

최 종
연구보고서

**포장연제품 관련 병원미생물의 예측 정량평가모델 및
PC용 software 개발**

**Development of Predictive Model and PC Software for
Pathogenic Bacteria in Packaged Surumi Products**

2003. 12

연 구 기 관
강 릉 대 학 교

해 양 수 산 부

Toolbox

제 출 문

해양수산부 장관 귀하

본 보고서를 “포장연제품 관련 병원미생물의 예측 정량평가모델 및 PC용 software 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2003년 11월 20일

주관연구기관명 : 강릉대학교
총괄연구책임자 : 신 일 식
세부연구책임자 : 김 영 태
연 구 원 : 박 욱 연
연 구 원 : 김 미 숙
연 구 원 : 이 재 진
연구보조원 : 문 성 양
연구보조원 : 장 태 은
연구보조원 : 이 건 욱
연구보조원 : 변 주 선
연구보조원 : 신 오 규
연구보조원 : 이 정 현
연구보조원 : 이 용 권
연구보조원 : 강 정 수

요 약 문

I. 제 목

포장연제품 관련 병원미생물의 예측 정량평가모델 및 PC용 software 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

식품 중의 병원 및 부패미생물에 의한 건강피해는 과학적 기술이 진보한 현대에 있어서도 여전히 세계적으로 중요한 문제이다. 그 배경으로서 계란을 매개로 한 *Salmonella Enteritidis*, 최근 일본을 강타한 장관출혈성대장균 O157:H7에 의한 식중독 사건의 세계적인 발생 및 특히 구미에서 문제가 되고 있는 식품을 원인으로 한 *Listeria monocytogenes*에 의한 집단감염 사례 등이 있다.

이와 같은 상황에서 식품의 미생물학적 안전성을 확보하기 위해서 최근 또 하나의 새로운 흐름으로서 식품 중에서의 미생물의 증식, 생산 및 사멸을 수학 모델을 이용하여 정량적으로 해석, 예측하는 연구가 특히 구미에서 많이 이루어지고 있다. 이 새로운 연구 분야는 예측식품미생물학(Predictive Food Microbiology)이라고 불리며, 각종 조건 하에서 식품 중의 미생물의 거동을 예측할 수 있는 해석수단으로서의 가치가 인정되고 있다. 이 같은 예측식품미생물학의 발달과 함께 병원 및 병원미생물에 오염된 식품을 섭취하는 것에 의한 감염의 Risk(위험도)를 정량적으로 평가하고자 하는 움직임이 구미 각 국에서 시작되어, FAO(Food and Agricultural Organization)/WHO (World Health Organization) 합동의 CODEX 위원회(CODEX Alimentarius Commission)에서는 그 guide line의 작성이 진행 중에 있다.

예측미생물학은 품질보존의 측면에서 생선식품의 미생물에 의한 변패 예측과, 안전성의 측면에서 식중독균의 발육에 미치는 환경요인의 영향에 관한 2가지의 분야에 대하여 1960년 이후의 연구에 의하여 축적된 지식을 기초로 발전하여 왔다. 전자는 어패류, 식육 및 우유의 냉장온도와 보존기한의 관계 해명으로부터 출발하였고, Australia, Canada, 미국 중서부의 대학 등에서 주로 연구가 진행, Ratkowsky 등이 먼저 균의 발육속도와 온도와의 관계의 모델식을 발표하였다. 후자는 소시지나 어육 중의 식중독균의 거동 혹은 독소생산에 미치는 온도, pH, 수분활성 등의 영향에 대해서 거의 같은 시기부터 주로 영국의 식품관계 연구기관이나, 미국의 대학에서 연구가 진행되고 있다. Software가 실용화된 것은 병원균을 주 대상으로 한 영국의 Food Micromodel⁴⁾과 미국의 Pathogen Modeling Program이다. Food Micromodel과 Pathogen

