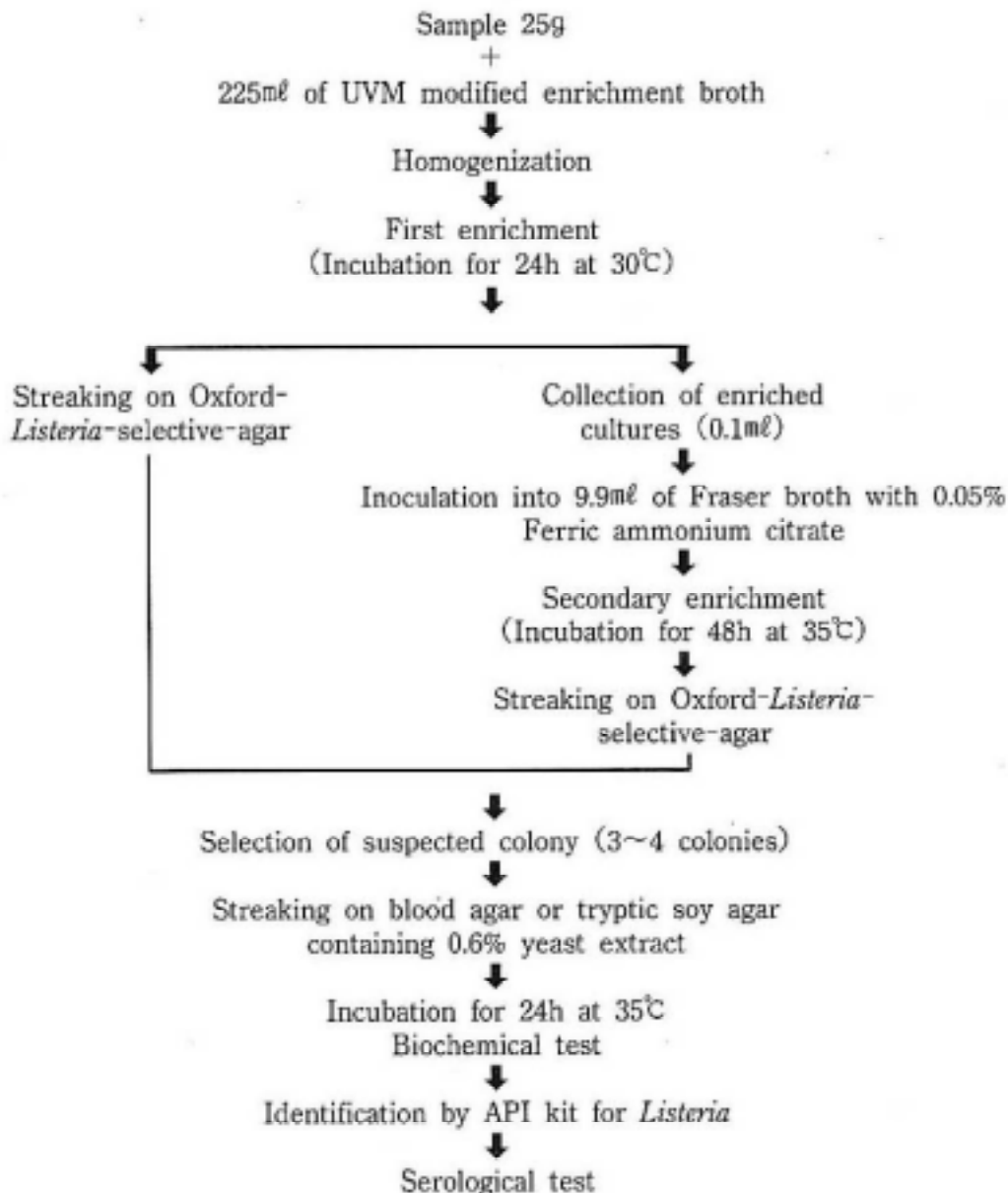


Fig. 1. Flow chart for isolation and identification of *Listeria* spp. from foods.

3. Serotyping

분리균에 대한 혈청형별 시험은 Lovett²⁰ 및 Seeliger¹²의 방법에 따라 *Listeria* polyvalent antiserum, O antiserum type 1 및 4를 사용하여 serotype을 분류하였다.

4. 항균제 감수성

분리된 *L. monocytogenes*에 대한 항균제 감수성시험은 disk 확산법³⁰에 따라 실시하였으며, 실험에 사용된 항균제의 종류 및 농도는 Table 2와 같다. 항균제 감수성시험의 기초배지로는 Mueller Hinton medium을 사용하였으며, 감수성시험에 사용한 항균제 disk는 ampicillin, cephalothin, penicillin, amikacin, gentamicin, kanamycin, erythromycin, vancomycin, nitrofurantoin, tobramycin, streptomycin, carbenicillin, tetracycline 및 trimethoprim/ sulfamethoxazole의 혼합제 등 14종의 항균제를 사용하였다.

37°C에서 18시간 배양하여 3×10^8 CFU/ml로 균수를 조절한 분리균을 평판배지에 도말한다음 각 항생제 disk를 배지표면에 가하고 37°C에서 24시간 배양한 후, 균 성장을 억제하는 투명대 형성 유무로서 감수성을 판정하였다. 항균제 감수성의 판정기준은 NCCLS³⁰의 기준에 준하였다.

Table 2. List of antibiotics for antibacterial susceptibility test in this study

Drug	Concentration (μg)	Drug	Concentration (μg)
Ampicillin(AM)	10	Vancomycin(VA)	30
Cephalothin(CF)	30	Nitrofurantoin(NF)	300
Penicillin(P)	10 unit	Tobramycin(TM)	10
Amikacin(AN)	30	Streptomycin(SM)	10
Gentamicin(GM)	10	Carbenicillin(CB)	100
Kanamycin(K)	30	Tetracycline(TE)	30
Erythromycin(EM)	15	SXT*	1.25/25.75

*. trimethoprim/sulfamethoxazole

5. Plasmid의 분리

분리된 *L. monocytogenes*의 plasmid분리는 Kado와 Liu³²⁾의 alkaline lysis 방법으로 실시하였다. 분리균을 5ml의 Brain Heart Infusion broth(BHI)에 접종하여 35℃에서 하룻밤 진탕 배양하였다. 이 배양액 1.5ml를 eppendorf tube에 옮겨 12,000×g로 1분간 원심분리하여 상층액을 제거한 다음 pellet에 4mg/ml의 lysozyme이 함유되어 있는 solution I(50 mM Glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris.Cl, pH 8.0) 100μl를 가하여 약 1분간 vortex mixer로 혼합하였다. 여기에 즉시 조제한 solution II (0.2 N NaOH, 1% SDS) 200μl를 가한 다음 부드럽게 역위진탕하여 얼음에 5분간 정치하였다. 그 다음, 얼음으로 차갑게 한 solution III (3 M potassium acetate, 23% glacial acetic acid) 150μl를 가하여 10초간 역위진탕하고 얼음에 5분간 정치한 후 4℃, 12,000×g에서 5분간 원심분리하였다. 상층액을 새 tube에 옮기고 동량의 phenol : chloroform(1 : 1) 용액으로 혼합하여 12,000×g에서 2분간 원심분리하였다. 상층액을 다시 깨끗한 tube로 옮겨 2배량의 ethanol을 가하고 -70℃에서 10분간 정치하여 DNA를 침전시킨 다음, 4℃에서 12,000×g로 5분간 원심분리하고 상층액을 제거하였다. Pellet을 70% ethanol 1ml로 세척하여 4℃에서 12,000×g로 5분간 원심분리한 다음 ethanol을 제거시키고 진공 데시케이터에서 건조시켰다. 건조된 DNA pellet은 RNase(20μg/ml)를 함유하는 TE(10 mM Tris.Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 용액 20μl에 용해하여 0.8% agarose gel에 loading하였다. 전기영동시 전개 buffer는 TAE(40 mM Tris-acetate, 10 mM EDTA) 용액을 사용하여 60 volt에서 1시간 30분동안 실시하였으며, 전기영동이 끝난 gel은 ethidium bromide 용액 (10μg/ml)에서 30분간 염색하고 증류수로 10분간 탈색한 다음 UV trans-illuminator에서 plasmid DNA를 관찰하였다.

6. 온도 및 pH 변화에 따른 분리균의 성장특성

온도변화에 따른 *L. monocytogenes*의 성장특성을 확인하기 위하여 Brain Heart Infusion(BHI) broth에 분리균을 동량씩 각각 접종하고 4, 10, 20, 30, 40℃의 온도에 배양하면서 매시간별 배양액의 혼탁도를 optical density(O.D) 660nm에서 측정하

였다.

pH 변화에 따른 분리균의 성장특성 시험은 pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0로 조정된 BHI broth에 분리된 *L. monocytogenes*를 각각 동량씩 접종하여 35°C에 배양하면서 매시간별 혼탁도를 660nm에서 측정하였다.

