

우유와 즉석섭취 메추리알에서 병원성 미생물의 생육에 미치는 지방과 저장온도의 영향

고영미 · 홍수현 · 박근철 · 나유진 · 문진산¹ · 윤기선[†]
경희대학교 식품영양학과, ¹농림축산검역본부 동물약품관리과

Effect of Fat Content and Storage Temperature on the Growth and Survival Kinetics of Pathogenic Microorganisms in Milk and Ready to Eat (RTE) Quail Eggs

Young-Mi Ko · Soo-hyeon Hong · Guen-Cheol Park · Yu-Jin Na · Jin-San Moon¹ · Ki-Sun Yoon[†]

Department of Food and Nutrition, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

¹Veterinary Pharmaceutical Management, Animal and Plant Quarantine Agency, Anyang 480-757, Korea

Abstract

According to the microbiological standard, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* and *Listeria monocytogenes* should not be detected in milk and egg products in Korea. Refrigerated food such as milk must be kept under 10°C at retail markets. However, temperature abuse of refrigerated foods at such markets is often observed. We compared the growth and survival kinetics of *S. aureus* and *C. perfringens* at 10 and 15°C, and the growth kinetics of *L. monocytogenes* at 4 and 10°C in whole and skim milk and ready-to-eat (RTE) quail eggs to evaluate their growth possibilities at retail markets. Regardless of storage temperature, the level of *S. aureus* reached the maximum level (10^8 - 10^9 CFU/ml) in whole milk, non-fat milk and RTE quail eggs within the expiration date. Even low contamination levels of *S. aureus* (10 CFU/mL) grew rapidly in milk and quail eggs to reach the maximum level within the shelf life. Survival of *C. perfringens* in whole milk was greater than that in non-fat milk, indicating that the fat content in milk influences the survival of *C. perfringens*. For *L. monocytogenes*, the population in milk increased by 0.5-1 log CFU/mL at 4°C, while the populations reached the maximum level at 10°C within the expiration date, regardless of initial contamination levels. In quail eggs, *L. monocytogenes* grew to the maximum level within the expiration date (60 days) at both temperatures. *S. aureus* and *L. monocytogenes* must be controlled to be negative, and proper temperature management should be emphasized at retail markets to protect the consumer. Since *C. perfringens* did not grow in milk and RTE quail eggs, there is no risk due to the growth of *C. perfringens* in these products at retail markets.

Key words: milk, ready to eat quail egg, pathogenic microorganisms, fat, storage temperature

I. 서론

최근 축산가공식품 중 우유 및 계란 가공품의 소비가 증가하고 있으며, 다양성과 편리성을 고려한 제품들이 개발, 판매되고 있다. 농림축산식품 주요통계 자료에 의하면(Ministry of Agriculture, Food and Rural 2013), 우리나라 국민 1인당 연간 우유 소비량은 2000년 59.6 kg, 2005년 62.9 kg, 2012년 67.2 kg, 계란 소비량은 2008년 224개, 2010년 236개, 2013년 245개로 해마다 증가하고 있는

추세이다. 우유와 계란과 같은 축산가공식품들은 고단백·고영양원으로, 생산으로부터 도축·가공·유통·판매 등 전 과정 중 부패 및 변질이 되기 쉬우므로 다른 가공식품 보다 더 특별한 안전 관리와 주의가 요구된다(Kim HW 등 2009).

우유 제품은 과거에 전유(whole milk)로만 한정하여 판매되었던 것과 달리 최근에는 건강과 다이어트와 관련한 저지방 관련 식품의 요구가 증가하면서 우유소비가 점차 전유 중심에서 저지방(semi-skimmed milk) 또는 무지방(skimmed milk) 우유의 판매가 증가하고 있다(Cho SJ와 Park JS 2011). 또한 메추리알은 우리나라와 일본에서 주로 섭취가 되고 있는데, 메추리알 제품 중 삶아서 간 상태로 판매되는 제품은 알가열성형제품 중에 하나로

[†]Corresponding author: Ki-Sun Yoon, Department of Food and Nutrition, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea
Tel: +82-2-961-0264
Fax: +82-2-961-0261
E-mail: ksyoon@khu.ac.kr

삶는 과정과 껍질을 제거하는 과정을 생략한 제품으로 편리성을 추구하는 현대시대의 소비자들에게 적합한 가공식품으로 소비가 증가하고 있는 실정이다. 이와 같은 축산 가공식품의 경우에는 소비까지 이루어지는 과정에서 주로 냉장 또는 냉동 보관을 통해 이루어지는데, 냉장 식품은 0~10°C, 냉동식품은 -18°C 이하에서 유지되도록 엄격히 법적 관리 되고 있지만(Ministry of Food and Drug Safety 2013), 저장 유통 중 온도 관리가 부적절하게 이루어질 경우 부패균 및 식중독균 증식이 문제가 될 수 있다.

현재 대형마트 또는 편의점과 같은 판매처에서 냉장·냉동식품의 온도관리는 철저히 하지 못한 실정이며 온도관리가 제대로 이루어지지 않았을 경우, 10°C 이상의 온도에서 *S. aureus* 등 중온균의 급격한 증식이 보고되어 유통환경에서 온도관리 중요성이 제기되고 있다(Ministry of Food and Drug Safety, 2007). 최근 대형마트에서는 저지방 및 무지방 우유가 판매되고 메추리알과 같은 새로운 알가열 성형제품과 같은 축산가공식품이 개발되어 판매되고 있으나 온도에 따른 이들 제품에서 병원성 식중독균의 생육변화에 대한 연구는 미흡한 실정으로 유통환경에서의 안전성을 예측하기는 어려운 실정이다.

병원성 식중독 균 중 *S. aureus*는 공기, 토양 등의 환경과 건강한 사람, 동물의 피부 등에도 상재하여 식품제조과정 중 완벽한 제어가 어려우며, 축산식품을 비롯한 다양한 식품에 쉽게 오염되어 식품위생상 중요하게 다루어지고 있는 원인체 중에 하나이다. 병원성 식중독 균으로 *S. aureus*는 균주에 따라 여러 가지 독소를 분비하는데, *S. aureus*가 생산한 장독소는 위장염의 원인이 되고, 열에 안정적이기 때문에 가열 조리한 후에도 문제가 될 수 있어 특별한 관리 및 제어가 필요한 균이다(Atanassova V 등 2001). 메추리알과 우유 및 유제품과 같은 즉석섭취 식품의 경우 *S. aureus* 뿐만 아니라 냉장온도에서 유통 및 판매되므로 3°C 또는 그 이하의 온도에서 생육이 가능한 *L. monocytogenes*와 같은 저온균에 의한 위험성이 항상 문제시 되고 있다(Seelinger HPR과 Jones D 1986). 또한 *C. perfringens*는 그람양성의 간균으로 아포를 형성하는 혐기성 세균으로서, 물과 토양과 같은 환경 및 사람, 가축, 야생동물의 장관에 널리 분포하여 축산식품에서 주로 식중독을 유발하는 원인균으로 알려져 있어 축산식품에서의 관리대상이 되고 있다(Cooper KK 등 2013).