Modeling Program에서는 1차 모델식에 Gompertz가 1825년에 인구동태의 조사결과를 경험식으로서 제시한 Gompertz관수를 적용시키고 있지만, 그 후 Baranyi 등의 개변식을 영국에서는 이용하고 있다. 그러나 이 식을 그대로 적용하는 경우에는 최적발육온도보다도 높은 온도역에 의 외삽, 혹은 발육하한에 가까운 온도역에서는 실험치와의 적합성이 나빠지기 때문에, Ratkowsky 등은 카고시마 대학의 太田과 平原의 논문¹⁸⁾에 힌트를 얻어 평방근 모델을 제창하고, 또 영국 유니레바 연구소의 group은 Arrhenius식으로부터 얻은 Schoolfield의 식을 채용하고 있다. 그러나 수산가공식품에서 문제가 되는 병원미생물을 대상으로 한 수치 예측 모델식에 관한 연구는 찾아보기 힘들다.

식품유래의 병원미생물에 의한 위해성을 정량화 하려는 시도가 최근 국제적으로 식품 안전 상 관심도가 높은 *S. Enteritides*, *L. monocytogenes*, 장관출혈성 대장균 O157:H7의 3균종을 대상으로 보고되어 있다. *S. Enteritides*에 대하여 Whiting과 Buchanan은 껍질을 제거한 저온살균 계란으로 마요네즈 가공시에 감염균의 위해성을 “The Unit Operation Approach method”에 의해 정량화 하였다. Miller 등은 *L. monocytogenes*의 식품미생물학적 안전기준치를 미생물학적 위해성 평가모델을 작성하여 해석하였다. 또한, Marks 등은 마쇄 쇠고기의 생산에서 소비에 이르기까지의 장관출혈성 대장균 O157:H7의 전체적인 위해성에 대하여 정량적인 위해성 모델을 개발하였다. 더욱이 Brown 등은 계육제품에 의한 *Salmonella* 감염증에 대하여 컴퓨터 그래픽으로 표현할 수 있는 정량적 평가모델을 개발하였다. 이는 미생물학적 위해성을 평가하는 종합적인 전문 프로그램으로서의 최초라 할 수 있다.

국내의 경우 수산식품에 있어서 특정균을 배지에 접종하고 온도, pH, 수분활성 등, 일정한 조건하에서 경시적으로 생균수를 측정하고, 그것을 수학적으로 취급하기 쉬운 형태(일반적으로 대수)로 변환한 값을 시간에 대하여 plot한 1차 모델(예, 미생물의 열사멸곡선, 발육곡선)과 온도 등 발육에 영향을 미치는 요인의 값을 변화시킨 경우, 1차 모델식의 parameter의 변화를 모델화한 2차 모델(반응속도정수와 온도와의 관계를 나타내는 Arrhenius식, 열사멸곡선으로부터 얻어지는 D-value(또는 F-value)와 가열온도와의 관계 등)은 있지만, 관련 병원미생물을 대상으로 각 요인의 어느 범위 내에서의 각각의 값에 대응하는 균의 반응의 정량적 정보가 얻어질 수 있도록 2차 모델을 조합하여 소프트화 하고, 이용자가 그 수치와 그것을 도형화해서 PC로서 쉽게 이용할 수 있도록 한 3차 모델(웹기반 인터넷 프로그램)의 개발에 관한 연구는 전무한 실정이다. 또한 본 연구과제에서 제시한 포장연제품 관련 병원미생물의 예측 정량평가모델 및 PC용 software 개발에 관한 연구는 아직 없기 때문에 관련 기술의 발전을 선도하기 위하여서는 이 분야의 연구가 시급하다고 생각한다.

