

식품안전 미생물 교육



일시 : 2014.04.28(월) ~ 29(화) 9:00~18:00

장소 : 서울대학교 농업생명과학대학

- 이론 교육 (203동 201호)
- 실습 교육 (200동 1040호)

주최 : 서울대학교 식품바이오융합연구소

주관 부서 : 서울대학교 식품안전성 및 독성연구센터, 서울대학교 식품안전위생교육센터

Contents

■ Program	(3)
■ 강의자료	(6)
■ 실습노트	(142)
- 지표균 검출실험 (정량실험)	(137)
☞ 선택배지 제작	
☞ 손/도구표면의 미생물 실험	
☞ 식품의 미생물 실험	
☞ 공기의 미생물 실험	
- API test : 미생물(unknown균) 동정실험	
- 병원성균 검출 실험(정성실험)	
☞ <i>Listeria monocytogenes</i>	
☞ <i>Salmonella</i> spp.	
☞ <i>E. coli</i> O157:H7	
☞ <i>Staphylococcus aureus</i>	
☞ <i>Bacillus cereus</i>	
- Real Time PCR	

Program

Program

▣ 일 시 : 2014년 04월 28일(월) ~ 29일(화) / 9:00 ~ 18:00

▣ 장 소 : 서울대학교 농업생명과학대학
 - 이론 교육 (203동 201호 - 세미나실)
 - 실습 교육 (200동 1040호 - 식품위생학실)

▣ 세부일정

- 4월 28일 (월)

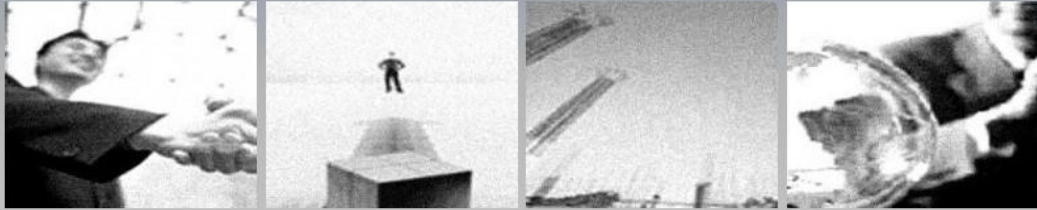
교육시간	교육내용	교육자
9:00~9:30	- 교육 접수 및 등록	강동현교수님 (서울대학교)
9:30~10:00	- 개회사 및 식품안전위생의 필요성	
10:00~12:30	- 병원성 미생물 특징	
12:30~14:00	- 점심시간	
14:00~17:40	- 식중독 균 저감화 방법 ☞최신 열처리 방법 ☞최신 비열처리 방법 ☞수송·저장 중 저감화 방법 - 지표균 및 병원균 검출 방법 ☞지표균 (정량분석) ☞병원균 (정성분석)	
17:40~18:00	- 교육 정리 및 익일 교육일정 공지	

- 4월 29일 (화)

교육시간	교육내용	교육자
<p>9:00~11:00 (실습 1.)</p>	<p>- 지표균 검출 실험 (정량실험) ☞ 선택배지 제작 ☞ 손/도구표면의 미생물 실험 (Swab test, petrifilm) ☞ 식품의 미생물 실험 (petrifilm) ☞ 공기의 미생물 실험 (Air sampler)</p>	
<p>11:00~12:00 (실습 2.)</p>	<p>- API test : 미생물 (unknown 균) 동정 실험</p>	
<p>12:00~13:00</p>	<p>- 점심시간</p>	
<p>13:00~15:00 (실습 3.)</p>	<p>- 병원균 검출 실험 1. (정성실험 : 증균단계) ☞ <i>Listeria monocytogenes</i> ☞ <i>Salmonella</i> spp. ☞ <i>E. coli</i> O157:H7 ☞ <i>Staphylococcus aureus</i> ☞ <i>Bacillus cereus</i></p>	실습 조교
<p>15:00~16:00 (실습 4.)</p>	<p>- Real Time PCR 실습 ☞ <i>Listeria monocytogenes</i> ☞ <i>Salmonella</i> spp. ☞ <i>E. coli</i> O157:H7 ☞ <i>Staphylococcus aureus</i> ☞ <i>Bacillus cereus</i></p>	
<p>16:00~17:30</p>	<p>- 지표균 검출 (정량분석) 결과 분석</p>	
	<p>- API test 결과 확인 - 병원균 검출 실험 2. (정성실험 : 확인단계) ☞ selective agar test, Latex test - Real Time PCR 결과 확인</p>	
<p>17:30~18:00</p>	<p>- 교육 결과 정리 및 마무리 (설문조사)</p>	

강의자료

식품안전 미생물 교육



2014.04.28 (1일차)

[www. foodsafetyinfo.net](http://www.foodsafetyinfo.net)

주최 : 서울대학교 농업생명과학연구원 / 주관부서 : 서울대학교 식품생명공학 WCU사업단

목차

1. Program 소개
2. 식품안전위생 개론
3. 병원성 미생물 특징
4. 식중독균 저감화 방법
5. 식품미생물 실습
6. 지표균 및 병원균 검출 방법

Program

1일차

교육시간	교육내용	교육자
9:00~9:30	- 교육 접수 및 등록	강동현 교수님 (서울대학교)
9:30~10:00	- 개회사 및 식품안전위생의 필요성	
10:00~12:30	- 병원성 미생물 특징	
12:30~14:00	- 점심시간	
14:00~17:40	- 식중독 균 저감화 방법 ↳최신 열처리 방법 ↳최신 비열처리 방법 ↳수송·저장 중 저감화 방법 - 지표균 및 병원균 검출 방법 ↳지표균 (정량분석) ↳병원균 (정성분석)	
17:40~18:00	- 교육 정리 및 익일 교육일정 공지	

