

축·수산식품 중 미생물 분석을 위한 건조필름법 평가

조미희 · 배은경 · 하상도¹ · 박영서² · 목철균² · 홍관표³ · 김상필³ · 박지용*
연세대학교 생명공학과, ¹중앙대학교 식품공학과, ²경원대학교 식품생물공학과, ³한국쓰리엠주식회사

Evaluation of Dry Rehydratable Film Method for Enumeration of Microorganisms in Meat, Dairy and Fishery Products

Mi-Hee Cho, Eun-Kyung Bae, Sang-Do Ha¹, Young Seo Park², Chul Kyoon Mok²,
Kwan Pyo Hong³, Sang Phil Kim³, and Jiyong Park*

Department of Biotechnology, Yonsei University

¹Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University

²Department of Food and Bioengineering, Kyungwon University

³3M Korea Company

Contents of total aerobic bacteria, coliform, *Escherichia coli*, yeast, mold, and *Staphylococcus aureus* in meat, dairy, and fishery products were analyzed by dry rehydratable film method using 3M Petrifilm™ and compared against those obtained through conventional method. Two methods showed high correlations of 0.990-0.999, 0.975-0.999, 0.979-0.987, 0.978-0.984, and 0.999 for total aerobic bacteria, yeast and mold, coliform, *E. coli*, and *S. aureus*, respectively; therefore, dry rehydratable film method using 3M Petrifilm™ offers acceptable alternative to conventional method for enumeration of microorganisms in meat, dairy, and fishery products.

Key words: microbial analysis, conventional method, dry rehydratable film method, 3M Petrifilm™

서 론

식품 중에 존재하는 지표 미생물의 확인시험은 식품의 안전성 평가에 매우 중요하다. 이러한 식품의 안전성 평가에 사용되는 주요 지표 미생물들의 검출 시험법에는 일반적인 표준 평판법, 최확수법(most probable number), 생화학적 확인시험법, 응집시험법, spiral plate법, microcalorimetry법, enzyme linked immunosorbent assay(ELISA), 최근 식품공전상에 등재된 건조 필름법 등이 있다(1-3). 이 중 전통적인 미생물 시험법은 많은 시간과 노동력을 요구하는 방법들로 구성되어 있기 때문에 비효율적이며 신속한 결과를 요구하는 시험에는 적합하지 않다. 대장균군과 대장균의 경우 균의 유무를 검사하는 정성시험을 거친 후 최확수법에 의한 정량시험으로 균수를 측정하는데, 확정에 6일이 소요되는 등 많은 시간과 노동력이 요구되기 때문에 신속한 결과를 요구하는 경우에는 실효성이 매우 낮은 방법이다. 또한 균수가 높게 측정될 수 있고, 반복 실험시 실험자 간 또는 실험실 간의 오차가 발생하기도 하는 단점이 있다. 이 밖에도 violet red bile agar(VRBA)법(4)과 Anderson-Baird-Parker법(5) 등 여러 가지 방법이 존재하지만 일반적으로 최확

수법이 가장 널리 사용되고 있으며 기존의 식품공전에도 최확 수법이 수록되어 있다. 효모와 곰팡이를 분리, 계수하는 시험법의 경우 현재 여러 배지가 사용되고 있는데 낮은 pH 조건에서는 대부분 세균들의 생육이 저해되기 때문에 일반 세균의 생육을 배제하기 위하여 일반적으로 산성 배지가 사용된다. 그러나 이 경우 내산성 세균이 생육하는 문제점이 발생되고 있으며, 생육력이 비교적 약한 효모는 산성 상태에서 정상적으로 생육하기 힘들기 때문에 검출되지 않기도 한다. 표준한천법에 의해 potato dextrose agar 배지를 사용하여 효모와 곰팡이 등 진균류를 검출하는 전통적인 방법은 진균류 이외의 일반세균도 생육이 가능하여 선택성이 낮다는 문제점이 있다. 황색포도상구균의 검출방법도 마찬가지로 전통적인 방법은 시험과정이 복잡하고 확인시험까지 5일 이상이 소요되는 등의 문제점이 있다.

이와 같은 전통적인 미생물 시험법과는 달리 최근 식품공전상에 등재된 건조필름법은 미생물 실험에 소요되는 시간이 짧고, 검사결과를 단 시간에 얻을 수 있는 미생물 시험법이다. 건조필름법은 표준화된 공정에 의하여 생산되는 sample-ready plate 이므로 실험자가 직접 배지를 만드는 agar plate법에서 발생할 수 있는 실험자 간 또는 실험실 간의 오차를 방지해 준다. 또한, 기존의 전통적인 시험법에 비하여 빠른 시간에 검사 결과를 알 수 있으며, 모든 검사 결과는 확정검사 결과이므로, 특히 대장균, 대장균군, 황색포도상구균의 경우 한번의 점종과 배양으로 단시간에 결과를 얻을 수 있고, 염색된 균체가 얻어짐으로써 다른 유사한 모양의 입자와 쉽게 구별될 수 있다.

*Corresponding author: Jiyong Park, Department of Biotechnology, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea
Tel: 82-2-2123-2888
Fax: 82-2-362-7265
E-mail: foodpro@yonsei.ac.kr

현재 산업적인 측면에서 빠르고 정확한 실험결과를 얻어야 하는 경우가 많아짐에 따라 건조필름 배지의 수요증가가 예상되므로, 이에 대비하여 기존의 전통적인 미생물시험법과 건조필름법 간의 비교 및 타당성 연구가 선행되어야 할 것으로 사료된다. 따라서 본 연구에서는 햄, 우유, 아이스크림 등 축산식품과 어묵, 게맛살 등 수산식품을 대상으로 일반세균, 대장균군(coliform), 대장균(*Escherichia coli*), 효모(yeast), 곰팡이(mold), 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 등 식품 안전성 평가의 지표가 되는 미생물의 정량시험을 전통적인 미생물 시험법과 건조필름법을 이용하여 실시하고 두 방법간의 상관관계를 비교 분석하였다.

