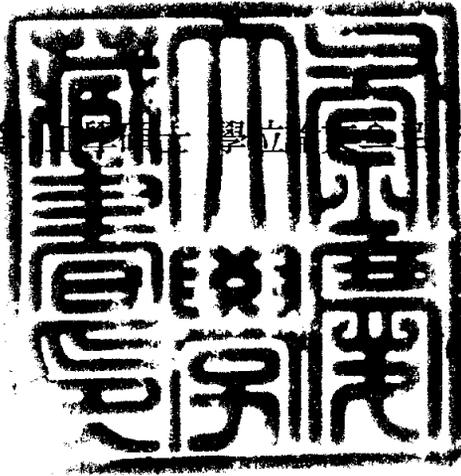


공학석사 학위논문

ATP Bioluminescence Assay를
이용한 단체 급식시설의 위생상태 평가

지도교수 양 지 영

이 論文은 工業大學校에서 提出함.



2004년 8월

부경대학교 산업대학원

식품산업공학과

김 명 원

이 논문을 김명원의 공학석사
학위논문으로 인준함

2004년 6월 19일

주 심 이학박사 장 동 석



위 원 농학박사 이 양 봉



위 원 농학박사 양 지 영



목 차

Abstract	1
서 론	3
이 론	5
1.단체급식.....	5
2.식중독	7
3.HACCP	10
4.미생물 검사법	13
재료 및 방법	17
1.실험기구	17
2.시료채취	17
3.상대형광도.....	17
4.생균수측정.....	18
결과 및 고찰	19
1.표준균주를이용한ATPbioluminescence법의신뢰구간설정	19
2.조리장의ATPbioluminescence법에의한위생시험	24
3.위생처리후ATPbioluminescence법에의한판정	28

요 약	31
감사의글	32
참고문헌	33

Evaluation of Hygienic Status of Foodservice Operation
by a ATP Bioluminescence Assay

Myoung-Won Kim

*Department of Food Industrial Engineering
Graduate School of Industry
Pukyong National University*

Abstract

An investigation was conducted to evaluate the hygiene status of foodservice operation by using conventional swabbing technique plus standard plate count and ATP bioluminescence assay. The results of the study were as follows: 1) For all kitchen boards, knives, feeding trays, and dish towels tested, there was an overall agreement at 95.9% level between the results obtained using ATP bioluminescence and plate count when using a pass/fail cut-off of 3× control values for ATP assay and 40 CFU(colony forming unit)/cm² for plate count.

2) The plate counts of three foodservice for kitchen board, kitchen knife, feeding tray and dish towel were within the acceptable limits when tested before using. However, none of them were within the acceptable limits when tested during using and after cleaning and sanitizing. 3) Above results suggested that an immediate action needs to be taken to reduce the potential danger of cross-contamination and also effective sanitary control methods needs to be developed to improve the sanitary condition.

서 론

인간의 삶에서 풍요롭게 영위하기 위해서는 건강이 가장 우선 되어야 한다. 특히 건강에서 식생활이 차지하는 비율은 매우 크다. 얼마 전까지만 해도 식생활이라 함은 가정 내에서 이루어지는 것으로 생각해 왔는데, 여성들의 취업기회가 많아져 맞벌이 부부가 증가하고 자녀수가 감소하며, 소득이 증가됨에 따라 가정 내에서 식사 횟수가 감소되고, 외식의 기회가 증가되었다. 이러한 소득의 증가와 외식의 증가라고 하는 사회변화는 소위 '급식산업'을 발전시키는 계기가 되었고, 누구나 각자 원하는 방식대로 식생활을 즐길 수 있게 되었다.

국내 급식산업은 급속히 성장하고 있고, 그만큼 급식의 혜택을 받는 사람도 늘어나고 있다. 국내의 집단 급식 시장의 규모는 연간 약 2조 5천억원에 달하며, 그 중 학교 시장은 약 1조원, 그리고 기업체 시장은 1조 5천억원에 달하는 것으로 추정되고 있다. 사업체, 병원, 학교, 복지기관의 급식시설 등 특정한 다수인에게 계속적으로 식사를 공급하는 단체급식은 피급식자에게 완벽한 식사를 제공하여야 한다. 단체급식은 균형 있는 영양공급을 위해 영양관리를 해야 하며, 식중독 사고를 사전에 예방하기 위해 위생관리를 철저히 해야 한다.¹⁾

최근 학교 급식에서의 식중독 발생률을 분석한 자료를 보면 1998년 이후 꾸준히 증가하고 있음을 볼 수 있다. 이러한 경향은 직영급식보다 위탁급식에서 더 두드러지게 나타난다. 단체급식에

있어서 위생관리의 방식은 여러 가지가 있으나, 이중 식중독 사고 예방에 가장 효과적인 방법은 HACCP (Hazard analysis and critical control point) 이다. HACCP에 의한 식품의 위생관리 특징은 CCP (critical control point) 에서의 위해가 적절히 관리되는지 여부를 가능한 그 자리에서 바로 판단하는데 있다. 즉 관리 상태가 적절하지 못한 사실을 확인한 경우 바로 개선조치를 취할 수 있도록 시간이나 온도 등 즉시 판단할 수 있는 기준치를 설정하는 것이 중요하다. 종래에는 미생물 검사방법으로 swab법이 사용되었으나, 결과 판정에 적어도 24시간 이상의 시간이 소요되어 HACCP system의 요구조건인 신속성, 간편성을 충족시킬 수 없다는 단점이 있다. Swab법의 단점을 보완해줄 방법으로 ATP bioluminescence법이 있다. ATP bioluminescence법은 살아 있는 세포에 존재하는 ATP를 수분 내에 형광량을 감지하여 생균수를 간접적으로 측정하는 방법으로 미생물 신속검지법으로 적절할 것으로 고려되고 있으나 아직은 결과의 신뢰성, 재현성 등으로 널리 보급되지는 않는 실정이다.

본 연구는 단체급식의 위생관리체제 및 미생물검사법에 대해 조사하며 ATP bioluminescence법을 사용하여 기존의 미생물검사법과의 관계를 살펴보고 한 단체급식을 대상으로 위생관리효과에 대해 조사하여 그 효과를 파악하고자 하였다.

이 론

1. 단체급식

1.1. 정의

단체급식이란, 학교·병원·산업체 등에서 특정 다수인에 대하여 정기적으로 계속 공급하는 식사를 말하는 것으로 내일의 재산을 위한 식사의 의미뿐만 아니라, 식생활의 합리화, 영양 개선, 건강 증진, 체력 향상의 기반이 된다. 이러한 목적을 달성하기 위해 조리시설, 기구, 원재료, 급식비 등의 물적 요소와 급식종사원 등의 인적요소를 기본으로 하여, 영양적이고 위생적이며 기호를 고려한 식사를 경제적으로 급식해야 한다.

