J. Fd Hyg. Safety 15(3), 252-255 (2000)

식육 및 육가공 · 유가공 생산라인의 환경미생물오염도 측정을 위한 ATP 방법의 이용

강현미 · 엄양섭 · 안흥석 · 김천제 · 최경환* · 정충일†
건국대학교 동물자원연구센타, *(주)코메드

Application of ATP Bioluminescence Method for Measurement of Microbial Contamination in Raw Meat, Meat and Dairy Processing Line

Hyun-Mi Kang, Yang-sup Eom, Heong-suk An, Cheon-jei Kim, Kyung- Hwan Choi* and Choog-il Chung†
Animal Reasources Research Center, Konkuk University, Seoul 143-703, Korea
**KOMED Co., Seoul 143-703, Korea*

ABSTRACT – This study was conducted to investigate the application of ATP bioluminescence to measure the degree of microbial contamination from raw meat, meat processing and milk processing lines. Samples collected from slaughter house, meat and milk processing plants were tested for estimation of bacterial number by using ATP bioluminescence and conventional method. The former result was transffered to R-mATP value(log RLU/ml), and the latter transffered to CFU(log/ml). Correlation coefficient(r) between aerobic counts(CFU, log/ml) and R-mATP(log RLU/ml) value was 0.93(n=408). R-mATP of aerobic counts from beef, pork, chicken was 0.93(n=220), and that was 0.93(n=187) between meat processing and dairy processing plants. In addition, Correlation coefficient(r) between aerobic counts and R-mATP was 0.87(n=252) under 1×10^5/ml of bacterial count and 0.74(n=152) over 10^5 respectively.

Key words ☐ ATP bioluminescence, Aerobic counts, R-mATP, Correlation coefficient

햄버거에 오염된 *E. coli* O157 : H7, 연질 치즈 속의 *Listeria monocytogenes*, 계란 속에 *Salmonella enteritidis* 가 오염이 되어 식중독 발생과 같은 사건이 연속적으로 불거져 나오면서 소비자의 식품안전에 대한 관심이 높아지고 있다. 식육 및 가금육은 흔한 식중독 원인물질로 알려져 있는데, 1986년 캐나다의 경우 이로 인한 식중독 발생률이 각각 20, 10%에 이른다고 하였다.[1)]

축육 및 가금육의 미생물 오염은 대부분 분변 또는 토양에서 유래하고 도축 과정에서 많은 세균의 오염은 주로 내장에서 유래되는 분변오염이라고 볼 수 있다. 분변 및 장관은 *Salmonella spp.*, *Campylobacter jejuni* 및 *Escherichia coli* 와 같은 그람음성 병원성균의 서식처이다.[2)] 도축 및 가공업자는 제품의 미생물학적 안전성 검사를 기존의 균배양 방법을 사용하여 총균수, 대장균군, 분변 대장균군 및 특정한 병원성균의 빈도를 조사하여왔다. 그러나 이러한 방법은 결과를 얻는데 보통 2-3일이 소요되므로 미생물이 오염되는 것을 감시하기 위해서는 현장에서 즉시 미생물오염도를 측정하여 오염된 가공 라인은 바로 시정하는 대책을 세우는 것이 필요하다. 이러한 관점에서 미생물 ATP bioluminescence 방법은 식품 및 많은 비식품 시료에 있어 세균 오염 여부를 측정하는데 신속하고 정확한 방법이라 할 수 있다.[3)] R-mATP방법의 가장 큰 장점은 신속성으로 시료 채취에서부터 결과치를 얻는 데까지 소요되는 시간이 크게 단축되어 식품공장의 현장책임자가 현장에서 미생물 오염 여부를 측정하는데 도움을줄 수 있다.

본 실험은 도체(쇠고기, 돼지고기, 닭고기)와 육가공장 및 우유 생산 라인 환경으로부터 시료를 채취하여 ATP bioluminescence방법에 의해 세균수분포에 따른 R-mATP와 표준평판법에 의한 호기성 세균수와의 상관관계를 조사하여 각각 calibration curve작성을 위한 기초자료를 제공하고

†Author to whom correspondence should be addressed.