재료 및 방법

재료

본 연구에 사용된 식품 시료는 축산식품, 수산식품으로 구분하여 축산식품에는 아이스크림(ice cream), 우유(milk), 햄(ham)을 사용하였고, 수산식품에는 어묵(fish paste)과 게맛살(imitation crab meat)을 사용하였다. 전통적인 미생물 시험법에 사용된 모든 배지는 Difco사(Detroit, MI, USA) 제품을 구입하여 사용하였으며, 건조필름법을 이용한 미생물 분석을 위한 배지는 한국 3M 주식회사로부터 공급 받았다. 건조필름배지는 Petrifilm™ aerobic count plate(PAC, 3M), Petrifilm™ coliform count plate(PCC, 3M), Petrifilm™ *E. coli*/coliform count plate(PEC, 3M), Petrifilm™ yeast and mold count plate(PYM, 3M), Petrifilm™ staph express count plate(STX, 3M)를 사용하였다. 건조필름배지 상에 배양된 균의 사진을 Fig. 1에 제시하였다.

재료의 전처리

식품시료에 존재하는 일반세균과 효모, 곰팡이의 정량분석을 위해 식품시료를 37°C에서 일정 기간 동안 저장하면서 12시간 간격으로 채취하였다. 우유 등의 액상식품은 여과지(Whatman No. 2 filter membrane)를 이용하여 여과한 후 고형성분이 제거된 액상성분을 시료로 사용하였다. 페이스트상인 아이스크림, 고형식품인 어묵, 게맛살과 햄은 식품 중량의 9배가 되는 멸균 증류수를 첨가하여 stomacher plastic bag(Nasco Whirl-pak filter bag, USA)에 넣고 stomacher(Aes Mix-2, France)를 사용하여 120초간 균질화한 후 액상부위를 수거하여 미생물시험을 실시하였다.

본 연구에 사용한 식품 시료는 시중에서 판매, 유통중인 제품을 구입하여 본 실험에 사용하였다. 대장균군과 대장균, 황색포도상구균 분석의 경우 식품 시료에 각각의 균을 접종하여 사용하였다. 대장균군과 대장균, 황색포도상구균의 정량분석은 일반세균과 효모, 곰팡이의 정량분석과 동일한 방법으로 액상부위를 수집한 후 각 시료에 10², 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷ CFU/mL가 되도록 대장균(대장균군과 대장균의 정량분석)과 황색포도상구균(황색포도상구균의 정량분석)을 접종한 후 1일간 37°C에서 저장한 다음 시료를 채취하여 건조필름 제조사의 실험방법에 의한 건조필름법과 기존의 식품공전상의 전통적인 미생물 시험법을 실시하여 분석하였다. 단, 햄을 사용하여 효모를 정량할 경우에는 햄 중량의 9배가 되는 멸균 증류수를 stomacher plastic bag에 넣고 stomacher를 사용하여 120초간 균질화하고 액상부위에 10², 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷ CFU/mL가 되도록 효모를 접종한 후 3일간 25°C에서 저장한 다음 시료를 채취하여 분석하였다.

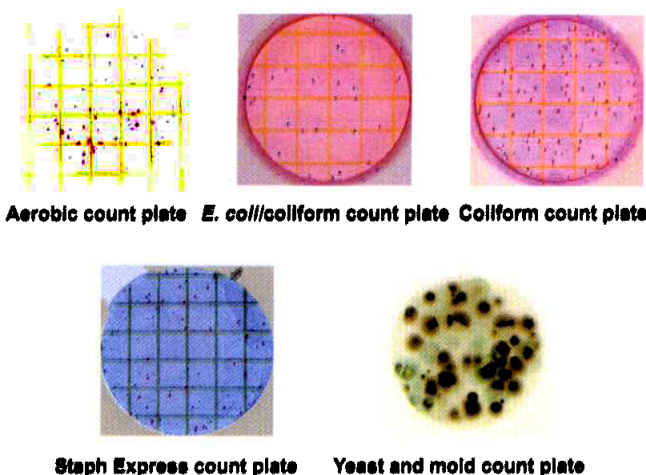


Fig. 1. Colony of dry rehydratable film.

사용 균주

Escherichia coli(ATCC 25922)와 *Staphylococcus aureus*(KCCM 12103)를 시험균주로 선정하여 접종하였으며, 그 외의 시료들은 자체내의 자연균총을 분석하였다.

