

식육추출가공품 중 갈비탕에서의 *Staphylococcus aureus* 성장예측모델 개발

손나리 · 김안나 · 최원석 · 윤상현 · 서수환 · 주인선 · 김순한 · 박효선 · 조준일*

식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 식품위해평가부 미생물과

Development of a predictive model describing the growth of *Staphylococcus aureus* in processed meat product galbitang

Na-Ry Son, An-Na Kim, Won-Seok Choi, Sang-Hyun Yoon, Soo-Hwan Suh,
In-Sun Joo, Soon-Han Kim, Hyo-Sun Kwak, and Joon-Il Cho*

Food Microbiology Division, Food Safety Evaluation Department, Ministry of Food and Drug Safety Evaluation

Abstract In this study, predictive mathematical models were developed to estimate the kinetics of *Staphylococcus aureus* growth in processed meat product galbitang. Processed meat product galbitang was inoculated with 0.1 mL of *S. aureus* culture and stored at 4, 10, 20, 37°C. The μ_{max} (maximum specific growth rate) and LPD (lag phase duration) values were calculated. The primary model was used to develop a response surface secondary model. The growth parameters were analyzed using the square root model as a function of storage temperature. The developed model was confirmed by calculating RMSE (Root Mean Square Error) values as statistic parameters. The LPD decreased, but μ_{max} increased with an increase in the storage temperature. At 4, 10, 20 and 37°C, R^2 was 0.99, 0.98, 0.99 and 0.99, respectively; RMSE was 0.39. The developed predictive growth model can be used to predict the risk of *S. aureus* contamination in processed meat product galbitang; hence, it has potential as an input model for the risk assessment.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, predictive model, processed meat product galbitang

서 론

최근 우리나라의 사회구조 및 식생활 패턴의 변화, 핵가족화 및 여성의 사회참여 증가로 편의성 및 경제성 등을 앞세워 완전 조리 상태의 식품과 즉석섭취 및 편의식품 등의 소비가 증가하는 것으로 나타났다(1). 이러한 시대상황은 조리된 식품, 반 조리 식품 등 새로운 식품 가공 기술에도 영향을 주어 비교적 조리시간이 긴 갈비탕류의 음식도 가정에서 간단한 과정만 거치면 쉽게 섭취할 수 있는 가공식품으로 생산되고 있다. 현재 세계적으로 식품의 위생과 안전성 확보를 위해 과학 기술을 기반으로 한 체계적인 노력은 계속되고 있지만, 여전히 병원성 미생물에 의한 식중독 발생은 증가 추세로 대량화 및 집단화 특성을 보이고 있다(2). 특히 우리나라의 경우 과거 쌀을 비롯한 곡류 위주의 음식문화에서 육류 위주의 음식문화로 전환됨으로써 동물성 식품 매개 식중독 사고 사례가 증가하고 있으며 식품의약품안전처에서 제공하는 식중독 발생 통계치에 따르면 2014년도에 국내 식중독 발생에 따른 원인식품으로 육류 및 그 가공품이 두 번째로 높은 것으로 보고되었다. *Staphylococcus aureus*는 자연계에 광범위하게 분포하고 있으며 식품에 오염되는 경로도 매우 다양하

로 식품위생상 중요하게 다루어지고 있는 세균이며 전 세계적으로도 *S. aureus*에 의한 식중독 발생빈도는 세 번째로 높은 것으로 보고되고 있다(3,4).

