pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 32, No. 3, pp. 206~210 (2017)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2017.32.3.206

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

시중 유통판매 중인 편육에서의 *Staphylococcus aureus* 성장예측모델 개발

김안나 · 조준일 · 손나리 · 최원석 · 윤상현 · 서수환 · 곽효선 · 주인선*
식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 식품위해평가부 미생물과

Development of a Predictive Model Describing the Growth of *Staphylococcus aureus* in Pyeonyuk marketed

An-Na Kim, Joon-Il Cho, Na-Ry Son, Won-Seok Choi, Sang-Hyun Yoon, Soo-Hwan Suh, Hyo-Sun Kwak, and In-Sun Joo*
Food Microbiology Division, Food Safety Evaluation Department, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju, Korea
(Received February 27, 2017/Revised March 20, 2017/Accepted May 12, 2017)

ABSTRACT - This study was performed to develope mathematical models for predicting growth kinetics of *Staphylococcus aureus* in the processed meat product, pyeonyuk. Growth patterns of *S. aureus* in pyeonyuk were determined at the storage temperatures of 4, 10, 20, and 37°C respectively. The number of *S. aureus* in pyeonyuk increased at all the storage temperatures. The maximum specific growth rate (μ_{max}) and lag phase duration (*LPD*) values were calculated by Baranyi model. The μ_{max} values went up, while the *LPD* values decreased as the storage temperature increased from 4°C to 37°C. Square root model and polynomial model were used to develop the secondary models for μ_{max} and *LPD*, respectively. Root Mean Square Error (RMSE) was used to evaluate the developed model and the fitness was determind to be 0.42. Therefore the developed predictive model was useful to predict the growth of *S. aureus* in pyeonyuk and it will help to prevent food-born disease by expanding for microbial sanitary management guide.

Key words : Pyeonyuk, *Staphylococcus aureus*, Predictive Model, Baranyi Model, Processed Meat Products

최근 국민 소득의 증가와 식생활의 서구화로 인해 축산식품의 소비가 꾸준히 증가하고 있으며[1] 농축수산물의 수입 개방화로 외국산 축산물의 국내유입이 급증함에 따라 국내에 유통되고 있는 축산물 및 그 가공품에 대한 미생물학적 안전성이 중요해지고 있다[2]. 축산식품은 가장 우수한 고단백 영양식품으로, 다른 식품에 비해 변질과 부패가 빠른 특징이 있다[2]. 축산식품 및 그 가공품에서 식중독을 유발하는 주요 미생물은 *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157, *Yersinia enterocolitica* 등이 있으며[3], 특히 황색포도상구균은 2007년에 육류 및 가공품에서 40건 이상의 식중독을 발생시킨 것으로 보고되어 축산식품에서의 황색포도상구균의 체계적인 관리가 필요하다[2,4].

황색포도상구균은 공기, 토양 등 자연계에 광범위하게 분포하고 있어 식품에 다양한 경로를 통해 쉽게 오염될 수 있으며 독소를 생성하여 식중독을 일으킨다[5,6]. 황색포도상구균에 의한 식중독은 가열조리 후 바로 섭취한 식품이나 살균우유 등에 의해서도 발생되는데 이는 황색포도상구균 장독소가 100°C로 30분간 가열해도 파괴되지 않고, 218-248°C로 30분간 가열해야 파괴되는 수준의 내열성을 갖고 있기 때문이며 따라서 원재료의 오염방지와 충분한 열처리 및 신속한 섭취가 중요하다[7]. 우리나라에서 황색포도상구균에 의한 식중독 발병률은 2005년 이후로 약 13% 정도를 차지하고 있으며[8], 주요 원인식품으로는 육류, 육제품 등 축산식품을 비롯하여 크림케익, 해산물, 감자, 햄샐러드, 김밥, 도시락 등으로 다양하다[9].