따라서 본 연구는 첫째, 포장연제품 관련 병원미생물의 주요 환경인자별 기본 정량평가모델 확립하고, 둘째, 복합 환경인자별 병원미생물의 예측 정량평가모델의 개발 및 database 구축하여 셋째, 병원미생물에 대한 예측 정량평가모델을 컴퓨터 프로그램화하여 넷째, 일반사용자를

위한 PC용 예측 software의 개발 및 웹기반 그래픽 인터페이스 개발하고, 다섯째, 포장연제품 생산현장에서의 예측프로그램 적용하기 위하여 수행되었다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 병원미생물의 예측 정량평가모델의 개발 및 database 구축

가. 병원미생물의 제조현장 관련 각종 환경 인자에 대한 성장변화 조사

포장연제품의 주요 대상 병원 미생물인 *Vibrio parahaemolyticus*와 *Listeria monocytogenes*를 선정하고, 포장 연제품(게맛살)의 조성과 유사한 모의배지 개발하여 제조현장에 관련된 대표적 환경인자로서 온도와 pH를 선정하여 서로 다른 환경조건(배양온도 및 pH 변화)하에서 균의 성장을 조사하였다.

나. 주요 환경 인자별 기본 정량평가모델의 개발

기본성장 예측모델로서의 Gompertz 모델식의 적용 가능성을 검토하였으며 균의 성장에 미치는 온도와 pH의 영향을 정량적으로 평가하였다.

다. 포장연제품을 이용한 복합 환경인자 별 병원미생물의 예측정량평가모델의 개선 및 확립

15회 이상의 반복실험을 통하여 온도, pH 등 복합 환경 인자별 병원미생물의 정량평가 모델을 개선하였으며, 평방근모델(Square root model)과 다항식모델(Polynomial model)을 이용하여 제조현장의 환경인자인 온도, pH, 등에 대한 병원미생물의 성장예측모델을 작성하고 복합 환경조건(초기균수, 배양온도 및 pH 변화)하에서 균의 성장을 조사하였다.

라. 포장연제품에 대한 예측정량평가모델의 각 parameter에 미치는 영향의 수치화 및 database 구축

예측정량평가모델의 각 parameter에 미치는 환경인자의 영향을 2차식을 이용하여 수치화하고, 반복실험을 통하여 수치화한 환경인자의 영향을 database한 후 database를 이용하여 환경인자의 변화에 따른 병원미생물의 성장을 예측하였다.

마. 실제 포장연제품에서의 접종실험을 통한 표준소프트웨어의 적용성 향상

포장연제품에서 부패미생물을 분리하여 예측정량평가모델을 확립한 후, 부패미생물을 포장연제품에 직접 접종하여 예측정량평가모델을 완성하였고 반복실험을 통하여 복합 환경조건(배양온도 및 pH 변화) 하에서 포장연제품에 있어서 부패미생물의 성장을 예측하는 정량평가모델을 개선을 시도하였다.

바. 시뮬레이션을 통한 신뢰도 확인

실제 포장연제품을 대상으로 확립된 예측정량평가모델을 컴퓨터 프로그램화하고 프로그램화된 컴퓨터모델에서 얻은 값과 실제 실험에서 얻은 값을 비교하여 신뢰도를 확인하였으며 오차 범위를 $\pm 10\%$ 이내로 줄이기 위한 정량평가모델의 개선 및 프로그램 개선을 시도하였다.

2. 예측모델의 computing 기술 적용 및 웹(web) 기반 그래픽 인터페이스 개발

가. 병원미생물에 대한 환경 인자별 수치계산 모델의 개발

병원미생물의 증식 예측 모델에 따른 환경 인자별 컴퓨터 계산 모델을 작성하였으며 미생물 성장환경의 예측 프로그램에서의 결과는 실험 모델과 컴퓨터를 이용한 수치모델의 결과의 비교를 통하여 정확도를 확인하였다.

나. 표준 소프트웨어(프로트 타입)의 개발

컴퓨터의 기종에 관계없이 인터넷에서 사용이 가능하도록 웹을 기반으로 하는 GUI (Graphic User Interface) 환경을 구축하였으며, 사용자별로 아이디와 비밀번호를 부여하여 각 개인별로 데이터베이스를 구축할 수 있도록 하였으며 데이터베이스의 보안을 유지하고 GUI (Graphic User Interface)를 이용하여 사용자가 데이터를 마우스만을 이용하여 쉽게 입력하고 그래프의 결과를 쉽게 출력할 수 있도록 시도하였으며 또한 좀더 다양하고 편리한 그래픽 환경을 위한 프로그램 개선을 시도하였다.

