

최 종
연구보고서

GA0618-

고 품질 식품생산을 위한 미생물 검지 기술 개발
Development of Detection Technique of Microorganism
for Production of High Quality Food

연 구 기 관
한국식품개발연구원

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “고품질 식품 생산을 위한 미생물 검지 기술 개발”
에 관한 연구 과제의 최종 보고서로 제출합니다.

2006년 7월 14일

주관연구기관명 : 한국식품연구원

총괄연구책임자 : 이 남 혁

연 구 원 : 조 진 호

연 구 원 : 김 기 성

연 구 원 : 양 승 용

연 구 원 : 김 영 호

연 구 원 : 김 영 봉

연 구 원 : 김 윤 지

연 구 원 : 오 세 욱

연 구 원 : 김 현 경

요 약 문

I. 제 목

고품질 식품 생산을 위한 미생물 검지기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 고품질 식품 생산을 위한 새로운 미생물 검지법 개발
- 미생물 반응시약의 개발
- 미생물 측정기기의 개발

III. 연구개발 내용 및 범위

■ 1차년도

1. 각종 미생물로부터 단백질 분리 및 생화학적 특성 검토(주관)

- 1) 각종 미생물로부터의 단백질 분리
 - o 일반세균, 대장균, 살모넬라, 리스테리아균 등으로부터 단백질 분리
- 2) 단백질 조성 조사
 - o SDS-PAGE에 의한 subunit 조성 검토
- 3) 단백질(효소)의 생화학적 특성 조사
 - o 단백질(효소)의 온도 의존성
 - o 단백질(효소)의 pH 의존성
 - o 단백질(효소)의 염농도 의존성
- 4) 각종 미생물의 단백질 특성으로부터 반응시약 예비 검토

2. 미생물 측정기기의 설계도 작성 및 1차간이 측정기기 개발 (협동)

1) 미생물 측정기기의 설계도 작성

- o 광학기술
- o SENSOR 기술
- o 전자회로 기술
- o S/W기술
- o 1차간이 측정기기 개발 완성

■ 2차년도

1. 단백질의 생화학적 특성을 이용한 시약 개발(주관)

- 1) ATP 분해산물 생산 시약개발 검토
 - o 금속이온에 대한 감수성 검토
- 2) 각종 미생물로부터 분리한 단백질의 특이적 라벨링 시약 검토
 - o IAEDANS
 - o Monodansylcadaverine
 - o ANS 등의 라벨링 효과 검토
- 3) 단백질 함량 측정기술로부터의 시약개발 검토
 - o 뷰렛 시약을 응용한 개발 검토
 - o 마이크로 뷰렛 시약을 응용한

2. 미생물 측정기기 개발 - 단채널, 고정형(협동)

- 1) 현장에서 사용 가능한 콤팩트형 기기 개발
 - o 광학부분
 - o 감지 기술
 - o 전자 회로 기술

■ 3차년도

1. 현장적용 시험 및 개발된 시약의 보완

- 1) 현장적용 시험
 - o 유통 중의 각종 식품에 대한 미생물 측정

- o 유가공장의 원유에 대한 미생물 측정
- o 요구르트의 가공공정 중 유산균의 측정
- o 도축장 및 육가공장(육류)의 미생물 측정
- o 농산식품의 미생물 측정
- o 시약에 대한 최종 감도 조절

2) 각종 미생물 측정에 대한 통계처리

2. 각종 식품에 대한 미생물의 신속한 측정 시스템 개발

- 1) 광학부분
- 2) 감지 기술
- 3) 분석Tool 개발
- 4) S/W 기술
- 5) 시스템 통합
- 6) 검증

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

미생물의 단백질 부분에 존재하는 ATPase에 의해 ATP가 분해되는 현상을 통해 자체 개발한 시약을 이용하여, 총균수, 병원성 미생물인 *Vibrio parahaemolyticus*(KCTC 2471)와 *Bacillus cereus*(KFRI 00437)의 정량법에 대해서 검토하였다. 평판배양법을 이용한 각종 균주들의 총균수와 이들의 Ca-ATPase 활성도를 비교한 결과, 미생물의 균수가 증가할수록 Ca-ATPase 활성도가 높아지는 경향을 보여, Ca-ATPase 활성을 측정함으로써 이들의 신속한 균수 측정이 가능한 것으로 판단되었다.

다음은 미생물 내에 존재하는 단백질의 특성을 파악하기 위해서 상기 균주를 0.1 및 0.6M NaCl, 20mM Tris-HCl(pH7.0) 용액에 첨가하여 0°C에서 sonication 처리 한 후 단백질의 용해도를 측정하였다. 그 결과, 0.1M NaCl에서는 용해도의 변화가 인정되지 않았으나, 0.6M NaCl 조건 하에서는 sonication 처리 시간이 경과함에 따라 단백질의 용해도가 증

가하는 것으로 나타났으며, 용해된 성분이 증가할수록 Ca-ATPase 활성도 크게 상승하는 결과를 보여, ATPase의 기능을 지니고 있는 단백질은 염용성 단백질인 것으로 사료된다.

이상의 결과를 토대로 현재 유통되고 있는 각종 식품의 총균수를 Ca-ATPase 활성법을 이용하여 측정하였다. 평판배지법과 비교한 결과, 육류 : $R^2 = 0.93$ ($n = 50$), 야채류 : $R^2 = 0.93$ ($n = 262$), 유제품 중의 요구르트 : $R^2 = 0.90$ ($n = 50$), 우유 $R^2 = 0.92$ ($n = 55$)로 강한 상관관계를 나타내었다.

한편, 측정기기의 제작은 상기의 data를 소프트웨어에 입력 시켜 완성하였으며, 1시간에 약 10 샘플 이상을 동시에 측정할 수 있는 기술을 개발하였다.

SUMMARY

I. Title

Development of detection technique of microorganism for production of High Quality Food

II. Objective and Significance of Research

- Development on new detection method of microorganism for production of high quality food
- Development of reaction reagent for measurement of cell number of microorganism
- Development of instrument for measurement of cell number of microorganism

III. Scope

- First year
 1. Biochemical properties and protein isolated from various microorganisms species
 - 1) Isolation of protein from various microorganism species
 - o Isolation of protein from total cell, *Escherichia coli*, *Listeria*, and *Salmonella typhimurium*
 - 2) Composition of microorganism protein
 - o Investigation of protein subunit by SDS-PAGE

- 3) Biochemical property of microorganism protein(enzyme)
 - o Depend on temperature of protein(enzyme)
 - o Depend on pH of protein(enzyme)
 - o Depend on KCl concentration of protein(enzyme)
- 4) Preliminary examination of reaction reagent for measurement of cell number of microorganism
2. Draft and manufacture of simple instrument for measurement of cell number of microorganism
 - 1) Draft of instrument for measurement of cell number of microorganism
 - o Optics technique
 - o Sensor technique
 - o Electron circuit technique
 - o S/W technique

■ Second year

1. Development of reaction reagent from biochemical properties of microorganism protein
 - 1) Development of measuring reagent of product degraded from ATP
 - o Investigation of sensitivity for metal ion
 - 2) Labelling effect of particular protein isolated from various microorganism species
 - o IAEDANS
 - o Monodensylcadaverine
 - o ANS

- 3) Development of reagent from measuring technique of protein content
 - o Application of biuret reagent
 - o Application of microbiuret reagent
2. Development of instrument for measurement of cell number of microorganism – simple channel, fixed form
 - 1) Development of compact instrument for the use of field
 - o Optics part
 - o Sensor technique
 - o Electron circuit technique

■ Third year

1. Field examination and repletion of developed reagent
 - 1) Field examination
 - o Microorganism measurement about various foods in distribution
 - o Measurement of microorganism in milk
 - o Measurement of microorganism in yogurt
 - o Measurement of microorganisms in meats and fishes
 - o Measurement of microorganism in agricultural products
 - o Sensitivity control of reagent for measurement of cell number of microorganism
 - 2) Statistical treatment of data
2. Development of measurement system on microorganism
 - 1) Optics part
 - 2) Sensor technique

- 3) Development of analysis tool
- 4) S/W technique
- 5) System combination
- 6) Verification

IV. Results and Recommendation

Microbial ATPase break down the ATP to ADP and phosphate. It is well known that the cell has almost equal contents of ATP regardless cell type. And lots of rapid method has been developed for determining cell number using this phenomenon. So, we investigated the possibilities of ATPase activity as an indicator of total cell number. *Listeria monocytogenes*(KFRI 00799) and *Vibrio parahaemolyticus*(KCTC 2471) was used as a target microorganism. Ca-ATPase activity was checked by adding higher concentration of ATP. As the total cell number was increased, the total Ca-ATPase activity was also increased. So, it was concluded that Ca-ATPase activity can be used to calculate the total cell number. To find out the properties of ATPase contained 20mM Tris-HCl(pH7.0) 0.1M or 0.6M NaCl was added and solubility was checked. ATPase activity was identified as a salt soluble protein for having higher solubility when 0.6M NaCl was used.

To the based above results, it was measured number of microorganism using Ca-ATPase activity, compare with total plate count. Relationship between Ca-ATPase activity and number of microorganism in foods appeared strong correlation coefficient (meats : $R^2 = 0.93$ (n = 50), vegetables : $R^2 = 0.93$ (n = 262), yoghurt : $R^2 = 0.90$ (n = 50), milk : $R^2 = 0.92$ (n = 55)).

On the other hand, instrument for measurement of cell number of microorganism manufactured to input at software above data and this method(ATPase activity) was able to measurement of 10 samples for one hour.

CONTENTS

SUMMARY.....

Chapter 1. Outline of the research.....

Chapter 2. State-of-the-art

Chapter 3. Scopes and results of the research.....

Section 1. Scopes of the research.....

1. Bacteria strains and collection
2. Measurement of cell number
3. Analysis of protein subunit using SDS-PAGE.....
4. Bacteria treatment.....
5. Measurement of number of microorganism using ATPase activity.....
6. Measurement of protein content.....
7. Labelling of particular protein isolated from various microorganism.....
8. Field examination
9. Measurement of cell number of microorganism in foods

Section 2. Result and discussion.....

■ PI

1. Investigation of reaction reagent for measuring of cell number of microorganism
2. Composition of protein subunit in microorganism

3. Property of reaction reagent
4. Biochemical properties of protein(enzyme)
5. Investigation of protein composition and microorganism properties in foods
6. Sensitivity for mental ion
7. Property of protein in microorganism having ATPase activity
8. Property of protein in germs having ATPase activity
9. Relation between total cell count and protein content
10. Labelling of particular protein and analysis of hydrophobic protein
11. Measurement of cell number of microorganism in foods

■ Co-PI

1. Draft and manufacture of simple instrument for measurement of cell number of microorganism
2. Development of instrument for measurement of cell number of microorganism
3. Development of measurement system on microorganism

Chapter 4. Achievement and contribution to related field

Chapter 5. Application plan of the results

Chapter 6. Technical oversea information collected during research

Chapter 7. Reference.....

목 차

요 약 문.....

제 1 장 연구개발과제의 개요.....

제 2 장 국내외 기술개발 현황.....

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구개발수행 내용

1. 균 분양 및 일반 미생물 채취
2. 총균수 측정
3. SDS-PAGE 분석
4. 미생물 전처리
5. Ca-ATPase 활성을 이용한 미생물 측정
6. 단백질 함량 측정
7. 병원성 미생물로부터 분리한 단백질의 특이적 라벨링
시약 검토
8. 현장적용 시험
9. 각종 식품의 미생물 수 측정

제 2 절 결과 및 고찰(주관)

1. 미생물 측정용 반응시약 예비 검토
2. 미생물 단백질의 subunit 조성
3. 반응시약의 특성 검토
4. 단백질(효소)의 생화학적 특성 검토
5. 식품 미생물의 단백질 조성 및 특성 검토

6. 금속이온에 대한 감수성
7. 미생물 so의 ATPase 활성을 갖는 단백질의 특성
8. 병원성 미생물 내의 ATPase 활성을 갖는 단백질 특성
9. 미생물의 총균수와 단백질 함량
10. 각종 미생물내 단백질의 라벨링 및 소수성 잔기 분석
11. 유통 중의 식품에 대한 미생물 측정

제 2 절 결과 및 고찰(협동)

1. 미생물 측정기기의 설계도 및 1차 간이 측정기기 개발
2. 미생물 측정기기 개발
3. 각종 식품에 대한 미생물의 신속한 측정 시스템 개발

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보

제 7 장 참고문헌

제 1 장 연구개발과제의 개요

고품질 식품 생산을 위한 가장 중요한 것 중의 하나는 식품의 안전성 확보이다. 지금까지 이를 확보하기 위하여 많은 노력을 기울였음에도 불구하고 매년 식중독에 의한 사고 건수는 줄어들고 있지 않고 있으며, 이에 따른 환자수도 200~500명 정도에 달하고 있다. 일반적으로 식품의 안전성은 미생물의 총균수, 및 대장균, 비브리오균, 리스테리아균, 살모넬라균 등과 같은 독성을 지니고 있는 균수(음성, 양성) 등을 측정함으로써 식품의 안전성을 판단하고 있다. 그러나 현재 이와 같은 식품의 안전성을 판단하는 분석방법은 미생물 배지에 배양하여 분석하는 방법으로서 약 3~7일 이상이 소요되고 있으며, 국내의 식품 유통과정의 실태로 볼 때 이미 소비자의 손에 넘어간 후에 미생물의 안전성이 파악되고 있는 실정이다. 실지로 최근에 일어난 단체급식 집단 식중독 사건은 사전에 신속하게 위해 미생물을 검지할 수 있는 기술이 없기 때문이며, 또한 이것 이외에도 알려지지 않은 식중독 사건이 상당수 있을 것으로 생각된다.

1997년부터 1999년의 통계에 의하면 식중독 발생건수가 94건에서 174건으로 늘어나고 있으며, 이와 같은 결과는 생산 또는 유통과정 중 식품의 안전성에 대한 사전 검토가 불가능하며, 또한 소비자에 이르기 전에 신속한 미생물에 대한 체크가 불가능하기 때문인 것으로 사료된다. 따라서 현재와 같은 미생물 분석법이 획기적으로 개선되지 않으면 앞으로도 이와 같은 문제점은 해결되기 어려울 것으로 사료된다.

국내에서 식품의 안전성 확보를 위한 미생물 분석법은 대부분 수입되고 있는 배지에서 3~7일간 배양하는 방법을 채택하고 있으며, 이와 같이 배양하는데 오랜 시간과 분석경비가 많이 소요되는데도 불구하고 분석법을 개선하고 있지 못하는 것은 이외에 다른 분석법이 거의 없는 실

정이기 때문이다.

한편, 식품의 안전성을 확보하기 위한 연구의 일환으로서 본 연구에서는 신속하고 정확한 미생물 분석법을 개발하고자 한다. 즉, 미생물 내에 존재하는 단백질의 생화학적 특성에 관한 정보를 획득한 후 이에 맞는 각각의 분석법을 탐색함으로써 현재 활용되고 있는 분석법 보다 신속하고 정확하게 분석할 수 있을 것으로 사료된다. 또한 실질적으로 총균수에 대한 예비실험의 결과(10샘플/1시간, 측정 가능) 그 가능성이 충분히 시사되었다. 따라서 본 연구에서 보다 자세한 연구가 진행된다면 각종 위해균에 대한 측정이 가능해질 것이며 식품의 안전성 분야에 있어서 필수적으로 연구가 추진되어야 할 것으로 사료된다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

본 연구에서 수행하고자 하는 고품질 식품 생산을 위한 미생물 검지 기술은 미생물에 존재하는 단백질의 생화학적 특성을 이용한 미생물의 분석방법으로서 이와 유사한 연구는 국내외를 막론하고 아직 이루어지고 있지 않다. 그러나 비교적 최근 미생물 분석에 있어서 연구된 내용을 살펴보면 다음과 같다.

■ ATP Bioluminescence assay

살아있는 세포는 대사작용에 이용되는 에너지의 근원인 ATP를 가지고 있으며 식품저장 중 저장기간이 경과함에 따라 오염된 미생물 수가 증가하면 이에 따라 상대적으로 ATP 함량도 증가하므로 ATP 함량을 측정함으로써 오염 미생물의 수를 측정할 수 있는 원리를 이용한 것이다. 이 방법은 north american firefly에서 자연적으로 발생하는 decarboxylation 반응에 기반을 두고 있다.

$$\text{Luciferin} + \text{luciferase} + \text{ATP} \rightarrow (\text{Luciferin-Luciferase-AMP}) + \text{pyrophosphate} \rightarrow \text{Oxyluciferin} + \text{Luciferase} + \text{CO}_2 + \text{AMP} + \text{Light}$$

이 분석법은 비교적 신속하게 측정할 수 있으나, 반응시약이 고가인데다 총균수에 국한되어 있으며, 정확도에서 다소 떨어지기 때문에 활용도가 떨어지는 단점이 있다. 일부 식품업체에서는 현재 사용 중에 있으나 대부분 기존의 표준 한천 평판법을 활용하고 있다.

■ DNA probe를 이용한 PCR법

특정의 DNA를 시험관내에서 대량으로 신속하게 증폭하는 방법을 이용한 것이다. PCR의 구성요소는 Primer set(1, 2), dNTPs, Taq

polymerase로 되어있으며, 측정 원리는 다음과 같다.

primer1 → primer2 → dNTPs → Taq polymerase → Denaturation
→ Annealing → Extension

미생물	유전자의 유래(probe의 종류)
Escherichia	내열성 enterotoxin (ST) 이열성 enterotoxin (LT) 장관장착성인자 (EPEC) 세포침투에 관여하는 인자 (EIEC) 자가양독소 (EHEC)
Salmonella spp	속특이적 DNA
Listeria monocytogenes	리스테리오신
Vibrio cholerae	enterotoxin (O1 및 non O1)
Vibrio parahaemolyticus	내열성 헤모리신
Staphylococcus aureus	enterotoxin A
Salmonella typhi	Vi항원 유전자

그러나 이 측정방법은 균을 동정하는 데에는 신속(24~30시간)하게 처리할 수 있다는 장점을 가지고 있지만, 균수를 측정하는 데에는 어려움이 있으며, 또한 기기 장비 및 반응시약이 고가이며, 어느 정도 전문지식이 있어야 측정 가능한 단점을 가지고 있다.

■ 3M petrifilm에 의한 분석법

본 분석법은 기존의 배지를 개량하여 측정하기에 편리하도록 제조한 것이다. 배지를 만들지 않아도 된다는 장점은 있으나 배양하는데 많은 시간(2일 이상)이 소요되며, 가격이 비싸며, 정확도에서 다소 떨어지는 단점이 있다. petrifilm은 다양한 미생물을 측정할 수 있는 각각의 film이 개발되어 있으며, 전문적인 지식이 없어도 총균수, 대장균, 살모넬라, 리

스테리아 등의 균수를 측정할 수 있다. 현재 국내에서도 사용의 편리성
으로부터 일부 사용되고 있으나 아직까지 본격적인 보급은 이루어지고
있지 않다.

■ 효소면역학적인 방법

대상균이 가지고 있는 특이적인 항원에 대하여 인위적으로 제조된 항
체(균체)를 결합시키고 이러한 결합체에 효소표식인자 및 기질을 반응시
켜 측정기구(ELIS A)등을 이용하여 측정하는 검사법이다. 현재 간이 kit
중에서 이 원리를 이용한 검사 kit가 가장 많으며 방법 및 원리는 다음
과 같다.

단일크론 항체를 matrix에 고정 → 항원항체 결합 → 효소표식인자와
기질을 반응 → 효소 기질반응에 의한 발색반응 → 측정

- 기타

상기의 외에 VIP kit, CliTrak plus, HY-Lite™, Pentan check 25 등
많은 kit가 개발되어 상용화되고 있지만, 대부분 미생물을 동정하는데 사
용되고 있으며, 고가이기 때문에 일반적으로 사용하기에는 어려움이 있
다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 연구개발수행 내용

1. 균 분양 및 일반 미생물 채취

식품 위해의 주요한 원인이 되는 균으로 *Escherichia coli*(KFRI 00174)와 *Staphylococcus aureus*(KFRI 00171), *Vibrio parahaemolyticus*(KCTC 2471), *Listeria*(KFRI 00799), *Bacillus cereus*(KFRI 00437) 및 *Salmonella typhimurium* (KFRI 00191) 등을 선택하였으며, 일반 미생물은 오염된 일정 면적 (10cm×10cm)을 멸균수에 적신 멸균 면봉을 이용하여 채취한 것을 실험에 사용하였다.

2. 총균수 측정

각종 실험에 사용할 미생물을 배양하고 미생물수를 측정하기 위하여 사용한 배지를 Table 1에 나타내었다. 즉, 실험 군주에 해당하는 액체 배지에 각 군주를 12~18시간동안 전 배양하고 이 과정을 2~3번 반복하여 증균 과정을 거친다. 이를 멸균수에 10진법으로 희석하여 멸균된 petri dish에 3반복 이상 무균적으로 분주하고, 각 시험 군주에 알맞은 선택 배지를 사용하여 이들을 무균적 pouring 하여 혼합하였다. 이렇게 혼합한 배지를 무균실에서 고형화 한 후, 37℃에서 48시간동안 배양하여 시료 mL당 cfu를 측정하였다.

3. SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) 분석

실험에 사용하고자 배양한 미생물에 8M urea, 2% SDS, 2% mercaptoethanol, 20mM Tris-HCl (pH 8.8)용액을 첨가한 후 100℃에서 2분간 가열하여 불활성화 시켜 사용하였다. SDS-PAGE는 10%

Table 1. Classification of medium

Pathogens		Culture medium
<i>Escherichia coli</i> (KFRI 00174)	a	EC broth
	b	EMB agar
<i>Staphylococcus aureus</i> (KFRI 00171)	a	Trypical soy broth
	b	Nutrient agar
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (KCTC 2471)	a	Nutrient broth
	b	Nutrient agar
<i>Listeria monocytogenes</i> (KFRI 00799)	a	Listeria enrichment broth
	b	Oxford agar
<i>Bacillus cereus</i> (KFRI 00437)	a	Nutrient broth
	b	Nutrient agar
<i>Salmonella typhimurium</i> (KFRI 00191)	a	Selenite cystine broth
	b	Salmonella shigella agar

polyacrylamide gel을 이용하여 실시하였고, 분자량의 standard marker protein(Sigma. USA)은 M.W. 6,500~205,000 Da을 사용하였다. SDS-PAGE의 염색은 silver staining법을 사용하였다. 즉, 실험이 끝난 gel을 40%의 ethanol과 10% acetic acid의 혼합액에 넣고 30분 동안 fixing하면서 단백질을 고정시키고, 고정된 gel을 30% ethanol과 glutardialdehyde가 혼합된 용액에 넣고 증감시킨다. 이렇게 처리한 gel을 high purity water로 충분히 씻어준 후 silver nitrate solution에 20분간 염색시킨다. 염색 후 gel에 남아있는 silver nitrate solution을 제거하기 위하여 high purity water로 반복하여 씻어준 후, 2.5% sodium carbonate solution에 gel을 넣고 band가 적당히 현상될 때까지 developing 한 후 1.46% EDTA- $\text{Na}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ solution에서 현상반응을 정지하여 염색을 종료한다. Coomassie brilliant blue 염색

은, 0.2% Coomassie brilliant blue R-250과 50% methanol, 9.2% acetic acid 혼합액에 gel을 염색하고, 50% methanol과 9.2% acetic acid가 포함된 탈색액에 탈색한 후, 9.2% acetic acid 용액에서 보존하면서 band를 확인하였다.

4. 미생물의 전처리

미생물 단백질의 특성을 살펴보기 위하여, 각각의 미생물을 얼음물에 담겨진 0.1M NaCl 과 0.6M NaCl buffer에 넣고, Ultrasonic dismembrator(model-100, Fisher scientific, U.S.A.)로 0~18분 동안 처리하였다. 이렇게 처리한 미생물이 포함된 buffer는 4℃에서 12시간 동안 교반하고, 10,000×G에서 20분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 상등액과 침전물을 분리하고, 분리된 미생물을 실험에 사용하였다.

5. Ca-ATPase 활성법을 이용한 미생물의 측정

Ca-ATPase 활성법은 미생물내의 단백질함량으로부터 미생물 수를 측정하기 위해 자체 개발한 것으로 측정방법은 다음과 같다. 측정시약은 5mM CaCl_2 , 0.1M KCl, 25mM Tris-malate buffer(pH 7.0)와 5mM NaN_3 의 반응 혼합액에 1~20mM로 제조된 ATP용액을 첨가하여 제조하였다. 이렇게 제조한 반응 시약에 측정하고자 하는 시료를 혼합하여 25℃에서 15분간 반응시키고, 반응 후 20% Trichloroacetic acid (TCA)를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 반응이 정지된 시료의 일정량을 발색시약에 첨가해 20분간 발색시킨 후 spectrophotometer를 이용하여 640nm에서 측정하여, 반응액의 발색정도에 따라 미생물 오염도를 추정하였다.

6. 단백질 함량 측정

단백질 함량은 Biuret법과 Microbiuret 법을 이용하였고, 미생물 전처리로 원심분리된 상등액(가용성)과 침전물(불용성)의 단백질 양은, 총 미생물 단백질에 대한 상등액과 침전물에 존재하는 단백질의 %로 계산하였다.

7. 병원성 미생물로부터 분리한 단백질의 특이적 라벨링 시약 검토

각종 병원성 미생물에서 단백질로서의 기능을 수행하는 부분에 특이적으로 작용할 것으로 예상되는 IAEDANS와 Monodansylcadaverine(MDC) 그리고 8-anilino-1-naphthalene-sulfonic acid(ANSA)를 사용하여 그 가능성을 검토하고자 하였다. 일정한 농도(0.5mg/mL)로 조절하여 10분간 Ultrasonic dismembrator(model -100, Fisher scientific, U.S.A.)로 처리한 *Staphylococcus aureus*(KFRI 00171)에 균 농도의 0.1%가 되도록 MDC를 첨가하고 0.01%, 0.1%의 TGase를 가한 후 30, 40 및 50℃에서 1시간동안 반응시킨다. 이렇게 반응시킨 시료에 8M urea, 2% SDS, 2% mercaptoethanol, 20mM Tris-HCl (pH 8.8)용액을 첨가하고 100℃에서 2분간 가열한 후, SDS-PAGE를 통해 라벨링 시약의 작용을 검토하였다.

8. 현장 적용시험

실험에 사용한 각종 식품은 육류, 어패류, 야채류, 우유 및 유제품 등을 현장에서 채취하여 사용하였으며, 육류는 쇠고기 외 2종, 어패류는 생선 외 10종, 야채류는 배추 외 23종, 우유 및 유제품은 종류에 따라 각각 5종씩 선택하여 사용하였다. 시료의 종류는 Table 1과 같다. 같은 시료를 여러 3회 이상 반복 실험하였고, 신선제품의 경우, 냉장 저장과 상온 저장을 통하여 식품의 상태를 변화시킨 후 실험에 사용하였다.

Table. 1. 실험에 사용한 식품의 종류

분 류	종 류
육 류	쇠고기, 돼지고기, 닭고기
어패류	생태, 우럭, 삼치, 고등어, 연어, 오징어, 꽁치, 우렁, 갈치, 가자미, 대구
야채류	비름나물, 돌나물, 브로콜리, 상추, 미나리, 꼬마당근, 쑥갓, 콩나물, 마늘, 배추, 양배추, 새싹채소, 부추, 두릅, 파, 당근, 파프리카, 시금치, 깻잎, 청경채, 얼갈이배추, 양파, 오이, 냉이
우유 및 유제품	액상요쿠르트(3), 호상요쿠르트(2), 우유(5)

9. 각종 식품의 미생물 수 측정

각종 식품을 일정량 취해 stomacher bag에 담고, 식품의 10배가 되는 멸균 증류수를 첨가한 후 stomacher에서 1분 동안 처리하였다. 이렇게 처리한 시료를 10진법으로 희석하여 멸균된 petri dish에 3반복 분주하고 plate count agar를 무균적으로 접종하여 pouring 한 후 혼합하였다. 이렇게 고형화한 plate를 37℃에서 72시간동안 배양하여 mL당 cfu를 측정하였다.

제 2 절 결과 및 고찰 (주관)

1. 미생물 측정용 반응시약 예비 검토

미생물내에는 ATP가 존재하며 미생물이 활동하는데 필요한 에너지는 다른 생물과 마찬가지로 ATP가 분해될 때 생성되는 에너지를 이용할 것으로 생각된다. 따라서 미생물내에는 ATP를 분해하는 ATPase가 존재할 것으로 사료되며, 이를 전제로한 반응시약을 검토하였다.

시약의 조성은 5mM CaCl_2 , 0.1M KCl, 25mM Tris-malate buffer(pH 7.0)와 5mM NaN_3 의 반응 혼합액에 1~20mM로 제조된 ATP용액을 첨가하여 제조하였다. 이렇게 제조한 반응 시약에 측정하고자 하는 시료를 혼합하여 25℃에서 15분간 반응시키고, 반응 후 20% Trichloroacetic acid (TCA)를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 반응이 정지된 시료의 일정량을 발색시약에 첨가해 20분간 발색시킨 후 spectrophotometer를 이용하여 640nm에서 측정하여, 반응액의 발색정도에 따라 미생물수를 추정하였다.

실험 결과 시료의 측정 시간은 총 35분으로, 기존에 사용하던 평판 배양법이 48시간 이상 소요되는 것에 비해 시간이 획기적으로 단축되었으며, 이로 인해 식품 안전성의 가장 중요한 요소인 신속성을 해결할 수 있는 방법으로서의 가능성을 시사하였다.

2. 미생물의 subunit 조성

개발한 시약이 반응하고 있는 미생물의 단백질(효소) 부분 존재여부를 파악하기 위하여 각종 미생물의 SDS-PAGE 패턴을 Fig. 1에 나타내었다. 미생물은 그 종류에 따라 특이적으로 나타나는 band를

볼 수 있었는데, 실험에 사용한 모든 균주에서 분자량이 약 9.7만~3.6만 사이에 상당하는 성분들이 주로 검출되었으며 특히, 분자량이 약 3.6만에 해당하는 band가 뚜렷이 관찰되었다. 일반미생물(2)의 경우에는 분자량이 약 20만에 해당하는 band가 검출되었으며 약 2.0만 이하의 저분자에서도 여러 개의 미량 성분들이 검출되었다. *Escherichia coli*(3)의 경우에는 분자량 4.5만에 해당하는 성분이 뚜렷이 검출되었고, 약 2.0만 이하의 저분자에 해당하는 성분은 비교적 적게 나타났다. *Staphylococcus aureus*(4)의 경우에는 분자량이 약 20만에 해당하는 band가 상당량 검출되었고, 다른 균주에 비해 고분자에 해당하는 band가 뚜렷이 관찰되었다. 이상의 결과로부터 미생물의 종류에 따라 subunit 성분에 있어서 차이를 확인 할 수 있었고, 이런 성분들이 자체 개발한 시약과 반응하는 기작에 대해서는 추후 검토할 예정이다.

3. 반응 시약의 특성 검토

1) 반응 시간에 따른 ATPase 활성의 변화

제조한 ATPase 활성 반응시약을 첨가한 후 반응시간에 따른 ATPase 활성의 변화를 Fig 2에 나타내었다. ATPase 활성은 반응시간과 함께 급격히 증가하는 경향을 보였으며, 반응 10분 후에 피크에 도달하였다. 그 이후 180분까지 활성의 변화를 관찰하였지만, 활성의 변화는 피크에 도달한 후 큰 변화가 인정되지 않았다. 따라서

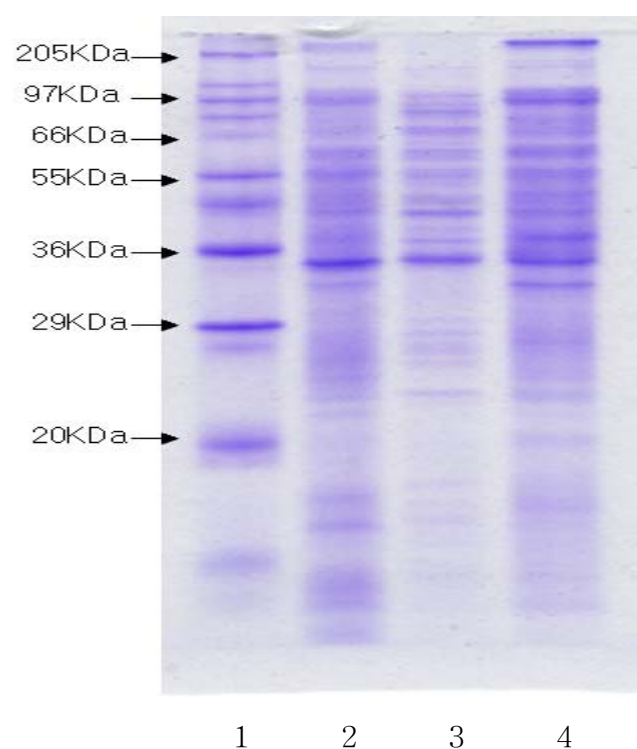


Fig.1. SDS-PAGE patterns of microorganism protein

1 : Standard marker

2 : Total colony

3 : *Escherichia coli* (KFRI 00174)

4 : *Staphylococcus aureus* (KFRI 00171)

반응 시약의 최적 반응 시간은 10분 이상인 것으로 나타났으며, 본 연구를 앞으로 진행함에 있어서는 충분한 반응조건인 15분으로 고정하는 것이 적합할 것으로 사료되었다.

2) 반응 시약의 안정성 검토

저장 기간에 따른 시약의 안전성에 대해 검토하여 Fig. 3에 나타내었다. 반응 시약은 각각 1차 증류수와 3차 증류수로 제조하고, 제조한 시약을 test tube에 일정량 분주하여 25℃에 60일간 저장하면서 시약의 안정성을 측정하였다. 저장 기간에 따른 반응 시약의 변화를 살펴본 결과, 1차 증류수와 3차 증류수로 제조한 시약의 사이에서 저장 9일째 조금씩 차이를 보이기 시작하였고 저장 60일째에는 3차 증류수로 제조한 시약에 비해 1차 증류수로 제조한 반응 시약이 2.02배 높은 값을 나타내었으며, 저장 기간에 따라 1차 증류수로 제조한 반응 시약의 안전성이 더 떨어지는 결과를 나타내었다. 따라서 시약을 제조함에 있어서 오염되지 않은 순수한 용매를 이용하는 것이 반응 시약의 안전성을 좌우하는 중요한 요소임을 확인하였다.

한편, 저장온도에 따른 반응시약의 안정성(data 생략)에 대해서도 검토하였으며, 온도가 낮을수록 저장성이 우수한 것으로 나타났다.

4. 단백질(효소)의 생화학적 특성 조사

미생물의 균수를 측정하는데 있어서 ATPase 활성법은 반응온도, pH 및 이온강도에 의해 영향을 미칠 수 있다. 따라서, ATPase 활성에 미치는 이들의 영향을 검토함으로서 최적 환경조건을 설정하고자 하였다.

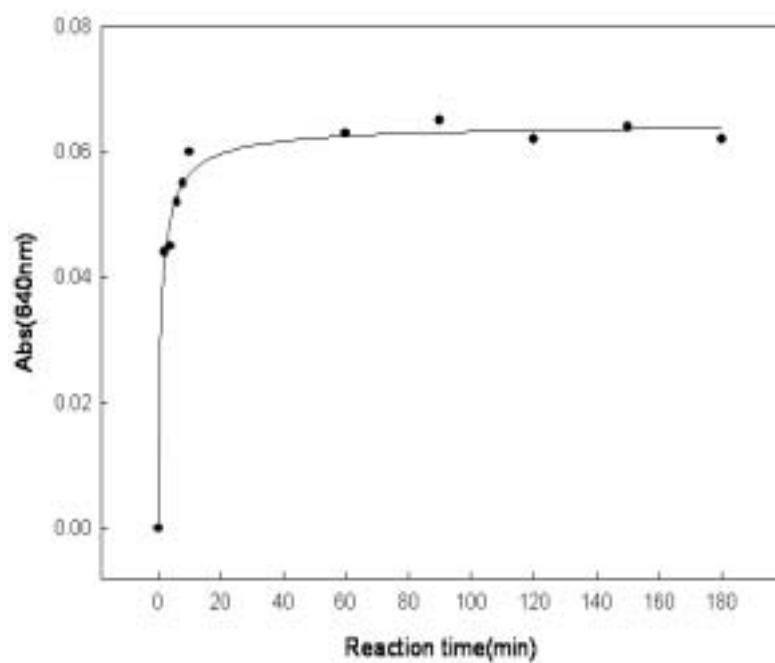


Fig. 2. Depend on reaction time for ATPase activity of microorganism

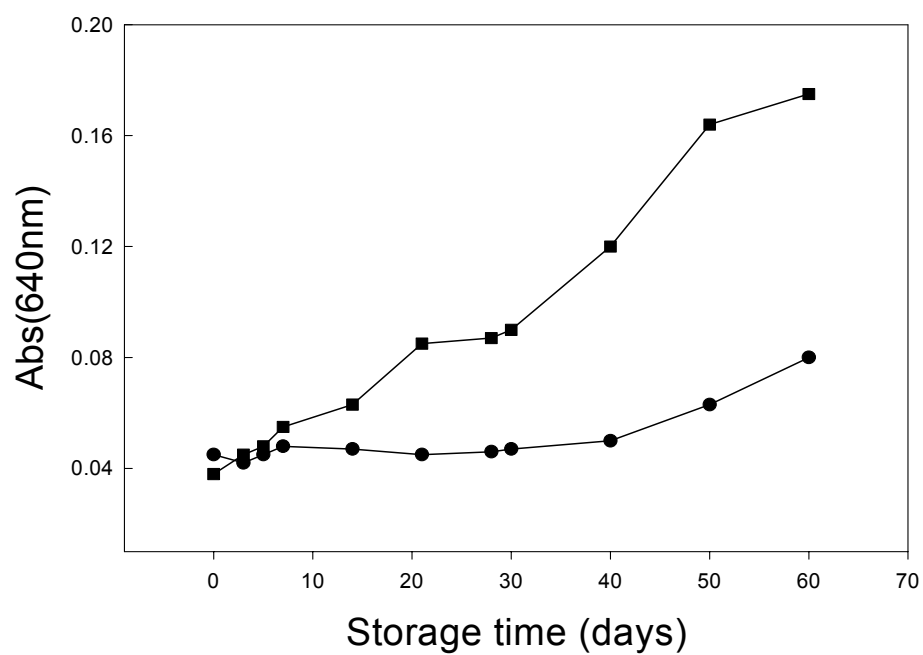


Fig 3. Stability of reaction reagent with storage period at room temperature.

■ : Distilled water ● : High purity distilled water

1) 단백질(효소)의 온도 의존성

Fig. 4에는 미생물의 ATPase 활성화에 미치는 영향을 검토하여 그 결과를 제시하였다. 일정 농도로 조절된 일반 미생물(1.2×10^6)을 반응 시약에 혼합한 후, 반응온도를 $4 \sim 70^\circ\text{C}$ 로 조절하여 반응한 후 반응온도에 따른 ATPase 활성을 검토한 결과 반응온도가 높아질수록 급격히 증가하는 경향을 나타내었으며, 10°C 이하에서는 그 반응정도가 미약하여 판단의 기준이 되기에는 적절하지 않다고 사료되었다. 특히 25°C 부근에서 미생물 유래 단백질과 자체 개발한 시약의 반응이 일어나는데, 이는 기존 평판 배양법으로 배양하던 온도보다 낮은 온도에서 반응이 가능한 것으로, 실험적으로 상온으로 분류되는 온도에서 측정할 수 있음을 보였다.

한편, 본 연구에서는 온도가 상승할수록 급격한 ATPase 활성의 상승을 보여주었는데 ATP는 일정 이상의 높은 온도에 의해서도 분해되는 특성을 지니고 있는 것으로 알려져 있으므로 고온에 의한 ATP의 분해가 일어난 것으로 사료되었다.

2) 단백질(효소)의 pH 의존성

미생물의 ATPase 활성화에 미치는 pH의 영향을 검토하여 Fig. 5에 결과를 제시하였다. 반응 시약의 pH를 $4.0 \sim 10.0$ 으로 조절하여 여기에 약 1.2×10^6 정도의 균수를 접종하여 반응시킨 결과 pH 7.0의 중성 부근에서 가장 높은 값을 나타냈으며, 산성 또는 알칼리 쪽으로 치우칠수록 ATPase 활성은 낮게 나타났다. 따라서, 이상의 결과로부터 ATPase 활성의 최적 pH 조건은 약 7.0 부근인 것으로 판단되었다.

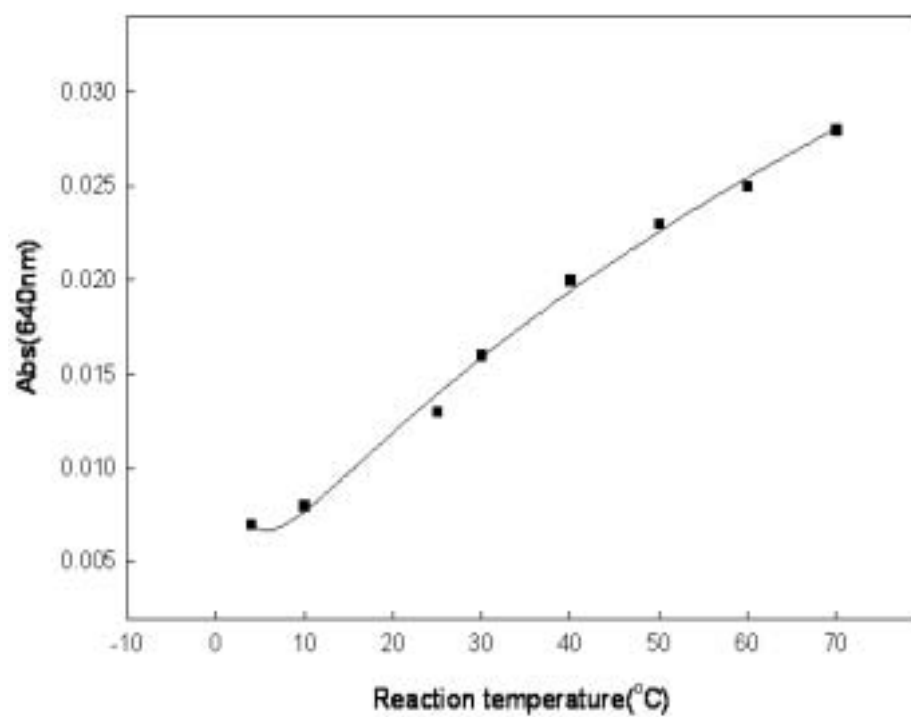


Fig. 4. Depend on reaction temperatures for ATPase activity of microorganism.

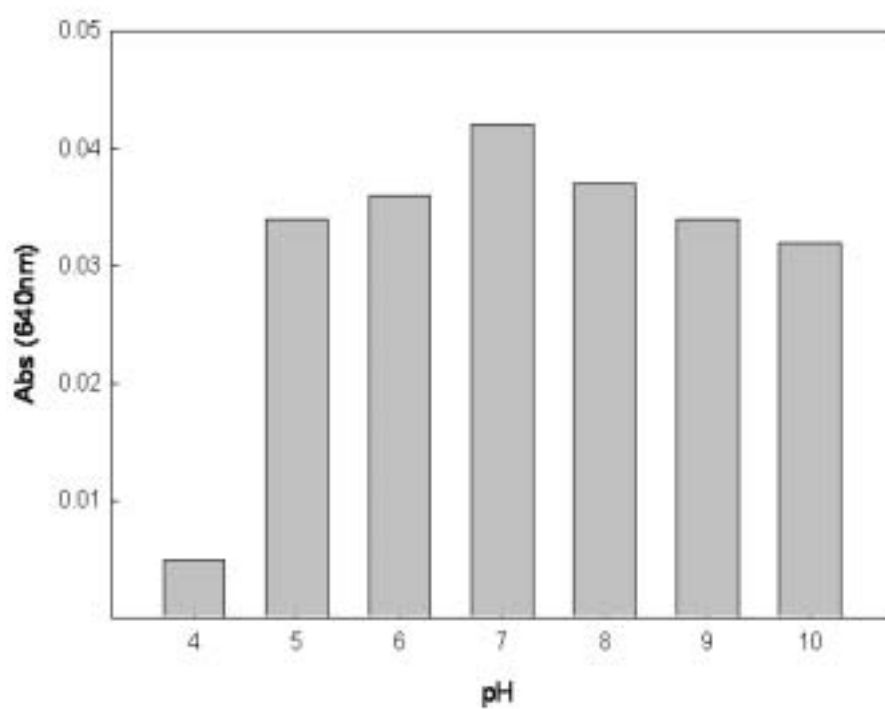


Fig. 5. Depend on pH for ATPase activity of microorganism

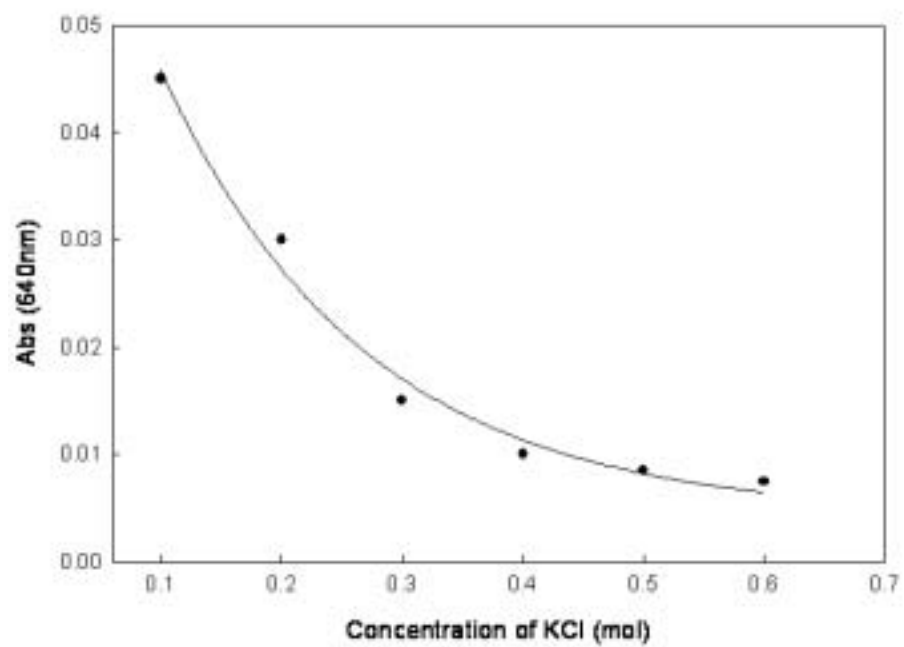


Fig. 6. Depend on KCl concentration for ATPase activity of microorganism.

