pISSN 1229-1153 *J. Fd Hyg. Safety*
Vol. 27, No. 1, pp. 103~107 (2012)

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

단보 (Note)

축산물가공품에서 건조필름법과 TEMPO®TVC 검사법의 총세균수 비교분석

김영조 · 위성환 · 윤하정[1] · 허은정 · 박현정 · 김지호 · 문진산*
농림수산검역검사본부 축산물기준과, [1]역학조사과

Comparison of an Automated Most-Probable-Number Technique TEMPO®TVC with Traditional Plating Methods Petrifilm™ for Estimating Populations of Total Aerobic Bacteria with Livestock Products

Young-Jo Kim, Sung-Hwan Wee, Hachung Yoon[1], Eun-Jeong Heo, Hyun-Jeong Park, Ji-Ho Kim, and Jin San Moon*
Livestock Product Standard Division, [1]Veterinary Epidemiology Division, Animal, Plant and Fisheries Quarantine and Inspection Agency, Anyang 430-824, Korea
(Received September 28, 2011/Revised January 10, 2012/Accepted February 8, 2012)

ABSTRACT - We compared between an automated most-probable-number technique TEMPO®TVC and traditional plating methods Petrifilm™ for estimating populations of total aerobic bacteria in various livestock products. 257 samples randomly selected in local retail stores and 87 samples inoculated with *E. coli* ATCC 25922*, Staphylococcus aureus* ATCC 12868 were tested in this study. The degree of agreement was estimated according to the CCFRA (Campden and Chorleywood Food Research Association Group) Guideline 29 and the agreement indicates the difference of two kinds methods is lower than 1 log base 10($\log_{10}$). The samples of hams, jerky products, ground meat products, milks, ice creams, infant formulas, and egg heat formed products were showed above 95% in the agreement of methods. In contrast, proportion of agreement on meat extract products, cheeses and sausages were 93.1%, 92.1%, 89.1%, respectively. One press ham and five sausages containing spice and seasoning, two pork cutlets containing spice and bread crumbs, two meat extract product and two natural cheeses and one processing cheese with a high fat content, and one ice cream containing chocolate of all samples showed the discrepancy. Our result suggest that TEMPO®TVC system is efficient to analyses total aerobic bacteria to compare manual method in time-consuming and laborious process except livestock products having limit of detection.

Key words: Livestock products, Total Aerobic Bacteria, TEMPO® System, Petrifilm method

서 론

식품 중 세균의 오염은 식품의 생산, 운반, 보관단계에서 신선도와 변질유무를 결정하는 중요한 요소이다. 따라서 식품에서 세균 검출은 제조, 가공 또는 저장과정 중 병원성 세균의 오염 가능성에 대한 지표, 식품 제조환경의 위생에 대한 지표, 그리고, 품질관리의 대상으로 널리 활용하고 있다[5,16]. 현재 식품 중 세균수를 측정하는 국내 표준시험법은 표준한천평판배지를 이용하는 표준평판배양법(Aerobic Plate Count)과 건조필름법이 있지만, 이러한 시험법은 노동력과 검사소요 시간이 많이 필요로 하여 식품 제조회사에서는 신속한 검사를 위해 자동화된 신속검출법 개발이 요구되고 있다[8,9,11,15].

최근 최확수법(most probable number method)에 기초한 자동화된 미생물 정량시스템(automated most probable number system)인 TEMPO® System(BioMrieux SA, Marcy-l'Etoile, France)이 개발되어 식품 내 총세균수, 대장균, 황색포도상구균, 장내세균, 대장균군, 효모 · 곰팡이, 유산균을 측정하여 실험자의 노동력을 줄이고 실험과정의 오류를 최소화할 수 있어서 유럽이나 미국에서 사용되고 있다[2,5,6,8,12,13,14,16,17,18].

