

## 식품내의 미생물 분리를 위한 dryfilm 방법의 평가연구

하상도

서울대학교 천연물과학연구소 조직배양실

**Evaluation of dryfilm method for isolation of microorganisms from foods.** Sang-Do Ha. *Culture Laboratory, Natural Products Research Institute, Seoul National University, 28 Yungun-Dong, Chongno-Gu, Seoul 110-744, Korea* – Dryfilm method by using 3M Petrifilm™ has been examined to replace conventional agar method for isolation of microorganisms from foods. The objectives of the present study were to evaluate suitability of dryfilm method as a microbial isolation method and to determine the effect of antimicrobial agent on dryfilm for isolation of microorganisms from foods. Five different foods, milk, ground beef, fishery surimi, Takju and wheat flour were used to isolate the natural microflora in foods and the inoculated *Escherichia coli*. Standard method agar (SMA, Difco) and Petrifilm™ aerobic count (PAC, 3M) were used to isolate total microorganisms from foods. Violet red bile agar (VRBA), brilliant green lactose bile (BGLB) broth and Petrifilm™ coliform count (PCC, 3M) were used to isolate coliforms from foods. *E. coli* broth (EC broth) and Petrifilm™ *E. coli* count (PEC, 3M) were used to isolate *E. coli* from foods. Acidified potato dextrose agar (APDA) and Petrifilm™ yeast & mold count (PYMC, 3M) were used to isolate yeasts and molds from foods. Total aerobic plate counts isolated from five different foods by SMA and PAC (3M) were not significantly different each other at  $P<0.05$  level and were highly correlated each other ( $\geq 0.96$ ). Mugwort extract as an antimicrobial agent did not affect microbial enumeration of Dryfilm. Significantly higher number of coliform colonies were formed on VRBA than PCC (3M) from ground beef, but they were not significantly different in coliform colonies from milk samples. PCC (3M) and BGLB were not significantly different for enumeration of coliforms in milk and beef samples. Significantly higher number of *E. coli* were isolated by EC broth than PEC from ground beef, but these were not significantly different for enumeration of *E. coli* from milk. Yeast and mold counts isolated from Takju and wheat flour by APDA and PYMC (3M) were not significantly different at  $P<0.05$  level. These data indicate that dryfilm method by using 3M Petrifilm™ can be successively used as an alternative to conventional agar method for enumeration of microorganisms in various foods.

식품 등의 시료로 부터 미생물을 분리해 내는 방법에는 일반적인 agar 배지 이용법, most probable number(MPN, 최확수)법, 직접 현미경 검사법, 염료 환원법, spiral plater법, dryfilm법, impedance법, microcalorimetry법, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) 등이 있다(1). 이 중 dryfilm법은 배지의 일종인 Petrifilm™(3M, St. Paul, MN 55144-1000, U.S.A.)을 사용하는데, 가격이 비싼 단점이 있으나 이의 이용으로 배지를 만드는데 필요한 기기, 시간, 노동력을 절약할 수 있으며, 부피가 작아 incubator 내에서의 필요공간이 적으며, 염색된 균체가 얻어짐으로써 다른 유사한 모양의 식품 등의 시료 입자와 쉽게 구별될 수 있으며, *E. coli* 분리배지의 경우 한 번 배양으로 단시간에 정확히 분리할 수 있는 장점이 있다. 또한 MPN법은 흔히 결과 균수가 overestimate되고, 높은 variability를 보여주는 단점이 있으며(2), agar pouring과 surface plating법은 heat shock과 desiccation의 단점이 있어 dryfilm 사용법이 유용할 것으로 생각된다. 이 dry film

방법은 1990년 Association of Official Analytical Chemists(AOAC)에 의해 공인된 우유로 부터의 미생물 분석법이며(3), 그 종류로는 총호기성 균수를 측정하기 위한 Petrifilm™ aerobic count(PAC) plates(4-12), coliform 균수와 대장균수 측정을 위한 Petrifilm™ coliform count(PCC) plates와 Petrifilm™ *E. coli* count(PEC) Plates(7, 12-18), 그리고 곰팡이와 효모수 측정을 위한 Petrifilm™ yeast & mold count(PYMC) plates(19, 21)의 네 가지가 있으며 많은 외국의 연구 문헌들에 의하여 그 이용의 타당성이 증명되었다. 위와 같은 외국에서의 활발한 연구에 반해 국내에서는 아직 Petrifilm™에 대한 평가 및 tryptic soy agar(TSA), plate count agar (PCA), brilliant green lactose bile broth(BGLB)에 의한 MPN법, violet red bile agar(VRBA), eosin methylene blue(EMB) agar, acidified potato dextrose agar(APDA) 등 일반적으로 사용되고 있거나 식품공전에 명시되어 있는 식품으로 부터의 미생물 분리 배지와의 비교 연구가 1994년 말까지 전혀 행하여 지지 않았었다. 그러나 최근에 인삼제품으로 부터 총호기성균 분리를 위한 배지인 standard method agar(SMA, Difco)와 PAC(3M)를 비교한 단 한 편의 논문만이 유일하게 학술지에 게재

\*Corresponding author.