식품안전위생교육센터
www. foodsafetyinfo.net

Program

2일차

교육시간	교육내용	교육자
9:00~9:30 (실습1.)	- API test : 미생물 (unknown균) 동정 실험	실습조교
9:30~11:00 (실습2.)	- 지표균 검출 실험 (정량실험) ↳선택배지 제작 ↳손/도구표면의 미생물 실험 (Swab test, petrifilm) ↳식품의 미생물 실험 (petrifilm) ↳공기의 미생물 실험 (Air sampler)	
11:00~12:00 (실습3.)	- 병원균 검출 실험 1. (정성실험 : 증균단계) ↳Listeria monocytogenes ↳Salmonella spp. ↳E. coli O157:H7 ↳Staphylococcus aureus	
12:00~13:00	점심시간	
9:30~13:00 (실습4.)	- Real Time PCR 실습 ↳Listeria monocytogenes ↳Salmonella spp. ↳E. coli O157:H7 ↳Staphylococcus aureus ↳Bacillus cereus - 지표균 검출 (정량분석) 결과 분석 - API test 결과 확인 - 병원균 검출 실험 2. (정성실험 : 확인단계) ↳selective agar test, Latex test - Real Time PCR 결과 확인	
17:15~17:30	- 교육 결과 정리 및 마무리 (설문조사)	

식품안전위생교육센터
www. foodsafetyinfo.net

실습노트

실습노트

▣ 선택배지 제작

1. 실험목적

균을 선택적으로 배양하기 위한 배지를 제작한다.

2. 준비물

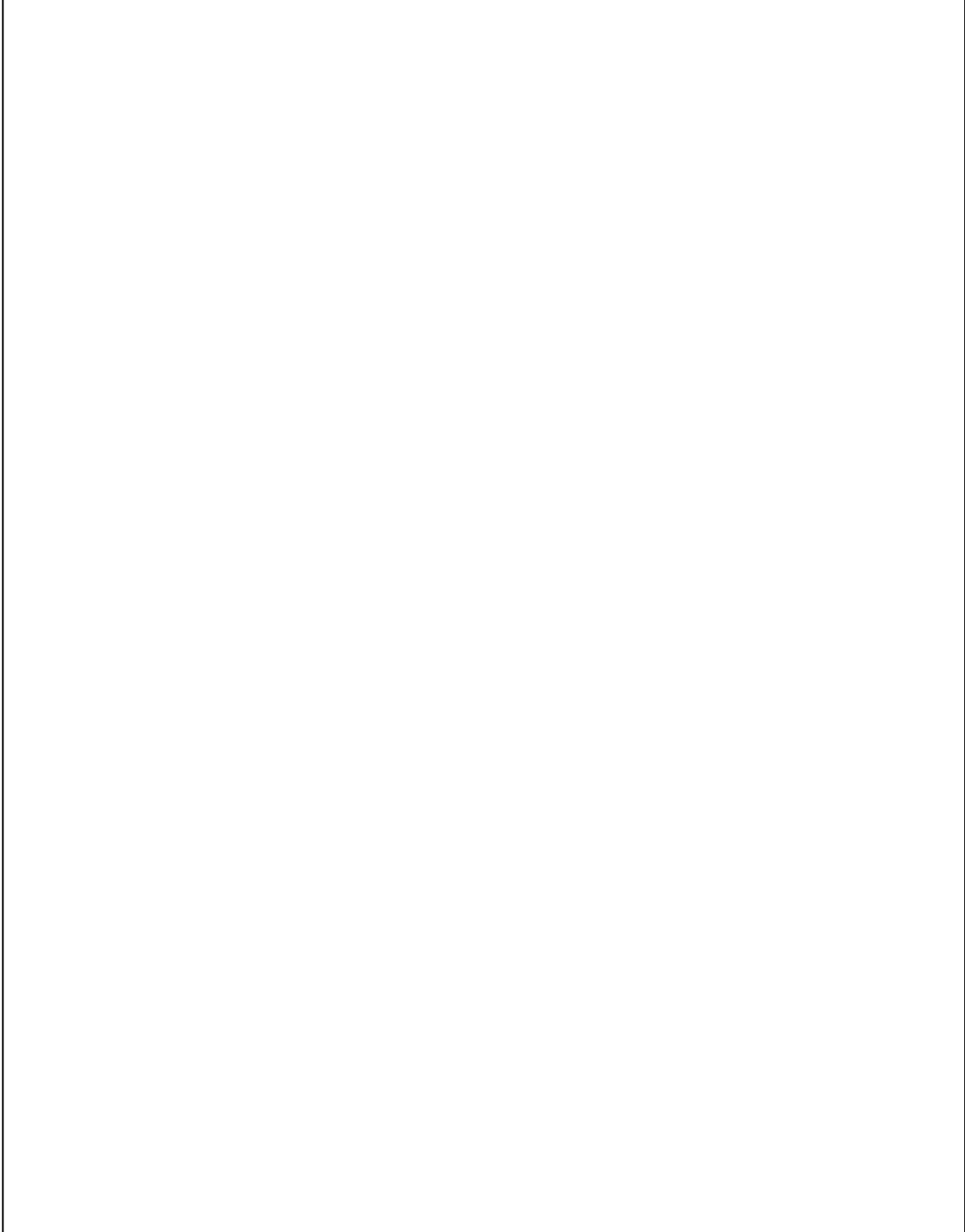
패트리디쉬, 알콜램프, 배지, 1L 삼각플라스크, 증류수, 저울, autoclave

3. 실험방법

1. MacConkey Sorbitol Agar를 증류수 500ml 기준에 맞게 무게를 잰다.
 2. 삼각플라스크에 증류수 500ml 과 배지를 넣는다.
 3. 121°C, 20분 동안 autoclave한다.
 4. 패트리디쉬에 일정량을 담는다.
- 주의 : autoclave 하지 않는 선택배지의 경우 오염되지 않도록 냉장보관을 권장한다.