자 실시하였다.

재료 및 방법

시료 채취

쇠고기 및 돼지고기시료는 삼우미트(주) 도축장에서 채취하였으며 쇠고기는 가죽을 제거한 후 4℃의 숙성실에서 5시간 정도 보관 중인 것을 선택하였다. 돼지고기는 탈모 후 4℃ 숙성실에서 도축 직후와 5시간, 24시간이 경과한 것을 시료로 선택하였다. 닭고기는 농협 하나로마트에서 구입한 포장육을 시료로 사용하였다. 이러한 도축 시료의 표면을 25 ml 완충 용액(0.85% sodium chloride, 0.05% Tween 20, pH 7.8)으로 적신 Speci-Sponge(NASCO, Fort Atkinson, WI, USA)를 사용하여 도체 표면을 닦아낸 것을 실험시료로 사용하였다. whirlpak bag으로부터 완충 용액이 묻어 있는 스폰지를 엄지와 검지손가락을 이용하여 짠 다음 무균적으로 꺼내어 도체의 전체 외부 표면을 잘 닦아내는데, 스폰지를 적어도 2회 이상 뒤집어 사용하며 template(10×10cm^2)를 대고 상하로 5번 좌우로 5번 합 10번을 닦아 낸 다음 이 스폰지를 완충 용액이 남아 있는 whirlpak bag안에 다시 넣은 다음 8~10℃에 보관하여 2시간 이내에 시료를 분석하였다. 또한 육가공(K햄) 및 유가공 공장(K우유)의 생산 라인의 환경 미생물도 함께 조사하였다. CIP가 끝난 두 공장의 작업대, 칼, 도마, 충진기, 운축수 등에서 시료를 채취하였는데, 5 ml 튜브에 담긴 멸균 완충 용액 2.5 ml에 멸균 면봉을 적셔 닦아 내는 방법으로 하였다.

세균수 검사

시료를 인산 완충 용액에 순차적으로 희석하여 tryptic soy agar(TSA)에 pour plating한 후 35℃/48시간 배양하여 나타난 집락을 계수 하였으며, 세균수는 log10(CFU/ml)으로 환산하였다.

R-mATP 분석 방법

여과 장치를 이용하여 시료에서 somatic ATP 및 비세균 ATP를 추출한 다음 세균 ATP 추출물을 정량 하였다. 먼저 50 µl의 시료를 Filtravette에 첨가한 다음 100 µl의 체세포 ATP추출시약 SRA(somatic cell releasing agent)를 첨가하여 압력을 가하며 2회 여과시켰다. Filtravette를 기기의 holding drawer로 옮긴 다음 30 µl의 microbial ATP 추출시약인 BRA(bacterial cell releasing agent)를 떨어뜨린 다음 즉시 동량의 luciferin/luciferase 시약을 가하여 피펫팁으로 3차례 신속하게 혼합하였다. holding drawer를 즉시 닫고 10초간 lightening하여 얻어진 수치를 RLU(relative light units)로서 표시하였으며 그 방법 및 순서는 아래와 같다.

시료를 stomacher bag에 옮겨 2분간 stomaching을 한 다음 15 ml을 추출하여 100 µl somatic ATP 추출시약(SRA)을 첨가하고 Filtravette™을 통해 aspiration(vacuum manifold & trap)한 다음 150 µl SRA을 재 첨가하여 pulling하여 Filtravette를 holding drawer에 건다. 다시 30 µl microbial ATP extractor(BRA)를 첨가한 후 30 µl luciferin/luciferase reagent 첨가하여 holding drawer를 닫고 reading 하여log RLU(relative light unit)/ml을 얻었다.

결과 및 고찰

시료 종류별 상관관계 비교

In-plant 도체 시료 – 쇠고기, 돼지고기 및 닭고기 그리고 육,유가공장 환경에서 채취된 총 408개의 시료의 R-mATP값과 호기성균수와의 상관계수는 0.93(신뢰도 0.87)으로 나타났다(Fig. 1).