최근 생물학적 위해요소인 미생물에 의한 식중독 예방 대책으로 미생물 위해평가의 중요성이 강조되고 있으며 이에 대한 평가 방법으로 예측미생물학(predictive food microbiology, PFM)이 크게 대두되고 있다(5,6). 이는 pH, Aw (water activity), NaCl의 함량과 같은 내부적인 요인(intrinsic factor)과 식품의 생산과 저장기간, 온도, 포장 방법, 습도 등의 외부적인 요인(extrinsic factor)에 따라 식품 중 미생물의 성장과 사멸을 예측할 수 있는 수학적 방법이다(7,8). 미생물의 성장을 수학적 모델에 의해 예측하고 평가할 수 있기 때문에 기존의 미생물 검사와 비교 시 정량적이고 신속한 예측이 가능하여 식중독 예방에 큰 효과가 있는 것으로 평가되고 있다(9). 현재 국내·외의 많은 나라에서 육류와 채소류 등의 원재료와 즉석섭취식품을 대상으로 다양한 병원성 미생물에 대한 성장예측모델을 개발하고 있다(10). 이 중 *S. aureus*에 대한 연구는 즉석섭취식품이나 햄, 칠면조 및 닭고기, 우유 등에 대한 연구가 이루어졌으며 국내에서는 학교급식에 대한 조리 식품에 대한 모델 개발로 한정되어 있다(11-14).

*S. aureus*의 주요 원인 식품으로 축산제품이 대두되고 있으며, 축산제품에 속하는 식육추출가공품 중 갈비탕은 우리나라의 대표적인 전통 탕반류로서 대량 보급이 가능한 대중식품의 특성을 가지고 있기 때문에 장기유통이 가능한 상품으로 다양한 형태로 유통·판매되고 있다(15,16).

따라서 본 연구에서는 유통·판매되는 식육추출가공품 중 냉동유통 제품과 멸균 처리된 실온제품에 대한 위해성은 배제하고 냉장상태로 유통·판매되는 갈비탕의 제품을 대상으로 성장예측

*Corresponding author: Joon-Il Cho, Food Microbiology Division, food Safety Evaluation Department, Ministry of Food and Drug Safety Evaluation, Cheongju, Chungbuk 28159, Korea
Tel: +82-43-719-4305
Fax: +82-43-719-4300
E-mail: kvoyou@korea.kr
Received January 10, 2017; revised February 10, 2017;
accepted February 12, 2017

모델을 적용하여 *S. aureus*의 성장 변화를 예측할 수 있는 수학적 모델을 개발하여 조건변화에 대한 식육추출가공품 중 갈비탕의 안전관리에 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

시료 수거

국내에 유통·판매되는 식육추출가공품 중 갈비탕 시료는 전국단위 26개 지역의 대형마트, 농협, 축협 등에서 구매하여 아이스박스에 보관하여 시험장소로 이동하였으며 실험 전까지 냉장 온도 4°C에 보관되었다.

표준균주

본 연구에 사용된 표준균주는 *S. aureus* ATCC 14458 (isolated from human), ATCC 27664 (isolated from chicken tetrazzini), ATCC 23235 (isolated from turkey salad), ATCC 13565 (isolated from ham) 및 ATCC 19095 (isolated from leg abscess)으로 American Type Culture Collection (ATCC)에서 분양 받았으며, tryptic soy broth (TSB, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)에 전 배양하여 1 mL을 vial tube에 50% 글리세롤(glycerol)을 첨가하여 -70°C에 동결 보관하면서 실험에 사용하였다.

시험 균 액 제조

표준균주의 단일 집락을 취하여 TSB 10 mL에 접종하여 35°C에서 24시간 동안 배양한 후 4°C에서 1.912×g으로 15분간 원심 분리하여 cell pellet을 얻고 이를 인산완충용액(PBS; phosphate buffer solution)으로 2회 세척한 다음 각각의 배양액을 혼합 후 PBS를 이용해 희석하였다. 다양한 선행연구에서 최소인체위해용량의 장독소를 생성하는 *S. aureus*의 균체 농도는 5 log CFU/mL 수준으로 보고되어 있어 본 연구에서는 유도기부터 성장패턴을 보고자 2 log CFU/mL 수준으로 희석하여 이를 시험 균액으로 사용하였다(17-19).