온도 및 pH 변화에 따른 *L. monocytogenes*의 성장특성 시험에서 혼탁도의 측정은 자동미생물 성장분석기(Labsystems Bioscreen C)를 사용하였고, 결과의 산출은 공시한 4 균주에 대한 O.D 값의 산술적 평균치로서 나타내었다.

7. 화학제에 대한 *L. monocytogenes*의 억제시험

식품의 방부효과를 위하여 흔히 사용되는 sorbic acid(SA), dehydroacetic acid(DA), propionic acid(PA), sodium nitrite(SN) 및 NaCl 등 5종의 화학제 각 농도에 대한 분리균의 억제효과를 관찰하였다.

본 시험에 사용된 화학제중 SA와 PA는 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 및 5.0%, DA와 SN은 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 및 1.5%, NaCl은 3~10%까지의 농도로 BHI에 첨가하여 사용하였다. 공시한 화학제의 각 농도에 분리균을 동량씩 접종하여 35°C에 배양하면서 매 시간별 균의 혼탁도를 660nm에서 측정하였다. 혼탁도의 측정은 자동 미생물 성장분석기(Labsystemis Bioscreen C)를 사용하였다.

III. 결과 및 고찰

1. *Listeria* 속균의 분리율

시중 유통식품중 냉동 또는 냉장식품을 대상으로 *Listeria* 속균의 분포상태를 조사한 바, Table 3에서와 같이 공시재료 189건으로부터 *L. grayi* 6주(3.2%), *L. innocua* 6주(3.2%), *L. monocytogenes* 4주(2.1%)가 분리되었으며, *L. welshimeri* 1건(0.5%)이 분리되어 총 17주의 *Listeria* 속균이 분리되었다. 그러나 공시재료 189건중 동일시

료에서 *Listeria* 속균이 중복분리되는 경향이 많아 *Listeria* 속균의 실제 분포율은 9건의 시료에서 분리되어 4.8%의 분포율을 나타내었다.

Table 4에서와 같이 시료별 *Listeria* 속균의 분포율은 냉동식품 84건중 4건(4.8%), 냉장식품 105건중 5건(4.8%)의 시료에서 분리되어 동일한 분포율을 나타내었다.

한편, Listeriosis의 원인체인 *L. monocytogenes*는 각각 2종류의 냉장식품과 냉동식품에서 분리되어 식품별 오염율은 2.4% 및 1.9%로 나타났으며, 전체 공시식품에 대한 오염율은 2.1%이었다.

Farber 등²¹⁾은 시판 닭고기에서 56.3%, 마쇄한 식육에서 86%의 *L. monocytogenes*를 분리보고하였고, Tiwari와 Aldenrath³⁹⁾도 세절한 식육에서 44.4%의 *L. monocytogenes*를 분리 보고하였으나, 본 실험에 공시된 시판 냉동 및 냉장식품에서는 189건중 4건(2.1%)의 시료에서 분리되어 비교적 낮은 분포율을 보여 상이한 차이를 나타내었다. 이러한 차이점은 원료식품과 가공식품의 차이, 즉 원료식품이 여러과정의 가공공정중 분균이 약화 또는 사멸됨으로서 나타나는 차이점으로 추측된다.

Table 3. Isolation rates of *Listeria* spp. from commercial foods

Source	No. of sample	<i>Listeria</i> spp. (%)			
		<i>L. grayi</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. monocytogenes</i>
Freezing foods	84	2(2.4)	3(3.6)	—	2(2.4)
Refrigeration foods	105	4(3.8)	3(2.9)	1(1.0)	2(1.9)
Total	189	6(3.2)	6(3.2)	1(0.5)	4(2.1)

그러나 본 실험에 공시한 재료가 유통중인 육·생선 가공품의 냉동식품과 육가공품, 소세지 및 어묵 등의 냉장식품 이었다는 점을 고려할 때 *L. monocytogenes*가 분리되었다는 사실만으로도 보건·위생학적인 측면에서 심각성을 던져 주고 있다. 뿐만아니라 동일시료에서 한 종류 이상의 *Listeria* 균종이 분리되는 경향이 많아 오염정도가 높은 것을 알 수 있었다.

Listeria 속균 뿐만아니라 병원성 세균의 분리율은 분리지역, 분리방법, 시료의 종류, 분리당 시 시료의 상태에 따라 상이한 결과를 초래하기 때문에 이들 유통식품에

Table 4. Isolation rates of *Listeria* spp. between freezing and refrigeration foods

Foods (No. of sample)	Sample* (%)	Isolates (%)			
		<i>L. grayi</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L.</i> <i>welshimeri</i>	<i>L.</i> <i>monocytogenes</i>
Freezing (84)	F-1	-	1	-	1
	F-2	1	-	-	1
	F-3	1	1	-	-
	F-4	-	1	-	-
Subtotal	4 (4.8)	2 (2.4)	3 (3.6)	0	2 (2.4)
Refrigeration (105)	R-1	1	1	-	-
	R-2	1	-	1	-
	R-3	1	1	-	-
	R-4	-	1	-	1
	R-5	1	-	-	1
Subtotal	5 (4.8)	4 (3.8)	3 (2.9)	1 (1.0)	2 (1.9)
Total(189)	9 (4.8)	6 (3.2)	6 (3.2)	1 (0.5)	4 (2.1)

*, contaminated sample with *Listeria* spp.

대한 *L. monocytogenes*의 분포 및 분리율에 관하여 광범위한 조사가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

2. 분리균의 생화학적 성상

분리균에 대한 생화학적 특성은 Table 5에서와 같이 분리균 모두 glucose, esculin, D-arabitol 등의 탄수화물 분해시험, α -mannosidase, α -methyl-D-glucoside, 4°C에서의 발육, MR, VP, catalase 및 운동성 시험(Fig. 2)에서 양성 반응을 보였으나, glucose-1-phosphate, indole, urease, nitrate 환원시험 및 oxidase 시험에서 분리균 모두 음성반응을 나타내었다. 또한 *L. monocytogenes*를 제외한 분리균 모두 혈액한

천배지에서 β -용혈을 나타내지 못하였으며, *Staphylococcus aureus*와의 CAMP 시험에서 음성반응을 나타내어 Doyle²⁴⁾, Lovett³⁰⁾, Seeliger와 Jones³⁰⁾의 분리 기준과 일치하였다.

Listeria spp.로부터 *L. monocytogenes*의 감별은 혈액배지에서의 좁은 투명대를 나타내는 β -용혈의 형성과, *Staphylococcus aureus*에 대한 CAMP test 양성으로서 대부분 감별가능하다. 그러나 *L. monocytogenes* ATCC15313과 같은 균주는 소, 양, 말의 혈액으로 제조된 혈액배지에서 β -용혈을 나타내지 않기 때문에 모든 *L. monocytogenes* 분리균주가 β -용혈을 나타낸다고 할 수 없다. 따라서 *L. monocytogenes*의 정확한 동정을 위하여는 *S. aureus*에 대한 CAMP 시험이 항상 병행되어야 할 것으로 사료된다.

L. monocytogenes

25°C 37°C

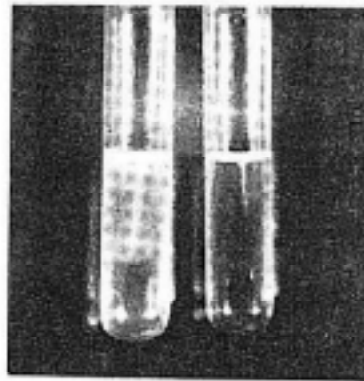


Fig. 2. Motility test of *L. monocytogenes* at different temperature. (after 24h of incubation)

Table 5. Biochemical properties of *Listeria* spp. from commercial freezing and refrigerated foods

Characteristics	No. of positive reaction			
	<i>L. grayi</i> (n=6)	<i>L. innocua</i> (n=6)	<i>L. welshimeri</i> (n=1)	<i>L. monocytogenes</i> (n=4)
Glucose	6	6	1	4
Esculin	6	6	1	4
α -mannosidase	6	6	1	4
D-arabitol	6	6	1	4
Xylose	0	0	1	0
Rhamnose	5	4	1	4
α -Methyl-D-glucoside	4	6	1	4
Ribose	6	0	0	0
Glucose-1-phosphate	0	0	0	0
D-tagatose	0	0	1	0
Mannitol	5	0	0	0
Growth at 4°C	6	6	1	4
Methyl red(MR)	6	6	1	4
Voges-Proskauer(VP)	6	6	1	4
Indole	0	0	0	0
Urease	0	0	0	0
Nitrate reduction	0	0	0	0
Catalase	6	6	1	4
Oxidase	0	0	0	0
Motility*	6	6	1	4
CAMP for <i>S. aureus</i>	0	0	0	4
β -hemolysis	0	0	0	4

*, Motility test performed at 25°C.

본 연구에서 분리된 *L. monocytogenes* 4주는 혈액배지상에서의 β -용혈(Fig. 3)과 CAMP 시험(Fig. 4)에서 양성을 나타내어 정확하게 *L. monocytogenes*로 동정할 수 있었다.