다. 포장연제품에 대한 예측정량평가모델의 parameter 변화를 적용한 수정 다항식의 도출

수치모델 표현 시 속도를 개선하고 mySQL 데이터베이스 사용으로 데이터를 체계적이고 안전하게 관리하며, PERL(Practical Extraction and Report Language) 스크립트 언어에서 PHP (Personal Home Page tools) 스크립트언어 사용으로 코드를 간소화하고 수치모델의 보다 더 정확한 표현을 위해서 수치모델을 하나의 이미지로 다운로드 가능하도록 프로

그램 개선을 시도하였다.

라. 표준소프트웨어의 일반 PC용 제품 개발

예측정량평가 프로그램은 실험을 통하여 얻어진 (i) *Listeria monocytogenes*, (ii) *Vibrio parahaemolyticus*, (iii) 계맛살 부패세균 등에 대한 예측용 계산모델을 이용하여 주어진 초기 균수, 온도 등의 인자값에 대한 균류의 예측 결과를 수식 그래프로 볼 수 있도록 시도하였으며, 예측 모델 프로그램에서는 서버 컴퓨터에서의 계산 환경을 구축하여 각 사용자의 개인용 프로그램이 아닌 인터넷에 연결된 웹 브라우저만 있으면 어디에서도 사용이 가능하도록 시도하였다. 또한 사용자별로 아이디와 비밀번호를 부여하여 각 사용자가 별도의 데이터베이스를 구축하고 보안을 유지할 수 있도록 시도하였다.

마. 인터페이스 개발 및 웹서버를 이용한 인터넷 프로그램 적용

사용자가 쉽게 사용할 수 있도록 인터넷상에서 웹을 기반으로 하는 GUI(Graphic User Interface)를 제작하였으며, 이러한 웹기반의 예측모델 프로그램은 사용자가 간단하고 쉽게 데이터를 입력하고 그래프의 결과를 화면에 출력할 수 있도록 하였다. 그리고 미생물 성장환경의 예측 프로그램의 검증에 위하여 실제 실험 모델의 결과와 컴퓨터를 이용한 수치 모델의 결과를 비교하여 정확도를 분석하였다.

IV. 연구개발결과

1. 병원미생물의 예측 정량평가모델의 개발 및 database 구축

가. 병원성 미생물의 성장 예측 모델의 개발

(1) *Vibrio parahaemolyticus*의 성장 예측 모델의 개발

(가) Gompertz model에 의한 균의 성장

균의 성장 변화를 예측하기 위하여 균의 증식을 표현하는 기본 모델로 Gompertz 식을 사용하였으며 각각의 환경 요인에 따른 균의 성장을 다음과 같은 Gompertz 모델식으로 표현하였다.

$$\text{Log}N = A + C \times \exp[-\exp\{-B \times (t - M)\}]$$

$$k = BC/e$$

$$\text{Generation time (GT, hr)} = (\log 2) e / BC$$

$$\text{Lag time (LT)} = M - (1/B)$$

(나) 환경 조건에 따른 균의 생육 지표치의 변화

각 환경 요인에 따른 균의 증식을 예측하기 위하여 균의 증식을 대표하는 생육지표로써, 최대증식속도상수(k), 유도기(LT), 세대시간(GT)를 Gompertz 모델로부터 구하였다.

최대증식속도상수(k)는 온도가 높아질수록 빨라져, 37°C에서 가장 빨랐으며 (1.10±0.16), 40°C에서는 다소 느려졌고, 초기균수와 pH에 따른 유의적인 차이는 없었다($P>0.05$). 유도기(LT)의 경우도 온도가 높아질수록 유도기는 짧아졌으며, 37°C에서 가장 짧은 유도기 (1.69±0.303 hr)를 나타내었으며 40°C에서는 유도기가 다시 길어졌다. 초기균수와 pH에 따른 유의적인 차이는 없었다($P>0.05$). 세대시간(GT)의 경우도 온도가 높아질수록 세대시간은 짧았으며, 37°C에서 가장 짧은 세대시간 (0.31±0.041 hr)을 나타내었고, 37°C보다 높은 온도에서는 세대시간은 길어졌다. 한편, 초기균수와 pH에 따른 유의적인 차이는 없었다($P>0.05$).