시료 준비 및 균 액 접종

송 등(20)의 연구에 따라 대상 식품에 대한 유사한 조건으로 하여 예측모델을 개발하기 위하여 각 시료를 clean bench에서 기존의 형태를 최대한 유지하며 판매되는 완제품의 평균 용량에 맞추어 진공팩에 250 g씩 취하였으며 희석한 시험 균 액 100 µL를 접종하여 균체 농도는 2 log CFU/g 수준이 되게 하였다. 접종된 시료는 각각의 저장 온도(4, 10, 20, 37°C)에 보관하면서 균수를 측정하였다.

균의 성장 측정

*S. aureus*가 접종된 식육추출가공품 시료를 4, 10, 20, 37°C에서 저장하면서 온도별로 10-15회 정도 시료를 분석하였다. 시료에 PBS 225 mL를 첨가한 후 균질기(BagMixer®, Interscience, St. Nom, France)를 이용하여 2분 동안 균질화 시킨 후 10진 희석법으로 희석하여 Baird Parker RPF 배지에 도말하여 균수의 변화를 확인하였다.

성장예측모델 개발

본 연구에서는 갈비탕에서 *S. aureus*의 Baranyi model을 이용하여 1차 모델을 개발하였으며, 최대성장률(μ_{max} ; maximum specific growth rate, log CFU/g·h), 유도기(LPD; lag phase duration, h), 초기 세균수(N_0 ; the initial bacterial counts, log CFU/g) 및 최대

성장 세균수(N_{max} ; the final bacterial counts, log CFU/g)를 온도별 성장패턴 결과를 이용하여 도출하였다.

[Baranyi model]

$$N_t = N_0 + \mu_{max} \times A_t - \ln \left[1 + \frac{\exp(\mu_{max} \times A_t) - 1}{\exp(N_{max} - N_0)} \right]$$

$$A_t = t + \frac{1}{\mu_{max}} \ln \left(\frac{\exp(-\mu_{max}) + q_0}{1 + q_0} \right)$$

μ_{max} : maximum specific growth rate

N_0 : the initial bacterial counts

N_{max} : the final bacterial counts

q_0 : a parameter defining the initial physiological state of the cells

t : time

*S. aureus*의 성장예측 2차 모델은 Square root model과 Polynomial equation을 활용하여 매개변수에 대해 저장 온도가 미치는 영향을 계산하였다.

[Square root model]

$$\sqrt{\mu_{max}} = a(T - T_{min})$$

μ_{max} : maximum specific growth rate

a : slope of linear equation

T : storage temperature

T_{min} : theoretical minimum temperature

[Polynomial equation]

$$\ln(\mu_{max}) = a + bT + cT^2$$

μ_{max} : Maximum specific growth rate

T : Temperature

a, b, c : Constant number

성장예측모델의 적합성 평가

개발된 *S. aureus* 성장예측모델 식을 평가하고자 통계적 지표인 Root Mean Square Error (RMSE)을 산출하였다. RMSE는 실험을 통해 얻어진 값과 예측 값과의 차이를 이용하여 얻어지는 수치로, 이 값이 0에 가까울수록 개발된 모델의 적합도가 높아진다.

[RMSE]

$$\sqrt{\frac{\sum(\text{obs} - \text{pred})^2}{n}}$$

obs: observed value

pred: predicted value

n : number of observation

결과 및 고찰

온도별 *S. aureus*의 성장패턴

갈비탕에서 온도에 따른 *S. aureus*의 성장변화는 Fig. 1과 같다. 황색포도상구균은 저장 온도(4, 10, 20, 37°C)에서 모두 증가하였고 4°C는 670시간, 10°C는 348시간, 20°C는 11시간, 및 37°C는 5시간 이후에 성장이 나타나기 시작했다. 온도별 최대 성장은 4°C의 경우 724시간에서 4.60, 10°C의 경우 852시간에서 7.02, 20°C