실습노트

4. 실험결과



실습노트

▣ 지표균 검출 실험 (정량실험)

☞ 손 표면의 미생물 실험

1. 실험목적

손 표면의 미생물적 안전성을 평가하고,
표면의 지표균을 정량 분석하는 방법을 이해하고 실험한다.

2. 준비물

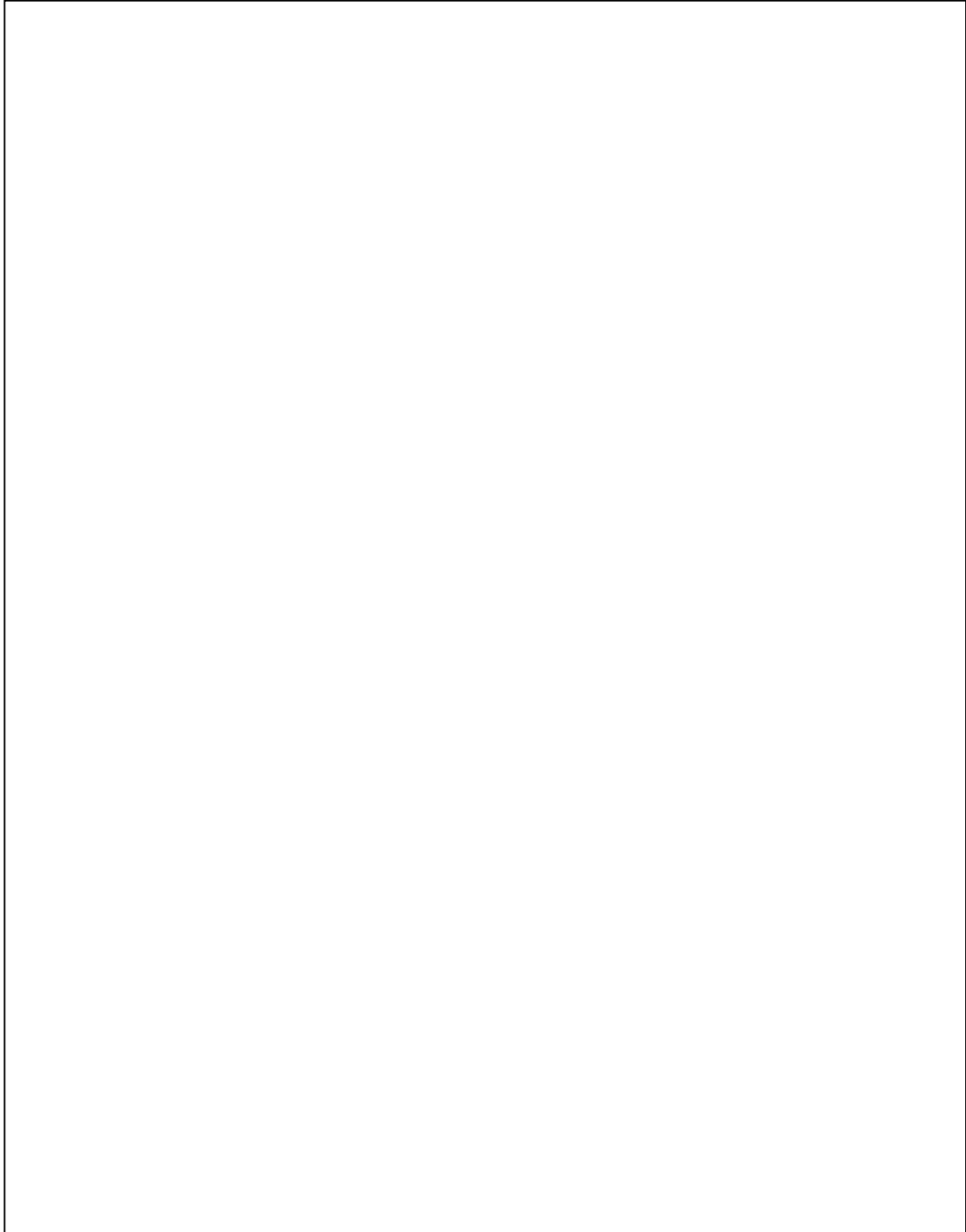
buffer, petrifilm (총균수용, 대장균군/대장균용),
70% 알코올, 비누, swab, pipet, voltex

3. 실험방법

1. 샘플
 - 샘플 1 : 안 씻은 손의 표면
 - 샘플 2 : 씻고 70% 알코올소독한 손의 표면
2. 표면의 10cm X 10cm 를 swab 한다.
3. voltex 로 균질화한다.
4. swab 내 1ml를 9ml buffer에 넣은 후 serial dilution 한다.
5. 각각의 swab 을 petrifilm 에 분주한다.
6. 35°C incubator 에서 24~48 시간 배양한다.
7. 배양 후 결과를 확인한다.

실습노트

4. 실험결과



실습노트

▣ 지표균 검출 실험 (정량실험)

☞ 도구표면의 미생물 실험

1. 실험목적

도구 표면의 미생물적 안전성을 평가하고,
표면의 지표균을 정량 분석하는 방법을 이해하고 실험한다.