TEMPO® System를 이용한 검사법 중 세균수를 측정하는 TEMPO® TVC(total viable count)법은 2002년에 AOAC에서 최초로 검증된 이래 비가열분쇄우육(raw ground beef),

*Correspondence to: Jin San Moon, Livestock Product Standard Division Animal, Plant and Fisheries Quarantine and Inspection Agency, Anyang City, 430-824, Korea
Tel: 82-31-467-1990, Fax: 82-31-467-4330
E-mail: moonjs727@korea.kr

비가열분쇄계육(raw ground chicken), 상추(lettuce), 생선(fish), 우유(milk) 등의 식품 공인 검사법으로 채택된 바 있다[12]. 식품의 여러 품목에서 활발하게 이용되는 외국과는 달리 국내에서는 동 시스템을 이용한 미생물검사법 활용 사례를 축산식품 중 대장균군수 표준검사법인 최확수법, 건조필름법에 대한 비교 검증한 논문[8]을 제외하고는 연구 결과가 거의 없는 실정이다.

최근, 식품의 안전성에 대한 소비자의 관심도 증가와 함께 제품의 정밀검사 시료수가 늘어남에 따라 많은 시료를 효과적으로 검사하기 위한 검사법의 개발이나 기 개발된 검사법의 적용에 대한 검증이 필요한 시점이다. 따라서 본 연구에서는 국내 유통 중인 다양한 축산물가공품을 대상으로 유럽이나 미국에서 사용되고 있는 자동화 미생물정량 시스템(TEMPO® TVC)을 적용할 수 있는지를 확인하기 위하여 총세균수 표준시험법인 건조필름법과 비교하여 그 유효성을 확인하였다.

재료 및 방법

실험 재료

2009년 3월부터 9월까지 국내 대형마트에서 축산물가공품 총 344건을 구매하여 냉장상태로 보관하면서 TEMPO® TVC 검사법을 실시하였다(Table 1). 전체 시료 중 257건은 국내유통 제품을 구매하여 두 검사법을 적용하였으며, 87건은 국내유통 제품을 구입하여 미생물을 인위적으로 접종시켰다. 축산물가공품 유형별로 식육가공품 179건(햄류, 건조저장육, 분쇄가공육제품, 소시지류, 식육추출가공품), 유가공품 144건(우유, 치즈, 아이스크림, 조제분유), 알가공품 21건(알가열성형제품)이었다.

Table 1. Number of samples used in this study

Food category		No. of samples tested		Total
		Artificially inoculated	Non-inoculated	
Meat products	Ham	0	37	37
	Jerky product	0	27	27
	Ground product	0	40	40
	Sausage	0	46	46
	Meat extract product	16	13	29
	Subtotal	16	163	179
Dairy products	Milk	20	17	37
	Cheese	14	24	38
	Ice cream	10	23	33
	Infant formulas	11	25	36
	Subtotal	55	89	144
Egg products	Heat formed product	16	5	21
	Subtotal	16	5	21
Total		87	257	344

축산물가공품 중 대장균, 황색포도상구균의 인위적 접종

국내 유통 중인 축산물가공품에 대장균, 황색포도상구균 표준균주를 1~10^7 CFU/g 범위로 접종하였다. 인위적 접종에 사용된 균주는 미국의 Essentials life science research에서 구입된 *E. coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 12868로서 제조된 시험용액(시료 25 g에 멸균식염수 225 mL를 넣어 균질기로 균질화한 것)에 10진법으로 단계 희석하여 10^0, 10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7의 균주를 접종한 후 건조필름법과 TEMPO®TVC 검사법으로 총세균수 검사를 실시하였다.

총세균수의 검사

건조필름법은 '축산물의 가공기준 및 성분규격'의 미생물시험법에 따라 실시하였다[11]. 즉, 시료 25 g과 희석액(멸균생리식염수) 225 ml를 혼합한 다음 10진법으로 단계 희석한 것과 대장균과 황색포도상구균을 인위적으로 접종한 각 단계 시험용액 1 mL씩을 2매 세균수 Petrifilm™(Total Viable Count, 3M, USA)에 접종한 후 흡수시키고 35 ± 1ºC에서 24~48시간 배양하여 생성된 붉은 집락수를 산정하였다. TEMPO® System을 이용한 총세균수의 검사는 제조회사의 매뉴얼에 근거하여 실험하였다. 즉, 시료 25 g과 희석액(멸균생리식염수) 225 ml를 혼합한 다음 10진법으로 단계 희석한 것과 대장균과 황색포도상구균을 인위적으로 접종한 각 단계 시험용액을 test tube에 4 mL 넣고 TEMPO filler을 이용하여 TEMPO® TVC card에 자동으로 주입한 후 40~46시간 동안 배양한 후, reader를 이용하여 결과를 판독하였다.