3) 단백질(효소)의 염(KCl)농도 의존성

미생물의 ATPase 활성에 미치는 KCl농도의 영향은(Fig. 6) 개발된 시약의 KCl농도를 0.1~0.6M의 범위로 조절하여 여기에 일반 미생물(1.2×10^6)을 접종한 후 반응정도를 살펴보았다. 이 결과에 의하면 KCl의 농도가 높을수록 ATPase 활성은 낮게 나타나는 경향을 보였으며, 0.1~0.4M까지는 직선적으로 감소하다가 그 이후에는 완만한 감소폭을 보였다. 따라서, ATPase 활성의 KCl 농도 의존성은 생물의 생리적인 염농도인 0.1M이 최적 조건인 것으로 나타났다.

5. 식품 미생물의 단백질 조성 및 특성 검토

1) 일반 미생물

식품에 존재할 수 있는 각종 유해한 미생물의 측정 가능성을 살펴보기 위하여 대기 중에서 흔히 접할 수 있는 일반 미생물을 채취하여 미생물내 단백질 조성 및 생화학적인 특성을 검토하였다.

먼저 멸균된 면봉에 멸균수를 적신 후, 일정 공간(10cm×10cm)내에 존재하는 미생물을 채취하여 평판배양법(pour plate method)에 의해 미생물 수를 측정하였다. 또한 같은 샘플을 이용하여 개발된 ATPase 활성 분석시약에 미생물내 단백질을 첨가하여 ATPase 활성을 측정한 후 상호간의 관계를 비교하여 그 상관관계를 산출하였다. 기존 평판배양법으로 미생물의 수를 측정한 값과 미생물 유래 단백질의 ATPase 활성 값을 비교한 결과(Fig. 7) 미생물 수가 많아질수록 미생물내 단백질의 ATPase 활성값이 높게 나타나 상관관계가 인정되었다. 미생물학적인 측면에서 식품의 안전성을 평가하는데 중요한 요소는 미생물의 오염도를 신속하고 정확하게 측정하는데 있다. 따라서 자체 개발된 미생물 유래 단백질의 ATPase 활성법은 기존의

방법에 비해 신속하고, 상관관계도 높은 것으로 나타나 평판배양법의 대체로 사용 가능할 것으로 사료된다.

개발한 시약과 반응하고 있는 미생물 유래 단백질(효소)을 파악하기 위하여 배양한 일반 미생물을 십진법에 의해 농도별로 조절한 후 SDS-PAGE를 실시하였다(Fig. 8).

일반 미생물의 농도에 따른 subunit을 살펴본 결과, 다량의 band들이 검출되었으며 이들의 주요성분은 분자량 약 3.6만 및 2.9만에 상당하는 것으로 나타났다. 또한 미생물 수가 적을수록 band가 희미하게 형성되는 것을 볼 수 있었으며, 약 3.6만 부근과 2.9만 부근의 분자량은 미생물 수가 10^3 정도의 낮은 농도의 미생물에서도 검출되어, 이와 같은 성분이 ATPase 활성을 유발시키는 주요 단백질인 것으로 추정하였다. 이들의 메카니즘적인 것과 관련하여 추후 좀더 자세한 연구가 필요할 것으로 사료되었다.

2) 병원성 미생물

최근 우리나라의 식중독 발생 경향은 매년 그 발생건수가 증가하고 있으며 원인식품 및 병원체가 다양해지고 있다. 원인체별 식중독의 발생은 *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* 및 *Vibrio parahaemolyticus* 등에 의한 원인이 가장 많고, *Escherichia coli*의 경우에는 분변에 의한 오염 유무가 지표가 되며, 수질검사 등에 종종 응용되는 수단으로 이용되고 있다.

따라서 이번 실험에 사용되는 균주는 식중독의 원인이 되는

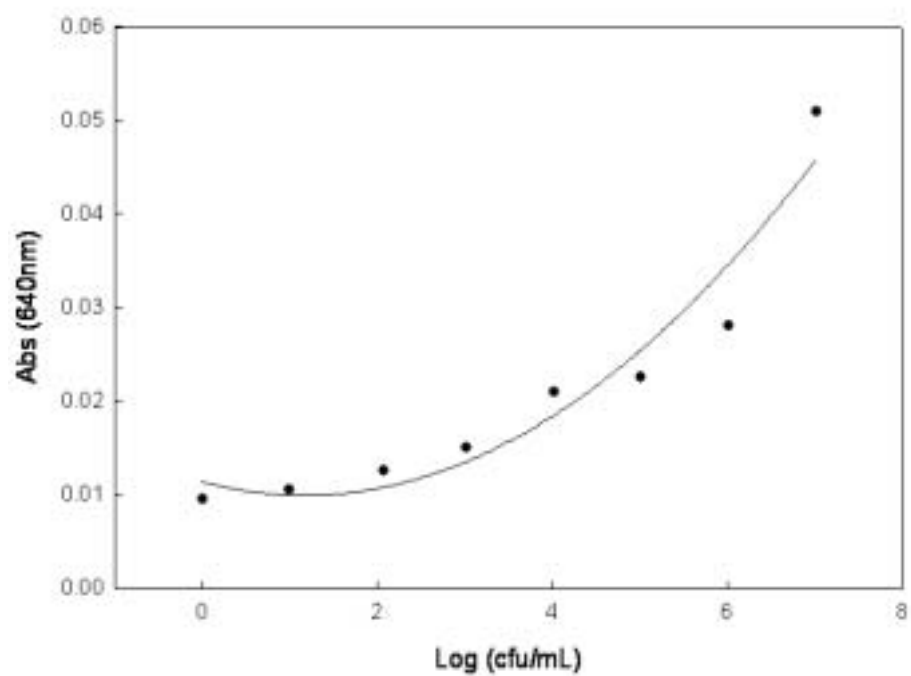


Fig. 7. Relationship between total colony count using total plate count method and ATPase activity of protein in microorganism.

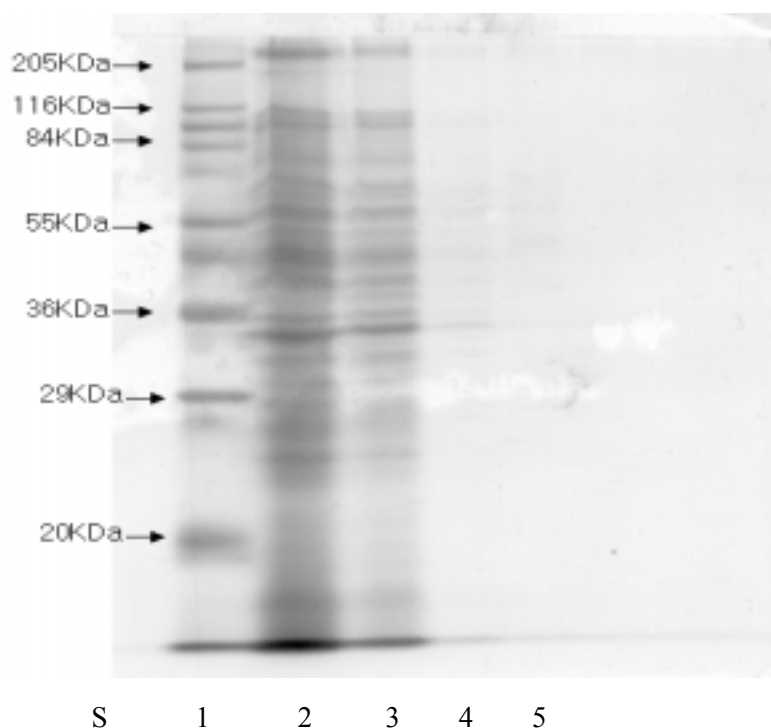


Fig. 8. SDS-PAGE patterns of protein in total colony.

S : standard marker 1 : 1.1×10^7 cfu/mL
 2 : 1.1×10^6 cfu/mL 3 : 1.1×10^5 cfu/mL
 4 : 1.1×10^4 cfu/mL 5 : 1.1×10^3 cfu/mL

*Staphylococcus aureus*와 *Escherichia coli*를 분양 받아 특정 배지에서 배양한 후, 동일한 균의 단백질을 ATPase 활성 측정용 시약에 첨가하여 측정한 후 상호관계를 비교 검토하였다.

Fig. 9 및 11에 나타낸바와 같이 기존 평판배양법으로 미생물의 수를 측정한 값과 미생물 유래 단백질의 ATPase 활성 값을 비교한 결과, *Staphylococcus aureus*와 *Escherichia coli* 모두 미생물의 농도가 높아질수록 미생물 유래 단백질의 반응에 의한 발색도가 증가하는 경향을 보였으며, 일반 미생물을 대상으로 실험한 결과와 유사한 경향을 나타내었다.

이상의 결과로부터 ATPase 활성은 기본적으로 균의 종류와 관계없이 일어나는 것으로 사료되었으며, 각종 미생물 수를 측정함에 있어서 시간이 많이 소요되는 기존의 방법을 짧은 시간내에 간단히 측정할 수 있는 새로운 방법이 될 것으로 판단되었다. 특히, 최근 식품의 안정성을 확보하기 위한 일환으로서 HACCP가 도입되고 있으며, 그 중 미생물에 대한 검사가 한층 강화되고 있는 실정이다. 그러나 현장에서는 기존의 미생물 측정법은 시간이 많이 소요될 뿐만 아니라 번거로움으로 인하여 미생물을 측정하는데 많은 어려움을 겪고 있다. 따라서, 현장에서 측정 가능한 간편하고 신속한 미생물 측정법의 개발이 요구되고 있으며, 본 연구에서 개발하고자 하는 ATPase 활성법은 현재 직면하고 있는 문제점들을 해결해줄 것으로 사료된다.

개발한 시약이 반응하고 있는 미생물 유래 단백질을 파악하기 위하여 배양한 *Staphylococcus aureus*와 *Escherichia coli*를 십진법에

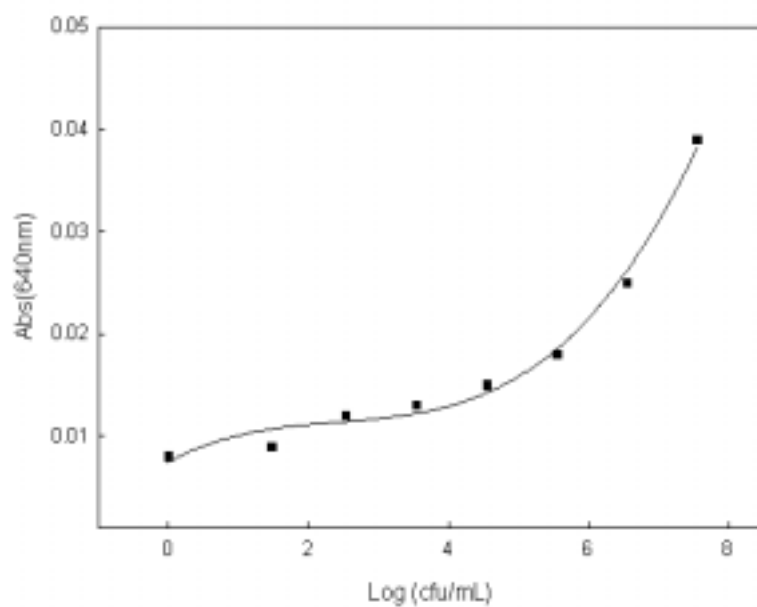


Fig. 9. Relationship between number of *Escherochia coli* (KFRI 00174) and ATPase activity of protein in *Escherochia coli*.

의해 농도별로 조절한 후 SDS-PAGE를 실시하였다(Fig. 10 및 12).

각종 미생물의 농도에 따른 subunit을 살펴본 결과 일반 미생물에서의 결과와 마찬가지로 농도가 낮아질수록 band가 희미하게 형성되는 것을 볼 수 있었다. *Escherichia coli*의 경우, 약 2.9만 부근의 분자량은 농도가 낮은 미생물에서도 미세하게 관찰되었고, 그 외 약 5.5만 부근의 분자량에서도 band가 발견되어 미생물 유래 단백질의 존재를 파악할 수 있었다. 또한 *Staphylococcus aureus*의 경우 미생물 유래 단백질 band는 주로 약 6.5만에서 2.0만사이의 분자량에 집중되어 있는 것을 볼 수 있었고, 낮은 농도의 미생물에서도 아주 미세한 양이 관찰되었다.

6. 금속이온에 대한 감수성

앞서 제시한 미생물 측정용 반응시약은 단백질의 효소학적 특성을 이용한 것으로서 calcium 이온에 의해 활성화가 촉진되는 원리를 이용한 것이다. 그러나 ATPase 활성화는 Ca 뿐만이 아니라 Mg 등의 금속 이온에도 활성화가 일어나는 것으로 알려져 있으므로, Ca 이외의 금속 이온에 대해서도 활성화를 검토하였다. 또한, 비교를 위하여 금속이온을 제거하였을 때의 ATPase 활성화(EDTA-ATPase)에 대해서도 검토하였다. 각각의 농도로 조절한 일반 미생물에 Ca, Mg 및 EDTA-ATPase를 측정한 결과는 Fig. 13과 같다. 이 결과에 의하면 미생물의 총균수가 높을수록 각각의 ATPase 활성이 증가하였으며, Mg-ATPase 활성이 가장 높게 나타났다. 다음으로 Mg-ATPase 활성과 큰 차이는 없었지만 Ca-ATPase 활성이 높게 나타났으며, EDTA-ATPase 활성이 가장 낮게 나타났다.

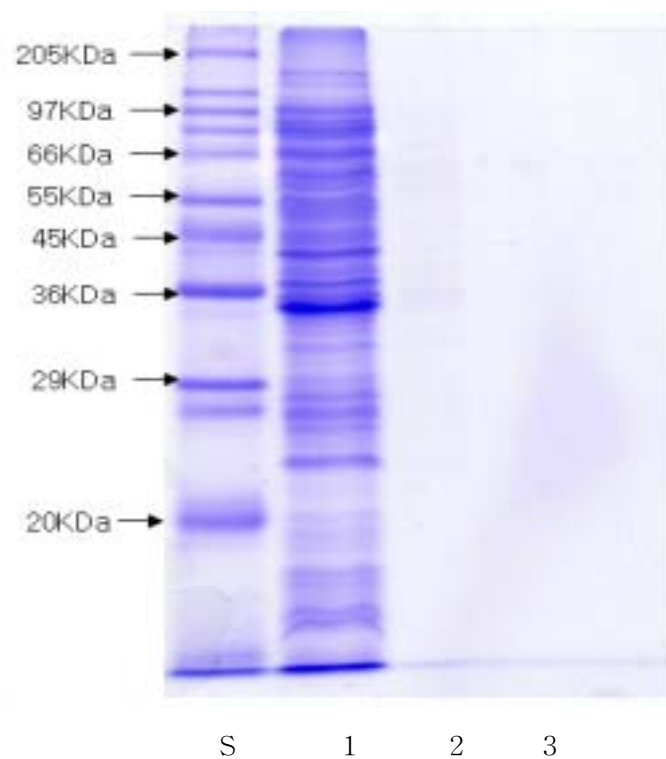


Fig. 10. SDS-PAGE patterns of protein in *Escherichia coli* (KFRI 00174).

S : standard marker 1 : 3.6×10^8 cfu/mL
 2 : 3.6×10^7 cfu/mL 3 : 3.6×10^6 cfu/mL

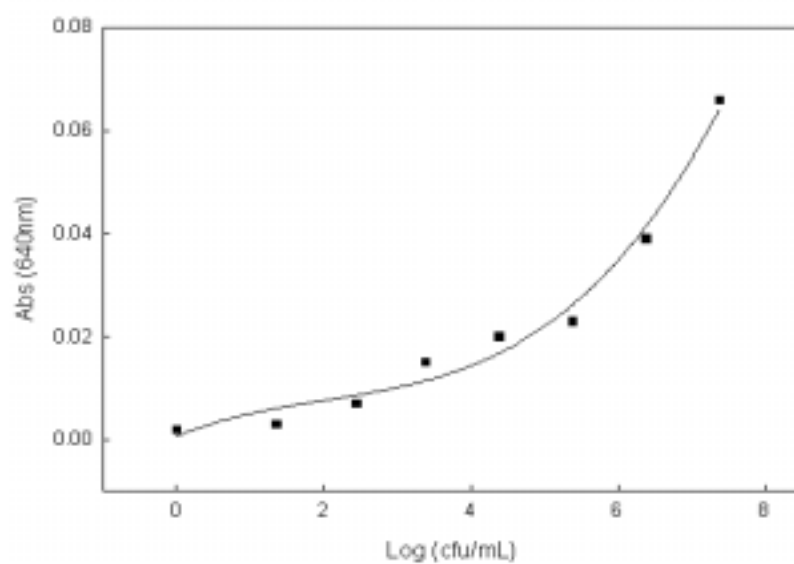


Fig. 11. Relationip between number of *Staphylococcus aureus*(KFRI 00171) and ATPase ativity of protein in *Staphylococcus aureus*.

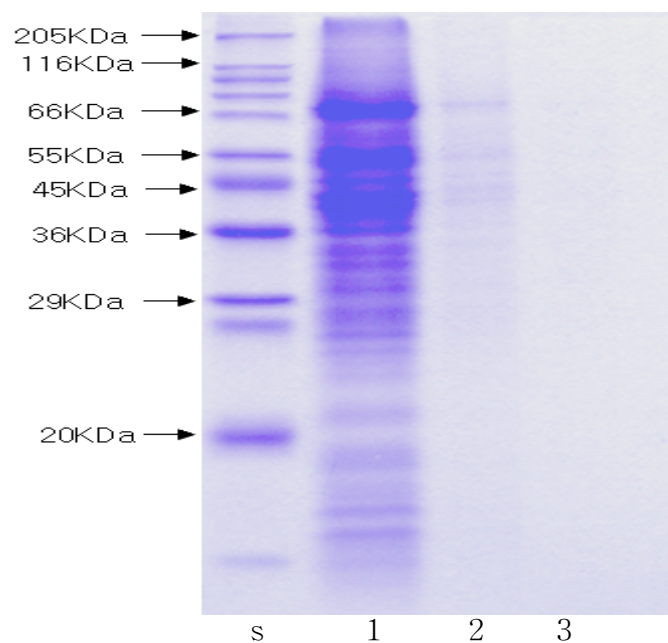


Fig. 12. SDS-PAGE patterns of protein in *Staphylococcus aureus* (KFRI 00171).

s : standard marker 1 : 2.4×10^8 cfu/mL
 2 : 2.4×10^7 cfu/mL 3 : 2.4×10^6 cfu/mL

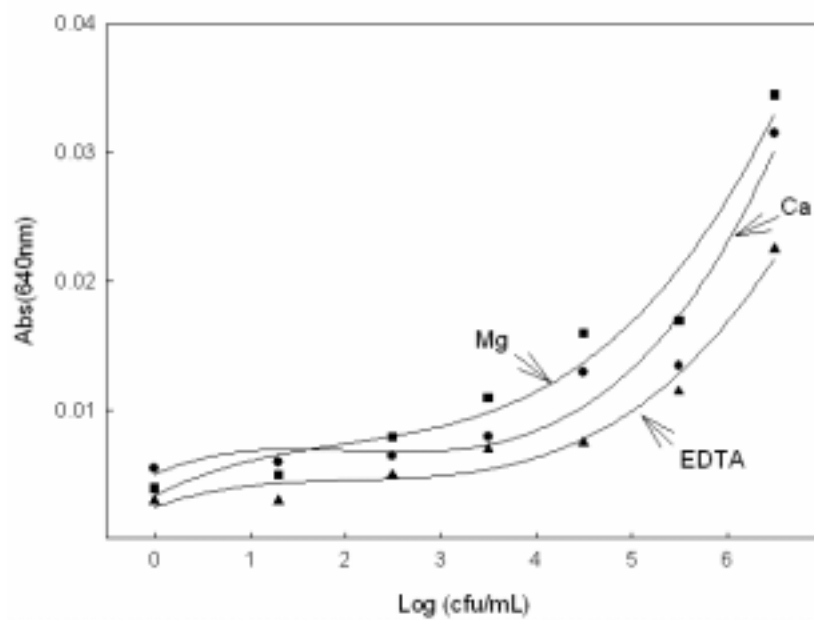


Fig. 13. Effects of Ca, Ma and EDTA on ATPase activity of microorganism.

이상의 결과로부터 ATPase 활성은 Ca 뿐만이 아니라 Mg에 의해서도 활성화가 일어나는 것으로 판명되었으며, Mg을 첨가한 미생물의 총균수 측정용 반응시약에 충분히 이용할 수 있을 것으로 사료되었다.

7. 미생물내의 ATPase 활성을 갖는 단백질의 특성

제 6항까지는 미생물의 균수를 신속하게 측정하고자 미생물내 존재하는 ATPase의 활성을 이용하였으며, 또한 여기에 맞는 시약을 개발하기 위하여 pH, 온도, 염농도, 금속이온 등의 여러 방면에서 검토하였다. 그 결과 pH 7.0, 25℃, 0.1M KCl, Ca 그리고 Mg의 존재하에서 활성이 인정되었으며, 미생물을 신속하게 측정할 수 있는 기술의 발판을 마련하였다. 다음은 미생물의 단백질 중 ATPase 기능을 갖고 있는 것은 어떠한 단백질인지에 대하여 검토하였다.

일반 미생물을 각각 0.1M 및 0.6M NaCl, 20mM Tris-HCl buffer(pH 7.0)에 첨가하여 일정 농도로 조절한 후 미생물내 단백질의 용이한 분리를 위하여 초음파기를 이용하여 ice bath 상에서 1분 간격으로 15분간 초음파 처리 하였다. 이렇게 처리한 시료를 4℃에서 12시간동안 stirring 하고 10,000 × g에서 20분간 원심분리한 후 상등액 중의 단백질 농도를 측정하여 용해도를 산출하였다(Fig. 14 및 15). Fig. 2에 제시한 0.6M NaCl의 조건하에서의 용해도는 초음파 처리시간의 경과와 함께 증가하는 것으로 나타났으며, 초음파 처리 10분 후에 최대값을 나타내었다. 또한 초음파 처리를 하지 않고 12시간 동안 0.6M NaCl로만 처리한 것은 수 %의 용해도만을 나타내고 있어 미생물의 cell을 초음파기로 파괴하였을 때 단백질의 용출이 쉽게 일어나는 것으로 나타났다.

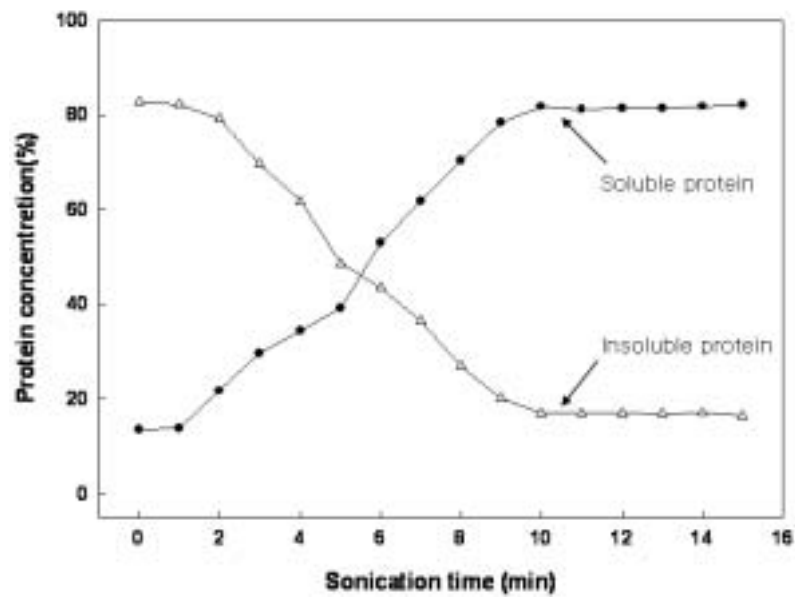


Fig. 14. Changes of soluble and insoluble protein of total colony 0.6M NaCl solution treated by ultrasonication.

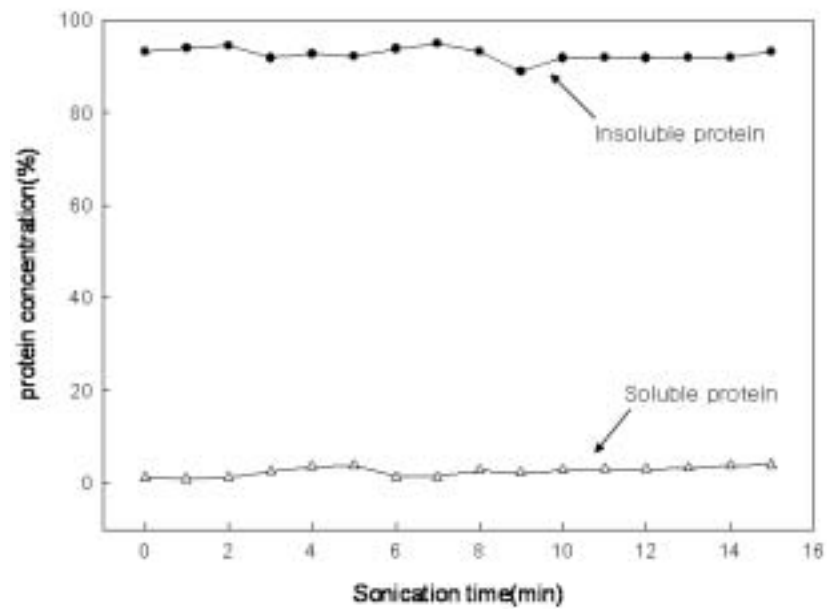


Fig. 15. Changes of soluble and insoluble protein of total colony in 0.1M NaCl solution treated by ultrasonication.

Fig. 15에는 0.1M NaCl 용액에서 초음파 처리하였을 때의 용해도를 나타내었다. 본 결과에서는 초음파 처리 시간에 관계없이 큰 변화를 보이지 않았다. 즉, 초음파기로 cell을 파괴하였음에도 불구하고 상등액 중에 단백질의 용출은 거의 일어나지 않았으며 0.1M NaCl의 염농도에서는 용해되지 않는 것으로 나타났다. 따라서, 미생물 중의 단백질은 대부분 염용성 단백질인 것으로 사료되었다.

이상의 결과를 확인하기 위하여 0.6 및 0.1M NaCl에 대한 가용화 성분을 SDS-PAGE로 검토하여 Fig.16 및 17에 제시하였다. Fig. 16에 제시한 0.6M NaCl 공존하의 미생물을 초음파 처리를 하면 초음파 처리시간의 경과와 함께 0.6M NaCl에 용출되는 단백질의 subunit 성분이 다량으로 검출되는 경향을 나타내었다. 검출되는 주요 성분은 겔의 최상단에서 관찰되는 고분자 성분과 90~60kDa에 해당하는 성분들이 관찰되었으며, 그 외에 마이너 성분으로서 분자량 45kDa 이하의 소량의 성분들이 다수 검출되었다.

한편, 0.1M NaCl 공존하의 미생물을 sonication 처리를 하면 분자량 66kDa에 해당하는 성분이 일부 용출되었을 뿐 이외의 다른 성분의 용출은 거의 관찰되지 않았다(Fig. 17).

이상의 결과로부터 일반 미생물은 대부분 염용성 단백질인 것으로 판명되었으며 또한 이들 염용성 단백질은 cell을 파괴하였을 때 보다 용의하게 용출되는 것으로 사료되었다.

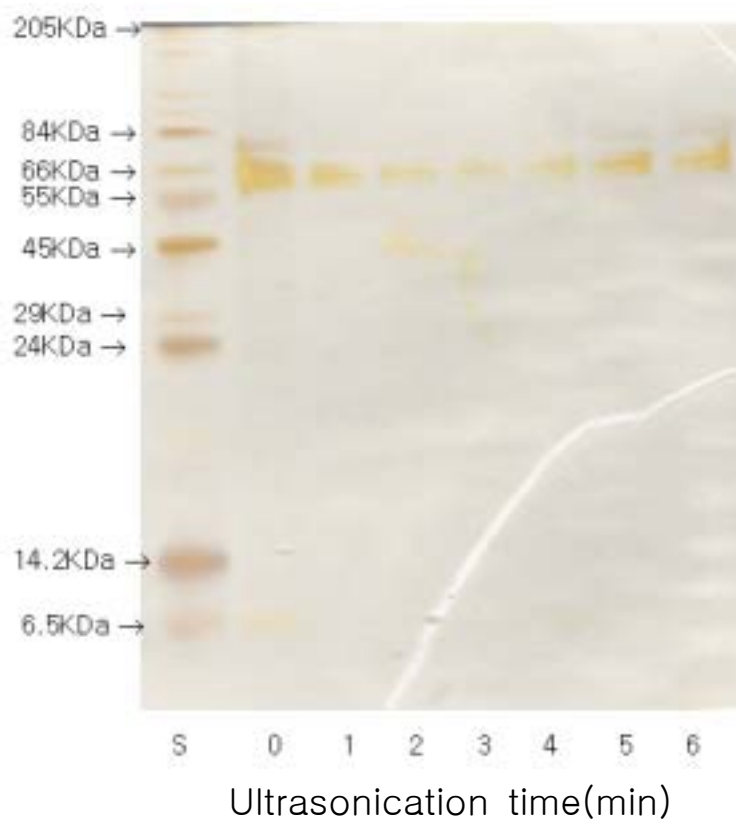


Fig. 16. SDS-PAGE patterns of soluble protein of microorganism in 0.6M NaCl solution treated by ultrasonication.

S : Standard maker

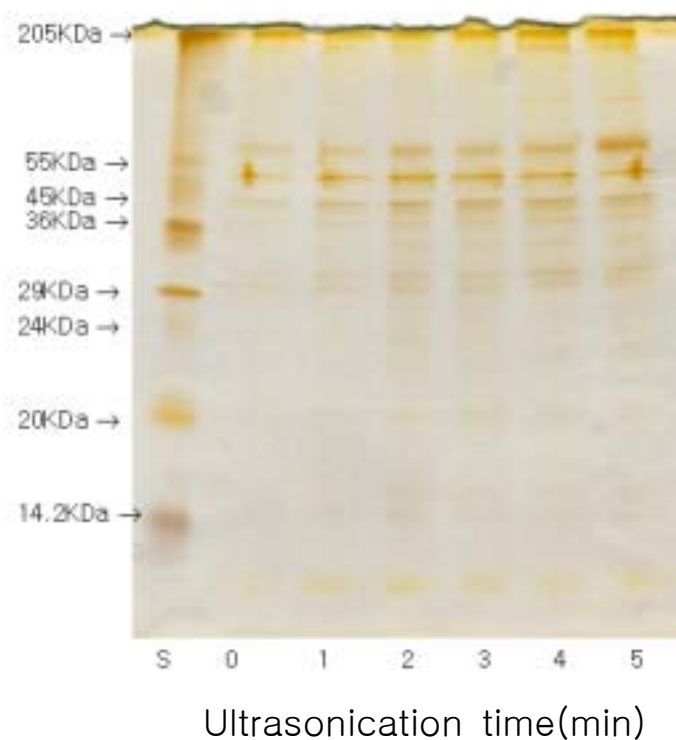


Fig. 17. SDS-PAGE patterns of soluble protein of microorganism in 0.1M NaCl solution treated by ultrasonication.

S : Standard maker

다음은 미생물내 단백질의 Ca-ATPase 활성을 발현하는 효소학적 기능을 지닌 단백질을 알아보기 위하여 0.6M NaCl에 대한 가용성 및 불용성 성분을 분리한 후 각각 Ca-ATPase 활성을 측정하였다. Fig. 18에는 0.6M NaCl에 대한 가용화 성분 및 불용화 성분의 Ca-ATPase 활성을 측정한 결과이다. 이 결과에 의하면 가용화 성분이 증가할수록 Ca-ATPase 활성은 증가하였으며, 상대적으로 불용화 성분이 감소할수록 Ca-ATPase 활성은 감소하였다. 즉, 이와 같은 경향은 0.6M NaCl에 의하여 가용화가 일어나면 효소학적 특성을 지닌 단백질이 대부분 가용화 성분 쪽으로 이전되었기 때문인 것으로 사료되었다. 일반 미생물의 경우 cell이 파괴가 되지 않으면 0.6M NaCl에 대하여 가용화가 용의하게 일어나지 않으며 이때는 가용화 성분의 Ca-ATPase 활성이 매우 낮았다. 따라서, 이상의 결과로부터 ATPase 기능을 지니고 있는 성분은 미생물의 염용성 단백질 중에 포함되어 있을 것으로 사료되었다.

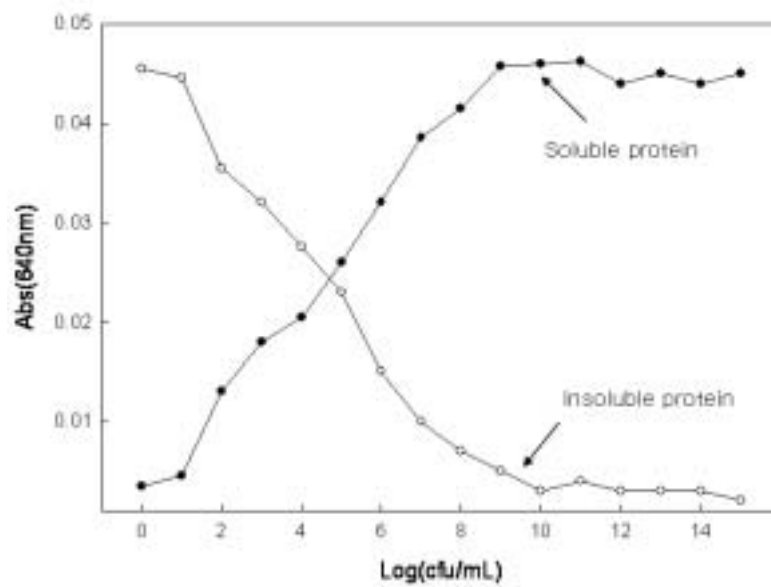


Fig. 18. Ca-ATPase activity of soluble and insoluble protein of microorganism in 0.6M NaCl solution treated by ultrasonication.

8. 병원성 미생물내 ATPase 활성을 갖는 단백질의 특성

식중독에 감염되는 비율은 매년 전세계의 약 5~10%로 추정되며, 이들 식중독의 발생은 매년 증가할 뿐 아니라 원인체도 다양해지고 있는 실정이다. *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus* 식중독은 오래전부터 문제시 되어 왔으나, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 등은 비교적 새롭게 대두된 식중독 원인균이며 그 밖에 *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* 등 생물학적 위해로서 주요한 병원성 미생물들이 있다.

따라서, Ca-ATPase 활성을 이용한 일반 미생물의 신속 검출법을 식품 위해요소 중의 하나인 각종 병원성 미생물에 대해서도 검토하여 이들 미생물의 군수를 신속하게 측정할 수 있는지를 검토하였다.

각종 병원성 미생물을 특정 배지에 배양하고 농도별로 조절하여 총군수를 측정한 후 Ca-ATPase 활성 측정법과 비교하여 두 방법의 상관관계를 비교 검토하였다. 또한 Ca-ATPase 활성을 나타내는 효소학적 특성을 지닌 단백질을 파악하기 위하여 미생물을 0.6M NaCl, 20mM Tris-HCl buffer(pH 7.0)에 첨가하여 일정 농도로 조절한 후 초음파기를 사용하여 ice bath에서 1분 간격으로 초음파 처리 하였다. 처리한 시료를 4℃에서 12시간동안 stirring 하고 10,000 × g에서 20분간 원심분리한 후, 상층액 중의 단백질 농도를 측정하여 용해도를 산출하였다. 이렇게 분리된 단백질의 Ca-ATPase 활성 측정을 통하여 활성을 나타내는 단백질의 효소학적 특성을 확인하였다.

1) *Salmonella typhimurium*(KFRI00191)

살모넬라의 군수와 Ca-ATPase와의 관계를 Fig 19에 제시하였다. 이

결과에 의하면 총균수가 많을수록 Ca-ATPase 활성이 증가하였으며, 총균수가 10^3 까지는 서서히 10^3 이상에서는 빠르게 증가하는 경향을 나타내었다. 이상의 결과는 일반미생물의 Ca-ATPase 활성의 결과와 유사한 경향이었으며, 살모넬라의 총균수에 있어서도 Ca-ATPase 활성을 측정함으로써 신속하게 측정할 수 있는 것으로 나타났다.

Ca-ATPase 활성을 나타내는 효소학적 특성을 지닌 단백질을 파악하기 위하여 살모넬라균을 0.6M NaCl의 공존하에서 초음파 처리를 한 후 용해도를 측정하였다(Fig. 20). 그 결과 초음파 처리 시간이 경과함에 따라 0.6M NaCl에 대한 용해도는 증가하였으며, 처리시간 10분 이내에 최대 값에 달하였다. 이렇게 처리한 시료의 Ca-ATPase 활성을 측정한 결과(Fig. 21) 0.6M NaCl에 용출된 염용성 단백질의 성분이 증가할수록 Ca-ATPase 활성이 증가하였고, 불용성 성분에서는 Ca-ATPase 활성이 점차 감소하는 경향을 보였다.

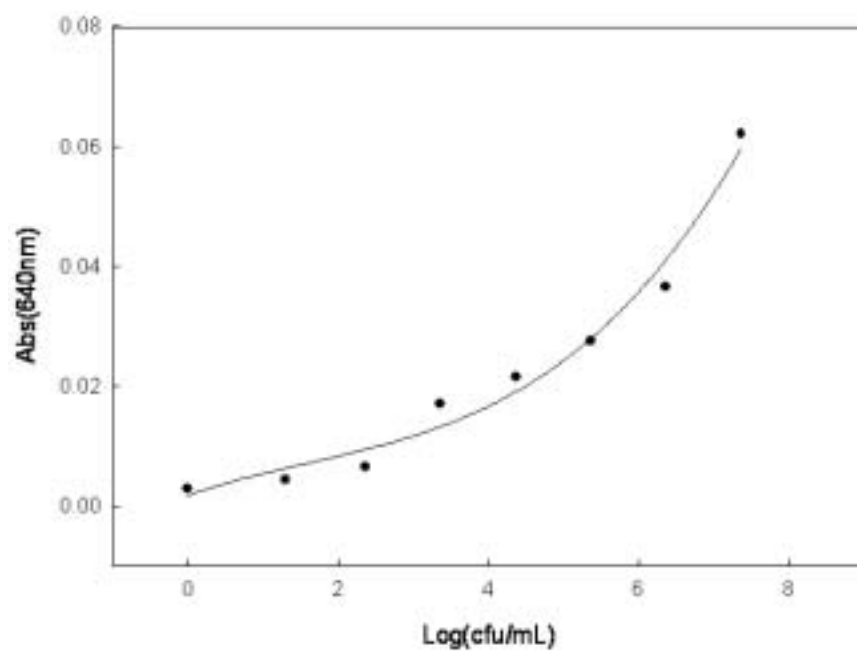


Fig. 19. Relationship between number of *Salmonella typhimurium*(KFRI 00191) and Ca-ATPase activity of protein in *Salmonella typhimurium*.

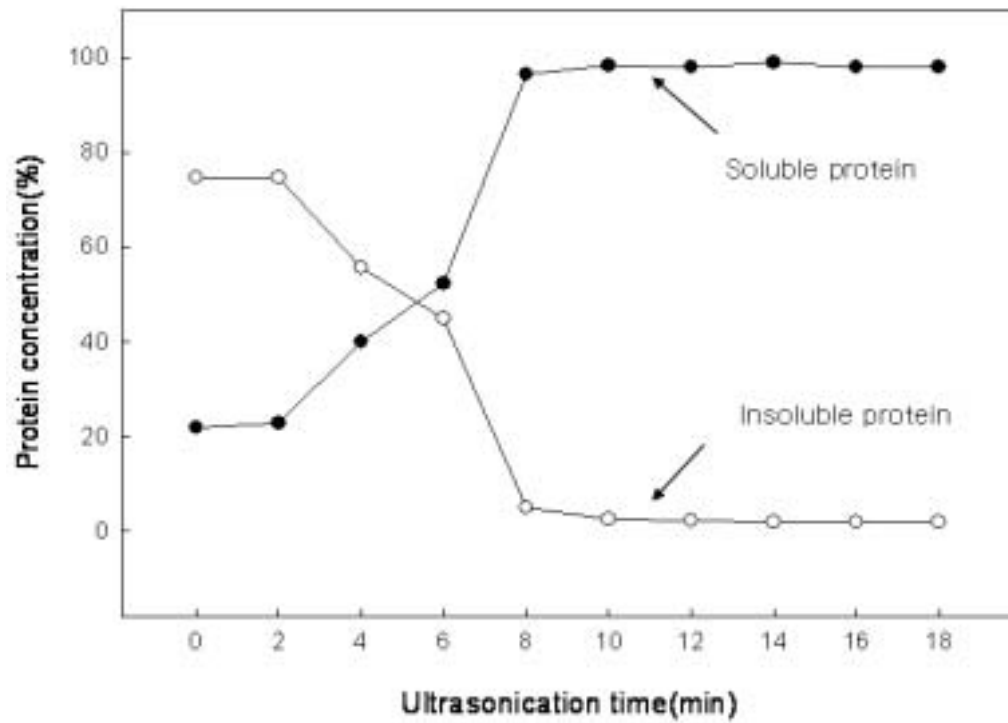


Fig. 20. Changes of soluble and insoluble protein of *Salmonella typhimurium* in 0.6M NaCl solution treated by ultrasonication.

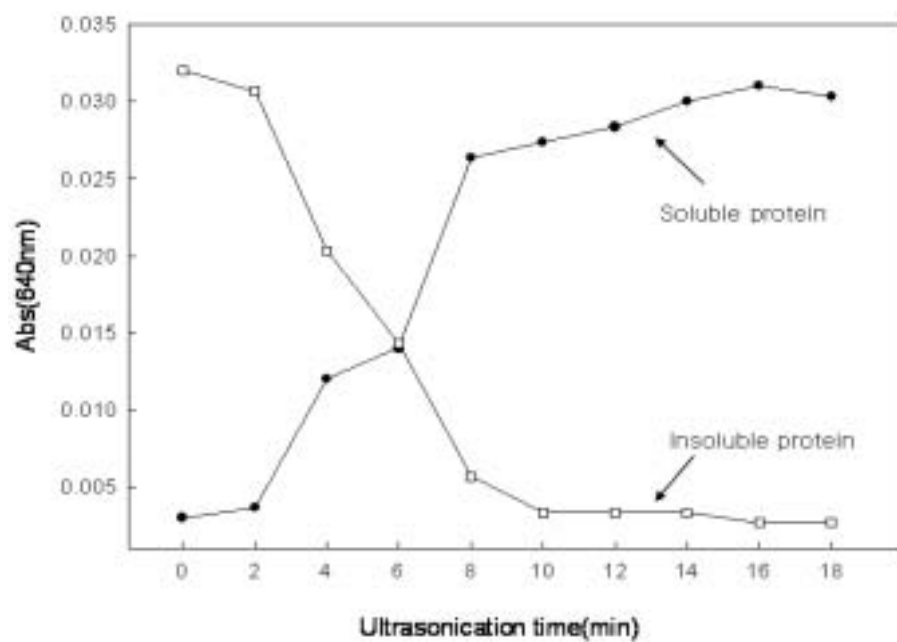


Fig. 21. Ca-ATPase activity of soluble and insoluble protein of *Salmonella typhimurium* in 0.6M NaCl solution treated by ultrasonication.

2) *Escherichia coli* (KFRI 00174)

*E. coli*의 총균수와 Ca-ATPase와의 관계를 Fig. 22에 제시하였다. 이 결과에 의하면 총균수가 많을수록 Ca-ATPase 활성이 증가하였으며, 총균수가 10^5 까지는 서서히 10^5 이상에서는 빠르게 증가하는 경향을 나타내었다.

Ca-ATPase 활성을 나타내는 효소학적 특성을 지닌 단백질을 파악하기 위하여 *E. coli*를 0.6M NaCl의 공존하에서 초음파 처리를 한 후 용해도를 측정하였다(Fig. 23). 그 결과 초음파 처리 시간이 경과함에 따라 0.6M NaCl에 대한 용해도는 증가하였으며, 처리시간 10분 이내에 최대 값에 달하였다. 이렇게 처리한 시료의 Ca-ATPase 활성을 측정한 결과(Fig. 24) 0.6M NaCl에 용출된 염용성 단백질의 성분이 증가할수록 Ca-ATPase 활성이 증가하였고, 불용성 성분에서는 Ca-ATPase 활성이 점차 감소하는 경향을 보였다.

3) *Staphylococcus aureus*(KFRI 00171)

*Staphylococcus*의 총균수와 Ca-ATPase와의 관계를 Fig. 25에 제시하였다. 이 결과에서도 총균수가 많을수록 Ca-ATPase 활성이 증가하였으며, 총균수가 10^3 까지는 서서히 10^3 이상에서는 빠르게 증가하는 경향을 나타내었다.

Ca-ATPase 활성을 나타내는 효소학적 특성을 지닌 단백질을 파악하기 위하여 *Staphylococcus*를 0.6M NaCl의 공존하에서 초음파 처리를 한 후 용해도를 측정하였다(Fig. 26). 그 결과 초음파 처리 시간이 경과함에 따라 0.6M NaCl에 대한 용해도는 증가하였으며, 처리시간 10분 이내에 최대 값에 달하였다. 이렇게 처리한 시료의 Ca-ATPase 활성을 측정한 결과(Fig. 27) 0.6M NaCl에 용출된 염용성 단백질의 성

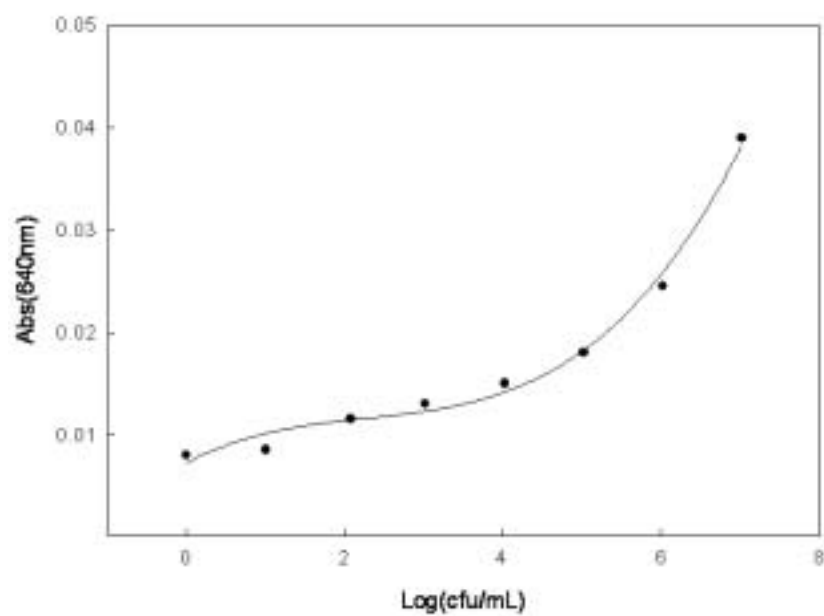


Fig. 22. Relationship between number of *Escherichia coli*(KFRI 00174) and Ca-ATPase activity of protein in *Escherichia coli*.

