

Resazurin 환원법을 응용한 돈육의 신속 미생물 검사법에 관한 연구

임상동·김기성
한국식품개발연구원

Studies on Rapid Microbiological Testing Method of Fresh Pork by Applied Resazurin Reduction Test(RRT) Method

S. D. Lim and K. S. Kim
Korea Food Research Institute

ABSTRACT

In order to search for reliable rapid methods of estimating bacterial counts in pork, this study was tried to measure resazurin reduction time which is simple in experimental method, low in analytical cost, able to estimate bacterial count within short time. The results were summarized as follows;

Correlation coefficient between initial bacterial log count(25℃/72hr, Y) and resazurin reduction time(X) from blue color to pink color during incubation at 25℃ and 30℃ was higher than other conditions as -0.95 and -0.94, respectively. Considering correlation coefficient and reduction time, incubation temperature was compatible at 30℃, and regression equation(RE) was $Y = -0.4386X + 7.7870$. At a bacterial load of 10^2 cfu/cm², 10^3 cfu/cm² and 10^4 cfu/cm² in pork, reduction time was 13.2hr, 10.9hr and 8.6hr, respectively.

Correlation coefficient between initial bacterial log count(30℃/72hr, Y) and resazurin reduction time(X) from blue color to pink color during incubation at 30℃ was highest among other conditions as -0.93, and RE was $Y = -0.4171X + 7.5540$. At a bacterial load of 10^2 cfu/cm², 10^3 cfu/cm² and 10^4 cfu/cm² in pork, reduction time was 13.3hr, 10.9hr and 8.5hr, respectively.

Correlation coefficient between initial bacterial log count(35℃/72hr, Y) and resazurin reduction time(X) from blue color to pink color during incubation at 30℃ was highest among other conditions as -0.93, and RE was $Y = -0.3514X + 6.7513$. At a bacterial load of 10^2 cfu/cm², 10^3 cfu/cm² and 10^4 cfu/cm² in pork, reduction time was 13.5hr, 10.7hr and 7.8hr, respectively.

(Key words : Fresh pork, Resazurin reduction time, Rapid microbiological testing method)

I. 서 론

최근, 구제역, 광우병, 다이옥신 등이 문제가 되는 등 식품의 안전성과 건전성에 국민의 관심이 고조되고 있는 실정이다. 이와같이 식품의 안전성과 건전성을 확보하고 식중독을 방지하기 위하여 국제적으로 높이 평가를 받고 있고, FAO/WHO가 권장하는 위해요소 중점관리

기준(HACCP)의 활용이 식품 위생관리의 국제적인 추세가 되고 있다.

현재, 우리나라 축산업에 HACCP 제도를 도입하여 농림부에서는 유제품 및 육가공업체에서 우선 적용하여 왔으며, 도축업에도 현재 적용하고 있다. 그러나, 식육의 경우에는 위생관리에 중요한 미생물을 검사하는데 표준방법인 standard plate count method(표준평판법, SPC)을

사용하고 있어 많은 노동력과 검사시간이 48~72시간 소요됨에 따라 사후관리 밖에 적용을 못하고 있는 실정이기 때문에 신속한 결과를 알 수 있는 통상법의 필요성을 인식하게 되었다.

본 기술을 통하여 식육의 세균수를 판별하는 screening test에 이용 가능하기 때문에 도축장에서 도살에서 부터 식육으로 해체될 때 까지 단계별 오염원인이 추적가능하며, 유통기간을 설정하거나 부패직전의 식육의 품질을 신속히 판별함으로써 경제적 손실감소는 물론 위생적인 관리에 이용될 수 있다.