전통적인 방법에 의한 미생물 분석

식품 시료에 대한 미생물 분석은 식품공전(3)에 수록된 기존의 전통적인 방법에 준하여 다음과 같이 실시하였다. 일반세균 수의 경우 비선택배지인 표준한천배지 내에서 발육할 수 있는 중온균의 수를 측정하는 표준 평판법에 의해 산출하였다. 시험용액을 0.1% 펩톤수로 단계적으로 희석한 희석액 1 mL를 멸균 petri dish에 취하여 표준한천배지인 plate count agar(PCA, Difco, Detroit, MI, USA)를 약 15 mL 분주하여 잘 섞고 냉각 응고시켰다. 확산 집락의 발생을 억제하기 위하여 다시 표준한천배지 3-5 mL를 가하여 중첩시켰다. 냉각 응고시킨 petri dish를 거꾸로 하여 35°C에서 24-48시간 동안 배양한 후 1 평판당 30-300개의 집락을 생성한 평판을 택하여 집락수를 계수하였다. 대장균군은 수 단계의 연속한 동일희석도의 검체를 유당부이온 발효관에 접종하여 대장균군의 존재 여부를 시험하고 그 결과로부터 확률론적인 대장균군의 수치를 산출하여 이것을 최확수로 표시하는 방법인 최확수법을 이용하였다. 대장균의 경우엔 시험용액 10 mL, 1 mL 및 0.1 mL를 각각 EC(EC Medium, Difco, Detroit, MI, USA) 배지에 접종한 다음 44.5°C에서 24시간 배양하였다. 그 때에 가스발생을 인정한 발효관을 대장균 양성이라고 판정하였다. 이 양성관으로부터 식품공전에 수록된 최확수표에 따라 검체 100 mL 중의 대장균수를 산출하였다. 효모 및 곰팡이의 측정방법은 총 세균수 측정방법에 준하여 시험하였다. 단, 배지는 멸균된 10% 주석산을 무균적으로 가하여 pH를 3.5로 조정된 potato dextrose agar(PDA, Difco, Detroit, MI, USA)를 사용하여 25°C에서 5-7일간 배양한 후 발생한 집락수를 계산하였다. 황색포도상구균의 경우도 식품공전에 수록된 방법에 준하여 10% NaCl을 첨가한 tryptic soy broth(TSB, Difco, Detroit, MI, USA)에 증균한 후 만니톨 식염한천배지로 분리한 다음 nutrient agar(NA, Difco, Detroit, MI, USA)에서 배양하고 생성된 집락에 그람 염색을 실시하였다. 그람 염색결과 그람양성구균에 대하여 혈청 응집반응을 실시함으로써 황색포도상구균을 확인하였다.

건조필름법에 의한 미생물 분석

건조필름 제조사인 3M 주식회사의 실험방법에 따라 실시하였다. 일반세균수의 측정을 위해 사용한 PAC는 2장의 film으로 구성되어 하부 film에는 수용성 겔과 탈수된 영양성분으로 덮여 있고 상부 film에는 겔화 물질과 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride(TTC)로 덮여있다. 배양액을 film 사이에 접종하고 32°C에서 24-48시간 동안 배양한 후 생성된 적색 콜로니를 일반세균으로 계수하였다. 대장균군 수의 측정을 위해 사용한 PCC는 2개의 film 사이에 violet red bile agar(VRBA, Difco, Detroit, MI, USA) 배지가 탈수되어 있으며 대장균군은 배지에 첨가되어 있는triphenyltetrazolium을 환원시킴으로써 적색 콜로니를 형성하고 lactose를 발효시켜 가스를 생성한다. 이 가스는 film에 포집되어 콜로니 주위에 하나 또는 하나 이상의 작은 가스방울을 형성한다. 배양액은 film 사이에 접종한 후 35°C에서 배양하여 24시간 후에 가스방울이 붙어 있는 적색 콜로니를 계수하였다. 대장균 수의 측정을 위해 사용한 PEC에는 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide (BCIG)가 첨가되어 있어 대장균은 β-glucuronidase에 의해 BCIG가 분해됨으로써 가스방울이 붙어 있는 청색 콜로니로 관찰된다. 배양액을 film 사이에 접종한 후 35°C에서 배양하여 24-48시간 후에 가스방울이 붙어 있는 청색 콜로니를 계수하였다. 효모 및 곰팡이의 측정을 위해 사용한 PYM에는 항생물질과 지시약이 첨가된 영양성분을 포함하는 film 형태로 되어 있어, 효모와 곰팡이를 하나의 배지에서 동시에 측정할 수 있는 선택성을 가진다. 핑크에서 녹색의 빛깔을 나타내며 작고 가장자리 부분이 명확히 구분되는 것을 효모균으로 계수하였고, 다양한 색상으로 나타나며 큰 공간을 차지하고 가장자리 부분이 명확히 구분되지 않는 것을 곰팡이균으로 계수하였다. 황색포도상구균의 정량분석을 위해 사용한 STX에는 황색포도상구균이 생산하는 staphylococcal 내열성 핵산가수분해효소(TNase)를 특이적으로 검출할 수 있도록 하여 특이성을 높이고 시험기간을 단축시킨 배지이다. 배양액을 film 사이에 접종한 후 35°C에서 배양하여 24시간 후에 적자색으로 염색되어 나타나는 콜로니가 황색포도상구균이다. 그러나 황색포도상구균의 경우 때때로 적자색 이외의 검정색이나 녹색 계열의 균체가 나오거나 식품입자 등의 불순물로 인하여 적자색 균체의 확인이 어려운 경우가 있어, 2차 확정용 디스크를 24시간 후에 삽입하여 동일한 온도에서 1-3시간의 추가 배양을 하여 분홍색으로 나타나는 pink zone이 관찰되는 균체를 황색포도상구균으로 계수하였다.

통계 분석

각 시료에 대한 미생물시험은 미생물당 3반복하여 평균을 구해 얻은 CFU/mL를 log₁₀값으로 전환하여 통계 처리하였다. 기존의 전통적인 방법에 의한 미생물 시험결과와 건조필름법을 사용하여 얻은 결과와의 상관관계는 선형회귀분석을 이용하여

구하였다. 회귀직선은 excel 2000 software package(Microsoft Corp., Redmond, USA)를 사용하여 작성하고 이로부터 얻은 상관관계수(r), 기울기(slope), 절편(intercept)으로부터 실험군 간의 상관관계를 분석하였다. 기울기 값이 1에 근접하는 정도와 절편 값이 0에서 벗어나는 정도를 분석하였다. P-value는 t-test를 통해 두 실험군 간의 유의성 확인을 위하여 산출하였다. 모든 통계처리의 유의성은 p < 0.05 범위에서 실시되었다.