Fig. 3. Beta-hemolysis property of *L. monocytogenes* on blood agar.(after 24h of incubation at 35°C)

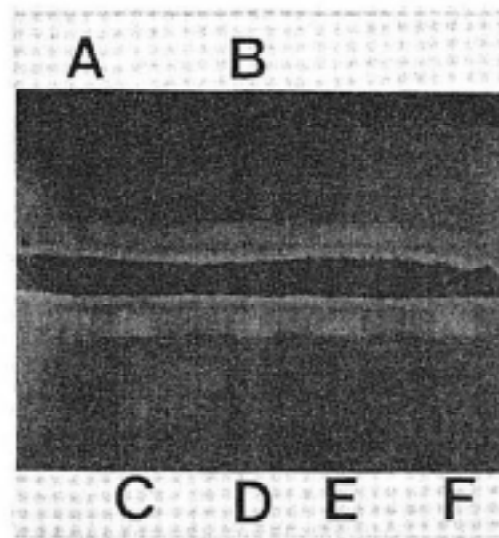


Fig. 4. CAMP test of *L. monocytogenes*. CAMP test done with *S. aureus*. A, *L. grayi* ; B, *L. innocua* ; C, D, E and F, *L. monocytogenes* (after 24h of incubation at 35°C)

3. 분리된 *Listeria* spp.의 항균제 감수성 검사

시주유통식품으로부터 분리된 *Listeria* 속균의 항균제에 대한 감수성시험은 Table 6과 같다.

Table 6. Antimicrobial susceptibility of *Listeria* spp. isolates

Drugs	Conc. (μ g/disk)	No. of strains			
		<i>L. grayi</i> (n=6)	<i>L. innocua</i> (n=6)	<i>L. welshimeri</i> (n=1)	<i>L. monocytogenes</i> (n=4)
Ampicillin	10	6	6	1	4
Cephalothin	30	6	6	1	4
Penicillin	10 units	6	6	1	4
Amikacin	30	6	6	1	4
Gentamicin	10	6	6	1	4
Kanamycin	30	6	6	1	4
Erythromycin	15	6	6	1	4
Vancomycin	30	6	6	1	4
Nitrofurantoin	300	0	0	1	0
Tobramycin	10	5	6	1	4
Streptomycin	10	2	3	0	4
Carbenicillin	100	6	6	1	4
Tetracycline	30	6	6	1	4
SXT*	1.25/23.75	6	6	1	4

*, trimethoprim/sulfamethoxazole

분리된 *Listeria* 속균은 14종의 공시약제중 nitrofurantoin을 제외한 대부분의 약제에 대하여 높은 감수성을 나타내었다. 균종별로 보면 *L. grayi* 6주는 NF, TM 및 SM, *L. innocua* 6주는 NF 및 SM, *L. welshimeri* 1주는 SM 이외의 전 공시약제에 대하여 감수성을 나타내었으며, 4주의 *L. monocytogenes*는 NF를 제외한 전 공시약제에 대하여

나타내었다. 이와 같이 본 실험에서 분리된 대부분의 *Listeria* 속균들은 대부분의 항균물질에 비교적 내성화가 많이 이루어지지 않은 균들로 확인되었으며, 이러한 높은 감수성도가 지속적으로 유지될 수 있도록 항균제의 남용에 주의를 기울여야 할 것으로 생각된다.

4. *L. monocytogenes*의 plasmid 유형

분리된 *L. monocytogenes*의 plasmid 유형은 Fig. 5와 같다. 4주의 분리주중 1주만이 48kD의 분자량을 갖는 plasmid가 확인되었다. Plasmid DNA에 관한 연구는 plasmid가 갖는 유전정보 또는 진단을 위한 DNA fragment를 얻기 위하여 많은 연구가 이루어진다. 본 연구에서는 *L. monocytogenes*의 plasmid에 관한 가장 기초적인 자료를 얻기 위하여 분리균으로부터 plasmid의 유형을 확인한 바, 1주의 분리주만 단일 band의 plasmid를 보유하고 있다. 이 plasmid의 유전적인 기능에 관하여는 차후 연구가 계속되어야 할 것으로 생각된다.

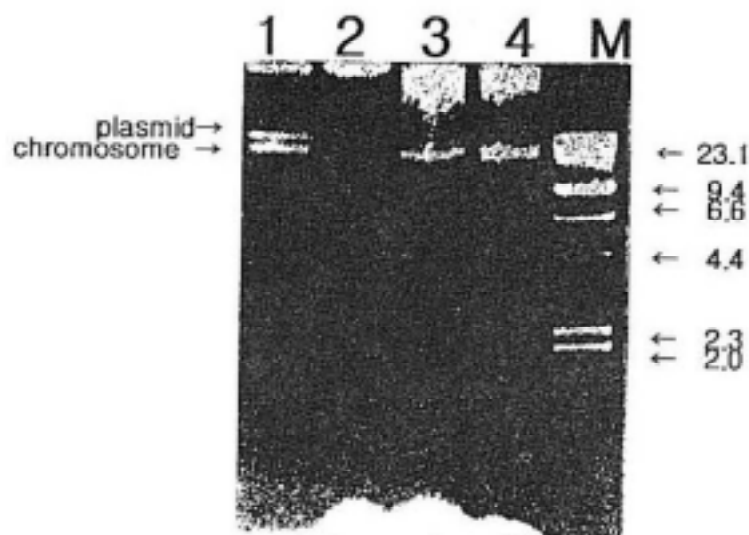


Fig. 5. Plasmid profile of *L. monocytogenes* isolates. Lane 1, 2, 3 and 4, *L. monocytogenes* isolates ; M, λ DNA digested with *Hind* III

5. *L. monocytogenes* 분리주의 혈청형

분리된 4균주의 *L. monocytogenes*에 대한 혈청형을 조사한 결과는 Table 7과 같이 serotype 1이 3주 및 type 4가 1주로 형별되었다. 식품군별로는 냉동식품에서 분리된 2주는 모두 type 1로 형별되었으며, 냉장식품에서 분리된 2주는 type 1 및 4로 각각 형별되었다.

Wrong 등³⁶⁾은 대만에서 계육과 돈육으로부터 분리되는 균의 절반이상이 serotype 1과 4였다고 하였고, 강 등³⁷⁾은 국내의 시판 우육 및 집합유로부터 분리한 균이 serotype 1과 4로 형별되었다고 보고한 바 있으며, 손과 강³⁸⁾이 도계장에서 유래된 분리주의 serotype은 모두 type 4라고 하였다. 본 연구에서도 선행 연구자들이 분리한 균주의 혈청형과 유사하게 병원성이 강한 혈청형으로 분류되어 시중 유통식품중 냉동·냉장식품이 보다 위생적인 생산관리가 필요한 것으로 사료된다.

Table 7. Serotype of *L. monocytogenes* isolates

Source	No. of isolates	Serotype	
		Type 1	Type 4
Freezing foods	2	2	-
Refrigeration foods	2	1	1
Total	4	3	1

6. 배양온도에 따른 분리균의 성장특성

분리된 4주의 *L. monocytogenes*를 4℃에서 일주일간 배양한 결과는 Fig. 6, 10~40℃의 범위에서 배양한 결과는 Fig. 6-1과 같다. 냉장온도인 4℃에서 배양한 결과, 배양 48시간부터 대수증식기 초기의 양상을 나타내었고, 배양 96시간에서는 상온에서 배양한 결과와 유사한 혼탁도의 증식을 보였다. 10℃의 온도에서는 배양 8시간부터 대수증식기 초기의 양상을 나타내었으며, 24시간 경과후에는 O.D 0.6이상의 높은

혼탁도를 나타내었다. 20, 30, 40℃에서는 아주 빠른 증식곡선을 나타내었으며, 저온에서의 증식곡선보다 배양온도가 높아짐에 따라 대수증식기의 시기가 빨라졌다.

*L. monocytogenes*는 2.5~44℃의 온도범위에서 발육이 가능하며, 동결과 해동의 반복에도 저항하여 식품에 오염되었을때의 위험성이 매우높고, Donnelly 등²⁰⁾은 이 균으로 오염된 식품을 저온보관할 때 보관전의 식품에서 분리되는 균량보다 더 높은 수준으로 증가함으로써 냉장 및 냉동식품으로 인한 질병의 원인이 될 가능성이 높다고 하였다. 본 연구의 결과에서도 냉동 및 냉장식품으로부터 분리된 분리주의 성장온도범위가 4~40℃로 확인되어 선행연구자들의 연구결과와 일치하였다.