식육의 신속세균검사장비로는 Bactometer, Bactrac, Lumac 등이 있는데 각 기종별로 SPC 법과의 상관계수를 보면 Impedance법인 Bactometer와 Bactrac은 $r = -0.83 \sim -0.93$ (Chen 등, 1993; Pless와 Reisinger, 1995)이며, ATP법인 Lumac biocounter는 $r = 0.71 \sim 0.95$ (Orth와 Steigert, 1996; Steigert와 Kirschner, 1997; Werlein, 1996; Werlein과 Fricke, 1975)라고 보고되고 있다. 한편, resazurin reduction test(RRT)법은 원유의 미생물학적 품질을 평가하는데 사용(Luck, 1982; Kroll, 1989)되어 왔지만 가리비(Webbs 등, 1972)와 신선우육(Dodsworth와 Kempton, 1977)에도 적용되어 왔다.

이 방법은 산화환원전위에 의해 레자주린이 청색에서 분홍색(resorufurin)과 무색(dehydro resorufurin)으로 변하기 때문에 세균분포에 따라 색소환원이 좌우되므로 식육내 중온성균이 많으면 기존의 RRT법(Edmondson 등, 1985)의 배양온도가 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 이므로 정확도가 높았으나, 최근 식육의 저장온도가 점차 낮아짐에 따라 식육내의 세균분포가 저온성균이 많아지게 되어 이 배양온도로는 정확도가 낮아지게 된다. 따라서 본 연구는 배양온도를 달리하여 실험방법이 간단하고 검사비용이 저렴하며, 단시간내에 세균수를 측정할 수 있는 현장적용 가능한 방법을 확립하기 위하여 시도하였다.

II. 재료 및 방법

1. 식육의 수집

시료로 사용한 돈육은 1999년 11월부터 2001

년 9월까지 경기도 지역의 백화점이나 대형 슈퍼에 비치되어 있는 냉장육을 사용하였으며, 검사시료는 아이스겔이 내장된 아이스박스를 이용하여 $2\sim4^\circ\text{C}$ 로 운반되었다. 실험실까지 걸리는 시간은 약 1시간 정도이며, 실험실에 도착한 즉시 총균수 검사를 실시하였다.

2. 총균수 검사

식육 표면의 일정면적(100cm^2)을 일정량($5\sim10\text{ml}$)의 희석액으로 습한 면봉으로 문질러 일정량($45\sim90\text{ml}$)의 희석액이 있는 시료채취용기에 넣고 세게 진탕하여 부착균의 현탁액을 조제하여 시험용액으로 하였다. 세균수 검사는 0.1% peptone-용액으로 적정 희석하여 pour plate method로 plate count agar에 접종한 후 축산물의 가공기준 및 성분규격(1998), ISO 규격(1988), Ingram과 Simonsen(1980) 방법으로 각각 35°C 에서 48시간, 30°C 에서 72시간, 25°C 에서 72시간 배양하여 나타난 colony수를 계측하였다.

3. Resazurin reduction test

차광된 250ml 플라스크에 멸균증류수 200ml와 resazurin 11mg을 넣어 완전히 용해시킨 후 냉각하여 시험용액 10ml에 20% 탈지분유 10ml와 조제 resazurin액 1ml 비율로 넣어 25°C , 30°C , 35°C 별로 배양하는 동안 색조판(한국공업협회)을 이용하여 청자색(10PB 7/5.5), 보라색(SP 7/4) 및 분홍색(10P 7/8)으로 각각 환원되는 시간(hour)을 측정하였다.

4. 자료 분석

실험에서 얻어진 시료의 색소 환원시간과 SPC값은 Microsoft Excel 97(Microsoft Corp., 1997)에 입력하여 상관계수 및 회귀방정식을 산출하였다.

III. 결과 및 고찰

총균수 배양온도를 35°C , 30°C , 25°C 별로 구

분하였고, 레지주린이 첨가된 돈육액의 배양온도 역시 35℃, 30℃, 25℃별로 배양하여 돈육의 총균수에 대해 SPC값과 색도별 레지주린 환원시간과의 상관관계를 조사함으로써 표준방법의 대체방법으로서 현장적용 가능성 여부를 판가름해 보았다.