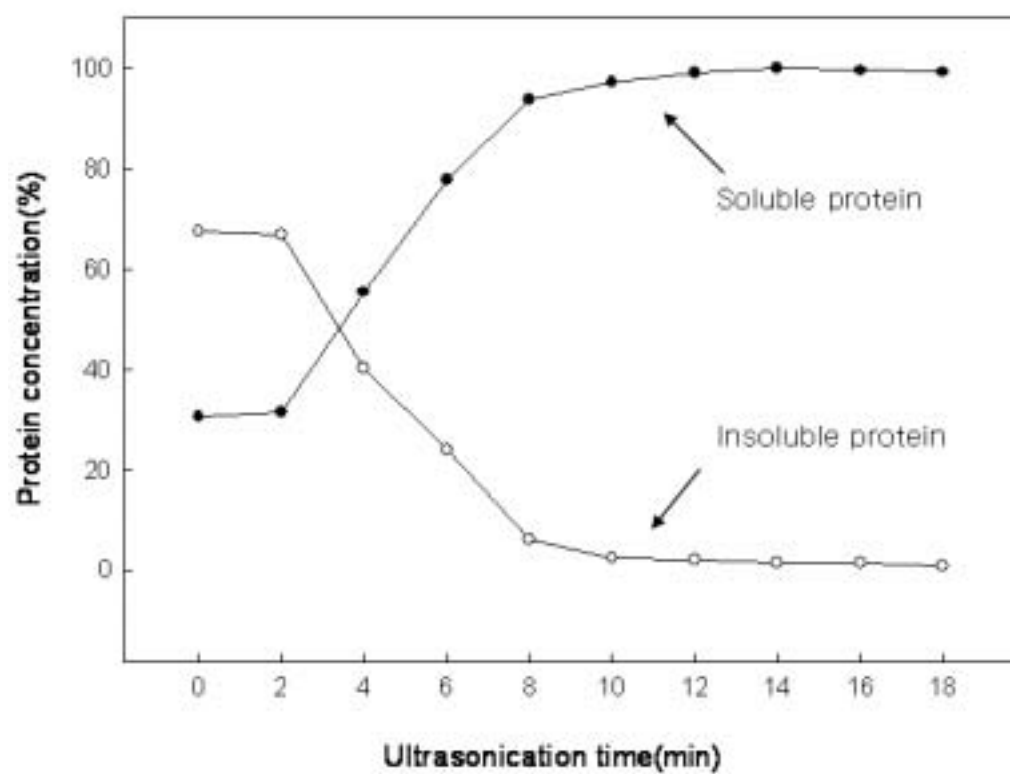


Fig. 23. Changes of soluble and insoluble protein of *Escherichia coli* in 0.6M NaCl solution treated by ultrasonication.

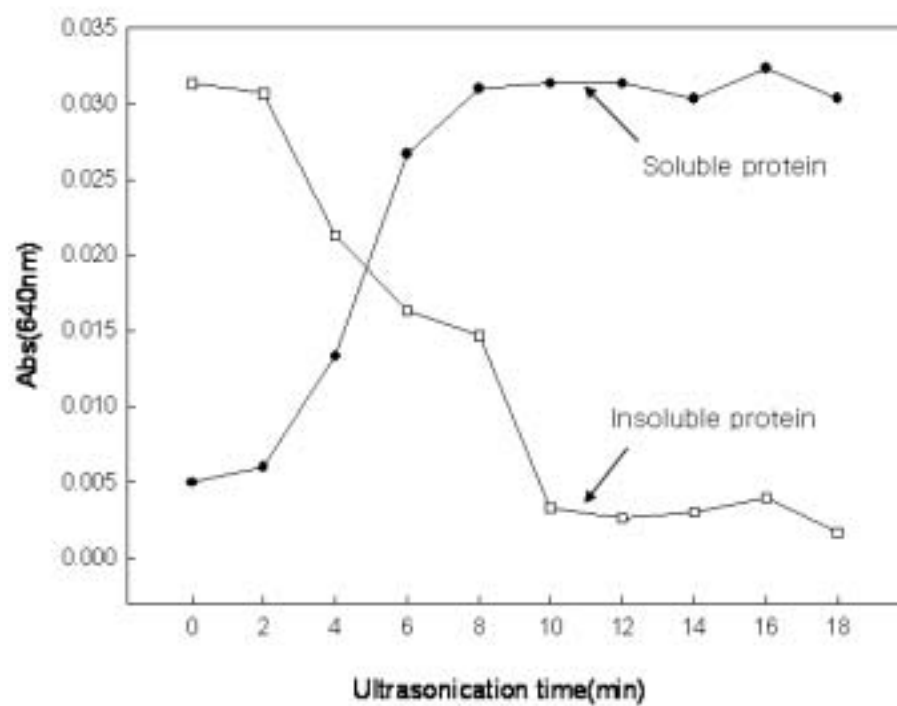


Fig. 24. Ca-ATPase activity of soluble and insoluble protein of *Escherichia coli* in 0.6M NaCl solution treated by ultrasonication.

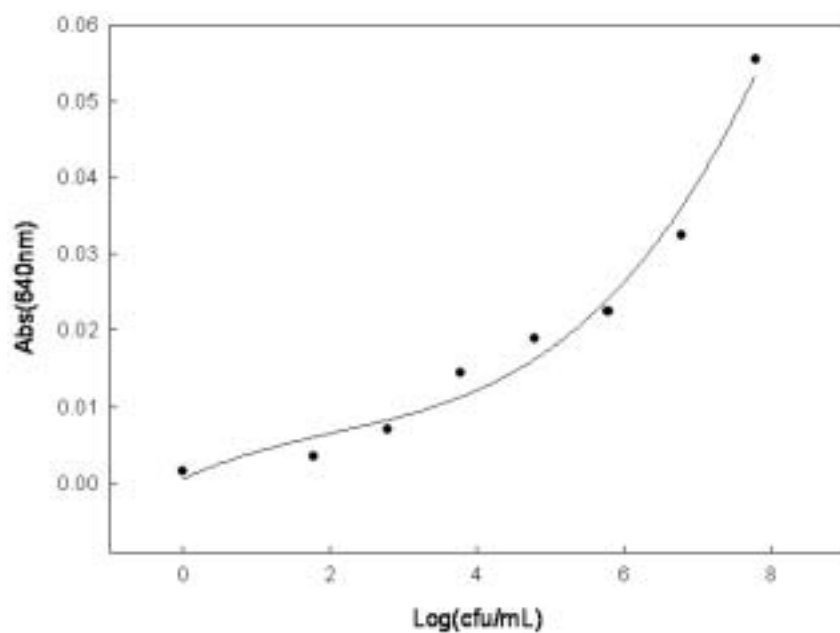


Fig. 25. Relationship between number of *Staphylococcus aureus* (KFRI 00171) and Ca-ATPase activity of protein in *Staphylococcus ureus*.

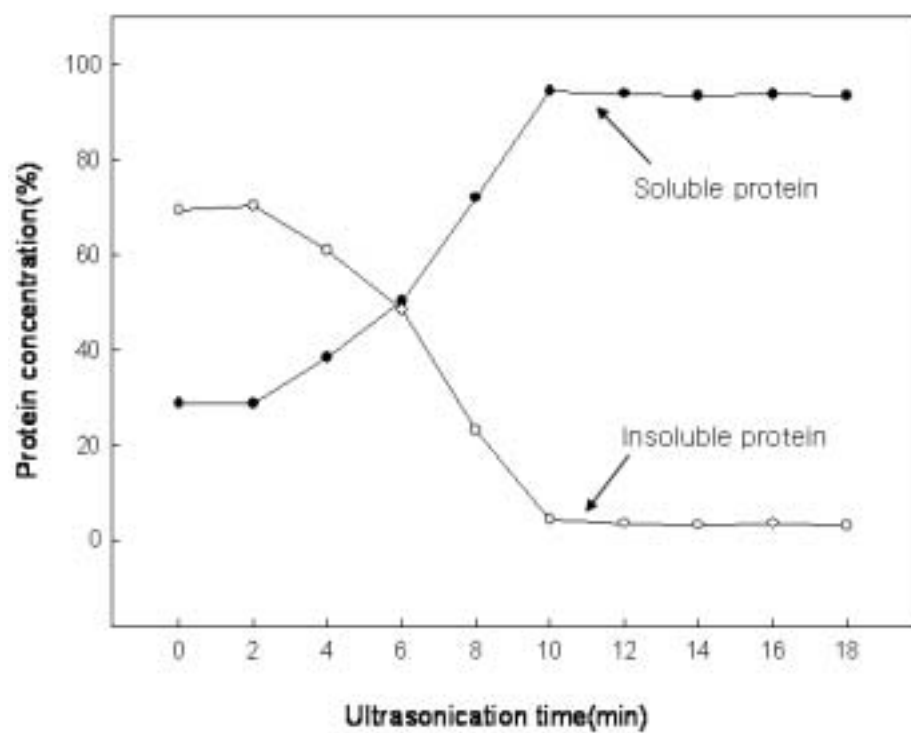


Fig. 26. Changes of soluble and insoluble protein of *Staphylococcus aureus* in 0.6M NaCl solution treated by ultrasonication.

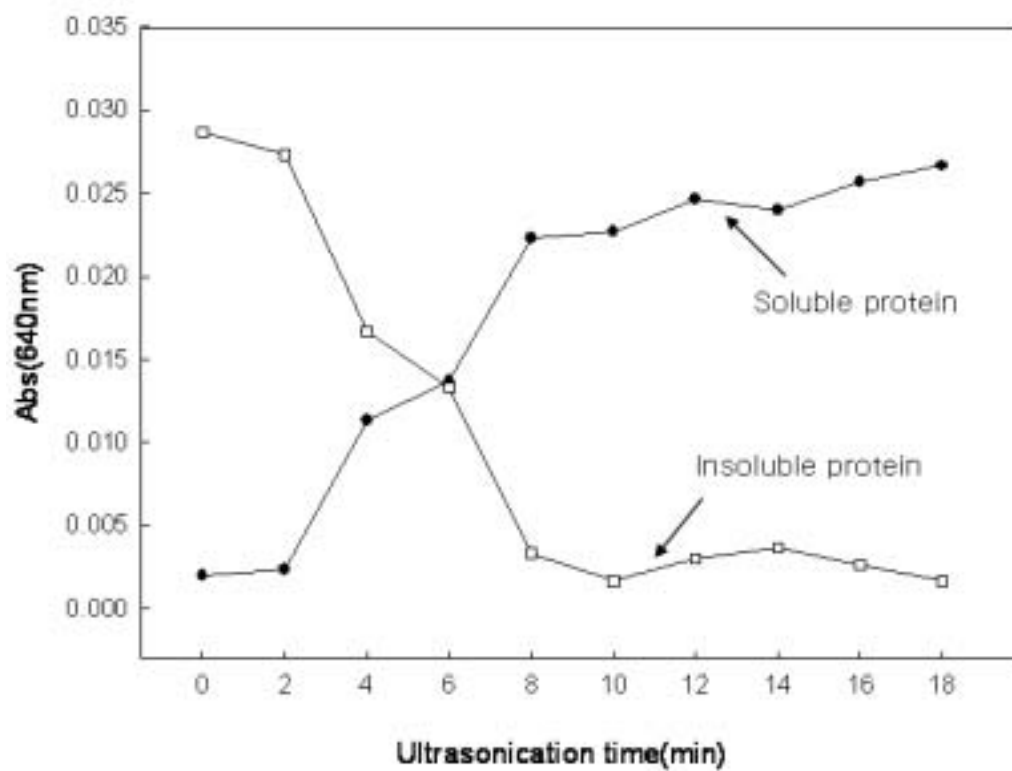


Fig. 27. Ca-ATPase activity of soluble and insoluble protein of *Staphylococcus aureus* in 0.6M NaCl solution treated by ultrasonication.

분이 증가할수록 Ca-ATPase 활성이 증가하였고, 불용성 성분에서는 Ca-ATPase 활성이 점차 감소하는 경향을 보였다.

4) *Vibrio parahaemolyticus*(KCTC 2471)

*Vibrio*의 총균수와 Ca-ATPase와의 관계를 Fig. 28에 제시하였다. 이 결과에서도 총균수가 많을수록 Ca-ATPase 활성이 증가하였다.

상기의 방법에 의해 *Vibrio*를 초음파 처리한 후 용해도를 산출한 결과를 Fig. 29에 나타내었다. 그 결과, 4℃에서 12시간 stirring 한 후, 원심 분리한 상등액이 0.6M NaCl에 용해되는 정도는 sonication 처리 시간이 경과함에 따라 증가하여 다른 미생물과 같은 경향을 나타냈다. 또한 sonication 처리시간이 10분 이상 경과하면 그 값은 더 이상 증가하지 않는 경향을 보였다. 이렇게 처리한 미생물의 Ca-ATPase 활성을 측정한 결과(Fig. 30), 염용성 성분이 증가할수록 그 활성이 높아지는 경향을 보였다. 따라서 이들의 효소학적인 특성을 지닌 단백질 대부분이 염에 가용화된 부분으로 용출되어 있는 것으로 보인다.

5) *Listeria monocytogenes*(KFRI 00799)

Fig. 31에는 *Listeria*의 총균수와 Ca-ATPase 활성과의 관계를 제시하였다. 이 결과에 의하면 총균수가 많을수록 Ca-ATPase 활성이 증가하였다.

*Listeria*의 활성을 나타내는 단백질의 특성을 파악하기 위하여 상기의 방법으로 본 미생물의 단백질을 분리하고, 용해도를 산출하였다. 그 결과,(Fig. 32) 초음파 처리 시간이 경과함에 따라 상등액의 용해도는 증가하였으며, 처리시간 10분 이내에 최대 값에 도달하였다. 또한 본 미생물의 Ca-ATPase를 측정하여 효소적 기능을 지닌 단백질을 알아본 결과는

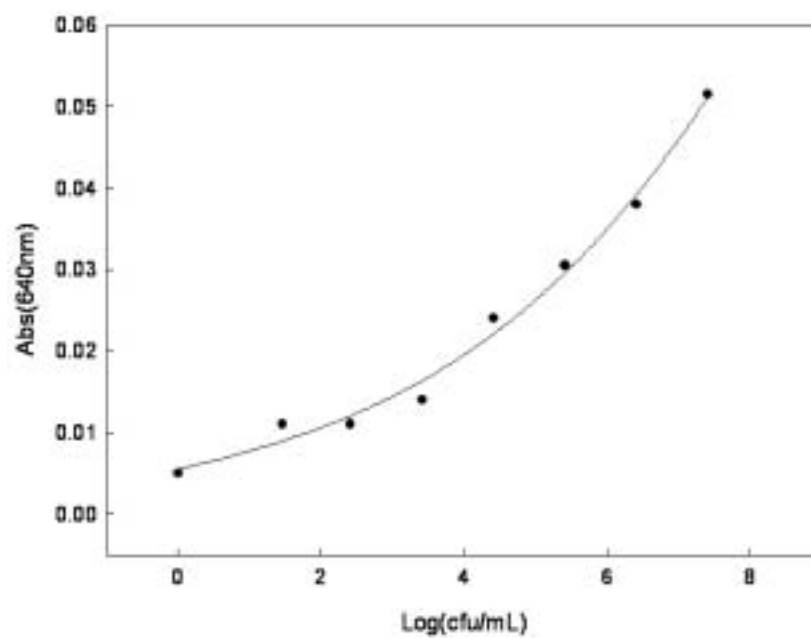


Fig. 28. Relationship between number of *Vibrio parahaemolyticus* (KCTC 2471) and Ca-ATPase activity of protein in *Staphylococcus ureus*.

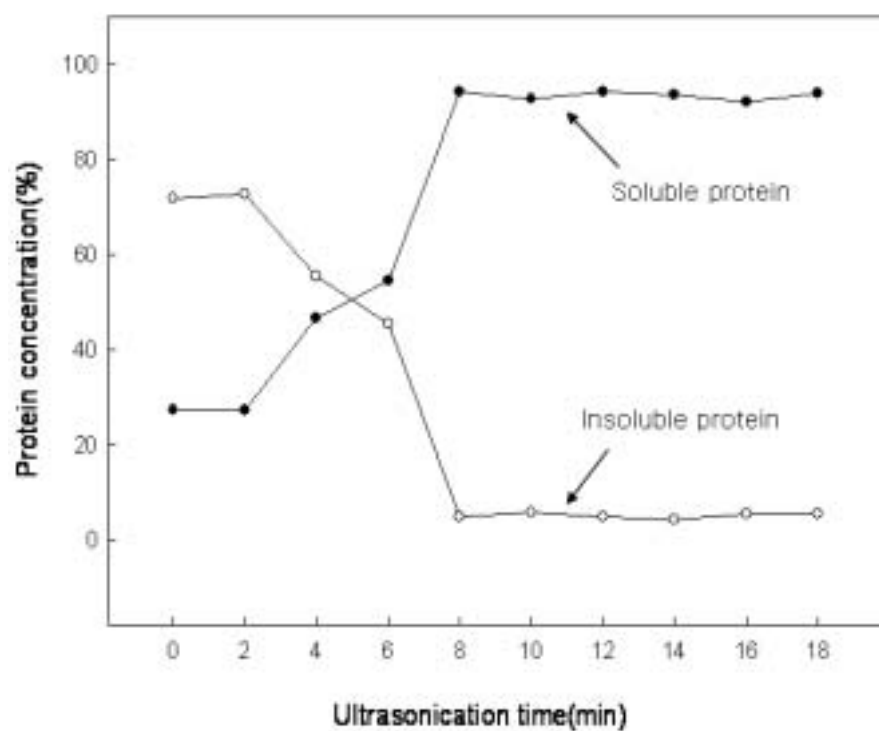


Fig. 29. Changes of soluble and insoluble protein of *vibrio parahaemolyticus* in 0.6M NaCl solution treated by ultrasonication.

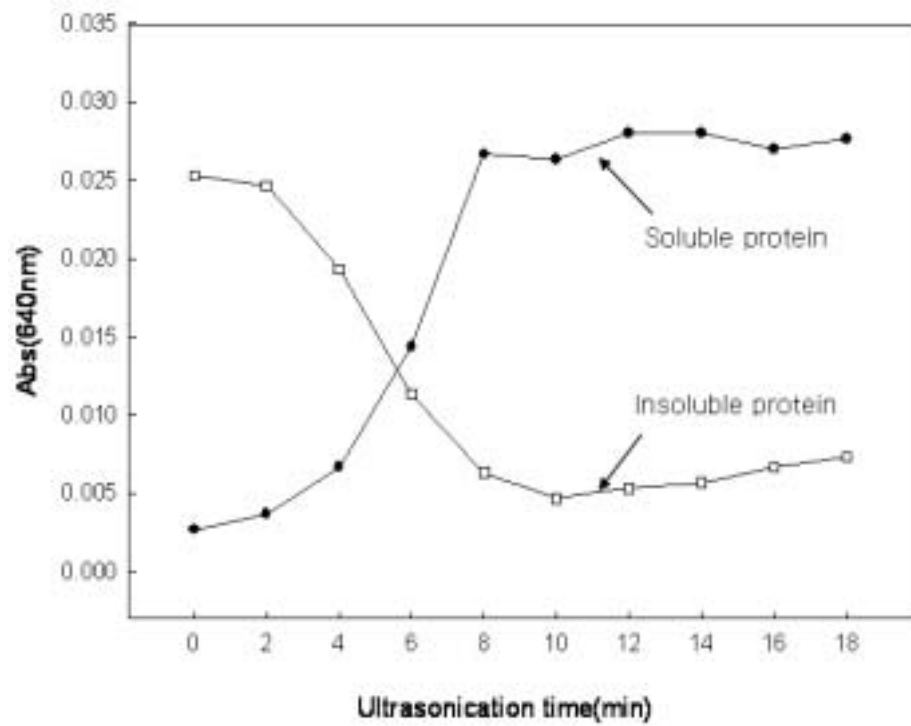


Fig. 30. Ca-ATPase activity of soluble and insoluble proetin of *Vibrio parahaemolyticus* in 0.6M NaCl solution treated by ultrasonication.

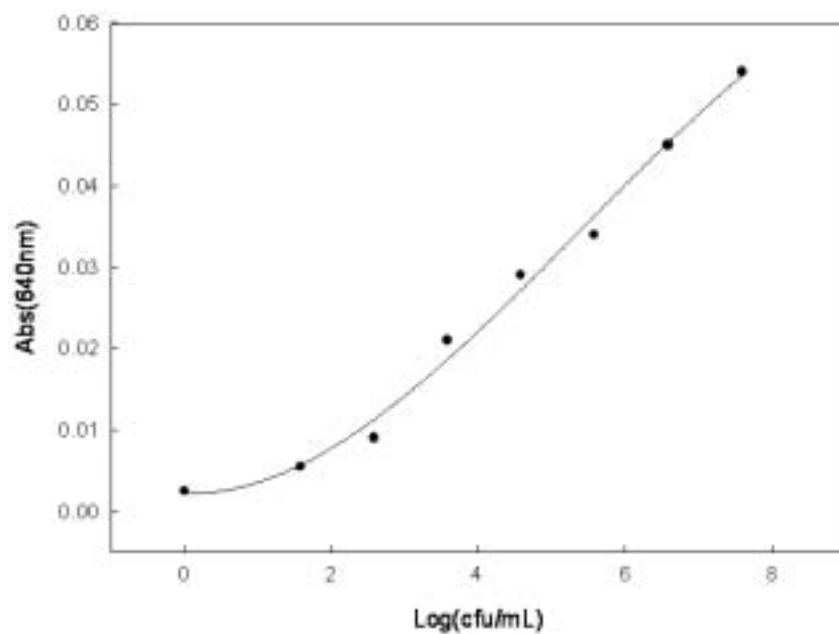


Fig. 31. Relationship between number of *Listeria monocytogenes*(KFRI 00799) and Ca-ATPase activity of protein in *Listeria monocytogenes*.

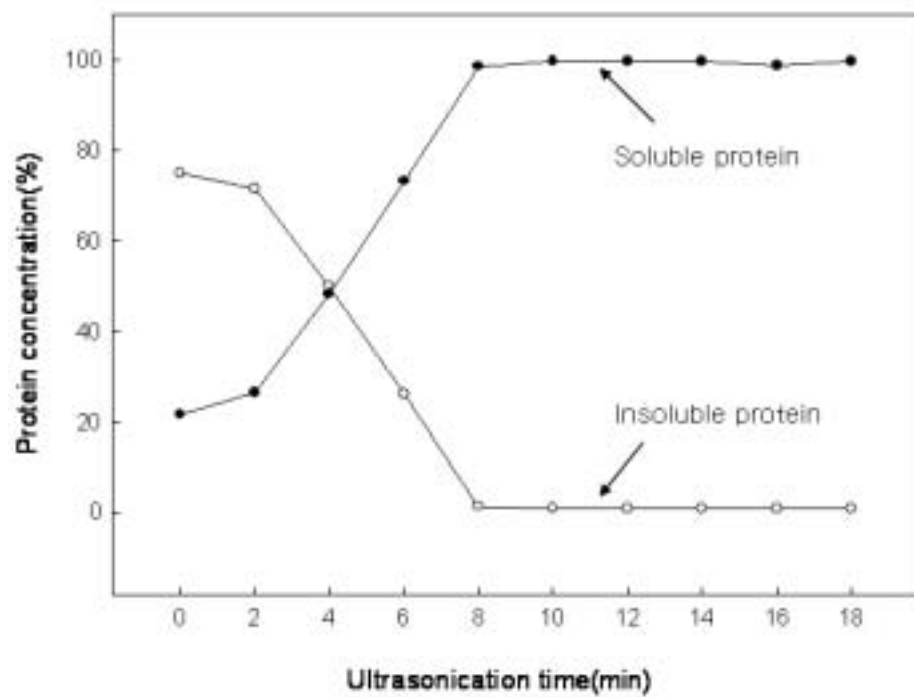


Fig. 32. Changes of soluble and insoluble protein of *Listeria monocytogenes* in 0.6M NaCl solution treated by ultrasonication.

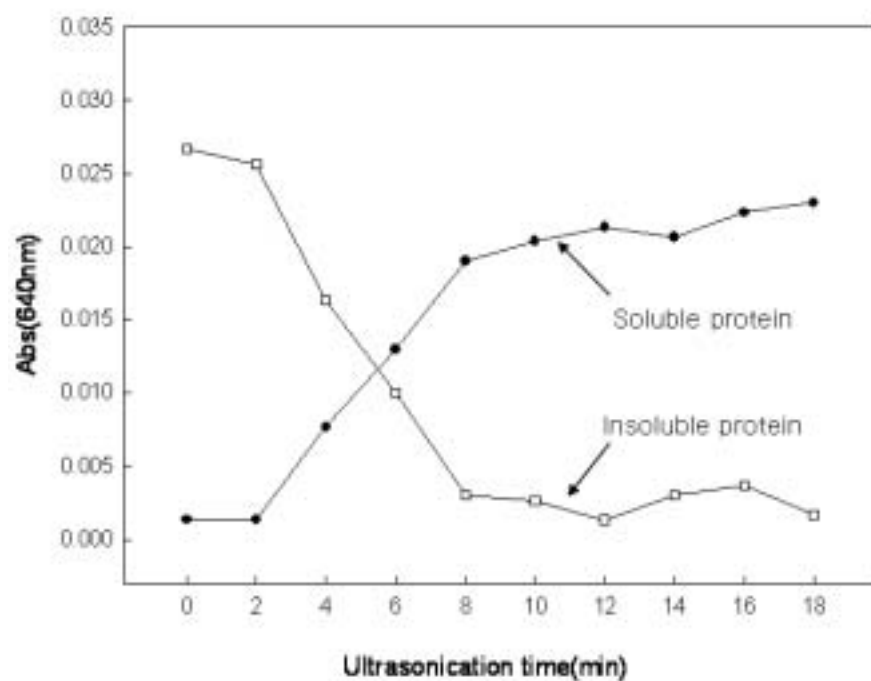


Fig. 33. Ca-ATPase activity of soluble and insoluble protein of *Listeria monocytogenes* in 0.6M NaCl solution treated by ultrasonication.

Fig. 33과 같다. 초음파 처리시간이 경과함에 따라 증가한 염용성 단백질의 성분의 양에 따라 Ca-ATPase 활성이 높아졌으며, 불용성 성분에서는 Ca-ATPase 활성이 점차 감소하는 경향을 보였다.

6) *Bacillus cereus*(KFRI 00437)

*Bacillus*의 총균수와 Ca-ATPase 활성과의 관계를 Fig. 34에 제시하였다. Ca-ATPase 활성과 *Bacillus* 균수와의 관계는 균수가 증가할수록 Ca-ATPase 활성도 증가하는 추세를 보였으며, 균수가 10^3 까지는 완만하게 10^3 이상에서는 빠르게 증가하는 경향을 나타내었다.

이상의 각종 병원성(1~6) 미생물에 대해서도 일반 미생물과 같이 Ca-ATPase에 의한 균수를 검토한 결과 정의 상관관계를 나타내고 있으므로 병원성 미생물의 균수를 측정하는데 유효할 것으로 사료되었다. 그러나, Ca-ATPase 활성법은 총균수를 측정하는데 있어서는 큰 문제점을 발견하지 못하였으나, 특정 미생물에 대한 검지 기술에는 미흡한 점이 많은 것으로 사료되었다. 따라서, 특정 미생물에 대해서는 새로운 검지기술법의 개발과 함께 본 기술을 복합적으로 개발할 필요성이 있다.

Bacillus cereus(KFRI 00437)내 효소학적 활성을 나타내는 단백질의 특성을 파악하기 위하여 0.6M NaCl 용액에 균을 첨가한 후 초음파처리를 하였을 때의 용해도를 측정하였다. 그 결과(Fig. 35) 초음파 처리 시간이 경과함에 따라 0.6M NaCl에 의해 용출된 단백질 함량이 증가하는 경향을 나타내었다. 또한, 초음파 처리 시간이 10분 이상 경과하면, 더 이상의 변화는 없는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 모든 미생물에 있어서 유사한 경향을 나타내었으며, 초음파를 약 10분간 처리함으로써 대부분의 cell이 파괴되어 염에 의해서 단백질이 유출되는 것으로 사료되었다. 이와 같이 초음파 및 염에 의해서 유출된 단백질의 Ca-ATPase

활성을 측정하면(Fig. 36) 유출된 단백질 함량에 의존하여 Ca-ATPase 활성이 유의적으로 증가하는 경향을 나타내었으며, 이와 같은 결과는 미생물의 단백질 중에서 ATPase의 효소학적 기능을 지닌 단백질은 염용성 단백질임이 판명되었다. 이상의 결과는 앞서 제시한 다른 미생물의 경우도 같았다. 또한, ATPase를 발현하는 염용성 단백질 중의 어떤 단백질인가에 대하여 검토 중에 있으며, 이것이 밝혀지면 미생물의 생리학적 측면에서 학문적으로 많은 발전이 기대된다.

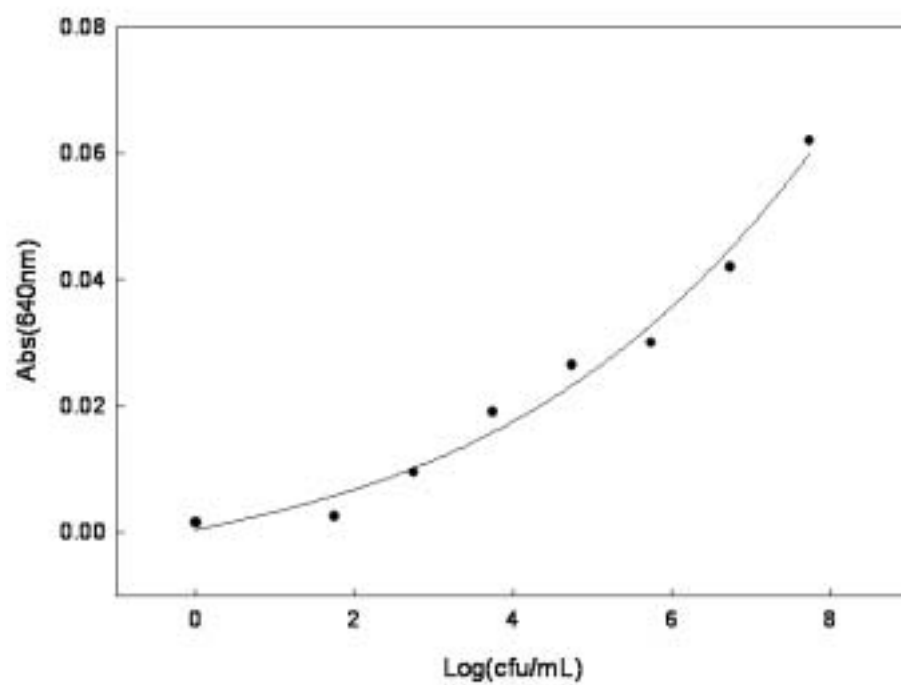


Fig. 34. Relationship between number of *Bacillus cereus* (KFRI 00437) and Ca-ATPase activity of protein in *Listeria monocytogenes*.

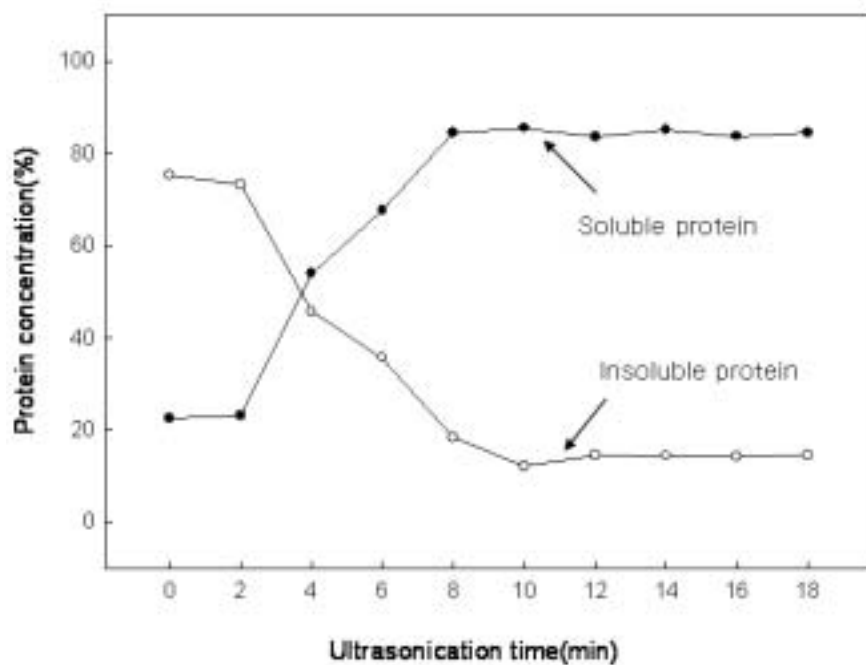


Fig. 35. Changes of soluble and insoluble protein of *Bacillus cereus* in 0.6M NaCl solution treated by ultrasonication.

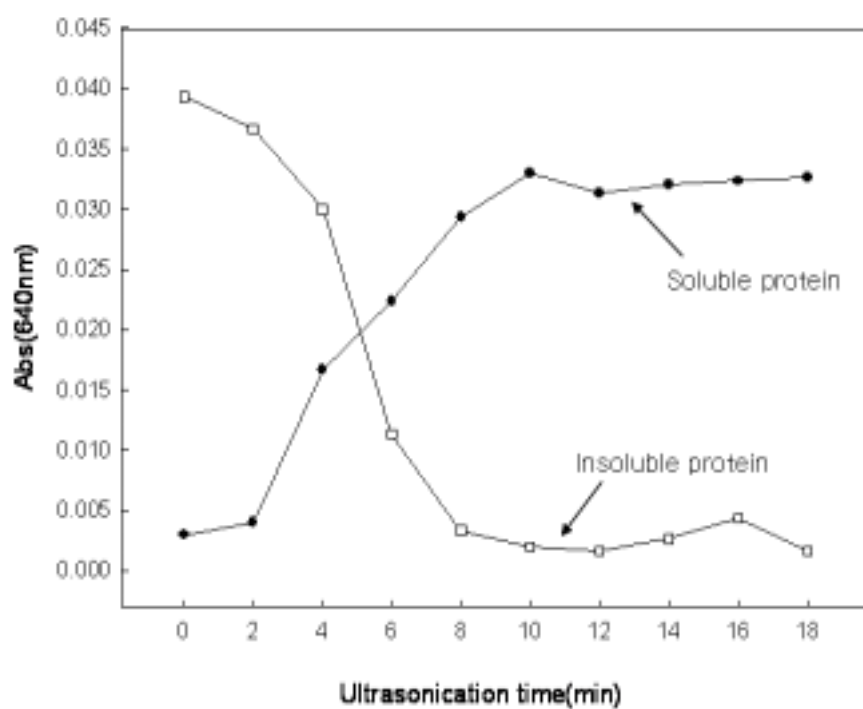


Fig. 36. Ca-ATPase activity of soluble and insoluble protein of *Bacillus cereus* in 0.6M NaCl solution treated by ultrasonication.

9. 미생물의 총 균수와 단백질 함량 측정 기술로부터의 시약 개발 검토

제 8항까지는 Ca-ATPase 활성 측정을 통한 미생물의 총균수의 측정법에 대하여 기술하였다. 본 연구에서는 Ca-ATPase 활성 이외의 보다 간편한 총균수 측정법을 검토하기 위하여 미생물의 단백질 총함량과 총균수와의 관계를 검토하였다. Fig. 37에는 일반적으로 알려져 있는 단백질 함량 측정기술인 뷰렛법을 이용하여 미생물의 총단백질 함량과 총균수와의 관계를 검토하여 결과를 제시하였다. 이결과에 의하면 10^4 이상에서 단백질 함량이 서서히 증가하는 경향이었으며, 10^6 이상에서 급격한 증가를 나타내었다. 이상의 결과를 Ca-ATPase 활성과 비교하면 감도면에서 많이 낮은 경향을 나타내었으며, 이 방법은 10^6 이상이 아니면 측정하기 어려운 것으로 판단되었다. 특히, 이 방법은 단백질 식품을 측정할 때 문제점이 발생하였으며 미생물 외에 이중의 단백질이 유입되었을 경우 급격한 단백질 함량의 증가가 일어났으며, 이로 인해 측정에 어려움이 있었다. 따라서 뷰렛법에 의한 미생물의 균수 측정법은 적합한 방법이 아닌 것으로 사료되었다.

한편, 뷰렛법 보다 감도가 우수하다고 알려져 있으며 미량의 단백질 농도 측정이 가능한 마이크로 뷰렛법을 이용하여 총균수와의 관계를 검토한 결과(Fig. 38) 기본적으로 뷰렛법과 유사한 결과를 나타내었다. 따라서 본 방법은 미생물의 균수를 측정하는 수단으로서는 적합지 못한 것으로 사료되었다.

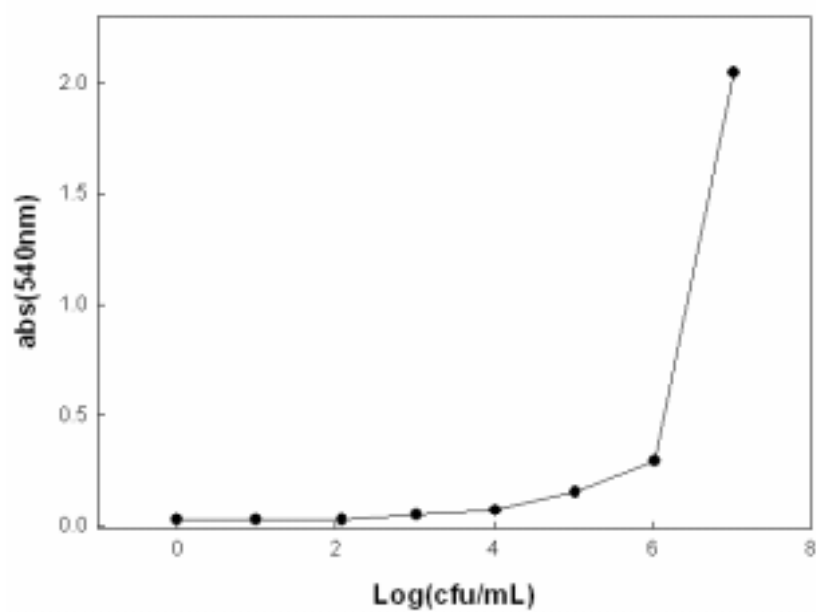


Fig. 37. Relationship between total colony count and protein concentration of microorganism measured by biuret method.

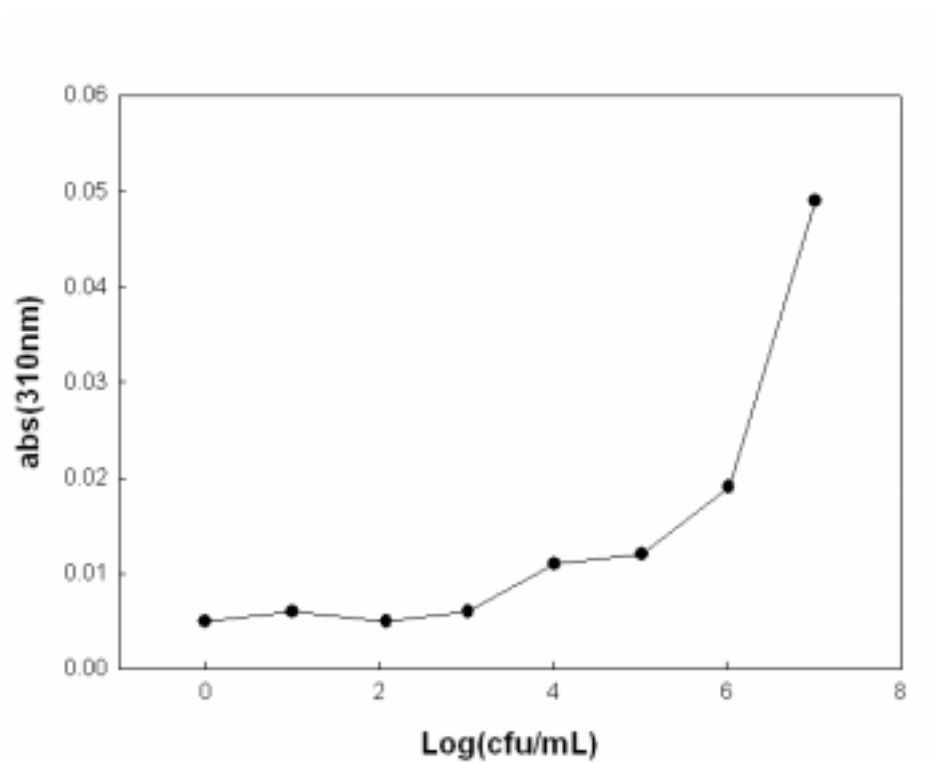


Fig. 38. Relationship between total colony count and protein concentration of microorganism measured by microbiuret method.

10. 각종 미생물 내 단백질의 라벨링 및 소수성 잔기 분석에 의한 미생물 검지 기술

앞서 제시한 바와 같이 Ca-ATPase 활성법은 미생물의 총균수를 측정하는 데는 유용하게 이용할 수 있으나, 병원성 미생물과 같은 미량의 균에 대해서는 측정하기 어려운 문제점이 있었다. 따라서 제(5)항에서는 병원성 미생물과 같은 미량의 특수한 균을 검지할 수 있는 방법을 개발하고자 미생물 내의 단백질에 선택적으로 라벨링되는 단백질을 찾아내어 균의 동정 및 균수를 측정하는 기술을 개발하고자 하였다.

Fig. 39에는 *Staphylococcus aureus* 내의 단백질을 분리하여 매개체인 TGase를 첨가한 후 MDC를 라벨링 효과를 나타내었다. 이 결과에 의하면 어떠한 subunit 성분에도 MDC의 라벨링 효과는 인정되지 않았다. 그러나 이론적으로는 라벨링 효과가 있을 것으로 사료되나 현재의 조건하에서는 라벨링 효과가 없는 것으로 나타났으며, 이에 대해서는 추후 자세한 연구가 요구되었다.

한편, 일반적으로 단백질을 열처리하면 소수성기가 표면으로 유출되는 특성이 있으며, 이를 이용하여 ANS의 형광물질을 소수성기에 특이적으로 결합시키므로써 형광물질의 세기에 의해서 미생물 수를 측정하는 기술을 이용하고자 하였다. 그러나 본 기술을 검토한 결과 형광의 발현은 일어나지 않았으며, 현재로서는 이 기술로는 미생물의 균수를 측정하는데는 문제점이 있는 것으로 판단되었다(data 미제시).

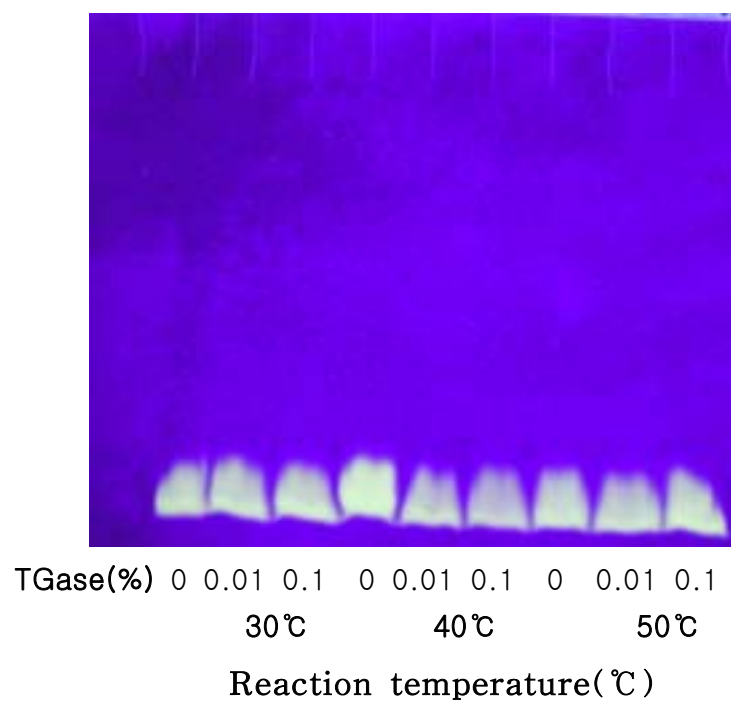


Fig. 39. SDS-PAGE of *Staphylococcus aureus* protein after incubation with transglutaminase in the presence of MDC

이상의 제 1항부터 10항 까지의 결과를 종합하면 Ca, Mg-ATPase 활성, SDS-PAGE, ANS 및 MDC 등을 이용한 검출법에 대하여 검토한 결과 가장 신속하면서 안정적으로 측정할 수 있는 기술은 Ca, Mg-ATPase 활성법인 것으로 판단되었다. 즉 기존의 평판배지법의 경우 약 48시간 이상이 지나야 미생물을 검지할 수 있었지만, ATPase 활성법은 1시간에 약 10~20샘플을 측정할 수 있었다. 또한 이에 대한 메카니즘을 검토한 결과 ATPase의 기능을 갖고 있는 단백질은 염용성 단백질인 것으로 확인되었으며, 염용성 단백질 중의 어떠한 단백질이 그 기능을 보유하고 있는지에 대해서는 좀더 검토할 필요성 있다.

따라서 ATPase 활성법은 Ca 및 Mg의 존재하에서 미생물의 총균수를 신속하게 측정할 수 있는 기술로 사료되며, 현장에서 신속하게 미생물의 총균수를 측정할 시에는 본 기술이 매우 유용하게 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

한편, 제 2항에서 측정기기에 대하여 자세한 설명이 되겠지만, 현재 현장에서 미생물의 총균수를 측정할 수 있는 콤팩트한 기기가 완성되어 본 기기에는 지금 까지 얻어진 data를 입력시켜 미생물의 총균수가 자동적으로 측정할 수 있는 단계에 이르고 있다.

11. 유통 중의 식품에 대한 미생물 측정

제 10항 까지는 식품 미생물의 신속한 측정법을 개발하기 위하여 ATPase 활성법, 여기에 따르는 시약 개발, ANS, MDC와 미생물과의 특이적 반응에 의한 검출법 등을 검토하였다. 그 결과 ATPase 활성법이 가장 정확하고 신속하게 측정할 수 있는 기술로 확인되었다.

따라서, 제 11항에서는 ATPase 활성을 이용한 유통 중의 각종 식품에 대한 미생물의 총균수를 측정하여 현장에 적용 가능한지를 검토하였다.