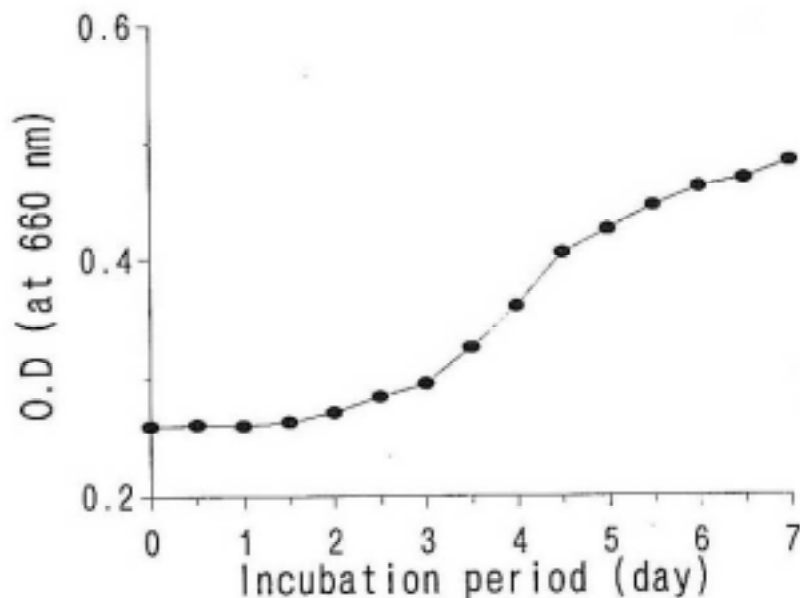


Fig. 6. Effect of temperature on growth of *L. monocytogenes* isolates at 4°C

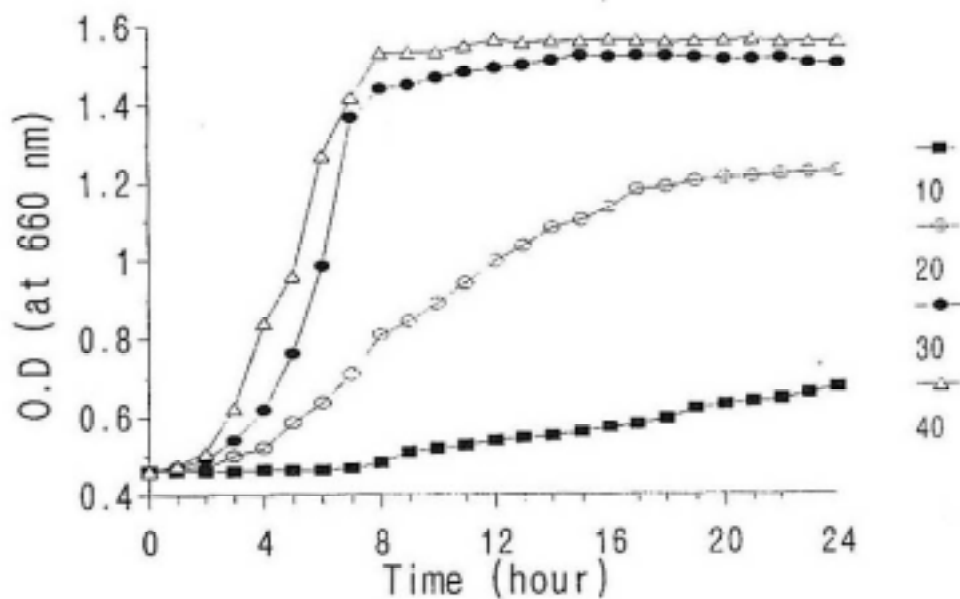


Fig. 6-1. Effect of temperature on growth of *L. monocytogenes* isolates at 10, 20, 30 and 40°C

7. pH 변화에 따른 분리균의 성장특성

분리된 *L. monocytogenes*를 pH 4.0~11.0의 범위로 조절한 BHI에 접종하고 35°C에 배양하면서 성장을 확인한 결과는 Fig. 7과 같다.

본 연구에서 *L. monocytogenes*는 pH 4.0 및 11.0에서 성장이 인정되지 않았고, pH 5.0~10.0의 범위에서는 성장이 인정되었다. 배양후 8시간까지는 pH 8.0에서 최적의 성장을 나타내었으나, 그 이후에는 pH 9.0에서 최적의 성장을 나타내었다. pH 10.0에서 12시간 배양후부터는 pH 7.0에서의 성장보다 높은 혼탁도를 나타내어 알카리의 조건에서 저항성을 나타내는 특성을 보였다.

Dallmier와 Martin은⁴⁰⁾ pH 5.0이하에서는 수소이온이 세균 세포막의 삼투압과 작용하여 세포를 산성화 시킴으로서 균의 증식을 억제시키거나 사멸시킨다고 하였다. 본 연구에서도 pH 4.0에서는 균의 증식이 전혀 인정되지 않아 이들의 성적과 일치하였다. Conner 등⁴¹⁾에 의하면 *L. monocytogenes*의 증식범위는 pH 5.0~9.0이며,

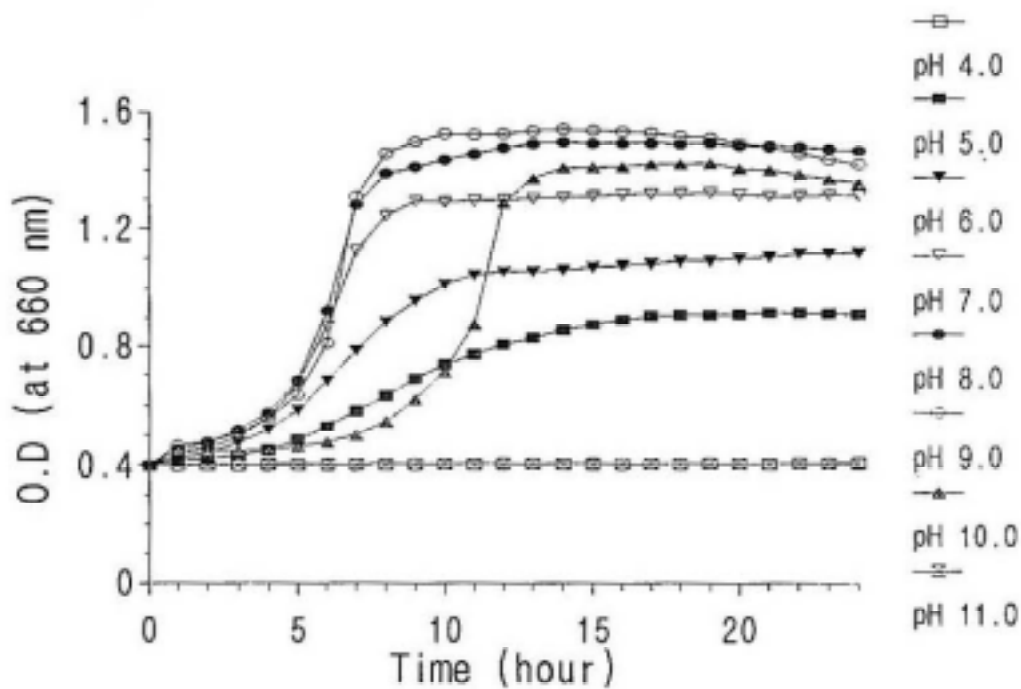


Fig. 7. Effect of pH on growth of *L. monocytogenes* isolates at 35°C

식품에 오염된 다른 미생물과 경쟁적으로 생존하거나 증식이 가능하다고 하였다. 본 연구에서는 pH 10.0의 초기배양에서 대수증식기 시간이 지연되는 성장곡선을 나타내었으나, 배양 중반기인 12시간부터는 pH 7.0의 성장보다 더 높은 O.D 값을 나타내어 이들의 성적과 다소 상이한 결과를 보였다.

8. *L. monocytogenes* 분리균에 대한 화학제의 작용

식품중 식육 및 어육류의 가공식품에 여러용도로 사용되는 sorbic acid, propionic acid, dehydroacetic acid, sodium nitrite 및 sodium chloride 등이 *L. monocytogenes*의 성장에 미치는 영향을 조사하였다.

1) Sorbic acid의 영향

Sorbic acid 각 농도에 따른 *L. monocytogenes* 분리균의 성장곡선양상은 Fig. 8과 같다. Sorbic acid의 첨가농도가 높아질수록 대수증식기가 지연되며, 높은 억제효과를 나타내었다. 5% 첨가농도에서 24시간 배양 동안 0.7이하의 흡광도값을 나타내어 강한 억제효과를 확인할 수 있었다. 대조구에 비하여 0.5% 첨가농도에서의 억제효과는 아주 미약하였고, 1, 2 및 3%의 첨가농도에서는 다소의 억제효과를 4%의 첨가농도에서는 24시간 배양 동안 0.9이하의 흡광도값을 나타내어 다소 강한 억제효과를 확인할 수 있었다.

한편 0.25%의 첨가농도에서는 대조구와 유사한 기울기의 성장곡선을 나타내어 억제효과를 인정할 수 없었다.