1.2. 단체급식의 발전과정

단체급식의 발전과정은 분야별로 알아볼 수 있다. 사업체 급식은 1960년대를 거쳐 1970년대까지 제 3,4공화국 시절 증산, 수출, 건설정책에 힘입어 생산, 제조업자가 증가하면서 공장급식이 발달하였는데, 1996년 대창방직을 비롯한 섬유공장에서 영양사를 채용하여 급식관리를 하기 시작하였다. 1967년부터 식품위생법상에 1회 50인 이상에게 식사를 제공하는 집단급식소에 영양사를 채용해야 하는 영양사 고용제도가 명시됨에 따라 전문인력을 동원한 양질의 급식제공이 이루어지게 되었다.

이 중 학교급식은 발전과정에 따라 외부지원에 의한 구호급식

기(1953년~1972년), 외부지원중단 이후의 자립급식기(1973년~1977년), 학교별로 조리시설을 갖추고 영양사를 배치하기 시작한 제도 확립기(1978년~1983년), 학교급식 발전 5개년 계획수립 등 학교급식 발전을 위해 많은 노력을 시작한 제도 확충기(1984년~1991년), 그리고 전면확대기(1992년~현재)로 나눌 수 있다. 약 20여년 간의 구호급식기에는 주로 전쟁고아나 극빈 아동에 대한 구호책의 일환으로 가루우유나 빵 등을 제공하였고 이는 유니세프(UNICEF), 케어(CARE), 유세이드(US-AID) 등의 기관으로부터 원조양곡을 받아서 실시하였다. 1978년에 급식시범학교를 정하고 국가의 경제적 지원 아래 급식시설을 갖춘 후 학교에서 조리하여 완전한 영양급식이 되도록 영양사를 두고 실시하기에 이르렀다. 1981년 1월 29일 학교급식법을 제정·공포하였는데, 이로써 급식학교 영양사가 보건의 공무원의 대우로 신분보장을 받게 되었으며, 학교급식 발달의 계기가 되었다.

병원급식은 1885년 선교사 알렌(Allen)에 의해 최초의 병원인 광혜원(제중원)이 설립되었는데, 1907년 대한의원으로 개칭되고 현재의 서울대학 병원이 되었다. 1902년에는 세브란스 병원이 사립병원으로 최초로 설립되었으며, 1958년 운크라(UNKRA)와 스칸디나비아 2국 및 우리나라는 국립중앙의료원을 건립하였는데 이때 최초로 외국인 영양사와 함께 우리나라 영양사를 채용하고 병원급식을 정상적으로 실시하였다. 또 1966년 국립중앙의료원에서는 처음으로 영양사 면허 소지자를 인턴으로 선발하고 인턴과정 수료 후 채용을 하였다.

1.3. 단체급식의 현황

우리나라의 급식산업은 1990년대에 들어와서부터 급속한 성장을 계속하고 있다. 단체급식의 경우 1988년 서울 캐터링 서비스 주식회사를 시작으로 그동안 중소기업과 대기업이 대거 참여하여 위탁급식이 크게 증가되었으며 급식시장도 매우 확대되었다. 특히 IMF이후 사업체들이 효율적인 급식관리와 경영의 효과를 높이기 위해 급식관리를 위탁하는 경향이 높아지면서 대기업과 중소기업이 급식을 위탁받아 운영하는 업장의 수도 증가하고 있다.

그리고 학교급식은 1966년 학교급식법이 개정되면서 외부로부터의 위탁급식이 허용되었고, 2000년대 이르러 급속한 발전을 하여 2003년 12월 31일 기준으로 전국의 초·중·고·특수학교 10,509교중 98.4%인 10,343교에서 급식이 실시되고 있다. 이중 학교급식이 8,413교(81.3%)이고 위탁급식이 1,930교(18.7%)이다. 초등학교 99.8%, 중학교 95.9%, 고등학교 98.4%, 특수학교 94.2%가 급식을 제공하고 있다. 급식학생수는 전체학생의 90%인 704만명이다. 초등학교 92.3%, 중학교 92.7%, 고등학교 81.8%, 특수학교 94.0%이다.

2. 식중독

2.1. 정의

식중독이란 인체에 유해한 미생물이나 유독한 물질이 혼입되어 있는 식품이 소화관을 경유하여 흡수되었을 때 급격한 생리적 이

상현상을 일으키는 것을 말하며 영양불량이나 전염병과는 구별된다. 또한 구토, 복통, 설사 등을 동반하는 급성 위장염 증상을 주증상으로 하며, 발병원인에 따라 세균에 의한 것과 유독한 화학물질에 의한 것, 그리고 자연독에 의한 것으로 나눌 수 있다.

2.2. 세균성 식중독

세균성 식중독은 세균이 증식한 식품이나 음식물을 섭취함으로써 발생하는 식중독으로 우리나라에서 발생건수가 가장 많으며 특히 *Vivrio parahaemolyticus*, *Sallmonella*, 포도상구균에 의한 식중독의 발생이 많다. 세균성 식중독은 세균에 오염된 식품을 섭취하였을 때 세균이 장관에 증식하여 발생하는 감염형과 식품 중에서 세균이 증식하면서 독소를 생산하여 식품내에 존재하는 독소를 섭취함으로써 발생하는 독소형으로 나눌 수 있다. 감염형 식중독들은 잠복기가 대개 12~48시간이며 *Sallmonella*, *Vivrio parahaemolyticus*, *Clostridium welchii*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*에 의한 식중독이다. 독소형에 속하는 식중독들의 잠복기는 2~8시간이며 *Stapylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*에 의한 식중독이 이에 속한다.

특히, 병원성 대장균은 대부분의 균이 식중독을 발생시키는데 미국, 일본 등에서 크게 문제가 되었던 병원성 대장균 O157 : H7은 사람의 장관에 감염되면 장관내에서 증식하여 Vero 독소를 생산하여 사람에게 설사를 유발하고 경우에 따라서는 용혈성요독증

중후군과 복통, 경련, 의식장해를 일으키기도 한다.

2.3. 발생현황

식품위생법에 의하여 식중독을 일으킨 환자 또는 그 의심이 있는 자를 진단하였거나 그 사체를 검안한 의사 또는 한의사는 관할 보건소장이나 보건지소장에게 보고하고, 검안 후 진상 조사 결과를 소속 시·도지사에게 보고하고, 최종적으로 보건복지부장관에게 보고하도록 되어 있다.

최근 우리나라 식중독 발생추이를 살펴보면, 2000년 104건(7,269명), 2001년 93건(6,406명), 2002년 78건(2,980명)으로 나타났다. 주요 식중독 발생 원인 세균은 *Sallmonella*, *Vivrio parahaemolyticus*, *Stapylococcus aureus*, *Escherichia. coli*이었다. 식중독 발생추이를 장소별로 보면 집단급식소가 2000년 43건(5,670명), 2001년 41건(4,792명), 2002년 16건(1,392명)으로 가장 많았고, 다음은 식품접객업소, 가정집, 기타의 순이었다. 이것은 식품위생관련업소중 집단급식소가 차지하는 비율이 1.90% (18,431개소)임을 감안할 때, 업소의 수에 비해 상당히 많은 식중독 사고가 일어났고, 한번의 사고가 대형사고로 이어지는 단체급식의 특성을 잘 보여준다.