돼지고기의 총균수를 검사하기 위해 25℃에서 72시간 배양한 SPC값과 색도별 레지주린 환원시간과의 상관관계는 표 1과 같다.

표 1에서 보는 바와 같이 총균수(25℃/72hr)와 청색에서 환원색으로 환원되는 시간의 상관관계수(r)는 25℃와 30℃에서 분홍색으로 변할 때가 가장 상관관계가 높았다. 청색에서 청자색으로 환원되는 시간의 상관관계는 25℃로 배양할 때 -0.49로서 가장 높았고, 청색에서 보라색으로 환원되는 시간의 상관관계수(r)는 30℃로 배양할 때 -0.78로서 가장 높았으며, 청색에서 분홍색으로 환원되는 시간의 상관관계수(r)는 25℃로 배양할 때 -0.95를 나타내었다. 이때 총균수를 산출하는데 소요되는 시간은 돼지고기의 총균수가 10², 10³, 10⁴cfu/cm²일 경우 25℃로 배양할 때 청색에서 청자색으로 환원되는 시간은 각각 6.9시간, 4.9시간, 2.9시간이었고, 30℃로 배양할 때 청색에서 보라색으로 환원되는 시간은 각각 10.3시간, 8.0시간, 5.7시간이었으며, 청색에서 분홍색으로 환원되는 시간은 25℃로 배양할 때 각각 16.0시간, 13.1시간, 10.2시간이었다. 이는 Venkitanarayanan 등(1997)이 beef steak을 대상으로 SPC(25℃/48hr)와 분

홍색으로 환원되는 시간간의 상관관계수가 0.94라고 한 값과 유사하였고, 식육에 오염된 세균수가 10⁶cfu/cm²에서 평균 환원시간이 5.5시간 소요되었다고 보고한 결과보다 동일조건에서 4.3시간 소요됨으로써 많은 시간단축을 보였다. 이는 레지주린 환원검사법에서 시험용액에 탈지분유를 첨가함으로써 균의 성장이 촉진되었기 때문으로 사료된다. 한편 상관관계수와 검사시간을 감안할 때 레지주린 배양온도를 25℃보다는 30℃로 배양하는 것이 적합한 것으로 판단된다.

돼지고기의 총균수를 검사하기 위해 30℃에서 72시간 배양한 SPC값과 색도별 레지주린 환원시간과의 상관관계는 표 2와 같다.

표 2에서 보는 바와 같이 총균수(30℃/72hr)와 청색에서 환원색으로 환원되는 시간의 상관관계수(r)는 25℃와 30℃에서 분홍색으로 변할 때가 가장 상관관계가 높았다.

청색에서 청자색으로 환원되는 시간의 상관관계는 25℃로 배양할 때 -0.43으로서 가장 높았고, 청색에서 보라색으로 환원되는 시간의 상관관계수(r)는 30℃로 배양할 때 -0.76으로 가장 높았으며, 청색에서 분홍색으로 환원되는 시간의 상관관계수(r)는 30℃로 배양할 때 -0.93을 나타내었다. 이때 총균수를 산출하는데 소요되는 시간은 돼지고기의 총균수가 10², 10³, 10⁴cfu/cm²일 경우 25℃로 배양할 때 청색에서 청자색으로 환원되는 시간은 각각 7.5시간, 5.2시간, 2.9시간이었고, 30℃로 배양할 때 청색에

Table 1. Relationship between bacterial log count(25℃/72hr) and resazurin reduction time from blue color to reduction color at 25℃, 30℃ or 35℃, respectively