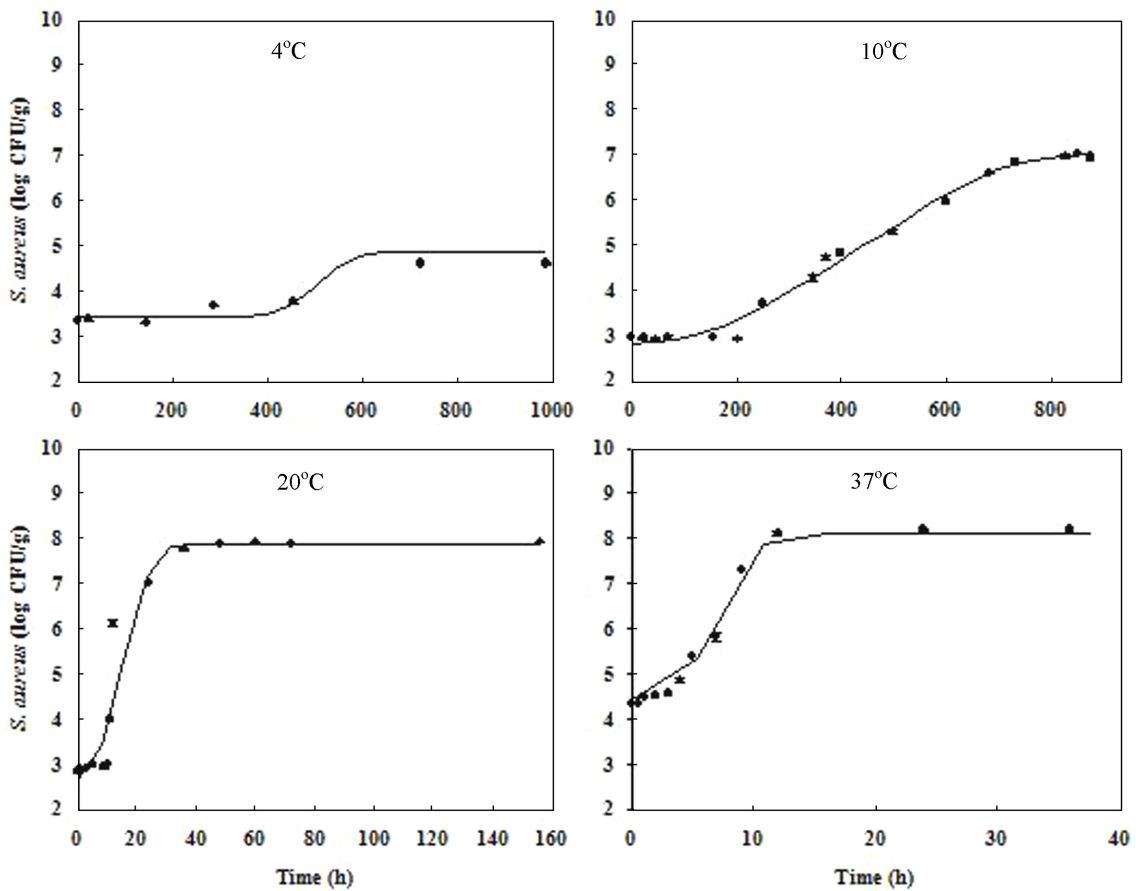


Fig. 1. Survival patterns of *S. aureus* in Galbitang of processed meat product during storage at 4, 10, 20, and 37°C

의 경우 156시간에서 7.93 및 37°C의 경우 48시간에서 8.31 log CFU/g 수준으로 확인되었다. 초기 오염도에 비해 보관 초기에는 균의 증식이 모든 온도에서 나타났으나 최대 성장 이후에는 감소하는 경향을 나타내었다. 37°C의 경우 가장 뚜렷한 균의 감소 경향을 보였으며 10°C 이하에서 보관한 식품에서의 *S. aureus*은 급속한 성장은 이루어지지 않으나 오랜 시간 생존하는 것으로 확인되어 다양한 미생물 성장패턴 연구 결과와 유사한 것으로 나타났다(21,22).