2002년 기준 식품위생관련업소 행정처분 현황을 보면 전체 2,270건중 집단급식소가 1,339건으로 가장 많았고, 식품첨가물제조업 787건, 식품소분업 68건, 용기·포장지 제조업 67건순이었다. 이는 집단급식소가 위생관리상 기준에 미치지 못함을 말해주는 것

으로 단체급식에서 위생관리방법에 조치가 필요하다는 것을 알 수 있다.

2.4. 세균성 식중독의 예방

세균성 식중독을 예방하기 위해서는 청결, 가열, 신속의 3원칙이 지켜져야 한다.

첫째, 청결의 원칙은 세균이 식품에 부착되지 않도록 하는 것으로, 조리 종사원은 개인위생을 철저히 준수하고, 식품을 위생적으로 취급·관리하며, 주방시설의 청결 관리 및 구충·구제에 신경을 써야한다.

둘째, 가열의 원칙은 세균을 가열 조리하여 죽이는 것으로, 조리시 식품의 중심 온도가 70~74℃가 되도록 충분히 가열하고, 조리기구는 열탕 소독하여 사용해야 한다.

셋째, 신속의 원칙은 세균의 증식을 막는 것으로, 식품은 조리 후 2시간 이내에 배식하고, 조리된 식품은 4시간 이상 보관을 금지하며, 냉장보관은 5℃ 이하로 하고 온장보관은 70℃이상에서 한다.

3. HACCP

3.1. 정의

'Hazard Analysis Critical Control Points'의 머릿글자로서 'HA'는 위해 가능성이 있는 요소를 찾아 분석·평가하는 것이며, 'CCP'는 그 위해성을 제거하고 안전성을 확보하기 위하여 중점적

으로 다루어야 할 관리점을 말하는 것으로, 식품의약품안전청에서는 이를 '식품위해요소중점관리기준'으로 부른다.

HACCP는 식품의 원재료 생산에서부터 제조, 가공, 보존, 유통 단계를 거쳐 최종 소비자가 섭취하기 전까지의 각 단계에서 발생할 우려가 있는 위해요소를 규명하고 이를 중점적으로 관리하기 위한 중요관리점을 결정하여 자주적이며 체계적이고 효율적인 관리로 식품의 안전성(safety), 건전성(wholesomeness), 및 품질(quality)을 확보하기 위한 과학적인 위생관리방법이다. 즉, 종전의 관리 방법과 달리 원료에서 제품에 이르기까지의 모든 공정에 있어서 특히 중점적으로 관리하고, 관리내용을 전부 기록함으로써 제조공정 전반에 걸친 제품의 안전성 확보를 기하는 방법인 것이다. 따라서 종전의 관리방식은 위해발생시 원인규명과 책임소재를 찾기가 어려운 실정이었으나, HACCP은 각 제조공정별로 위해요인을 관리·기록하도록 함으로써 위해발생 요인과 책임소재를 명확하게 파악할 수 있어 가장 효과적인 식품의 안전성 확보수단으로 부각되고 있는 제도이다. HACCP은 일반적인 식품위생과 GMP(Good Manufacturing Practice)를 바탕으로 식품에 대한 안전성을 한 단계 더 발전시킨 시스템으로 크게 위해분석과 CCP의 결정, 기록보관 등으로 나눌 수 있는데 통상 7가지 원칙에 기초하고 12가지의 절차로 구성된다. 절차 1~5까지는 원칙1의 위해분석을 하기 위한 준비단계라고 할 수 있다.

3.2. 우리나라의 HACCP 도입현황

우리나라는 식품안전성 확보와 식품의 국제기준·규격과의 조화를 위하여 1995년 12월 식품위생법 제 32조의 2항(위해요소중점관리기준)의 규정을 신설함으로써 HACCP를 도입할 수 있는 법적 기틀을 마련하였다. 동 제도는 HACCP를 도입할 수 있는 법적 기틀을 마련하였다. 동 제도는 HACCP의 효율적인 적용을 위하여 업종별로 희망하는 업체에 한하여 일정한 절차를 거쳐 승인해 주는 자율적인 지정제도의 형태로 운영되고 있다. 이러한 기본방침에 따라 1996년 12월 '식품위해요소중점관리기준'을 고시함으로써 본격적인 HACCP의 적용체제를 구축하였으며 적용대상품목으로 1996년 12월에 식육가공품(식육햄류·소시지류), 1997년 10월에 어육가공품(어묵류), 1998년 2월에 냉동수산식품(어류·연체류, 패류, 갑각류, 조미가공품), 1998년 5월에 유가공품(우유, 발효유, 가공치즈, 자연치즈)을, 1999년 6월에는 냉동식품(기타 빵 및 떡류·면류, 일반가공식품중 기타가공품) 및 병과류로 단계적으로 확대하여 개정고시 하였다. 이러한 추진결과 1997년 5월 식육햄·소시지의 시범적용업체였던 제일제당 이천공장이 최초의 HACCP 적용업소로 지정되고, 롯데햄·롯데우유 청주공장(1997년 8월), 대상농장(주) 성남공장(1997년 9월)이 같은 해 지정을 받았으며, 1998년 5월에는 (주)강동, 삼진물상(주)부산공장(냉동수산식품)이, 1998년 6월에는 (주)비락 진천공장을 비롯한 유가공업체 12개사 26개 공장이, 그리고 1999년 4월에는 대림수산(주) 안산공장(어육가공품)이 HACCP 적용업체로 지정받아 지금까지 총 18개사 32개 공장이 HACCP 적

용업체로 지정되었다. 한편, 1997년 11월 한국보건산업진흥원을 HACCP 교육·훈련 및 기술지원기관으로 지정하여 HACCP에 관한 식품업체 종사자와 식품위생관련공무원의 체계적인 교육·훈련을 실시함으로써 효과적인 기술지원 및 관리체계를 구축하였으며, 그 외에도 소비자를 대상으로 한 홍보물 작성 및 HACCP 표시로고를 개발 등 HACCP 홍보활동을 강화하였다.

4. 미생물 검사법

HACCP계획 수립시 위해분석은 가장 기초적이고 중요한 단계로서 특히 미생물학적 위해분석은 위생관리 상태를 판단하기 위한 초기 분석시에 그 가치가 있으며 위해분석이 적절히 이루어져야만 각각의 급식소 여건에 적합한 효과적인 HACCP계획 수립이 가능해진다. 이에 미생물 검사법에 대해 조사하였다.