따라서 본 연구의 목적은 현재 판매되고 있는 일반우유, 무지방 우유 및 삶아서 껍질을 깬 상태로 판매되는 알가열 성형제품에서 냉장 온도와 각 제품의 오염 정도에 따라 병원성 식중독균의 생육변화를 분석하여 유통환경에서의 지방 및 저장온도가 이들 제품의 안전성에 미치는 효과 및 유통환경에서 보관 온도와 관련된 기초자료를 제시하고자 하였다. 본 연구에서는 현재 우유 및 알

가열 성형제품에서 음성관리 되고 있는 식중독 균으로 *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *C. perfringens*를 대상 식중독균으로 선정하여 이들 균이 음성관리 되지 않았을 경우 유통환경에서의 위험성을 예측하고자 하였다.

II. 연구방법 및 내용

1. 실험 재료

본 실험에서 사용한 우유와 메추리알은 서울시 동대문구의 대형마트에서 구입하였으며, 시료는 유통기한 까지 우유는 최소 10일, 메추리알은 최소 40일 이상 남은 제품을 구입하여 본 실험에 사용하였다. 우유는 일반 우유와 무지방 우유를 사용하였으며, 메추리알은 삶아서 껍질을 깬 상태로 충전 수에 침지되어 판매되는 제품을 구입하여 사용하였다.

2. 연구대상 균 선정 및 균액 제조

연구대상 식중독균인 *S. aureus* Enterotoxin A type(ATCC 13565)과 enterotoxin(cpa와 cpe)을 생산하는 *C. perfringens* (ATCC 12916)은 한국중균협회로부터 구입하여 사용하였고, *L. monocytogenes*(ATCC 15313)은 한국생명공학연구원에서 분양 받아 -80°C의 온도로 냉동 보관 하여 사용하였다. 10 µL의 *S. aureus* 와 *L. monocytogenes*는 멸균상태의 10 mL Tryptic Soy Broth(TSB, Difco, Sparks, MD, USA)에 각각 접종하여 36°C에서 24시간 동안 전 배양한 후 사용하였다. 100 µL의 *C. perfringens*는 10 mL Cooked meat broth(CMM, OXOID, Basingstoke, England)에 접종하여 가스치환장치(don Whitley Scientific, West Yorkshire, UK)를 사용하여 modified gas(H₂ 5%, CO₂ 10%, N₂ 85%)를 주입한 microbial anaerobic jar(Merck, Darmstadt, Germany)에 넣어 36°C에서 24시간 동안 배양시켰다. 전 배양한 균은 멸균된 0.1% peptone water(Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)를 이용하여 10진 희석하여 사용하였다.

Clostridium perfringens 포자는 선행연구(Juneja VK 등 1994)에서 사용한 방법을 변형하여 cooked meat medium에서 배양한 균액을 사용하였다. 균액 0.2 mL를 fluid thioglycollate medium(FTG, Oxoid, Basingstoke, UK) 10 mL에 접종한 후, 75°C에서 20분 동안 heat-shock을 주고, 36°C에서 18시간 동안 배양하였다. 배양액 FTG 1 mL를 다시 10 mL의 FTG에 첨가하고 36°C에서 4시간 동안 배양한 후, 균액을 10 % 수준으로 Duncan and Strong(DS) medium에 첨가하여 36°C에서 48시간 동안 배양하였다. 배양한 DS medium을 4,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리한 후 vegetable cell을 제거하고 멸균된 증류수로 세척하였다. 그렇게 얻어진 포자 현탁액을 4°C에서 저장하여 사용하였다. DS medium은 포자형성을 효과적으로 생성시키기 위해 변형하여 제조하였다. 변형된 DS medium은

1.5% proteose peptone(Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), 0.4% yeast extract(Oxoid, Basingstoke, UK), 0.1% sodium thioglycolate, 0.4 % raffinose(replacing starch), 1% sodium phosphate, 100 μ L caffeine(0.51 mM/mL)을 첨가하여 제조하였다(Velugoti PR 등 2007).

3. 균 접종 배양 및 시료채취

우유(일반 우유, 무지방 우유) 50 mL에 전 배양한 *S. aureus*와 *L. monocytogenes* 균을 각각 500 μ L를 접종하여 초기 오염 농도를 약 1.0 ± 0.5 , 2.0 ± 0.5 , 3.0 ± 0.5 log CFU/g 수준이 되도록 하고, *C. perfringens*는 편성 혐기성 균으로 호기조건에서는 성장하기 어려우므로 약 3.0 ± 0.5 , 5.0 ± 0.5 log CFU/g 수준이 되도록 준비하여 균의 생존률을 분석하였다. 메추리알 시료는 polyethylene zip lock bag에 9.5~10.5 g 무게의 메추리알을 선별하여 무균적으로 담고, 각 시료에 미리 준비된 균주 현탁액을 200 μ L씩 접종한 후, 30분 정도 잘 스며들도록 방치하였다. 나머지 무게는 충전수에 메추리알이 80% 이상 잠길 수 있도록 채워 총 시료의 무게가 20 g이 되도록 준비하였다. 보관온도는 우유와 메추리알의 실제 유통 판매 온도를 고려하여 4, 10, 15°C로 하였는데 *C. perfringens* 과 *S. aureus*의 경우 4°C 온도에서 증식하지 않으므로 10, 15°C에서만 실험이 진행되었고 *L. monocytogenes* 의 경우 4°C 온도에서도 생육이 가능하므로 4, 10°C에서 증식률을 분석하였다. 본 연구에서 분석을 위한 저장기간은 시간에 따른 온도별 균의 성장 및 생존 속도를 고려하여, 각 시간대별로 시료를 채취하여 분석하였다.

4. 균수 측정

온도별로 저장하면서 각 시간대별로 채취한 시료를 멸균 백에 넣고 0.1% 펩톤수 9 mL로 단계별 희석한 후, stomacher(BAGMIXER 400, Interscience, Saint Nom, France)로 2분간 균질화하였다. 균액을 spiral plate(Whitley automatic spiral palter, Don Whitley Scientific, West Yorkshire, UK)를 사용하여 Tryptic Soy agar(TSA, Difco, Sparks, MD, USA)에 yeast extract 0.6%가 첨가된 TSA 및 *Perfringens* Agar Base(TSC & SFP, OXOID, Basingstoke, UK)에 각각 분주하고 36°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 형성된 집락수를 colony counter(Colony Counter SCAN 1200, Interscience, Saint Nom, France)로 계수하여 colony forming unit(CFU)으로 표시하였다. 단, *C. perfringens* 는 가스치환장치(don Whitley Scientific, West Yorkshire, UK)를 사용하여 modified gas(H₂ 5%, CO₂ 10%, N₂ 85%)를 주입한 microbial anaerobic jar(Merck, Darmstadt, Germany)에 넣어 배양하였다.