1) 육류의 미생물 측정

유통 중의 쇠고기, 돼지고기 및 닭고기의 샘플을 채취하고, 채취한 시료를 일정한 양 취해서 stomacher bag에 넣어 시료 무게의 10~20배량의 멸균수를 가한 후, stomacher에서 1분 동안 처리하였다. 이를 10진법에 의해 희석하여 평판 배양법에 의한 총균수를 구했다. 또한 각 시료를 1g 취해서 Ca-ATPase activity에 의한 방법으로 미생물을 측정하였다. 이는 3반복 이상 실험하여 평균값을 구했으며, 채취시 육류는 대부분 비슷한 균수를 포함하고 있기 때문에, 육류를 미생물적 위해환경에 노출된 상태를 측정하기 위하여, 25℃에서 1주일간 보관하면서 실험에 사용하였다. 평판배양법에 의한 미생물 총균수 측정값과 Ca-ATPase activity 방법에 의한 값을 비교한 결과 총균수에 따라 Ca-ATPase activity 측정치가 변화하는 경향을 보였다. 이는 총균수가 10^3 cfu/mL 이상일 경우 정의 상관관계를 나타내었으며, 10^3 cfu/mL 이하의 균수에서는 값의 변화가 인정되지 않았다. 따라서 10^3 cfu/mL의 이상에서 두 방법간의 상관식을 산출한 결과, 쇠고기의 경우 $y=0.0192x-0.0642$, R^2 는 0.9894로 높은 상관관계를 보였으며

(Fig. 40), 돼지고기는 $y=0.0249x-0.0969$ 로 R^2 는 0.9799(Fig. 41), 닭고기는 $y=0.0195x-0.0692$, R^2 는 0.9761(Fig. 42)를 나타내었다. 또한 이상의 결과를 분석해본 결과 각각의 시료로부터 얻어진 산출식이 매우 유사함을 알 수 있었으며, 육류의 경우 시료의 종류와 관계없이 하나의 식으로 나타낼 수 있을 것으로 사료되었다. 여기에서 각각의 얻어진 data 값을 하나로 합쳐 산출해본 결과 $y=0.0213x-0.0734$ 이라는 하나의 상관식을 산출할 수 있었고, 상관계수 $R^2 = 0.9388$ 로 상당히 높은 상관관계를 나타냈다(Fig. 43).

한편 총균수가 10^3cfu/mL 이하일 경우에는 총균수와 Ca-ATPase activity의 방법간에 일정한 경향을 나타내지 않았으며, 이때의 관계식을 산출해본 결과 $y=0.0007x-0.003$ 의 식이 산출되었고, 상관계수 $R^2 = 0.2221$ 로 나타나 상관관계는 인정되지 않았다(Fig.44). 이상의 결과로부터 육류의 총균수는 10^3cfu/mL 이상일 경우에 한해, 위의 식을 적용하여 Ca-ATPase 활성법에 의한 신속한 미생물 측정에 사용할 수 있는 것으로 확인되었다.

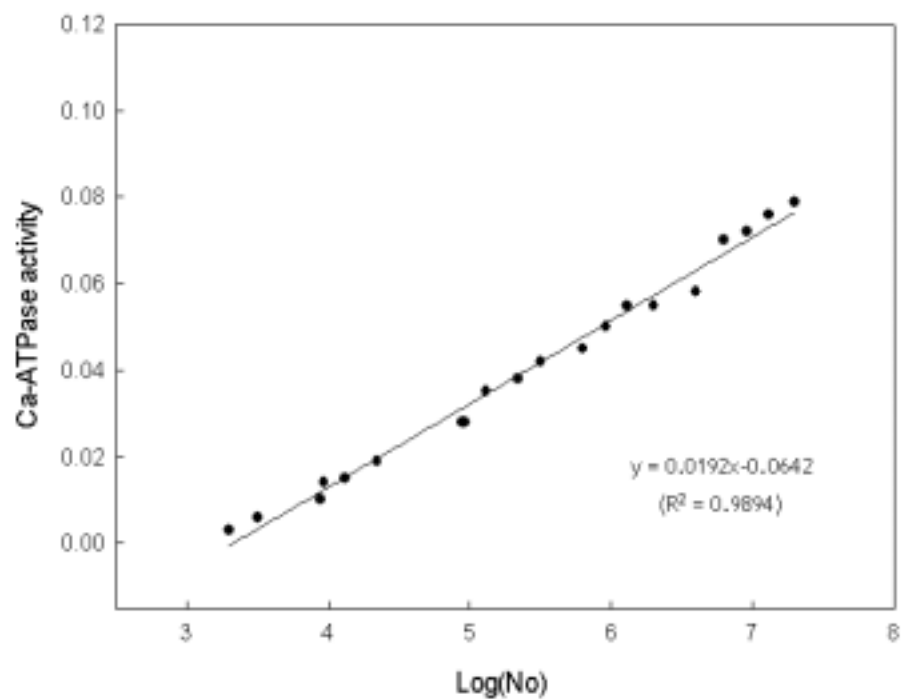


Fig. 40. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from beef(n = 20).

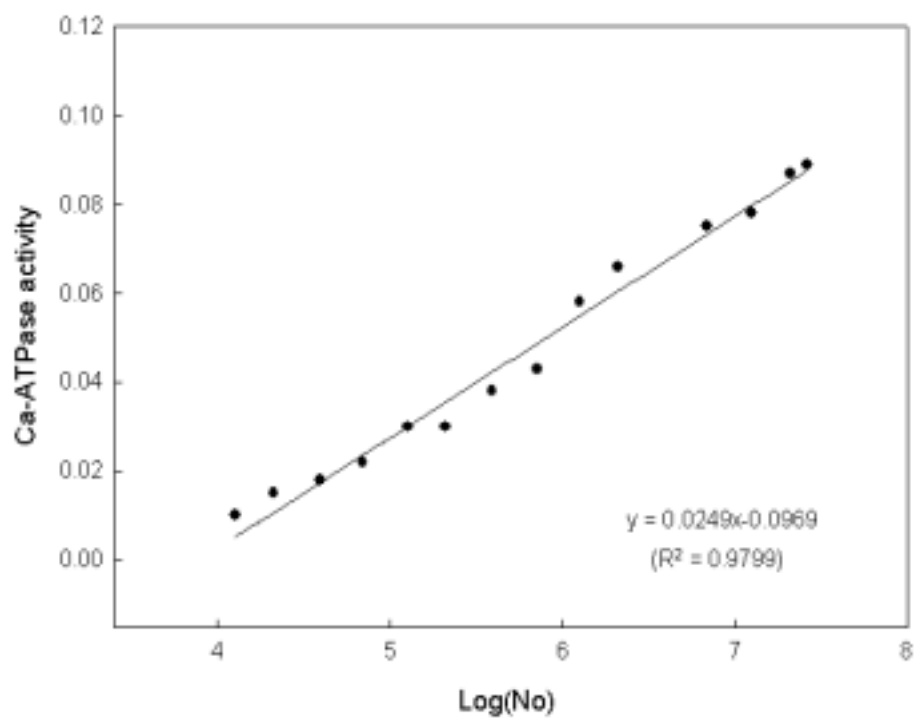


Fig. 41. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from pork(n = 15).

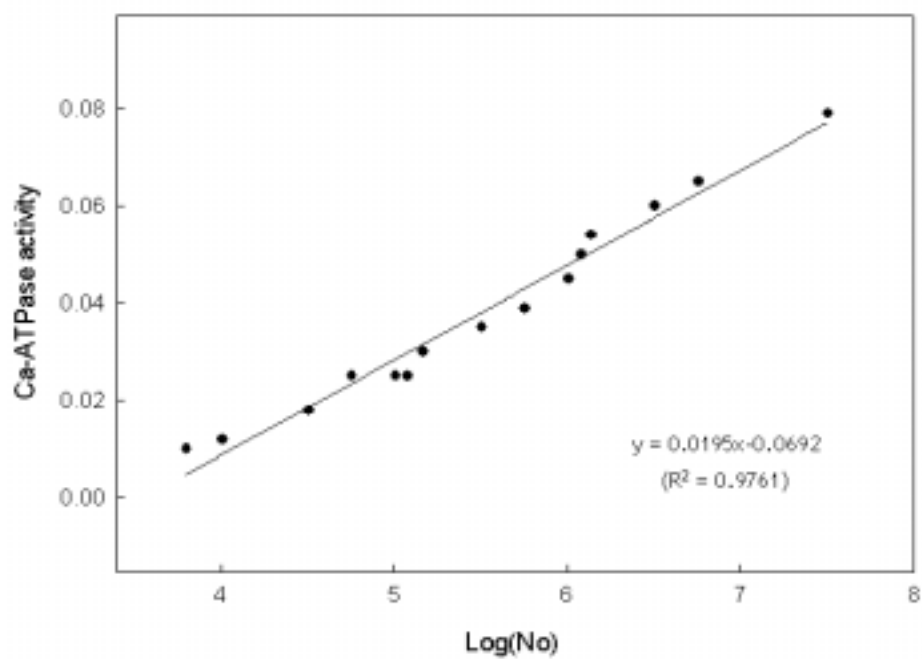


Fig. 42. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from chicken(n = 15).

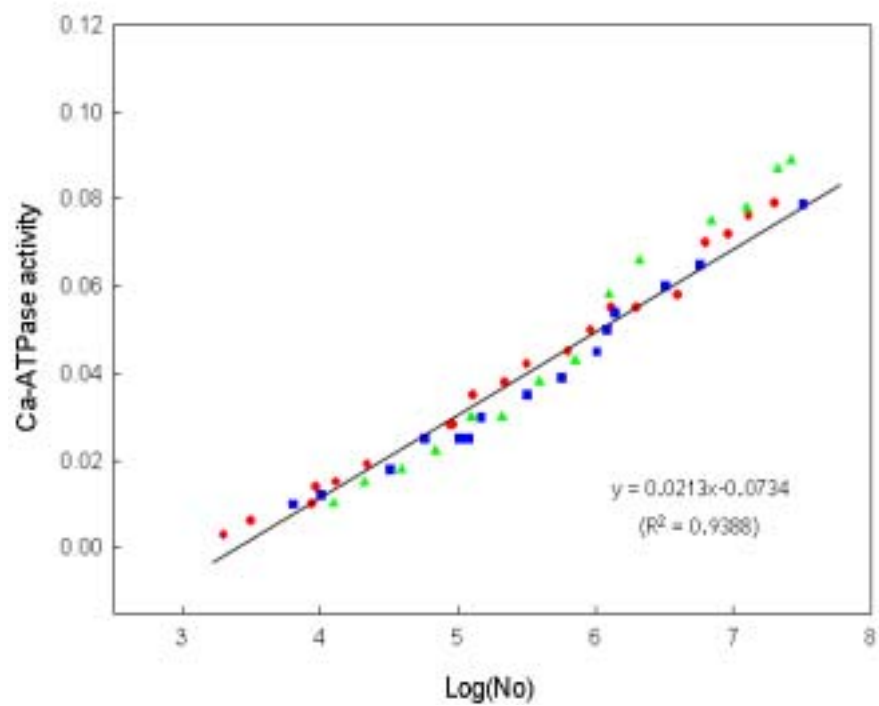


Fig. 43. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from meat species.

● Beef (n=20) ▲ Fork (n=15) ■ Chicken (n=15)

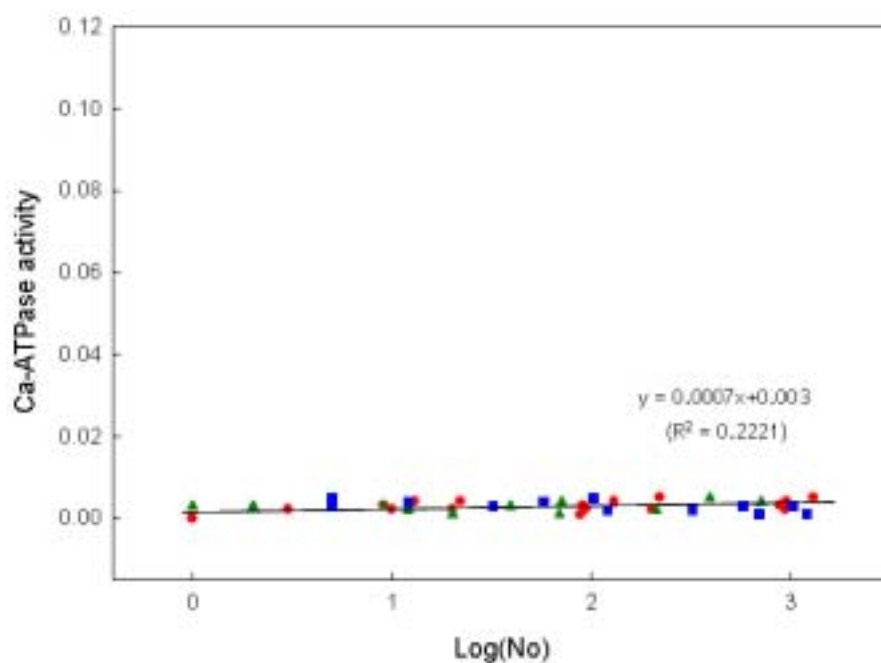


Fig. 44. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from meat species.

● Beef (n=20) ▲ Fork (n=15) ■ Chicken (n=15)

2) 어패류의 미생물 측정

어패류는 생태 외 10종을 채취하여 실험에 사용하였다. 이들은 채취 즉시 일정량 취하여 평판 배양법에 의해 총균수를 구하고 Ca-ATPase activity 측정으로 미생물 함량을 조사하여 비교 검토하였다. 육류와 마찬가지로 위해환경에 노출된 시료를 측정하기 위하여 25℃에서 1주일간 보관하면서 어패류의 균수를 다양하게 변화시켰다.

평판 배양법에 의한 미생물 총균수 측정값과 Ca-ATPase activity 방법에 의한 측정치를 비교한 결과, 미생물의 수가 증가할수록 Ca-ATPase activity 측정치가 높아지는 경향을 보였다. 이는 전체적으로 총균수 10^3cfu/mL 이상에서는 균수가 많을수록 증가하는 추세를 나타냈고, 이 때 평판 배양법과 Ca-ATPase activity 방법을 이용하여 측정한 두 방법간에 상관식을 산출하면, 생태는 $y=0.0145x-0.0519$ ($R^2 = 0.9569$)의 식을 나타내었고(Fig. 45), 우럭의 경우 $y=0.0157x-0.0594$, $R^2 = 0.988$, 오징어 $y=0.0157x-0.0610$, 과 비슷한 식을 나타냈으며, 실험에 사용한 시료들 중 가장 높은 기울기 값을 보였다. 이 때 우럭과 오징어의 R^2 는 각각 0.9880과 0.9848로 나타났다. 그 밖에 생태는 $y=0.0145x-0.0519$ ($R^2=0.9569$)로 나타났고, 고등어($y=0.0137x-0.0493$), 연어($y=0.0137x-0.0524$), 가자미($y=0.0136x-0.0490$)는 비슷한 기울기 값을 가진 식을 산출하였다. 이 때 이들의 R^2 는 각각 0.9630, 0.9697 및 0.9731로 나타났다. 또한 실험에 사용한 어패류들 중 꽁치, 우렁, 갈치와 대구는 각각 $y=0.0131x-0.0454$ ($R^2=0.9845$), $y=0.0125x-0.0434$ ($R^2=0.9838$), $y=0.0133x-0.0471$ ($R^2=0.9725$) 및 $y=0.0133x-0.0480$ ($R^2=0.9798$)의 식을 나타내었으며, 이들은 어패류의 다른 시료들에 비해 약간 낮은 기울기 값을 보였으나, 그 차이는 미비하였다. 따라서, 이들 어패류의

총균수가 10^3 cfu/mL 이상일 때 평판 배양법과 Ca-ATPase activity 방법간의 상관식은 $y=0.0138x-0.0505$ 로 나타낼 수 있었으며, 이 두 방법간에 R^2 는 0.9709로 높은 상관관계를 보였다. 이는 육류에서 나타난 두 방법간의 결과보다 낮은 기울기의 식이 산출되었다. 또한 총균수가 10^3 cfu/mL 이하에서는 총균수와 Ca-ATPase activity 방법에 의한 수치 간에 뚜렷한 경향이 나타나지 않았으며, 10^3 cfu/mL 이하에서는 $y=0.0004x-0.0014$ 의 식이 산출되었고, 이 때 R^2 는 0.1756으로 매우 낮은 값을 보였다. 따라서, 어패류의 총균수가 10^3 cfu/mL 이상일 경우 위의 식을 적용하여 어패류의 총균수를 신속하게 측정할 수 있는 것으로 사료된다.

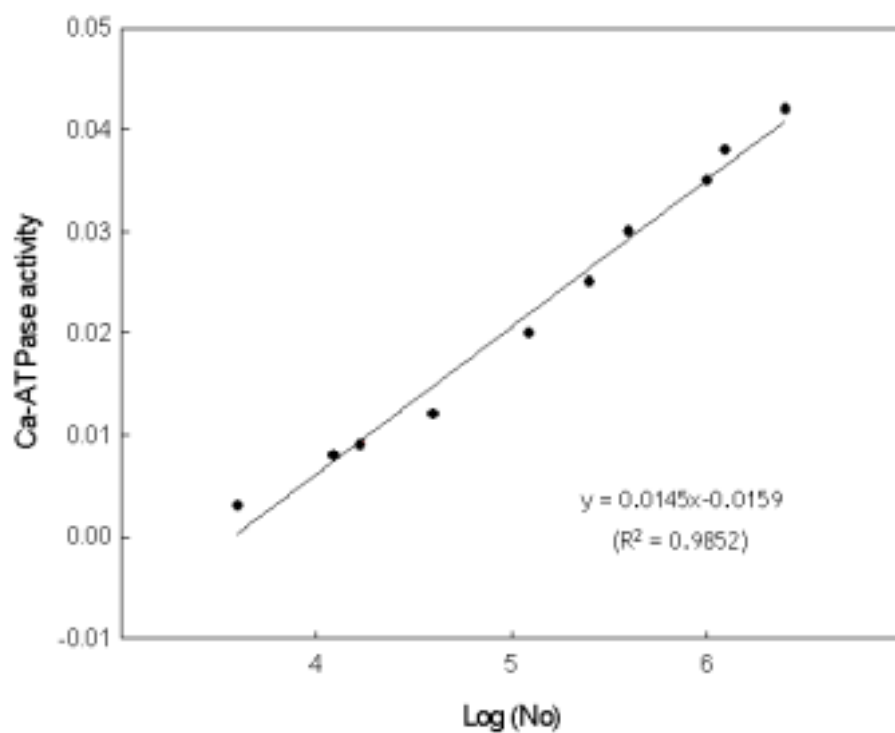


Fig. 45. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from alaska pollack(n = 10).

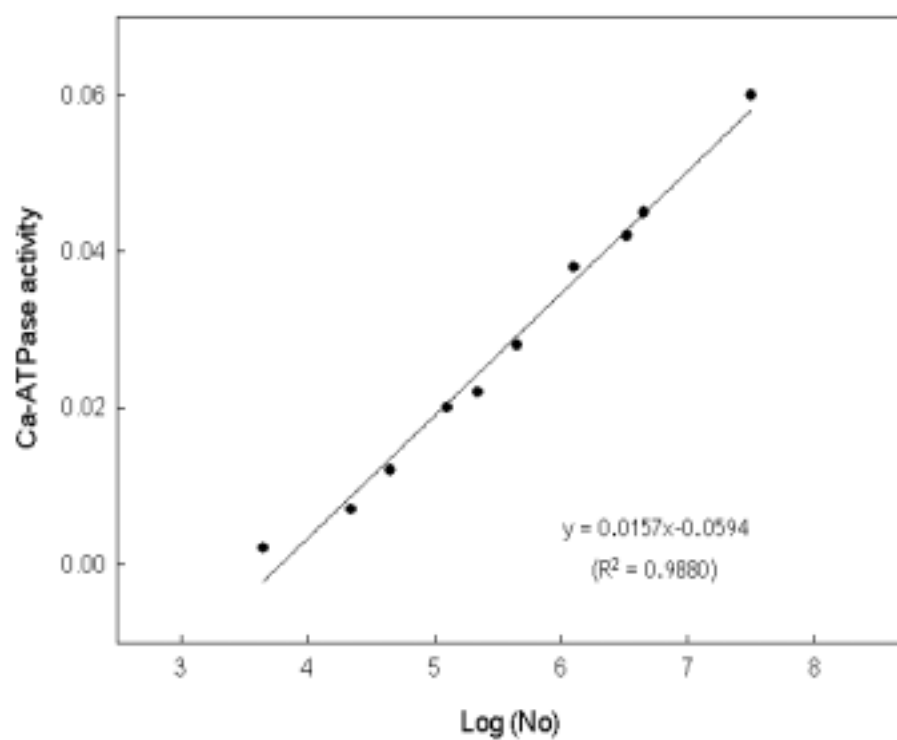


Fig. 46. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from rock fish(n = 10).

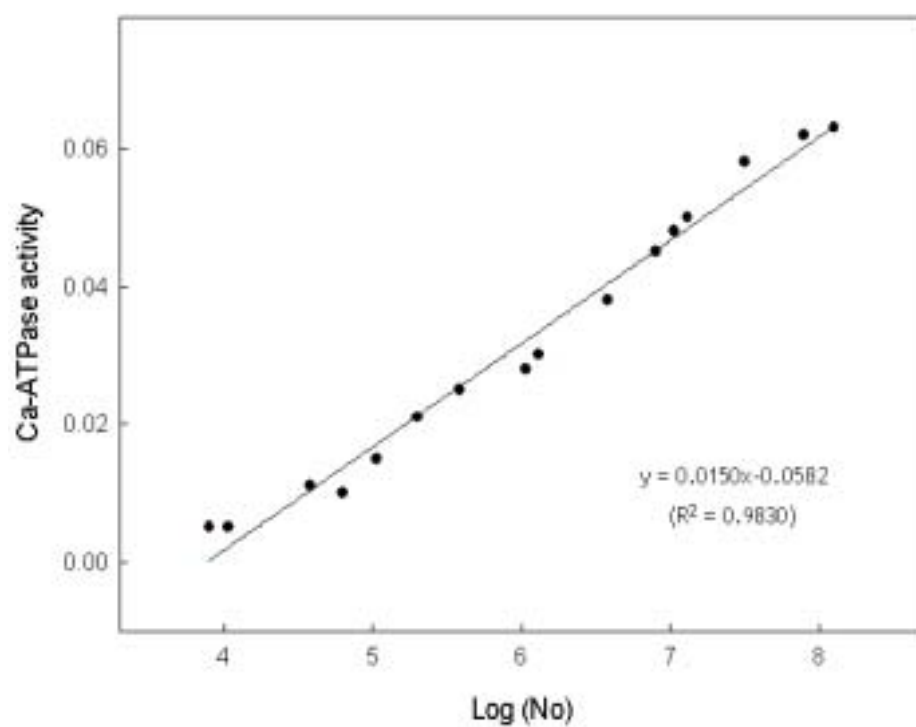


Fig. 47. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from Japanese Spanish markerel(n = 16).

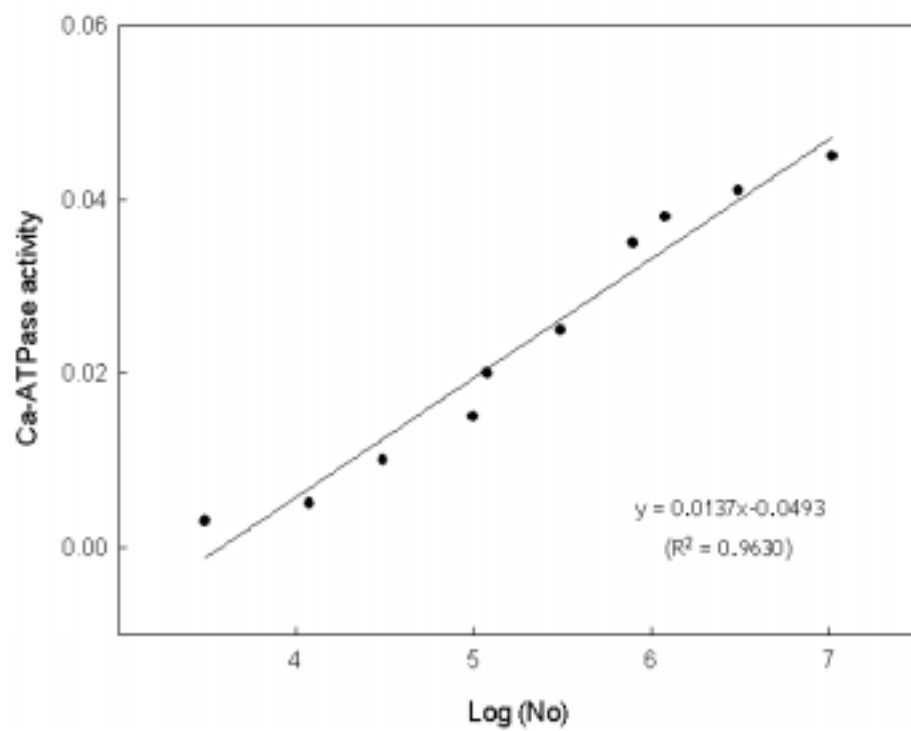


Fig. 48. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from markerel(n = 10).

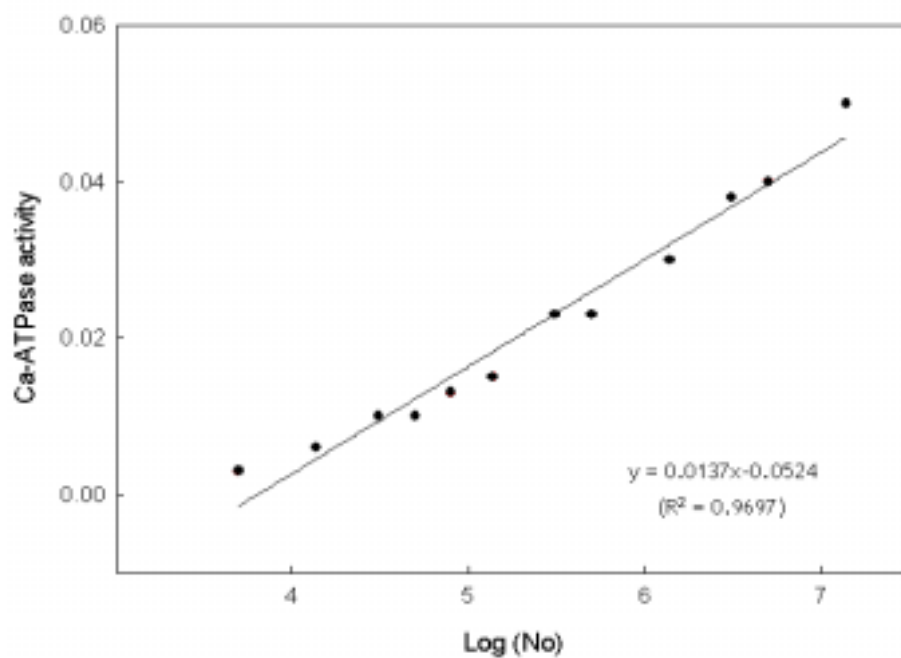


Fig. 49. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from salmon(n = 12).

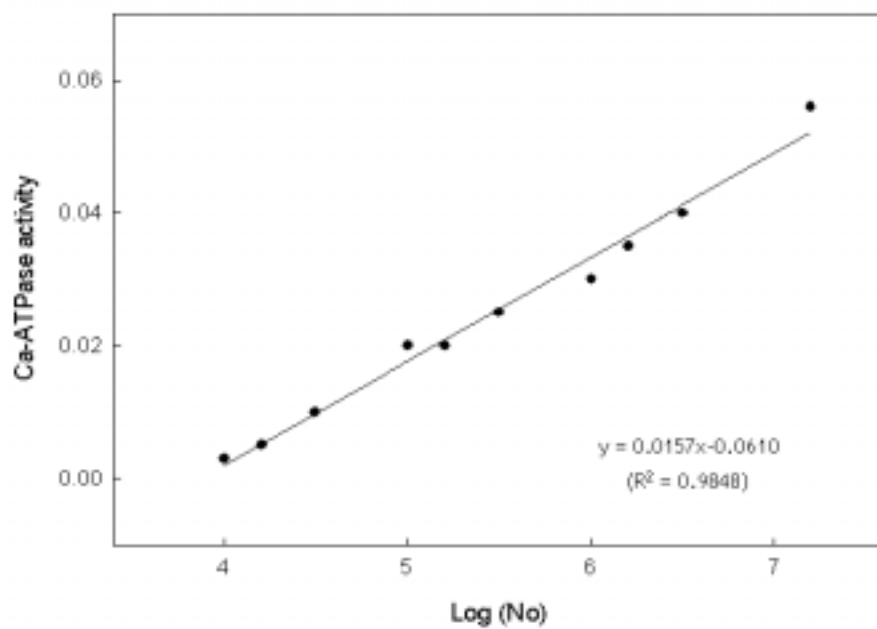


Fig. 50. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from squid(n = 10).

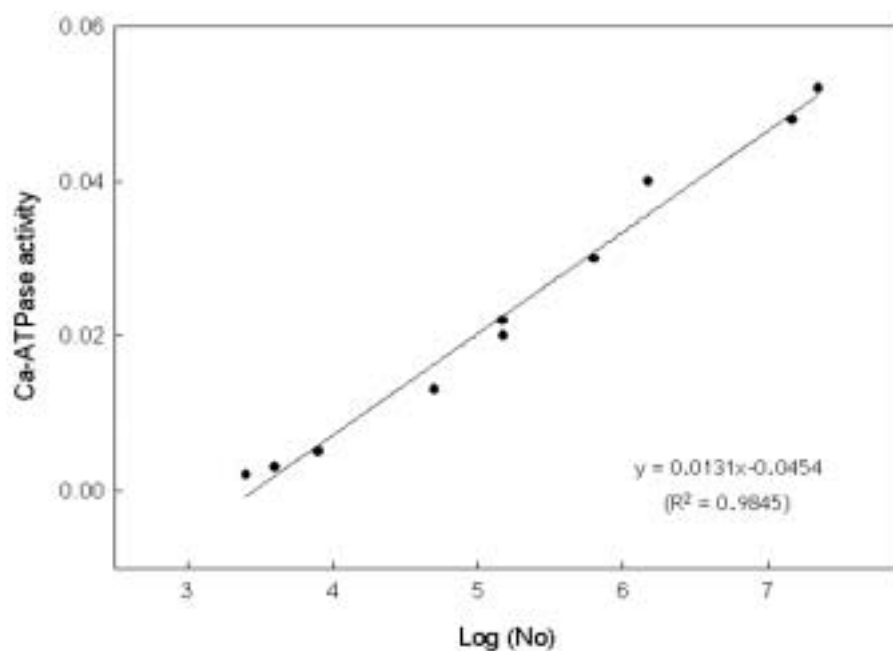


Fig. 51. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from saury(n = 10).

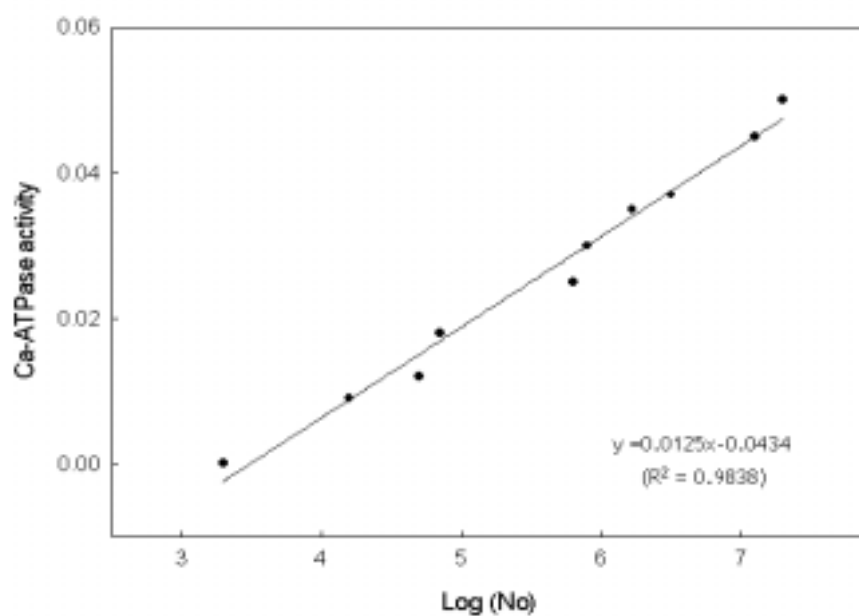


Fig. 52. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from mud snail(n = 10).

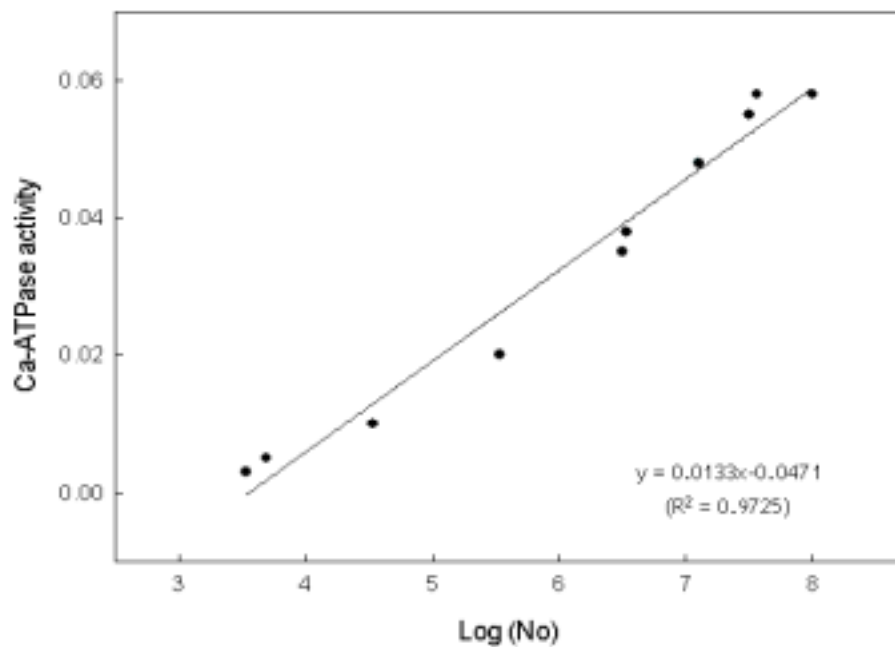


Fig. 53. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from hair tail(n = 10).

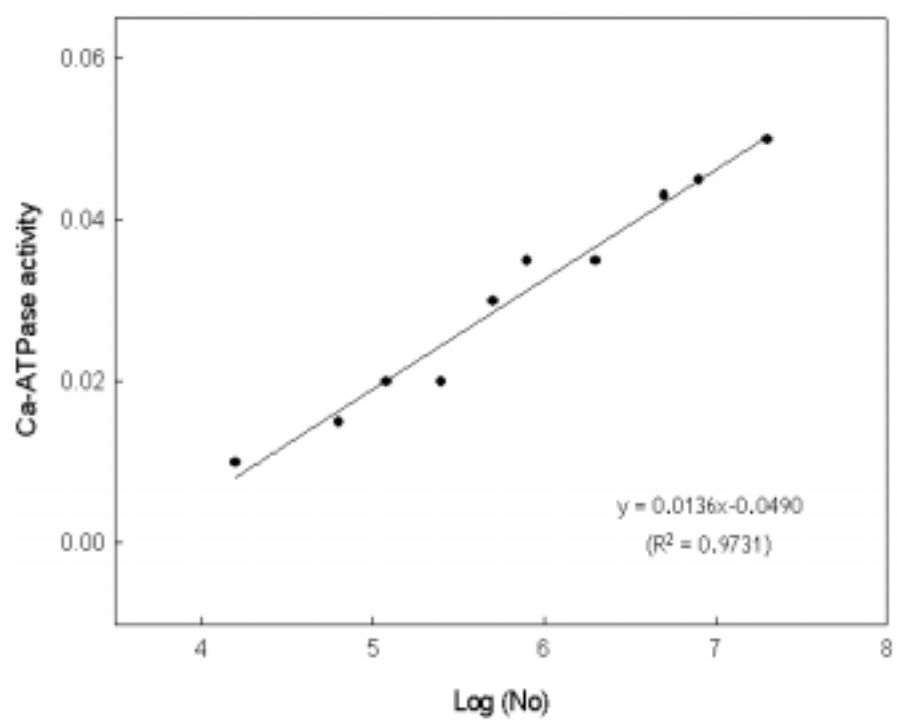


Fig. 54. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from flunder(n = 10).

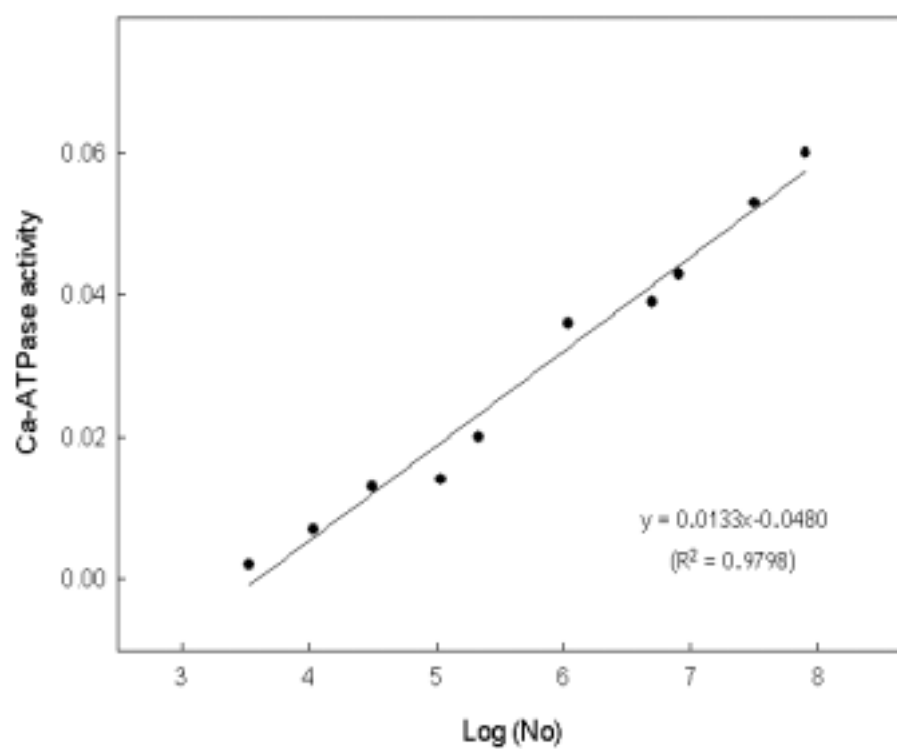


Fig. 55. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from cod(n = 10).

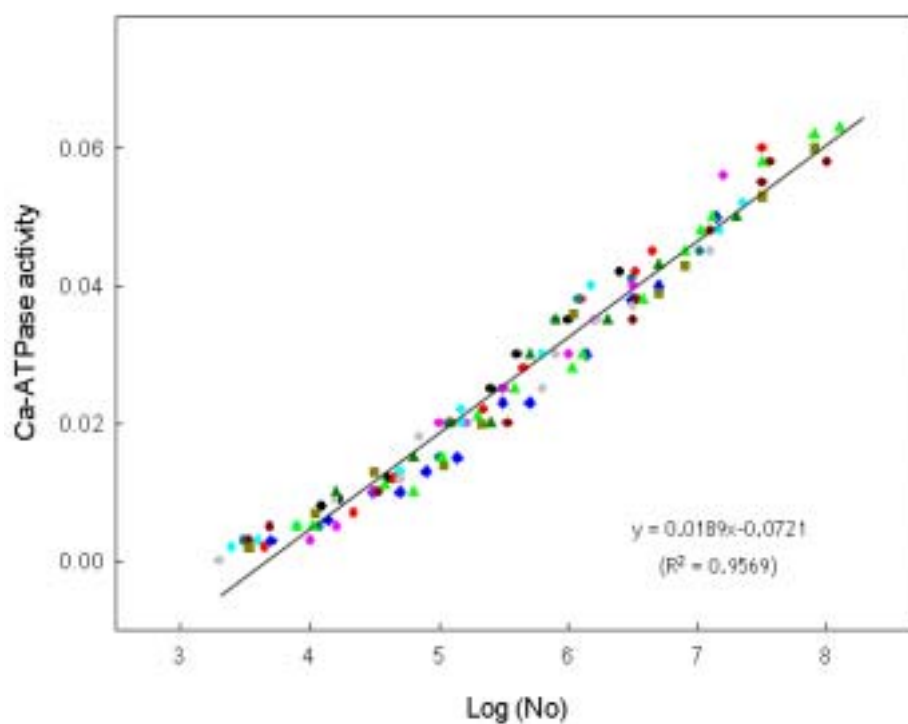


Fig. 56. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from fish species.

- Pollack (n=10) ● Armor-clad rock fish (n=10) ● Squid (n=10)
- ▲ Japanese Spanish Mackerel (n=16) ● Mackerel (n=10)
- Saury (n=10) ◆ Salmon (n=12) ● Hair tail (n=10)
- ▲ Flounder (n=10) ● Mud snail (n=10) ■ Cod (n=10)

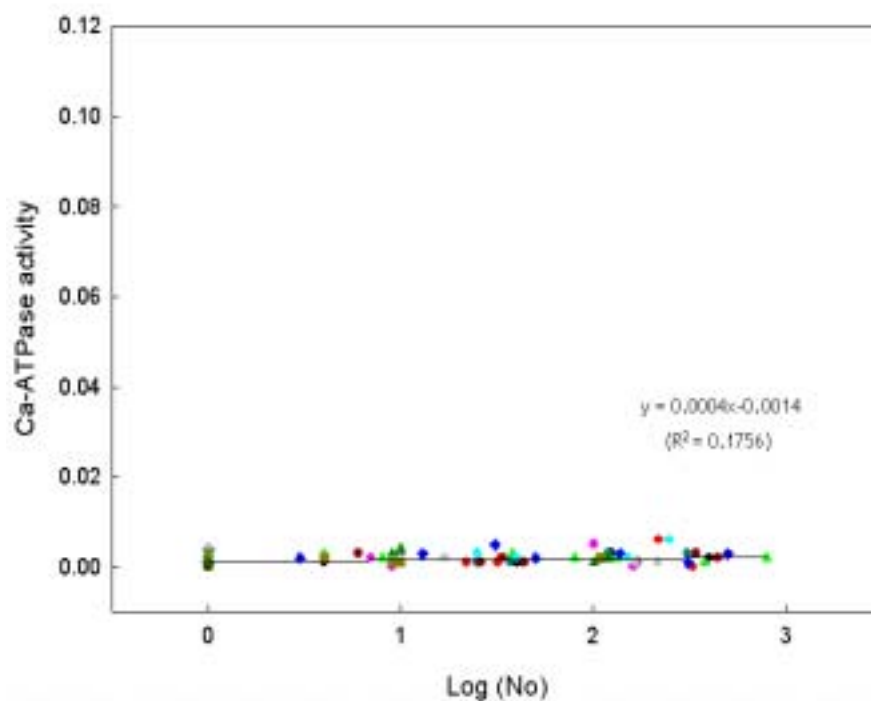


Fig. 57. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from meat species.

- Pollack (n=10) ● Armor-clad rock fish (n=10) ● Squid (n=10)
- ▲ Japanese Spanish Mackerel (n=16) ● Mackerel (n=10)
- Saury (n=10) ◆ Salmon (n=12) ● Hair tail (n=10)
- ▲ Flounder (n=10) ● Mud snail (n=10) ■ Cod (n=10)

3) 야채류의 미생물 측정

야채류는 배추 외 23종(Fig. 58~83)을 채취하여 실험에 사용하였으며, 시료와 멸균수를 stomacher bag에 넣고 stomacher에서 1분 동안 처리하였다. 이를 10진법에 의해 희석하여 평판 배양법에 의한 총균수를 구했다. 또한 각 시료의 Ca-ATPase activity에 의한 방법에 의한 미생물을 측정하였다. 이는 3반복 이상 실험하여 평균값을 구했으며, 채취 후 다양한 균수의 식품으로 변화시켜 측정하기 위해 야채류를 25℃에서 1주일간 보관하면서 실험에 사용하였다.

평판배양법에 의한 미생물 총균수 측정값과 Ca-ATPase activity 방법에 의한 측정치를 비교한 결과, 총균수에 따라 Ca-ATPase activity 측정치가 달라지는 경향을 보였다. 이는 전체적으로 총균수 10^3cfu/mL 의 경우에서만 유효한 결과였다. 야채류의 경우, 육류와 어패류에 비해 대체적으로 낮은 기울기값을 보였으나, 모든 야채류가 비슷한 경향의 그래프를 나타내어 일정한 경향의 상관식을 산출할 수 있었다. 또한 시료별로 평판 배양법에 의한 값과 Ca-ATPase activity 방법에 의한 수치가 크게 벗어나지 않아서, R^2 은 0.9709~0.9925까지 높은 수치를 나타내었다. 따라서, 이들 야채류의 총균수가 10^3cfu/mL 이상일 경우의 실험치를 하나의 식으로 하여도 문제가 없는 것으로 판단되었으며, 따라서 야채류를 모두 하나로 하여 두 방법 간의 관계식을 검토한 결과 $y=0.0052x-0.0158$ 의 관계식을 산출할 수 있었으며, 이 때 상관계수 $R^2 = 0.9554$ 로 높은 상관관계를 나타내었다. 반면, 야채류의 총균수가 10^3cfu/mL 이하일 경우, 평판 배양법과 Ca-ATPase 활성법에 의한 사이에서는 $y=0.0005x-0.001$, $R^2 = 0.3466$ 으로 매우 낮은 값을 보여 상관관계는 인정되지 않았다.. 따라서, 야채류의 경우에 있어서도 총균수가 10^3cfu/mL 이상일 경우에만 식을

적용하는 것이 가능하며, 이 식을 적용함으로써 야채류의 총균수를 신속하게 측정할 수 있을 것으로 사료되었다.