Key words: Microbial isolation, dryfilm method, conventional agar method, 3M Petrifilm™

되어 있을 뿐이다(21). 이러한 원인으로 외국에서는 Petrifilm™이 미생물 실험용 배지로써 널리 사용되고 있으나, 우리나라에서는 아직도 잘 알려지지 않고 있는 실정이다. 더욱기 1995년 7월 20일 보건복지부는 1996년 7월 1일부터 육류를 제외한 모든 냉동식품 유통기한을 자율화한다고 발표하여 수입회사 자체의 미생물 검사로서 저장기간의 극대화를 모색할 것으로 예상된다. 이에 따라 간단하며 신속, 정확한 미생물 분리 및 검사배지의 수요가 검사시설이 부족한 식품 수입상들 및 유통업체에 의해 증가될 전망이다. 편의성 등 위에서 기술한 Petrifilm™의 장점들에 의한 앞으로 예상되는 국내의 연구실험실, 미생물 품질검사실, 검사소 등에서의 수요증가에 대비하여 Petrifilm™을 이용한 dryfilm 방법과 기존의 전통적 미생물 분리 방법간의 비교 및 타당성 연구가 선행되어야 할 것으로 사료되어 본 연구가 행해지게 되었다. 본 연구의 목적은 1) 여러 식품으로부터 미생물을 분리하기 위한 방법으로서의 dryfilm 방법의 타당성 평가; 2) 한국식품공전에서 공인된 일반적 미생물 분리방법과 dryfilm 방법의 분리능력 및 반복성 비교; 3) antimicrobial agent와 같은 식품첨가물이 dryfilm 방법의 미생물 분리능력에 미치는 영향을 조사함에 있다.

## 재료 및 방법

### 실험 시료

시중 수퍼마켓에서 구입한 다섯 종류의 식품을 본 실험에 사용하였다. 살균된 우유(pasteurized milk)는 매일유업과 서울우유에서 구입한 유통기간이 지나지 않은 신선한 우유, 개봉 후 하룻밤 냉장고에 보관된 우유 그리고 *E. coli*를 접종한 우유의 세가지 시료를 총균수, coliform 및 *E. coli* 수 측정에 사용하였다. 간 쇠고기(fresh ground beef)는 유통기간이 지나지 않은 신선한 간 쇠고기, 2% 쑥 ethanol 추출물을 첨가한 후 24시간 냉장보관한 간 쇠고기 그리고 *E. coli*를 접종한 신선한 간 쇠고기의 세가지 시료를 총균수, coliform 및 *E. coli* 수 측정에 사용하였다. 쑥 추출물이 첨가된 간 쇠고기가 시료로 사용된 이유는 식품으로부터 미생물을 분리하는 배지들에 대한 식품첨가물의 영향을 조사하기 위함이다. 어묵(fishery surimi)은 유통기간이 지나지 않은 신선한 어묵과 *E. coli*를 접종한 어묵의 두가지 시료를 총균수, coliform 및 *E. coli* 수 측정에 사용하였다. 탁주(Takju)와 밀가루(wheat flour) 시료는 총균수 및 효모와 곰팡이수 측정을 위하여 사용하였다.

### 사용 균주

*Escherichia coli*(ATCC 25922)를 시험균주로 선정하여 우유와 간 쇠고기에 접종하였으며, 그 외의 시료들은 자체내의 자연균총(natural microflora)을 이용되었다.

### 미생물 분리방법

액체시료인 시유와 막걸리는 살균된 phosphate dilution water(pH 7.2)로 직접 희석하여 각 배지에 1 ml 씩 분주하였다. 고체 시료인 간 쇠고기, 밀가루 및 어묵은 10 g을 칭량하여 살균된 Stomacher plastic bag(Stomacher 400, Seward Medical, London, UK)에 넣고 90 ml의 lactose broth(LB, Difco)를 첨가한 후 1분간 Stomacher(Model Lab Blender 400, Tekmar Co., Cincinnati, OH, U.S.A.)에서 균질화 및 혼합하여 phosphate dilution water(pH 7.2)로 희석한 후 각 배지에 1 ml 씩 분주하였다. 결과는 6~24개 시료가 각각 duplicate plating 된 것이므로 12~48개 결과의 평균치이다. 균수는  $\log_{10}$  CFU/g으로 나타내었는데 그 이유는 결과 통계분석을 위한 평균치 간의 통일된 분산과 정규분포의 가정을 보다 쉽게 충족시키기 위한 가정에 의해서이다(22).