2. 준비물

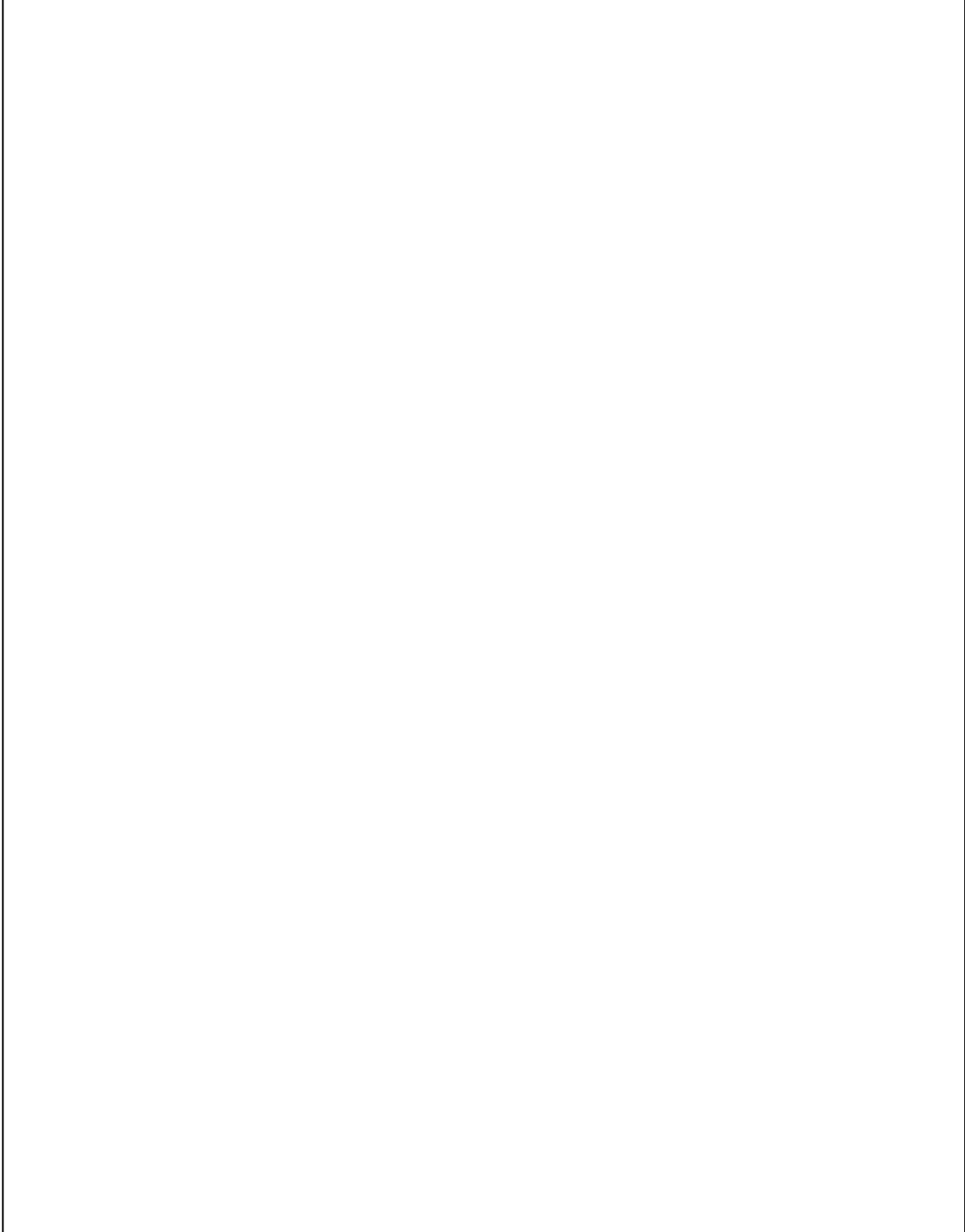
샘플, buffer, swab, petrifilm (총균수용, 대장균군/대장균용),
pipet, voltex

3. 실험방법

1. 샘플 : 도마 및 칼의 표면
2. 표면의 10cm X 10cm 를 swab 한다.
3. voltex 로 균질화한다.
4. swab 내 1ml를 9ml buffer에 넣은 후 serial dilution 한다.
5. 각각의 swab 을 petrifilm 에 분주한다.
6. 35°C incubator 에서 24~48 시간 배양한다.
7. 배양 후 결과를 확인한다.

실습노트

4. 실험결과



실습노트

▣ 지표균 검출 실험 (정량실험)

☞ 식품의 미생물 실험

1. 실험목적

식품(소고기)의 미생물적 안전성을 평가하고,
식품 내 지표균을 정량 분석할 수 있는 방법을 이해하고 실험한다.