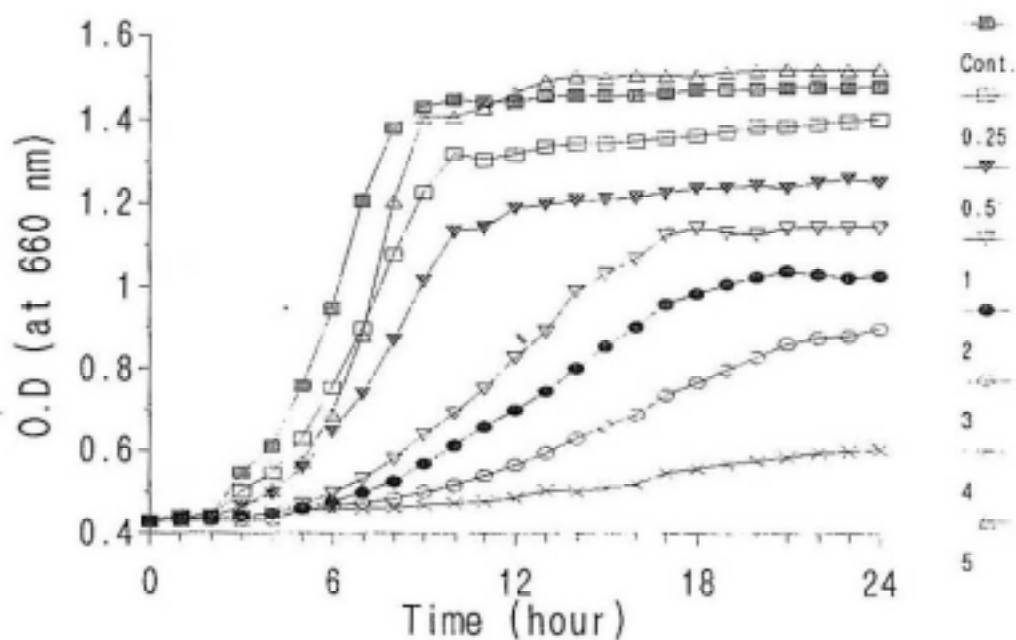


Fig. 8. Effect of sorbic acid on growth of *L. monocytogenes* isolates at 35°C.

2) Propionic acid의 영향

Propionic acid 각 농도에 대한 분리균의 성장곡선 양상은 Fig. 9와 같이 2~5%의 농도에서 균의 발육을 확인할 수 있었으나, O.D 1.0 이하의 흡광도를 나타내어 *L. monocytogenes*에 대한 억제효과를 다소 인정할 수 있었다. 그러나 0.25 및 0.5%의 첨가농도에서는 배양 13시간 이후부터 O.D 1.0 이상을 나타내어 억제효과가 다소 미약하였다.

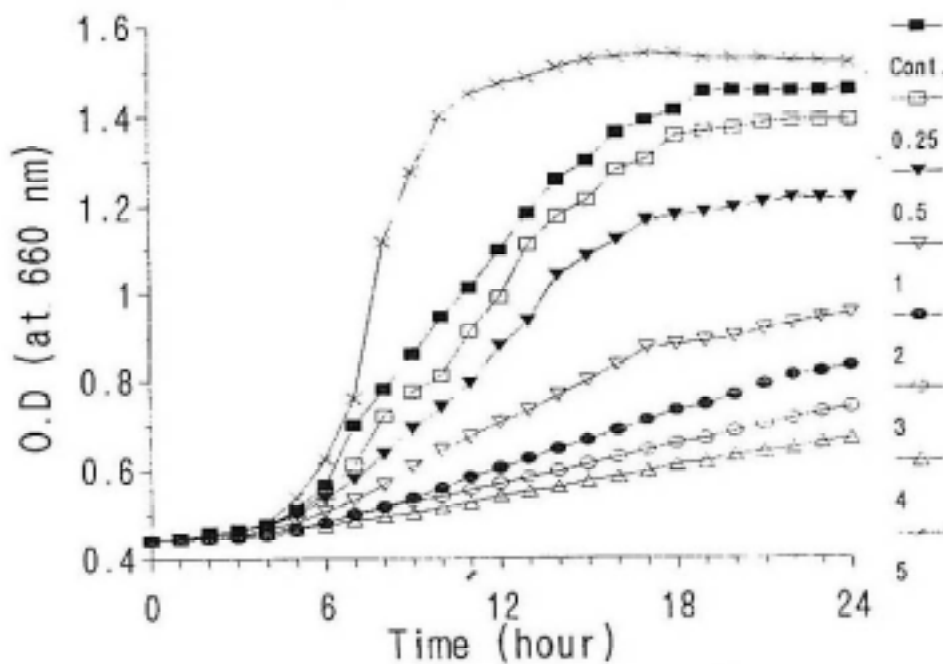


Fig. 9. Effect of propionic acid on growth of *L. monocytogenes* isolates at 35°C

3) Dehydroacetic acid의 영향

Dehydroacetic acid에 대한 분리균의 억제효과는 Fig. 10과 같이 1.5%의 농도에서 전혀 증식하지 못하였고, 대조군과 비교하여 볼 때 1%의 농도에서 배양 24시간째에 O.D 0.7이하의 흡광도를 나타내어 강한 억제효과를 관찰할 수 있었다. 0.125 및 0.25%의 첨가농도에서는 대조군의 성장곡선과 유사한 기울기를 나타내어 억제효과가 아주 미약하였다.

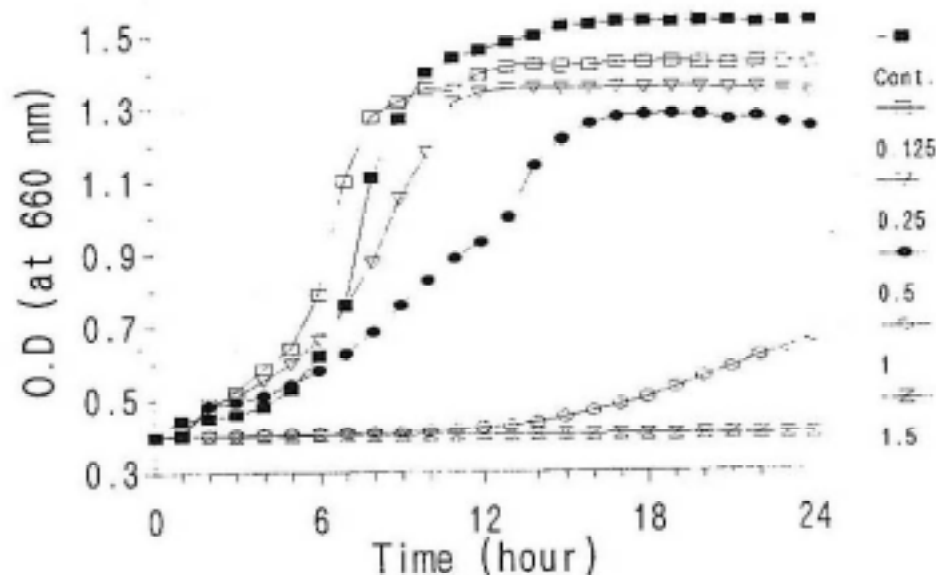


Fig. 10. Effect of dehydroacetic acid on growth of *L. monocytogenes* isolates at 35°C

Sorbic acid는 주로 dehydrogenase 효소계를 억제함으로써 mold의 성장을 저하시키고⁴²⁾, 인체에 대한 위험성이 적기때문에 식품에서의 화학보존제로서 많이 사용되며, 가공식품에 첨가되는량은 일반적으로 식품 1kg에 대하여 2g이하로 권장하고 있다³⁶⁾. 그러나 본 연구에서는 식품에 첨가되는 일반적인 농도보다 약 25배의 농도에서도 분리균의 증식이 인정되어 El-shenawy와 Marth⁴³⁾의 tryptic soy broth에서 sorbic acid의 세균발육 억제효과에 대한 결과와 상이하였다.

Sorbic acid는 균수가 많은 경우, 균에 의하여 대사가 되어지기 때문에 균의 증식을 억제시키지 못한다고 한다⁴²⁾. 본 연구에서 높은 농도의 sorbic acid에서도 균이 증식된 것은 실험에 이용된 균수의 영향도 있었을 것으로 사료되어 이에 관한 추가연구가 필요하다고 생각된다.

Dehydroacetic acid는 치즈, 버터 및 마아가린 등의 식품에 사용되는 보존료로서 부패균이나, 병원균의 구별없이 고르게 작용하여 항균력을 나타내며, 곰팡이나 효모보다 세균에 있어서 더 강한 항균력을 나타낸다⁴⁴⁾. 본 연구에서 1.5%의 dehydroacetic acid 농도에서 *L. monocytogenes* 분리균의 성장을 완전하게 억제하였으며,

1.5% 이하의 농도에서도 어느정도 균의 성장이 억제되어 sorbic acid 보다 높은 억제효과를 나타내었다.