4.1. 식품공전법

현재까지 미생물검출을 위해 가장 널리 사용되고 있는 미생물 검사방법은 swab방법을 이용하여 제조한 배지에 균을 접종한 후 생균수를 측정하는 방법이다. 멸균한 면봉을 멸균 0.85% NaCl에 적셔 생균수를 측정하고자 하는 부위에 일정 면적만큼 닦아내어, 일정량의 멸균 0.85% NaCl을 담고 멸균·냉각한 tube에 넣고 세게 진탕하여 부착균의 현탁액을 조제하여 이를 시험용액으로 사용한다. 이 용액을 미리 조제한 배지에 접종하여 일정온도와 일정시간동안 incubator에서 배양한 후 colony수를 세어 생균수를 측정한다.

다.

이 방법으로 식품의 생균수를 측정할 경우 배지를 조제하고, 균을 배양하는 등의 실험에 소요되는 시간이 길어져 식품조리시 위해성을 발견이 늦어져 즉각적인 조치를 취할 수 없게 된다. 그래서 HACCP에서 요구하는 미생물검사의 신속성이 확보되지 않는다.

4.2. Petri film법

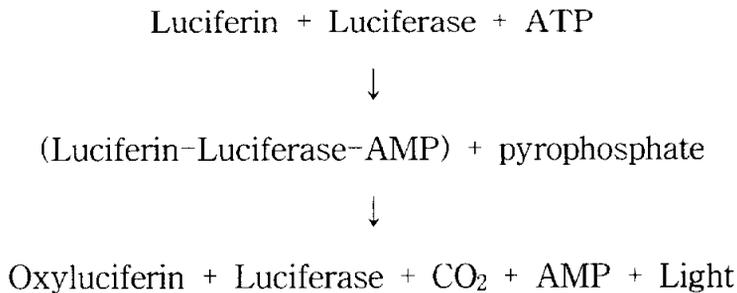
Petri film법은 미생물 성장에 필요한 영양소, 수용성 겔 및 colony지시약들을 필름에 특수코팅한 필름배지로, 상부필름과 하부 필름으로 구성되어 있다. 상부필름은 수용성 겔, 접착제·지시약, 폴리프로필렌 필름이 층을 이루고 있고, 하부필름은 격자가 새겨진 폴리에틸렌 필름, 접착제, 영양성분·수용성 겔이 층을 이루고 있다. 하부필름에 시료 1ml를 접종하고 상부필름으로 덮어 누름판으로 눌러주면 상부와 하부의 필름에 있는 수용성 겔이 시약에 녹아 겔화가 일어나고 시료의 균은 필름의 영양성분으로 증식하게 되고, 지시약에 의해 colony가 염색되어 균의 정성, 정량실험에 사용할 수 있다.

Petri film은 준비된 상태의 배지이기 때문에 기존의 균 검사시 배지준비에 필요한 작업과정 및 시간을 절약할 수 있고, 배지제조에 필요한 실험기구가 없이도 미생물 검사를 실시할 수 있는 장점이 있다.

4.3. ATP bioluminescence법

ATP bioluminescence법은 무균실험에서 필요한 복잡한 기술이나 장비가 없이 미생물오염유무를 신속히 판정할 수 있는 방법이다.

ATP bioluminescence법은 북미 반딧불에서 자연적으로 발생하는 luciferase라는 효소에 의해 일어나는 decarboxylation 반응에 기반을 두고 있다.



ATP bioluminescence법의 원리

반딧불의 luciferase는 세포내 거의 모든 ATP를 이용할 수 있으며, 또한 ATP 이외의 다른 핵산과는 거의 반응하지 않으므로 ATP의 선택측정에 좋은 방법이 될 수 있다. 한 분자의 ATP는 한 개의 photon을 생산하므로 발산된 빛의 양을 측정함으로써 ATP 함량을 측정할 수 있다.

모든 살아있는 세포는 대사 작용에 이용되는 에너지의 근원이 ATP를 가지고 있으며 식품저장 중 저장기간이 경과함에 따라 오

염된 미생물수가 증가하며 이에 따라 상대적으로 ATP 함량도 증가하므로 ATP 함량을 측정함으로써 오염미생물의 수를 측정할 수 있다. ATP bioluminescence법을 응용한 Lumitester PD-10을 사용하여 미생물 검사를 하면 배지를 사용할 때처럼 균을 배양하는 시간이 필요 없기 때문에 검사 즉시 검사결과를 알 수 있고, 조작이 간편해 누구나 검사를 할 수 있는 장점이 있다.

재료 및 방법

1. 실험기구

본 실험에는 luminometer로 Kikkoman Corporation의 Lumitester PD-10를 사용하였고, swab test는 Lucipac-W로 실시하였다. 생균수 측정은 3M petri film을 사용하였다.

시료 채취와 회석에 사용된 5 μ l cap tube, 10ml test tube, 면봉, 0.85% NaCl 용액, 5ml tip, 1ml tip은 autoclave하여 0.85% NaCl 용액을 제외한 나머지는 oven에서 건조하여 사용하였다.

2. 시료채취

실험에 사용된 시료는 부산광역시 수영구에 위치한 흰돌실버타운의 조리장에서 채취하였다. 시료채취기간은 2003년 4월부터 2004년3월까지칼, 식판, 도마, 행주 및 기구표면 등으로부터 시료를 채취하였다. 시료는 멸균한 면봉을 멸균 0.85% NaCl 용액에 적서 5 \times 5cm의 면적으로 swab을 한 후, 멸균 0.85% NaCl 용액이 들어있는 5 μ l cap tube에 넣어 ice box에 담아 실험실로 운반하여 24시간이내에 분석에 사용하였다.

3. 상대형광도(RLU, Relative Luminescence Unit) 측정

실험실로 운반한 시료를 10배 순차적으로 희석하여 각각의 RLU를 측정하였다. Lucipac-W의 면봉을 반응튜브까지 통과시켜 본체 중간의 용액이 발광시약과 섞이게 한다. 반응튜브를 분리하여 시

료 1ml을 반응튜브에 넣고, lucipac-w를 다시 결합하여 발광시약과 시료가 잘 섞이도록 5초간 vortex 한 후, lumitester PD-10으로 RLU를 측정하였다.

4. 생균수 측정

상대형광도 측정시 희석한 시료를 동일하게 petri film에 1ml씩 접종하여 incubator에서 32℃에서 24시간 배양한 후 colony수를 측정하였다.

결과 및 고찰

1. 표준균주를 이용한 ATP bioluminescence법의 신뢰구간

설정

ATP bioluminescence법에 의한 luciferase와의 반응시간을 조사한 결과는 Fig. 1과 같았다. Luminometer에 의해 사용된 lucipack-W의 반응액 속 luciferase의 반응시간은 10분에 최대 형광도에 도달하였으며 최대치에 도달후 30분까지 그 값이 떨어지지 않으며 안정한 값을 유지하였다. 따라서 10분이상의 반응시간 유지 후 최대형광도를 ATP luminescence법에 의해 얻은 값으로 하였다.