이중 육류시료 220개의 상관계수료 0.93으로 나타났다(Fig 2). R-mATP 분석법은 쇠고기 및 돼지고기 도체의 장내 미생물 수준을 정확히 측정하기 위한 방법으로 미생물 ATP와 비미생물 ATP를 신속하게 분리하여 시료의 미생물 ATP수를 측정하였다. 이는 Kennedy와 Oblinger (1985)의 ground beef시료를 가지고 표준 평판 배양온도를 35, 20, 7℃로 하였을 때 mATP와의 상관계수 0.95, 0.98, 0.98[4]

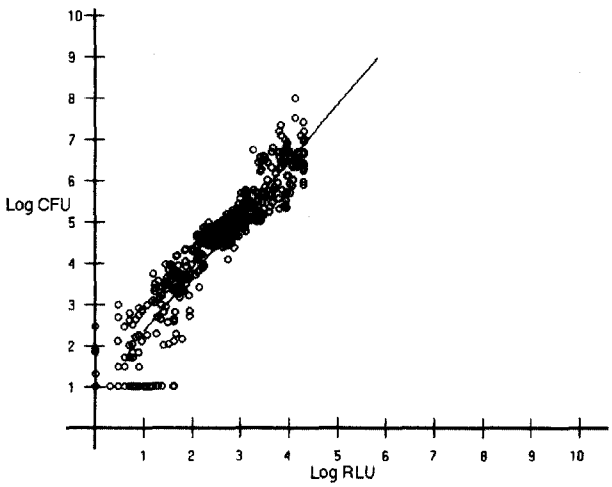

Fig. 1. Scatterplot of R-mATP assay values(log RLU/ml) and 35℃ aerobic colony counts(log CFU/ml) of samples from beef, pork, poultry, and meat and dairy processing line.

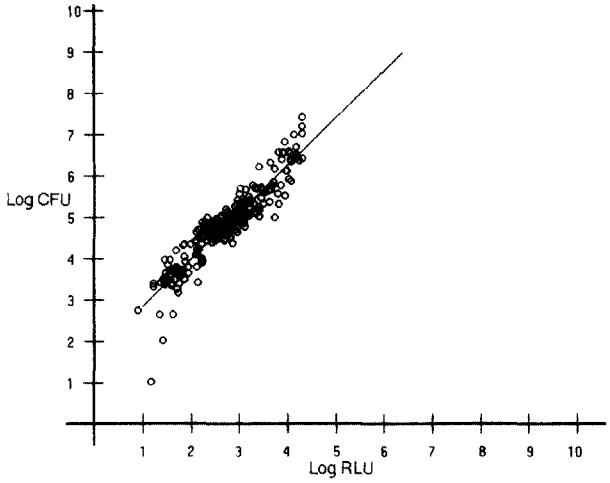

Fig. 2. Scatterplot of R-mATP assay values(log RLU/ml) and 35°C aerobic colony counts(log CFU/ml) from beef, pork, and poultry samples

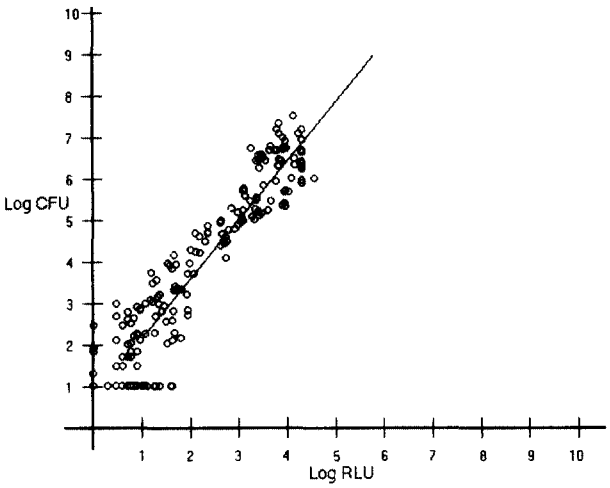

Fig. 3. Scatterplot of R-mATP assay values(log RLU/ml) and 35°C aerobic colony counts(log CFU/ml) of samples from meat and dairy processing line