빵류, 생과자 및 치즈 등의 식품에 보존료로써 사용되는 propionic acid는 세균에 대하여 항균력을 발휘하지만 효모에는 거의 작용하지 않는다⁴⁴⁾. Propionic acid는 유가공품중 유일하게 치즈에 사용이 허용되며, 최근 치즈에서 *L. monocytogenes*의 분리사례가 빈번하기 때문에 본 균에 대한 propionic acid의 억제효과에 관한 연구가 절실히 요구되고 있다. 본 연구에서 이에 관한 연구결과 2~5% 농도에서는 *L. monocytogenes*의 억제효과를 다소 나타내었으나, 0.25 및 0.5%에서는 아주 미약한 억제효과를 나타내었다.

위에서 열거한 바와 같이 본 시험에 공시한 3종류의 보존료를 각각 단독으로 사용하여 *L. monocytogenes*에 대한 억제효과 정도를 보고한 경우는 드물며, 본 연구의 결과 dehydroacetic acid, propionic acid 및 sorbic acid의 순으로 높은 억제효과를 나타내었다. 이와 같은 보존료들은 주로 산형보존료이기 때문에 산성의 조건에서 더욱 확실한 정균효과를 나타낸다. 본 논문에서 사용한 보존료 첨가배지의 최종 pH는 7.6이었으며, 시험이 종료되는 시점의 최종 pH는 보존료의 종류와 농도 및 균 발육의 정도에 따라 달랐다(결과 미제시). 따라서 식품가공에 있어서 *L. monocytogenes*의 성장억제효과를 위하여는 이와 같은 사항을 달리하였을때의 최적조건을 선택하는 것이 무엇보다 중요할 것으로 사료된다.

4) Sodium nitrite(NaNO_2)의 영향

L. monocytogenes 분리균의 NaNO_2 에 대한 억제효과와 결과는 Fig. 11과 같다. 1.5%의 첨가농도에서는 균의 발육이 완전히 억제되었고, 1%의 농도에서는 배양 15시간에 O.D 0.8의 최고성장을 나타내었으며, 배양이 종료되는 시간까지 이 수준을 유지하여 억제효과가 우수하였다. 본 시험구에서 대조군의 배양 11시간부터 O.D 1.5이상의 발육을 하였으나, 0.5, 0.25 및 0.125%의 농도 모두 전 배양시간에 걸쳐 O.D 1.2 이하의 발육을 나타내어 미약한 억제효과를 보였다.

NaNO_2 는 육류에서 myoglobin과 hemoglobin이 공기중의 산소에 의한 산화작용으로

나타나는 갈변을 방지하여 육색을 안정하게 유지시키거나 선명하게 하는 발색제로 많이 이용되며, 비교적 특성이 강하여 사용 기준이 규정되어 있고 WHO에서는 어린이용 식품에는 첨가를 삼가도록 권고하고 있다⁴¹. 또한 많은 연구자들에 의해 세균의 억제효과가 입증되어⁴⁵⁻⁴⁷, 발색효과 및 세균억제의 목적으로 식육가공품 등에 첨가하고 있다. 특히 Shahamat 등⁴⁵은 냉장온도에서 pH 5.5 이하와 NaCl 3.0% 이상의 조건일 경우 NaNO_2 는 *L. monocytogenes*를 억제한다고 하였고, Buchanan 등⁴⁶은 온도, pH, NaCl 등을 포함한 여러조건들과 병행할 때 억제한다고 하였다. 본 연구에서는 선행연구자들의 실험조건과는 다소 차이가 있는 방법이었지만, NaNO_2 를 단독으로 사용할 경우 0.125~1.5%의 농도에서 *L. monocytogenes*의 억제효과를 관찰한 결과 1.5% 및 1%의 농도에서 높은 억제효과를 확인할 수 있었고, 0.125~0.5%의 농도에서 미약한 정도나마 억제효과를 관찰할 수 있었다.

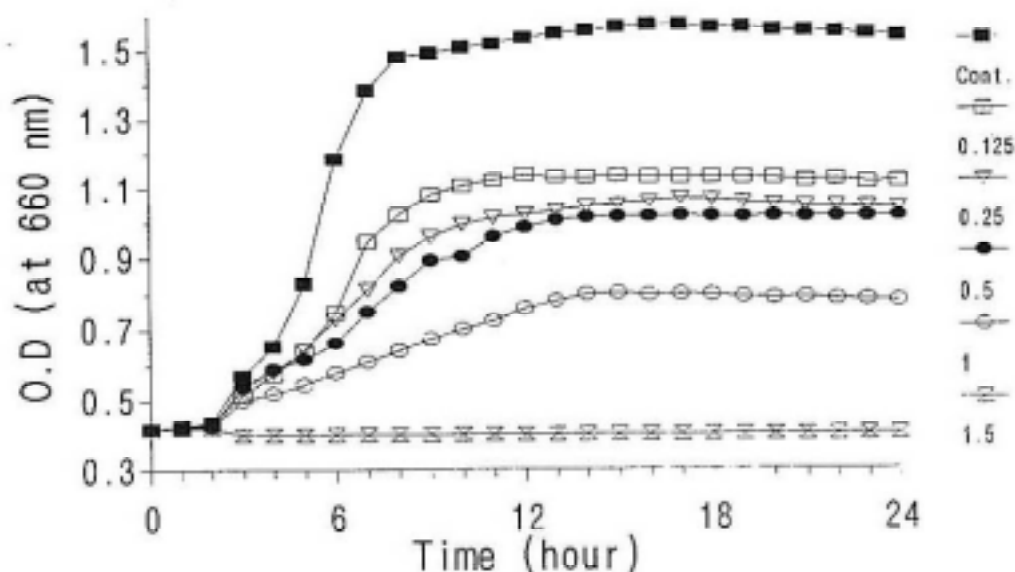


Fig. 11. Effect of sodium nitrite on growth of *L. monocytogenes* isolates at 35°C.

5) Sodium chloride의 영향

분리한 *L. monocytogenes*의 NaCl에 대한 억제효과 결과는 Fig. 12와 같이 대조군에 비하여 공시한 모든 농도에서 억제효과가 인정되었다. 특히 대조군에서는 배양 4시간경에 대수증식기가 시작되었으며, 배양 24시간의 O.D는 1.5 이상을 나타내었으나, 8%, 9% 및 10% NaCl의 농도에서 대수증식기는 모두 배양 12시간 이후로 지연되었으며, 배양 24시간의 O.D는 각각 1.2, 0.83 및 0.56으로 나타나 높은 억제효과를 보였다.

그러나 이들 세농도 모두에서 24시간의 배양시간내에 극대기를 형성하지 못하는 성장곡선을 보여 저항성을 나타내었으며, 24시간의 배양이후에도 계속 증식이 이루어질 것으로 추측되었다. 한편, 3, 4, 5 및 6%의 농도에서는 농도가 높아질수록 대수증식기가 조금씩 지연되는 것 이외에는 각 농도에 따른 억제효과가 유사하였다.

NaCl은 식품에 있어서 가장 광범위하고 빈번히 사용되는 성분중의 하나이며, 식품에서의 이용목적은 수없이 많다. 그러나 식품위생학적인 측면에서 NaCl의 사용은 식품중의 세균을 억제시키거나 살균하기 위하여 가장 많이 이용되며, 26.5%의 농도이상에서 세균, 효모, 곰팡이와 같은 미생물 성장이 완전하게 억제된다. 식품중에 존재하는 NaCl은 미생물에 대하여 탈수작용, Cl⁻의 직접적인 작용, 산소분압의 감소, 여러종류의 효소작용을 방해함으로써 억제작용을 나타낸다⁴³⁾.

Buchanan 등⁴⁴⁾은 0.5%의 NaCl을 100~200 ppm의 NaNO₂와 병행하여 사용하였을 때 *L. monocytogenes*의 억제에 영향을 끼치지 못한다고 하였으며, Junttila 등은 3.0%의 NaCl을 다른 종류의 화학제와 병행하여 실험한 결과 *L. monocytogenes*를 억제한다고 하였다.

본 연구에서는 이들 연구자들과의 실험방법은 다르지만 0.5%의 NaCl 농도에서 분리균의 성장을 전혀 억제하지 못하였고(결과 미제시), 3%의 농도에서는 미약한 억제작용을 나타내어 NaCl에 대한 억제작용만을 비교할 경우 유사한 결과라고 인정할 수 있었다. 또한 10%의 NaCl 농도에서 분리균에 대한 억제작용이 나타났으나, 절차로 증식되어 Shahamat 등⁴⁵⁾과 McClure 등⁴⁶⁾이 NaCl을 단독으로 사용할 경우 고농도에서도 *L. monocytogenes*의 저항성이 강하다고 한 결과와 일치하였다.