일반시료를 대상으로 실험하기 이전에 표준균주를 대상으로 ATP bioluminescence법에 의한 RLU와 Petri film법에 의한 생균수와의 관계 및 검출한계를 실험한 결과는 Fig. 2, Fig. 3. 및 Fig 4와 같았다. *E. coli*는 10^2 이상에서, *Staphylococcus. aureus*는 10^2 이상에서, *Saccharomyces. cerevisiae*는 10^1 이상에서 CFU와 RLU 간의 높은 상관관계를 보여 주었다. 따라서 생균수와 상대형광도와의 관계는 높은 상관성을 나타냄에 따라 최대형광도로서 생균수를 예측할 수 있음을 알 수 있었다. 원핵세포와는 달리 진핵세포에서 최저측정한계치가 낮게 검출된 것은 세포의 크기에 따른 ATP 발생과의 관계에 기인하는 것으로 사료되며, 또한 *Escherichia coli*의 경우 다른 2 표준균주보다 다소 높은 기울기를 보여주고 있었다.

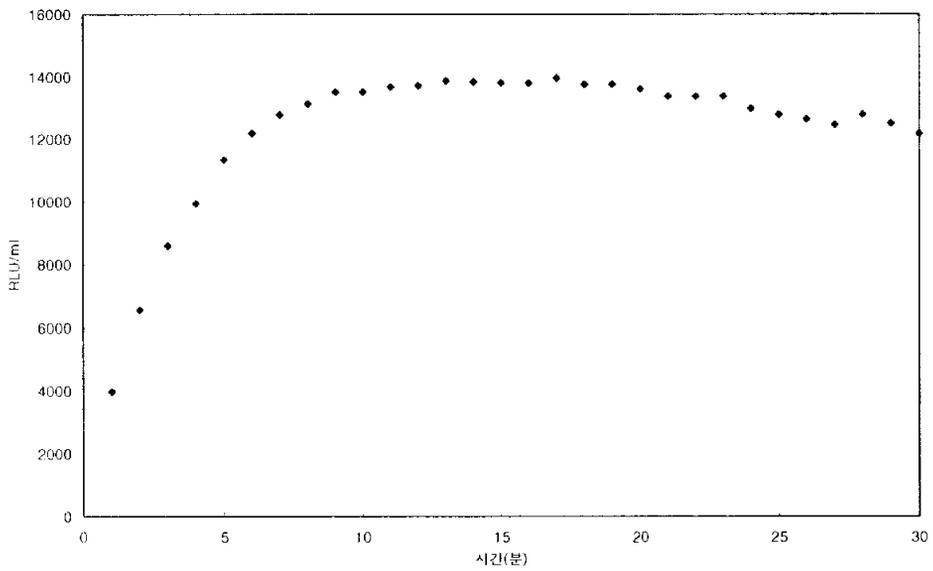


Fig.1. Effect of reaction time in ATP bioluminescence method.

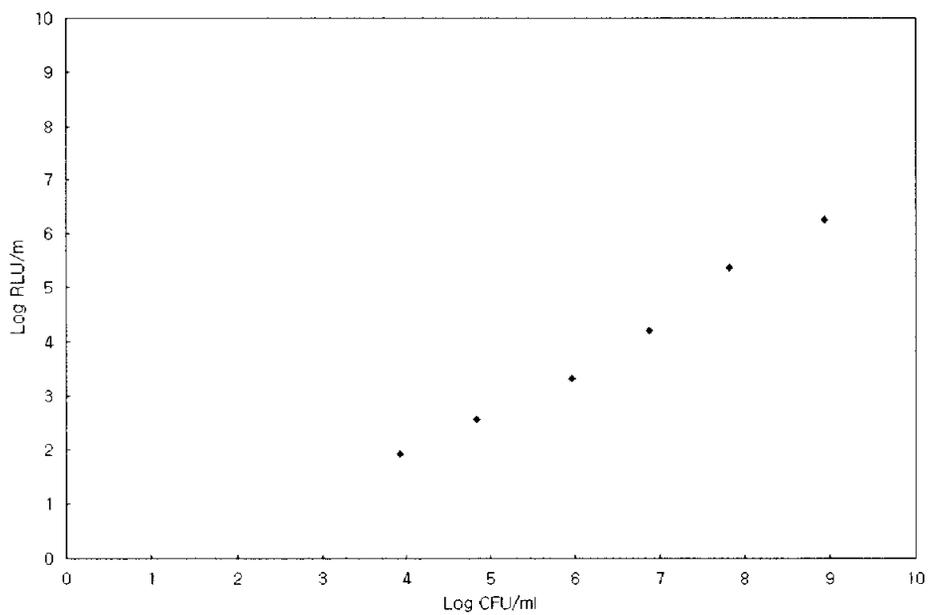


Fig.2. Relationship between ATP bioluminescence method and Petri film method for *Escherichia coli*.

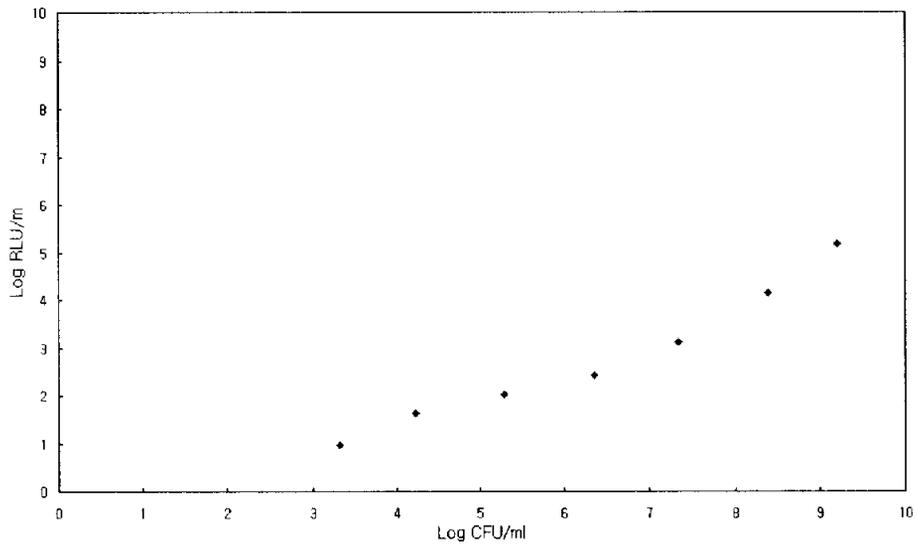


Fig.3. Relationship between ATP bioluminescence method and Petri film method for *Staphylococcus aureus*.