5. 성장 및 생존곡선

본 연구에서는 우유 및 알가열성형제품에서 병원성 미생물의 증식곡선을 위해서는 Modified Gompertz model 식을 이용하였으며, GraphPad Prism V4.0 program(GraphPad Software, San Diego, CA, USA)을 사용하여 분석하였다. 또한 생존 곡선을 위해서는 Weibull model 식을 이용하였으며, Microsoft Excel에서 무료로 제공하는 Gina FiT V 1.5 program(Geeraerd and Van Impe Inactivation Model Fitting Tool)을 사용하여 분석하였다.

Gompertz model equation

$$Y = N_0 + C(\exp(-\exp((2.718 \times \text{SGR}/C) \times (\text{Lag} - X) + 1))) \quad (1)$$

N_0 : log initial number of cells

C : difference between initial and final cell numbers

Lag: lag time before growth, same units as X

SGR: maximum specific growth rate (log/day)

X is time (day), Y is log cell number (CFU/ml)

Weibull model equation

$$\text{Log}_{10}(N) = \text{log}_{10}(N_0) - ((t/\text{delta})^p) \quad (2)$$

delta: treatment time for the first decimal reduction

p : shape

N_0 : log initial number of cells

t : time (day)

6. 통계분석

모든 실험은 SAS(Statistical Analysis System) V 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 통계 프로그램을 이용하여 분석하였다. 각각의 시료 그룹들 간의 유의적인 차이는 one way ANOVA와 t-test를 이용하여 분석하였으며, 각 시료간의 유의적인 차이는 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 이용하여 시료간의 유의적 차이를 검정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 지방과 저장온도가 우유제품에서 고 위험균 병원성 식중독 균의 증식 및 생존에 미치는 영향

본 연구에서 병원성 식중독균으로 *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *C. perfringens*를 인위적으로 오염시킨 우유제품을 각각의 균의 증식특성을 고려한 보관 온도 4°C, 10°C, 15°C(*L. monocytogenes*: 4와 10°C, *S. aureus*, *C. perfringens*: 10, 15°C)에 저장하면서 관찰한 각각의 식중독 균의 증식 및 생존 결과는 Fig. 1, 2, 3와 같다.

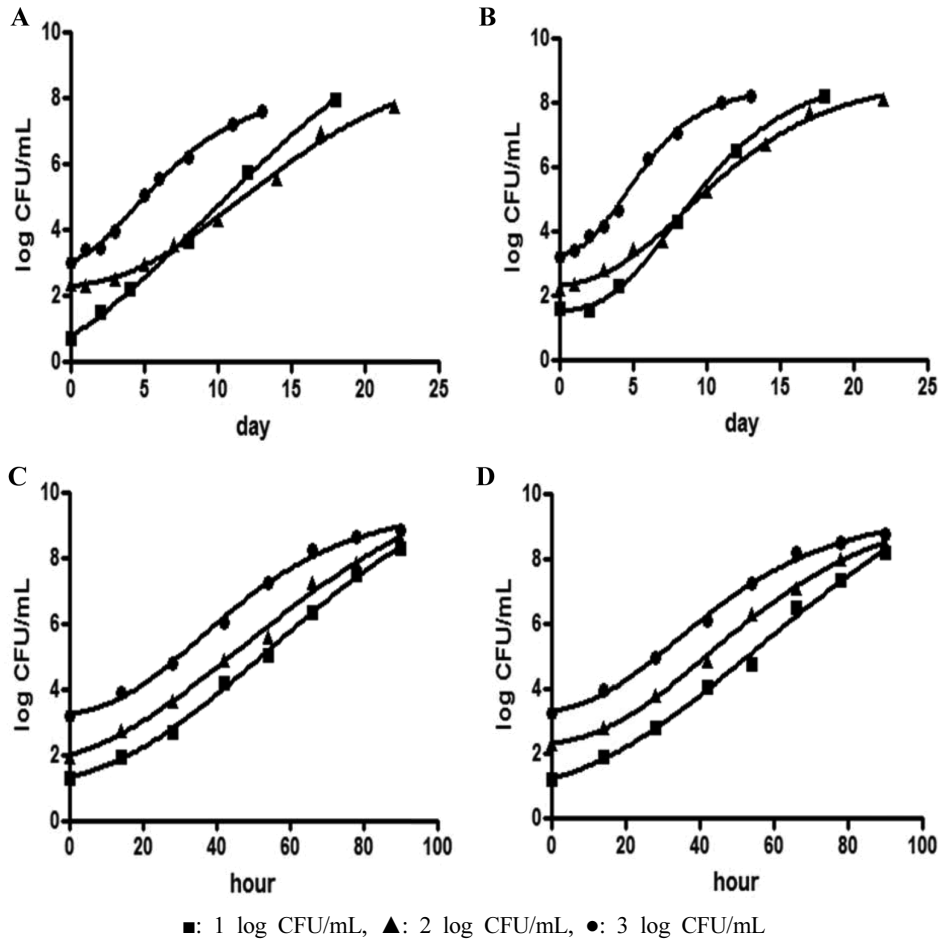


Fig. 1. Effect of initial inoculum concentration on growth of *S. aureus* in whole milk (A, C) and non-fat milk (B, D) at 10°C (A, B) and 15°C (C, D)

우유제품에서 *S. aureus*는 10, 15°C에서만 증식되므로 본 연구에서는 10°C와 15°C에서 *S. aureus*의 증식변화를 분석하였다(Fig. 1). 10°C와 15°C에서 초기 오염농도(0.5~3.5 log CFU/mL)에 따라 성장하는 속도를 비교했을 때, 통계적으로 초기 오염 농도가 다른 샘플 간에 성장속도에 유의적인 차이가 있는 것으로 나타났다($p<0.05$)(Table 1). 또한 10°C에서는 약 13~22일이 지난 후에 최대 농도 7.5~8

log CFU/mL까지 성장하였으나, 15°C에서는 일반 우유와 무지방 우유에서 모두 초기 오염 농도에 상관없이 약 3~4일 이내에 각각 8 log CFU/mL까지 성장하였으므로 철저한 온도관리가 강조 되어야 할 것으로 사료된다. 또한 오염농도가 매우 낮은 1 log CFU/mL 수준으로 균이 접종되었을 때도, 10°C에 저장한 일반 우유와 무지방 우유에서는 약 12일 경과 후 5~6 log CFU/mL까지 증식하

Table 1. Growth kinetics of *S. aureus* and *L. monocytogenes* in whole milk, non-fat milk and quail egg stored at 4, 10 and 15°C

| Parameter | Level of inoculation (log CFU/ml) | <i>S. aureus</i> | | | | | | <i>L. monocytogenes</i> | | | | | |
|-------------------|-----------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------------|--------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | | 10°C | | | 15°C | | | 4°C | | | 10°C | | |
| | | Whole milk | Non-fat milk | quail egg | Whole milk | Non-fat milk | quail egg | Whole milk | Non-fat milk | quail egg | Whole milk | Non-fat milk | quail egg |
| SGR ¹⁾ | 1.0±0.5 | 0.447 ^b | 0.612 ^b | 0.496 ^a | 2.067 ^a | 1.904 ^c | 0.812 ^c | NG ²⁾ | NG | 0.587 ^a | 0.957 ^c | 1.022 ^c | 0.416 ^c |
| | 2.0±0.5 | 0.348 ^c | 0.432 ^c | 0.324 ^b | 1.832 ^b | 2.169 ^b | 1.006 ^a | NG | NG | 0.257 ^c | 1.302 ^a | 1.191 ^b | 0.479 ^b |
| | 3.0±0.5 | 0.490 ^a | 0.670 ^a | 0.282 ^c | 1.797 ^c | 2.495 ^a | 0.921 ^b | NG | NG | 0.379 ^b | 1.261 ^b | 1.272 ^a | 0.623 ^a |

¹⁾SGR: specific growth rate (log CFU/day).