2. 준비물

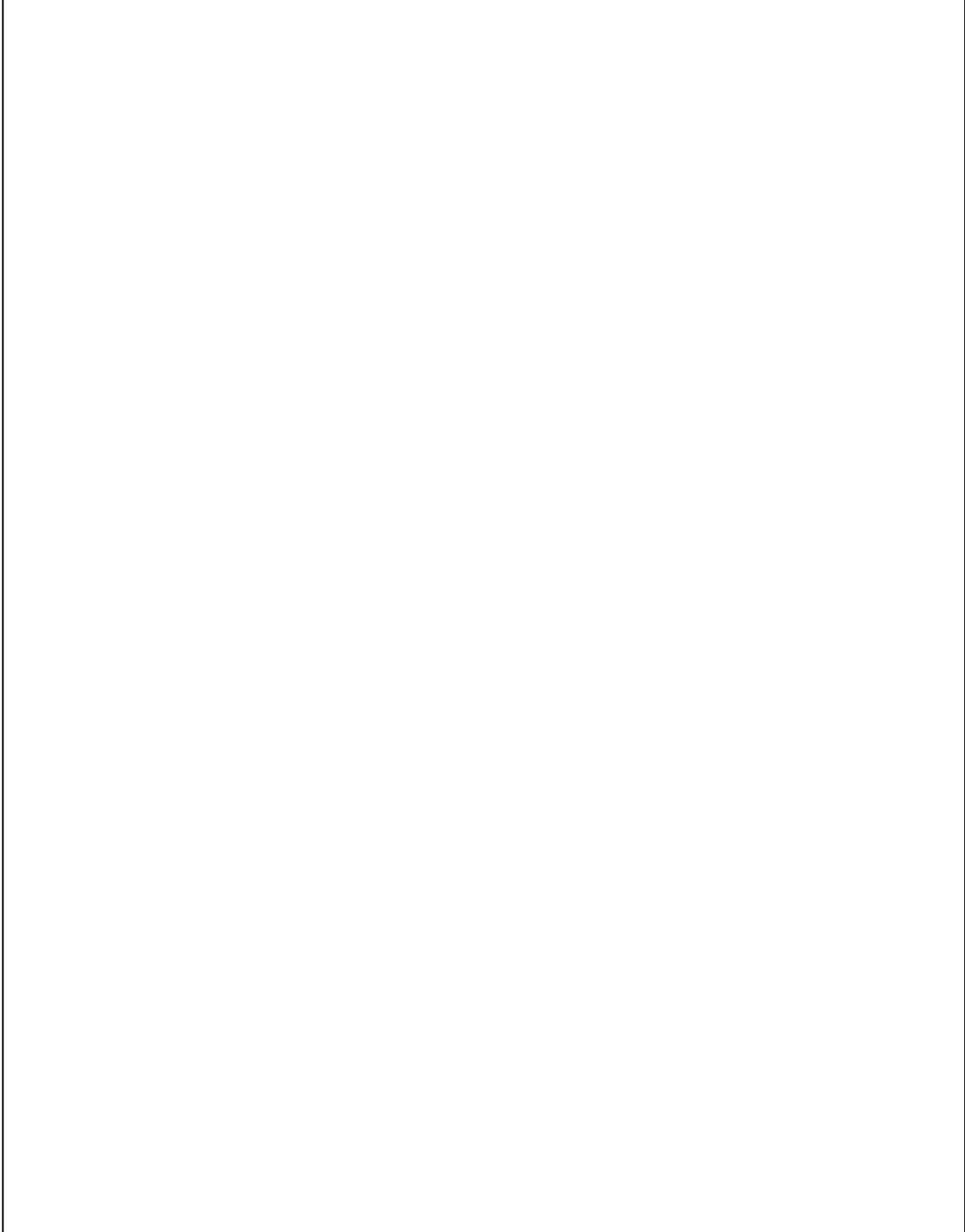
소고기 샘플(25g), buffer, 멸균백, pipet, 저울, voltex,
petrifilm(총균수용, 대장균군/대장균용), homogenizer(stomacher)

3. 실험방법

1. 샘플을 25g 재어 멸균백에 넣는다.
2. 샘플이 담긴 멸균백을 stomacher 에서 2분간 균질화한다.
3. 1ml 을 취하여 9ml buffer(test tube) 에 넣는다.
4. tube를 voltexing 한다.
5. 1ml 을 취하여 serial dilution 한다.
6. 희석된 모든 tube에서 1ml 를 취하여 petrifilm 에 분주한다.
7. 35°C incubator 에서 24~48시간 배양한다.
8. 배양 후 결과를 확인한다.

실습노트

4. 실험결과



실습노트

▣ 지표균 검출 실험 (정량실험)

☞ 공기의 미생물 실험

1. 실험목적

식품생산시설 내의 공기 중에 존재하는 부유균 및 낙하균을 빠르고 정확하게 포집하고 공기 청정도를 평가한다.