결과 및 고찰

일반 세균수 분석

일반 세균수 측정을 위한 시료는 식품 시료에 따라 29-50개를 사용하였는데 PAC법에 의해 분리된 세균수의 log₁₀ 값을 x축으로 하고 PCA법에 의해 분리된 세균수의 log₁₀ 값을 y축으로 하여 두 방법에 의해 측정된 일반세균수를 plotting함으로써 회귀직선을 구하였다. 이렇게 구한 회귀직선의 기울기, 절편과 이로부터 구한 상관계수와 P 값, 일반세균수의 log₁₀ 평균값과 분리능력을 Table 1과 Fig. 2에 나타내었다. 조사된 식품시료에서의 P 값은 0.990-0.999로 측정되어 두 측정방법에 의한 결과는 p > 0.05의 범위에 있어 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 두 방법 사이의 상관계수는 조사된 식품 시료에서 매우 높은 범위 내에 존재하였는데 어묵이 0.980으로 그 중 가장 낮았으며 햄, 우유, 아이스크림이 0.999로 가장 높았다. 게맛살에서는 일반세균이 검출되지 않았으며 그 이외의 식품에서 조사된 회귀직선의 기울기는 0.953-1.006으로 1.0에 근접하는 값을 나타내었다. 조사된 식품 전체에서 분리된 일반세균수의 log₁₀ 평균값은 PAC법에서는 5.50, PCA법에서는 5.49로 두 방법이 차이가 없음을 알 수 있었다. Abgrall 등(6)은 생선으로부터 일반세균을 분리하는 배지로서 일반 agar 배지와 PAC를 사용하여 비교하였다. 두 방법간의 균 분리능력은 별 차이가 없었으나, 어떤 경우에는 agar 배지보다 더 많은 균이 PAC로부터 분리되었는데, 이는 일반 agar 배지에서 자랄 수 없는 luminous marine bacterium이 PAC에서 분리되었기 때문이라고 보고하였다. Curiale 등(7)은 11개 실험실의 공동연구 결과 Petrifilm™ method가 5개 유제품(chocolate milk, pasteurized cheese, nonfat dry milk, evaporated milk and vanilla ice cream)으로부터 일반세균수를 측정하는데 적합하다고 보고하였다. Kwak 등(8)은 7가지 인삼 제품에 대하여 일반세균수를 분리해 내는 방법인 건조필름법과 기존의 식품공전에서 사용하는 방법인 일반 agar 배지법을 비교, 평가하였다. 그 결과 인삼차, 인삼정, 인삼정환, 인삼분말 캡슐, 인삼정차의 경우 1% 수준에서 유의적인 차이가 없었으나, 인삼분말과 인삼타브렛 시료에서는 1% 수준에서 유의적인 차이가 인정되어(3M Petrifilm™의 분리능이 우수하였음) 이들 두 제품을 제외한 5가지 시료에서는 건조필름법이 기존의 방법을 대체할 수 있는 신속하고 간편한 방법임을 증명하였다.

Table 1. Comparison of Petrifilm™ aerobic count plate (PAC) and plate count agar (PCA) methods for the enumeration of total aerobic bacteria in foods

Sample	Sample size	Correlation coefficient	Slope	Intercept	P-value	Mean log (CFU/mL) ± standard deviation		PAC=PCA n (%)	PAC>PCA n (%)	PAC<PCA n (%)
						PAC	PCA			
Fish paste	29	0.980	0.953	0.261	0.877	6.97 ± 1.75	6.90 ± 1.69	0 (0.0)	17 (58.6)	12 (41.4)
Ham	50	0.999	1.006	-0.015	0.960	4.87 ± 1.61	4.89 ± 1.62	0 (0.0)	21 (42.0)	29 (58.0)
Milk	50	0.999	1.006	-0.031	0.999	5.40 ± 1.89	5.40 ± 1.90	0 (0.0)	25 (50.0)	25 (50.0)
Ice cream	50	0.999	0.999	0.012	0.980	5.37 ± 1.66	5.38 ± 1.66	0 (0.0)	20 (40.0)	30 (60.0)

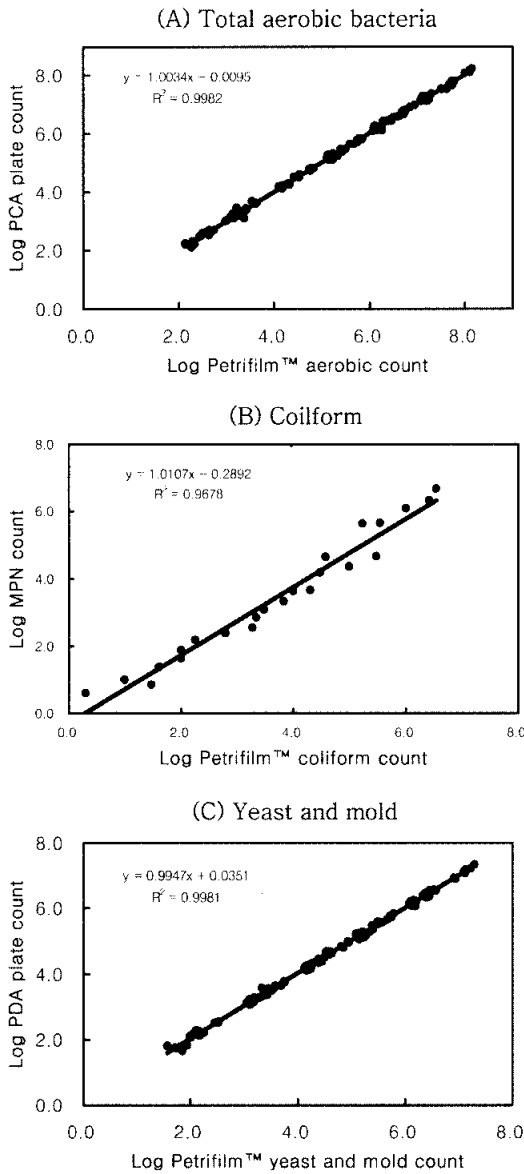


Fig. 2. Relationship between dry rehydratable film method and traditional method for the enumeration of various microorganisms in meat and dairy products.