Temp.	RRT method Reduction color	Sample number	Regression equation	Correlation coefficient	Detection time(hr)		
					Y=2	Y=3	Y=4
25℃	Bluish purple	82	Y = -0.5070X + 5.4834	-0.49	6.9	4.9	2.9
	Purple	81	Y = -0.3046X + 6.0807	-0.72	13.4	10.1	6.8
	Pink	83	Y = -0.3421X + 7.4762	-0.95	16.0	13.1	10.2
30℃	Bluish purple	120	Y = -0.4176X + 5.3081	-0.43	7.9	5.5	3.1
	Purple	120	Y = -0.4422X + 6.5404	-0.78	10.3	8.0	5.7
	Pink	122	Y = -0.4386X + 7.7870	-0.94	13.2	10.9	8.6
35℃	Bluish purple	120	Y = -0.4481X + 5.1844	-0.35	7.1	4.9	2.6
	Purple	121	Y = -0.5813X + 6.6835	-0.72	8.1	6.3	4.6
	Pink	123	Y = -0.4495X + 7.4695	-0.78	12.2	9.9	7.7

주) Y = Initial bacterial log count, X = Reduction time from blue color to reduction color.

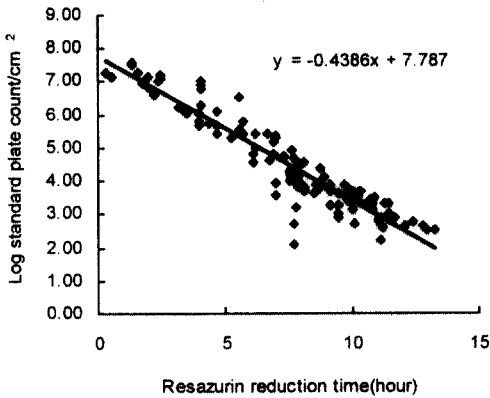


Fig. 1. Scatter diagram and regression line showing the relationship between bacterial log count(25°C/72hr) and resazurin reduction time from blue color to pink color at 30°C.

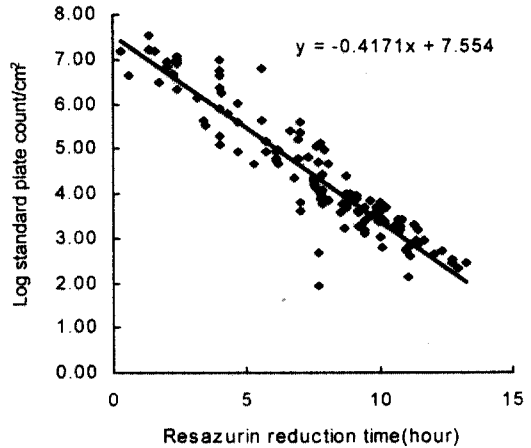


Fig. 2. Scatter diagram and regression line showing the relationship between bacterial log count(30°C/72hr) and resazurin reduction time from blue color to pink color at 30°C.

서 보라색으로 환원되는 시간은 각각 10.4시간, 8.0시간, 5.6시간이었으며, 청색에서 분홍색으로 환원되는 시간은 30°C로 배양할 때 각각 13.3시간, 10.9시간, 8.5시간이었다.

따라서 상관계수와 검사시간을 감안할 때 레자주린 배양온도는 30°C로 배양할 때가 적합한 것으로 판단된다.

돼지고기의 총균수를 검사하기 위해 35°C에서 48시간 배양한 SPC값과 색도별 레자주린 환원시간과의 상관관계는 표 3과 같다.