전 세계적으로 미생물에 의한 식중독 발생이 증가하고 그 규모가 집단화, 대형화되는 추세에 따라 최근 식품의 미생물학적 안전성 확보를 위해 예측 미생물학 분야의 중요성이 크게 부각되고 연구 또한 꾸준히 진행되고 있다[2,10-12]. 하지만 미생물 성장예측모델은 환경 내 존재하는 요인의

*Correspondence to: In-Sun Joo, Food Microbiology Division, Food Safety Evaluation Department, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Ministry of Food and Drug Safety, 187 Osongsaengmyeong 2-ro, Osong, Cheongju 28159, Korea
Tel: 82-43-719-4302, Fax: 82-43-719-4300
E-mail: jis901@korea.kr

다양성과 변이성을 충분히 설명할 수 있는 확률적 통계 모델과 미생물의 생리적 특성을 완벽히 나타내기에는 아직까지도 미흡한 수준이다[13]. 이러한 한계점에도 불구하고 미생물 성장예측모델은 식품 업계의 위생관리 강화, 정부의 미생물 관리기준규격의 적합성 평가 등 현장에서의 활용도가 점차 확대되고 있다[14,15].

돼지고기를 푹 삶아 식힌 다음 썰어서 먹는 편육은 최근 일반 마트에서 조리된 형태로 판매되고 있으며 간단한 과정만 거치면 쉽게 섭취할 수 있어 소비량과 함께 생산량도 늘고 있으므로 미생물학적 안전관리가 필요하다고 여겨진다. 따라서 본 연구에서는 황색포도상구균이 쉽게 증식할 수 있는 축산식품 중 편육을 대상으로 성장예측모델을 개발하고, 개발한 모델의 적합성을 평가함으로써 효과적이고 과학적인 식중독 예방 및 축산식품의 안전성 확보를 위한 기초 자료를 제공하고자 하였다.

Materials and Methods

표준균주

본 연구에 사용된 표준균주는 *Staphylococcus 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, Detroiy, MI, USA)에 전 배양하여 1 mL을 vial tube에 50% glycerol를 첨가하여 −70°C에 동결 보관하면서 실험에 사용하였다.

시험균액 제조

표준균주의 단일 집락을 취하여 TSB 10 ml에 접종하여 35°C에서 24시간동안 배양한 후 4°C에서 1,912 × *g*으로 15분간 원심 분리하여 cell pellet를 얻고 이를 Phosphate Buffer Solution (PBS)로 2회 세척한 다음 각각의 배양액을 혼합하여 PBS를 이용해 5~6 log CFU/ml 수준으로 희석하여 이를 시험 균액으로 사용하였다.

시료 준비 및 균액 접종

국내에 유통・판매되는 편육은 전국단위 26개 지역의 대형마트, 농협, 축협 등에서 구매하여 아이스박스에 보관하며 시험장소로 운반한 뒤 실험 전까지 냉장온도 4°C에 보관되었다. 식품공전의 미생물 확인 시험법으로 황색포도상구균의 오염 여부를 확인한 후, 각 시료를 clean bench에서 기존의 형태를 최대한 유지하며 진공팩에 25 g 씩 채취하고 희석한 시험 균액 100 µl를 접종하여 균수가 3~4 log CFU/g 수준이 되게 하였다. 접종된 시료는 각각의 저장 온도(4, 10, 20, 37°C)에 보관하면서 균수를 측정하였다.

균의 성장 측정

황색포도상구균이 접종된 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 황색포도상구균 선택배지에 도말하여 균수의 변화를 확인하였다.

성장예측모델 개발

본 연구에서는 편육에서 황색포도상구균의 1차 모델을 개발하기 위하여 Baranyi model[12]을 이용하였으며, 온도별 생장패턴 결과를 바탕으로 최대생장률(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 생장 세균수(N_{max}; the final bacterial counts, log CFU/g)를 산출하였다.

황색포도상구균의 생장예측 2차 모델은 Square root model[16]과 Polynomial equation을 이용하여 매개변수에 대한 저장 온도의 영향을 계산하였다. 식은 다음의 (1), (2), (3)과 같다.