2. 준비물

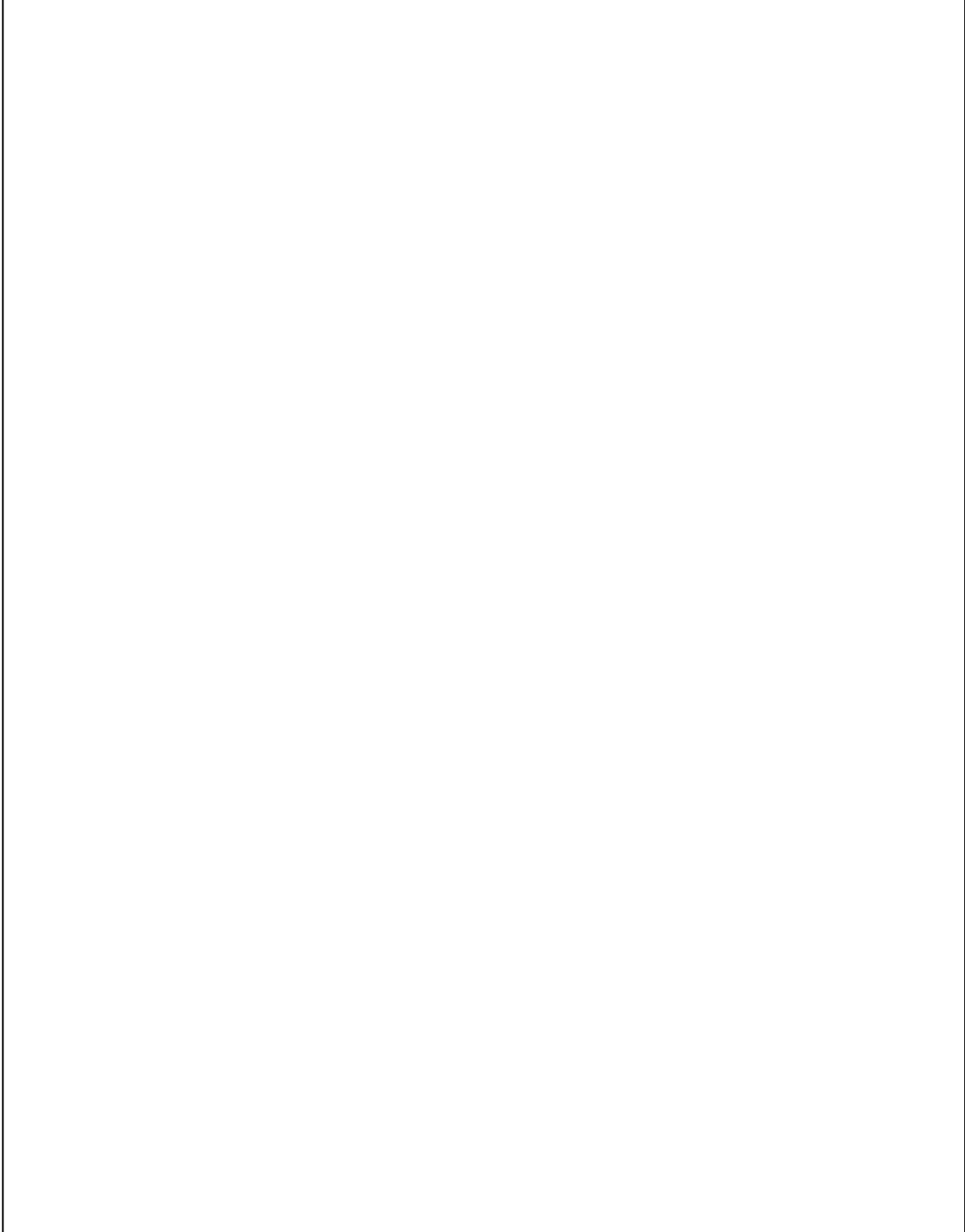
Air sampler, 삼각대, TSA

3. 실험방법

1. 평가하고자 하는 공간에 Air sampler를 설치한다.
2. 부유균채취 : 용량별 (500, 1000 L) 실내공기 sample 채취한다.
낙하균 채취 : TSA배지를 공기중에 노출 (1h) 시킨다.
3. Sample 채취한 배지를 incubator에서 24시간 배양한다.
4. 배지의 균 수를 확인한다.

실습노트

4. 실험결과



실습노트

▣ API test (미생물 (unknown균) 동정 실험)

1. 실험목적

각종 샘플로부터 분리된 장내세균 및 그람 음성간균 (unknown균)을 생화학적 반응 특성을 이용하여 동정한다.

2. 준비물

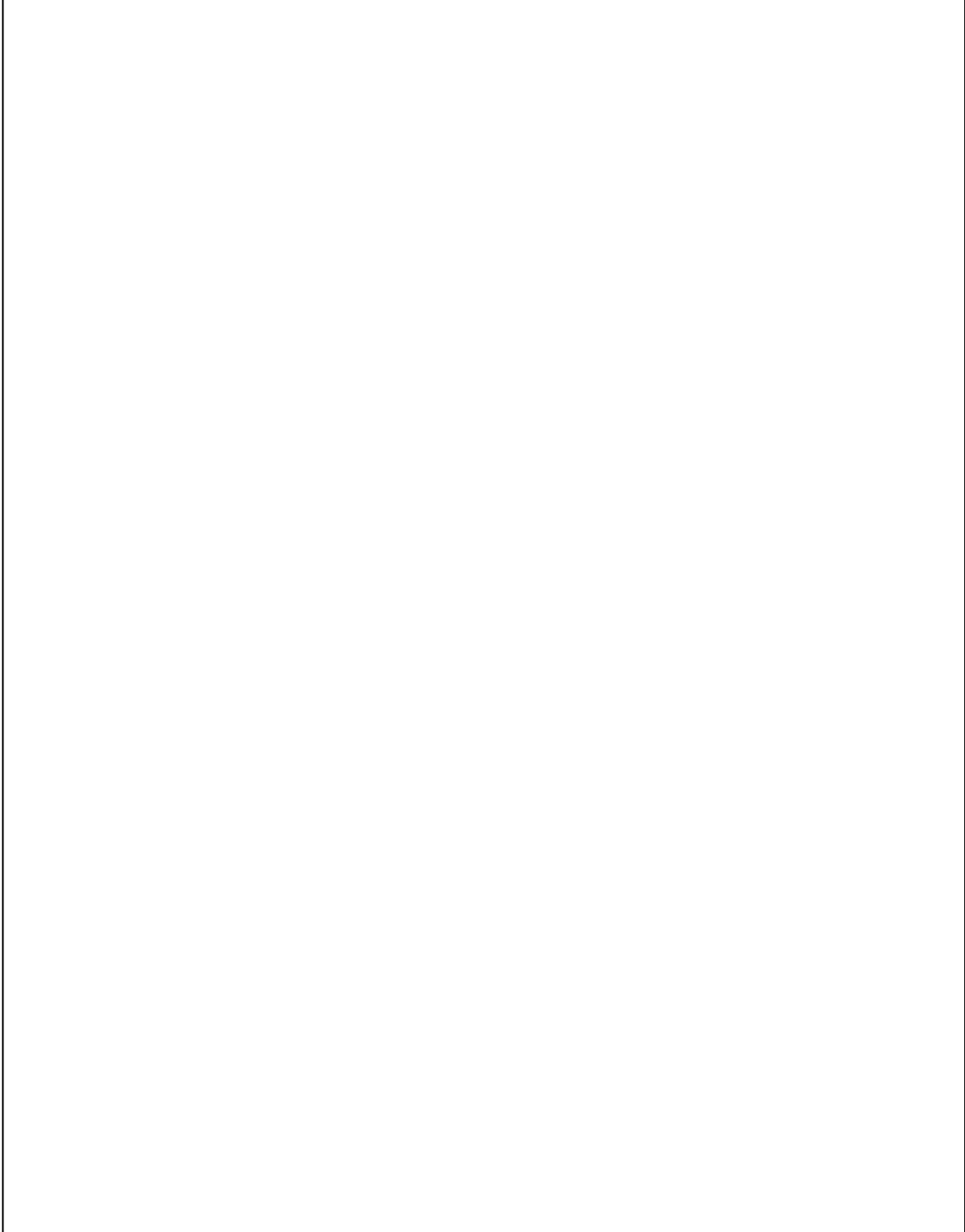
API 20E strip, API suspension medium, Mineral oil, Reagent kit,
배양용 박스, Loop

3. 실험방법

1. 배양용 박스에 약 5ml의 증류수를 부어 준다.
2. 스트립을 올려 놓고 균주 정보를 기록한다.
3. Suspension medium의 앰플을 열고 하나의 colony를 취해 골고루 부유시킨다.
4. CIT, VP, GEL은 큐브까지 균액으로 가득 채운다.
5. ADH, LDC, ODC, H₂S, URE는 혐기적인 조건을 만들어 주기 위해 mineral oil로 큐브를 채운다.
6. 스트립 위에 뚜껑을 덮는다.
7. 호기적인 상태에서 34-38°C, 18-24시간 동안 배양한다.
8. 배양 후 결과를 확인한다.