표 3에서 보는 바와 같이 총균수(35°C/48hr)와 청색에서 환원색으로 환원되는 시간의 상관

계수(r)는 30°C에서 분홍색으로 변할 때가 가장 상관관계가 높았다. 30°C로 배양할 때 청색에서 청자색으로 환원되는 시간의 상관관계는 -0.47이었고, 청색에서 보라색으로 환원되는 시간의 상관계수(r)는 -0.77이었으며, 청색에서 분홍색으로 환원되는 시간의 상관계수(r)는 -0.93을 나타내었다. 이때 총균수를 산출하는데 소요되는 시간은 돼지고기의 총균수가 10², 10³, 10⁴cfu/cm²일 경우 청색에서 청자색으로 환원되는 시간은 각각 7.6시간, 4.9시간, 2.2시간이었고, 청색에서 보라색으로 환원되는 시간은 각

Table 2. Relationship between bacterial log count(30°C/72hr) and resazurin reduction time from blue color to reduction color at 25°C, 30°C or 35°C, respectively

RRT method		Sample number	Regression equation	Correlation coefficient	Detection time(hr)		
Temp.	Reduction color				Y=2	Y=3	Y=4
25°C	Bluish purple	82	Y = -0.4368X + 5.2785	-0.43	7.5	5.2	2.9
	Purple	81	Y = -0.2770X + 5.8742	-0.68	14.0	10.4	6.8
	Pink	83	Y = -0.3147X + 7.1766	-0.91	16.4	13.3	10.1
30°C	Bluish purple	120	Y = -0.3898X + 5.1814	-0.42	8.2	5.6	3.0
	Purple	120	Y = -0.4185X + 6.3603	-0.76	10.4	8.0	5.6
	Pink	122	Y = -0.4171X + 7.5540	-0.93	13.3	10.9	8.5
35°C	Bluish purple	120	Y = -0.4072X + 5.0472	-0.33	7.5	5.0	2.6
	Purple	121	Y = -0.5517X + 6.5026	-0.71	8.2	6.3	4.5
	Pink	123	Y = -0.4228X + 7.2222	-0.77	12.4	10.0	7.6

주) Y = Initial bacterial log count, X = Reduction time from blue color to reduction color.

Table 3. Relationship between bacterial log count(35℃/48hr) and resazurin reduction time from blue color to reduction color at 25℃, 30℃ or 35℃, respectively

RRT method		Sample number	Regression equation	Correlation coefficient	Detection time(hr)		
Temp.	Reduction color				Y=2	Y=3	Y=4
25℃	청자색	82	$Y = -0.3501X + 4.8414$	-0.39	8.1	5.3	2.4
	보라색	81	$Y = -0.2467X + 5.4597$	-0.68	14.0	10.0	5.9
	분홍색	84	$Y = -0.2484X + 6.3039$	-0.85	17.3	13.3	9.3
30℃	청자색	124	$Y = -0.3688X + 4.8183$	-0.47	7.6	4.9	2.2
	보라색	124	$Y = -0.3618X + 5.7722$	-0.77	10.4	7.7	4.9
	분홍색	126	$Y = -0.3514X + 6.7513$	-0.93	13.5	10.7	7.8
35℃	청자색	124	$Y = -0.3799X + 4.6782$	-0.36	7.0	4.4	1.8
	보라색	125	$Y = -0.4741X + 5.8763$	-0.71	8.2	6.1	4.0
	분홍색	127	$Y = -0.3583X + 6.4509$	-0.76	12.4	9.6	6.8

주) Y = Initial bacterial log count, X = Reduction time from blue color to reduction color.

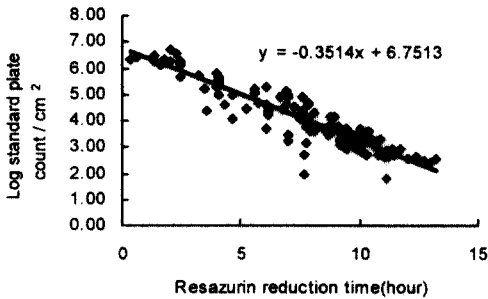


Fig. 3. Scatter diagram and regression line showing the relationship between bacterial log count(35℃/48hr) and resazurin reduction time from blue color to pink color at 30℃.