### 미생물 분리 배지

일반적으로 사용되고 있는 식품공전에 명시되어 있는 전통적 공시방법과 한국 3M 주식회사(서울 영등포구 여의도동 27-3)로부터 구입한 네 종류의 Petrifilm™을 이용하여 식품내의 미생물을 분리하였다. 총균수(total aerobic plate counts) 측정을 위하여 한국식품공전 공시법인 plate count agar(PCA, Difco)를 이용한 standard method agar(SMA)법(3)과 Petrifilm™ aerobic count(PAC, 3M)가 이용되었다. 시료가 접종된 PCA는 37°C에서, PAC(3M)는 32°C에서 24시간 동안 배양된 후 총균수를 측정하였으며, 세균의 경우 25~250 colony를 포함하고 있는 희석률의 plate를 선정하였다. Petrifilm™의 경우 일반세균이 red colony를 나타내며 크기에 관계없이 모두 헤아렸다. Coliform 측정에는 AOAC 공시법인 violet red bile agar(VRBA, Difco) plate법(3), brilliant green lactose bile(BGLB, Difco) broth에 의한 MPN법(3) 그리고 Petrifilm™ coliform count(PCC, 3 M)가 이용되었다. VRBA법에서는 pink색을 띠는 colony가 coliform이며, 35°C에서 48시간 동안 배양한 후 coliform 수를 측정하였다. BGLB에 의한 3-tube series MPN법은 35°C에서 2일 동안 배양한 후 coliform 수를 측정하였다. 배지가 혼탁하게 변하며, durham tube에 기포가 포집되어 있는 것을 positive tube로 간주하였다. Petrifilm™ coliform count(PCC, 3M)는 이전의 이름이 Petrifilm™ VRB였으며, VRB nutrient로 코팅된 아래면 film과 cold-water-soluble gelling agent와 tetrazolium indicator 염료로 코팅된 윗면 film으로 구성되어 있다. Coliform은 triphenyltetrazolium dye의 reduction에 의해 red colony를 나타내며, lactose의 fermentation에 의해 기포를 colony 주위에 형성한다(13). 35°C에서 24시간 동안 배양한 후 coliform 수를 측정하였다. *E. coli* 측정에는 AOAC 공시법인 EC broth(Difco)에 의한

MPN법(3)과 Petrifilm™ *E. coli* count(PEC, 3M) plate를 이용하였다. EC broth법은 Durham tube를 포함하고 있는 EC broth(Difco) tube에 시료를 접종한 후 44.5°C에서 24시간 동안 배양하여 배지가 혼탁하게 변하고 durham tube에 기포가 포집되어 있는 것을 *E. coli* presumptive positive로 간주하였다. 추정시험이 양성일 경우(presumptive positive), EMB 평판배지를 이용하여 confirmation test 하여 확인하였다. Petrifilm™ *E. coli* count(PEC, 3M) plate는 PCC(3M)와 같은 조성에 97%의 *E. coli*가 갖고 있는 glucuronidase의 indicator인 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide (BCIG)를 포함하고 있다. 만약 BCIG가 *E. coli*의 효소인 glucuronidase에 의하여 분해되면 indigo blue가 형성된다. 그러므로 glucuronidase positive *E. coli*는 blue colony를 보이고, glucuronidase negative *E. coli*는 red colony를 나타낸다(13). 오직 기포를 갖고 있는 blue colony만을 *E. coli*로 간주하여 counting 하였다. *E. coli* count를 위해서 35°C에서 24~48시간 배양하였다. 효모 및 곰팡이 측정배지는 acidified potato dextrose agar (APDA, Difco)(3)와 Petrifilm™ yeast and mold count (PYMC)가 이용되었다. APDA는 10% tartaric acid로 pH 3.5가 되도록 potato dextrose agar를 acidified시킨 것이며, PYMC plate에서 효모는 pink에서 green의 빛깔을 띠며, 작고 가장자리 부분이 명확하게 구분이 된다. 곰팡이는 다양한 색상으로 나타나며, 큰 공간을 차지하고 가장자리 부분이 명확히 구분되지 않는다. 이들 배지는 똑바로 세워 21~25°C의 암소에서 보관하면서 3~5일 후에 효모와 곰팡이 수를 각각 따로 측정하였으며, 15~150 colony를 포함하고 있는 plate를 선정하였다(23).

### 시약

Phosphate dilution water의 stock solution을 조제하기 위해 34 g의 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>를 증류수 500 ml에 녹인 후 1N NaOH(약 175 ml)를 첨가하여 pH를 7.2로 보정한 후 증류수를 채워 1 l로 하였다. 1.25 ml의 stock solution을 증류수 1 l에 혼합하여 autoclaving한 후 사용하였다(24).