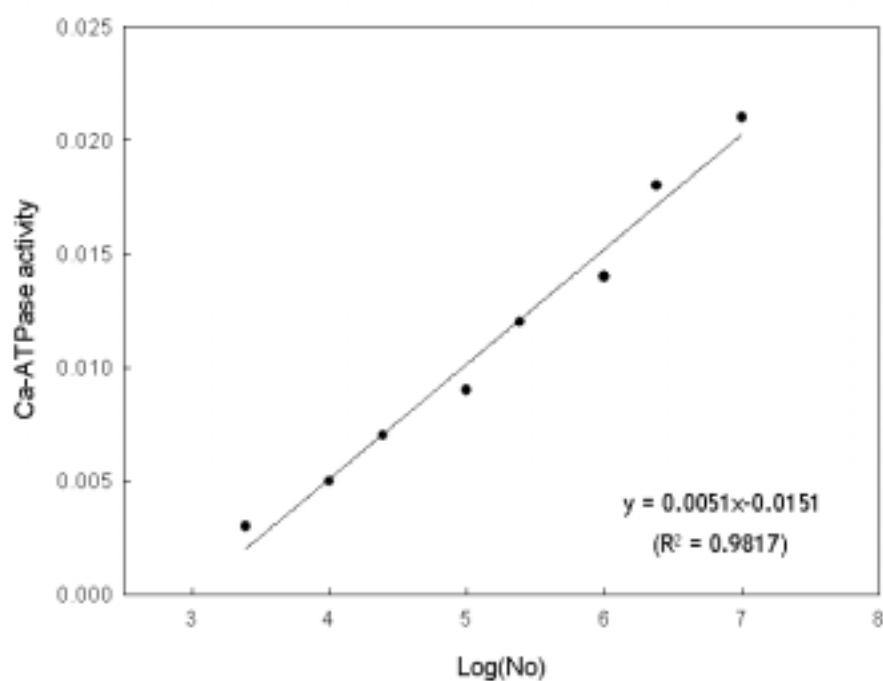


Fig. 58. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from pigweed herb(n = 8).

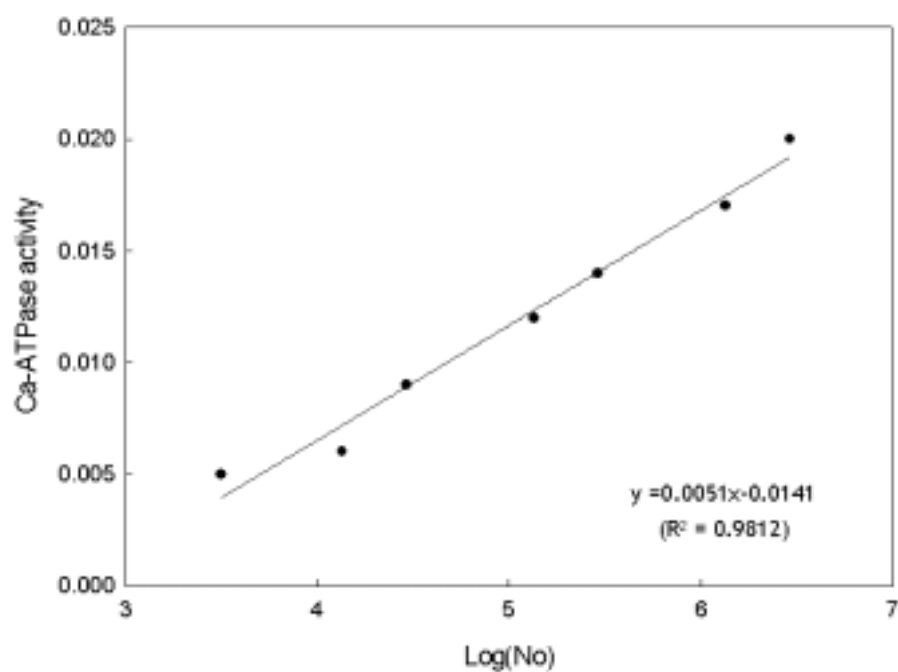


Fig. 59. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from sedum(n = 7).

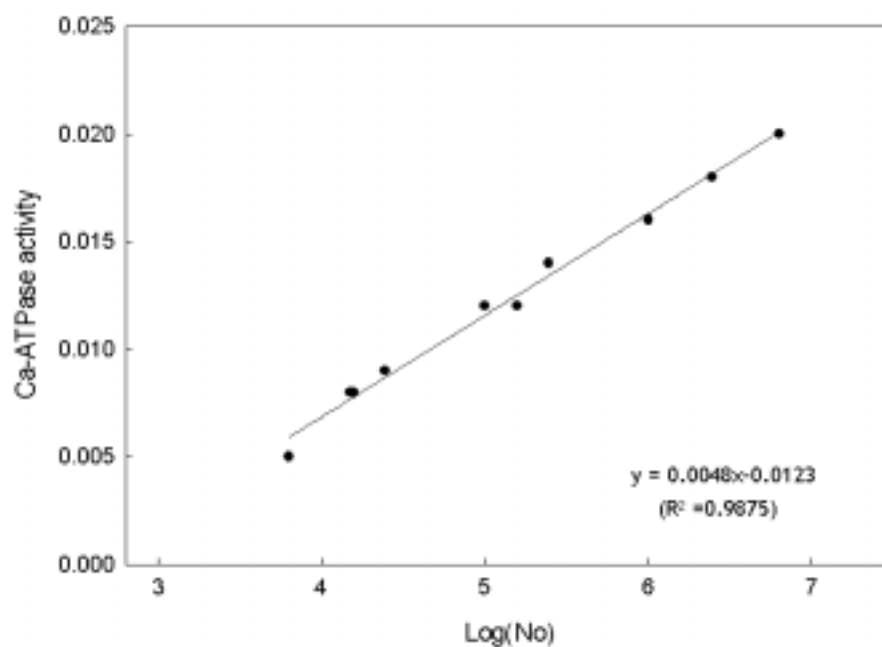


Fig. 60. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from broccoli(n = 10).

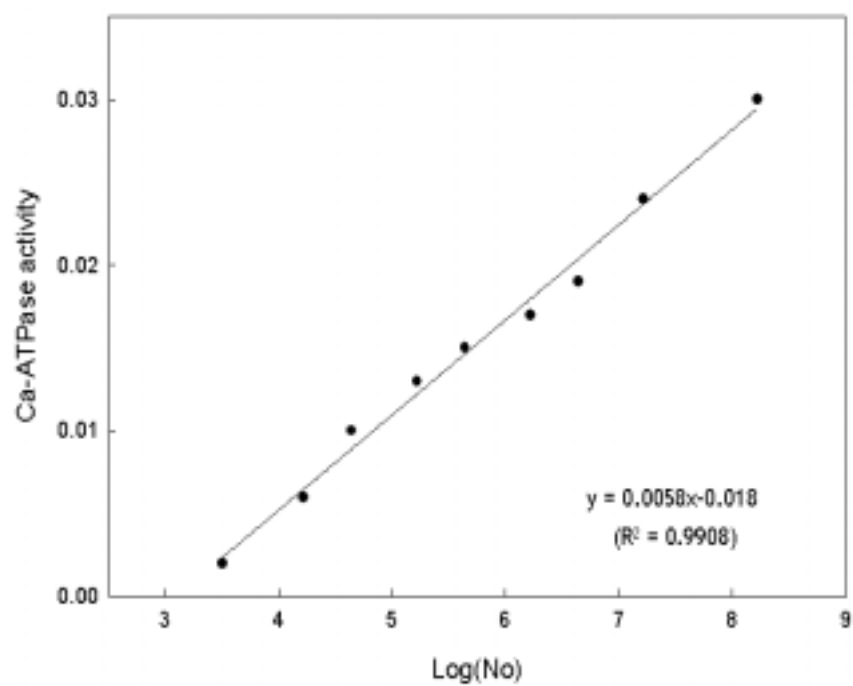


Fig. 61. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from lettuce(n = 9).

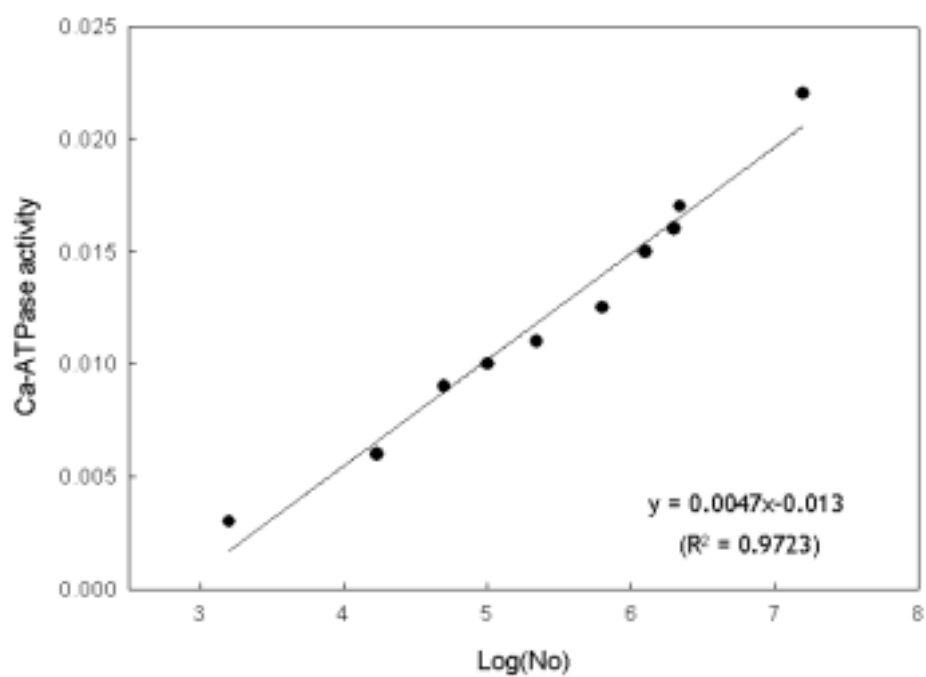


Fig. 62. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from dropwort(n = 10).

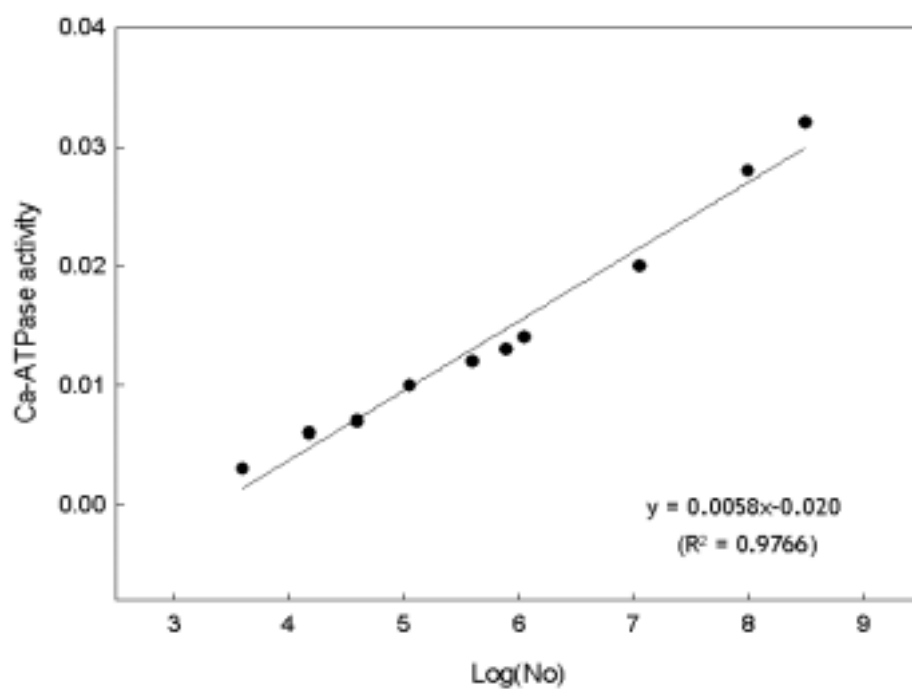


Fig. 63. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from minicarrot(n = 10).

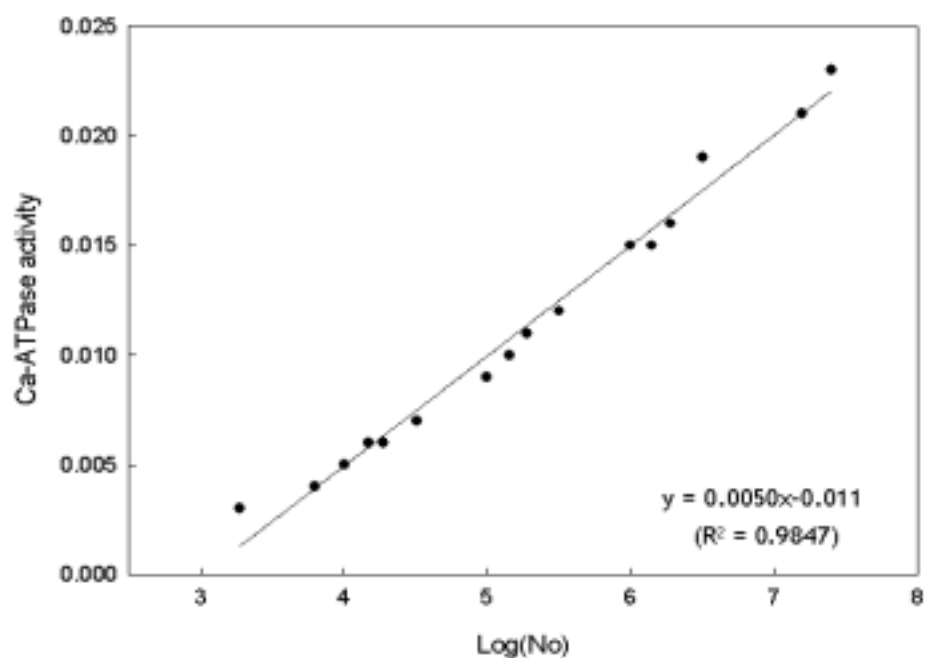


Fig. 64. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from crown daisy(n = 16).

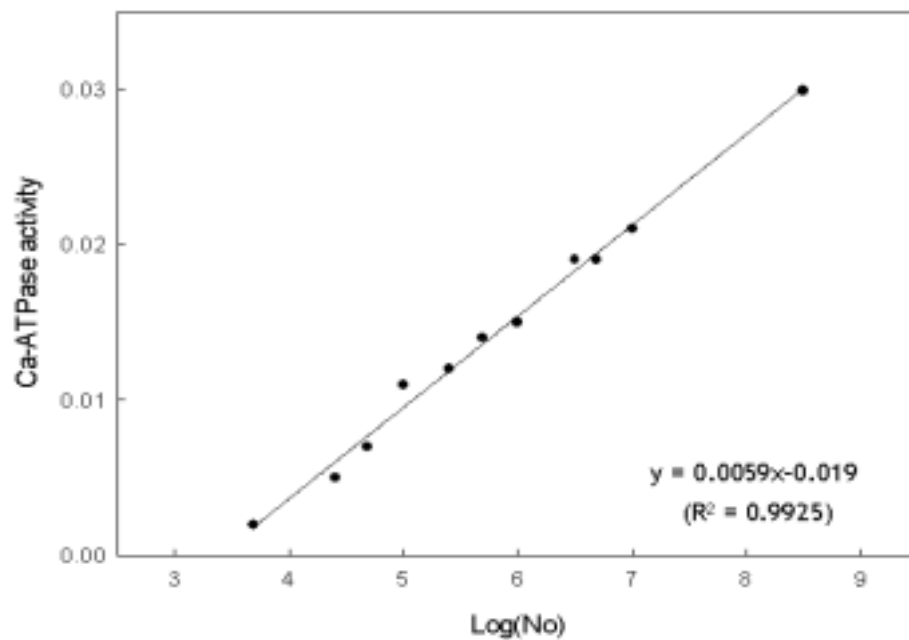


Fig. 65. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from bean sprout(n = 11).

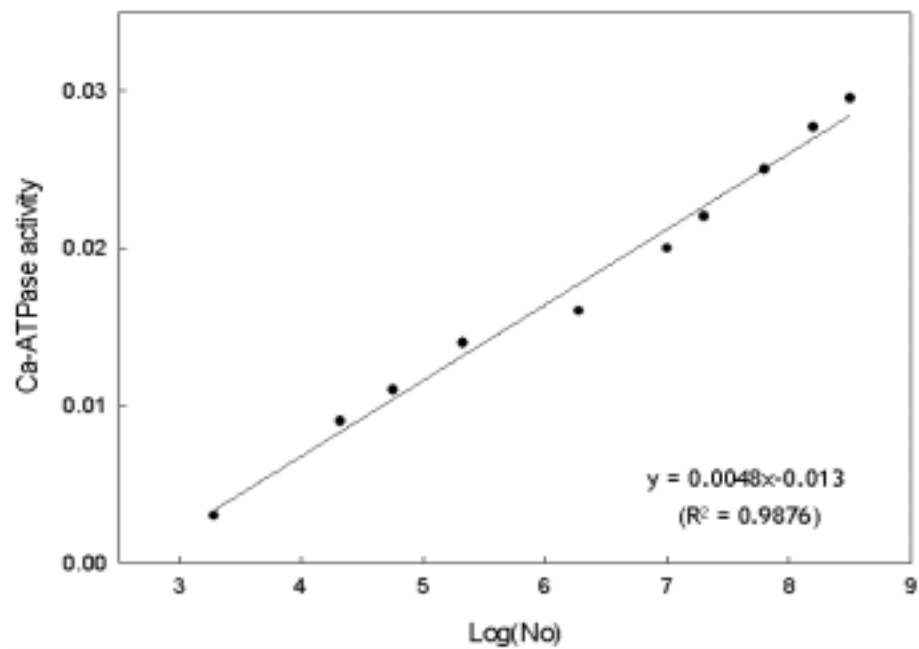


Fig. 66. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from garlic(n = 10).

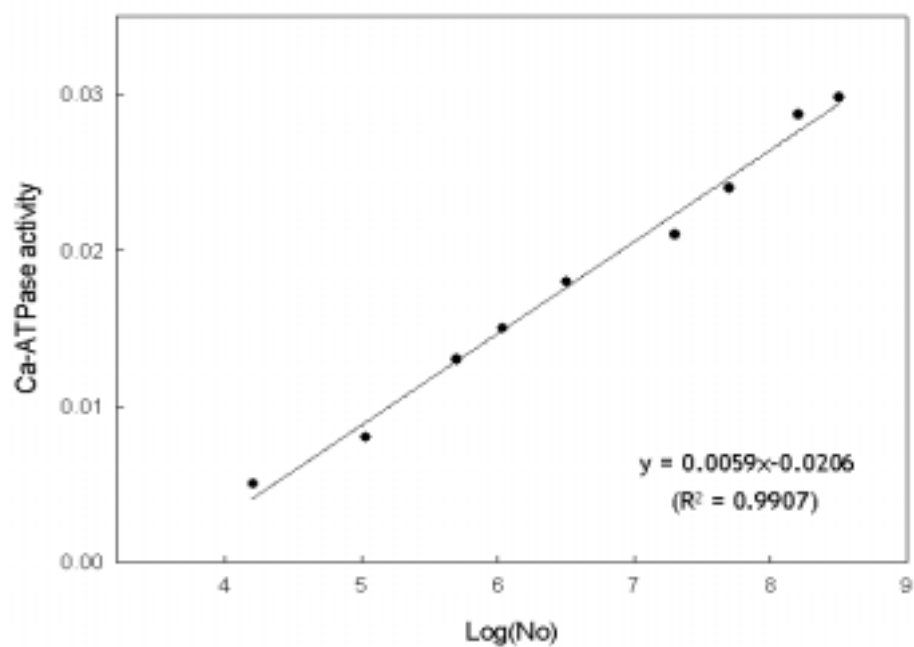


Fig. 67. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from chinese cabbage(n = 9).

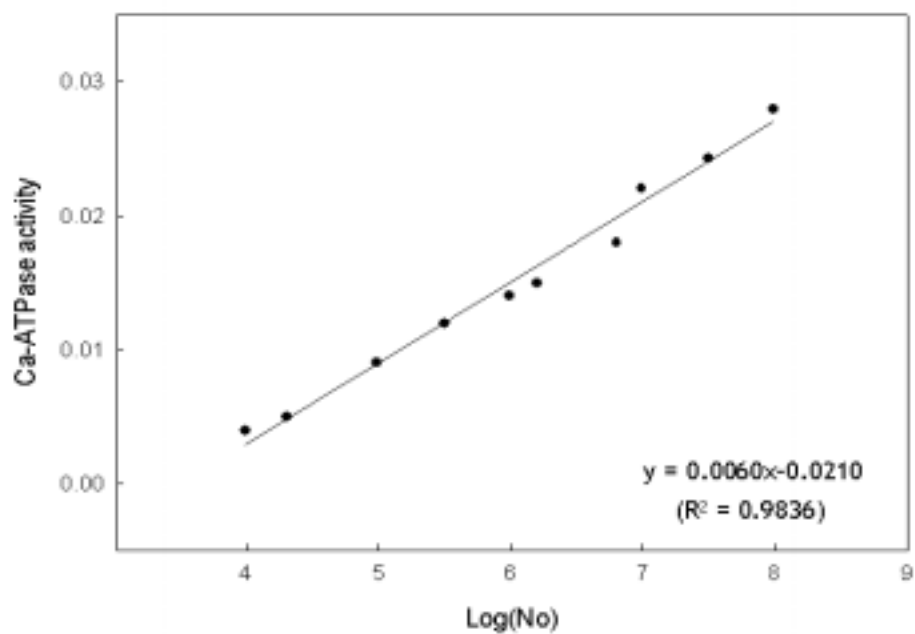


Fig. 68. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from cabbage(n = 10).

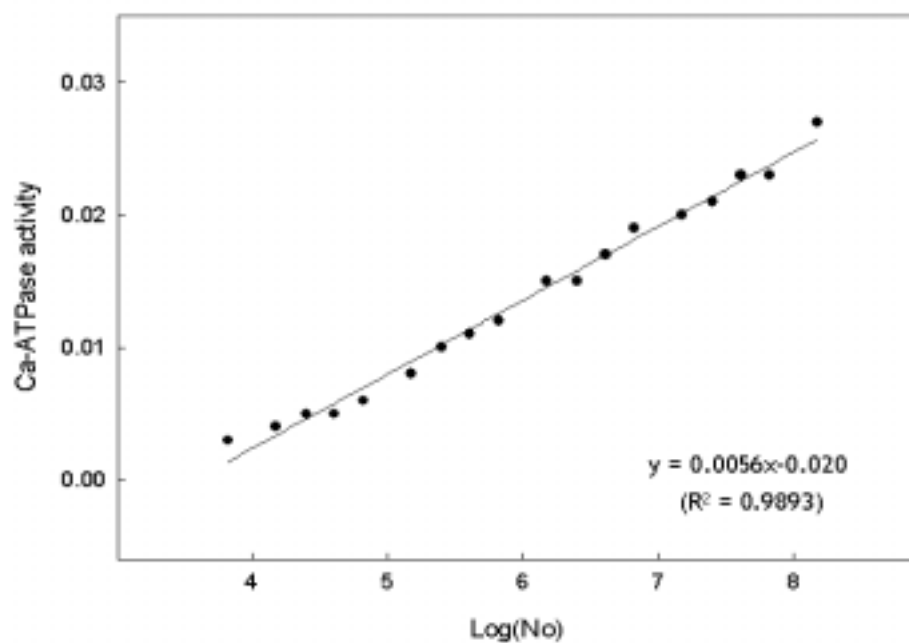


Fig. 69. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from edible sprout(n = 18).

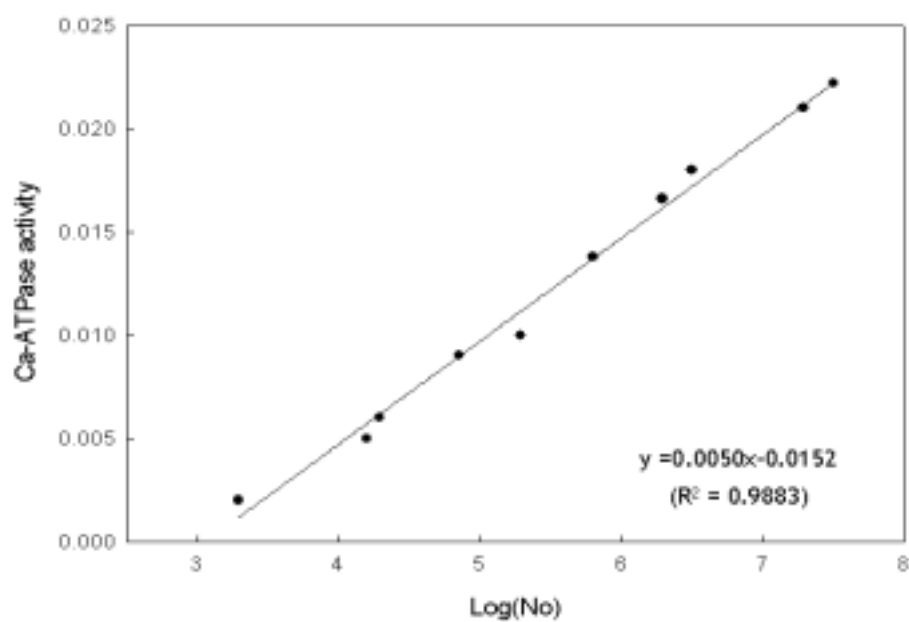


Fig. 70. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from leek(n = 10).

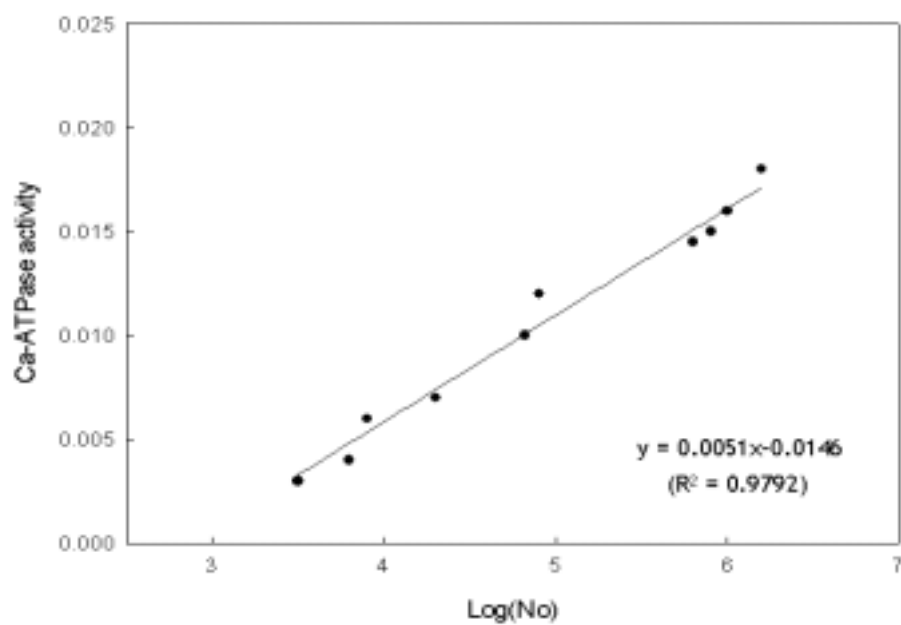


Fig. 71. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from fatsia shoot(n = 10).

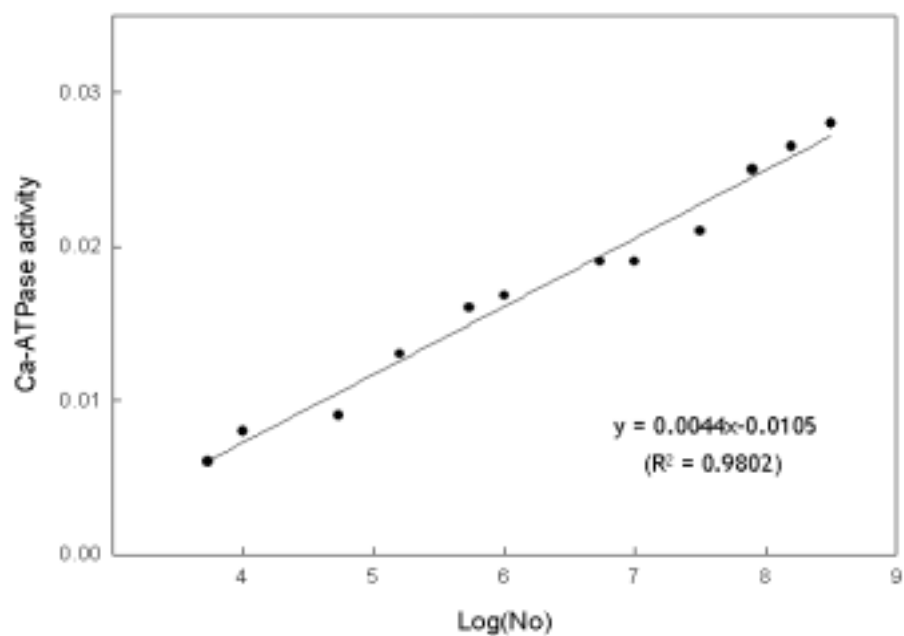


Fig. 72. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from spring onion(n = 12).

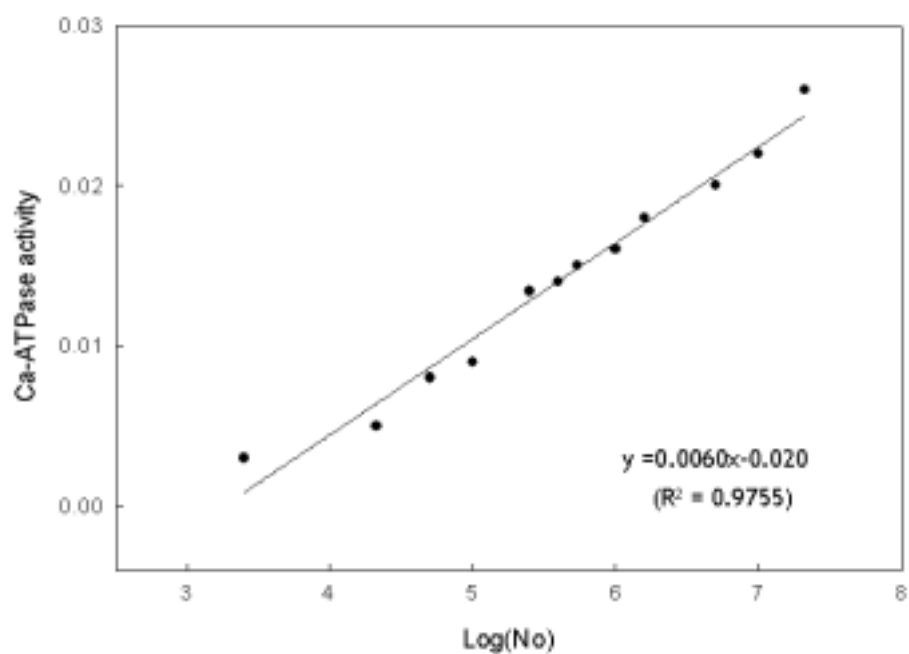


Fig. 73. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from carrot(n = 12).

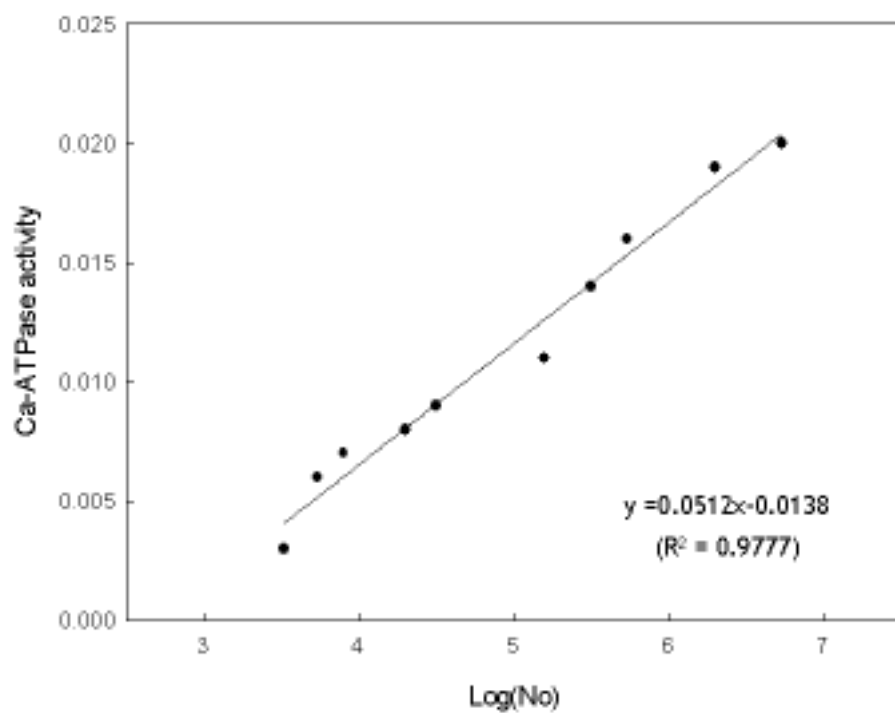


Fig. 74. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from paprika(n = 10).

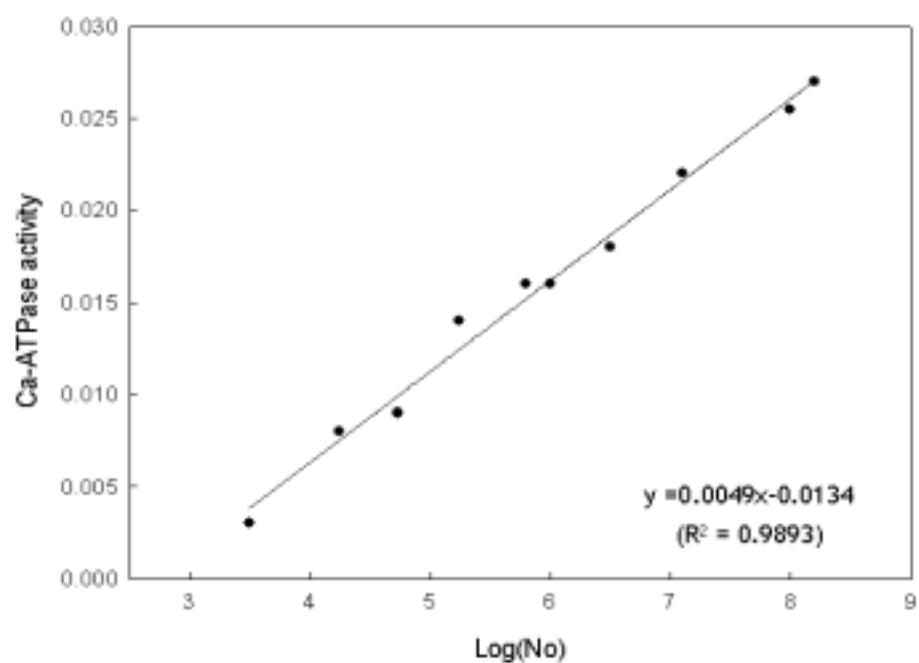


Fig. 75. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from spinach(n = 10).

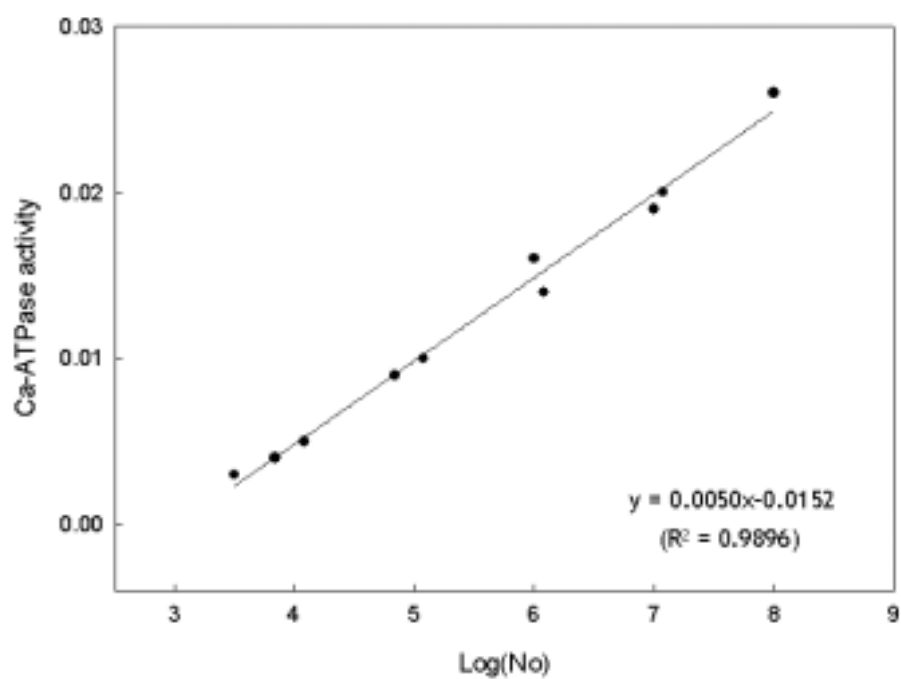


Fig. 76. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from sesame leaf(n = 10).

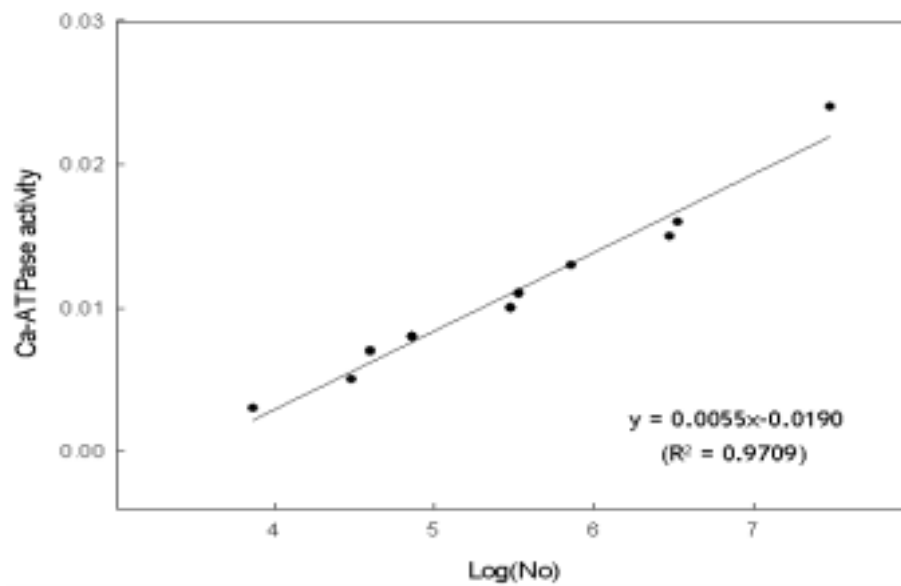


Fig. 77. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from pak choi(n = 10).

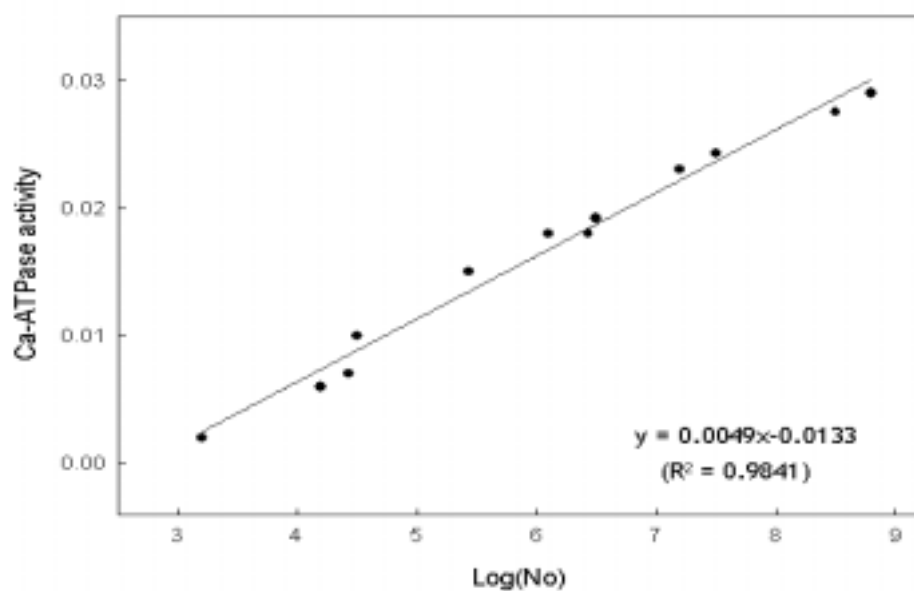


Fig. 78. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from grown cabbage(n = 12).

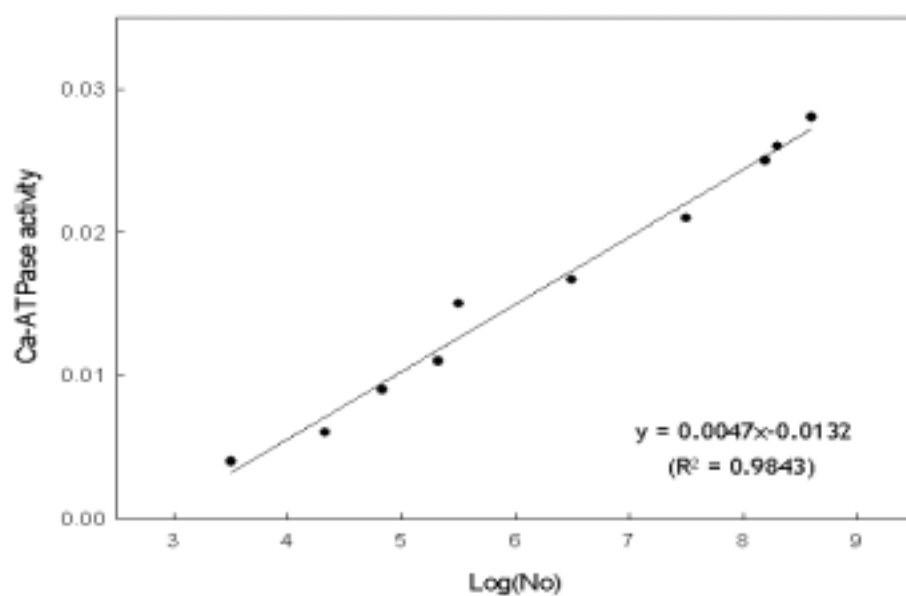


Fig. 79. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from onion(n = 10).

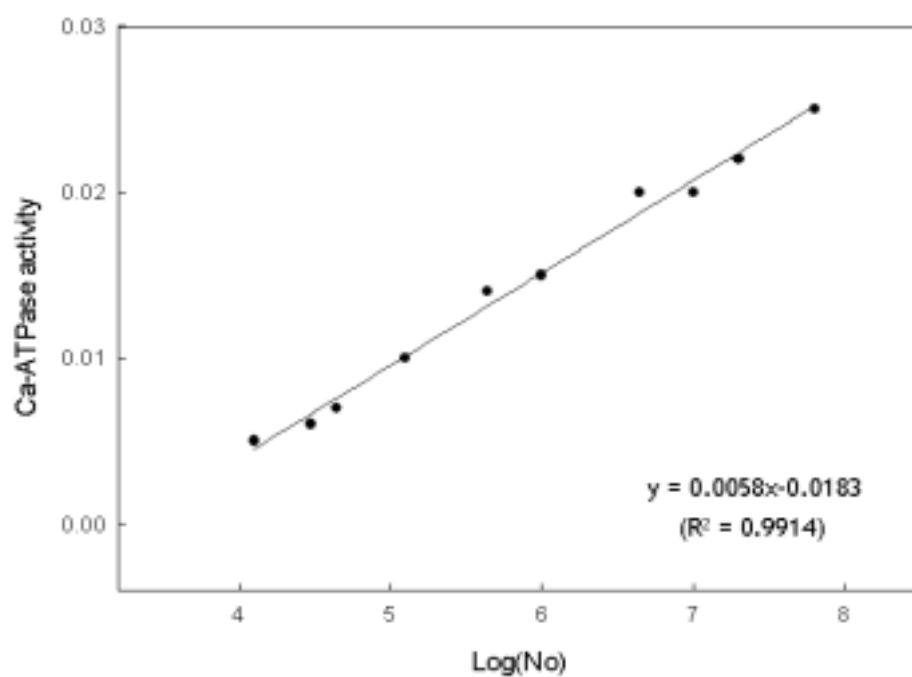


Fig. 80. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from cucumber(n = 10).

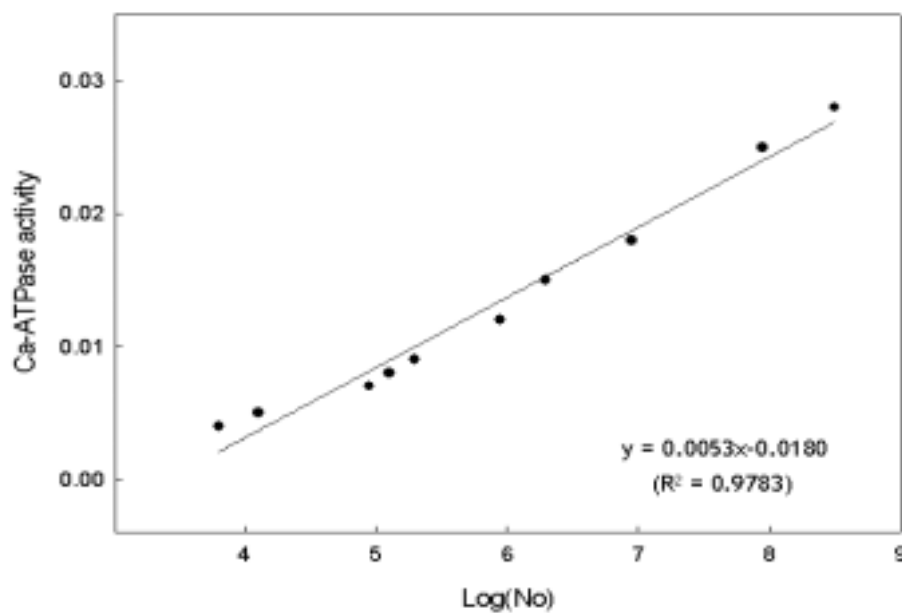


Fig. 81. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from shepherd's purse (n = 10).