성장예측모델 개발

각 온도별(4, 10, 20, 37°C) 갈비탕에 오염된 *S. aureus*의 생육 결과를 바탕으로 Baranyi model을 이용하여 유도기(LPD)와 최대 성장률(μ_{max} , maximum specific growth rate)을 산출하였다(Fig. 1). 최대성장률(μ_{max})은 온도가 높아질수록 증가하여 37°C에서 0.601 log CFU/g·h으로 최대값을 보였고, 유도기(LPD)는 온도와 반비례적으로 감소하는 경향을 나타내어 4°C에서 최대 357.67 h으로 확인되었다(Table 1). 따라서 최대성장률과 유도기 모두 온도에 대해 유의적인 차이가 있는 것으로 조사되었다.

갈비탕에서 *S. aureus*의 μ_{max} 와 LPD에 대한 저장 온도의 영향을 평가하기 위해 μ_{max} 는 square root model, LPD는 polynomial equation을 사용하여 2차 모델을 개발하였다. 개발된 2차 모델의 결정계수 R²값은 μ_{max} 와 LPD에서 각각 0.97, 0.85로 1에 근접하는 것으로 나타나 적합성이 높음을 확인하였다. μ_{max} 의 2차 모델 식으로 사용된 square root model은 $\mu_{max} = \frac{\mu_{opt}}{\sqrt{T - T_{min}}}$ 으로 표현되며, 이때 T_{min} 은

Table 1. Kinetic parameters calculated by the Baranyi model for *S. aureus* growth in Galbitang of processed meat product during storage at 4, 10, 20, and 37°C

Storage temperature (°C)	LPD (h)	μ_{max} (log CFU/g·h)	R ²
4	357.67	0.011	0.99
10	136.61	0.012	0.98
20	7.14	0.260	0.99
37	1.49	0.601	0.99

미생물 성장가능 최저온도를 의미한다. 따라서 *S. aureus*는 갈비탕이 2°C 이상의 저장온도에서 보관될 때 성장 가능 할 것으로 사료된다(Fig. 2).

성장예측모델의 적합성 평가

통계적 지표인 RMSE 값을 산출하여 모델의 통계적 적합성을 확인하였으며 이를 위하여 모델 개발에는 사용되지 않은 15°C 저장 온도에서 추가 실험을 진행하였다. 각 온도별(4, 10, 20, 37°C) *S. aureus*의 관측값과 개발한 1, 2차 모델을 통해 산출된 *S. aureus*의 예측값을 이용하여 RMSE 값을 산출하였으며, 0에 가까울수록 모델이 적합하다고 평가할 수 있다(23). 갈비탕의 RMSE 값은 0.39로 도출되어 모델이 적합한 것으로 확인되었다(Table 2).

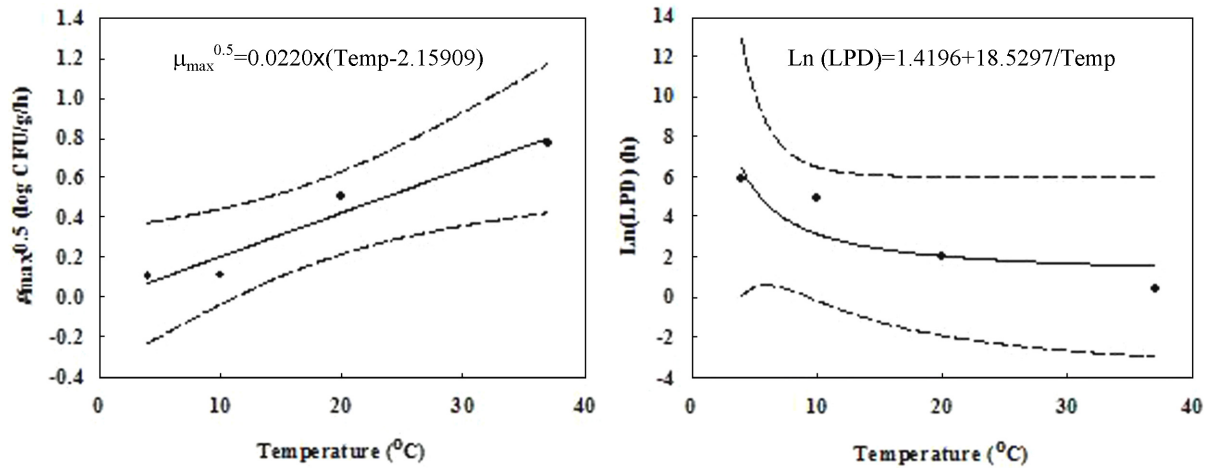


Fig. 2 Developed model for effect of temperature on the lag phase duration (LPD) and maximum specific growth rate (μ_{max}) of in Galbitang of processed meat product by Baranyi model