### 통계 처리

미생물 균수는 log<sub>10</sub> CFU/g(ml)으로 나타내었으며, SAS 통계처리 프로그램, version 6.04(1988 SAS User's Guide, SAS Institute Inc., Cary, NC, U.S.A.)에 있는 GLM procedure의 PDif option에 의해 수행된 least square mean separation 방법에 의해 분석 되었으며, 모든 통계처리의 유의성은 P<0.05 범위에서 실행되었다. Regression analysis가 Petrifilm™ 법과 일반적인 배지 이용법 사이의 관계를 설명하기 위해 사용되었다. 만약 두 방법으로 부터 얻어진 결과가 정확히 같다면 correlation coefficient는 1.0이 될 것이지만 실제 결과는 이런 이상과는 다르다. 그러므로 두가지 방법을 이용한 실험에 의해 얻어진 결과의 correlation coefficient를 구하여 두 방법간의 상관성을 조사하였다.

### 결과 및 고찰

우유, 간 쇠고기, 탁주, 밀가루, 어묵의 다섯 가지 식품내의 총균수를 분리하기 위한 배지인 standard method agar(SMA)와 Petrifilm™ standard method (PSM, 3M)를 비교하였으며, 그 결과는 Table 1에 나타난 바와 같다. 총균수 측정을 위한 식품시료는 12~48 개를 사용하였다. 다섯 가지의 식품으로 부터 분리된 총균수는 SMA법과 PSM법을 사용했을 때 모두 P<0.05 범위에서 유의적인 차이가 없었다. 다섯 가지 식품 모두에서 correlation coefficients가 0.96 이상으로써 SMA (Difco)법과 PSM(3M)은 총균수 분리능에 있어 상당한 상관성을 보인다고 할 수 있다. MacAllister 등(4)과 Ginn 등(12)도 SMA(Difco)법과 PSM(3M)법이 우유제품으로 부터 총균수를 분리해 내는데 P<0.01 범위에서 유의적 차이를 보이지 않는다고 보고하였다. MacAllister 등(4)은 우유제품으로 부터 총균수를 분리해 내는데 있어 SMA(Difco)법과 PSM(3M) 사이의 correlation coefficients가 0.91에서 0.99로서 상당한 상관성을 보인다고 보고하였다. 본 실험에서 사용한 신선한 시유는 초기 균수가 너무 적어 회석을 하지 않고 plating을 하였다. Plating된 SMA(Difco) 배지는 우유에 의해 혼탁해져 colony count가 어려웠는데, PSM(3M) 배지는

Table 1. Comparison of standard method agar and Petrifilm™ standard method for total aerobic plate counts in five foods.

Parameters	Milk	Ground beef	Takju	Wheat flour	Surimi
Sample size	48	36	12	24	12
Mean log <sub>10</sub> cfu/g (ml) (SMA± SE)	1.65± 0.28	5.29± 0.04	5.99± 0.13	3.13± 0.04	5.62± 0.18
Mean log <sub>10</sub> cfu/g (ml) (PSM± SE)	1.52± 0.28	5.37± 0.04	5.95± 0.13	3.04± 0.04	5.70± 0.18
Correlation Coefficient	0.97	0.99	0.96	0.96	0.99
Slope	1.00	1.01	0.98	0.96	1.01
Intercept	-0.13	0.03	0.05	0.05	0.04
P-value	0.74	0.21	0.84	0.11	0.76

SE=Standard Error

**Table 2. Comparison of standard method agar and Petrifilm™ standard method for total aerobic plate counts in milk and ground beef samples.**

Foods	Mean $\log_{10}$ cfu/g (mL) (SMA± SE)	Mean $\log_{10}$ cfu/g (mL) (PSM± SE)	P- value
Fresh milk	0.08± 0.03	0.00± 0.03	0.15
One day stored milk	0.94± 0.11	0.58± 0.11	0.06
<i>E. coli</i> contaminated milk	2.95± 0.05	2.86± 0.05	0.22
Fresh ground beef	5.10± 0.04	5.23± 0.04	0.06
Mugwort extract added beef	5.38± 0.06	5.45± 0.06	0.49
<i>E. coli</i> contaminated beef	5.39± 0.05	5.42± 0.05	0.72

SE = Standard Error

흰색 배경 위에서 TTC에 의해 colony가 붉은색으로 염색되어 쉽게 셀 수 있었다. 이것으로 볼 때 살균된 우유로 부터 균수를 측정하기 위한 배지로서는 SMA(Difco)에 비하여 PSM(3M)이 보다 적당한 것으로 사료된다. 이 결과는 아래 다섯 가지 식품으로부터 총균수 측정을 위한 배지로서 SMA법과 PSM(3M)법이 차이가 없으며, 정확하고 편리한 배지인 PSM(3M)법이 전통적인 SMA(Difco)법의 좋은 대체방법으로 이용될 수 있다는 증거가 된다.