²⁾NG: no growth.

^{a-c}Means in a row by different letters are significantly different ($p<0.05$).

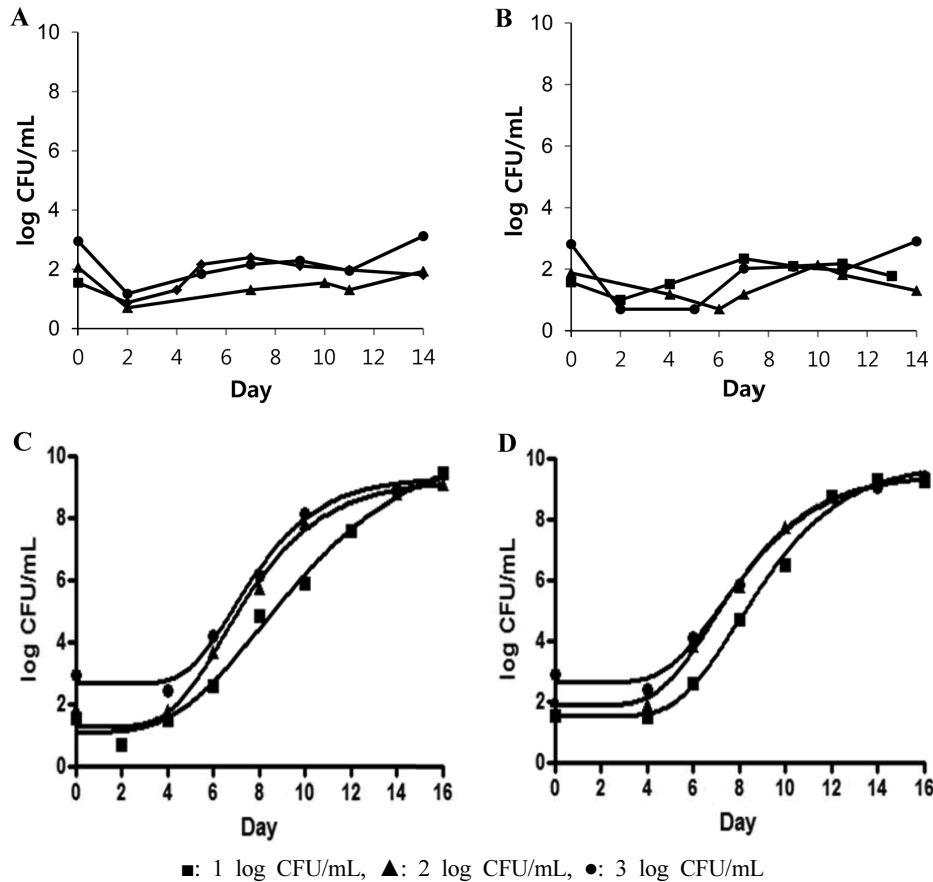


Fig. 2. Effect of initial inoculum concentration on growth of *L. monocytogenes* in whole milk (A, C) and non-fat milk (B, D) at 4°C (A, B) and 10°C (C, D)

였고, 15°C에서는 약 2~3일 경과 후 5~6 log CFU/mL까지 증식하였다. 1 log CFU/mL 수준의 균이 존재한 상태에서도 10°C, 15°C로 유통이 이루어 졌다면, 일반 우유와 무지방 우유 모두 유통기한 내에 독소 형성이 가능한 수준까지 증식하여(Ash M 1997) 식중독을 일으킬 가능성이 있음을 나타내 우유에서 *S. aureus*는 계속적으로 불검출로 관리를 할 필요가 있다고 사료된다.

다른 균에 비해 저온에서도 잘 증식하는 *L. monocytogenes*는 4°C에서 2~3 log CFU/mL 접종 수준의 오염된 우유에서 약 16일 이내에 4~6 log CFU/mL까지 증식하는 것에 비해 10°C에서는 약 16일 이내에 9 log CFU/mL 이상 증식하였으며(Fig. 2), 통계적으로 초기 오염 농도가 다른 샘플간에 성장속도에 유의적인 차이가 있는 것으로 나타났다($p < 0.05$)(Table 1). 또한 *L. monocytogenes*는 1 log CFU/mL 수준으로 오염되었을 때, 4°C에 저장한 일반 우유와 무지방 우유에서는 약 16일 경과 후 2 log CFU/mL 수준까지 증식 하였으나, 10°C에서는 약 4~5일 경과 후 2 log CFU/mL 수준 이상으로 증식하였다. *L. monocytogenes* 균은 오염수준에 상관없이 4°C에서 저장했을 때에는 낮은 증가율을 보였으나, 10°C에서는 16일 경과 후 모두 9

log CFU/mL 수준 이상으로 성장하였다. *L. monocytogenes*의 경우에도 1 log CFU/mL 수준으로 오염된 상태에서 냉장온도인 0~10°C로 유통 및 판매가 이루어 졌다면, 식중독을 일으킬 가능성이 있어 유통단계에서의 온도관리가 철저하게 이루어져 하며 *L. monocytogenes*균이 영유아, 임산부 등 고위험군 그룹에 치명적인 것을 고려할 때(Liewen MB와 Plautz MW 1998) 우유에서는 반드시 음성으로 관리되어야 한다고 판단되어진다.