통계 분석

건조필름법과 TEMPO® TVC검사법의 측정 결과를 각각 log값으로 전환한 후 일치율과 상관성을 분석하였다. 일치율 분석은 CCFRA(Campden and Chorleywood Food Research Association Group) Guideline 29의 방법에 의하여 실시하였는데[4], 실험결과를 $\log_{10}$값으로 전환한 다음 두 검사법간 log difference 값이 ± 1.0 log를 초과하는 것이 5% 미만이면 통계적으로 유의한 범위내에서 유의한 것으로 판정하였다[4]. 또한, 건조필름법과 TEMPO® TVC검사법을 $\log_{10}$ 값으로 변환시킨 결과를 Pearson의 검정법을 이용하여 상관분석을 실시하였으며, 통계학적 분석에는 IBM® SPSS Statistics(19, IBM, USA)를 이용하였다[1,3,10]. 유의수준 $\alpha = 0.05$로 규정하고, 상관계수 R^2의 절대 값이 0.9 이상이면 두 방법으로 측정한 값들 사이에 상관관계가 있는 것으로 인정하였다.

결과 및 고찰

국내 유통 중인 축산식품 또는 유통중인 축산식품에 인

Table 2. Comparison on the proportion of agreement between Petrifilm and TEMPO® TVC method in various livestock products

Food category		No. of sample	No. of agreement* (%)
			Petrifilm vs. TEMPO® TVC
Meat products	Ham	37	36 (97.3)
	Jerky product	27	27 (100)
	Ground meat product	40	38 (95.0)
	Sausage	46	41 (89.1)
	Meat extract product	29	27 (93.1)
	Subtotal	179	169 (94.4)
Dairy products	Milk	37	37 (100)
	Cheese	38	35 (92.1)
	Ice cream	33	32 (97.0)
	Infant formulas	36	36 (100)
	Subtotal	144	140 (97.2)
Egg products	Heat formed product	21	21 (100)
	Subtotal	21	21 (100)
Total		344	330 (95.9)

*Agreement indicates that the difference between the two methods is lower than ± 1 $\log_{10}$.

위적으로 미생물을 접종한 제품에 대한 총세균수 검출결과는 Table 2와 Table 3과 같다. 식육가공품 중 햄, 건조저장육, 분쇄가공육제품 및 식육추출가공품에서 두 검사법간의 일치율은 각각 97.3%, 100%, 95%, 93.1%로 확인된 반면 소시지류에서는 89.1%로 나타났다. 육가공품 중 두 검사법에서 결과가 서로 일치하지 않는 제품으로는 양념과 향신료가 들어있는 프레스햄(1개)과 소시지(5개)를 비롯하여 빵가루와 양념을 함유하고 있는 돈가스(1개), 지방함량이 높은 단순식육추출가공품(1개)과 식육추출가공품(1개)이었다. 유가공품에 있어서는 우유류, 치즈류, 아이스크림류, 조제유류에서 각각 100%, 92.1%, 97%, 100%의 일치율을 보였하다. 불일치율을 보인 시료로는 유지방 함량이 높은 자연치즈(2개)와 가공치즈(1개), 초콜릿이 함유되어 있는 아이스크림(1개)이었으며, 이들 시료에서 두 검사법간 $\log_{10}$값의 차이가 일정한 패턴이 없이 ± 1.0 log를 초과하였다. 이에 반하여 본 실험에 사용된 알가열성형제품 모두에서 두 검사법간 100%의 일치율을 보였다.