세 종류의 우유(신선한 우유, 개봉 후 하룻밤 냉장고에 보관된 우유, *E. coli*를 접종한 우유)와 세 종류의 간 쇠고기(유통기간이 지나지 않은 신선한 간 쇠고기, 2% 쑥 ethanol 추출물을 첨가한 후 1일간 냉장보관한 간 쇠고기, *E. coli*를 접종한 간 쇠고기) 등 여섯 종류의 시료내의 총균수를 측정하기 위한 배지인 standard method agar(SMA)와 Petrifilm™ Standard Method(PSM, 3M)를 비교하였으며, 그 결과는 Table 2에 나타난 바와 같다. 여섯 가지의 식품으로 부터 분리된 총균수는 SMA법과 PSM(3M)법을 사용했을 때 모두  $P<0.05$  범위에서 유의적인 차이가 없었다. Antimicrobial agent인 쑥 추출물(mugwort extract) 또한 SMA( $5.38\pm 0.06$ )과 PSM( $5.45\pm 0.06$ )의 분리 균수에 유의적 차이를 보이지 못하였으므로 균 분리능력에 영향을 끼치지 못한 것으로 나타났다. 이 결과로 이들 여섯 종류의 시료로부터 총균수 측정을 위한 배지로서 SMA와 PSM(3M)이 차이가 없으며, PSM(3M)이 SMA의 대체방법으로 이용될 수 있다는 것을 알 수 있다.

우유와 간 쇠고기 시료내의 coliform 분리 배지인 violet red bile agar(VRBA)와 Petrifilm™ coliform count(PCC, 3M)를 비교하였으며, 그 결과는 Table 3에

**Table 3. Comparison of violet red bile agar and Petrifilm™ coliform count for coliform enumerations in milk and ground beef samples.**

Parameters	Milk	Ground beef
Sample size	48	72
Mean $\log_{10}$ cfu/g (mL) (VRBA± SE)	1.64± 0.27	4.32± 0.04 <sup>a</sup>
Mean $\log_{10}$ cfu/g (mL) (PCC± SE)	1.43± 0.27	3.82± 0.04 <sup>b</sup>
Correlation Coefficient	0.97	0.91
Slope	0.93	0.87
Intercept	-0.10	0.04
P-value	0.59	0.0001

<sup>a,b</sup> Means in the same column with no common superscripts differ significantly at  $P<0.05$  level.

SE = Standard Error

나타난 바와 같다. 신선한 우유에서는 coliform이 분리되지 않았는데, 이는 pasteurized milk의 경우 식품공전의 기준에 적합한 coliform 음성임을 보여준다. 우유로부터 분리된 coliform의 수는  $P<0.05$ 에서 VRBA(Difco)와 PCC(3M)간에 유의적 차이를 보이지 않았으며, correlation coefficient도 0.97로 상당히 가까운 상관관계를 보였다. Ginn 등(12)은 VRBA(Difco)법과 PCC(3M)법이 우유제품으로 부터 coliforms을 분리해 내는데  $P<0.01$  범위에서 유의적 차이를 보이지 않는다고 보고하였다. Curiale 등(7) 또한 비록 dryfilm법이 우유제품으로 부터 VRBA(Difco)법에 비하여 약간 높은 수의 coliform을 분리해 내었지만 유의적 차이가 없었다고 보고하였다. 육고기 시료를 사용하였을 때 두 방법간의 상관성은 0.91로 상당히 높았으나, PCC(3M)는 VRBA(Difco)에 비하여  $P<0.05$ 의 범위에서 유의적으로 낮은 수의 coliform을 분리해 내었다( $3.82\pm 0.04$  vs  $4.32\pm 0.04$ ). 우유와 신선한 간 쇠고기로 부터 분리된 coliform 수는 BGLB(Difco)에 의한 MPN법과 PCC(3M)법을 사용했을 때  $P<0.05$  범위에서 유의적으로 차이가 없었으나, PCC(3M)법이 BGLB(Difco)보다 약간 많은 수의 coliform을 분리해 내었다( $2.66\pm 0.06$  vs  $2.50\pm 0.06$  in contaminated milk;  $3.53\pm 0.06$  vs  $3.35\pm 0.15$  in fresh ground beef, data not shown). Nelson 등(15)은 우유제품으로 부터 coliform을 분리하는데 PCC(3M), VRBA(Difco), MPN법 간에 유의적 차이를 보이지 않았다고 보고하였다. 반면에 Curiale 등(13)은 비록 다른 시료를 사용하였지만 밀가루와 버섯에서 MPN보다 dryfilm이 유의적으로 높은 수의 coliform을 분리하였으며, 쇠고기에서는 오히려 dryfilm에 비하여 MPN으로 부터 높은 수의 coliform이 분리되었다. 그러나 그들은 MPN법의

**Table 4. Comparison of E. coli broth and Petrifilm™ E. coli count for E. coli enumeration in contaminated foods.**

Foods	Mean log <sub>10</sub> cfu/g (mL) EC broth± SE	Mean log <sub>10</sub> cfu/g (mL) PEC± SE	P- value
E. coli contaminated milk	2.50± 0.18	2.77± 0.10	0.22
E. coli contaminated beef	3.38± 0.06 <sup>a</sup>	3.03± 0.02 <sup>b</sup>	0.0001

<sup>a,b</sup> Means in the same row with no common superscripts differ significantly at P<0.05 level.