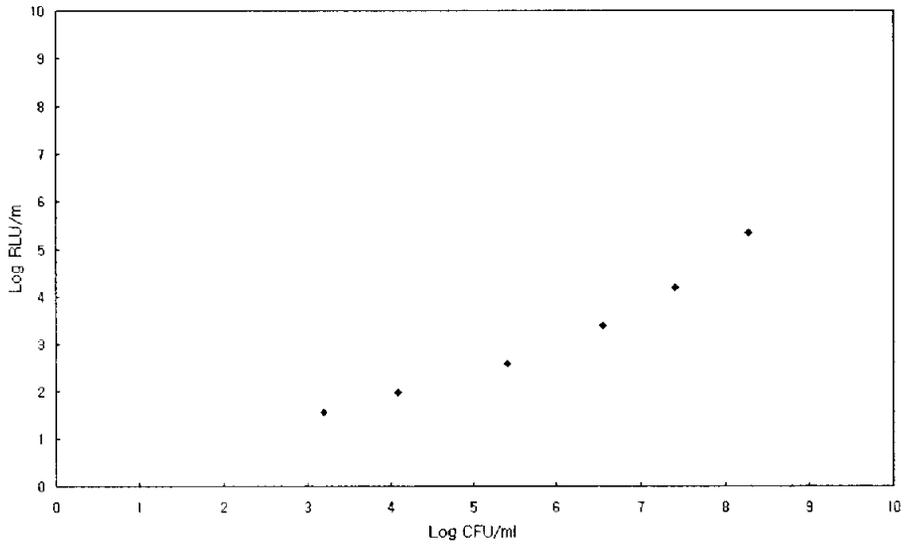


Fig 4. Relationship between ATP bioluminescence method and Petri film method for *Saccharomyces. cerevisiae*.

2. 조리장의 ATP bioluminescence법에 의한 위생시험

실험 대상 조리장을 방문하여 여러 시료에 대해 RLU와 CFU를 측정된 값은 Table 1.과 같았다. 조리장에서 채취한 시료는 생균수가 $10^1/\text{cm}^2$ 에서 TNTC/cm^2 의 분포를 보이고, RLU는 120에서 18000의 범위를 보였다. 또한 Table 1.의 결과를 생균수와 상대형광도와와의 상관관계를 나타낸 결과는 Fig. 5. 와 같았다. 이는 표준군주를 통한 실험과 같은 결과를 보이는 것으로 매우 높은 상관관계를 보여주고 있었다.

Table 1에서 실험한 시료들 중 특히 칼, 식판, 도마, 행주에 대해 10회 시료를 채취하여 실험을 통해 결과치의 재현성에 대해 실험한 결과는 Table 2.와 같았다. 오염의 정도를 판단하기에는 결과치의 편차가 있었으나 청결도 정도를 판정함에는 무리가 없는 방법으로 사료되었다. Lumitester PD-10이 조리장의 조리기구가 세균에 오염된 만큼의 값을 RLU로 측정함을 알 수 있었다.

Harrigan과 McCance는 기구, 설비 및 용기에 대한 미생물적정 수준을 표준평판 균수는 1cm^2 당 5미만일 때 만족할 수준이고, 5~25은 시정을 요하며 25이상일 때는 즉각적인 조치를 취해야 한다고 했으며, 사용 중인 경우에는 20미만일 때 만족할만한 수준이고, 20~40일 때 시정을 요하며 40이상일 때는 즉각적인 조치를 취해야 한다고 했다. 또한 Seeger와 Griffiths에 의하면 고기용 칼과 식판에 대한 위생 청결도 수준으로 표준평판 균수가 1cm^2 당 40미만일 때 허용수준으로 하였다. 이런 기준으로 볼 때, 시료를 채취한 조리장에서 사용 중인 칼, 식판, 도마, 행주의 위생수준이 즉각 조치를 취해야 할 만큼 비위생적인 것을 알 수 있었다.

Table 1. Results of relative luminescence unit and viable cell counts for foodservice operations

	생균수	상대형광도	단위면적당 생균수	단위면적당 상대형광도
	CFU/ml	RLU/ml	CFU/cm ²	RLU/cm ²
식판	27	21	1.08	0.84
작업대	1290	24	51.6	0.96
주걱	222	27	8.88	1.08
배식통 뚜껑 안쪽면	960	27	38.4	1.08
식기건조대	213	33	8.52	1.32
배식대 아래선반	720	33	28.8	1.32
국그릇	54	36	2.16	1.44
행주	582	42	23.28	1.68
싱크대 바닥	1020	42	40.8	1.68
숟가락	0	45	0	1.8
고무장갑(야채용)	204	54	8.16	2.16
잔반수거대	735	54	29.4	2.16
취반기 손잡이	1170	54	46.8	2.16
조리장 바닥	720	57	28.8	2.28
문손잡이	0	96	0	3.84
쟁반	990	123	39.6	4.92
양푼-도토리무침	2970	138	118.8	5.52
앞치마	280	141	11.2	5.64
소쿠리	810	162	32.4	6.48
배식대	39	180	1.56	7.2
숯	110	384	4.4	15.36
가스렌지	720	1350	28.8	54
칼-돼지수육	162	18162	6.48	726.48
도마(김치용)-김치	TNTC	126	TNTC	5.04
도마(야채용)-다시마	TNTC	54	TNTC	2.16
싱크대 배수구	TNTC	1149	TNTC	45.96

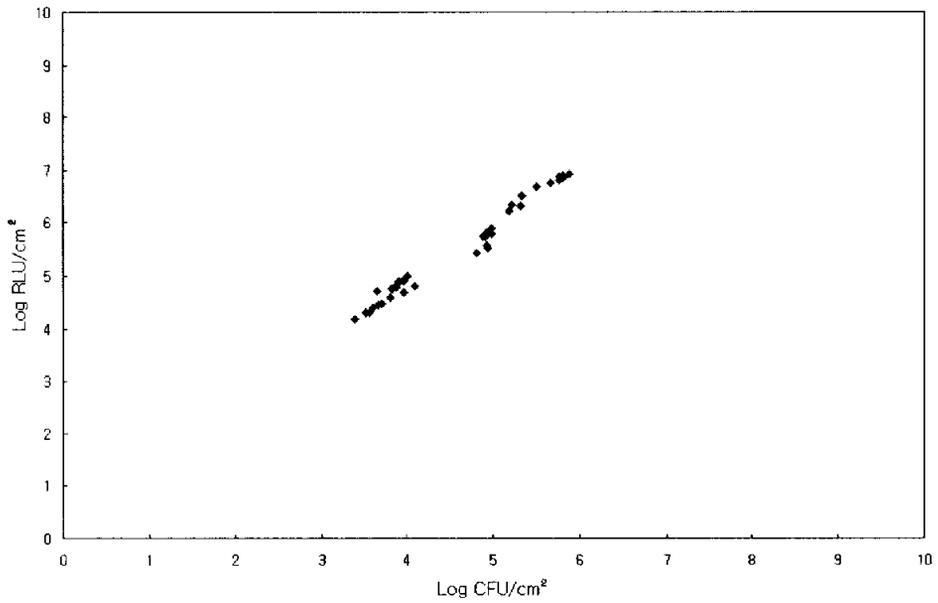


Fig.5. Relationship between ATP bioluminescence method and Petri film method for various foodservice operations.