TEMPO® TVC검사법은 TEMPO® card 내에서 세균이 증식하면서 생성되는 효소에 의해 발현하는 형광물질을 측정하는 원리로 세균수를 정량적으로 측정한다[2]. 본 실험결과 건조필름법과 TEMPO® TVC검사법에서 불일치를 보인 시료는 이들 축산물가공품에 함유된 matrix 성분이 TEMPO® TVC 검사에 영향을 준 것으로 사료된다[7,8,17,19]. 즉, 양념과 향신료가 함유된 햄류 및 소시지류와 지방함량이 많은 치즈와 식육추출가공품은 미생물이 배양되면서 효소 및 지방성분 때문에 결과판독 시 간섭현상을 줄 가능성이 있고, 돈가스 제품에 함유된 밀가루의 탁도 영향으로 결과 판독 시 오류가 나타났을 것으로 생각되어진다. 또한, 초콜릿이 함유된 아이스크림 제품의 경우에는 초콜릿 등의 고유한 색깔이 균의 증식으로 발현되는 형광물질을 가려서 결과분석에 영향을 주는 것으로 생각되어진다. 한편, 발효유와 같이 유산균 함유가 높은 제품은 건조필름법에서는 세균수 측정이 가능하였으나, TEMPO® TVC검사법은 유산균으로 인하여 제품의 pH가 낮아져 위양성이 나타나 세균수 측정을 할 수 없었을 것으로 생각되어진다.

Table 3. List on samples of the discrepancy* between Petrifilm and Tempo® TVC method

Food category	Detail food category	Case	$\log_{10}$ CFU/g	
			Petrifilm	TEMPO® TVC
Ham	Press ham containing spice and seasoning	1	1.7	< 0.4
Ground meat product	Pork cutlet containing spice and bread crumbs	2	1.2	2.4
			5.1	0.4
Sausage	Sausage containing spice and seasoning	5	< 1	3.9
			< 1	3.9
			< 1	4.1
			3.8	2.0
			5.0	2.0
Meat extract product	Simple meat extract product with a high fat content	1	< 1	3.4
	Meat extract product with a high fat content	1	0.7	2.7
Cheese	Natural cheese with a high milkfat content	2	1.0	2.9
			4.5	<0.4
	Processing cheese with a high milkfat content	1	1.6	2.9
Ice cream	Ice cream containing chocolate	1	3.2	2.0
Total		14		

* Discrepancy indicates that the difference between the two methods exceed ± 1 $\log_{10}$

Table 4. The correlation of the numbers of total aerobic bacteria obtained between Petrifilm and TEMPO® TVC method

Methods	Food category	No. of sample	Range*	Coefficient (R^2)	P value
Petrifilm vs TEMPO® TVC	Ham	37	0-5.4	0.98	< 0.001
	Jerky product	27	3.1-7.2	0.93	< 0.001
	Ground meat product	40	0-5.6	0.97	< 0.001
	Sausage	46	0-5.1	0.78	< 0.001
	Meat extract product	29	0-8.1	0.96	< 0.001
	Milk	37	0-7.2	0.99	< 0.001
	Cheese	38	0-6.4	0.89	< 0.001
	Ice cream	33	0.7-6.1	0.96	< 0.001
	Infant formulas	36	0-6.5	0.98	< 0.001
	Heat formed product	21	0-7.4	0.99	< 0.001

* Range: minimun-maximum

한편, 본 연구에서 불일치률을 보인 제품들은 그들이 함유하고 있는 물질로 인한 간섭작용을 최소화하기 위해서는 1:40에서 1:400배까지 희석하거나 간섭작용을 중화시킬 수 있는 전처리 단계가 필요할 것으로 사료된다[8,17,19].

인위적으로 미생물을 접종한 제품(87건)과 유통 중인 축산식품의 제품(257건)을 유형별 상관관계를 조사한 바, 대부분의 유형에서 0.9이상의 높은 상관계수(r)를 나타내었으나, 소시지류와 치즈류에서는 0.77, 0.89의 상관계수를 보였다. 또한 모든 유형에서 두 검사법의 측정값은 통계적으로 유의한 상관관계를 보였다($p < 0.001$, Table 4).

본 실험에서 사용된 건조필름법은 세균수 정량분석법의 표준화 방법으로 사용되고 있지만 자동화된 장비에 비하여 시간과 노동력의 소모가 많다는 단점이 있다[5,8]. TEMPO® System은 최확수법을 자동화시킨 방법으로서 실험자의 노동력과 시간을 절감할 수 있을 뿐더러 자동화된 검사로 인하여 실험과정 중 오류를 최소화 할 수 있으며, 특히 16 tube MPN 방법을 자동화하였는데, tube의 수가 늘어날수록 정확도가 높아지므로 기존의 3 tube 또는 5 tube를 이용한 MPN법에 비해 훨씬 정확한 것으로 알려져 있다[5,6,8,16,17,18]. 그러나 축산물가공품의 성분에 의한 검출한계가 있어 TEMPO® System를 이용하여 실험을 할 경우에는 이를 유의해야 한다[8,17,19].