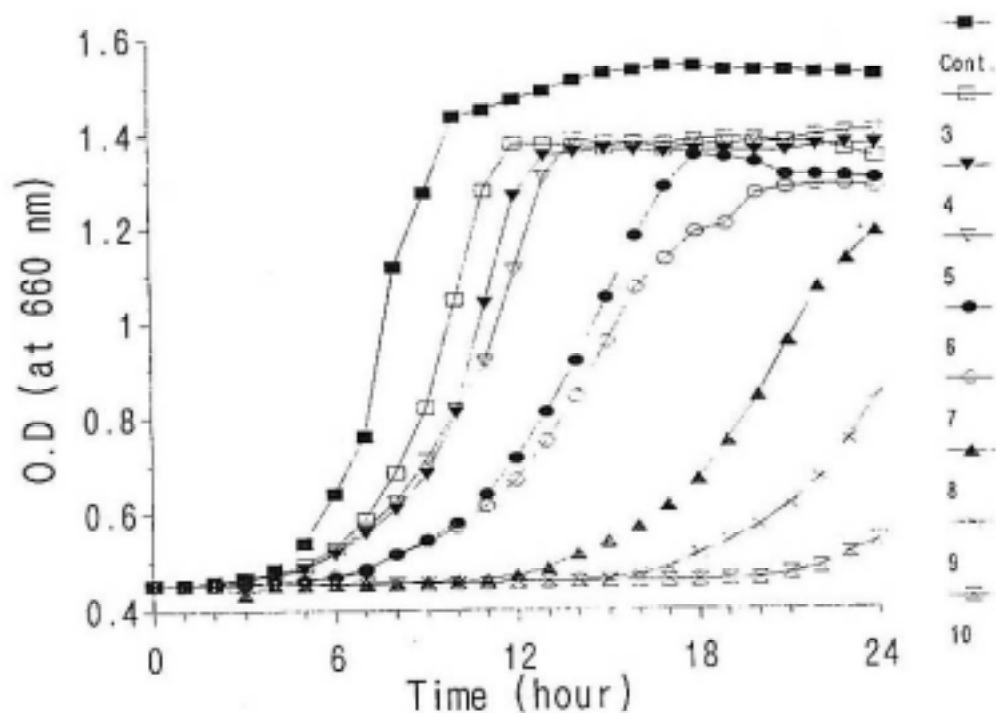


Fig. 12. Effect of sodium chloride on growth of *L. monocytogenes* isolates at 35°C.

IV. 결 론

리스테리아병에 대한 역학적 연구의 일환으로 시중 유통식품중 냉동 및 냉장식품 189건을 대상으로 *Listeria monocytogenes*의 분포와 분리균의 생화학적 특성을 조사하고 온도, pH, sorbic acid, propionic acid, dehydroacetic acid, sodium nitrite 및 sodium chloride 등과 같은 여러종류의 물리·화학적제에 대한 분리균의 성장특성을 확인한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 유통중인 냉동 및 냉장식품 189건중 9건의 시료에서 *Listeria* 속균이 분리되어 분포율은 11.1%이었다. 균종별 분리율은 *L. grayi* 및 *L. innocua*가 각각 6건(3.2%)의 시료에 분포하였으며, 1건(0.5%)의 시료에서 *L. welshimeri*가 분리되었다.

*L. monocytogenes*는 4건의 시료에서 분리되어 2.1%의 분포율을 나타내었다. 식품군별 분포율은 냉동식품 84건중 *L. grayi* 및 *L. monocytogenes*가 각각 2건(2.4%)의 시료에서, 3건(3.6%)의 시료에서 *L. innocua*가 분리되었으며, 냉장식품 105건중 *L. grayi*, *L. innocua*, *L. welshimeri* 및 *L. monocytogenes* 등이 각각 4건(3.8%), 3건(2.9%), 1건(0.5%) 및 2건(1.9%)의 시료에서 분리되었다.

2. 분리균 *Listeria* 속균 모두 glucose, esculin, D-arabitol 등의 탄수화물 분해시험, α -mannosidase, α -methyl-D-glucoside, 4°C에서의 발육, MR, VP, catalase 및 운동성 시험에서 양성 반응을 보였으나, glucose-1-phosphate, indole, urease, nitrate 환원시험 및 oxidase 시험에서 분리균 모두 음성반응을 나타내었다. 또한 *L. monocytogenes*를 제외한 분리균 모두 혈액천천배지에서 β -용혈을 나타내지 못하였으며, *Staphylococcus aureus*와의 CAMP 시험에서 음성반응을 나타내었다.
3. 분리된 *Listeria* 속균 모두 nitrofurantoin을 제외한 대부분의 약제에 대하여 높은 감수성을 나타내었다. 균종별로 보면 *L. grayi* 6주는 NF, TM 및 SM, *L. innocua* 6주는 NF 및 SM, *L. welshimeri* 1주는 SM 이외의 전 공시약제에 대하여 감수성을 나타내었으며, 4주의 *L. monocytogenes*는 NF를 제외한 전 공시약제에 대하여 감수성을 나타내었다.
4. 분리한 *L. monocytogenes*로부터 plasmid 추출하여 유형을 확인한 결과 4주의 분리균중 1주만이 48 kD의 분자량을 갖는 plasmid를 보유하고 있었다. 또한 분리된 4균주의 *L. monocytogenes*의 혈청형은 serotype 1이 3주 및 type 4가 1주로 형별되었다.
5. 분리된 *L. monocytogenes*를 냉장온도인 4°C에서 일주일간 배양한 결과 배양 48시간부터 대수증식기가 시작되었고, 배양 96시간경에서는 상온에서 배양한 결과와 유사한 혼탁도의 증식을 보였다. 10°C의 온도에서는 배양 8시간부터 대수증식기가 시작되었으며, 24시간 경과후에는 O.D 0.6이상의 높은 혼탁도를 나타내었다. 20, 30, 40°C에서는 아주 빠른 증식곡선을 나타내었으며, 저온에서의 증식곡선보다 배양온도가 높아짐에 따라 대수증식기의 시기가 빨라지는 경향을 나타내었다.

6. *L. monocytogenes*는 pH 4.0 및 11.0에서 성장이 인정되지 않았고, pH 5.0~10.0의 범위에서는 성장이 인정되었다. 배양후 8시간까지는 pH 8.0에서 최적의 성장을 나타내었으나, 그이후에는 pH 9.0에서 최적의 성장을 나타내었다. pH 10.0에서 12시간 배양후부터는 pH 7.0에서의 성장보다 높은 혼탁도를 나타내어 알카리의 조건에서 저항성을 나타내는 특성을 보였다.
7. Sorbic acid의 *L. monocytogenes*에 대한 작용은 5% 농도에서 24시간 배양 동안 0.7이하의 흡광도값을 나타내어 강한 억제효과를 나타내었으나, 0.5% 농도에서는 아주 미약하였고, 1, 2 및 3%의 농도에서는 다소의 억제효과를, 4%의 농도에서는 24시간 배양 동안 0.9 이하의 흡광도값을 나타내어 다소 강한 억제효과를 확인할 수 있었다.
8. Propionic acid의 *L. monocytogenes*에 대한 작용은 2~5%의 농도에서 O.D 1.0이하의 흡광도를 나타내어 억제효과를 다소 인정할 수 있었다. 그러나 0.25 및 0.5%의 농도에서는 배양 13시간 이후부터 O.D 1.0 이상을 나타내어 억제효과가 다소 미약하였다.
9. Dehydroacetic acid는 1.5%의 농도에서 *L. monocytogenes*를 전혀 증식하지 못하게 억제하였고, 1%의 농도에서 배양 24시간에 O.D 0.7 이하의 혼탁도를 나타내어 강한 억제효과를 관찰할 수 있었다. 0.125 및 0.25%의 농도에서는 대조군의 성장곡선과 유사한 기울기를 나타내어 억제효과가 아주 미약하였다.
10. Sodium nitrite의 *L. monocytogenes*에 대한 작용은 1.5%의 농도에서 증식을 전혀 확인할 수 없었으며, 1% 농도에서도 전 배양시간에 걸쳐 O.D 0.8 이하를 나타내어 다소의 억제효과를 인정할 수 있었다. 0.125, 0.25 및 0.5%의 sodium nitrite 농도에서 분리균의 흡광도는 모두 O.D 1.2 이하의 흡광도를 나타내어 다소 미약한 억제효과가 인정되었다.
11. Sodium chloride의 *L. monocytogenes*에 대한 작용은 3~10%의 농도에서 모두 증식은 인정되었으나, 8% 이상의 첨가농도에서는 발육억제 정도가 뚜렷하였고,

10% 농도에서는 배양 21시간 이후부터 증식이 인정되어 높은 억제효과를 나타내었다. 공시한 모든 농도에서 대조구보다 낮은 흡광도값을 보였고, NaCl의 농도가 높을수록 대수증식기가 지연되어 나타났으나 3~6%의 농도에서는 배양 16시간 이후부터 1.0이상의 흡광도를 나타내어 억제정도가 미약하였다.