MacAllister 등(9)과 Ginn 등(10)은 우유로부터 일반세균수를 분리해 내는 배지로서 PCA plate와 PAC를 사용하여 비교하였다. 그 결과 유의적인 차이를 보이지 않았고, 상관계수가 0.91에서 0.99로 상당한 상관성을 보인다고 보고하였다. Ha(11)는 우유, 소고기, 탁주, 밀가루, 어묵에 존재하는 일반세균수를 PCA plate를 이용한 방법과 PAC를 이용한 방법으로 측정된 결과 유의적인 차이가 없음을 밝혔는데 우유 중에 존재하는 일반세균수

측정시 PCA plate를 이용할 경우에는 우유에 의해 혼탁해져 균수 측정이 어려웠지만 PAC는 흰색 배경 위에서 TTC에 의해 colony가 붉은 색으로 염색되어 쉽게 측정할 수 있었기 때문에 우유로부터 균수 측정을 위한 배지로는 PCA plate에 비하여 PAC가 보다 적당한 배지라고 제시하였다.

본 연구결과를 비롯한 이러한 다양한 문헌들의 결과들은 일반세균의 분석에 있어서 Petrifilm™법과 agar plate를 이용한 전통적인 방법 사이에는 유의적인 차이가 없다는 것을 보여주고 있다.

대장균군(coliform)수 분석

대장균군수 측정을 위한 시료는 식품 시료에 따라 12-36개를 사용하였는데 전통적인 방법인 최확수법과 PCC법을 사용하였다. 두 방법에 의해 측정된 대장균군수를 plotting하여 구한 회귀직선의 기울기, 절편과 이로부터 구한 상관계수와 P 값, log 평균값과 분리능력을 Table 2와 Fig. 2에 나타내었다. 조사된 모든 식품시료에서 P 값은 0.110-0.726으로 측정되어 두 측정방법에 의한 결과는 $p > 0.05$ 의 범위에 있어 유의적인 차이를 보이지 않는 것을 알 수 있다. 두 방법 사이의 상관계수는 조사된 식품 시료에서 0.970-0.987의 매우 높은 범위 내에 존재하였으며, 회귀직선의 기울기는 0.966-1.026으로 1.0에 근접하는 값을 나타내었다. 조사된 식품 전체에서 분리된 대장균군수의 log₁₀ 평균값은 PCC에서는 4.10, 최확수법에서는 4.40으로 최확수법에서 좀 더 많이 계수되었음을 알 수 있었다. 그러나 어묵에서는 PCC법이 최확수법보다 적은 균수를 분리할 수 있었지만 햄과 아이스크림에서는 최확수법보다 많은 대장균군을 검출하여, 검출된 대장균군 수와 식품시료의 특성과는 어떠한 연관성도 찾을 수 없었다. 또한 최확수법의 정확성 결여로 인한 결과로 볼 수도 있을 것이다. Ginn 등(10)은 11개 실험실에서 PCC법과 AOAC 공시법인 VRBA법(4)을 이용하여 원유와 멸균유로부터 대장균군을 분리하였는데, 두 배지로부터 분리된 대장균군의 평균 log CFU 차이는 별로 크지 않은 값인 0.013으로 측정되었고, 유의적 차이를 보이지 않는다고 보고하였다. Curiale 등(12)도 건조필름법이 VRBA법에 비해 우유로부터 약간 높은 수의 대장균군을 분리했지만 유의적인 차이는 없었다고 보고하였다. 또한 밀가루와 버섯을 대상으로 하였을 경우 최확수법보다 건조필름법이 유의적으로 높은 수의 대장균군을 분리해 냈으며, 쇠고기에서는 오히려 건조필름법에 비하여 최확수법으로부터 높은수의 대장균군이 분리되었다고 보고한 바 있다(13). 그러나 그들은 최확수법의 정확성 결여로 인해 분리된 대장균군 평균치 간의 통계학적 유의차는 구하기 어려웠으며 PCC법의 재현성이 최확수법보다 좋았다고 보고하였다. 또한 Nelson 등(14)은 PCC법과 일반적으로 사용하는 방법인 VRBA법 그리고 lauryl sulfate tryptose broth(LST, Difco)를 사용한 최확수법을 비교하였다. 그 결과 원유 시료로부터 대장균군의 분리에 각각의 방법이 차이를 보이지 않았다고 하였다.

Table 2. Comparison of Petrifilm™ coliform count plate (PCC) and most probable number (MPN) methods for the enumeration of coliform in foods

Sample	Sample size	Correlation coefficient	Slope	Intercept	P-value	Mean log (CFU/mL) ± standard deviation		PCC=MPN n (%)	PCC>MPN n (%)	PCC<MPN n (%)
						PCC	MPN			
Fish paste	36	0.970	0.966	0.814	0.110	4.43 ± 1.76	5.10 ± 1.72	1 (2.8)	1 (2.8)	34 (94.4)
Ham	12	0.987	1.026	-0.376	0.726	3.95 ± 1.85	3.68 ± 1.93	1 (8.3)	8 (66.7)	3 (25.0)
Ice cream	12	0.979	1.001	-0.229	0.673	3.26 ± 1.75	3.03 ± 1.79	0 (0.0)	9 (75.0)	3 (25.0)

Table 3. Comparison of Petrifilm™ *E. coli* count plate (PEC) and most probable number (MPN) methods for the enumeration of *E. coli* in foods