(다) 2차 모델에 의한 최대증식속도상수(k)에 미치는 환경 조건의 영향을 정량화

① pH와 온도의 변화에 따른 초기균수 별 정량평가모델

각 초기 균수에서 pH와 온도에 따른 속도상수의 변화를 관찰하였다. 초기 균수와 pH에 따른 유의적인 차이는 없었으며, 각 초기균수 조건에서 pH와 온도의 복합적인 영향을 표현하기 위해서 Sigmaplot 7.0(SPSS Inc.)의 Gauss-Newton 알고리즘을 사용한 비선형 회귀분석을 통하여 $f=a \cdot \exp(-0.5 \cdot ((T-T_{\max})/b)^2 + ((pH-pH_{\max})/c)^2)$ 형태의 다항식으로 나타내었다. 각 초기 균수에 따른 상관관계는 0.966, 0.979, 0.965이며 초기균수에 따른 최대증식속도상수(k)의 유의적인 차이가 없으므로 초기균수 조건을 무시할 경우, 상관관계가 0.966으로 나타났다.

② 다항식을 이용한 속도상수의 실험치와 예측치의 비교

*V. parahaemolyticus*의 실험을 통하여 구한 최대증식속도상수(k)와 다항식에 의해 예측된 최대증식속도상수(k) 값을 곡면응답법으로 비교한 결과 실험치와 예측치는 잘 일치하는 것을 알 수 있었다.

③ 2차 모델식과 Gompertz 모델에 의한 균의 성장

최대증식속도상수(k)에 미치는 온도와 pH의 영향을 모델화한 정량평가모델식으로 서로 다른 초기 균수, 온도, pH 조건에서 균의 최대증식속도상수(k)를 예측할 수 있었다. 이를 바탕으로 균의 성장 곡선을 표현하는 Gompertz식에 적용함으로써, 각 조건에서 Gompertz식에 의한 균의 성장이 예측 가능하게 되었다.

(2) *Listeria monocytogenes*의 성장 예측 모델의 개발

(가) 환경 조건에 따른 균의 생육 지표치의 변화

각 환경 요인에 따른 균의 증식을 예측하기 위하여 균의 증식을 대표하는 생육지표로서, 최대증식속도상수(k), 유도기(LT), 세대시간(GT)를 Gompertz 모델로부터 구하였다.

균의 최대증식속도상수(k)에 미치는 환경 요인의 영향을 알아보기 위하여 *L. monocytogenes*의 초기 균수를 다르게 하여 서로 다른 온도에서 배양하였으며, 그 결과 최대 증식 속도상수에 미치는 온도의 영향은 온도가 높아질수록 값이 증가하여, 37℃에서 가장 높은 값을 나타내었으며 40℃에서는 감소하였다. 초기 균수에 따른 최대증식속도상수(k)는 유의적인 차이를 나타내지 않았다 ($P>0.05$). 유도기(LT)의 경우도 온도가 높아질수록 유도기(LT)는 짧아졌으며, 37℃에서 가장 짧은 유도기(LT)를 나타내

있으며 초기 균수와 pH에 따른 유의적인 차이는 없었다 ($P>0.05$). 세대시간(GT)의 경우 온도 온도가 높아질수록 짧아져 37°C와 40°C에서 가장 짧았으며, 초기 균수에 따른 유의적인 차이는 없었다 ($P>0.05$).