SE=Standard Error

정확성 결여로 인하여 분리된 coliform 평균치 간의 통계학적 유의차는 구하기가 어려웠으며, PCC(3M)법의 repeatability와 reproducibility variance는 MPN법 보다 좋았다고 보고하였다. 이 결과는 PCC(3M)법이 BGLB (Difco)에 의한 MPN법을 대체할 수 있는 좋고 편리한 방법임을 보여주며, VRBA(Difco)가 가장 많은 수의 coliform을 분리해 낼 수 있는 배지임을 보여준다. 그러나 전통적으로 사용되고 있는 방법인 VRBA(Difco)법이 과연 정확히 coliform만 선택적으로 분리하는 방법인가를 의심해 보아야 하는데, VRBA(Difco)의 경우 기포 생성을 확인할 방법이 없으므로 기포를 생성하지 않는 colony까지도 count하여 coliform으로 간주하기 때문이다. 그러나 PCC(3M)의 경우 분리되는 모든 colony가 coliform으로 간주되는 것이 아니고, 기포를 갖고 있는 colony만이 coliform colony로 간주되기 때문에 VRBA (Difco)보다 상대적으로 적은 수의 coliform이 분리되는 것이 아닌가 생각된다. VRBA(Difco)가 PCC(3M) 보다 많은 수의 coliform을 분리해 내는 배지임을 보여주는 또 다른 원인은 가스생성 능력이 낮은 coliform의 경우 PCC(3M) 배지에서는 무시되어 count되지 않을 수 있다는 것이다. 이것은 Nelson 등(15)의 주장이 잘 반영해 준다. 그들은 가스생성 능력이 낮은 coliform의 경우 PCC(3M) 배지에서는 coliform으로 간주되지 않고 무시되므로 실제보다 낮게 평가된 수의 coliform이 보고 된다는 것이다. 우유의 경우 살균되어 있으므로 다른 균총이 존재하지 않으나, 육류의 경우 g 당 10<sup>5</sup> cells 정도의 여러 혼합균총이 포함되어 있으므로 기포를 생성하지 않는 coliform이 아닌 균이 VRBA(Difco) 배지에 분리되어 균수가 높게 측정되었거나 가스생성 능력이 떨어지는 coliform이 PCC(3M)에서 count되지 않아 PCC(3M) 배지에서 낮게 측정된 것으로 생각되며, 추후 연구가 필요할 것으로 사료된다.

*Escherichia coli*으로 오염된 우유와 간 쇠고기 시료의 E. coli 수를 조사하기 위한 배지인 EC broth를 이용한

**Table 5. Comparison of acidified potato dextrose agar and Petrifilm™ yeast & mold count for yeast and mold enumerations in Takju and wheat flour samples.**

Foods	Mean log <sub>10</sub> cfu/g (mL) APDA± SE	Mean log <sub>10</sub> cfu/g (mL) PYMC± SE	P- value
Yeast counts from Takju	5.64± 0.10	5.92± 0.10	0.08
Mold counts from wheat flour	2.18± 0.05	2.14± 0.05	0.45

SE=Standard Error

MPN법과 Petrifilm™ E. coli count(PEC, 3M)를 비교하였으며, 그 결과는 Table 4에 나타난 바와 같다. PEC (3M)(2.77± 0.10)가 EC broth(2.50± 0.18)에 비하여 약간 높은 수의 E. coli를 우유로 부터 분리 하였으나 P< 0.05에서 유의적 차이를 보이지 않았다. 간 쇠고기로 부터 분리된 E. coli의 수는 PEC(3M)(3.03± 0.02)에서 EC broth(3.38± 0.06)에 비하여 P<0.05의 범위에서 유의적으로 낮은 수의 E. coli가 분리되었다. 이는 coliform 분리배지 결과와 유사하며, 우유의 경우 오염될 소지가 있는 E. coli 외의 다른 자연균총이 존재하지 않으나, 육류의 경우 10<sup>5</sup> cells 정도의 자연균총들이 존재하므로 EC broth를 overestimation시킨 것이 아닌가 생각되므로 추후 연구가 또한 필요할 것으로 생각된다.