Table 2. Results of relative luminescence unit and viable cell counts for major foodservice operations

	Knife		식판		도마		행주	
	CFU/cm ²	RLU/cm ²						
1회	7.9×10 ³	72235	2.5×10 ³	15487	6.7×10 ⁴	277572	6.5×10 ³	7895465
2회	6.8×10 ³	57842	4.5×10 ³	51321	8.6×10 ⁴	378378	5.9×10 ³	6254811
3회	1.0×10 ⁴	97522	3.4×10 ³	19554	7.9×10 ⁴	548774	4.6×10 ³	5842158
4회	8.1×10 ³	75846	4.7×10 ³	28648	8.9×10 ⁴	345373	6.4×10 ³	6954212
5회	6.9×10 ³	58245	3.7×10 ³	20154	9.8×10 ⁴	786211	2.2×10 ³	3213546
6회	9.5×10 ³	81548	4.1×10 ³	24868	8.6×10 ⁴	674512	5.9×10 ³	6521354
7회	7.5×10 ³	64978	5.1×10 ³	30087	8.4×10 ⁴	651212	5.9×10 ³	7351351
8회	8.3×10 ³	78221	1.3×10 ⁴	65487	9.8×10 ⁴	621585	1.7×10 ³	2186433
9회	9.5×10 ³	84667	9.5×10 ³	49875	1.6×10 ³	1654354	7.6×10 ³	8351356
10회	7.7×10 ³	62155	6.4×10 ³	38457	2.1×10 ³	2133545	3.3×10 ³	4684621

3. 위생처리 후 ATP bioluminescence법에 의한 판정

조리장의 오염도를 판정한 후 불량으로 판정된 시료에 대해 위생처리 후 그 효과를 Petri 법과 ATP bioluminescence법에 의해 효과를 판정한 결과는 Table 3과 Fig. 6.과 같았다. 위생처리 후 생균수 및 상대형광치가 감소하였음을 두 가지 방법 모두를 통해 확인 할 수 있었다. 그러나 생균수 측정법의 경우 배지제조 및 배양을 위해 소용되는 시간이 길어짐에 따라 위생상태를 즉각적으로 판단하거나 조치함에는 한계가 있었으며 ATP bioluminescence법의 경우는 생균수 측정법과 높은 상관관계를 나타내었으며 상대형광도에 의한 결과분석이 생균수를 나타냄에 충분하였으며 측정 후 즉각적인 결과 판정 및 위생조치가 가능한 방법으로 위생관리시스템에는 매우 유효한 방법으로 사료되었다.

Table 3. Effect of hygiene treatment between relative luminescence unit and viable cell counts for foodservice operations

시료채취부위	RLU/ml		RLU/cm ²		log RLU/cm ²	
	소독전	소독후	소독전	소독후	소독전	소독후
조리장 바닥(1)	4633	508	185.32	20.32	2.267922	1.307924
조리장 바닥(2)	33940	2917	1357.60	116.68	3.132772	2.066996
쌈크대바닥(1)	579	58	23.16	2.32	1.364739	0.365488
쌈크대바닥(2)	154	108	6.16	4.32	0.789581	0.635484
쌈크대배수구(1)	3344	1718	133.76	68.72	2.126326	1.837083
쌈크대배수구(2)	1837	899	73.48	35.96	1.866169	1.555820
배식대 아래선반(1)	4094	2105	163.76	84.20	2.214208	1.925312
배식대 아래선반(2)	4744	957	189.76	38.28	2.278205	1.582972
작업대(1)	996	135	39.84	5.40	1.600319	0.732394
작업대(2)	506	71	20.24	2.84	1.306211	0.453318
건조대(1)	2658	479	106.32	19.16	2.026615	1.282396
건조대(2)	197	35	7.88	1.40	0.896526	0.146128
건조대손잡이(1)	2520	398	100.80	15.92	2.003461	1.201943
건조대손잡이(2)	564	319	22.56	12.76	1.353339	1.105851
가스렌지(1)	1552	381	62.08	15.24	1.792952	1.182985
가스렌지(2)	2236	274	89.44	10.96	1.951532	1.039811
숯(1)	736	236	29.44	9.44	1.468938	0.974972
숯(2)	19586	571	783.44	22.84	2.894006	1.358696
도마(1)	542	76	21.68	3.04	1.336059	0.482874
도마(2)	742	80	29.68	3.20	1.472464	0.505150
앞치마(1)	31778	3130	1271.12	125.20	3.104187	2.097604
앞치마(2)	389	91	15.56	3.64	1.192010	0.561101
고무장갑(1)	161	121	6.44	4.84	0.808886	0.684845
고무장갑(2)	103	96	4.12	3.84	0.614897	0.584331

소독전후비교

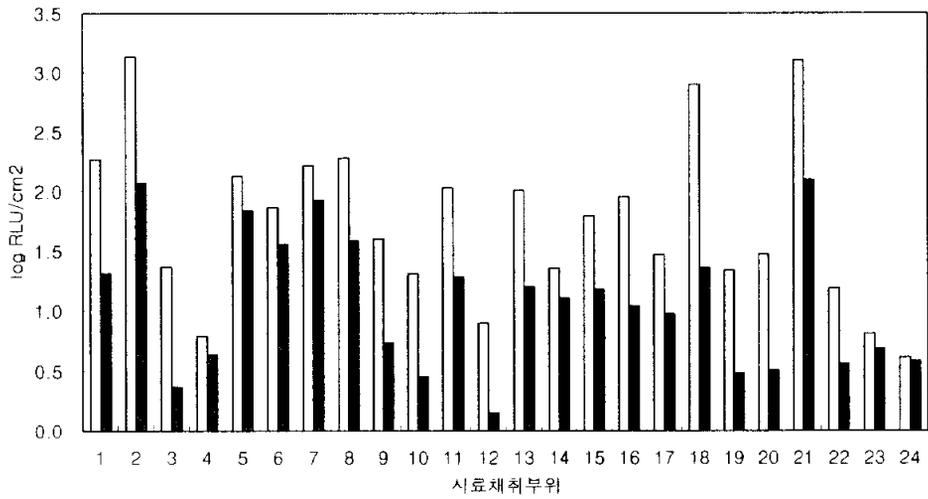


Fig.6. Effect of hygiene treatment between ATP bioluminescence method and Petri film method for various foodservice operations.