각 10.4시간, 7.7시간, 4.9시간이었으며, 청색에서 분홍색으로 환원되는 시간은 각각 13.5시간, 10.7시간, 7.8시간이었다. 35℃로 배양하면서 분홍색으로 환원되는 시간과의 상관계수($r = -0.76$)와 30℃로 배양하면서 분홍색으로 환원되는 시간과의 상관계수($r = -0.93$)는 Losonczy와 Incze(1969)가 돼지고기를 대상으로 SPC(37℃/24hr)와 RRT법을 이용하여 37℃로 배양하면서 분홍색으로 환원되는 시간과의 상관계수가 $-0.749(n=37)$ 이었다고 한 결과와 비교했을 때 35℃는 비슷한 반면 30℃는 높은 상관성을 보임에 따라서 레자주린 배양온도에 크게 영향을 받는 것으로 나타났다.

표 1~표 3을 종합해 볼 때 Werlein(1996)이 bioluminescence법으로 우도체의 표면 미생물수를 측정했을 때 SPC법과의 상관계수(r)가 0.95

이었다는 보고와 유사한 반면 Steigert와 Kirschner(1997)는 0.71이었다는 보고보다는 상관관계가 높게 나왔다. 또한 Pless와 Reisinger(1995)는 Bactrac 4100 impedance 법으로 260개 시료에 대해 SPC법과의 상관계수(r)가 $-0.83 \sim -0.87$ 이었다는 보고보다 높은 상관성을 보였으며, 검사시간은 10^4 cfu/cm²일 경우 9.6시간, 10^6 cfu/cm²일 경우 4.2시간 소요되었다고 한 결과보다 검사시간이 단축되었다.

이와같이 온도간에는 상관계수가 30℃, 25℃, 35℃ 순이었고, 환원색간에는 분홍색, 보라색, 청자색 순으로 상관계수가 높았으며, 검사시간은 35℃, 30℃, 25℃ 순으로 짧았다.

이를 토대로 상관계수와 검사시간을 감안할 때 30℃에서 분홍색으로 환원되는 시간이 가장 적합한 것으로 나타났다.

따라서 신속검사법으로는 30℃에서 분홍색으로 환원되는 시간이 외국의 신속세균검사기와 비교해볼 때 자동방법은 아니지만 상관계수가 비슷하거나 높고, 검사시간이 단축되었으며, 검사비용이 시료당 거의 들지 않는 장점이 있어 대체 가능한 것으로 나타났다.

IV. 요약

본 연구는 실험방법이 간단하고 분석비용이 저렴하며, 단시간내에 세균수를 측정할 수 있는 현장적용 가능한 방법을 확립하기 위하여 냉장우육의 총균수를 표준평판배양법과 배양온도를 25℃, 30℃, 35℃ 별로 레자주린 환원색과

환원시간을 측정하여 상관관계를 산출하였다.

연구결과를 보면, 총균수(25℃/72시간, Y)와 레자주린 환원시간(X)과의 상관계수는 RRT (Resazurin reduction test) 배양온도가 25℃와 30℃, 환원색은 청색에서 분홍색으로 변할 때가 각각 -0.95와 -0.94로서 가장 높았다. 상관계수와 환원시간을 감안할 때 RRT 배양온도는 30℃가 적합하였으며, 이때 회귀방정식은 $Y = -0.4386X + 7.7870$ 이었으며, 돼지고기의 총균수가 10^2 , 10^3 , 10^4 cfu/cm²일 경우 검사시간은 13.2시간, 10.9시간, 8.6시간이었다. 총균수(30℃/72시간, Y)와 레자주린 환원시간(X)과의 상관계수는 RRT 배양온도가 30℃, 환원색은 청색에서 분홍색으로 변할 때가 -0.93으로서 가장 높았다. 이때 회귀방정식은 $Y = -0.4171X + 7.5540$ 이었으며, 돼지고기의 총균수가 10^2 , 10^3 , 10^4 cfu/cm²일 경우 검사시간은 13.3시간, 10.9시간, 8.5시간이었다. 총균수(35℃/48시간, Y)와 레자주린 환원시간(X)과의 상관계수는 RRT 배양온도가 30℃, 환원색은 청색에서 분홍색으로 변할 때가 -0.93으로서 가장 높았다. 이때 회귀방정식은 $Y = -0.3514X + 6.7513$ 이었으며, 돼지고기의 총균수가 10^2 , 10^3 , 10^4 cfu/cm²일 경우 검사시간은 13.5시간, 10.7시간, 7.8시간이었다.