보다는 약간 낮았으나 Bulte와 Reuter(1985)의 쇠고기시료를 30°C로 배양했을 때 상관계수 0.66~0.87[5]보다는 높았다 그러나 Labots와 Stekelenburg(1988)의 생고기, 다진 고기 및 진공포장육제품의 mATP와 표준 평판의 상관 계수로 나타난 0.91, 0.91, 0.94[6]와 본실험에서 결과로 나타난 수치는 유사하였다.

R-mATP 시험의 효과를 평가하기 위해서는 적당한 범위의 호기성균군이 포함되어야 한다. Eden과 Eden(1984)는 표준평판법과 Impedance방법과의 상관관계를 평가하기 위해서는 최소 4 log10 cycle 범위의 균이 분포되어야 한다고 하였다.[7]

세균수를 예측하는 R-mATP 분석 효력의 중점은 미생물 세포당 APT의 함량이다. 세균의 ATP량의 평균 범위가 균종간에 현저히 좁지만[5] ATP량이 많은 인자에 의해 크게 영향을 받는 것이 세균의 특성이다.[8] 이러한 인자에는 세균 유형, 영양 상태, 균성장단계, 온도 및 항균 물질의 존재 등이 포함된다. 배지구성성분 및 온도는 Enterobacter aerogenes의 세포당 ATP량에 크게 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.9) 유기산, trisodium phosphate 및 염소 등 항균 물질로 도체 표면을 분사세척하는 현재의 추세 때문에 R-mATP 분석시 그러한 처리효과에 대해서는 좀 더 연구되어져야 할 부분이다.

세균수 측정 방법으로서 mATP를 사용할 때 mATP (RLU)치는 호기적 중온성 평판 방법과 상관관계가 있다. 그러므로 mATP와 호기성 평판 측정과의 상관관계에서 호기적 평판 측정에 의해 제외되는 세균군은 포함되지 않는다. 가금육 제품은 가공 중에 피부를 제거하지 않는다는 점에서 미생물학적 관리와 제품 안전성에 문제를 야기할 소지를 안고 있다. 가금육 도체의 세균수가 1×10^5CFU/ml이하인 것은 품질 검사에서 통과되는 기준이며, 세균수가 1×10^6CFU/ml이상인 것은 품질이 낮은 것으로 판단되는데, 이때의 log ATP분석치는 각각 1.99와 2.66에 해당되고 이때의 예측 정확도가 89%이므로 ATP분석은 표준평판법의 대체 방법으로도 이용될 수 있으며 시료내에 존재하는 미생물군 수준을 신속하게 검출할 수 있으므로 원료수납 검사로도 이용될 수 있는 방법이다.[10]

생산 라인의 환경 시료 – 표면을 닦아 낸 총ATP를 추출하여 신속하게 분석하였을 경우, 배양 방법에서 나온 결과치와 상관관계가 높았다(0.80)고 하였으며[11] 식품 잔류물 및 미생물 소스로부터 ATP가 검출되었기 때문에 표면 전체가 오염되어 있다고 할 수 있다.[12,13] 육가공장과 우유공장 각 한곳을 정하여 총 시료 187개를 채취하였으며 R-mATP값과 호기성균수와의 상관관계는 0.93으로 비교적 높게 나타났다(Fig.3).

호기성균수별 상관관계

시료중 균수가 100,000 CFU/ml미만인 경우(시료 252개)의 R-mATP와 호기성 균수와의 상관계수는 0.87이고 100,000 CFU/ml이상인 경우(시료 152개)에서는 0.74로 균수가 작을수록 높게 나타났다.