[Baranyi model]

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

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

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

[Square root model]

$$\sqrt{\mu_{max}} = \alpha(T - T_{min}) \quad (2)$$

μ_{max} : maximum specific growth rate
α : slope of linear equation
T : storage temperature
T_{min} : theoretical minimum temperature

[Polynomial equation]

$$\ln LPD = a + b / T \quad (3)$$

LPD : lag phase duration
a and *b* : coefficient
T : storage temperature

성장예측모델의 적합성 평가

개발된 황색포도상구균 성장예측모델 식을 평가하고자 통계적 지표인 RMSE (Root Mean Square Error)을 산출하였다. RMSE는 실험을 통해 얻어진 값과 예측 값과의 차이를 이용하여 얻어지는 수치로, 이 값이 0에 가까울수록 개발된 모델의 적합도가 높아진다[17].

[RMSE]

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

obs : observed value
pred : predicted value
n : number of observation

Results and Discussion

온도별 황색포도상구균의 생장패턴

편육에서 온도에 따른 황색포도상구균의 성장변화는 Fig. 1에 나타내었다. 황색포도상구균은 저장 온도(4, 10, 20, 37°C)에서 모두 증가하였으며 4°C는 288시간, 10°C는 168시간, 20°C는 9시간, 및 37°C는 3시간 이후에 성장이 나타나기 시작했다. 온도별 최대 성장은 4°C의 경우 988시간에서 6.97, 10°C의 경우 912시간에서 8.88, 20°C의 경우 156시간에서 9.02 및 37°C의 경우 24시간에서 8.78 log CFU/g 수준으로 확인되었다. 이러한 결과는 35°C 보관온도에서 숙주나물에 초기농도 3.0 log CFU/g 수준이었던 황색포도상구균이 3시간 이후부터 12시간까지 균수가 급격히 증가하여 약 7.0 log CFU/g 수준으로 유지된 연구결과[18]와 구운 햄, 칠면조고기, 닭고기에 초기농도 5.0 log CFU/g 수준으로 황색포도상구균을 접종하였을 때 17.7°C에서 약 200시간을 전후로 최대 9 log CFU/g 수준으로 유지된 조사결과[19]와 유사하게 나타났다.

성장예측모델 개발

각 온도별(4, 10, 20, 37°C) 편육에 오염된 황색포도상구균의 생육결과를 토대로 Baranyi model을 이용하여 유도기(*LPD*, lag phase duration)와 최대성장률(μ_{max}, maximum specific growth rate)을 산출하였다(Table 1). 최대성장률(μ_{max})은 온도가 높아질수록 증가하여 37°C에서 0.568 log CFU/g/h으로 최대값을 보였고, 유도기(*LPD*)는 온도와 반비례적으로 감소하는 경향을 나타내어 4°C에서 최대