V. 사 사

본 연구는 1999년도 농림부 농림기술개발사업에 의해 수행된 결과의 일부이며 지원에 감사드립니다.

VI. 인 용 문 헌

1. 축산물의 가공기준 및 성분규격. 1998. 농림부.
2. Chen, H. C., Ding, H. C. and Chang, T. C. 1993. Impedance based method for the rapid enumeration of total aerobic bacterial load of pork hamburger and its raw materials. J. the Chinese Agricultural Chemical Society 31(3):351.
3. Dodsworth, P. J. and Kempton, A. G. 1977. Rapid measurement of meat quality by resazurin reduction II. Industrial Application. J. Inst. Can. Sci. Technol. Aliment. 10:158.
4. Edmondson, J. E., Golden, R. and Wedle, D. B. 1985. Reduction Methods. In Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 15th Ed.

pp.259-264, American Public Health Association, Washington, D. C.

5. Ingram, M. and Simonsen, B. 1980. Meat and meat products. In: Microbial Ecology of Foods, Vol 2. Food commodities, pp. 333-409, Academic Press, New York.
6. ISO. 1988. Meat and meat products-enumeration of microorganism-colony count technique at 30℃ (reference method). ISO 2293, 2nd edition. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
7. Kroll, R. G. 1989. Dye reduction and other colorimetric methods for the assessment of microbial contamination. In Rapid Methods in Food Microbiology, M. R. Adams, and C. F. A. Hope, (Ed.), p.191-237. Elsevier Publ. Amsterdam.
8. Losonczy, M. and Incze, K. 1969. Rapid method for estimation of microbiological quality of meat and meat products. Proceedings of the European Meeting of meat - research - workers; 15:118 (sumrn III) 31.
9. Luck, H. 1982. Reduction tests for the determination of the bacteriological quality of raw milk. Kieler Milchwirt. Forschung. 132:1789.
10. Orth, R. and Steigert, M. 1996. Practical experience in the ATP-bioluminescence measuring technique to control hygiene after cleaning of a meat plant. Fleischwirtschaft. 76(1):40.
11. Pless, P. and Reisinger, T. 1995. Using the impedance splitting method for quick determination of the surface bacterial count on carcasses. Fleischwirtschaft. 75(9):1149.
12. Steigert, M. and Kirschner, T. 1997. Practical application of the bioluminescence method. Acceptance checking, using a meat cutting factory as an example. Fleischwirtschaft. 77(5):412.
13. Venkitanarayanan, K. S., Faustman, C., Hoagland, T. and Berry, B. W. 1997. Estimation of spoilage bacteria load on meat by fluorescein diacetate hydrolysis or resazurin reduction. J. Food Science. 62(3):601.
14. Webbs, N. B., Thomas, F. B., Busta, F. F. and Kerr, L. S. 1972. Evaluation of scallop meat quality by the resazurin reduction technique. J. Milk Food Technol. 35:664.
15. Werlein, H. D. 1996. Determination of the microbial load on pork and beef carcasses by means of the bioluminescence method. Fleischwirtschaft. 76(2):179.
16. Werlein, H. D. and Fricke, R. 1996. ATP bioluminescence for rapid determination of the microbiological quality of poultry meat. Archiv fuer Gefluegelkunde. 60(5):212.

(접수일자 : 2002. 7. 3 / 채택일자 : 2002. 8. 9)