국문요약

본 연구는 육류와 가금육, 유가공 공장의 생산라인에서 미생물 오염수준을 측정함에 있어 ATP bioluminescence법이 적용될 수 있는지를 조사하기위해 수행되었다. 도축장, 도계장, 유가공 공장 생산라인에서 시료를 채취하였으며 ATP bioluminescence법과 표준평판법을 병행하여 나타난 결과치(log RLU/ml, CFU(log/ml))를 상호 비교하여 상관계수를 측정하였다. 모든 시료(n=408)에서의 상관계수는 0.93이었으며 이중 쇠고기, 돼지고기, 닭고기는 0.93(n=220), 육, 유가공장 생산라인 또한 0.93(n=187)로 비교적 높게 나타나 ATP bioluminescence법이 기존의 표준평판법에 비해 상관계수가 높으므로 식품생산현장에서 신속하고 편리하게 세균의 오염여부를 판정할 수 있는 방법이라고 생각된다.

참고문헌

1. Todd, E. C. D., MacKenzie, J. M. and Peterkin, P. I.: Development of an enzyme-linked antibody hydrophobic grid membrane filter method for the detection of Salmonella in foods. *Food Microbiol.* **10**, 87-99 (1993).
2. Drasar, B. S., and Barrow, P. A.: Intestinal Microbiology. Aspects of microbiology 10. American Society for Microbiology, Washington, D. C (1985).
3. Gregory, R. S., Cutter, C. N., Dorsa, W. J. and Koohmaraie, M.: Use of a rapid microbial ATP bioluminescence assay to detect contamination on beef and pork carcasses. *J. Food Prot.* **58**, 770-775 (1995).
4. Kennedy, J. E. Jr. and Oblinger, J. L.: Application of bioluminescence to rapid determination of the microbial levels in ground beef. *J. Food Prot.* **48**, 334-340 (1985).
5. Bulte, M., and Reuter, G.: The bioluminescence technique as a rapid method for the determination of the microflora of meat. *Int. J. Food Microbiol.* **2**, 371-381 (1985).
6. Labots, H. and Stekelenburg, F. K.: Some possible applications of ATP-bioluminescence in the processing of meat and meat products, pp, 47-57. In Metodi rapidi ed automatizzati nella microbiologia applicata. Nell'Industria alimentar, farmaceutica, cosmetica, igienistica, Atti del Convegno:A.F.I. & S. I. M. A (1988).
7. Eden, R. and Eden, G.: Estimation of microbial levels, p. 73-98. In R. Eden and G. Eden(ed.), Impedance microbiology. Research Studies Press, John Wiley and Sons, Inc., New York (1984).
8. Chapman, A.G., and Atkinson, D. E.: Adenine nucleotide concentrations and turnover rates. Their correlation with biological activity in bacteria and yeast. In Rose,A. H. and Tempest,D. W. (ed.), Advances in microbial physiology, vol. 15. Academic Press. New York (1977).
9. Theron, D. P., Prior, B. A. and Lategan, P. M.: Effect of temperature and media on adenosine triphosphate cell content in Enterobacter aerogenes. *J. Food Prot.* **46**, 196-198 (1983).
10. Bautista, D. A., Vaillancourt, J. P., Clarke, R. A., Renwick, S. and Griffiths, M. W.: Rapid assessment of the microbiological quality of poultry carcasses using ATP bioluminescence. *J. Food Prot.* **58**, 551-554 (1995).
11. Holah, J. T.: Monitoring the hygienic status of surfaces. *J. Food Prot.* **54**, 819 (1991).
12. Bautista, D. A., McIntyre, L., Laleye, L. and Griffiths, M. W.: The application of ATP bioluminescence for the assessment of milk quality and factory hygiene. *J. Rapid Methods Automation Microbiol.* **1**, 179 (1992).
13. Kyriakades, A., Costello, S., Easter, M. and Johnson, I.: Rapid hygiene monitoring using ATP bioluminescence. p, 519 in Bioluminescence and Chemiluminescence, Current Concepts. Stanley, P. E. and Kricka, L. J. ed. John Wiley & Sons, Chichester, Engl (1991).