(나) 환경 조건이 최대증식속도상수(k)에 미치는 영향의 2차 모델에 의한 정량화

① 온도의 변화에 따른 최대증식속도상수(k)의 정량평가모델

초기 균수에 따른 최대증식속도상수(k)의 유의적인 차이는 없었으며 ($P>0.05$), 따라서 초기균수 항이 없는 온도와 최대증식속도상수(k)간의 상호작용을 표현하는 변화는 2차 모델인 평방근 모델을 사용하여 $\sqrt{k} = b (T - T_{min}) [1 - \exp(c(T - T_{max}))]$ 형태로 정량화 하였다. 한편, 초기 균수를 고려할 경우, Sigmaplot 7.0(SPSS institute)의 Gauss-Newton 알고리즘을 사용한 비선형 회귀분석을 통하여 $f = a \cdot \exp(-0.5((T - T_{max})/b)^2 + ((A_0 - A_{0max})/c)^2)$ 형태의 다항식으로 나타내었다. 본 연구에서는 최대증식속도상수(k)와 환경요인간의 관계를 평방근모델과 다항식모델을 사용하여 나타낸 결과, 상관관계가 각각 0.95, 0.92로 평방근모델이 좀 더 나은 적용성을 나타내었다.

② 다항식을 이용한 최대증식속도상수(k)의 실험치와 예측치의 비교

*L. monocytogenes*의 실험을 통하여 구한 최대증식속도상수(k , 실험치)와 평방근 모델식과 다항식에 의하여 예측된 최대증식속도상수(k , 예측치)를 비교하였으며, 평방근모델과 다항식모델에 의한 예측치는 실험치와 근사값을 나타내고 있으며, 평방근 모델에 의한 예측치가 다항식모델의 예측치에 비하여 실험치와 다소 높은 상관관계를 가지고 있는 것을 알 수 있었다.

(다) 2차 모델식과 Gompertz 모델에 의한 균의 성장

최대증식속도상수(k)에 미치는 온도와 pH의 영향을 모델화한 정량평가 모델식으로 서로 다른 초기 균수, 온도, pH 조건에서 균의 최대증식속도상수(k)를 예측할 수 있었다. 이를 바탕으로 균의 성장 곡선을 표현하는 Gompertz식에 적용함으로써, 각 조건에서 Gompertz식에 의한 균의 성장이 예측 가능하게 되었다.

나. 개맛살 부패 세균의 성장예측 모델

(1) 개맛살 부패 세균의 분리 및 생화학적 특성

한성 수산(주)의 개맛살 제품을 25°C incubator에서 5일간 방치한 후 균질화 하여 BHI(Brain heart infusion, Difco. co. USA)에 도말하였다. 평판상에서 검출 빈도가 높고

colony의 특징이 뚜렷한 두 종류의 colony를 분리하여 게맛살의 주 부패 세균으로 정하였다.

분리 균주의 동정을 위하여 Gram stain, motility, spore, Catalase, ONPG 및 생화학적 특성을 관찰하였으며, API kit 50CH를 이용한 49종류의 당 이용 시험을 실시하여 균을 동정하였다. 그 결과, 게맛살 부패의 주 원인 세균은 내열성 포자를 형성하는 *Bacillus subtilis* 와 탄소원으로 당을 분해하여 exopolysaccharide를 생산하는 *Bacillus licheniformis* 로 판단되었다.

(2) 환경 조건에 따른 균의 생육 지표치의 변화

(가) 부패균의 성장 - 배지 내

게맛살의 부패에 영향을 미치는 주요 세균은 *B. subtilis* 와 *B. licheniformis* 의 두 그룹으로 나눌 수 있다. 두 그룹간의 부패한 게맛살 내 점유 비율은 각각, 60%와 34%로 나타났다. 게맛살 내 부패 세균의 증식을 예측하기 위하여, 점유 비율에 맞게 균을 혼합하여, 모의 게맛살 배지(Modified imitation crab sticks broth)에 초기균수 별로 접종하여 서로 다른 온도에서 혼합균의 증식을 측정하였다. 2차 모델에 의한 혼합균의 증식을 예측하기 위하여 균의 증식을 대표하는 생육지표로써, 최대증식속도상수(k), 유도기(LT), 세대시간(GT)를 Gompertz 모델로부터 구하였다.