탁주 시료내의 효모와 밀가루 시료내의 곰팡이를 분리하기 위한 배지인 acidified potato dextrose agar (APDA)와 Petrifilm™ yeast & mold count(PYMC)를 비교하였으며, 그 결과는 Table 5에 나타난 바와 같다. 탁주로부터 분리된 효모의 수는 PYMC(3M)(5.92± 0.10)가 APDA(5.64± 0.10)에 비해 약간 높았으나, P<0.05에서 유의적 차이를 보이지 않았으며, 밀가루로 부터 곰팡이를 분리하기 위해 사용된 APDA(2.18± 0.05)와 PYMC(3M)(2.14± 0.10) 또한 P<0.05에서 유의적 차이를 보이지 않았다. 이 결과는 Beuchat 등(20)의 결과와 일치하며, PYMC(3M)법으로 밀가루에서 분리한 곰팡이 수는 비록 5일 배양시 APDA(Difco)보다 유의적으로 높은 수의 곰팡이를 분리하였으나, 3일 배양시 APDA (Difco)와 차이가 없었다. 이 결과는 식품으로부터 효모 및 곰팡이를 분리하기 위한 배지인 APDA(Difco)와 PYMC(3M)가 차이가 없으며, 보다 편리한 배지인 PYMC(3M)가 배지 준비 시간이 길고, acidification 등이 요구되는 불편한 전통적 방법인 APDA(Difco)의 좋은 대체 방법으로 이용될 수 있다는 증거가 될 수 있을 것이다.

Coliform수 만을 측정하기 위한 배지인 Petrifilm™ coliform count(PCC)와 coliform과 E. coli를 선택적으로 분리하여 coliform수를 측정할 수 있는 Petrifilm™ E. coli count(PEC) 배지의 coliform 분리능력이 72가지의

**Table 6. Comparison of Petrifilm™ coliform count and Petrifilm™ *E. coli* count for coliform enumerations in 72 milk and ground beef samples.**

	PCC± SE	PEC± SE	P-value
Mean $\log_{10}$ cfu/g (ml)	3.82± 0.04	3.71± 0.04	0.08

SE=Standard Error

우유와 간 쇠고기 시료를 이용하여 비교되었으며, 그 결과는 Table 6에 나타난 바와 같다. 시료로 부터 분리된 coliform의 수는 PCC(3M)(3.82± 0.04)가 PEC(3M)(3.71± 0.04)에 비하여 약간 높았으나 P<0.05에서 유의적 차이를 보이지 않았다. 이는 PCC(3M)와 PEC(3M)가 coliform 분리를 위한 배지로서 차이를 보이지 않음을 의미한다. 식품으로부터 *E. coli*와 coliform 측정이 필요할 경우 PEC(3M)만 사용해도 *E. coli*와 coliform 모두를 선별적으로 분리해 낼 수 있으므로 PEC(3M) 배지의 사용은 경제적으로 유익하리라 사료된다.

이상의 결과로서 3M Petrifilm™을 사용한 dryfilm 법이 식품으로부터 미생물을 분리하기 위한 적당한 배지이며 전통적 미생물 분리 방법들과 균분리 능력에 있어 유의적 차이가 없음이 증명되었다.

## 요 약

본 실험에서는 식품내 미생물을 분리하는 불편한 전통적 agar 배지법을 대체하기 위하여 간편하고 정확한 3M Petrifilm™을 이용한 dryfilm 방법을 비교, 평가하였다. 총균수 분리배지인 standard method agar (SMA)와 Petrifilm™ standard method(PSM, 3M)는 P<0.05 범위에서 우유, 간 쇠고기, 턱주, 밀가루, 어묵의 다섯 가지 식품으로부터의 균분리 능력에 있어 유의적인 차이가 없었다. 우유로부터 분리된 coliform 수와 *E. coli* 수는 brilliant green lactose broth (BGLB)에 의한 MPN법과 Petrifilm™ coliform count (PCC, 3M)법을 사용했을 때 그리고 EC broth에 의한 MPN법과 Petrifilm™ *E. coli* count(PEC, 3M)법을 사용했을 때 각각 P<0.05 범위에서 유의적으로 차이가 없었다. 우유로부터 분리된 coliform 수는 P<0.05에서 violet red bile agar(VRBA)와 PCC(3M)간에 유의적 차이를 보이지 않았으나 육고기 시료를 사용하였을 때 PCC(3M)는 VRBA에 비하여 유의적으로 적은 수의 coliform을 분리하였다. 턱주 시료내의 효모와 밀가루 시료내의 곰팡이를 분리하기 위한 배지인 acidified potato dextrose agar(APDA)와 Petrifilm™ yeast & mold count(PYMC)를 비교하였는데, 균 분리능력에 유의적 차이를 보이지 않았다. 이 결과로 3M Petrifilm™을 이용한 dryfilm 방법이 제조시간이 길고, 불편한 전통적 agar 이용법의 좋은 대체방법으로 사용될 수 있다는

것을 알 수 있다.