실습노트

4. 실험결과



실습노트

▣ 병원균 검출 실험 (정성실험)

☞ *Listeria monocytogenes*

1. 실험목적

샘플의 미생물적 안전성을 평가하고,
병원균(*Listeria monocytogenes*)을 정성 분석하는 방법을
이해하고 실험한다.

2. 준비물

sample, LEB(Listeria Enrichment broth), OAB (Oxford Medium Base),
TSA, 멸균백, Loop

3. 실험방법

1. LEB 225ml을 멸균백에 담는다.
2. 샘플 25g을 LEB가 들어있는 멸균백에 담아 37°C, 24시간 동안 배양한다.
4. loop를 이용하여 배양액을 취한 뒤 OAB 배지에 streaking 한다.
5. OAB배지를 37°C, 24-36시간 동안 배양한다.
6. Loop를 이용하여 OAB배지에서 전형적인 colony를 취한 뒤, TSA배지에 접종한다.
7. 접종된 TSA배지를 37°C, 24-36시간 동안 배양한다.
8. TSA의 colony가 *Listeria monocytogenes*가 맞는지 확인한다.
(예 : Real time PCR)

실습노트

4. 식품공전

1. 증균배양

우유, 유제품, 가공식품 및 수산물의 검체에 대해서는 증균배지로 Listeria 증균배지(배지 35)를 사용하고, 식육 및 가금류의 검체는 1차 증균배지로 UVM-modified Listeria 증균배지(배지 36)를 사용한다.

검체 25 g 또는 25 mL를 취하여 225 mL의 Listeria 증균배지(배지 35) 또는 UVM-modified Listeria 증균배지(배지 36)를 가한 후 30°C에서 24±2시간 배양한다. 식육 및 가금류 등의 검체는 배양액 0.1 mL를 취하여 Fraser Listeria 배지(배지 37) 10 mL에 접종하여 35~37°C에서 24±2시간 2차 증균을 실시한다.

2. 분리배양

증균배양액을 멸균된 면봉을 이용하여 Oxford 한천배지(배지 38) 또는 LPM 한천배지(배지 39) 또는 PALCAM 한천배지(배지 65)에 접종하여 30°C에서 24~48시간 배양한다. 의심집락이 확인되면 이를 0.6% yeast extract가 포함된 Tryptic soy 한천배지(배지 40)에 접종하여 30°C에서 24~48시간 배양한다

5. 실험결과

실습노트

▣ 병원균 검출 실험 (정성실험)

☞ *Salmonella* spp.

1. 실험목적

샘플의 미생물적 안전성을 평가하고,
병원균(*Salmonella* spp.)을 정성 분석하는 방법을 이해하고
실험한다.

2. 준비물

sample, BPW(buffer peptone water), XLD, pipet
RV broth (Rappaport-Vassiliadis Broth)

3. 실험방법

1. BPW 225ml을 멸균백에 담는다.
 2. 샘플 25g을 BPW가 들어있는 멸균백에 담아 37°C, 24시간 동안 배양한다.
 4. 배양액 1ml를 pipet으로 취하여 9ml RV broth가 들어있는 시험관에 넣는다.
 5. 배양액이 접종된 시험관을 37°C, 24시간 동안 배양한다.
 6. 시험관의 배양액을 loop로 취하여 XLD배지에 streaking한 후 37°C, 24시간 동안 배양한다.
 7. XLD배지의 전형적인 colony를 loop로 취하여 latex test 한다.
 8. "*Listeria monocytogenes*" 정성실험의 6. ~ 8. 과정과 같다.
-
6. Loop를 이용하여 XLD배지에서 전형적인 colony를 취한 뒤, TSA배지에 접종한다.
 7. 접종된 TSA배지를 37°C, 24-36시간 동안 배양한다.
 8. TSA의 colony가 *Salmonella* spp.가 맞는지 확인한다.

실습노트

4. 식품공전

1. 증균배양

검체 25 g 또는 25 mL를 취하여 225 mL의 펩톤수(배지 56)에 가한 후 35~37°C 에서 24±2시간 증균 배양한다. 배양액 0.1 mL를 취하여 10 mL의 Rappaport-Vassiliadis배지(배지 57)에 접종하여 42±1°C에서 24±2시간 배양한다.

2. 분리배양

증균배양액을 MacConkey 한천배지(배지 30) 또는 Desoxycholate Citrate 한천배지(배지 31) 또는 XLD 한천배지(배지 58) 또는 Bismuth Sulfite 한천배지(배지64)에 접종하여 35~37°C에서 24±2시간 배양한 후 전형적인 집락은 확인시험을 실시한다.

5. 실험결과

실습노트

▣ 병원균 검출 실험 (정성실험)

☞ *E. coli* O157:H7

1. 실험목적

샘플의 미생물적 안전성을 평가하고,
병원균(*E. coli* O157:H7)을 정성 분석하는 방법을 이해하고
실험한다.

2. 준비물

mEC broth (EC medium), SMAC, pipet

3. 실험방법

1. mEC 225ml을 멸균백에 담는다.
 2. 샘플 25g을 mEC가 들어있는 멸균백에 담아 42°C, 24시간 동안 배양한다.
 4. 배양액을 loop로 취하여 SMAC배지에 streaking한 후, 37°C, 24시간 배양한다.
 5. SMAC배지의 전형적인 colony를 loop로 취하여 latex test 한다.
 6. "*Listeria monocytogenes*" 정성실험의 6. ~ 8. 과정과 같다.
-
6. Loop를 이용하여 SMAC배지에서 전형적인 colony를 취한 뒤, TSA배지에 접종한다.
 7. 접종된 TSA배지를 37°C, 24-36시간 동안 배양한다.
 8. TSA의 colony가 *E. coli* O157:H7 가 맞는지 확인한다.