Sample	Sample size	Correlation coefficient	Slope	Intercept	P-value	Mean log (CFU/mL) ± standard deviation		PEC=MPN n (%)	PEC>MPN n (%)	PEC<MPN n (%)
						PEC	MPN			
						Fish paste	24			
Milk	12	0.984	1.012	-0.854	0.283	3.76 ± 1.78	2.95 ± 1.83	0 (0.0)	12 (100.0)	0 (0.0)
Ice cream	12	0.981	0.952	-0.018	0.821	3.39 ± 1.97	3.21 ± 1.91	3 (25.0)	8 (66.7)	1 (8.3)

Table 4. Comparison of Petrifilm™ yeast and mold count plate (PYM) and potato dextrose agar (PDA) methods for the enumeration of yeast and mold in foods

Sample	Sample size	Correlation coefficient	Slope	Intercept	P-value	Mean log (CFU/mL) ± standard deviation		PYM=PDA n (%)	PYM>PDA n (%)	PYM<PDA n (%)
						PYM	PDA			
						Fish paste	27			
Ham	50	0.999	0.983	0.067	0.996	3.87 ± 1.47	3.87 ± 1.44	0 (0.0)	25 (50.0)	25 (50.0)
Milk	50	0.999	0.998	0.016	0.987	4.78 ± 1.71	4.78 ± 1.70	0 (0.0)	23 (48.0)	27 (52.0)
Ice cream	50	0.999	0.999	0.034	0.923	4.45 ± 1.48	4.48 ± 1.48	0 (0.0)	17 (34.0)	33 (66.0)

VRBA법과 Petrifilm™ method를 통해 얻은 결과로 회귀직선을 그렸을 때 기울기는 0.959, 절편은 -0.076이라 하였고, 시험법 간에 유의적인 차이를 보이지 않았다고 보고하였다. 또한 McAllister 등(15)은 3M Petrifilm™ method는 가공류 가공산업 현장에서 호기성 총균수와 대장균군 미생물 오염을 측정하기 위한 실질적이고, 정확한 방법임이 증명되었다고 보고하였다.

이상의 Petrifilm™ method와 기존의 전통적인 시험 방법간의 높은 상관성을 나타내는 결과들은 Petrifilm™ method가 기존의 시험법을 대체할 수 있는 방법임을 나타내고 있다.

대장균(*E. coli*)수 분석

전통적인 방법인 최확수법과 PEC법을 이용하여 대장균수를 측정하여 두 방법을 비교하였다. 대장균수를 측정하기 위해 사용한 시료는 식품 시료에 따라 12-24개를 사용하였다. 두 방법에 의해 측정된 대장균수를 plotting하여 구한 회귀직선의 기울기, 절편과 이로부터 구한 상관계수와 P 값, log 평균값과 분리능력을 Table 3에 나타내었다. 조사된 모든 식품에서 최확수법과 Petrifilm™법은 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p > 0.05$). 두 방법 사이의 상관계수는 조사된 식품 시료에서 0.956-0.984의 매우 높은 범위 내에 존재하였으며 회귀직선의 기울기는 0.909-1.012로 1.0에 근접하는 값을 나타내었다. Matner 등(16)은 Petrifilm™ method를 자연 오염된 spiked cheese, 야채, 닭고기로부터 *E. coli*를 분리하기 위해 사용하였는데, 최확수법과 비교하여 분리능력이 비슷하거나 우수하다고 보고하였다. Russell (17)은 닭고기와 쇠고기에 존재하는 대장균수를 최확수법, simplate coliform and *E. coli* plate법(IDEXX Laboratories Inc.), biosys optical system(BioSys, Inc.)법, bactometer microbial monitoring system(bioMericux Vitek, Inc.)법, PEC법 등을 이용하여 이들 방법 간의 상관관계를 구한 결과, 최확수법과 PEC법 사이의 상관관계는 닭고기의 경우 0.95, 쇠고기는 0.93으로 사용한 검출법 중에서 가장 높은 상관관계를 나타냈다고 보고한 바 있다.

이러한 결과들은 대장균을 분리하기 위해 사용되는 전통적인 시험법과 비교하여 Petrifilm™ method는 결과에 있어 유의성에 차이가 없는 편리하고 정확한 방법임을 보여주고 있다.

효모 및 곰팡이(yeast and molds)수 분석

효모 및 곰팡이 수 측정을 위한 시료는 식품 별로 27-50개를 사용하였으며 전통적인 방법인 potato dextrose agar plate법과 PYM법을 이용하여 비교하였는데, 모든 시료에서 두 분리 방법 모두 곰팡이는 검출되지 않았다. 조사된 각 식품재료는 Petrifilm™법보다 PDA plate에서 더 많이 효모가 검출되었으며, 시료 전체에서 분리된 효모수의 log 평균값은 Petrifilm™법에서는 4.13, PDA에서는 4.15로 거의 비슷하지만 PDA에서 약간 과 평가되었음을 알 수 있었다. 이는 PDA법이 Petrifilm™법 보다 선택성이 낮아 진균류 이외의 일반세균이 생육했기 때문인 것으로 판단된다. 한편 일반세균의 경우와 마찬가지로 계맛살에서는 효모와 곰팡이가 검출되지 않았다. 두 방법에 의해 측정된 효모수를 plotting하여 구한 회귀직선의 기울기, 절편과 이로부터 구한 상관계수와 P 값, log 평균값과 분리 능력을 Table 4와 Fig. 2에 나타내었다. 모든 식품에서 유의적인 차이가 나타나지 않았으며($p > 0.05$), 두 방법 사이의 상관계수는 조사된 식품 시료에서 0.950-0.999의 매우 높은 범위 내에 존재하였고 회귀직선의 기울기는 0.980-0.999로 1.0에 근접하는 값을 나타내었다. Beuchat 등(18)은 13가지의 식품으로부터 효모와 곰팡이를 분리하기 위하여 Petrifilm™ method를 acidified potato dextrose agar(APDA)법 그리고 chloramphenicol supplemented plate count agar(CPCA)법과 비교하였다. Petrifilm™ method로부터 분리된 효모 및 곰팡이수는 어떤 식품에서는 APDA와 CPCA보다 높거나 비슷하게 나타났으나, 어떤 식품에서는 시료입자의 방해(food partial interference)에 의하여 더 낮게 분리되었다고 하였다. 하지만 Petrifilm™ method의 APDA와 CPCA에 대한 correlation coefficient는 각각 0.961과 0.974로 결과간의 유의적인 차이는 없다고 보고하였다. Ha 등(11)도 탁주로부터 효모를 분리하였을 경우나 밀가루로부터 곰팡이를 분리하였을 경우 PYM법과 acidified potato dextrose agar(APDA)법 간에 유의적인 차이를 보이지 않았다고 보고하였다. Taniwaki 등(19)은 dichloran rose bengal chloramphenicol(DRBC), dichloran 18% glycerol(DG18)의 두 가지 항생물질이 첨가된 PDA plate 등의 배지를 이용한 검출법과 PYM법을 이용하여 14가지 식품재료로부터 효모와 곰팡이를 분리하였을 경우 Petrifilm™법과 DRBC