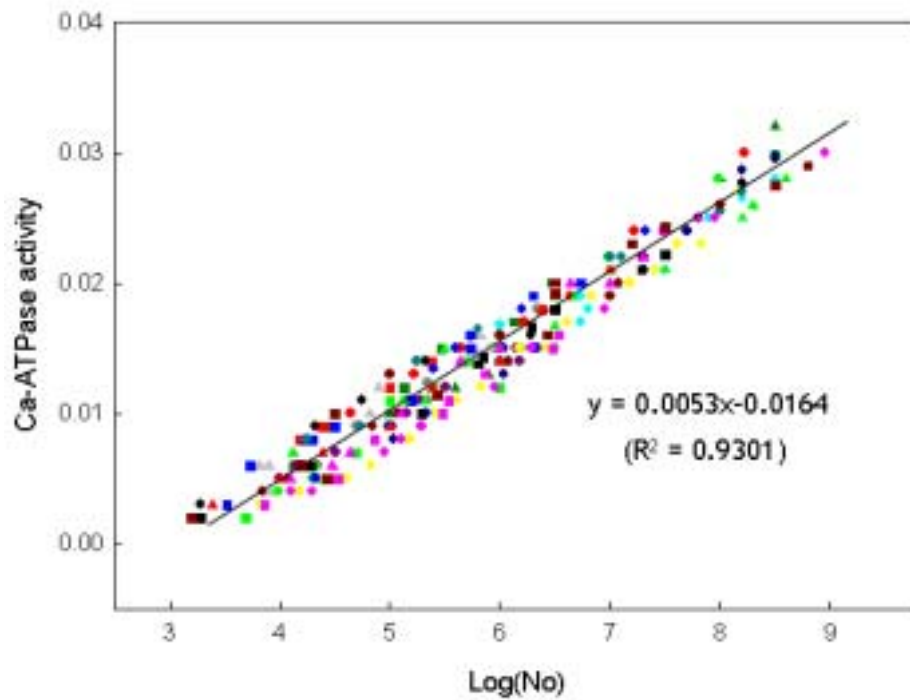


Fig. 82. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from vegetables species.

- ▲ Green bean sprouts (n=10) ■ Sedum (n=10) ■ Broccoli (n=10)
- Lettuce (n=10) ● Dropwort (n=10) ▲ Mini carrot (n=10)
- Crown daisy (n=16) ■ Bean sprout (n=11) ● Garlic (n=10)
- Chinese cabbage (n=10) ● Cabbage (n=11) ● Edible sprout (n=18)
- Leek (n=10) ▲ Fasia shoots (n=10) ● Spring onion (n=12)
- Carrot (n=12) ■ paprika (n=10) ● Spinach (n=10)
- Sesame leaf (n=10) ■ Pak choi (n=10) ■ Grown cabbage (n=12)
- ▲ Onion (n=10) ▲ Cucumber (n=10) ● Shepherd's purse (n=10)

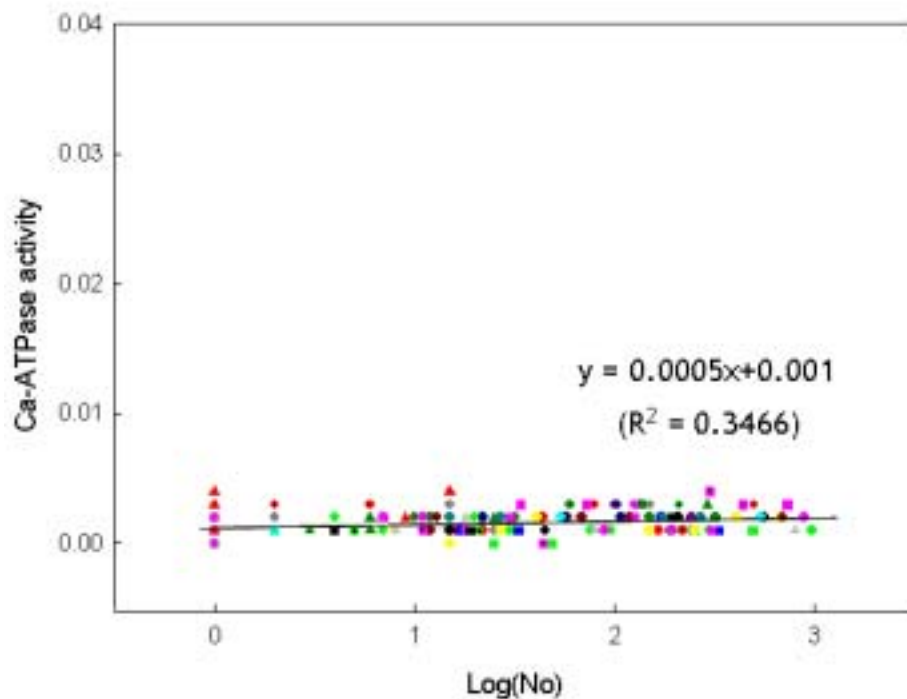


Fig. 83. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from vegetables.

- ▲ Green bean sprouts (n=10) ■ Sedum (n=10) ■ Broccoli (n=10)
- Lettuce (n=10) ● Dropwort (n=10) ▲ Mini carrot (n=10)
- Crown daisy (n=16) ■ Bean sprout (n=11) ● Garlic (n=10)
- Chinese cabbage (n=10) ● Cabbage (n=11) ● Edible sprout (n=18)
- Leek (n=10) ▲ Fasia shoots (n=10) ● Spring onion (n=12)
- Carrot (n=12) ■ paprika (n=10) ● Spinach (n=10)
- Sesame leaf (n=10) ■ Pak choi (n=10) ■ Grown cabbage (n=12)
- ▲ Onion (n=10) ▲ Cucumber (n=10) ● Shepherd's purse (n=10)

2) 유제품의 미생물 측정

우유와 요쿠르트는 제조사별로 각각 5종씩 구입하여 실험에 사용하였다(Fig. 84~95). 이들은 구입 즉시 일정량 취하여 평판 배양법에 의해 총균수를 구하고 Ca-ATPase activity 측정으로 미생물 함량을 조사하여 비교 검토 하였다. 시중에 판매되는 우유는 살균제품이므로, 위해환경에 노출된 상태를 가정하여 측정하기 위하여 25℃에서 1주일간 보관하면서 실험하였다. 평판 배양법에 의한 미생물 총균수 측정값과 Ca-ATPase activity 방법에 의한 측정치를 비교한 결과, 총균수의 증가와 Ca-ATPase activity 측정값이 비례하는 경향을 보였다. 전체적으로 10^3cfu/mL 이상에서는 증가하는 추세를 나타냈고, 이 때 평판 배양법과 Ca-ATPase activity 방법을 이용하여 측정한 값을 토대로, 두 방법 간에 일정한 경향의 상관식을 산출할 수 있었다. 총균수가 10^3cfu/mL 이상일 때 평판 배양법과 Ca-ATPase activity 방법간의 상관식은 $y=0.0111x-0.0008$ 로 나타낼 수 있었으며, 이 두 방법간에 R^2 는 0.8896으로 나타났다. 또한 총균수가 10^3cfu/mL 이하에서는 총균수와 Ca-ATPase activity 방법의 결과간에 뚜렷한 경향이 나타나지 않았으며, 10^3cfu/mL 이하에서는 $y=0.0004x-0.0014$ 의 식이 산출되었으며, 이 때 R^2 는 0.1756으로 매우 낮은 값을 보였다. 따라서, 유제품의 경우에 있어서도 총균수가 10^3cfu/mL 이상일 경우 위의 식을 적용하여 유제품의 총균수를 신속하게 측정할 수 있을 것으로 사료되었다.

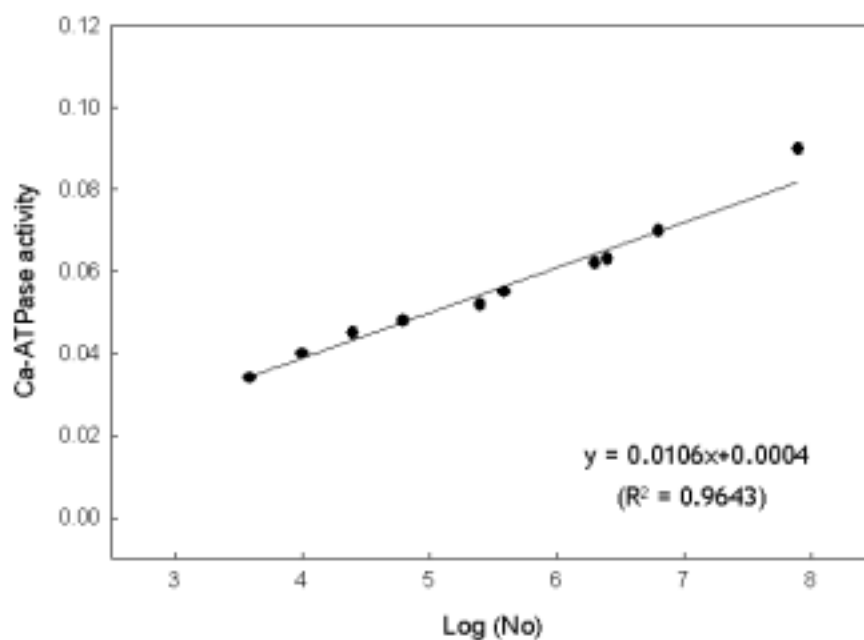


Fig. 84. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from yoghurt of A company (n = 10).

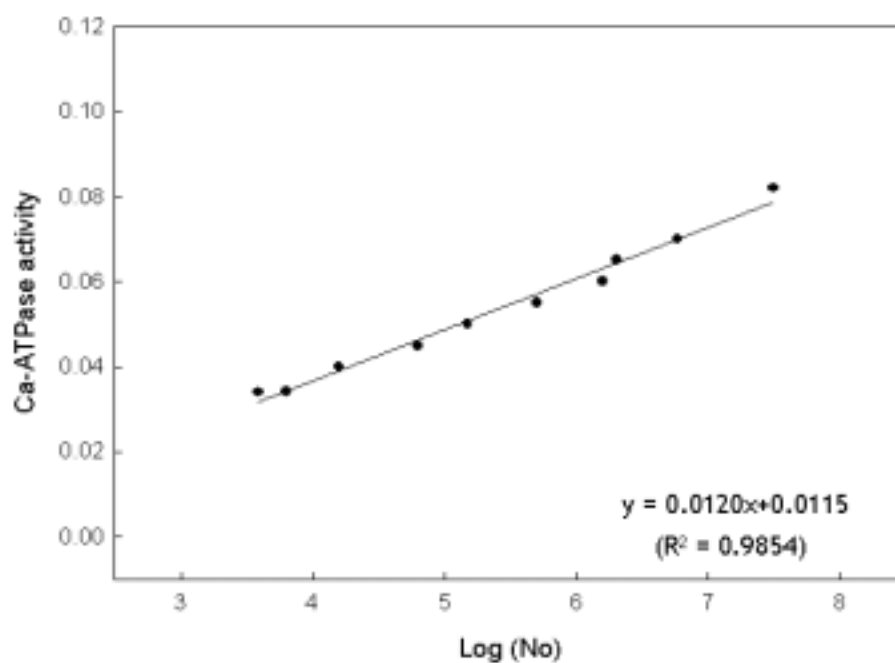


Fig. 85. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from yoghurt of B company (n = 10).

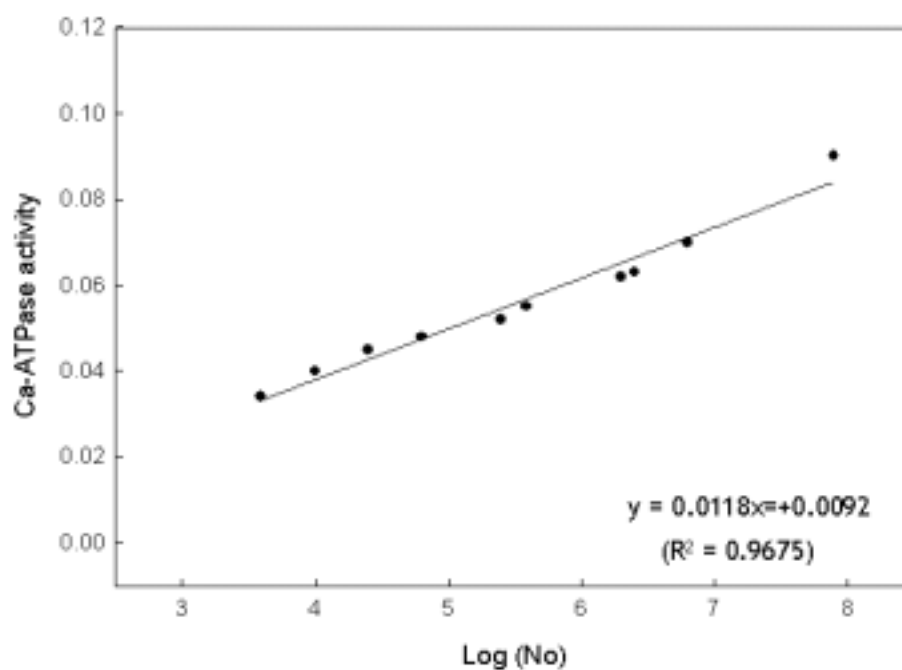


Fig. 86. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from yoghurt of C company(n = 10).

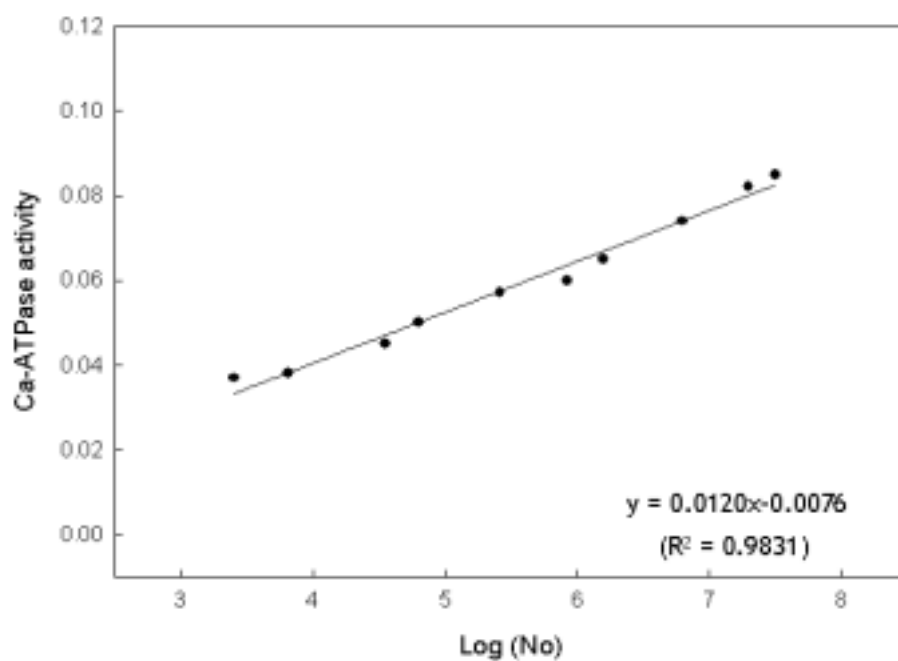


Fig. 87. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from yoghurt of D company (n = 10).

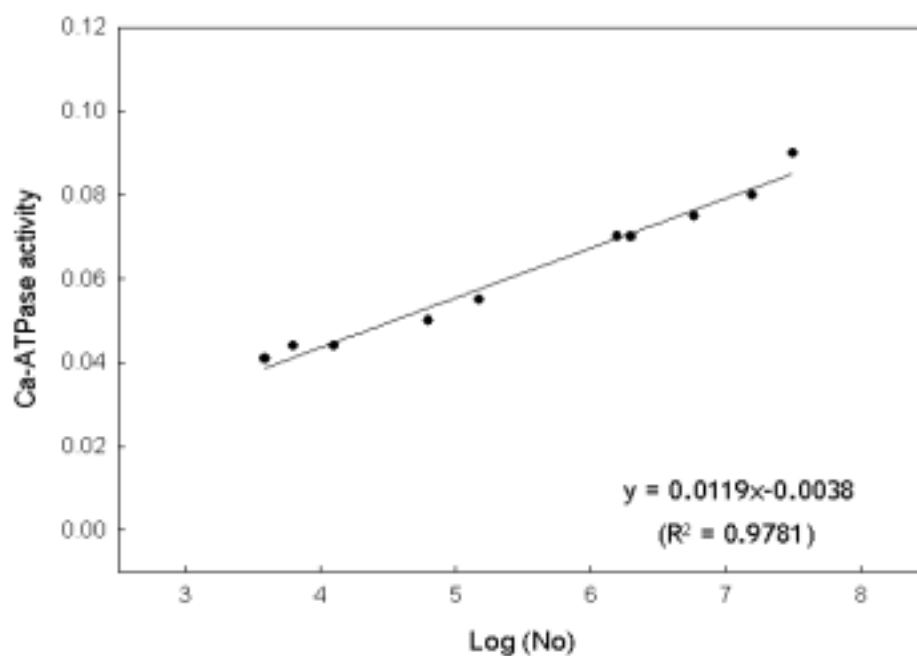


Fig. 88. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from yoghurt of E company(n = 10).

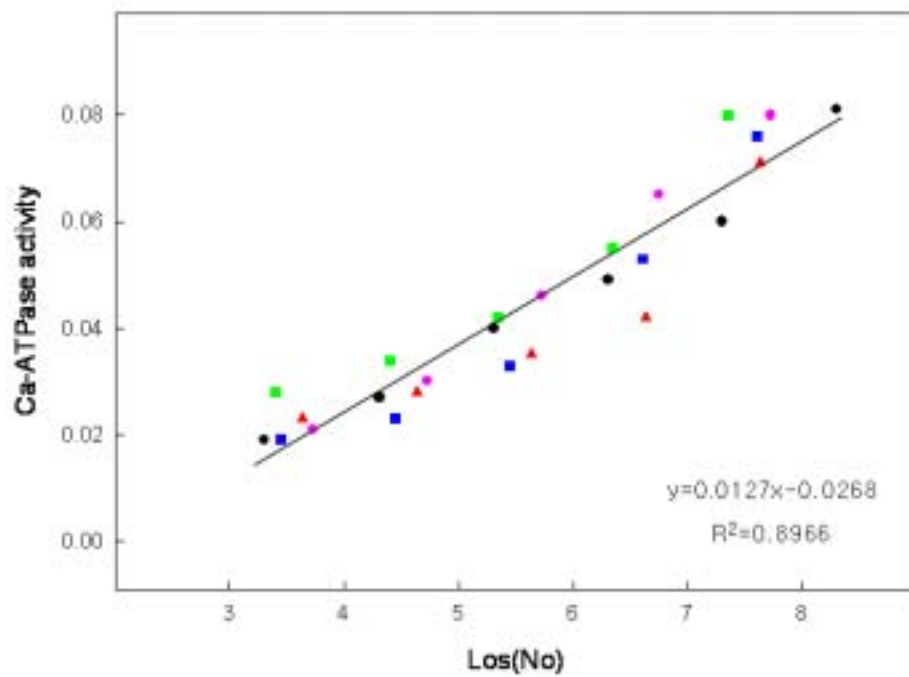


Fig. 89. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from yoghurt of various companies.

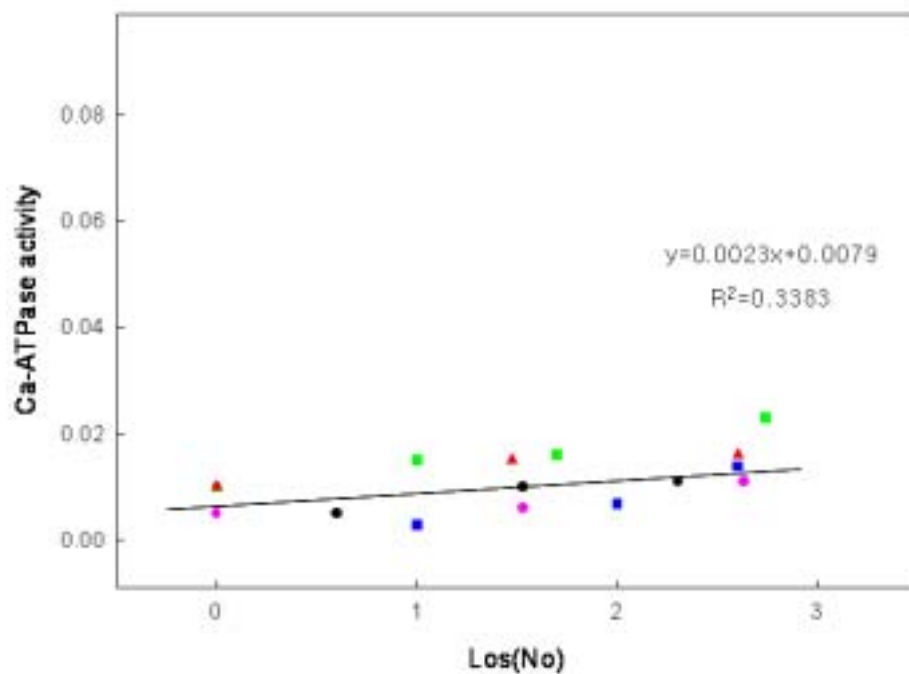


Fig. 90. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from yoghurt of various companies.

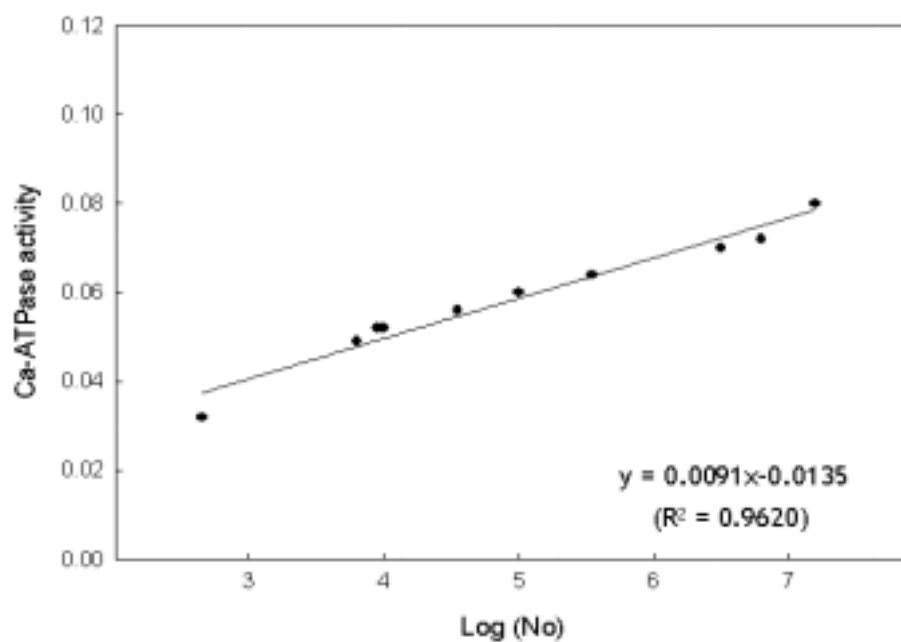


Fig. 91. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from milk of F company (n = 10).

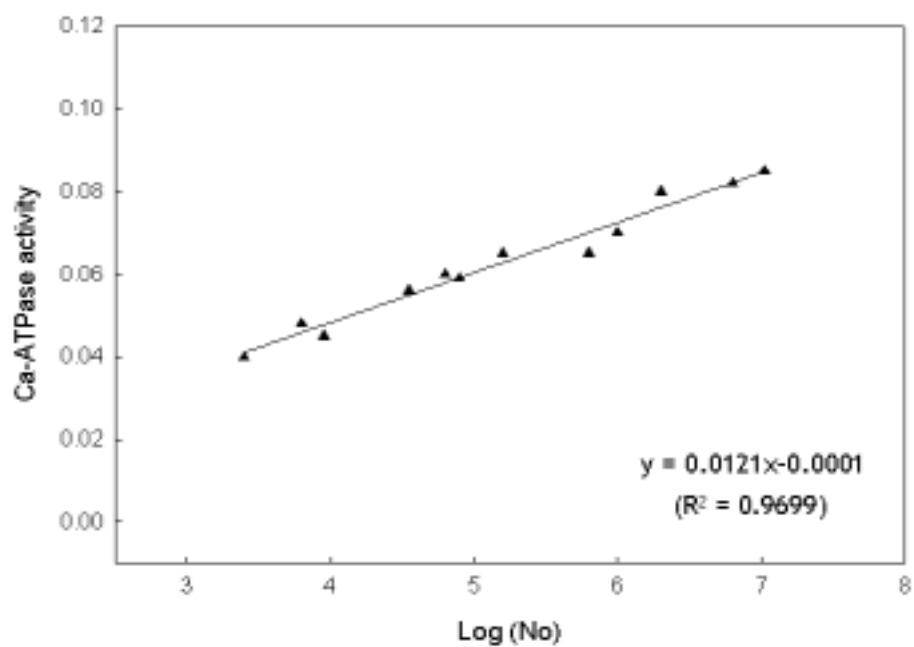


Fig. 92. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from milk of G company (n = 12).

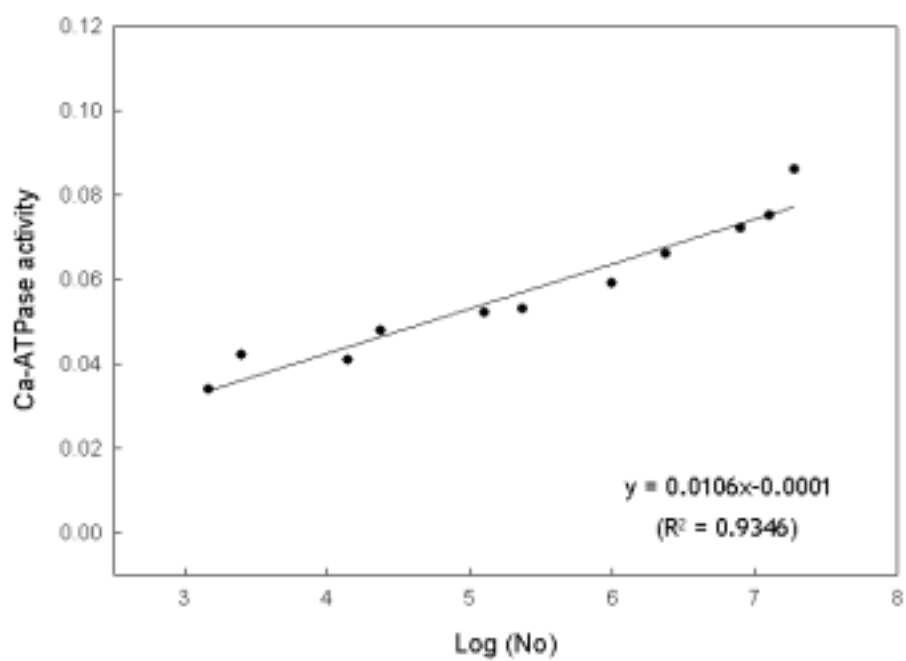


Fig. 93. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from milk of H company(n = 11).

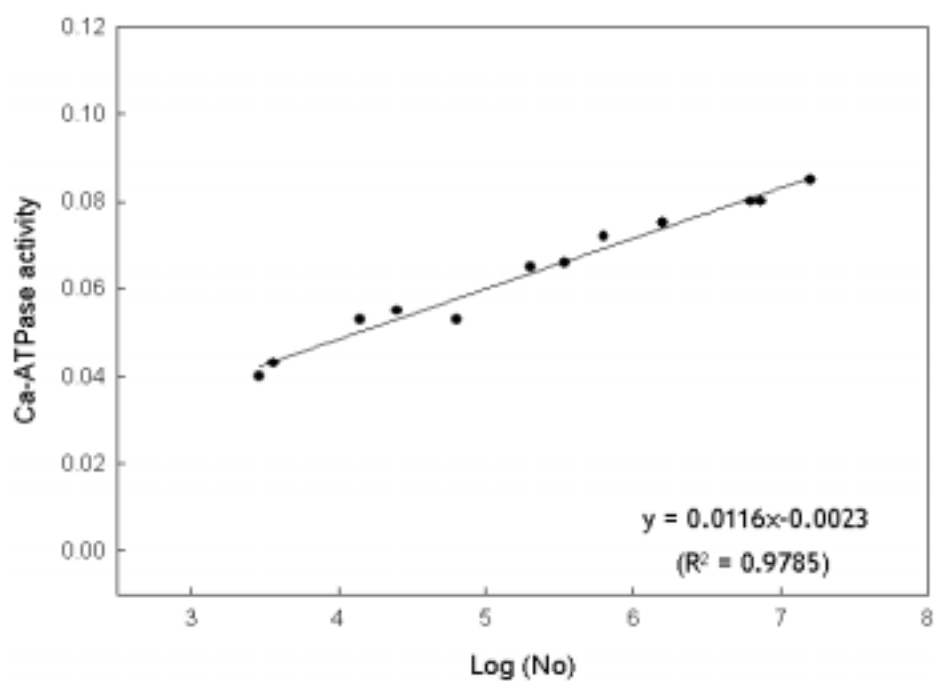


Fig. 94. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from milk of I company(n = 12).

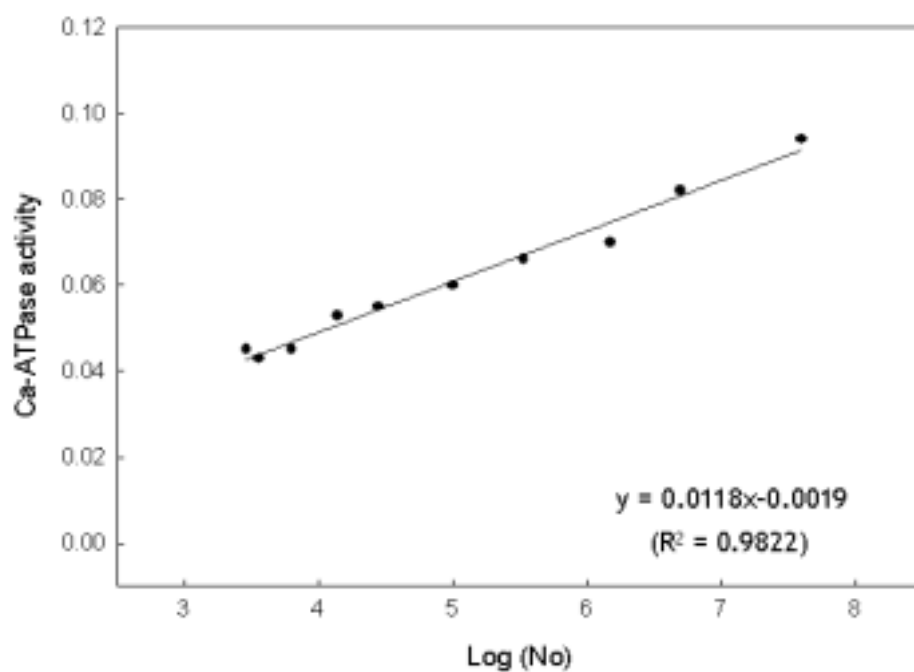


Fig. 95. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from milk of J company (n = 10).

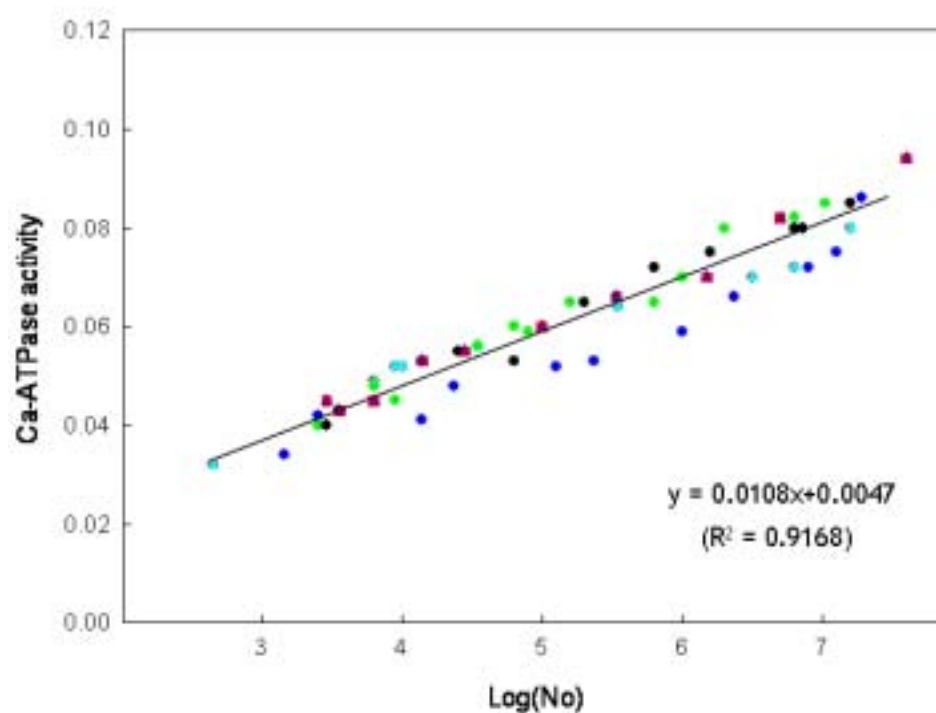


Fig. 96. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from milk of various companies.

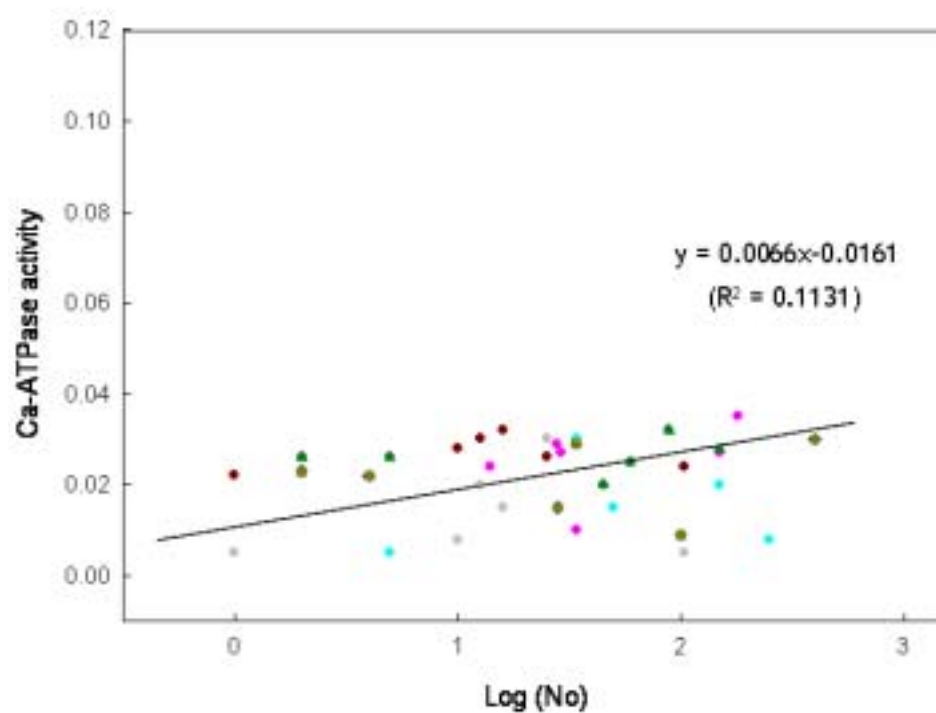


Fig. 97. Relationship between total colony count and Ca-ATPase activity of microorganisms isolated from milk of various companies.

제 2 절 결과 및 고찰 (협동)

1. 각종 미생물 측정기기의 설계도 작성 및 1차 간이 측정기기 개발

Fig. 1 및 2는 미생물 측정기기의 구성 및 설계도를 개략적으로 나타낸 제어회로블록그림이다. Fig. 2에 제시된 바와 같이, 본 발명의 어류 신선도 판정기는 크게 광필터부(10)와, 광신호처리부(20)로 이루어진다. (광원부, 분광부, 신호처리부, 데이터 처리부 로 이루어진다.)

(광원부는 백색광을 발산하는 부분으로써 긴 수명과 광원의 밝기 때문에 텅스텐광을 사용한다.) 상기 광필터부(분광부)(10)는 광을 발산시키는 광발생부(101)와, 이 광발생부(101)로부터 (광원으로부터)발산된 (백색광)과장에서 특정과장만을 통과시키는 밴드패스 필터(102)와, 광발생부(101)에서 발산된 광에 (광원부에서 발산된 백색광)대해 광량변화를 보정하기 위해 두 갈래의 광으로 나누어 진행시키는 빔 스플리터(103)와(로 이루어진다), (신호처리부는)이 빔 스플리터(103)를 통과함과 동시에 시료(104)를 통과한 광을 감지하는 샘플 센서(105)와, 상기 빔 스플리터(103)에서 반사된 광을 감지하는 스플릿 센서(106)와, 상기 샘플 센서(105)와 스플릿 센서(106) 각각에 접속되어 각각에서 감지된 전류를 전압으로 변환하는 제1, 제2 전류/전압 변환기(107, 108)와, 제1 전류/전압 변환기(107)와 제2 전류/전압 변환기(108)에 접속되어 변환된 아날로그값을 갖는 전압을 디지털로 변환하는 A/D 컨버터(109)로 이루어져 있다. 여기서 센서는 광신호를 검출하는 모든 센서가 사용 가능하며 (PD, PMT, PDA, CCD), 센서로부터 얻어지는 전류를 전압으로 변환한 뒤 변환된 전압값에 따라 자동증폭(Auto gain system) 된 후 A/D 변환기로 입력되는 방법과 전류로부터 직접적으로 흡광도를 연산해주는 하드웨어 장치를 통하여 흡광도에 해당하는 전압값을 A/D 변환기로 입력시키는 방법들을 통하여 이루어진다 . 또한 상기필터는 측정항목에 따라 특정과장대

역만을 통과하는 밴드패스필터 (간섭필터 혹은 분광필터)를 사용하고 있다. 이 A/D 컨버터(109)는 전압을 주파수로 변화하는 V/F(Voltage/Frequency) 컨버터이다. 또한, 상기 밴드패스 필터(102)로는 중심파장이 640nm인 광을 통과시키는 필터(102)를 사용하고 있다.

상기 광 신호처리부(20)는, (데이터 처리부)상기 A/D 컨버터(109)로부터 출력된 디지털화된 신호(데이터)를 전달받아 (데이터 처리를 하는 마이크로 프로세서가 마련되는데) 처리가 이루어지는 마이크로 프로세서(201)가 마련되는데, 이 마이크로 프로세서(201)는, (주변소자인 ROM RAM 및 기타 입출력 소자들을 통하여 프로그램실행, 데이터 취득 및 데이터 처리를 통하여 식품의 위해정도를 판정하며) 이후 설명되는, ROM/RAM(202, 203)의 데이터의 독출 및 저장된 프로그램에 따른 독출된 데이터 처리(저해율 계산)가 이루어지며, 키패드(204)를 통해 입력되는 키 입력 신호에 대응한 제어신호를 발생시키고, 발생된 제어신호에 대응하여 디스플레이신호를 LCD(205)로 출력하며, 컴퓨터(30)와의 통신 제어를 수행하게 된다. 이 마이크로 프로세서(201)는 8bit 마이크로 프로세서(201)를 사용하고 있다. ROM(202)은 전체 구성 장비의 구동에 필요한 소프트웨어를 저장하고 있으며, RAM(203)은 상기 ROM(202)에 저장된 소프트웨어가 실행될 경우에 독출되는 데이터, 즉 상기 A/D 컨버터(109)를 통해 출력(입력)되는 데이터를 저장시키고 있다. 키패드(204)는 사용자의 작업을 받아들이는 장치로서, 소프트 터치 키패드(204)를 사용하고 있다. LCD(205)는 작업결과, 사용 메뉴 등을 표시하는 장치로서, 통상의 TFT-LCD(205)를 의미한다. RS232C(206)는 컴퓨터(30)와 통신하는 통신 포트로서, 이 포트를 통하여 컴퓨터(30)에서 실행되는 미생물 측정기 소프트웨어와 통신한다.

상기와 같이 구성된 본 발명의 제1 실시예에 의한 식품위해물 분석기

의 동작을 간단하게 설명한다.

시스템에 전원을 공급하여 시스템의 초기화가 이루어지면, (광원부에 있는 텅스텐 램프는 켜지게 되면서 가시광선 영역의 파장을 발산하게 된다)광발생부(101)에서 발광된 광은 밴드 패스 필터(102)를 통과하면서 640nm의 중심파장을 갖는 광만이 통과하게 된다. 이후 이 640nm의 주파장을 갖는 광은 빔 스플리터(103)를 거치면서 일부 광은 투과하여 시료(104)쪽으로 향하게 되고, 나머지 광은 반사되어 스플릿 센서(106)로 향하게 된다. 한편, 시료(104)를 통과한 광 역시 샘플 센서(105)로 향하게 된다. 상기 스플릿 센서(106)와 샘플 센서(105)에 수광된 광은 전류/전압 변환기(107, 108)에서 광에 비례한 전압으로 각각 변환되게 된다. 상기 변환된 전압은 아날로그 값을 가지고 있으므로 2진화된 데이터를 처리하는 마이크로 프로세서(201)에서 직접 처리할 수 없으므로 이를 A/D 컨버터(109)에서 디지털화된다. 상기한 바와 같이, 이 디지털화된 데이터는 주파수형태로 마이크로 프로세서(201)에 입력되어 ROM에서 실행되어지는 미생물 균수 프로그램에 의해 해당 항목의 식품위해 여부를 계산하게 된다. ROM(202)으로부터 리딩된 저해율 계산 소프트웨어에 의해 저해율 계산이 이루어지게 된다. 이 계산 결과 값은 LCD(205)를 통하여 사용자에게 디스플레이 시키고, 해당 계산 결과 값은 RAM(203)에 일시 저장시킨다. 미생물 측정기를 현장에서 사용하는 사용자가 LCD(205)를 통하여 계산 결과 값을 인지한 이후에, 키패드(204)를 이용하여 해당 계산 결과 값의 저장 또는 삭제 등의 키입력, 재분석, 새로운 샘플의 분석 등의 키입력을 수행함에 따라 이에 해당하는 동작이 수행되게 된다. 여기서 상기 계산 결과 값은 기준이 되는 기준데이터를 바탕으로 결과 값을 도출하게 되는 것이다.

다음은 미생물 측정기의 광필터부(10)의 구성을 구체적으로 설명하고

자 한다. 상기한 바와 같이, 광필터부(10)는 광발생부(101), 필터(102), 빔 스플리터(103), 샘플 센서(105), 스플릿 센서(106), 제1, 제2 전류/전압 변환기(107, 108), A/D 컨버터(109)로 이루어져 있다. 상기 필터(102)는 원하는 파장만 통과시키고 다른 영역의 광을 차단 시켜주는 밴드패스필터(Band Pass Filter)와 해당 파장영역 외의 빛을 차단 시켜주기 위한 컷오프필터(Cut Off Filter)가 있다. 밴드패스필터는 도시된 바와 같이, 특정 파장만을 통과시키는 역할을 수행하게 된다.

기존에, 분광분석기기는 특정파장의 흡수율과 투과율로서 물질의 정량적 분석을 한다. 따라서, 빛의 여러 파장 중에서 특정 파장만을 선별적으로 뽑아 물질에 투과시켜 분석을 하게 된다. 흔히 분광분석기기는 단색광을 뽑아내기 위하여 모노크로미터(monochrometer)를 사용한다. 원리는 슬릿을 통하여 백색광을 입사하면 회절격자에 입사되고 그 빛은 회절격자에 의하여 파장별로 늘어선다. 해당 파장만을 또 다른 슬릿을 이용하여 선별적으로 통과시키면 단색광을 얻을 수 있고 그 단색광(monochromatic light)을 이용하여 분석에 사용하다.

미생물 측정기에는 이러한 용도로 모노크로미터를 대신하여 밴드패스필터를 사용하고 있다. 필터(102)는 백색광이 입사되었을 때 해당 파장만 투과되도록 코팅되어 있다. 그러나 정해진 파장만을 투과시키지는 않는 것이 약점이다. Fig. 3에서 볼 수 있듯이 주 파장 외에 오른쪽에 약간 솟은 투과 스펙트럼을 볼 수 있다. 따라서 주 파장외의 다른 영역의 투과되는 광을 블로킹(blocking)하기 위하여 컷오프필터를 사용하였다. 컷오프필터를 사용하지 않으면 주파장외의 잡광의 영향으로 흡광도가 3.0인 샘플이 2.0의 흡광도도 나오지 않기 때문이다. 따라서 위 두개의 필터(102)는 쌍(pair)으로 장착하면 주파장외의 잡광의 영향이 줄어들게 되어 보다 정확한 데이터를 얻을 수 있기 때문에 기기에 장착하였다.

미생물 측정기는 밴드패스필터를 사용하게 되는데, 640nm 파장의 빛을 통과시키는데 정확히, 640nm가 아니라 약간의 오차가 있음을 알 수 있다(Fig. 4). 또한, 밴드패스필터는 200 ~ 1100nm까지 스캔(Scan)한 결과 640nm에서 36.56%의 투과율을 나타내었다.

Fig. 21은 컷오프필터의 투과 스펙트럼이다. 빔 스플리터(beam splitter ; 광속분할기, 103)는 측정에 사용되는 광선 중 일부를 이용하여 광원, 전자부품, 온도, 습도 등 주변환경의 시간적 변화에 의한 드리프트(drift)의 영향을 보정해 주기 위한 장치이다. 흔히, 빔 스플리터(103)는 투과율과 반사율의 비율이 50% : 50 %이나, 본 기기에서는 투과율(투과60% : 반사40%)이 더 높은 스플리터를 사용한다. 투과도를 높임으로서 샘플 센서(105)에 입사되는 광이 상대적으로 커지게 되므로 고 흡광도(투과율이 매우 작은 1%미만)의 샘플 측정시 노이즈에 의한 오차를 줄일 수 있다.

상기 샘플 센서(105)와 스플릿 센서(106)는 단색광의 입사 강도를 측정하는 부분이다. 통상의 수광센서를 이용하고 있다.

제1 전류/전압 변환기(107) 및 제2 전류/전압 변환기(108)는 상기 샘플 센서(105) 및 스플릿 센서(106)로부터 입력되는 전류 값을 비교하여 흡광도를 나타내는 전압 값으로 변환시켜 준다. 이 때, 전압 값으로의 변환은 LOG100을 이용하게 되는데, 이 LOG100은 BurrBrown 사의 Logarithmic and LOG ratio Amplifier 이다. 2개의 측정센서 중 스플릿 센서(106)는 기준 값을 제공하고, 샘플 센서(105)는 측정 값을 제공하여 2개의 값을 가지고 내부적으로 흡광도를 계산하여 전압으로 출력한다. 그러므로 센서를 통해 흐르는 전류가 미세하더라도 정확한 비율을 나타낼 수 있는 넓은 동작범위를 가진다. 이는 기존의 센서를 통해 흐르는 전류의 양에 따라 증폭시키는 회로는 구성하지 않아도 되는 장점이 있

다. LOG100 부분을 거친 전압은 A/D 컨버터(109)로 입력된다.

이상으로 미생물의 1차 간이측정기기에 대한 도면 및 제조한 기기의 스펙트럼 특성에 대하여 설명하였으며 이 기기에 미생물내 단백질의 생화학적 특성으로부터 얻어진 data를 기초로하여 소프트웨어를 개발하여 장착하면 미생물 측정기기는 완성된다고 사료된다.