실습노트

4. 식품공전

1. 증균배양

검체 25 g 또는 25 mL를 취하여 225 mL의 mEC 배지(배지 42)에 가한 후 35~37°C에서 24±2시간 증균배양한다.

2. 분리배양

증균배양액을 cefixime (0.05 µg/L) 및 potassium tellurite(2.5 µg/mL)가 첨가된 MacConkey sorbitol 한천배지(배지 43)에 접종하여 35~37°C에서 18시간 배양한다. Sorbitol을 분해하지 않는 무색집락을 취하여 EMB 한천배지(배지 6)에 접종하여 35~37°C에서 24±2시간 배양하고, 녹색의 금속성 광택이 확인된 집락은 확인시험을 실시한다.

5. 실험결과

실습노트

▣ 병원균 검출 실험 (정성실험)

☞ *Staphylococcus aureus*

1. 실험목적

샘플의 미생물적 안전성을 평가하고,
병원균(*Staphylococcus aureus*)을 정성 분석하는 방법을 이
해하고 실험한다.

2. 준비물

BPW, BPA, pipet

3. 실험방법

1. BPW 225ml을 멸균백에 담는다.
 2. 샘플 25g을 BPW가 들어있는 멸균백에 담아 42°C, 24시간 동안 배양한다.
 4. 배양액을 loop로 취하여 BPA배지에 streaking한 후, 37°C, 24시간 배양한다.
 5. SMAC배지의 전형적인 colony를 loop로 취하여 latex test 한다.
 6. "*Listeria monocytogenes*" 정성실험의 6. ~ 8. 과정과 같다.
-
6. Loop를 이용하여 BPW배지에서 전형적인 colony를 취한 뒤, TSA배지에 접종한다.
 7. 접종된 TSA배지를 37°C, 24-36시간 동안 배양한다.
 8. TSA의 colony가 *Staphylococcus aureus* 가 맞는지 확인한다.

실습노트

4. 식품공전

1. 증균배양

검체 25 g 또는 25 mL를 취하여 225 mL의 10% NaCl을 첨가한 TSB 배지 (배지 23)에 가한 후 35~37°C에서 18~24시간 증균배양한다.

2. 분리배양

증균 배양액을 난황첨가 만니톨 식염한천배지(배지 14) 또는 Baird-Parker 한천배지(배지 63)에 접종하여 35~37°C에서 18~24시간 배양한다. 배양결과 난황첨가만니톨 식염한천배지에서 황색불투명 집락을 나타내고 주변에 혼탁한 백색환이 있는 집락 또는 Baird-Parker 한천배지에서 투명한 띠로 둘러싸인 광택이 있는 검정색 집락은 확인시험을 실시한다.

5. 실험결과

실습노트

▣ 병원균 검출 실험 (정성실험)

☞ *Bacillus cereus*

1. 실험목적

샘플의 미생물적 안전성을 평가하고,
병원균(*Bacillus cereus*)을 정성 분석하는 방법을 이해하고
실험한다.

2. 준비물

BPW, BPA, pipet

3. 실험방법

1. BPW 225ml을 멸균백에 담는다.
 2. 샘플 25g을 BPW가 들어있는 멸균백에 담아 균질화한다.
 3. 희석액 0.1ml 을 취하여 MYP배지에 spreading 한다.
 4. 희석액 1ml 을 취하여 10배씩 희석한 뒤, MYP 배지에 spreading 한다.
 5. 30°C에서 24시간 배양한다.
 6. MYP배지의 전형적인 colony를 loop로 취하여 latex test 한다.
 7. "*Listeria monocytogenes*" 정성실험의 6. ~ 8. 과정과 같다.
-
6. Loop를 이용하여 BPW배지에서 전형적인 colony를 취한 뒤, TSA배지에 접종한다.
 7. 접종된 TSA배지를 37°C, 24-36시간 동안 배양한다.
 8. TSA의 colony가 *Bacillus cereus* 가 맞는지 확인한다.

실습노트

4. 식품공전

1. 분리배양

검체 25 g 또는 25 mL를 취하여 225 mL의 희석액을 가하여 균질화한 검액을 MYP한천배지(배지 46)에 접종하여 30°C에서 24시간 배양한다. 배양후 혼탁한 환을 갖는 분홍색 집락을 선별한다. 이 때 명확하지 않을 경우 24시간 더 배양하여 관찰한다.

5. 실험결과

실습노트

■ Real time PCR

1. 실험목적

병원균(*Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7)을 신속하고 정확하게 정성(정량)한다.

2. 준비물

micro-tube, 균이 배양된 TSA, loop, hot plate, loop,
micro-tube용 원심분리기, real-time PCR kits, 96well, 원심분리기,
pipet, real-time PCR

3. 실험방법

1. micro-tube에 멸균증류수를 30 μ l를 넣는다.
2. TSA에서 배양시킨 병원균의 colony를 loop를 이용하여 1.의 micro-tube에 풀어준다.
3. 2.의 micro-tube를 끓는 물에서 10분간 끓인다.
4. 12000rpm으로 5분간 원심분리한다.
5. 상층액을 다른 micro-tube로 옮긴다. (실험 시 상층액 사용)
* 정량이 목적인 경우 DNA양을 측정한 후 real-time PCR에 사용할 Template값을 계산한다.
6. Primer/Probe Mixture 4 μ l, X2 Real-time PCR Master mix 10 μ l, Template를 96 well의 하나의 well에 모두 넣는다.
7. 6.의 96 well을 400rpm으로 30초간 원심분리한다.
8. real-time PCR을 이용하여 병원균을 정성한다.

실습노트

4. 실험결과