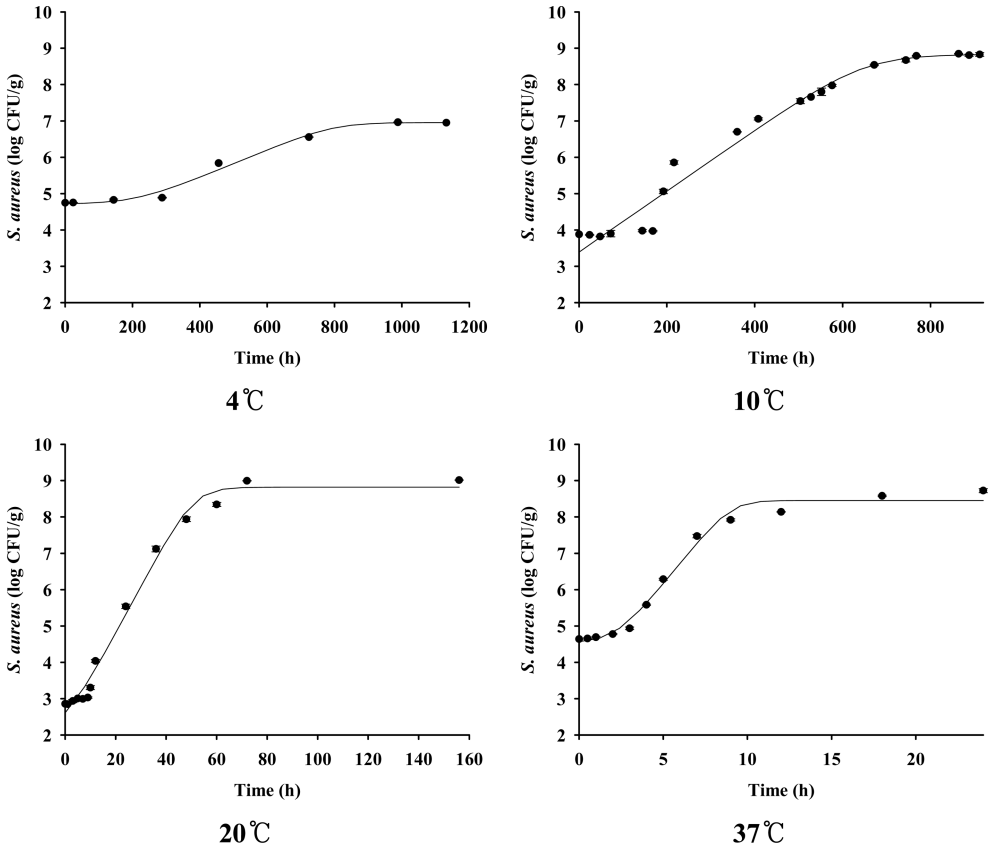

Fig. 1. Growth patterns of *S. aureus* in *Pyeonyuk* in storage at 4, 10, 20, 37°C.

Table 1. Kinetic parameters calculated by the Baranyi model for *S. aureus* growth in pyeonyuk during storage at 4, 10, 20, 37°C.

Storage temperature (°C)	*LPD* (h)	μ_{max} (log CFU/g/h)	R^2
4	212.81	0.004	0.99
10	79.67	0.009	0.98
20	3.12	0.130	0.99
37	2.21	0.568	0.99

212.81 h으로 확인되었다. 따라서 연구결과 최대성장률과 유도기는 모두 온도에 대해 유의적인 차이가 있는 것으로 조사되었다. 박형수 등(2010)[20]의 연구에서 수육에 황색포도상구균을 접종하여 5, 15, 25°C에서 생육을 관찰한 결과, 온도와 균의 증식속도는 비례, 온도와 균의 유도기는 반비례한 것으로 나타나 본 연구결과와 일치하였다. 또한 Fujikawa와 Morozumi[21]도 우유에서 황색포도상구균 성장과 독소생성을 측정한 결과, 23°C 보다 32°C에서 균의 증식속도와 독소생성이 빠르게 나타났음을 확인하였다.

편육에서 황색포도상구균의 μ_{max}와 *LPD*에 대한 저장 온도의 영향을 평가하기 위해 μ_{max}는 square root model, *LPD*는 polynomial equation을 사용하여 2차 모델을 개발하였다(Fig. 2). 개발된 2차 모델의 결정계수 R^2값은 μ_{max}와 *LPD*에서 각각 0.98, 0.78로 1에 근접하는 것으로 나타나 적합성이 높음을 확인하였다. μ_{max}의 2차 모델식으로 사용된 square root model은 $\sqrt{\mu_{max}} = \alpha(T - T_{min})$으로 표현되며, 이때 T_{min}은 미생물 생장가능 최저온도를 의미한다. 따라서 황색포도상구균은 편육이 3.30°C 이상의 저장온도에서 보관될 때 생장가능할 것으로 사료된다.

성장예측모델의 적합성 평가

개발한 모델의 적합성을 평가하기 위해 통계적 지표인 *RMSE* 값을 산출하여 모델의 통계적 적합성을 확인하였으며 이를 위하여 모델 개발에 사용되지 않은 15°C 저장 온도에서의 추가실험을 진행하였다. 각 온도별(4, 10, 20, 37°C) 황색포도상구균의 관측값과 개발한 1, 2차 모델을 통해 산출된 황색포도상구균의 예측값을 이용하여 *RMSE* 값을 산출하였으며, 0에 가까울수록 모델이 적합하다고 평가할 수 있다. 편육 성장예측모델의 *RMSE* 값은 0.42로 도출되어 모델이 적합한 것으로 확인되었고, 편육에 대한 황색포도상구균의 성장 예측모델로 사용 가능하다고 판단된다. 따라서 본 연구의 결과, 편육은 영양성이 높아 부패가 빠르기 때문에 안전하게 섭취하기 위해서는 저온에서 보관하는 냉장유통체제가 중요하며, 조리 후 신속하게 섭취하는 것을 권장한다.