최근 식품의 안전성 확보차원에서 검사 시료수가 증가되는 추세이므로 축산물가공품에 대한 정확하고 효율적인 미생물 정량 검사법의 필요성이 더욱 절실히 요구되고 있다. 본 연구에서 TEMPO® TVC검사법이 기존 매뉴얼 총세균수 검사법인 건조필름법과 비교하였을 때 검출한계가 있는 일부 제품을 제외하고 효과적인 것으로 확인되었다. 그러한 점에서 TEMPO® System과 같은 자동화 미생물 정량기기는 일선현장에서 활용도가 높을 것으로 판단된다. 그러나 본 연구에서 사용한 축산물가공품 중 일부 유형은 시료수가 제한적으로 적용되었고, 두 검사법간 일치율에서 다소 차이가 있는 제품에 대해서는 원인규명 및 검증을 위하여 제품별로 좀 더 많은 시료를 대상으로 추가적인 실험이 수행되어져야 할 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 2010년 농림수산검역검사본부의 수의과학기술개발연구비(과제번호 N-FS03-2010-10-03)로 수행되었으며, 또한 실험에 많은 도움을 준 박신혜, 이희경, 박은배 선생에게 감사를 드립니다.

요 약

본 연구에서는 축산물가공품에서 건조필름법과 TEMPO® TVC의 총세균수 측정에 대한 유효성을 평가하였다. 이를 위하여 국내 유통 중인 축산물가공품 257건과 대장균과 황색포도상구균을 인위적으로 접종시킨 축산물가공품 87건에서 대하여 총세균수를 측정하였다. 실험결과는 $\log_{10}$ 값으로 전환 후 CCFRA Guideline 29에 의하여 두 검사법간의 일치율을 분석하였고, Pearson의 검정법을 이용하여 상관분석을 실시하였다. 식육가공품 중 햄류, 건조저장육, 분쇄가공육제품 및 식육추출가공품에서 두검사법간 93%이상의 일치율이 확인된 반면 소시지류에서는 89.1%의 일치율을 보였다. 이에 반하여 우유류, 치즈류, 아이스크림류, 조제유류에서는 92% 이상의 일치율을 보였고, 알가열성형제품은 100%의 일치율을 보였다. 또한 소시지류(상관계수 $r = 0.77$)와 치즈류(상관계수 $r = 0.89$)를 제외한 축산물가공품 모든 유형에서 건조필름법과 TEMPO® TVC 검사법간의 상관계수(r)가 0.9 이상으로 ($P < 0.001$) 높은 양의 상관관계를 나타내었다. 결론적으로 본 연구에서 TEMPO® TVC는 검출한계가 있는 일부 축산물가공품을 제외하고 총세균수 검사에 있어서 효과적인 것으로 나타났다.

참고문헌

1. Beuchat, L.R., Copeland, F., Curiale, M.S., Danisavich, T.,

Gangar, V., King, B.W., Lawlis, T.L., Likin, R.O., Okwusoa, J., Smith, C.F., Townsend, D.E.: Comparison of the Simplate™ Total Plate Count Method with Petrifilm™, Redigel™ and Conventional Pour-plate Methods for Enumerating Aerobic Microorganisms in foods. *J. Food Prot,* **61**, 14-18 (1998).