Table 5. Comparison of Petrifilm™ staph express count plate (STX) and coagulase methods for the enumeration of *Staphylococcus aureus* in foods

Sample	Sample size	Correlation coefficient	Slope	Intercept	P-value	Mean log (CFU/mL) ± standard deviation		STX=Coagulase (%)	STX>Coagulase (%)	STX<Coagulase (%)
						STX	Coagulase			
Fish paste	30	0.999	1.030	-0.093	0.831	3.27 ± 1.73	3.27 ± 1.78	0 (0.0)	10 (33.3)	20 (66.7)
Imitation crab meat	30	0.998	1.025	-0.092	0.962	3.32 ± 1.73	3.30 ± 1.77	0 (0.0)	16 (53.3)	14 (46.7)

법 사이에는 0.930의 높은 상관계수를 나타내었으며 acidified PDA나 chloramphenicol이 첨가된 PDA법 간에는 0.99 이상의 높은 상관계수를 나타냈다고 보고하였다.

이러한 결과들은 효모 및 곰팡이를 분리하기 위해 사용되는 전통적인 시험법과 비교하여 Petrifilm™ method는 결과에 있어 유의성에 차이가 없는 방법임을 보여주고 있다.

황색포도상구균(*S. aureus*)수 분석

황색포도상구균 수 측정을 위한 시료는 각각 30개씩을 사용하였다. 분석을 위해 전통적인 방법인 coagulase 시험법과 STX법을 이용하였는데, 두 방법에 의해 측정된 황색포도상구균수를 plotting하여 구한 회귀직선의 기울기, 절편과 이로부터 구한 상관계수와 P 값, log 평균값과 분리능력을 Table 5에 나타내었다. P 값은 0.999로 모든 식품에서 유의적인 차이가 나타나지 않았으며($p > 0.05$) 두 방법 사이의 상관계수는 조사된 식품 시료에서 0.998-0.999의 매우 높은 범위에 존재하였고 회귀직선의 기울기는 1.025-1.030으로 1.0에 근접하는 값을 나타내었다. 시료 전체에서 분리된 황색포도상구균수의 log 평균값은 Petrifilm™법에서는 3.30, coagulase 시험법에서는 3.29로 결과에 차이가 없음을 알 수 있었다. De Buysse 등(20)은 미국 식품의 약국이 채택하고 있는 방법인 Baird-Parker(B-P)법을 이용하여 실험하였는데 B-P 배지가 선택성이 낮아 오염 균주들이 다수 생육하기 때문에 황색포도상구균을 정확하게 계수하기 어렵다고 보고한 바 있다. 여러 종류의 식품에서 분리한 황색포도상구균들이 B-P 배지에서 투명환을 생성하지 않기 때문에 추가적인 확인실험이 필요하며 확인실험에 의해서도 분리균주를 정확하게 동정하는 것이 종종 불가능하다는 보고도 있다(21). Schoeller 등(22)은 다진 소고기와 치즈를 대상으로 B-P법과 Petrifilm™법을 사용하여 황색포도상구균을 계수함으로써 두 방법을 비교한 결과 B-P 배지에서 분리한 84 균주의 73%는 황색포도상구균이 아닌 것으로 확인하였으며 치즈에 황색포도상구균을 접종한 후 저장 과정에서 분리한 균주를 두 방법으로 확인하였을 경우에는 동일한 결과를 얻어 Petrifilm™법이 B-P법을 대체할 수 있는 방법이라고 제시한 바 있다. 이는 Petrifilm™법이 B-P법의 단점을 보완할 수 있는 대체법이 될 수 있음을 나타내는 결과라고 판단된다.

결론적으로 3M Petrifilm™ plate를 이용하는 건조필름법에 의한 일반세균, 대장균군, 대장균, 효모와 곰팡이, 황색포도상구균 시험법은 식품공전상에 기재되어 있는 기존의 전통적인 방법과 그 정량 결과가 유의적으로 차이가 없음을 증명되었다. 건조필름은 식품으로부터 미생물을 분리하기 위한 적당한 배지이며, 기존의 전통적인 방법과 균 분리 능력에 있어 유의적으로 차이가 없고 신속, 정확하며 편리한 방법이기 때문에 기존의 시험방법을 대체할 수 있는 미생물 시험법인 것으로 판단된다.