국문요약

본 연구에서는 축산식품인 편육을 대상으로 황색포도상구균의 성장예측모델을 개발하였다. 편육에서 황색포도상구균의 성장패턴은 4, 10, 20, 37°C의 보관온도에서 측정되었으며, 황색포도상구균은 각각의 저장 온도에서 모두 증가하는 것으로 나타났다. 편육에 오염된 황색포도상구균의 생육결과를 토대로 Baranyi model을 이용하여 유도기(*LPD*)와 최대성장률(μ_{max})을 산출한 결과, 유도기는 4, 10, 20, 37°C에서 212.81, 79.67, 3.12, 2.21 h으로 온도에 반비례한 것으로 나타났고 최대성장률은 같은 보관온도에서 0.004, 0.009, 0.130, 0.568 log CFU/g/h으로 온도에 비례한 것으로 조사되었다. 2차 모델은 μ_{max}의 경우, square root model, *LPD*는 polynomial equation을 사용하여 산출하였고, 개발한 모델의 적합성을 평가하기 위해 통계적 지표인 *RMSE* 값을 계산한 결과, 비교적 0에 가까운 0.42로 도출되어 모델이 적합한 것으로 확인되었다. 따라서 개발

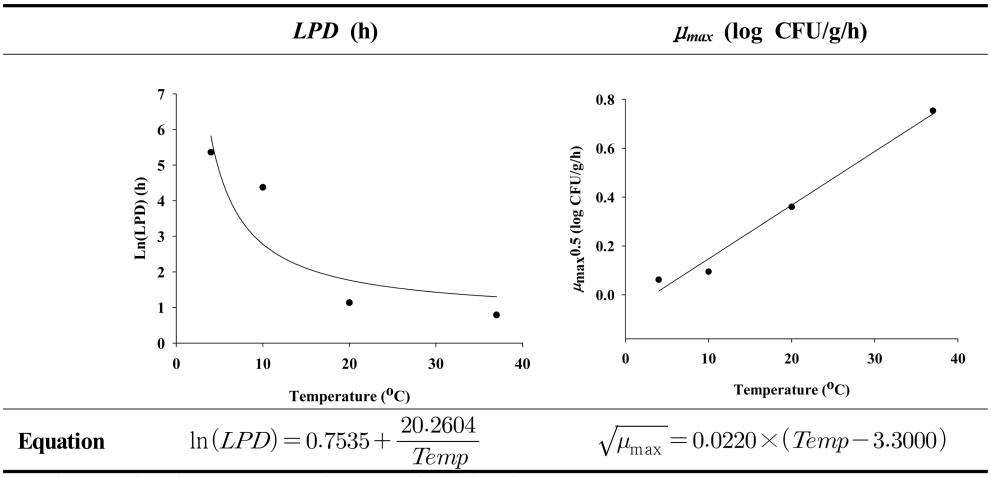

Fig. 2. Secondary model for lag phase duration (*LPD*) and maximum specific growth rate (μ_{max}) developed for pyeonyuk.

된 모델이 편육에 대한 황색포도상구균의 성장 예측모델로 사용 가능하다고 판단되어지며, 편육에서의 식중독을 예방하고 미생물학적 위생관리기준을 설정하는데 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