*C. perfringens*의 경우에도 *S. aureus*와 마찬가지로 장독소를 생성하는데, 식중독은 *C. perfringens*가 소장에서 포자를 형성할 때 만드는 enterotoxin에 의해 일어난다(McDonel JL 1980). *C. perfringens*는 6 log CFU/mL 이상 오염되어야 발병을 일으키는 식중독 균인 만큼(Park JH 2009), 3, 5 log CFU/mL 수준으로 각각 접종하여 10°C 저장 조건에서 약 10일 동안 저장한 결과 통계적으로 초기 오염 농도가 다른 샘플 간에 감소속도에 유의적인 차이가 있는 것으로 나타났으며(Table 2), 모두 사멸하였는데 우유의 포장 상태가 호기적 조건인 것이 영향을 미쳤을 것으로 사료된다(Fig. 3). 또한 10°C 이하의 온도에서는 증식하지 못하는 *C. perfringens*균의 특성상(Li J와 McClane

Table 2. Survival kinetics of *C. perfringens* in whole milk, non-fat milk and quail egg stored at 10 and 15°C

| Parameter | Samples | <i>C. perfringens</i> | | | | p-value |
|---------------------|--------------|-----------------------|-----------------|-----------------|-------|----------|
| | | 10°C | | 15°C | | |
| | | 3.0±0.5 | 5.0±0.5 | 2.0±0.5~3.0±0.5 | | |
| | | Vegetative cell | Vegetative cell | Vegetative cell | spore | |
| | Whole milk | 3.97 | 5.21 | - | - | < 0.0001 |
| Delta ¹⁾ | Non-fat milk | 3.52 | 2.77 | - | - | < 0.0001 |
| | Quail egg | 5.63 | 12.58 | 12.21 | 13.49 | < 0.0001 |

¹⁾Delta: treatment time for the first decimal reduction, p<0.05.

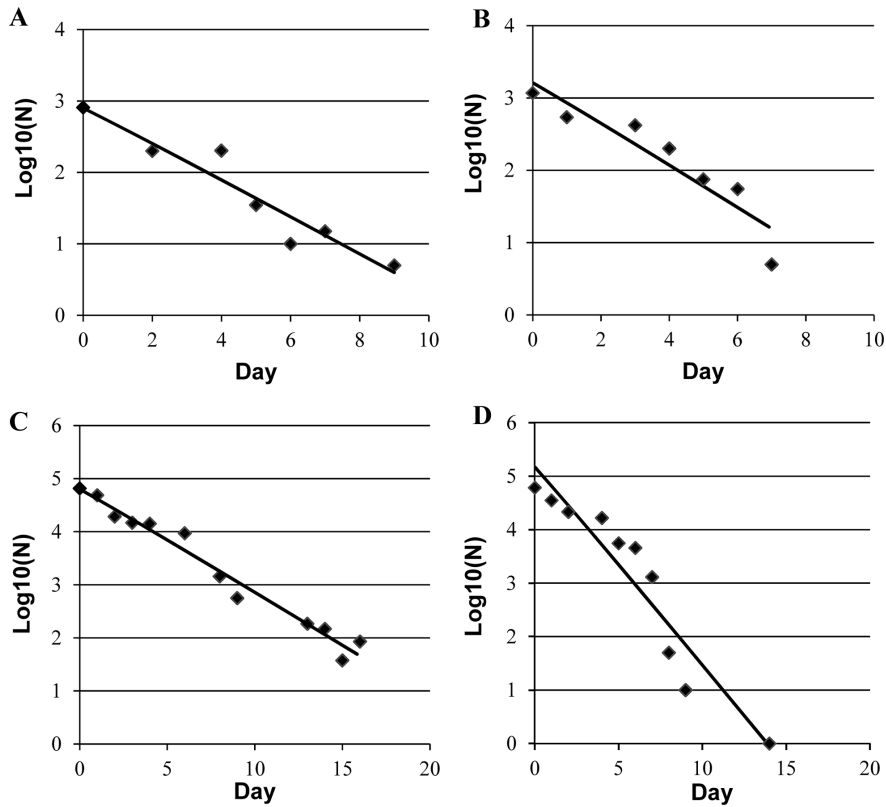


Fig. 3. Effect of fat content on survival of *C. perfringens* in whole milk (A, C) and non-fat milk (B, D) at 10°C (A, B: 3 log CFU/mL, C, D: 5 log CFU/mL)

BA 2006) 우유가 유통 및 판매되는 과정 동안 10°C 이하의 온도를 유지한다면 유통기한 내에 *C. perfringens*의 감염에 대한 위험성은 매우 희박할 것으로 나타났다. 그러나 10°C의 온도에서 3, 5 log CFU/mL 수준으로 오염된 *C. perfringens*는 일반 우유에서 더 오래 생존하였는데 특히 유제품에서 자주 발견되는 균인 *C. perfringens*의 생존은 지방함량의 유·무와도 관련이 있을 것으로 사료된다. 초기 오염수준에 따라서는 5 log CFU/mL 수준으로 오염되었을 때보다 3 log CFU/mL 수준으로 오염되었을 때 생존기간이 2배 정도 줄어드는 것으로 나타났으며, 특히 3 log CFU/mL의 오염수준에서는 10°C 에서 유통기한 내

에 사멸하였다.

2. 초기 오염농도가 메추리알 제품에서 고 위험군 병원성 식중독 균의 증식 및 생존에 미치는 영향

*S. aureus*를 접종한 메추리알을 10°C에 저장했을 때, 초기 오염 농도(1~3 log CFU/g)에 크게 상관없이 약 46일 이내에 최대 8 log CFU/g까지 증식하였나(Fig. 4), 통계적으로는 초기 오염 농도에 따른 성장속도에 유의적인 차이가 있는 것으로 나타났다(Table 1). 이는 알가열성형제 품인 메추리알의 유통기한이 60일인 것을 고려했을 때, 유통판매온도인 10°C에서 초기 오염 수준이 1 log CFU/g

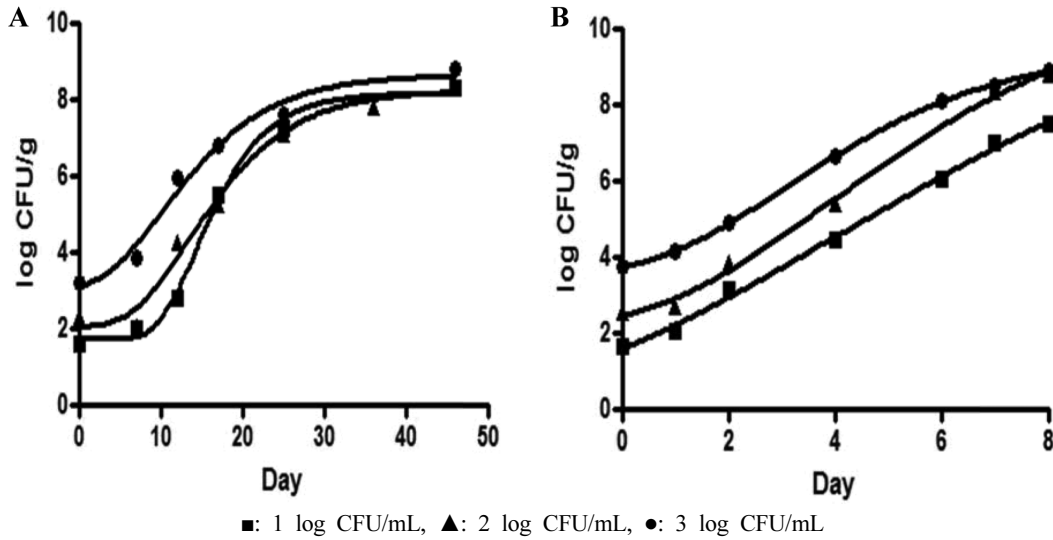


Fig. 4. Effect of initial inoculum concentration on growth of *S. aureus* in quail egg at 10°C (A), 15°C (B)