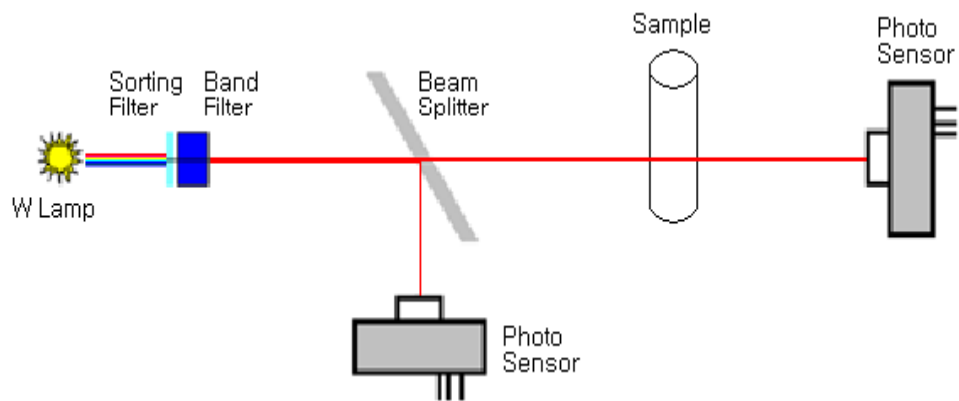


Fig. 1. Construction of instruments measured number of microorganism.

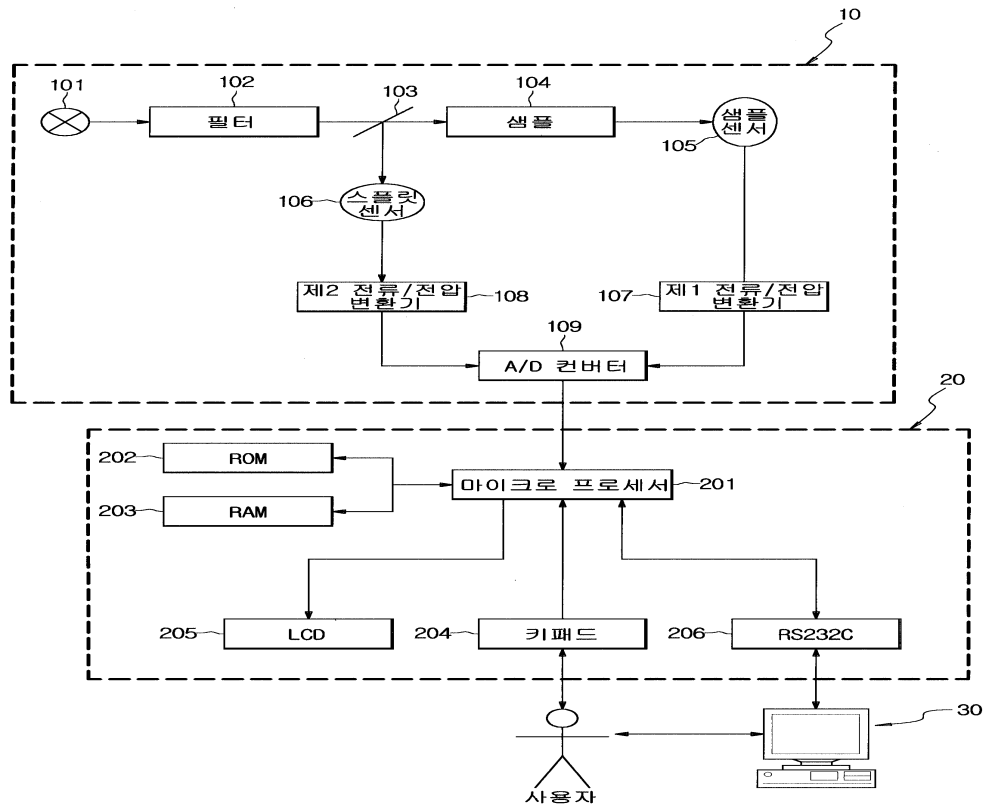


Fig. 2. Draft of instruments

10: 광학파트

101-광원(할로젠 램프), 102-필터(단색화장치), 103-빔스플리터,
104-샘플(분석대상), 105-광센서, 106-광센서, 107-증폭기1,
108-증폭기2, 109-Analog to Digital 변환기

20:전자파트

201-마이크로 프로세서, 202-Rom, 203-Ram, 204-키패드(사용자조작키)

205-LCD, 206-RS232C Port(30번:PC연결용)

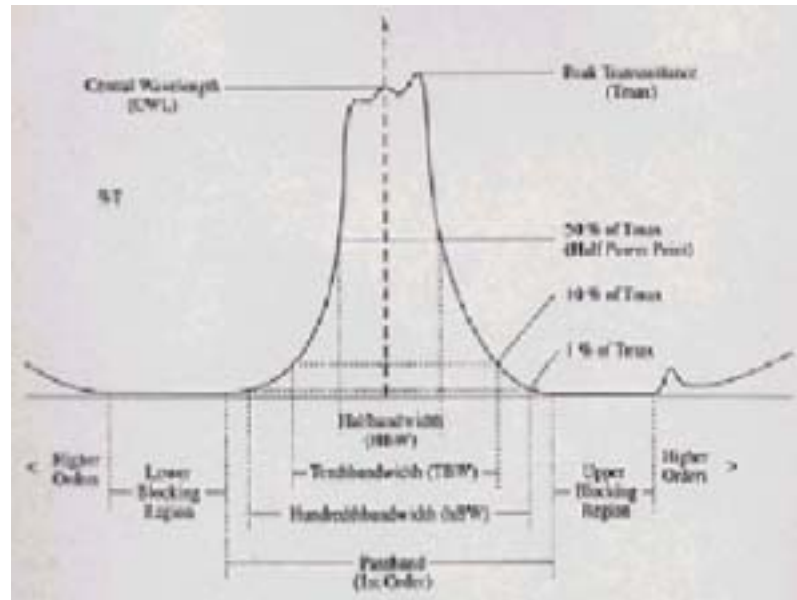


Fig. 3. Spectrum of light transmitted filter.

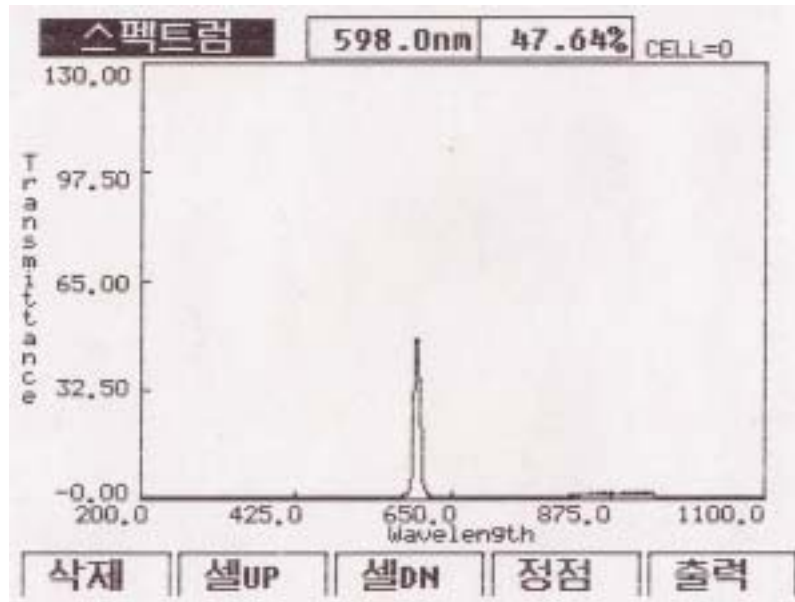


Fig. 4. Spectrum of light transmitted band pass filter.

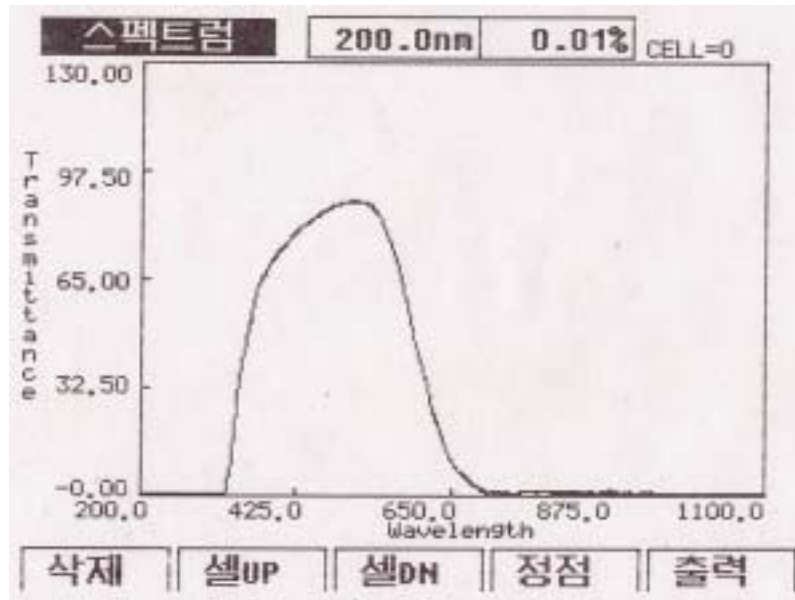


Fig. 5. Spectrum of light transmitted cut off filter.

2. 미생물측정기기 개발

1) 개요

미생물 분석에 사용되는 계측시스템은 단일 파장의 빛을 이용하므로 Spectrophotometer type의 장비보다 Colorimeter type의 장비가 더욱 경제적이며 작업이 용이하다고 판단되었다. Colorimeter는 광학기구파트, 하드웨어, 소프트웨어로 구성되어있다.

2) 광학기구파트 구성

기계가공품으로 구성되어 있는 광학기구는 본 Colorimeter 에서 가장 중요한 부분이다.

램프, 광학Filter, Beam Splitter, 광 Detector, 기타구조물 등으로 나뉜다.

3) 광학기구파트 제작

광학 FILTER를 삽입 시 스냅링을 이용하여 광학필터가 FILTER 안에 삽입후에 유격이 없도록 한다. 또한 같이 조립되어지는 ORDER SORTING도 같이 삽입된다.

2-BLOCK에 조립되어지는 BEAM SPLITTER는 45°로 가공되어있는 홈 부분에 삽입하여 실리콘(검정색) 이용하여 부착시킨다. 실리콘 사용후 표면처리를 깨끗이 하여야 한다. 아래에 나타난 그림과 같이 화살표방향으로 조립을 하면된다.

Fig. 7은 DETECTOR와 2-BLOCK을 결합하는 공정도이다. Detector를 2-Block에 결합시 사용되는 Bolt 는 M2×6 둥근머리나사가 사용된다. Detector 부분은 절대 지문이 묻지않도록 세심한 주의를 요한다. 조립 후 Detector 뒷부분에 검정색 스폰지 테이프로 한번 붙여 외부빛이 들어오는것을 최소한으로 줄인다.

Fig. 8은 Motor +Motor Braket+ Filter Wheel+ Chech Bar가 결합되는 모습을 보여주는 도면이다.

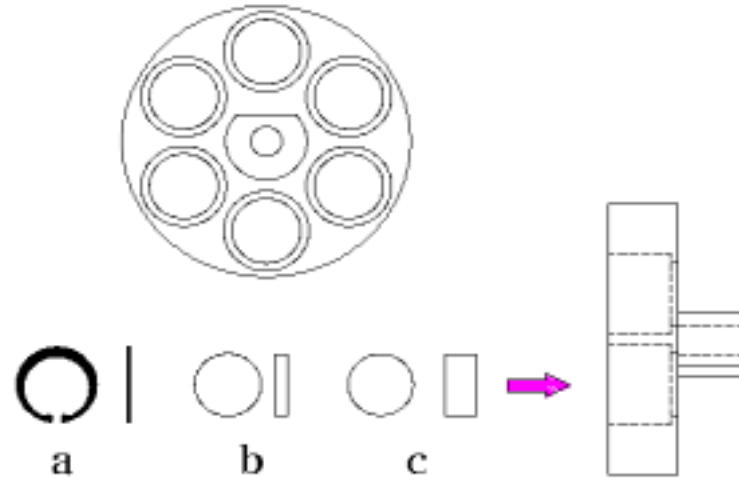


Fig. 6. Assembling method of filter and filter wheel.

a: 스냅링($\Phi 13$) b: Order Sorting Filter c: Filter

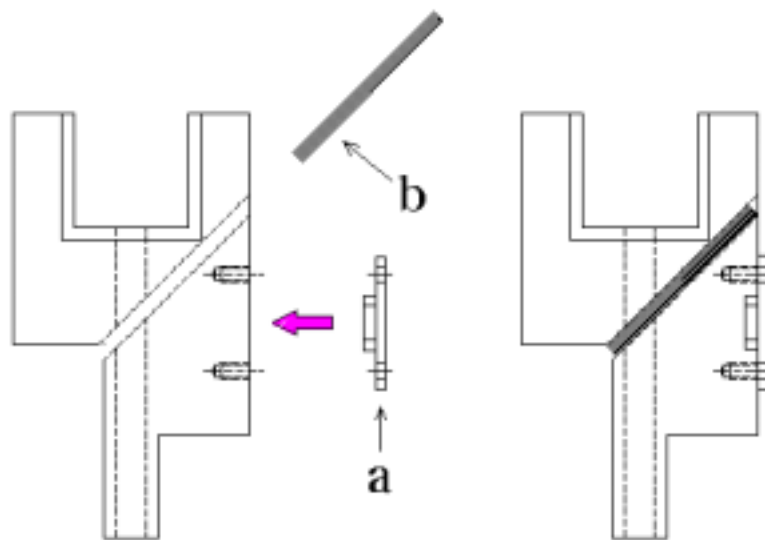


Fig. 7. Assembling method of detector and 2-block

a: Detector b: Beam Splitter

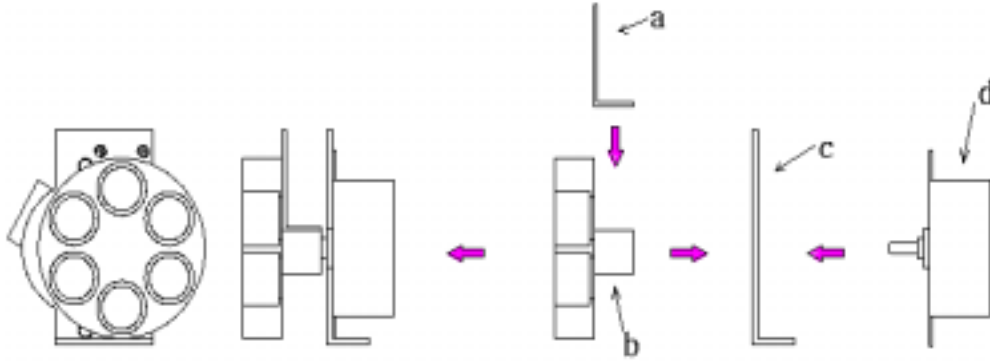


Fig. 8. Motor +Motor Braket+ Filter Wheel+ Chech Bar

a: Chech Bar, b: Filter Wheel. c: Motor Braket, d: Motor

Chech Bar역할은 1-Block에 조립되어있는 Photo interrupter에 신호를 보내 Filter가 회전시 광로에 정확한 위치를 잡을 수 있도록하는 역할을 한다. 이때 Filter Wheel에 고정시 M2×4을 이용하여 조립을 하고 힘이 없도록 반드시 주의해야한다.

Motor를 Motor Braket에 고정시 M3×5와 Nut를 이용하여 조립한다. Wheel Filter를 모터에 고정시에는 Set Screw M3×6을 이용한다.

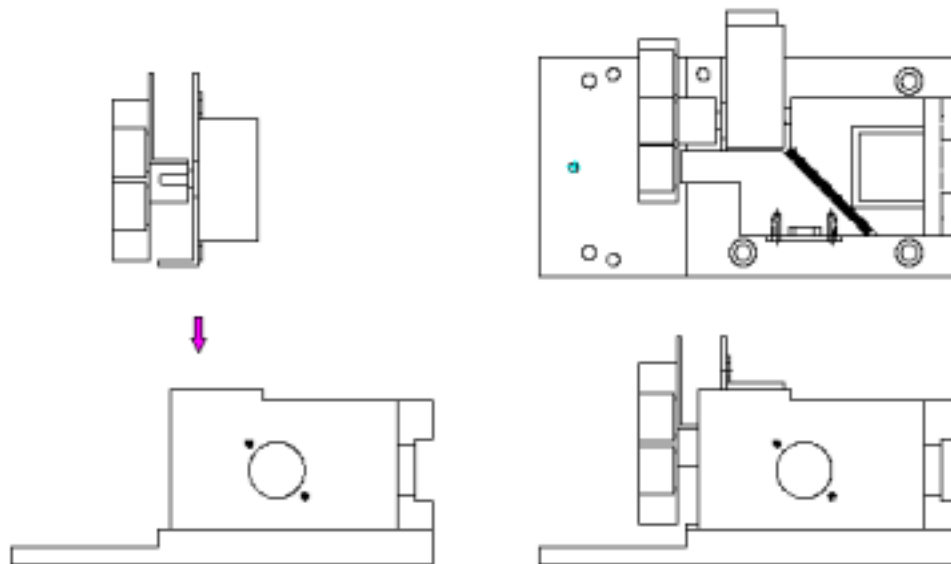


Fig. 11. Assembling method of optical part(A).

Fig. 8에서 조립된 Filter Set를 광학 본체에 조립하는 모습을 보여주는 그림이다. Filter set를 조립시에는 M3×10 Bolt를 4-Block 바닥에서 삽입하여 체결한다.

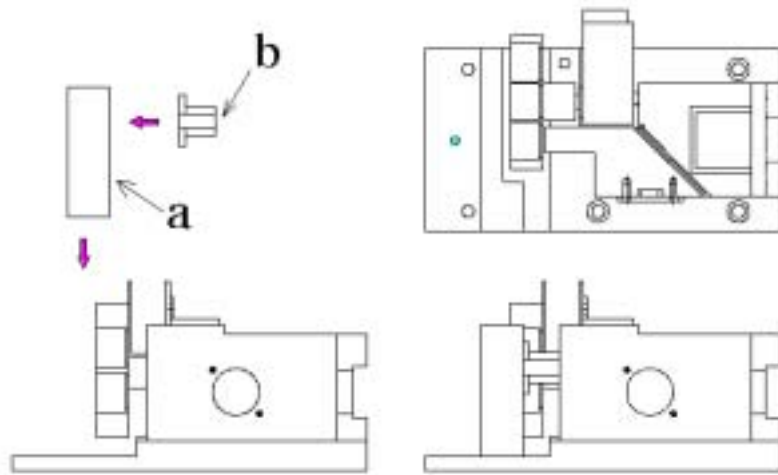


Fig. 12. Assembling method of optical part(B).

a: 1-Block b: Photo-Interrupter

Fig. 12은 1-Block을 광학기구 본체에 조립하는 모습을 나타낸 그림이다. 1-Block을 조립하기전에 Photo-Interrupter을 1-Block에 M3×5을 이용하여 조립하고 광학기구 본체에 M4×14 Lench Bolt을 이용하여 조립시킨다.

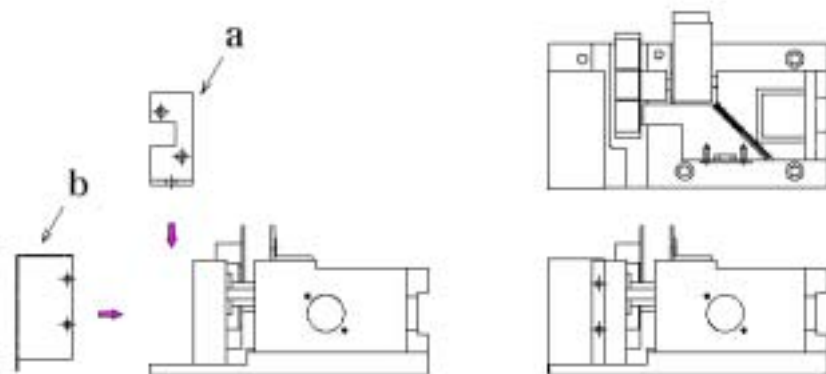


Fig. 13. Assembling method of optical part(C).

a: Assembled part at Fig. 10. b: Lamp-Cover

Fig. 13은 Fig. 10에서 조립된 Lamp-Set와 Lamp Cover을 광학기구 본체에 조립시키는 그림이다. Lamp Set를 조립시 M3×5 Bolt를 이용하여 체결하고 Lamp Cover를 체결시에는 M2×5 Bolt를 이용한다.

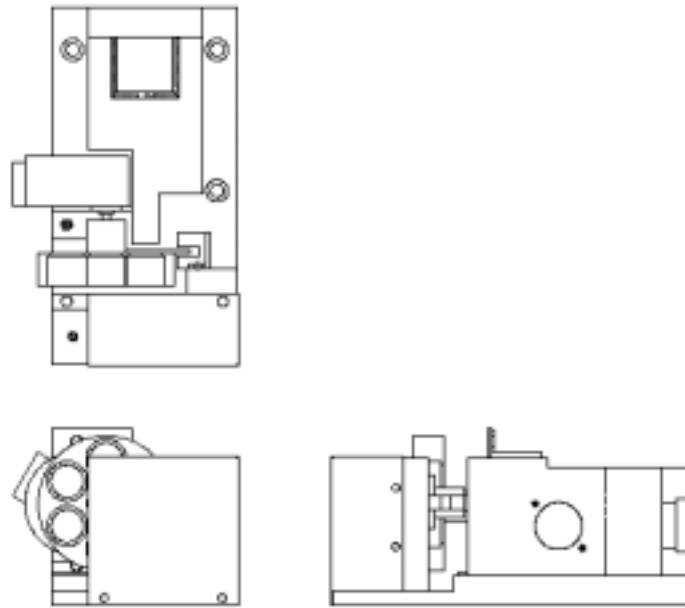


Fig. 14 Drawing of optical part using trigonometry

위 도면(Fig. 14)은 지금까지 나타난 모든 도면이 결합되어진 광학파트를 3각법을 이용하여 최종적으로 조립되어진 모습의 도면이다.

4) 전자파트 구조

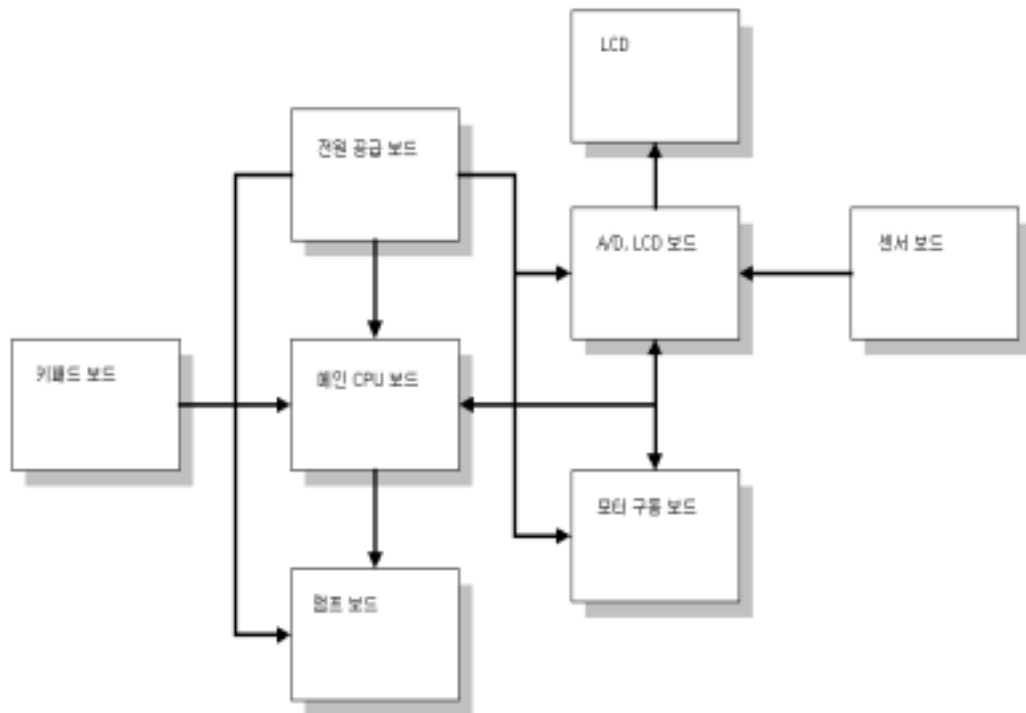


Fig. 15. Draft of electric part

Fig. 15는 OPRON-FN1000의 하드웨어 구성도를 보여 준다. 크게 7 종류의 보드로 구성된다. 입력 전압은 220V AC [$\pm 5\%$]이다. 이러한 입력 전압은 SMPS를 통하여 전원 공급 보드와 램프 보드에 입력된다. 전원 공급 보드의 출력 전압은 디지털 공급용 +5V, LCD 백라이트 공급용 +5V, 아날로그 공급용 $\pm 15V$, LCD 밝기 조정 공급용 -24V, 릴레이 동작 공급용 +12V, 모터 구동 공급용 +12V~+15V로 구성된다. 이

렇게 만들어진 전압은 연결된 선을 통하여 각각의 보드에 공급된다.

메인 CPU 보드는 MC68302 CPU와 4Mbit ROM 2개, 4Mbit RAM 2개, RS232 포트 3개, 와치독 타이머, 리얼타임 클럭, 4Kbit 시리얼 EEPROM 그리고 부가적인 회로로 구성되어 있다.

5) 전자파트 구성

(1) 메인 보드

테스트 ROM이나 OPRON-FN1000 프로그램을 ROM에 EVEN, ODD로 구워 전원을 투입하였을 경우 녹색 LED가 주기적으로 깜박거리고 빨간 LED가 꺼져 있다면 메인 CPU 보드는 정상 동작한다고 판정한다. 메인 보드는 CPU로 MC68302FC16C, ROM은 27C040 2개, RAM은 KM684000 2개, RS232 포트 3개, 리얼타임 클럭 DS1302, 와치독 타이머 LTC699, 기타 TTL 게이트로 구성되어 있다.

가. MC68302FC16C

MC68302는 모토롤라 계열의 프로세서로 Integrated Multiprotocol Processor이다. 특징으로는

- 1) MC68000/MC68008 코어를 제공한다.
- 2) 독립적인 DMA 지원한다.
- 3) 두가지 동작 모드를 지원한다.
- 4) 인터럽트 기능을 갖는 병렬 I/O 기능을 갖는다.
- 5) 와치독을 포함하는 3개의 타이머가 있다.
- 6) 웨이트 스테이트를 발생할 수 있는 4개의 칩셀렉터를 제공한다.
- 7) 프로그램으로 이동 가능한 내부 듀얼 포트 램
- 8) 시스템을 제어할 수 있는 기능

- 9) 다양한 통신 프로토콜을 제공하는 커뮤니케이션 프로세서(CP)를 제공한다.

MC68302는 일반 컨트롤러로서 동작 가능하지만 이 보다는 다양한 통신을 지원하는 기능을 갖는 편이 더 나은 컨트롤러이다. 이 CPU에 관한 더 자세한 사항은 User's Guide를 참고하면 될 것이다.

나. 메모리 구조

MC68302의 I/O는 메모리 Mapped I/O로 구성되며, I/O 각각도 메모리를 차지하게 된다. 메모리 구성은 ROM 2개, RAM 2개, A/D, LCD 보드에 포함된 병렬 EEPROM 1개, 비디오 버퍼로 사용되는 SRAM 1개, CPU 내부에 있는 듀얼포트 램이 존재한다.

MC68302는 처음 초기에 전원이 투입될 때 절대 번지로 0번지에 있는 정보를 읽어 들인다. 그러므로 초기 0번지에는 ROM이 위치해야 한다. 그러나 응용 프로그램에서는 램을 0번지에 놓고 사용한다. 그래서 전원 투입 시에는 ROM의 번지를 0번지에 놓고 MC68302의 특징인 어드레스 번지 변경하는 기능을 사용하여 RAM을 0번지에 놓는다.

Table 1. Mapping of memory address

RAM	0 ~ 0X0FFFFFFF
ROM	0X100000 ~ 0X1FFFFFFF
비디오 RAM	0X200000 ~ 0x20FFFFF
병렬 EEPROM	0X210000 ~ 0X21FFFF
LCD Controller	0X300080
82C55_1	0X300090
82C55-2	0X3000C0
A/D 컨버터	0X3000A0
ADCGAIN	0X3000B0
DUAL PORT RAM	0X700000

다. RS232 포트

MC68302에서는 3개의 통신 포트를 제공한다. 커뮤니케이션 프로세서 (CP)는 다양한 통신 프로토콜을 지원하는데 그 중 우리는 3 포트 모두 RS232 통신을 지원한다. 첫 번째는 PC 컨트롤용으로 사용하고, 두 번째는 키패드 보드와 연결하여 키 값을 읽어 들이는데 사용하고, 마지막으로 세 번째는 시리얼 써멀 프린터 연결용으로 사용한다.

라. 리얼 타임 클럭 DS1302

리얼 타임 클럭이란 간단히 말하자면 시계와 달력 기능을 이용하는 것이다. 이러한 기능을 하는 칩이 달라스사의 DS1302이다. DS1302는 3가닥을 사용하여 연, 월, 일, 시, 분, 초를 셋팅하거나 읽어들이어 시간 정보

를 알아낸다 이 칩에는 백업 배터리를 사용하여 전원이 없더라도 30일 정도 동작시킬 수 있다. 자세한 정보는 데이터 북을 참조하기 바란다.

마. 와치독 타이머 LTC699

와치독 타이머란 일정한 기간 주기로 LTC699가 신호를 받지 않을 경우, LTC699는 MC68302에 리셋 신호를 출력하여 시스템을 초기화한다. MC68302에서 LTC699에 주기적인 신호를 주기 위하여 타이머 인터럽트 (10msec)에 약 200msec 간격으로 신호를 출력하고 있다. 이 출력 신호는 시스템이 정상 동작하는 지를 확인 할 수 있는 신호로 녹색LED에 연결하여 깜박거리게 하였다. 또한 붉은 색 LED는 시스템 적 으 로 불안하거나 리셋 신호에 신호가 들어갔을 때 깜박거리게 하였다.

바. 기타 TTL

기타 TTL회로는 CPU 주변에 들어가는 디코딩 회로나 컨트롤 제어 신호에 신호를 맞춰 주기 위하여 들어간 회로이다.

(2) A/D와 LCD 보드

메인 CPU 보드가 정상 동작할 경우 A/D, LCD컨트롤 보드를 슬롯 보드에 연결하고 LCD를 연결하면 LCD에 화면이 나오면 LCD컨트롤 부분은 정상 동작하며, A/D 부분은 -3V ~ +3V사이의 전원을 입력 하였을 경우 LCD 화면에 값이 변화할 경우 정상 동작한다고 판정한다.

A/D와 LCD컨트롤 보드는 크게 네 가지 부분으로 나눌 수 있다. 첫째는 센서로부터 신호를 받는 A/D 부분, 두 째는 LCD 화면을 제어하는 LCD컨트롤 부분, 세 째는 프린터를 출력하는 부분, 네 째는 병렬 EEPROM으로 나눌 수 있다.

가. A/D 부분

OPRON-FN1000의 A/D컨버터는 리니어 테크놀로지사의 TC1605-2이다. LTC1605-2는 16bit 병렬 A/D 컨버터로 칩 타입은 ssop이다. LTC1605-2의 입력 전압은 $-4V \sim +4V$ 로 입력받는다. 입력은 LOG100을 통하여 받는데 LOG100은 Logarithmic and LOG ratio Amplifier 이다. 두 센서 (스필릿과 샘플)로부터 받은 신호를 계산하여 A/DC인 LTC1605-2로 출력해준다.

A/D 부분의 회로 구성은 다음과 같다.

- 1). 두 개의 센서를 입력받을 수 있다.
- 2). 입력받은 LOG100을 통하여 두 센서의 입력값을 흡광도 전압 값으로 바꿔준다.
- 3). LOG100 부분을 거친 전압은 A/D 컨버터로 입력한다. 입력부, LOG100 부분은 회로를 참고하기 바란다.

나. LCD컨트롤 부분

LCD컨트롤 부분은 LCD에 디스플레이 될 내용을 저장하는 버퍼와 주기적으로 화면에 디스플레이 되도록 하는 제어부로 나뉘어질 수 있다. 디스플레이 될 내용을 저장하는 버퍼로는 KM62256을 사용한다. 만약 320X240 LCD를 사용할 경우 전체를 디스플레이 하기 위해서는 9600바이트가 필요하다. KM62256에는 약 3페이지를 디스플레이 할 공간을 갖는다. 디스플레이 되도록 하는 제어부는 OKI사의 MSN6255라는 칩을 사용하여 제어한다. 이 칩은 LCD 전용 컨트롤 칩으로 몇 가지 설정을 해주면 간단히 사용할 수 있다.

다. 프린터 출력부

프린터를 출력하는 부분은 MSN82C55라는 칩을 사용하는데, 이 칩의 구성은 병렬 I/O 3포트로 구성된다. 3개의 포트 중 1개는 A/D 컨버터의 계인 변경부에 입력 단자로 사용되고, 나머지 두 포트는 프린터를 제어하기 위한 I/O로 사용된다.

라. 병렬 EEPROM

병렬 EEPROM은 프로그램으로 쓰고 지울 수 있는 메모리로 아트멜사의 29C256을 사용한다.

(3) 모터 컨트롤 보드

메인 CPU 보드와 A/D, LCD컨트롤 보드가 정상 동작할 경우 모터 보드를 슬롯 보드에 연결하고 2개의 모터를 연결한다. 각각의 모터가 명령에 따라 회전을 하고 포토 인터럽트가 제대로 걸리면 (테스트 프로그램에서 회전수를 체크한다.) 정상 동작하는 것으로 판단한다.

모터 컨트롤 보드는 모터를 돌리기 위한 드라이브 회로가 들어 있는보드이다. 모터 컨트롤 보드는 총 2개의 스텝핑 모터를 돌릴 수가 있는데, 필터를 돌리는 스텝 모터만 사용한다.

스텝 모터를 돌리기 위한 구동 회로의 구성은 GAL과 L298로 제작되었다. GAL은 MSN82C55로부터 리셋, 방향, 클럭 신호를 받아 L298에 파워 드라이브 할 수 있도록 신호를 출력한다. 이렇게 출력 받은 신호를 L298은 받아 파워 증폭한 후 모터를 돌리게 된다. GAL에 대한 데이터는 PDS 파일을 참조하기 바란다. 또한 모터의 위치를 검출하는 센서가 있는데 모터의 위치를 알아내기 위해서는 모터의 초기 값을 알아야한다. 이 때 사용하는 센서로 포토 인터럽트를 사용한다.

(4) 전원 보드

가. 120V, 360V 교정

D2 LAMP 의 전원 및 트리거용 전압으로써 동작 상태는 전원 (85 ~ 265V) 전압을 인가했을 경우 출력으로 D2 LAMP의 전압이 약 100 ~ 105V 사이의 전압과 트리거용 전압으로는 330 ~ 360V사이의 전압이 확인이 되면 정상적인 동작이다. 전압을 조정하기 위해서는 TL431 NETWORK에 연결되어있는 가변저항(100K)을 이용하면 조정이 가능하다.

TOP 227은 정상적으로 SWITCHING 동작은 하고 있지만 출력 전압이 부족하거나 과하게 출력이 될 경우에는 그림 13의 저항R2,R5를 조정 하면 된다.

부족할 경우 : 저항 R2,R5의 값을 더욱 높은 것을 이용한다.

과할 경우: 저항 R2,R5의 값을 더욱 낮은 것을 이용한다.

단 D2 LAMP의 전압은 부하를 약 340Ω 의 저항을 연결한 상태에서의 전압 (100 ~ 105V)이다.

나. 5V, 10V 교정

디지털 회로용 전압으로써 동작 상태는 전원(85 ~ 265V)전압을 인가했을 경우 출력으로 디지털 회로용으로 5V 전압을 조정하기 위해서는 TL431 NETWORK에 연결되어있는 가변저항(5K)을 이용하면 조정이 가능하다.

단 디지털 회로용의 부하는 1.6 (50W 이상)이다. D2 LAMP 히팅용에는 약 100의 (5W 이상) 저항이 보드에 삽입이 되어있다.

다. 12V, 3A 교정

텅스텐 LAMP 용 전압으로써 동작 상태는 전원(85 ~ 265V)전압을 인가했을 경우 출력으로 12V,3A의 전압과 전류를 생성할 수 있으면 정상 동작이다. 전압을 조정하기 위해서는 TL431 NETWORK에 연결되어있는 가변저항(10K)을 이용하면 조정이 가능하다.

단 텅스텐 LAMP용의 부하는 4Ω 이다.

라. +15V,-15V,-24V 교정

아날로그 회로용 전압(+15V, -15V)과 LCD 휘도 조정용 전압 (-24V)으로써 동작 상태는 전원(85--265V)전압을 인가했을 경우 출력으로 아날로그 회로용으로는 +15V,-15V의 전압이 LCD 휘도 조정용에는 -24V의 전압이 출력이 되면 정상적인 동작 상태이다.

전압을 조정하기 위해서는 TL431 NETWORK에 연결되어있는 가변저항(20K)을 이용하면 조정이 가능하다.

단 +15V-15V,-24V는 전압 레귤레이터를 이용하여 전압을 생성하였다.

마. 12V, 3A 교정

릴레이 구동용, 모터 구동용 전압으로써 동작 상태는 전원 (85 ~ 265V) 전압을 인가했을 경우 출력으로 12V,3A의 전압과 전류를 생성할 수 있으면 정상동작이다.

전압을 조정하기 위해서는 TL431 NETWORK에 연결되어있는 가변저항(10K)을 이용하면 조정이 가능하다. 단 텅스텐 LAMP용의 부하는 4Ω 이다.

(5) 키패드 보드

키 패드 보드는 메인 CPU 보드와 키 패드를 연결한 후 키 값이 LCD 화면에 제대로 나오고 키 패드 보드에 LED가 주기적으로 깜박거리면

정상 동작한다고 판정한다.

키 패드 보드는 키 패드로부터 키 값을 주기적으로 읽어 들여 해당 되는 키 값을 메인 CPU 보드에 RS232 통신을 하여 보내게 된다. 키 패드 보드의 구성은 다음과 같다.

- 아트멜사의 89C2051 (CPU)
- 메인 CPU와 통신을 하기 위한 RS232 칩
- 키가 눌렸을 때 확인을 하기 위한 부저
- 키 패드 보드의 동작을 확인하기 위한 LED 메인 CPU 보드와의 통신은 9600bps, parity, 8bit로 통신을 한다.

(6) 전자파트 연결

가. SMPS의 연결

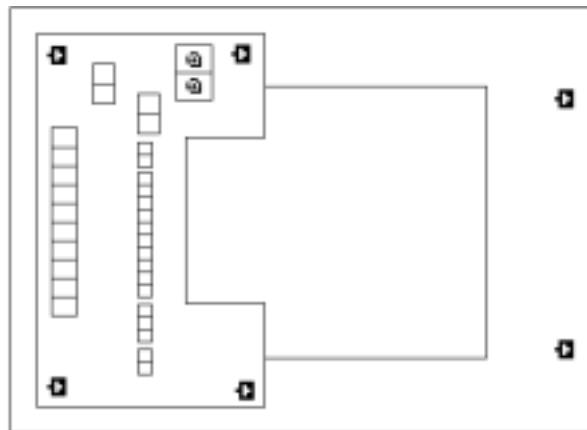


Fig. 16. SMPS diagram

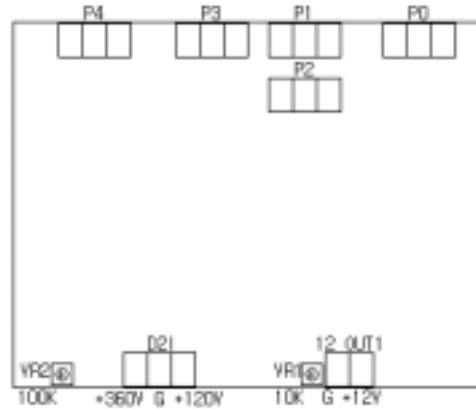


Fig. 17. Bottom part of bard

나. SMPS PCB1

SMPS PCB1은 전원 전압에 대한 필터와 W 램프용 전압(12V,3A),

1. P0 은 입력 전원이다. (85 ~ 265V)
2. P1 ~ P6 까지는 P0에서 받은 전원 전압을 그대로 받는다.
3. P1-P5, P2-P4, P3-P6과 연결된다.
4. 12 OUT1은 +12V를 출력하고 출력 보드에 연결된다.
5. D2I는 D2보드에 연결을 한다. (+360V, G, +120V)
6. VR1 10K Ω 가변저항으로 W 램프의 빛 밝기를 조절하는데 +12.2V로 맞춘다.

다. SMPS PCB2

아래 보드는 릴레이 구동용, 모터구동용 (12V, 3A), 디지털 회로용 (5V, 3A), D2 히팅용 (10V, 1A), 아날로그 회로용 (+15V, -15V), LCD회도용 (-24V)를 생성하는 보드이다.

1. 12 OUT2는 출력 보드에 연결된다.
2. 5 OUT도 출력 보드에 연결된다.
3. VR3 10K Ω 가변저항은 +12V 출력을 가변 시킬수있다.
4. VR4 20K Ω 가변저항은 건드리지 않아도 되는 가변저항이다.

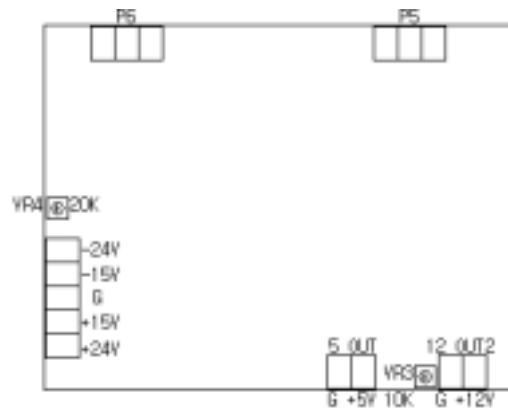


Fig. 18. Upper part of board



Fig.19. Output board

라. SMPS PCB3 - 출력 보드

출력 보드에는 많은 전압들을 연결하므로 주의하여야하고 12 OUT2, P0와, 5 OUT의 5V, GND는 출력 보드에서 모든 접지가 이루어지므로 위 보드의 -24V, -15V, G, +15V, +24V 커넥터의 접지는 하나만 출력보

드의 왼쪽의 10개짜리 큰 커넥터로 이어주면 된다.

마. 슬롯 보드와 보드 배치도

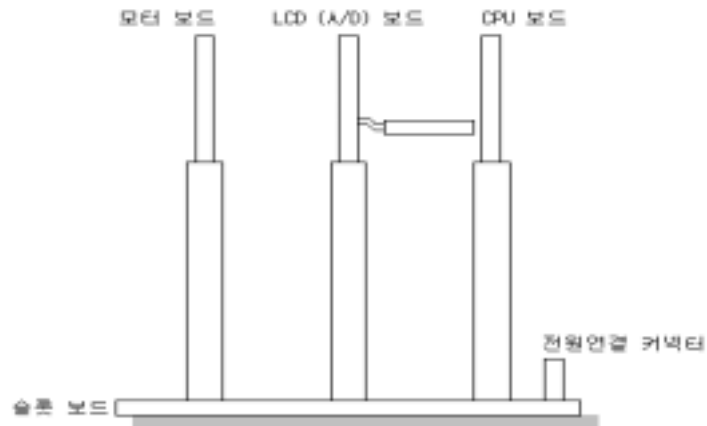


Fig. 20 Slot and others boards

메인 CPU 보드는 슬롯 보드 중 일반적으로 뒤쪽에 위치하게 된다. 모터 보드는 앞쪽에 위치하게 되고 A/D, LCD 보드는 가운데 자리에 위치하게 된다.

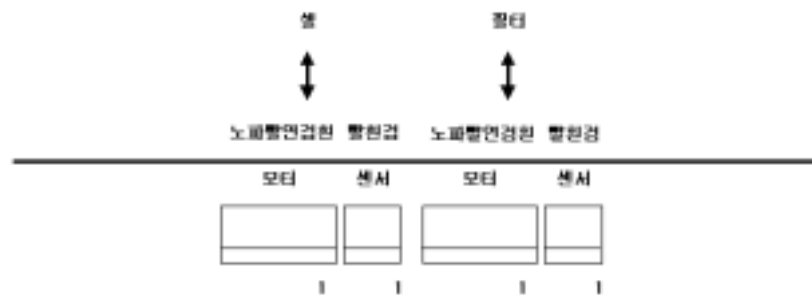
바. 메인 CPU 보드의 연결



Fig, 21. Linking of main CPU

메인 CPU 보드에 연결되는 것은 다섯 가지이나 현재 사용하는 것은 네 가지로 마지막 제일 오른쪽 시퍼 연결 부분은 사용하지 않는다. JP1은 RS232 연결로 PC 컨트롤로 사용하는 것인이다. JP2는 RS232 연결로 키 패드 보드 연결용으로 사용, JP3는 RS232 연결로 RS232 포트로 연결되는데 Thermal Printer를 사용하는데 주로 쓴다. JP4는 D2 램프를 켜기 위한 릴레이 구동 신호를 출력시킨다.

바. 모터 보드의 연결



Fig, 22. Linking of motor board

모터 보드는 2개의 모터와 2개의 포토 인터럽트 연결을 할 커넥터로 구성된다. 왼쪽이 셀 모터 커넥터이고, 오른쪽이 필터 모터 커넥터이다. 각각의 모터 커넥터의 오른쪽에 센서를 연결하도록 되어 있다.

사. A/D, LCD 컨트롤 보드의 연결

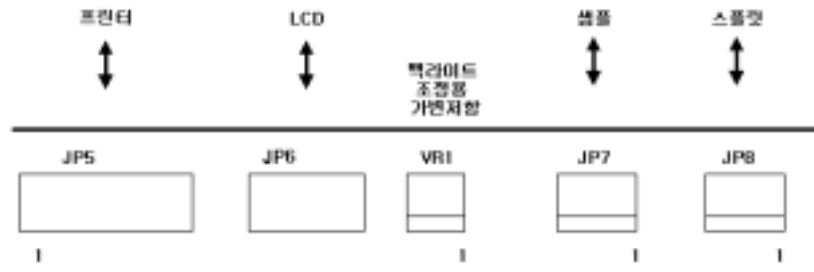


Fig. 23. Linking of A/D, LCD control board

A/D, LCD 컨트롤 보드는 실리콘 포토다이오드 출력을 입력으로 받는 2개의 커넥터 중 JP7은 샘플 디텍터와 연결되고 JP8은 스플릿 디텍터와 연결된다. 그리고 LCD 연결 커넥터 JP6, 프린터 연결 커넥터 JP5가 있다.