요 약

단체 급식 시설의 미생물적 위생상태를 평가하기 위해서 도마, 칼, 식판, 행주에 대하여 ATP bioluminescence와 표준평판 균수를 측정 비교하여 분석, 평가한 결과는 다음과 같다.

1. 도마, 칼, 식판, 행주에 대한 표준평판 균수의 허용기준으로 1cm² 당 40을 기준으로 하고 ATP bioluminescence는 800 RLU을 허용기준으로 하여 만족할 만한 수준과 시정할 수준으로 구분하여 위생상태를 평가하였을때 ATP bioluminescence 측정값과 표준평판 균수의 측정값은 95.9%의 일치도를 보였다.
2. ATP bioluminescence측정과 표준 평판 균수 측정으로 얻어진 결과에서 사용중인 도마, 칼, 식판, 행주의 전량이 허용기준 이하로 위생상태가 불량하여 즉각적인 조치가 필요하였다.
3. 도마, 칼, 식판, 행주의 용도별 분리사용은 거의 이루어지고 있지 않고 있다. 특히 칼과 도마는 교차오염의 가능성이 크므로 용도에 따라 구분하여 분리사용이 필요하였다.

감사의 글

평생 존경으로 모실 양지영 교수님께 이 글을 올립니다. 뒤늦게 시작한 공부, 학교생활을 즐겁게 보낼 수 있었던 것은 주위의 사랑과 관심이 있었기에 가능했으리라 생각합니다. 석사과정 중 많은 용기와 애정을 가져 주시고 이끌어 주시며 미흡한 저에게 오늘을 맞이할 수 있게 해주신 양지영 교수님께 진심으로 깊은 감사를 드립니다. 제 논문의 심사를 맡아주신 장동석 교수님과 이양봉 교수님께도 감사드리며 석사과정을 지도해주신 이근태 교수님, 전병수 교수님, 안동현 교수님, 김선봉 교수님께도 깊은 감사를 드립니다. 언제나 애정 어린 모습들로 반겨 주었던 실험실 식구들 항상 감사드리고 사랑 잊지 않겠습니다.

세 아이의 엄마임에 언제나 마음 걱정을 끼쳐 드린 사랑하는 우리 엄마 항상 건강하게 오래오래 제 곁에 계셔 주시구요 늦게나마 공부할 수 있는 바탕을 만들어준 친정언니, 오빠, 남동생에게도 진심으로 고맙고 사랑한다고 전하고 싶습니다. 사랑하는 연진, 혜진, 상진 아빠! 많은 애정으로 힘과 용기 주어서 정말 행복했습니다. 예쁘고 사랑스러운 연진, 혜진 공주님! 엄마 많이 도와주어서 힘수 있었고 즐거웠단다. 우리 가족의 재롱둥이 상진 왕자님! 엄마 공부할 수 있게 씩씩하게 자라 주어서 엄마는 너무나 행복했단다. 제 논문을 위해 많은 도움을 주신 분들께 진심으로 감사드립니다.

참 고 문 헌

Harrigan, W. F. and McCance, M. E. : Laboratory method in food and dairy microbiology, *Academic Press Inc., Ltd.*, New York. 1976

Seeger, K. and Griffiths, M. W. : Adenosine triphosphate bioluminescence for hygiene monitoring in health care institutions. *J Food protection.*, 57(6):509, 1994

강현미, 엄양섭, 안홍석, 김천제, 최경환, 정충일 : 식육 및 육가공 유가공 생산라인의 환경미생물오염도 측정을 위한 ATP 방법의 이용. *Journal of Food Hygiene and Safety*, 15(3):252, 2000

곽동경, 남순란, 김정리, 박신정, 서소영, 김성희, 최은희 : 공동조리 학교급식의 미생물적 품질보증을 위한 위험요인 분석, *한국조리과학회지*, 11(3):249, 1995

곽이성, 김천석, 송용범, 고성룡 : ATP-Bioluminescence를 이용한 인삼분말의 미생물 신속검사법. *고려인삼학회지*, 2001

김동한 : 위생과 식중독. 도서출판 광문각, 1998

김소희, 이용우 : 부산지역 대학 및 사업체 급식소의 위생관리 수행 수준에 관한 연구, *Journal of Food Hygiene and Safety*, 16(1):1, 2001

김정원, 김동연, 곽동경, 서희재 : 국내 의료기관의 급식위생 현황 분석, *한국조리과학회지*, 17(2):105, 2001

김종규 : 국내 급식위생관리의 현황고찰 및 발전방안. *Journal of Food Hygiene and Safety*, 15(3):186, 2000

김종규 : 일부 학교급식소 조리실의 위생관리에 관한 조사연구, *한국환경위생학회지* 29(2):87, 2003

남은정, 이연경 : 대구·경북지역 사업체급식소의 HACCP에 근거한 위생관리 실태조사. *대한영양사회 학술지*, 2001

노민정 : 학교급식 HACCP시스템 구축 실제. 한국보건산업진흥원 연구원,

문정원, 김소희, 강현주, 김 일 : 세시대 단체급식, 도서출판 효일, 2000

문주석 : 식품위생법해설, 식품과학과 산업 29(1):22, 1996

박영숙 : ATP bioluminescence Assay를 이용한 대학 급식시설의 위생상태 평가에 관한 연구. 한국조리과학회지, **16(2)**:195, 2000

박용만 : 단체급식에서의 HACCP 적용. 식품산업과 영양 **4(3)**:30, 1999

배현주, 전희정 : 급식소의 조리기기 및 작업환경에 대한 미생물학적 위해분석과 HACCP 제도 적용 후 위생개선효과. 한국조리학회지, **19(2)**:106, 2003

오세욱, 조진호, 이남혁 : 고등어 표피의 미생물 오염도 신속측정을 위한 ATP Bioluminescence assay. 한국식품과학회지, **31(5)**:1345, 1999

유화춘 : HACCP개념을 도입한 집단급식의 위생관리. 한국식품위생연구원 식품위생연구부, 2003

유화춘, 김정원 : 단체급식시설의 HACCP 시스템 적용을 위한 Generic HACCP Model 개발. 한국조리학회지, **16(3)**:232, 2000

은종방 : 식품미생물의 신속한 검색방법 및 항미생물제를 이용한 미생물의 저해, 식품과학과 산업, **29(1)**:15, 1996

이승용, 장영수, 최희진 : 우리나라의 HACCP제도 실시현황 및 추진 전망. 식품산업과 영양, 4(3):14~20, 1999

장미라, 광동경 : 사업체 단체급식소의 유형에 따른 급식운영실태 평가. 대한영양사회 학술지 3(1):64, 1997

정동관, 류은순 : 초등학교 단체급식소의 환경과 급식설비에 대한 미생물 평가, *J.Korean Soc. Food Sci. Nutr* 31(2):216, 2002

최근 5년간 식중독 발생률 분석자료 : 교육인적자원부, 2003