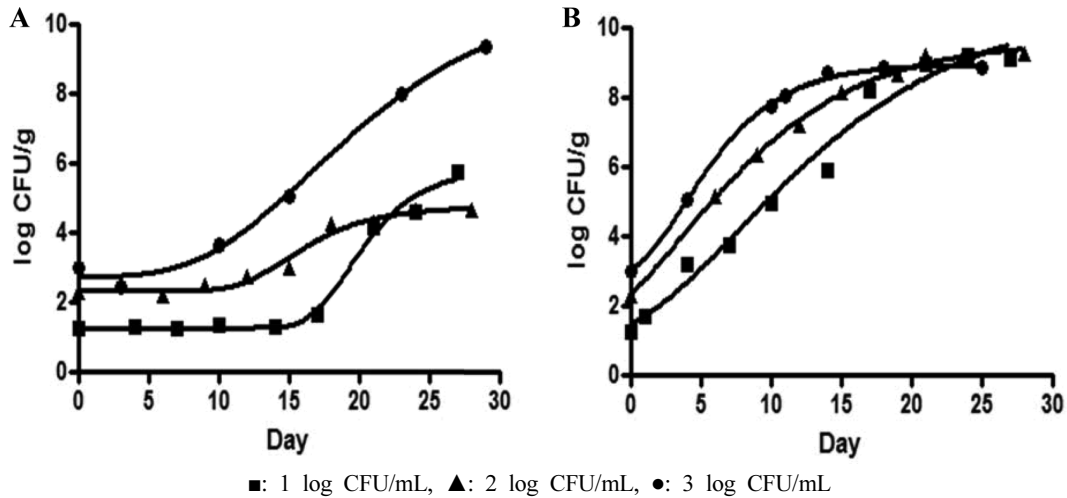


Fig. 5. Effect of initial inoculum concentration on growth of *L. monocytogenes* in quail egg at 4°C (A), 10°C (B)

일 때에도 유통기한 내에 최대 농도까지 성장할 수 있는 것으로 판단된다. 또한 10°C 보다 높은 15°C에 저장했을 때에도 초기 오염 농도(1~3 log CFU/g)에 따른 성장속도에 유의적인 차이가 있었으며(Table 1), 8일 이내에, 최대 7~8 log CFU/g까지 증식하여 10°C에 저장했을 때에 비해 최대 수까지 성장하기 까지 걸리는 속도는 약 6배 정도 빠른 것으로 나타났다. 이는 저장온도에 따라 메추리알에서의 *S. aureus*의 증식 속도가 크게 차이 나는 것을 보여주며, 알가열성형제품인 메추리알의 공정과정에서 *S. aureus* 오염이 되지 않도록 하여야 하며 마켓이나 편의점 등에서 유통 판매할 때에 온도 남용이 되지 않도록 철저한 온도 관리가 필요한 것으로 나타났다.

메추리알을 4°C에 저장 시, *L. monocytogenes*를 1 log CFU/g의 수준으로 오염된 메추리알은 17일의 저장기간 동안에는 큰 성장 없이 유지하는 경향을 보이다가 17일

이후부터는 급격히 성장하기 시작하여 약 27일 이내에 최대 5 log CFU/g까지 성장하였으며(Fig. 5), 초기 오염 농도에 따른 성장속도에 유의적인 차이가 있는 것으로 나타났다(Table 1). 메추리알의 유통기한이 60일인 것을 고려했을 때, 유통 판매 온도인 4°C에서 최소 농도로 오염되었음에도 불구하고 최대 5 log CFU/g 이상 성장할 수 있으므로 메추리알에서 *L. monocytogenes*는 철저한 음성 관리가 필요할 것으로 사료된다. 10°C에서 저장했을 때에도 초기 오염 농도에 따른 성장속도에 유의적인 차이를 보였다(Table 1). 또한 초기 오염 농도(1~3 log CFU/g)에 상관없이 약 20일 이내에 최대 9 log CFU/g 이상 수준까지 성장하였으며, 4°C에서 저장했을 때와 비교했을 때 약 2배 정도 빠르게 성장하였다. *L. monocytogenes*의 경우도 *S. aureus*와 마찬가지로 저장 온도에 따라 증식 속도가 크게 차이 나며, 메추리알의 유통 및 판매 단계에서

온도관리가 절대적으로 중요하다는 것을 나타낸다. 또한 *L. monocytogenes*의 경우도 건강한 사람이 6-7 log CFU/g 이상 오염된 식품을 섭취했을 경우 식중독 증상이 일어나는데(Farber JM 등 1996), 권장 냉장온도(0~10°C)에서 낮은 농도로 오염되었을 때 모두 최대 6-8 log CFU/g까지 성장하므로 최종제품에서 음성으로 엄격한 관리가 필요할 것으로 판단된다. 현재 삶아서 간 형태로 판매되고 있는 메추리알 가공품은 충전수와 함께 반호기 상태로 유통되고 있다. 충전수에는 천연항균물질인 GSE(Grapefruit Seed Extrate: 자몽종자추출물)가 첨가되어 있는데, GSE는 자몽 종자 외에도 과육, 흰색의 얇은 막에서 추출한 것으로 부패성 및 병원성 미생물의 세포벽 및 세포막의 기능을 약화시키고 효소활성을 억제한다고 알려져(Hegggers JP 등 2002, Reagor L 등 2002) 천연 항균 보존제로 사용되고 있다. 그러나 *S. aureus*와 *L. monocytogenes*를 충전수에 담겨져 있는 메추리알에 인위적으로 접종했을 때, 유통기한 내에 모두 초기 농도에서 최대 농도로 성장하

는 경향으로 보아 메추리알 가공품에서의 자몽추출물의 항균 효과는 크지 않다고 판단된다. 따라서 메추리알 가공품이 유통과정에서 온도남용이 되는 경우를 생각할 때 자몽종자추출물 이외에 다른 hurdle 테크닉이 필요할 것으로 사료된다.