7) 데이터 측정

분광광도계에서 측정되는 투과율은 다음과 같이 주어진다.

$$T = \frac{S - D}{R - D}$$

S : 시료 측정시 시료부 검출기의 값

R : 기준물질 측정시 시료부 검출기의 값

D : 시료부 검출기의 암전류

Split beam 시스템에서, drift의 영향을 막기 위하여 split부의 검출기를 함께 사용할 경우 투과율은 다음과 같이 표현할 수 있다.

$$T_c = T * \frac{R_c - D_c}{S_c - D_c}$$

$$= \frac{S - D}{R - D} * \frac{R_c - D_c}{S_c - D_c}$$

S_c : 시료 측정시 split부 검출기의 값

R_c : 기준물질 측정시 split부 검출기의 값

D_c : split부 검출기의 암전류

광원등의 환경변화가 없을 경우

$$\frac{R_c - D_c}{S_c - D_c} \doteq 1$$

이 되며 $T = T_c$ 가 된다.

여기서 계산된 T (투과도)를 \log 를 취하여 -1 을 곱해주게되면 흡광도가 계산된다.

즉,

$$A(\text{흡광도}) = -\text{Log} (T) \text{ 이다.}$$

3. 각종 식품에 대한 미생물의 신속한 측정 시스템 개발 - 다채널, 휴대용

1) 개요

미생물 분석에 사용되는 계측시스템은 단일 파장의 빛을 이용하므로 Spectrophotometer type의 장비보다 Colorimeter type의 장비가 더욱 경제적이며 작업이 용이하다고 판단되었다. Colorimeter는 광학기구파트, 하드웨어, 소프트웨어로 구성되어있다.

또한, 2차년도 까지 개발하여 테스트한 Colorimeter 장비는 다수의 밴드패스 필터를 모터로 구동하여 파장을 변화시키면서 광 계측 하였으나, 그간 실험에 의하여 최적의 측정 파장 영역대를 찾아내어 LED 램프만으로 단일 파장을 입사시켜 보다 정확하고 안정적인 측정 결과를 얻을 수 있게 되었다. 전자 파트 또한 A/D Converter와 CPU가 하나의 칩으로 구성되어 있고 Amplifier를 개선하여 측정 데이터가 선형적이고 노이즈가 적은 회로를 구성하였다.

2) 광학기구파트 구성

기계가공품으로 구성되어 있는 광학기구는 본 Colorimeter 에서 가장 중요한 부분이다.

램프, 광학 Filter, Beam Splitter, 광 Detector, 기타 구조물 등으로 나뉜다.

이전에는 여러 파장의 밴드패스 필터를 모터 구동에 의해 선택하여 측정하는 복잡한 과정과 이를 위한 하드웨어를 가지고 있었으나, LED 광원과 최적조건의 단일 필터를 이용하므로 서 보다 심플한 광학 구조와 작업성을 갖게 되었다.

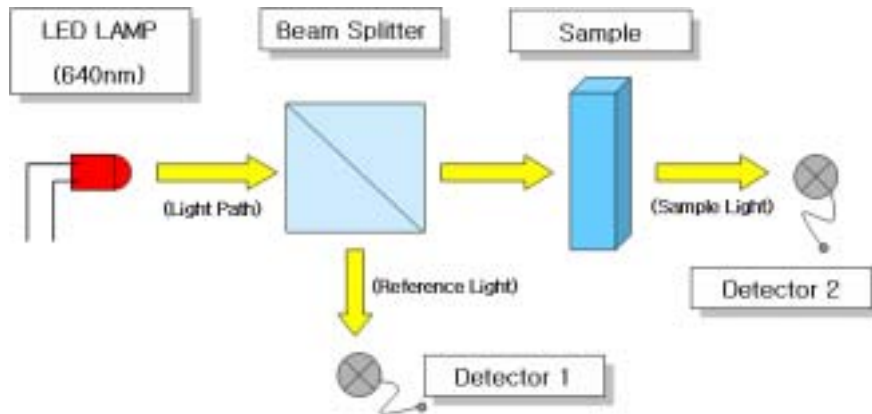


Fig. 24. The schematic diagram of the optical part

Fig 24의 개념도에서 보는 바와 같이 LED 램프에서 나온 UV light(640nm)는 Beam Splitter에 의하여 두 개 나뉜다. 두 개의 Beam 중 하나는 광원의 세기가 시간에 따라 변화 하는 것을 보상해 주기 위하여 기준으로 사용이 되는데, 첫 번째 Detector로 그 세기를 측정하여 보상을 해준다. 다른 하나의 빔은 Sample에 입사되어 그로 인해 발광되는 특정 파장의 빛을 Bandpass Filter를 거쳐 두 번째 Detector로 측정하게 된다.

3) 광학기구파트 제작

가장먼저 광학기구파트의 Beam Splitter를 조립하여 빛을 두 개로 나뉜다. fig 2에서 보는 바와 같이 2-BLOCK에 조립되어지는 Beam Splitter는 45°로 가공되어있는 홈부분에 삽입하여 실리콘(검정색) 이용하여 부착시킨다. 실리콘 사용 후 거칠어진 표면처리를 깨끗이 하여야 한

다. 또한 Detector와 2-BLOCK은을 결합한다.

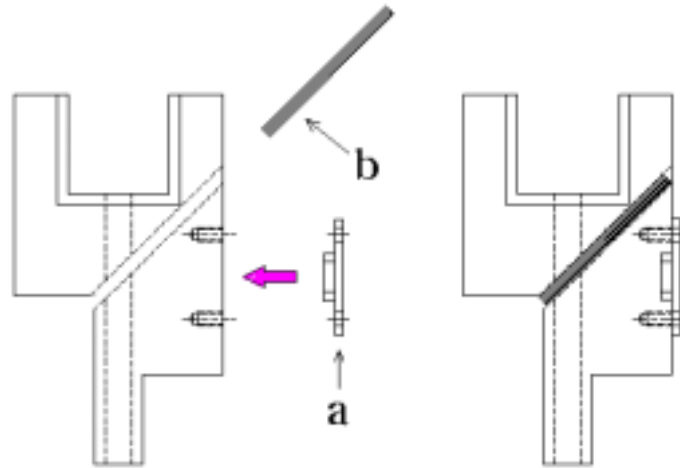


Fig. 25. Detector and 2-Block assembly

a: Detector b: Beam Splitter

Detector를 2-Block에 결합시 사용하는 Bolt는 M2×6 둥근 머리 나사가 사용된다. Detector 부분은 절대 지문이 묻지 않도록 세심한 주의가 요한다. 조립 후 Detector 뒷부분에 검정색 스펀지 테이프로 붙여 외부 빛이 들어오는 것을 최소한으로 줄인다.

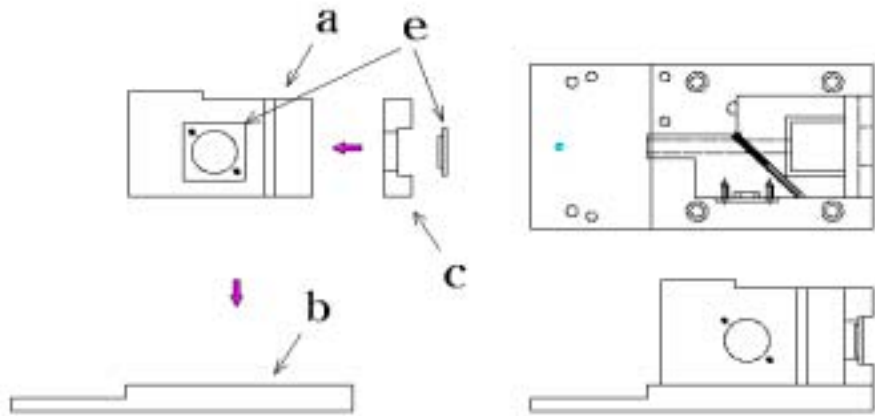


Fig. 26. 2-Block + 3-Block + 4-Block + Detector

a: 2-Block b: 3-Block c: 4-Block e: Detector

Fig 26은 광학 파트가 모두 조립되어 base(3-block) 위에 올라가는 그림이다. Fig 25에서 조립된 2-Block에 3-Block을 M3×6 Bolt를 이용하여 조립하고 조립된 파트를 4-Block에 조립한다. 2-Block 조립파트를 4-Block에 조립할 때 M4×12 둥근 머리 Lench Bolt를 이용하여 파트를 체결한다

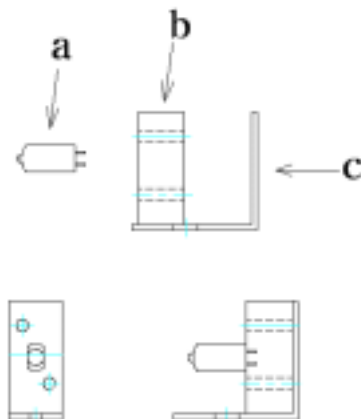


Fig. 27. LED Lamp assembly

a: LED Lamp b: Lamp Socket c: Lamp-Holder

Fig. 27. 는 LED 램프의 조립을 보여 준다. 광의 세기가 비교적 약한 UV-LED(640nm) 램프를 사용하기 때문에 무엇보다도 정확한 위치에 단단히 고정 하여야 한다.

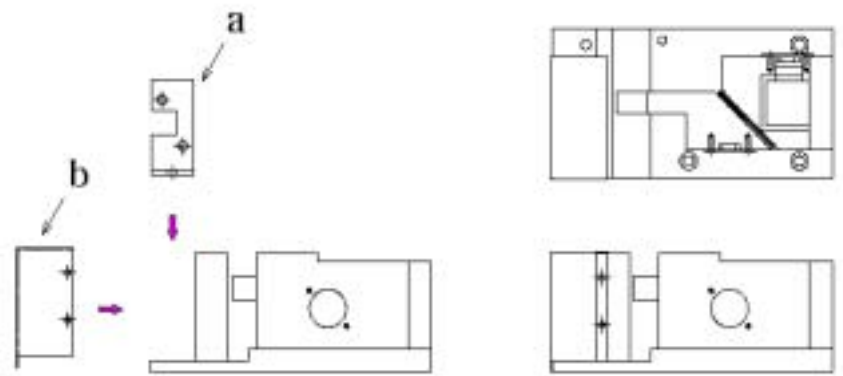


Fig. 28. the Optical part assembly

a: Fig. 27에서 조립된 파트 b: Lamp-Cover

Fig 28는 Fig. 27에서 조립된 Lamp-Set와 Lamp Cover를 광학기구 본체에 조립하는 그림이다. Lamp Set의 조립 시 M3×5 Bolt를 이용하여 각 부품들을 체결하고 Lamp Cover의 체결 시에는 M2×5 Bolt를 이용한다. 위 도면은 지금까지 나타난 모든 도면이 결합되어진 광학파트를 최종적으로 그린 것이다.

4) 전자파트 구성

(1) 메인 보드

메인 보드는 CPU로 Analog Devices Inc.의 ADuC836 프로세서를 사용 하였고 Texas Instruments Inc.의 OPA111 OPAMP, HAMAMAMTSU 사의 Si-Photodiode, ODT 사의 LCD 그리고 기타 TTL 게이트로 구성되어 있다.

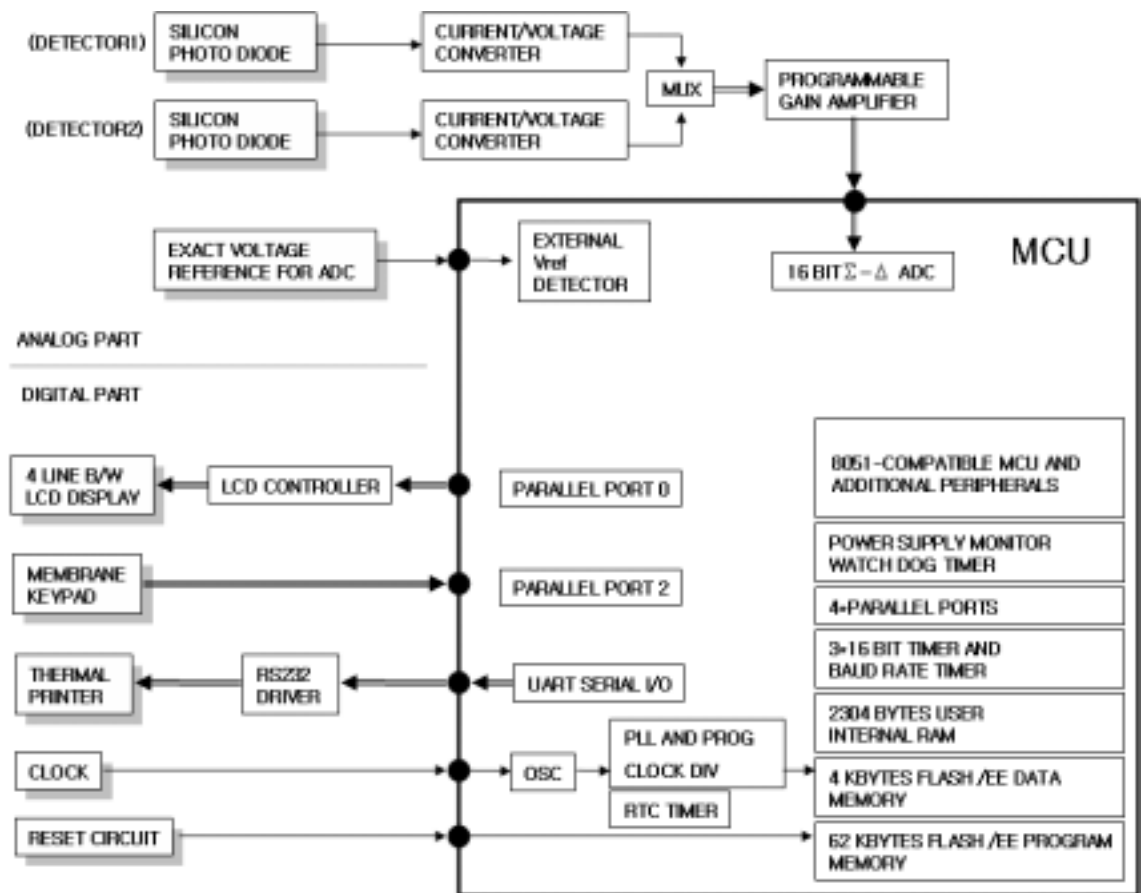


Fig 29. Electronics Part Block Diagram

(2) ADuC836

ADuC836은 16bit A/D Converter를 내장하고 있는 ADI의 ROM, RAM이 내장된 마이크로 컨트롤러이다.

가.. 사양

Table 2. ADuC836 Specification

MCU Core	8052 (12-clk)
MCU Speed (MIPS)	1
Flash (kBytes)	62kBytes
SRAM (bytes)	2304Bytes
GPIO Pins	34
Resolution (bits)	16bit
ADC Speed (kSPS)	0.105kSPS
ADC # Channels	4
12 Bit DAC Outputs	1
PWM	–
External Memory Interface	X
Temperature Range (°C)	–40 to 125

나. 세부 특징

1) 2-Channel, Differential Input, Programmable Gain, Self-Calibrating,

16-Bit Primary ADC

2) 3-Channel, Single-Ended Input, Self Calibrating, 16-Bit

- Auxiliary ADC Single 12-Bit Rail-to-Rail Voltage-Output DAC
- 3) Two Flexible PWM Outputs
 - 4) Industry Standard 8052 Microcontroller
 - 5) 62K-Byte In-Circuit Re-Programmable Flash Program Memory
 - 6) 4K-Byte Read/Write Accessible Non-Volatile Flash Data Memory
 - 7) 2K-Byte SRAM (In Addition to
 - 8) the 256-Bytes in the 8052 Core)
 - 9) Precision Temperature Sensor
 - 11) Programmable PLL Clock &
 - 12) Low Power Operating Modes
 - 13) Voltage Reference, Serial Interface
 - 14) Ports, Watchdog Timer, Power
 - 15) Supply Monitor, Power-On-Reset (POR), etc
 - 16) Embedded Download/Debug &
 - 17) Emulation Features

ADuC836은 일반 컨트롤러로서 동작 가능하지만 이 보다는 다양한 Analog-Digital 변환 기능을 갖는 더 낮은 컨트롤러이다.

다. 구조

하나의 칩에 여러 기능을 포함하고 있다. ADuC836 MCU는 주변회로의 설계가 용이하고 간편하여 소형화와 고기능, 저가격의 회로 설계가 용이하다.

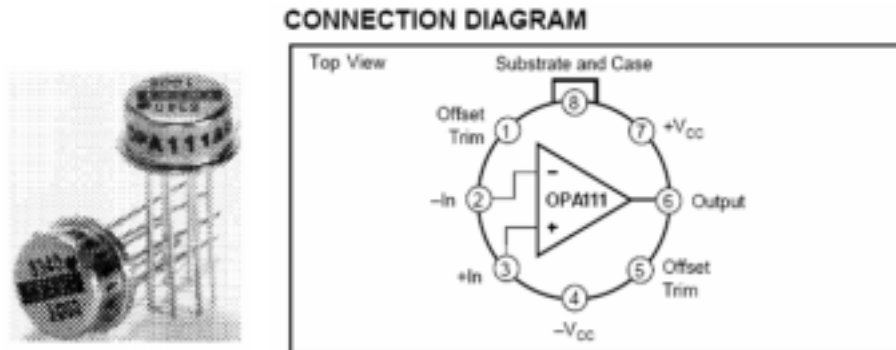


Fig 31. Texas Instruments's OPA111 OPAMP

(4) Photodiode

본 개발품에서 빛을 감지하기 위하여 사용한 S1227-66BR Photodiode는 광소자 업체로 유명한 일본 HAMAMATSU 사의 실리콘 포토센서이다. fig 9의 센서 도면에서 빛을 감지하는 영역(active area)은 5.5 x 5.5(mm)의 크기이며 이 영역 안쪽으로 빛이 입사해야만 센서가 반응하여 양단에 전류가 흐른다. fig 10에서 보는 바와 같이 가시광선 영역에서 반응한다.

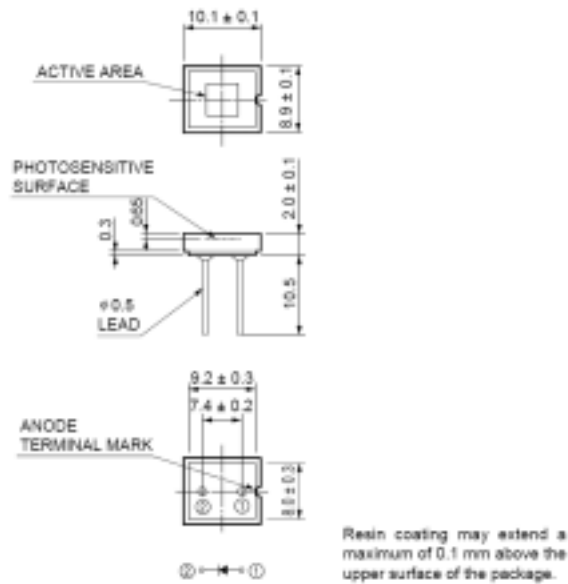


Fig. 32. HAMAMATSU's 1227-66BR Silicon Photodiode

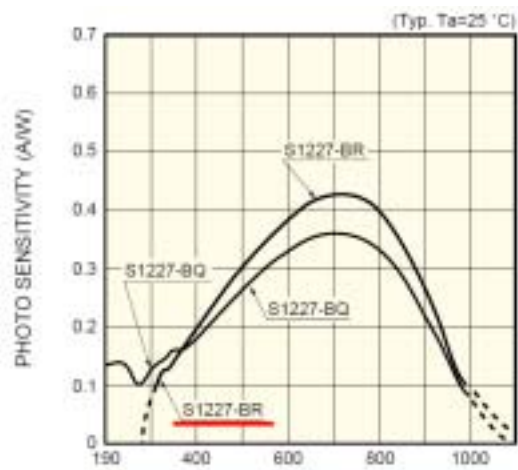


Fig. 33. S1227-66BR Photodiode Spectral Response

(5) LCD

본 계측장비에서는 데이터를 사용자에게 보여주기 위하여 디스플레이 장치가 요구된다. 주로 미생물 분석의 데이터를 수치로 표시하기 때문에 단순 하면서도 사용자의 식별이 쉬운 16 x 4 Character LCD 모듈을 사용하였다. 사용한 LCD 모듈은 ODT 사의 OCM-16416D 모델이며 수명이 긴 LED 백라이트를 채용하여 주간 혹은 야간에도 식별이 쉽고 전력 소모가 크지 않다.



Fig. 34. OCM-16416D LCD (Front Side)

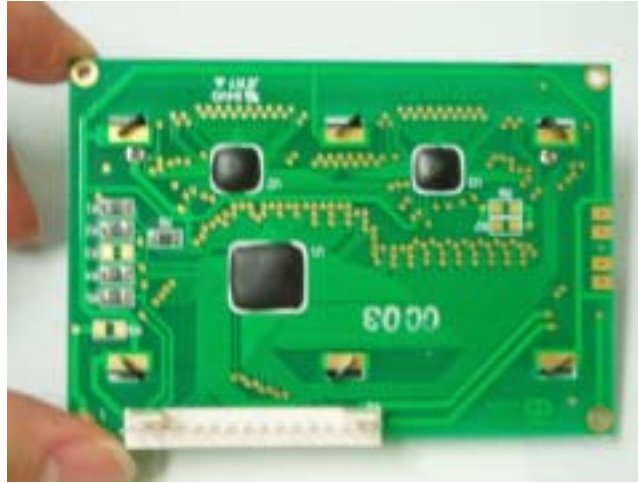


Fig 35. OCM-16416D LCD (Rear Side)

(6) 계측기의 제작



Fig. 36. the Mainboard using ADuC836 MCU (Final Revision)

Fig 36에서 보는바와 같이 하나의 보드에 ADuC836 MCU와 증폭회로 전원부가 삽입되어 있다.

본 장비가 정밀 계측기로 사용되기 위해서는 입력되는 신호대비 디지털 변환 값이 선형적으로 변환되어야 한다. 즉 입력되는 일정한 아날로그 시그널 대하여 gain(이득률)의 변화가 없어야 한다. 이를 위해 표준과 학연구원에서 보유하고 있는 Voltage Calibrator를 이용하여 수 mV의 정전압을 생성시켜 정밀하게 테스트 해 보았다.

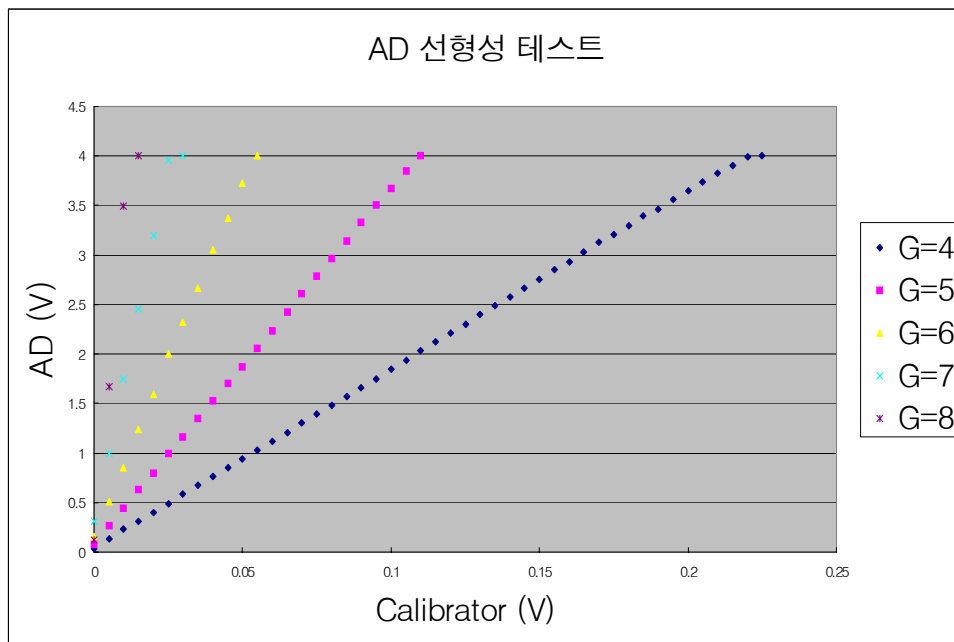


Fig. 37. A/D Converter's Linearity

위의 Fig. 37는 기존의 A/D 변환기를 외부의 Calibrator를 입력으로 하여 각 Gain 별 선형성을 측정한 결과들이다. 이들 선형성에 미치는 영향으로 Multiplexer와 각 저항의 오차 및 회로설계의 방법에 따라 나타

날 수 있는 현상이다. ADuC836 MCU는 8051 Core와 내부에 PGA 기능이 포함되어 있으며, 또한 4개의 아날로그 입력을 가지고 있어 프로그램 적으로 gain의 변화가 가능하고 여러 아날로그 시그널을 하나의 칩으로 입력 받고 디지털로 변환 할 수 있다.

측정 결과는 0V에서 0.25V까지 10mV간격으로 입력 신호를 주었을 때 증폭되어 디지털로 변환되는 값을 표시한 그래프이다. 각각의 gain별로 다른 기울기를 보이고 R^2 값이 0.999이상으로 일정한 선형성(Linearity)을 보였다.

Fig. 38는 ADuC836 프로세서와 신호처리부의 회로도이고 Fig. 39은 광전류를 전압으로 변환해 주는 전류/전압 변환회로를 보여준다. Fig. 40은 파워 공급 부분이다.

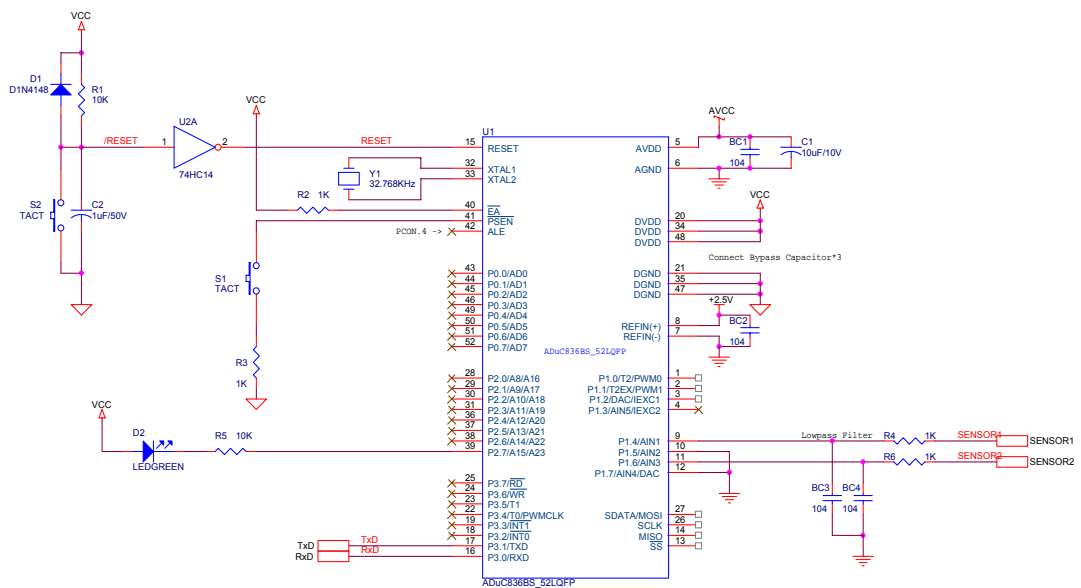


Fig 38. a MCU Part

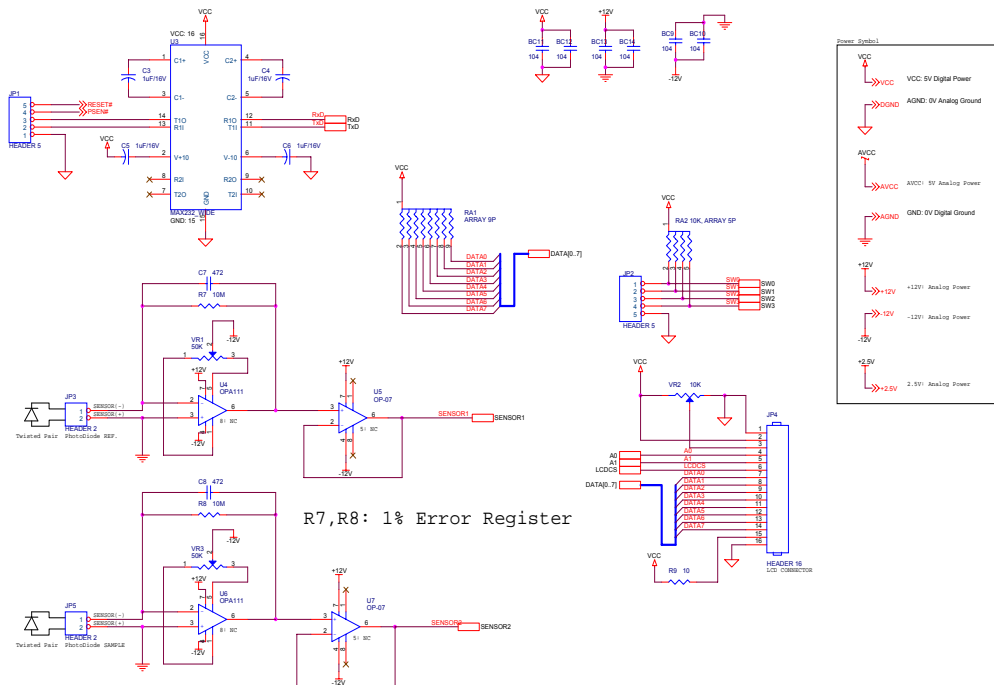


Fig. 39. The Sensor and the Amplifier Part

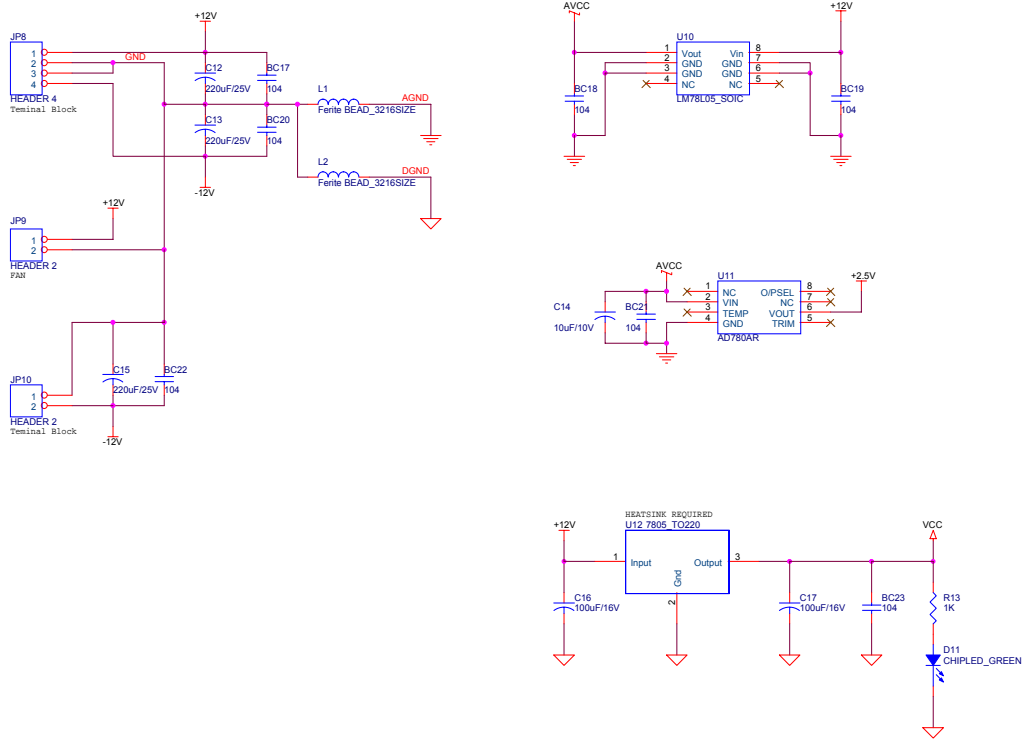


Fig. 40. a Power part



Fig. 41. Device Inside #1



Fig. 42. Device Inside #2



Fig 43. Microbe Analyzer (Final Revision)

(7) 데이터 측정

미생물 분석기기에서 측정되는 투과율은 다음과 같이 주어진다.

$$T = \frac{S - D}{R - D}$$

S : 시료 측정시 시료부 검출기의 값

R : 기준물질 측정시 시료부 검출기의 값

D : 시료부 검출기의 암전류

본 기기에 적용된 Split beam 시스템에서, drift의 영향을 막기 위하여 split부의 검출기를 함께 사용할 경우 투과율은 다음과 같이 표현할 수 있다.

$$\begin{aligned} T_c &= T * \frac{R_c - D_c}{S_c - D_c} \\ &= \frac{S - D}{R - D} * \frac{R_c - D_c}{S_c - D_c} \end{aligned}$$

S_c : 시료 측정시 split부 검출기의 값

R_c : 기준물질 측정시 split부 검출기의 값

D_c : split부 검출기의 암전류

광원 등의 환경변화가 없을 경우

$$\frac{R_c - D_c}{S_c - D_c} \cong 1$$

이 되며 $T = T_c$ 가 된다.

여기서 계산된 T(투과도)를 log를 취하여 -1을 곱해주게되면 흡광도가 계산된다.

즉

A(흡광도) = - Log (T) 이다.

제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도

구 분	연구목표 및 평가의 착안점	목표 달성도	기여도
1차년도(2003)	○ 미생물 유래 단백질의 생화학적 특성 조사 ○ 개발기기 도면의 작성	100 100	큼
2차년도(2004)	○ 시약개발에 있어서의 know how ○ 기기개발에 있어서의 know how	100 100	큼
3차년도(2005)	○ 개발시약의 완성도 ○ 개발기기의 완성도 ○ 체계적인 미생물 측정 시스템의 완성도	100 100 100	매우큼
최종평가	○ 미생물 측정용 시약의 완성도 ○ 미생물 측정기기의 완성도 ○ 체계적인 미생물 측정 시스템의 완성도	100 100 100	매우큼

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구를 통하여 개발된 미생물의 신속 측정방법은 이미 특허로 등록되었으며(제 10-0575897, 2006년 4월 25일자), 현재 참여업체인 (주)한국기술산업과 기술이전에 대하여 협의 중에 있다. 또한, 이 기술을 개발하기 위한 기초연구는 현재 관련학회에 논문 투고를 준비하고 있으며, 식품과학회, 식품영양과학회 등에 3회에 걸쳐 발표한 바 있다. 또한 본 연구의 성과물을 토대로 하여 현재 박사과정 1인을 배출할 예정으로 있다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보

■ ATP Bioluminescence assay

살아있는 세포는 대사작용에 이용되는 에너지의 근원인 ATP를 가지고 있으며 식품저장 중 저장기간이 경과함에 따라 오염된 미생물 수가 증가하면 이에 따라 상대적으로 ATP 함량도 증가하므로 ATP 함량을 측정함으로써 오염 미생물의 수를 측정할 수 있는 원리를 이용한 것이다. 이 방법은 north american firefly에서 자연적으로 발생하는 decarboxylation 반응에 기반을 두고 있다.

$$\text{Luciferin} + \text{luciferase} + \text{ATP} \rightarrow (\text{Luciferin-Luciferase-AMP}) + \text{pyrophosphate} \rightarrow \text{Oxyluciferin} + \text{Luciferase} + \text{CO}_2 + \text{AMP} + \text{Light}$$

이 분석법은 비교적 신속하게 측정할 수 있으나, 반응시약이 고가인데다 총균 수에 국한되어 있으며, ATP는 미생물에만 존재하는 것이 아니므로 실질적으로는 미생물 측정이기 보다는 오염도를 측정한다고 보는 것이 맞다고 사료된다. 이러한 면에서 정확도에서 다소 떨어지기 때문에 활용도가 떨어지는 단점이 있다. 일부 식품업체에서는 현재 사용 중에 있으나 대부분 기존의 표준 한천 평판법을 활용하고 있다.

■ DNA probe를 이용한 PCR법

특정의 DNA를 시험관내에서 대량으로 신속하게 증폭하는 방법을 이용한 것이다. PCR의 구성요소는 Primer set(1, 2), dNTPs, Taq polymerase로 되어있으며, 측정 원리는 다음과 같다.

$$\text{primer1} \rightarrow \text{primer2} \rightarrow \text{dNTPs} \rightarrow \text{Taq polymerase} \rightarrow \text{Denaturation} \rightarrow \text{Annealing} \rightarrow \text{Extension}$$

미생물	유전자의 유래(probe의 종류)
Escherichia	내열성 enterotoxin (ST) 이열성 enterotoxin (LT) 장관장착성인자 (EPEC) 세포침투에 관여하는 인자 (EIEC) 자가양독소 (EHEC)
Slmonella spp	속특이적 DNA
Listeria monocytogenes Vibrio cholerae Vibrio parphaemolyticus Staphylococcus aureus Slmonella typhi	리스테리오신 enterotoxin (O1 및 non O1) 내열성 헤모리신 enterotoxin A Vi항원 유전자

그러나 이 측정방법은 균을 동정하는 데에는 신속(24~30시간)하게 처리할 수 있다는 장점을 가지고 있지만, 균수를 측정하는 데에는 어려움이 있으며, 또한 기기 장비 및 반응시약이 고가이며, 어느 정도 전문지식이 있어야 측정 가능한 단점을 가지고 있다.

■ 3M petrifilm에 의한 분석법

본 분석법은 기존의 배지를 개량하여 측정하기에 편리하도록 제조한 것이다. 배지를 만들지 않아도 된다는 장점은 있으나 배양하는데 많은 시간(2일 이상)이 소요되며, 가격이 비싸며, 정확도에서 다소 떨어지는 단점이 있다. patrifilm은 다양한 미생물을 측정할 수 있는 각각의 film이 개발되어 있으며, 전문적인 지식이 없어도 총균수, 대장균, 살모넬라, 리스테리아 등의 균수를 측정할 수 있다. 현재 국내에서도 사용의 편리성으로부터 일부 사용되고 있으나 아직까지 본격적인 보급은 이루어지고 있지 않다.

■ 효소면역학적인 방법

대상균이 가지고 있는 특이적인 항원에 대하여 인위적으로 제조된 항체(균체)를 결합시키고 이러한 결합체에 효소표식인자 및 기질을 반응시켜 측정기구(ELIS A)등을 이용하여 측정하는 검사법이다. 현재 간이 kit 중에서 이 원리를 이용한 검사 kit가 가장 많으며 방법 및 원리는 다음과 같다.

단일크론 항체를 matrix에 고정 → 항원항체 결합 → 효소표식인자와 기질을 반응 → 효소 기질반응에 의한 발색반응 → 측정

- 기타

상기의 외에 VIP kit, CliTrak plus, HY-Lite™, Pentan check 25 등 많은 kit가 개발되어 상용화되고 있지만, 대부분 미생물을 동정하는데 사용되고 있으며, 고가이기 때문에 일반적으로 사용하기에는 어려움이 있다.

제 7 장 참 고 문 헌

1. Candance N. Burnnette and Kisun Yoon : Comparision of growth and survival kinetics of *Salmonella typhimurium* and *Campylobacter jejuni* on cooked chicken breast stored under aerobic conditions at various temperatures. *Food Sci. Biotechnol*, 13(6) 796~800, 2004.
2. Tong-Kyung Kwak and Kyung-Hae Park : A study for the improvemint of the sanitary condition as well as the Quality of foods served in various types of restaurants in Seoul city area. *J. Fd Hyg. Safety* 1(2), 121~131, 1986.
3. Jeong-Weon Kim, So-Jin Lee and Kwan Hwa Park : Antimicrobial effect of *Bifidobacterium breve* and *Bifidobacterium infantis* against *Salmonella typhimurium* KCTC 1925 and *E. coli* O157:H7 ATCC 43895. *Food Sci. Biotechnol*, 11(1) 89~92, 2002.
4. Ki-Ho Han, Chil-Woo Lee, Ok-Soon Yang, Yong-Soon Lee, Yoon-Kyu Lim, and Byoung-Su Yoon : Application of Multilplex PCR using Lis-mix primers in food test and specific detection of *Listeria invanovill*. *J. Fd Hyg. Safety* 16(4), 251~257, 2001.
5. In-Seon Park, Woo-Yeon Kim and Namsoo Kim : Rapid dection of *Salmonellaby* spp. Antibody-Lmmobilized Piezoelectric Crystal Biosensor. *J. Fd Hyg. Safety* 13(3), 206~212, 1998.

6. Yi-Seong Kwak and Jin-Kyu Chang : Effect of various sterilization methods on growth of microorganism contamination in Ginseng powder. *J. Fd Hyg. Safety* 16(3) 221~226, 2001.
7. Hyun-Mi Kang, Yang_Sup Eom, Heong-Suk An, Cheon-jei Kim, Kyung-Hwan Choi and Choog-il Chung : Application of ATP Bioluminescence method for measurement of microbial contamination in raw meat, meat and dairy processing line. *J. Fd Hyg. Safety* 15(3) 252~255, 2000.
8. Eun-Seon Kim and Deok-Young Jhon : Rapid detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. *Korean J. Food Sci. Technol.* 28(6) 1001~1008, 1996.
9. Jee-Yeon Lee and Sang-Ho, Choi : Rapid and direct detection of *vibrio vulnificus* in small Octopus (*Octopus variabilis*) using polymerase chain reaction. *J. Microbiology and Biotechnol.* 5(4) 181~187, 1995.
10. Mi-Hee Cho, Eun-Kyung Bae, Sang-Do Ha, Young-S대 Park, Chul-Kyoon Mok, Kwan-Pyo Hong, Sang-Phill and Jiyong Park : Evaluation of dry rehydratable film method for enumeration of microorganisms in meat, dairy and fishery products. *Korean J. Food Sci. Technol.* 37(2) 294~300, 2005.

11. Hyo-Min Lee, Shi-Nai Choi, Eun-Kyung Yoon, Jee-Yeun Han, Chang-Min Lim and Kil-sang Kim : Study on the methodology of the microbial Risk Assessment in food. *J. Fd Hyg. Safety* 14(4) 319~326, 1999.
12. Ogden, LD : Use of conductance methods to predict bacterial counts in fish. *J. Applied Bacteriol.* 61, 263 (1986)
13. Yi-Seong Kwak, Cheon-Suk Kim, Yong-Bum Song and Sung-Ryong Ko : Rapid microbiological assessment method by using ATP-Bioluminescence in Ginseng powder. *J. Ginseng Res.* 25(3) 127~129, 2001.
14. Jong_Kyung Lee and No-Seong Kwak : Microbiological Risk assessment for food safety control. *F.Sci. and Industry*, 37(1) 61~71, 2004.
15. Lammerding, A. M. and Fazil, A : Hazard identification and exposure assessment for microbial food safety risk assessment. *International J. Food Microbiology*, 58, 147~157, 2000.
16. Voysey, P. A and Brown, M : Microbiological risk assessment, a new approach to food safety control. *International J. Food*

Microbiology, 58, 173~179, 2000.

17. Shin Young, Park, Jin-Won, Choi, Ji-Hye, Yeon, Min-Jeong Lee, Dong-Ha Lee, Keun-Sung Kim, Ki-Hwan Park and Sang-Do Ha. : Assessment of contamination levels of foodborne pathogens isaltaed in major RTE foods marketed in convenience stores. *Korean J. Food Sci. Technol.* 37(2) 274~278, 2005.

18. KFDA. Korea Food and Drug Administration, Available from : [http:// www.kfda.co.kr](http://www.kfda.co.kr). Accessed Oct. 25, 2004.

19. Sung-Hoon Ryu, In-Seon Park, Namsoo Kim and Woo-Yeon Kim : Hybridization of salmonella spp. nucleic acids immobilized on a quartz crystal microbalance. *Food Sci. Biotechnol*, 10(6) 663~667, 2001.

20. Dong_Hyun Kang, G.C. Jiang and Geun-Eog Ji : Recovery of injured *Salmonella typhimurium* with hydrophobic grid membrane filter. *Food Sci. Biotechnol*, 8(3) 193~196, 1999.

21. Sun-Young Lee and Dong_Hyun Kang : Suitability of overlay method for recovery of heat-injured *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* . *Food Sci. Biotechnol*, 10(3) 323~326, 2001.

22. Dong-Whan Gu, Choong-Il Chung, Dong-Kwan Jeong and Eun-Sook Nam. : Contamination of *Listeria* spp. in market beef. *J. Fd Hyg. Safety* 10(2) 89~95, 1995.

23. Sang-Young Lim and Sang-Ryul Yu : *Salmonella* Pathogenicity Island(SPI). *F.Sci. and Industry*, 34(2), 67~80. 2001.

24. Heukeshoven, J, and Dernick, R. : Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *J. Biol. Chem.* 260, 103~112, 1985.

25. Gram, L and H, Songgard. : Microcalorimetry as a rapid method for estimation of bacteria levels in ground meat. *J. Food Prot*, 49, 341, 1986.

26. Buchman, T-G, Rossier, M, Merz, W-G, and Charache, P : Detection of surgical pathogens by in vitro DNA amplification. Part I. Rapid identification of *Candida albicans* by in vitro amplification of a fungus-specific gene. *Surgery*. Aug; 108(2): 338-46; discussion 346-7. 1990

27. Nunes, V, Chillon, M, Lench, N, Ramsay, M, and Estivill, X : PCR detection of the pKM.19/ScrFI RFLP (D7S23), a marker closely linked to the cystic fibrosis mutation. *Nucleic-Acids-Res.* Aug 25; 18(16): 4957. 1990

28. Vaughn, G-L, Toguchida, J, McGee, T-L, and Dryja, T-P : PCR

detection of the Tth 111 I RFLP at the RB locus. Nucleic-Acids-Res. Aug 25; 18(16): 4965, 1990

29. Rodriguez,-J-A, Liou,-G-I, and Daiger,-S-P. : PCR detection of the BgIII RFLP at the RBP3 locus. Nucleic-Acids-Res. Sep 25; 18(18): 5578. 1990.

30. Venta,-P-J, and Tashian,-R-E : PCR detection of the TAQ1 polymorphism at the CA2 locus. Nucleic-Acids-Res. Sep 25; 18(18): 5585. 1990

31. Patel, P.D. : Rapid analysis techniques in food microbiology. Blackie Academic and Professional Press, P5, London, England, 1983.

32. Se-Wook Oh, Jin-Ho Jo, and Nam-Hyouk Lee : Application of ATP Bioluminescence assay for rapid estimation of microbial level in ,arlral(Scomber japonicus). *Korean J. Food Sci. Technol.* 31(5) 1345-1348, 1999.

33. Gruenewaelder, T. and Laaff, R. : Rapid test methods on the basis of ATP bioluminescence. Active hygiene management in the brewing and beverages industry. Brauwelt 138 : 314-317, 1998.

34. Cutter, C.N., Dorsa, W.J. and Siragusa, S.R. : A rapid microbial ATP bioluminescence assay for meat carcasses. Dairy, Food Environ. Sanitation. 16 : 726-736, 1996.