요 약

식품의 안전성 평가에 사용되는 주요 지표 미생물들의 검출 시험법 중에서 전통적인 미생물 시험법과 신속 검출법인 건조필름법에 의한 미생물 시험법 간의 유효성 관계를 국내 특정 축·수산식품에 존재하는 미생물을 대상으로 분석하였다. 축·수산식품 중 어묵, 게맛살, 아이스크림, 우유, 햄 시료에 대하여 두 가지 미생물 시험법을 각각 실시하였다. 일반 세균수 분석에는 plate count agar법과 Petrifilm™ aerobic count plate법을 비교하였고, 대장균군과 대장균의 분석에는 most probable number(MPN)법과 Petrifilm™ coliform count plate 및 Petrifilm™ *E. coli*/coliform count plate법을 각각 비교하였으며, 효모와 곰팡이의 분석에는 potato dextrose agar법과 Petrifilm™ yeast and mold count plate법을 비교하였다. 황색포도상구균의 분석에는 coagulase 시험법과 Petrifilm™ staph express count plate법을 비교하였다. 5가지 축·수산식품에 대한 두 방법들간 상관계수는 일반세균이 0.990-0.999, 대장균군이 0.979-0.987, 대장균이 0.978-0.984, 효모와 곰팡이가 0.975-0.999, 황색포도상구균이 0.999로 두 방법간 상관성이 매우 높았으며, 평균 미생물 수에 있어서도 유의적인 차이가 없는 것으로 확인되었다. 이상의 결과로부터 건조필름법이 기존의 전통적인 시험 방법을 대체할 수 있는 미생물 분석법임이 확인되었다.

문 헌

1. International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). Microorganisms in Foods: 1. Their Significance and Methods of Enumeration, 2nd ed. University of Toronto Press, Toronto, Ontario (1986)
2. International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). Microorganisms in Foods: 2. Sampling for Microbiological Analysis Principles and Specific Applications, 2nd ed. University of Toronto Press, Toronto, Ontario (1986)
3. Korea Food and Drug Administration. Food Code. KFDA (2004)
4. AOAC. Official method of Analysis. 16th ed. Association of Official Analytical Communities, Washington, DC, USA (1995)
5. Anderson JM, Baird-Parker AC. A rapid and direct plate method for enumerating *Escherichia coli* biotype 1 in food. J. Appl. Bacteriol. 39: 111-117 (1975)
6. Abgrall B, Cleret JJ. Evaluation of Petrifilm 3M for the enumeration of the Aerobic Flora of Fish. J. Food Prot. 53(3): 213-216 (1990)
7. Curiale MS, Fahey P, Fox TL, McAllister JS. Dry rehydratable films for Enumeration of Coliform and Aerobic Bacteria in Dairy Products. J. Assoc. off. Anal. Chem. 72(2): 312-318 (1989)
8. Kwak YS, Chang JK, Lee KS. Bacterial counts in ginseng products by dry rehydratable film method. J. Fd. Hyg. Safety. 10: 41-43 (1995)
9. MaAllister JS, Ramos MS, Fox TL. Evaluation of the 3M dry medium culture plate (Petrifilm 3M) method for enumerating bacteria in processed fluid milk samples. Dairy Food Sanit. 7: 632-

- 635 (1987)
10. Ginn RG, Packard VS, Fox TL. Enumeration of total bacteria and coliform in milk by dry rehydratable film methods: Collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 69: 527-531 (1986)
 11. Ha SD. Evaluation of dryfilm method for isolation of microorganisms from foods. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24: 178-184 (1996)
 12. Curiale MS, Fahey P, Fox TL, MaAllister JS. Dry rehydratable film for enumeration of coliform and aerobic bacteria in dairy products: Collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 74: 635-648 (1991)
 13. Curiale MS, Sons T, Mciver D, MaAllister JS, Halsey B, Roblee D, Fox TL. Dry rehydratable film for enumeration of total coliform and *Escherichia coli* in foods: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 74: 635-648 (1991)
 14. Nelson CL, Fox TL, Busta FF. Evaluation of dry medium film (Petrifilm VBR) for coliform enumeration. *J. Food Prot.* 47: 520-525 (1984)
 15. McAllister JS, Stadtherr MP, Fox TL. Evaluation of the 3M Petrifilm culture plate method for enumerating aerobic flora and coliform in poultry processing facilities. *J. Food Prot.* 51: 658-659 (1998)
 16. Matner RR, Fox TL, McIver DE, Curiale MS. Efficacy of petrifilm *E. coli* count plates for *E. coli* and coliform enumeration. *J. Food Prot.* 53: 140-150 (1990)
 17. Russell SM. Comparison of the traditional three-tube most probable number method with the Petrifilm, SimPlate, BioSys Optical, and bactometer conductance method for enumerating *Escherichia coli* from chicken carcasses and ground beef. *J. Food Prot.* 63: 1179-1183 (2000)
 18. Beuchat LR, Nail BV, Brackett RE, Fox TL. Comparison of the Petrifilm Yeast and Mold culture film method to conventional methods for enumerating yeasts and molds in foods. *J. Food Prot.* 54: 443-447 (1991)
 19. Taniwaki MH, Dilva N, Banhe AA, Iamanaka BT. Comparison of culture media, simplate, and petrifilm for enumeration of yeasts and molds in food. *J. Food Prot.* 64 (10): 1592-1596 (2001)
 20. De Buyser ML, Audinet N, Delbart MO, Maire M, Francoise F. Comparison of selective culture media to enumerate coagulase-positive *Staphylococci* in cheeses made from raw milk. *J. Food Microbiol.* 15: 339-346 (1998)
 21. Wilson IG, Gilmour A, Cooper JE, Bjourson AJ, Harvey JA. Non-isotopic DNA hybridization assay for the identification of *Staphylococcus aureus* isolated from foods. *Int. J. Food Microbiol.* 22: 43-54 (1994)
 22. Schoeller NP, Ingham SC. Comparison of the Baird-Parker agar and 3M Petrifilm rapid *S. aureus* count plate methods for detection and enumeration of *Staphylococcus aureus*. *J. Food Microbiol.* 18: 581-587 (2001)

(2005년 1월 19일 접수; 2005년 3월 28일 채택)