*S. aureus*와 *L. monocytogenes*와 다르게 *C. perfringens*를 3 log CFU/g 수준으로 접종한 메추리알을 10°C에 저장했을 때는 16일간 저장 후에 약 3 log CFU/g 정도 사멸하는 것으로 나타났다(Fig. 6). 메추리알 제품의 유통기한이 60일인 것을 고려했을 때, 유통기한 내에 고농도의 오염 및 증식에 대한 우려는 없을 것으로 판단된다. 또한 5 log CFU/g 이상의 고농도로 접종했음에도 불구하고 55일 이내에 모든 *C. perfringens*가 사멸한 것으로 나타났다. 따라서 10°C에서 유통 및 판매되는 알가열성형제품은 *C. perfringens*에 의한 위험성은 없을 것으로 판단된다. 초기 오염수준이 약 3 log CFU/g인 메추리알을 각각 10, 15°C에 저장했을 때, 사멸속도에 유의적인 차이가 있

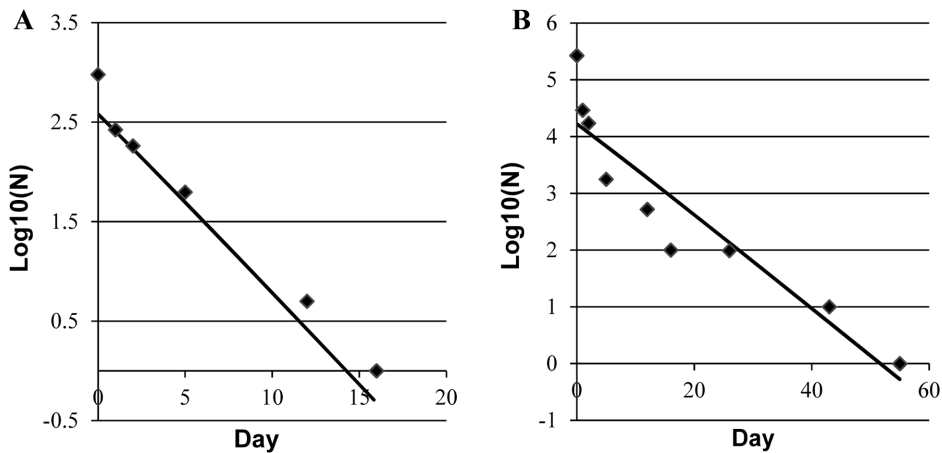


Fig. 6. Effect of initial inoculum concentration on survival of *C. perfringens* in quail egg at 10°C (A: 3 log CFU/g, B: 5 log CFU/g)

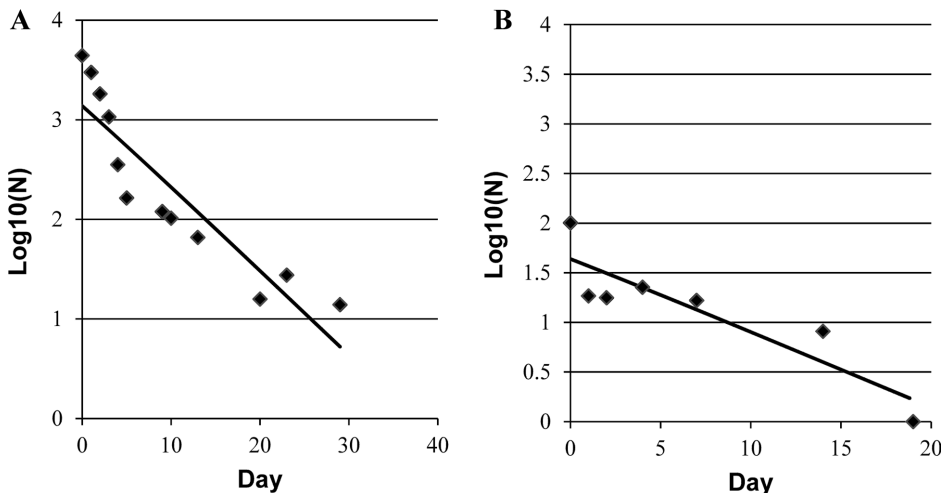


Fig. 7. Survival of *C. perfringens* vegetable cell (A), *C. perfringens* spore (B) in quail egg at 15°C

는 것을 볼 수 있었는데, 10°C에서의 delta 값이 15°C에서의 delta 값보다 작은 것으로 나타났다(Table 2). *C. perfringens*가 10°C에서보다 15°C에서 더 오래 생존하였으나 유통기한 내에 온도에 따른 오염 및 증식에 대한 우려는 없을 것으로 사료된다. 또한, 충전수와 함께 포장되어 있어 반 호기 포장 상태인 알가열성형제품에서 *C. perfringens*는 10, 15°C에서 유통기한 내에 사멸하는 경향을 보였다. 그러나 *C. perfringens*의 경우 포자를 생성할 수 있는데, *C. perfringens* 포자는 영양세포가 적절한 열처리를 하였을 때 사멸되는 것과는 달리 100°C에서 1시간 가열하여도 생존할 정도로 열정항성이 매우 강하다(Labbe RG 2001). 또한 Byrne B 등(2006)은 pork luncheon roll에서 *C. perfringens* 영양세포의 D-value가 65°C에서 0.8분 이었던 것에 비해 포자의 D-value는 90°C에서 30.6분이라는 결과가 나왔다고 보고하여 포자의 대한 위험성을 조사할 필요가 있다고 판단된다. 따라서 본 연구에서는 *C. perfringens*를 포자상태로 메추리알에 접종하여 15°C에 저장한 결과 포자의 초기 오염 농도가 약 2 log CFU/g인 상태에서 완전히 사멸하기까지 걸리는 시간은 19일 이었다(Fig. 7). 또한 영양세포와 포자와의 사멸속도를 비교해본 결과, 포자의 delta 값이 영양세포의 delta 값보다 유의적으로 큰 것으로 나타났다(Table 2). 이는 식품에서 포자가 영양세포보다 더 오래 성장할 수 있어 그 위험성이 더 크다고 판단할 수 있다. 그러나 메추리알에서 영양세포 뿐만 아니라 포자 모두 유통기한 내에 사멸하므로 *C. perfringens* 포자에 의한 위험은 매우 희박하다고 판단된다.

IV. 요약 및 결론

본 연구에서는 병원성 식중독 균을 인위적으로 오염시킨 우유 및 계란 가공품을 4, 10, 15°C에 저장하면서 유통기한 동안 지방성분, 보관온도, 오염농도가 미생물의 증식 및 생존에 미치는 영향을 연구하였다. 연구결과에 따르면 일반 우유와 무지방 우유에서의 *S. aureus*가 최대 농도까지 성장하는데 걸리는 시간을 온도에 따라 비교했을 때, 10°C에서 저장했을 때가 15°C에 저장했을 때에 비해 약 4-5배 차이 나는 것을 볼 수 있었다. 또한 10°C에서는 초기 오염 농도에 따라 성장하는 속도에 있어서 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났으며, 1 log CFU/mL 수준으로 균이 접종되었을 때도 일반 우유와 무지방 우유에서 유통기한 내에 5~6 log CFU/mL까지 증식하였다. 15°C에서도 마찬가지로 1 log CFU/mL의 낮은 수준으로 접종시켰을 때, 유통기한 내에 8 log CFU/mL까지 증식하였다. 우유의 최대 보존 및 유통온도는 0~10°C이며 유통기한은 약 11~14일인 것을 고려했을 때, 그 기간 내에 일반 우유와 무지방 우유 모두 *S. aureus*의 독소 형성이 가