Table 2. Developed model for effect of temperature on the lag phase duration (LPD) and maximum specific growth rate (μ_{max}) of in Galbitang of processed meat product by Baranyi model

Sample	RMSE
Galbitang of processed meat products	0.39

요약

본 연구는 축산물에 대하여 쉽게 오염될 수 있는 *S. aureus*에 대해 축산제품에 속하는 식육추출가공품 중 갈비탕에 대해 식중독 예방과 식품의 안전성을 확보하기 위하여 Baranyi model을 이용하여 성장 예측모델을 개발하였다. DMFit 프로그램을 이용하여 *S. aureus*의 유도기(LPD)와 최대성장률(μ_{max} , maximum specific growth rate)을 산출하였다. *S. aureus*의 성장곡선은 4, 10, 20, 37°C의 보관 온도에서 측정하였다.

Baranyi model의 LPD의 값은 4, 10, 20, 37°C의 저장 온도에서 각각 256.04, 152.60, 5.41, 3.78 h으로 온도에 반비례 한 것으로 나타났다. 또한 μ_{max} 의 값은 4, 10, 20, 37°C의 저장 온도에서 각각 0.003, 0.007, 0.258, 0.528 log CFU/g-h으로 온도에 비례 한 것으로 나타났다. 또한 일차식의 적합성을 나타내는 R² 값은 모두 0.9 이상으로 나타나 실험값과 예측값의 상관관계가 높은 것을 알 수 있었다. RMSE 값은 0.39로 비교적 0에 근접하게 나타난 것을 볼 수 있으며 개발된 예측모델의 적합성이 높다고 할 수 있다. 따라서 개발된 모델을 이용할 경우 식육추출가공품 중 갈비탕의 다양한 생산 환경과 온도에 따라 *S. aureus*의 성장을 예측할 수 있을 것이라고 사료된다. 갈비탕을 생산, 보관 및 판매하는 산업체에서 널리 활용할 수 있을 것이라고 생각되며 이를 위해평가에서 또한 충분히 활용가능 할 것이라고 생각되어진다.

감사의 글

본 연구는 식품의약품안전평가원 2015년도 연구개발과제에 의하여 이루어진 것으로 추후 미생물 기준을 설정함에 있어 과학적인 근거로 활용될 예정이다.