V. 참고문헌

1. Fleming, D.W., Cochi, S.L., Macdonald, K.L., Brondum, J., Hayes, P.S., Plikaytis, B.W., Holmes, M.B., Audurier, A., Broome, C.V. and Reingold, A.L., 1985, Pasteurized milk as vehicle of infection in an outbreak of listeriosis, *New Engl. J. Med.*, 312, 404-407.
2. Linnan, M.J., Mascola, L., Lou, X.D., Goulet, V., May, S., Salminen, C., Hird, D.W., Yonekura, K.L., Hayes, P., Weaver, R., Audurier, A., Plikaytis, B.D., Fannin, S.L., Aleks, A. and Broome, C.V., 1988, Epidemic listeriosis associated with mexicanstyle cheese, *New Engl. J. Med.*, 319, 823-828.
3. WHO, 1988, Foodborne listeriosis, *Document No. WHO/WHE/FOS/88 · 5. World health organization, Geneva, Switzerland.*
4. U.S. FDA and Milk, Ind. Found. Int. Ice Cream Assoc., 1988, Recommended guidelines for controlling environmental contamination in dairy plants, *Dairy Food Sanit.*, 8, 52-56.
5. Gellin, B.G., Broome, C.V. and Hightower, A.W., 1987, Geographic differences in listeriosis in the united states, *Abstracts of the 27th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* New York, Oct 5.
6. Ho, J.L., Shands, K.N., Friedland, G., Eckind, P. and Fraser, D.W., 1986, An outbreak of type 4b *Listeria monocytogenes* infection involving patients from eight Boston

- hospital, *Arc. Intern. Med.*, 146, 520-524.
7. Shelf, L.A., 1989, Listeriosis and its transmission by food, *Prog. Food. Nutri. Sci.*, 13, 363-382.
 8. Brackett, R.E., 1988, Presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in food and water, *Food Technol.*, 42, 162-164.
 9. Murray, E.G.D., Webb, R. and Swann, M.B.R., 1926, A disease of rabbits characterized by large mononuclear leucocytosis caused by a hitherto undescribed *Bacillus Bacterium monocytogenes* (n.sp), *J. Path Bact.*, 29, 407-439.
 10. Anonymous. 1987. *Listeriosis warning from Switzerland. Newsletter No 14.* Institute of Veterinary Medicine-Robert von Ostertag-Institute, Berlin, 1987.
 11. Seeliger, H.P.R. and Finger, H., 1983, In Remington J.S. and Klein, J.O.(eds.) : *Infectious disease of the fetus and newborn infant*, 2nd ed., W.B. Saunders, Philadelphia.
 12. Seeliger, H.P.R. and Jones, D., 1987, *Listeria.* In *Bergey's manual of bacteriology*, 9th ed., vol.2. Williams and Wilkins, Baltimore, pp.1235-1245.
 13. CDC, 1985, Listeriosis outbreak associated with Mexican-style Cheese-California, *Morbidity and Mortality Weekly Rept.* 34, 357-359.
 14. Kampelmacher, E.H., 1990, Foodborn listeriosis facts and fiction. In *Foodborne Listeriosis*, Proceedings of a symposium, Wiesbaden, FRG. Technomic Pub. Co. Inc. Lancaster, Basel.
 15. Weis, J. and Seeliger, H.P.R., 1975, Incidence of *L. monocytogenes* in nature, *Appl. Microbiol.*, 30, 29-33.
 16. Alexander, M., 1977, *Introduction to soil microbiology*, John Wiley & Sons Inc., New York.

17. 정동관, 1993, 생육과 육가공제품의 식중독균 *Listeria*의 오염과 그 문제점, 한국식육연구회지, 13, 11-25.
18. 정동관, 1993, 식중독균 *Listeria monocytogenes*의 특성과 식품에서의 문제점, *Korea J. of Food Hygiene*, 8, S1-S11.
19. Anonymous, 1979, *Australian standard methods for the microbiological examination of food*. AS 1766, 3, 2, Standards Association of Australia.
20. Lovett, J., Francis, D.W. and Hunt, J.M., 1987, *Listeria monocytogenes* in raw milk : detection, incidence and pathogenicity, *J. Food Prot.*, 50, 188-192.
21. Farber, L.M., Sanders, G.W. and Johnston, M.A., 1989, A survey of various foods for the presence of *Listeria* species, *J. Food Prot.*, 52, 456-458.
22. Lee, W.H. and McClain, D. 1987. *Personal communication*. Food Safety and Infection service, U.S. Dept. of Agriculture, Belisville, Md.
23. D'Errico, M.M. 1990. Isolation of *Listeria* spp. from milk and cheese. *Dairy Science Abstracts*, 52 : 929.
24. Doyle, M.P. and Schoeni, J.L. 1987. Comparison of procedures of isolation of *Listeria monocytogenes* in soft, surface-ripened cheese. *J. Food Prot.* 50 : 4.
25. Curtt, M.P. and Catherine, W.D., 1990, Incidence of *Listeria monocytogenes* in silage and its subsequent control by specific and nonspecific antagonism. *J. Food Prot.*, 53, 642.
26. 식품공전, 1997, 한국식품공업협회.
27. Lovett, J., 1988, Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes*, *Food Technol. Overview*, pp. 165-168.

28. U.S. Department of Agriculture, Food Safety Inspection Service, 1989, Method for the isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from meat and poultry product, Laboratory Communication No. 57. U.S. Department of Agriculture Washington, DC.
29. Lovett, J., 1988, Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes*, *Food Technol., Overview*. pp. 165-168.
30. Edwin, H.L., 1991, *Manual of clinical microbiology*, 5th ed., American society for microbiology, Washington, DC., pp. 1105-1125.
31. NCCL, 1993, *Performances standards for antimicrobial disk susceptibility test*, 5th ed., M2-M5, 13.
32. Kado, C.I. and Liu, S.T., 1981, Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids, *J. Bacteriol.*, 45, 1367.
33. Tiwari, N.P. and Aldenrath, S.G., 1990, Occurrence of *Listeria* species in food and environmental samples in Alberta, *Canadian Institute of Food Sci. Technol.*, 23, 109.
34. Lovett, J., 1987, *Listeria* isolation, In Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual, 6th ed. Spplemented 9/87. *Assoc. Offi. Anal. Chem.* Arlington, VA.
35. Seeliger, H.O.R. and Jones, D., 1984, Genus *Listeria*, pp. 1235-1245, in : Sneath, P. H. A. et al(ed), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol 2. The Williams and Wilkins Co. Baltimore.
36. Wrong, H.C., Chao, W.L. and Lee, S.J., 1990, Incidence and characterization of *Listeria monocytogenes* in food available in Taiwan, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 3101-3104.

37. 강호조, 손원근, 강광식, 박종일, 1991, 동물유래 생식품, 사료 및 동물분변중 *Listeria monocytogenes*의 분포와 분리균의 특성에 관한 연구1. 원유, 우유, 계육 및 동물분변에서 *Listeria monocytogenes*의 분포, 한국수의공중보건학회지, 15, 231-237.
38. 손원근, 강호조, 1991, 도축장유래 닭고기와 부산물 및 환경재료에서 *Listeria spp.*의 분리 및 분리균의 특성, 경상대학교 석사학위논문.
39. Donnelly, C.W., Briggs, E.H. and Donnelly, L.S., 1987, Comparison of heat resistance of *Listeria monocytogenes* in milk as determined by two method, *J. Food Prot.*, 50, 14-17.
40. Dallmier, A.W. and Martin, S.E., 1988, Catalase and superoxide dismutase activities heat injury of *Listeria monocytogenes*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 581-585.
41. Conner, D.E., Brackett, R.E. and Beuchat, L.R., 1986, Effect of temperature, sodium chloride and pH on growth of *Listeria monocytogenes* in cabbage juice, *Appl. Environ. Microbiol.*, 52, 59-63.
42. Norman, W.D., 1977, The technology of food preservation. In *principles of chemical preservation of food*, 4th ed. pp. 377-411. AVI Publishing Company, Inc.
43. El-shenawy, M.A. and Marth, E.H., 1988, Inhibition or inactivation of *Listeria monocytogenes* by sorbic acid, *J. Food. Prot.*, 51, 842-847.
44. 장지현, 문범수, 김교창, 1986, 식품위생학, 수학사, pp. 221-269.
45. Shahamat, M., Seaman, A. and Woodbine, M., 1980, Influence of sodium chloride, pH and temperature on the inhibitory activity of sodium nitrite on *Listeria monocytogenes*, In G.W. Gould and J.E.L. Corry. (Eds.), *Microbial growth and survival in extremes of environment*. Academic Press. New York, NY. pp. 227-237.

46. Buchanan, R.L., Stahl, H.G. and Whiting, R.C., 1989, Effects of interactions of temperature, pH, atmosphere, sodium chloride and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*, *J. Food Protect.*, 52, 844-851.
47. Tompkin, R.B., 1983, Nitrite. In A.L. Branen and P.M. Davidson, (Eds.), *Antimicrobials in Foods*. Marcel Dekker. New York, NY. pp. 205-256.
48. McClure, P.J., Roberts, T.A and Otto Oguru, P., 1989, Comparison of the effects of sodium chloride, pH and temperature on the growth of *Listeria monocytogenes* on gradient plates and in liquid medium, *Lett. Appl. Microbiol.*, 9, 95-99.