Reference

1. Korea meat industries association: Production and sales state of processed meat Available from http://www.kmia.or.kr/infocenter/infocenter2.html.Accessed on June 15, 2014.
2. Hong S.H., Park N.Y., Jo H.J., Ro E.Y., Ko Y.M., Na Y.J., Park K.C., Choi B.G., Min K.J., Lee J.K., Moon J.S.: Risk Ranking Determination of Combination of Foodborne Pathogens and Livestock or Livestock Products. *J. Food Hyg. Saf.,* **30**, 1-12 (2015).
3. Borch, E. and Arinder, P.: Bacteriological safety issues in red meat and ready-to-eat meat products, as well as control measures. *Meat Sci*., **62**, 381-390 (2002).
4. Lee J.H., Song K.Y., Hyeon J.Y., Hwang I.G., Kwak H.S., Han J.A, Chung Y.H., Seo K.H.: Comparison of Standard Culture Method and Real-time PCR Assay for Detection of Staphylococcus aureus in Processed and Unprocessed Foods. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.*, **30**, 410-418 (2010).
5. Kang Y.S., Yoon S.K., Jwa S.H., Lee D.H., Woo G.J.: Prevalence of Staphylococcus aureus in Kimbap. *J. Food Hyg. Saf.,* **17**, 31-35 (2002).
6. Cho J.I., Lee S.H., Choi J.H., Choi E.J., Hwang I.G.: Analysis of prevalence and survival pattern of Staphylococcus aureus from dried seasoned fishes. *J. Food Hyg. Saf.,* **26**, 366-369 (2011).
7. Ministry of food and drug safety: Risk assessment of Staphylococcus aureus in Gimbap (2015).
8. Ministry of food and drug safety: Food poisoning statistics. Available from http://www.kfda.go.kr. Accesed on Mar. 20, 2009.
9. Lee H.M., Lee G.Y., Yoon E.K., Kim H.J., Kang Y.S., Lee D.H., Park J.S., Lee S.H., Woo G.J., Kang S.H., Yang J.S., Yang K.H.: Computation of maximum edible timeusing monitoring data of *Staphylococcus aureus* in Kimbap and Food MicroModel. *J. Food Hyg. Saf.,* **19**, 49-51 (2004).
10. Afshin, A.B., Misaghi, A., Khaschabi, D.: Growth response and modelling of the effects of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil, pH and temperature on *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. Lebensmittel Wissenschaft Technologie, **40**, 973-981 (2006).
11. Amit, P., Theodore, P.L., 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 Microbiology.*, **25**, 460-470 (2008).
12. Baranyi, J. and Roverts, T.A.: A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *J. Food Microbiology.*, **23**, 277-294 (1994).
13. Cho J.I., Lee S.H., Lim J.S., Kwak H.S., Hwang I.G. : Development of a Predictive Model Describing the Growth of Listeria Monocytogenes in Fresh Cut Vegetable. *J. Food Hyg. Saf.,* **26**, 25-30 (2011).
14. Heo C., Kim H.W., Choi Y.S., Kim C.J., Paik H.D.: Application of predictive microbiology for shelf-life estimation of Tteokgalbi containing dietary fiber from rice bran. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **28**, 232-239 (2008).
15. Bahk G.J., Oh D.H., Ha S.D., Park K.H., Joung M,S., Chun S.J., Park J.S., Woo G.J., Hong C.H.: Quantitative Microbial Risk Assessment Model for *Staphylococcus aureus* in Kimbab. *Korean J. Food sci. technol.*, **37**, 484-491 (2005).
16. Ratkowsky, D.A., Olley, J., McMeekin, T.A., Ball, A.: Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *J. Bacteriol*, **149**, 1-5 (1982).
17. Baranyi, J., Ross, T., Roberts, T.A., MeMeekin, T.A.: Effects of parameterization on the performance of empirical models used in 'predictive microbiology'. *Food Microbiol.*, **13**, 83-91 (1996).
18. Park H.S., Kim M.Y., Jeong H.S., Park K.H., Ryu K.: Development of a Predictive Growth Model of Staphylococcus aureus and Shelf-life Estimation of Cooked Mung Bean Sprouts Served in School Foodservice Operations. *J. Korean Soc Food Sci Nutr.,* **38**, 1618-1624 (2009).
19. Castillejo-Rodriguez, A.M., Gimeno, R.M.G., Cosano, G.Z., Alcala, E.B., Perez, M.R.R.: Assessment of mathematical models for predicting *Staphylococcus aureus* growth in cooked meat products. *J. Food Prot*., **65**, 659-665 (2002).
20. Park H.S., Bahk G.J., Park K.H., Pak J.Y., Ryu K.: Predictive Model for Growth of Staphylococcus aureus in Suyuk. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.*, **30**, 487-494 (2010).
21. Fujikawa, H. and Morozumi, S.: Modeling *Staphylococcus aureus* growth and /enterotoxin production in milk. *Food Microbiol*., **23**, 260-267 (2006).