## 참고문헌

- Jay, J.M. 1992. *Modern Food Microbiology* (4th ed.) Pp. 97-165. Chapman & Hall, New York, NY10119, U.S.A.
- Russek, E. and R.R. Colwell. 1983. Computation of most probable numbers. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 1646-1650.
- Official Method of Analysis. 1990. *AOAC* (15th ed.), Arlington, VA.
- McAllister, J.S., M.S. Ramos, and T.L. Fox. 1987. Evaluation of the 3M dry medium culture plate (Petrifilm™ SM) method for enumerating bacteria in processed fluid milk samples. *Dairy and Food Sanitation* **7**: 632-635.
- Abgrall B. and J.J. Cleret. 1990. Evaluation of Petrifilm SM for the enumeration of the aerobic flora of fish. *J. Food Prot.* **53**: 213-216.
- Bishop J.R. and J.Y. Juan. 1988. Improved methods for quality assessment of raw milk. *J. Food Prot.* **51**: 955-957.
- Curiale, M.S., P. Fahey, T.L. fox, and J.S. McAllister. 1989. Dry rehydratable films for enumeration of coliform and aerobic bacteria in dairy products: Collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **72**: 312-318.
- Curiale, M.S., T. Sons, J.S. McAllister, B. Halsey, and T.L. Fox. 1990. Dry rehydratable film for enumeration of total aerobic bacteria in foods: Collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **73**: 242-248.
- McAllister, J.S., M.P. Stadtherr, and T.L. Fox. 1988. Evaluation of the 3M Petrifilm culture plate method for enumerating aerobic flora and coliforms in poultry processing facilities. *J. Food Prot.* **51**: 658-659.
- Smith, L.B., T.L. Fox, and F.F. Busta. 1985. Comparison of dry media culture plate (Petrifilm SM plates) method to the aerobic plate count method for enumeration of mesophilic aerobic colony-forming units in fresh ground beef. *J. Food Prot.* **12**: 1044-1045.
- Smith, L.B., E.A. Zottola, T.L. Fox, and K. Chausse. 1989. Use of petrifilm to evaluate the microflora of frozen dessert mixes. *J. Food Prot.* **52**: 549-551.
- Ginn, R.E., V.S. Packard, and T.L. Fox. 1986. Enumeration of total bacteria and coliforms in milk by dry rehydratable film methods: Collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **69**: 527-531.
- Curiale, M.S., T. Sons, D. McIver, J.S. McAllister, B. Halsey, D. Roblee, and T.L. Fox. 1991. Dry rehydratable film for enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* in foods: Collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **74**: 635-648.
- Matner, R.R., T.L. Fox, D.E. McIver, and M.S. Curiale. 1990. Efficacy of Petrifilm *E. coli* count plates for *E. coli* and coliform enumeration. *J. Food Prot.* **53**: 145-150.
- Nelson, C.L., T.L. Fox, and F.F. Busta. 1984. Evaluation of dry medium film (Petrifilm VRB) for coliform enumeration. *J. Food Prot.* **47**: 520-525.

16. Okrend, A.J.G., B.E. Rose, and B. Bennett. 1990. A screening method for the isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from ground beef. *J. Food Prot.* **53**: 249-252.
17. Okrend, A.J.G., B.E. Rose, and R. Matner. 1990. An improved screening method for the detection and isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from meat, incorporating the 3M Petrifilm™ test kit-HEC-for hemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J. Food Prot.* **53**: 936-940.
18. Restino L. and R.H. Lyon. 1987. Efficacy of petrifilm VRB for enumerating coliforms and *Escherichia coli* from frozen raw beef. *J. Food Prot.* **50**: 1017-1022.
19. Beuchat, L.R., B.V. Nail, R.E. Brackett, and T.L. Fox. 1990. Evaluation of a culture film (Petrifilm YM) method for enumerating yeasts and molds in selected dairy and high acid foods. *J. Food Prot.* **53**: 869-874.
20. Beuchat, L.R., B.V. Nail, R.E. Brackett, and T.L. Fox. 1991. Comparison of the Petrifilm™ Yeast and Mold culture film method to conventional methods for enumerating yeasts and molds in foods. *J. Food Prot.* **54**: 443-447.
21. Kwak, Y.S., J.K. Chang, and K.S. Lee. 1995. Bacterial counts in ginseng products by dry rehydratable film method. *J. Fd. Hyg. Safety* **10**: 41-43.
22. Snedecor, G.W. and W.G. Cochran. 1980. *Statistical Methods*, 7th Ed., Iowa State University Press, Ames, IA, U.S.A.
23. Mislicvec, P.B., L.R. Beuchat, and M.A. Cousin. 1991. Yeasts and molds. Chapter 16. in D.F. Splitstoesser and C. Vanderzant (ed.), *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* (3rd ed.), American Public Health Association, Washington, D.C.
24. Richardson, G.H. (ed.). 1985. *Standard methods for the examination of dairy products* (15th ed.). American Public Health Association, Washington, D.C.

**(Received 4 December 1995)**