2. BioMerieux Inc. AOAC Research Institute News: bioMérieux TEMPO®TVC Test Granted PTM Status. Available from: http://www.biomerieux-usa.com/upload/TEMPO%20TVC%20RI%20ILM%20article%20FINAL%20-9.pdf *Accessed* DEC. 27 (2006).
3. Blackburn, C.W., Baylis, C.L., Petitt S.B.: Evaluation of Petrifilm™ methods for enumeration of aerobic flora and coliforms in a wide range of foods. *J. Appl. Microbiol*, **22**, 137-140 (1996).
4. Campden and Chorleywood Food Research Association Group. Guideline 29. Guidelines for establishing the suitability of food microbiological methods. Campden and Chorleywood Food Re-search Association Group, Chipping Campden, UK. (2001).
5. Crowley, E.S., Bird, P.M., Torontali, M.K., Agin, J.R. and Goins, D.G.: Tempo TVC for the Enumeration of Aerobic Mesophilic Flora in Food: Collaborative Study. *J. AOAC Int,* **92**, 165-174 (2009).
6. Crowley, E.S., Bird, P.M., Torontali, M.K., Goetz, K., Agin, J.R. and Goins, D.G.:Tempo EC for the Enumeration of *Echerichia coli* in Food:Collaborative Study. *J. AOAC Int,* **93**, 576-586 (2010).
7. Hyeon, J.Y., Hwang, I.G., Kawk, H.S., Park, J.S., Heo, S., Choi, I.S., Park, C.K. and Seo, K.H.: Evaluation of an automated ELISA and real-time PCR by comparing with a conventional culture method for the detection of *Salmonella* spp. in steamed pork and raw broccoli sprouts. *Kor. J. food Sci. Ani. Resour,* **29**, 506-512 (2009).
8. Kim, Y.J., Wee, S.H., Yoon, H.J., Heo, E.J., Park, H.J., Kim, J.H. and Moon, J.S.: Comparative study between the automated MPN method (TEMPO® CC) and the standard methods for the enumeration of coliform bacteria in livestock processed foods. *Kor. J. Publ. Hlth,* **35**, 113-120 (2011).
9. Korea Food and Drug Administration. Food code. Available from http://safefood.kfda.go.kr/RS/food_menu.jsp, Accessed Jan. 21 (2011).
10. Kudaka J, Horii T, Tamanaha K, Itokazu K, Nakamura M, Taira K, Nidaira M, Okano S, Kitahara A.: Evaluation of the petrifilm aerobic count plate for enumeration of aerobic marine bacteria from seawater and Caulerpa lentillifera. *J. Food Prot*, **73**, 1529-1532 (2010).
11. Livestock products processing and composition standards (NVRQS Notice 2010-16).
12. Official Methods of Analytical Online 18th Ed., AOAC INTERNATIONAL Automated Enumeration of Total Viable Count in Food, TEMPO® TVC Method from http://www.eoma. aoac.org/methods (2009).
13. Official Methods of Analytical Online 18th Ed., AOAC INTERNATIONAL Automated Enumeration of Escherichia coli in Food, TEMPO® EC Method from http://www.eoma. aoac.org/methods (2009).
14. Owen, M., Willis, C. and Lamph. D.: Evaluation of the TEMPO® most probable number technique for the enumeration of Enterobacteriaceae in food and dairy products. *J. Appl. Microbiol,* **109**, 1810-1816 (2010).
15. Park, Y.H., Seo, K.S., Ahn, J.S., Yoo, H.S. and Kim, S.P.: Evauation of the Petrifilm plate method for the enumeration of aerobic microorganisms and coliforms in retail meat samples, *J. Food Prot,* **64**, 1841-1843 (2001).
16. Paulsen, P., Schopf, E. and Smulders, F.J.M.: Enumeration of total aerobic bacteria and *Escherichiacoli* in minced meat and on carcass surface samples with an automated most-probable-number method compared with colony count Protocols. *J. Food Prot*, **69**, 2500-2503 (2006).
17. Paulsen, P., Borgetti, C., Schopf, E. and Shulder, F.J.M.: Enumeration of *Enterobacteriaceae* in various foods with a new automated most -probable-number method compared with petrifilm and international organization for standardization procedures. *J. food Prot*, **71**, 376-379 (2008).
18. Torlak, E., Akan, I.M. and Gökmen, M.: Comparison of TEMPO EC and TBX medium for the enumeration of *Escherichia coli* in cheese. *Lett Appl. Microbiol.*, **47**, 566-570 (2008).
19. 송광영, 천정환, 김혜성, 김윤경, 김동현, 성창현, 현지연, 박준호, 이종익, 서건호: 즉석섭취편의식품류에서 *Staphylococcus aureus* 정량검출을 위한 배지검출법과 TEMPO 방법과의 비교검증. *Kor. J. Vet. Publ. Hlth,* **35**, 295-298 (2011).