References

- Bahk GJ, Chun SJ, Park KH, Hong CH, Kim JW. Survey on the foodborne illness experience and awareness of food safety practice among Korean consumers. *J. Food Hyg. Saf.* 18: 139-145 (2003)
- Cho JI, Lee SH, Lim JS, Kwak HS, Hwang IG. Development of a predictive model describing the growth of *Listeria Monocytogenes* in fresh cut vegetable. *J. Food Hyg. Saf.* 1: 25-30 (2011)
- Kang YS, Yoon SK, Jwa SH, Lee DH, Woo GJ. Prevalence of *Staphylococcus aureus* in kimbap. *J. Food Hyg. Saf.* 17: 31-35 (2002)
- Bean NH, Goulding JS, Matthew TD, Angulo FJ. Surveillance for foodborne disease outbreaks-United States 1988-1992. *J. Food Prot.* 60: 1265-1286 (1997)
- Koseki S, Isobe S. Prediction of pathogen growth on iceberg lettuce under real temperature history during distribution from farm to table. *Int. J. Food Microbiol.* 104: 239-248 (2005)
- Amit P, Theodore PL, Francisco D. Comparison of primary predictive models to study the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures in liquid cultures and selection of fastest growing ribotypes in meat and turkey product slurries. *J. Food Microbiol.* 25: 460-470 (2008)
- Chen H. Use of linear, Weibull and log-logistic functions to model pressure inactivation of seven foodborne pathogens in milk. *J. Food Microbiol.* 24: 197-204 (2007)
- Dlignette-Muller ML, Cornu M, Pouillot R, Denis JB. Use of Bayesian modelling in risk assessment: Application to growth of *Listeria monocytogenes* and food flora in cold-smoked salmon. *J. Food Microbiol.* 106: 195-208 (2006)
- Park SY, Choi JW, Chung DH, Kim MG, Lee KH, Kim KS, Bahk GJ, Bae DH, Park SK, Kim KY, Kim CH, Ha SD.. Development of a predictive mathematical model for the growth kinetics of *Listeria monocytogenes* in sesame leaves. *Food Sci. Biotechnol.* 16: 238-242 (2007)
- Park Hs, Bahk GJ, Park KH, Pak JY, Ryu K. Predictive Model for Growth of *Staphylococcus aureus* in *Suyuk*. *Korean J. Food Sci. An.* 30: 487-494 (2010)
- Chung MS. Study on the risk management for risk reduction of *Staphylococcus aureus* in ready-to-eat foods (II). The final report of Korea Food and Drug Administration research project. Korea Health Industry Development Institute pp. 157-185 (2007)
- Castillejo-Rodriguez AM, Gimeno RMG, Cosano GZ, Alcalá EB, Perez MRR. Assessment of mathematical models for predicting *Staphylococcus aureus* growth in cooked meat products. *J. Food Prot.* 65: 659-665 (2002)

13. Fujikawa H, Morozumi S. Modeling *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production in milk. *Food Microbiol.* 23: 260-267 (2006)
14. Kim EJ. Analysis of microbiological hazards and quantitative microbial risk assessment of *Staphylococcus aureus* inoculated onto potentially hazardous foods in school foodservice operations. MS thesis, Yonsei University, Seoul, Korea (2004)
15. Korean Dietetic Association. The Standard Recipe In: A Guide-line for Foodservice Management. 283, Seoul, Korea (2007)
16. Han KS, Lee EJ, Hong SP. The prediction of shelf-life of commercially sterilized Korean soups using accelerated experiment. *Korean J. Food Cook. Sci.* 21: 149-154 (2005)
17. FDA(Food and Drug Administration): Bad bug book. 2nd edition (2012)
18. Abigail MF, Catherine AB, Lief Rustvold D, Kim AH, Jessica H, James EL, Margret O. Clinical impact of a real-time PCR assay for rapid identification of *Staphylococcal* bacteremia. *J. Clin. Microbiol.* 50: 127-133 (2012)
19. Park Ms, Cho JI, Lee SH, Bahk GJ. The analysis for minimum infective dose of foodborne disease pathogens by Meta-analysis. *J. Food Hyg. Saf.* 29: 305-311 (2014)
20. Song JY, Kim YS, Hong CH, Bahk GJ. Growth and predictive model of wild-type *Salmonella* spp. on temperature and time during cut and package processing in cold pork meats. *J. Food Hyg. Saf.* 28: 7-12 (2013)
21. Cho JI, Lee SH, Choi JH, Choi EJ, Hwang IG. Analysis of prevalence and survival pattern of *Staphylococcus aureus* from dried seasoned fishes. *J. Food Hyg. Saf.* 26: 366-369 (2011)
22. Park SG, Hwang YO, Jung JH, Lee KM. Biological characteristics of *Staphylococcus aureus* isoalted from food borne patients in Seoul. *J. Food Hyg. Saf.* 16: 159-167 (2001)
23. Baranyi J, Ross T, Roberts TA, McMeekin TA. Effects of parameterization on the performance of empirical models used in 'predictive microbiology'. *Food Microbiol.* 13: 83-91 (1996)