능한 수준까지 증식하므로 식중독 위험 가능성이 있어 우유에서 *S. aureus*는 계속적으로 불검출로 관리될 필요가 있다고 사료된다. *L. monocytogenes*는 저온에서도 잘 성장하여 4°C와 10°C에 저장한 결과, 오염수준에 상관없이 4°C에서는 낮은 증가율을 보였으나, 10°C에서는 유통기한 내에 최대 8~9 log CFU/mL 수준 이상으로 증식하였다. *L. monocytogenes*의 경우도 *S. aureus*와 마찬가지로 냉장온도에서 최소 농도로 오염되었어도 식중독을 일으킬 가능성이 있으므로 온도관리가 철저하게 이루어져야 하며, 반드시 음성으로 관리되어야 한다고 판단되어진다. 반면에 *C. perfringens*를 3, 5 log CFU/mL 수준으로 접종하여 10°C에 저장했을 때, 저장기간 동안 모두 사멸하는 경향을 보여 우유의 유통과정 동안 *C. perfringens*의 감염에 대한 위험성은 희박할 것으로 판단된다. 알가열성형제품인 메추리알에 *S. aureus*를 접종하여 10°C와 15°C에 저장했을 때, 유통기한 60일 이내에 초기 접종 온도에 상관없이 최대 8 log CFU/g까지 증식하였다. 또한, 10°C에 저장했을 때에 비해 15°C에 저장했을 때, 최대 농도까지 성장하는 속도가 약 6배 빠른 것으로 나타나 알가열성형제품인 메추리알을 유통 판매 할 때 철저한 온도 관리가 필요할 것으로 사료된다. *L. monocytogenes*의 경우에도 유통기한 내에 최대 농도까지 성장하는 속도가 4°C에 비해 10°C에서 약 2배 빠르게 성장한 반면 *C. perfringens*를 3, 5 log CFU/g 수준으로 접종한 메추리알은 저장온도 10°C에서 유통기한 내에 모두 사멸하여 알가열성형제품에서의 *C. perfringens*의 의한 위험성은 없을 것으로 판단된다. 또한 15°C에서 *C. perfringens* 포자를 접종하여 저장한 결과, 모두 유통기한 내에 사멸하는 경향을 보였으므로 영양세포 뿐만 아니라 포자에 의한 식중독 위험성 또한 매우 희박할 것으로 판단된다. 본 연구 결과 냉장 온도에 따른 병원성 미생물의 성장 속도 차이를 보였으므로 우유 제품 및 계란 가공품의 유통 판매 과정 중의 냉장온도를 낮추어 관리가 이루어진다면 이들 제품에 대한 품질보장 및 유통기한 연장 등의 효과를 볼 수 있을 것으로 사료된다. 특히 낮은 오염 수준임에도 불구하고 유통기한 내에 최대로 성장하는 *S. aureus*, *L. monocytogenes* 한해서는 음성으로 반드시 관리가 되도록 하여야 하며 유통 전 단계에서 온도납용이 되지 않도록 하는 유통 가이드라인을 제시할 필요가 있다.

References

- Ash M. 1997. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxin. In: A.D. Hocking, G.A.I.J.K.N.a.P.S. eds. *Foodborne Microorganisms of Public Health Significance*. 5th ed. AIFST (NSW Branch) Food Microbiology Group. Sydney, Australia pp 313-332

- Atanassova V, Meindl A, Ring C. 2001. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham—a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR. *Int J Food Microbiol* 68(1):105-113
- Byrne B, Dunne G, Bolton DJ. 2006. Thermal inactivation of *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* vegetative cells and spores in pork luncheon roll. *Food Microbiol* 23(8): 803-808
- Cho SJ, Park JS. 2011. Impediment of dairy industry development: butterfat crude price system. *GS&J Insititute* 121:1-11
- Cooper KK, Songer JG, Uzal FA. 2013. Diagnosing clostridial enteric disease in poultry. *J Vet Diagn Invest* 25(3):314-327
- Farber JM, Ross WH, Harwig J. 1996. Health risk assessment of *Listeria monocytogenes* in Canada. *Int J Food Microbiol* 30(1-2):145-156
- Hegggers JP, Cottingham J, Gusman J, Reagor L, McCoy L, Carino E, Cox R, Zhao JG. 2002. The effectiveness of processed grapefruit-seed extract as an antibacterial agent; II Mechanism of action and *in vitro* toxicity. *J Altem Complem Med* 8(3): 333-340
- Juneja VK, Call JE, Marmer BS, Miller AJ. 1994. The effect of temperature abuse on *Clostridium perfringens* in cooked turkey stored under air and vacuum. *Food Microbiol* 11(3): 187-193
- Kim HW, Paik HD, Hong WS, Lee JY. 2009. Overview of the Management Characteristics of Food (Livestock Products) Transportation Systems on International – and National-level HACCP Application. *Korean J Food Sci Ani Resour* 29(4): 513-522
- Labbe RG. 2001. *Clostridium perfringens*. pp 325-330 In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Downs FP, Ito K. (eds). American Public Health Association. Washington, DC
- Liewen MB, Plautz MW. 1998. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in raw milk in Nebraska. *J Food Prot* 51(11):840-841
- Li J, McClane BA. 2006. Further comparison of temperature effects on growth and survival of *Clostridium perfringens* Type A isolates carrying a chromosomal or plasmid-borne enterotoxin gene. *Appl Environ Microbiol* 72(7):4561
- McDonel JL. 1980. *Clostridium perfringens* toxins (type A, B, C, D, E). *Pharmacol Ther* 10(3):671-655
- Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs. MAFRA statistics. Available from: <http://lib.mafra.go.kr>. Accessed September 23, 2013
- Ministry of Food and Drug Safety. 2007. Microbial change monitoring in food by temperature management. Korean Consumer Agency. Korea pp 1-17
- Ministry of Food and Drug Safety. Korean Food Standards Codex. Available from; http://fse.foodnara.go.kr/residue/RS/jsp/menu_02_01_01.jsp. Accessed December 31, 2013
- Park JH. 2009. A study of growth *Clostridium perfringens* in a ‘Sous-vide/Cook-chill’ Korean traditional seasoned beef rib. Master thesis. The Hanyang University of Korea. p 6
- Reagor L, Gusman J, NcCoy L, Carino E, Hegggers JP. 2002. The effectiveness of trated grapefruit-seed extract as an antibacterial agent. I An *in vitro* agar assay. *J Altem Complem Med* 8(3):325-332
- Seelinger HPR, Jones D. 1986. *Listeria*. Vol 2. pp 1235-1245. In: Sneath PHA., Mair NS, Sharp ME, Holt JG (eds). *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins Baltimore
- Velugoti PR, Bohra LK, Juneja VK, Thippareddi H. 2007. Inhibition of germination and outgrowth of *Clostridium perfringens* spores by lactic acid salts during cooling of injected turkey. *J Food Prot* 70(4):923-929

Received on June19, 2014/ Revised on Sep.26, 2014/ Accepted on Sep.28, 2014