(나) 최대증식속도상수(k), 유도기(LT) 및 세대시간(GT)에 미치는 환경요인의 영향

최대증식속도상수(k)에 미치는 온도의 영향은 온도가 높아질수록 값이 증가하였으며, 초기 균수에 따른 유의적인 차이는 없었다($P>0.05$). 유도기(LT)와 세대시간(GT)의 경우도, 온도가 높을수록 짧았으며, 초기 균수에 따른 유의적인 차이는 없었다($P>0.05$).

(3) 2차 모델에 의한 최대증식속도상수(k)에 미치는 환경 조건의 영향을 정량화

(가) 온도의 변화에 따른 최대증식속도상수(k)의 정량평가모델

각 환경 조건인 초기 균수와 온도에 따른 최대증식속도상수(k)의 변화를 관찰하였다. 초기 균수에 따른 최대증식속도상수(k)의 유의적인 차이는 없었으며 ($P>0.05$), 따라서 초기균수 항이 없는 온도와 최대증식속도상수(k)간의 상호작용을 표현하는 2차 모델인 평방근 모델을 사용하여 최적 온도 이하의 범위에서 $\sqrt{k} = b(T - T_{min})$ 형태로 정량화 하였다. 한편, 초기 균수를 고려할 경우, $k = a + bT + cA_0$ 형태의 다항식으로 나타내었다. 평방근모델의 경우 실험치 k 와 예측치 k 의 상관계수는 0.88이었으며 다항식

모델의 경우 실험치 k 와 예측치 k 의 상관계수는 0.87으로 평방근모델이 다소 신뢰도가 높게 나타났다.

(나) 다항식을 이용한 최대증식속도상수(k)의 실험치와 예측치의 비교

부패세균의 실험을 통하여 구한 최대증식속도상수(k , 실험치)와 평방근 모델식과 다항식에 의해 예측된 최대증식속도상수(k , 예측치)를 비교한 결과, 실험치와 예측치가 잘 일치하는 것을 알 수 있었다.

(4) 2차 모델식과 Gompertz 모델에 의한 균의 성장

최대증식속도상수(k)에 미치는 온도와 pH의 영향을 모델화한 정량평가 모델식으로 서로 다른 초기 균수, 온도, 조건에서 균의 최대증식속도상수(k)를 예측할 수 있었다. 이를 바탕으로 균의 성장 곡선을 표현하는 Gompertz식에 적용함으로써, 각 조건에서 Gompertz식에 의한 균의 성장이 예측 가능하게 되었다. 초기 균수 1.0×10^3 , 온도 25°C, pH 7에서의 반복실험을 통한 성장곡선(실험치)과 평방근 모델과 다항식 모델에 의해 예측된 균의 성장 곡선(예측치)을 비교한 결과, 평방근 모델에 의한 예측치가 실험치와 잘 일치하는 것을 알 수 있었다.

다. 포장 연제품내에서 부패 세균의 성장예측 모델

(1) 환경 조건에 따른 균의 성장

계맛살 내 부패 세균의 증식을 예측하기 위하여, 점유 비율에 맞게 균을 혼합하여, 계맛살 1g 당 초기균수가 10^1 , 10^2 , 10^3 이 되도록 접종하여 서로 다른 온도에서 혼합균의 증식을 측정하였으며 2차 모델에 의한 혼합균의 증식을 예측하기 위하여 균의 증식을 대표하는 생육지표로써, 최대증식속도상수(k), 유도기(LT), 세대시간(GT)를 Gompertz 모델로부터 구하였다.

혼합균의 최대증식속도상수(k)는 온도가 높아질수록 빨랐으며, 초기 균수에 유의적인 차이는 없었다 ($P > 0.05$). 하지만 균을 접종하지 않은 실험구 15°C, 20°C, 25°C에서 각각, 0.06 ± 0.01 , 0.11 ± 0.04 , 0.24 ± 0.03 로 속도상수가 가장 느리게 나타났다.

유도기(LT)와 세대시간(GT) 역시 온도가 높아질수록 짧았으며, 초기균수에 따른 유의적인 차이는 없었다($P > 0.05$).

(2) 환경 조건이 최대증식속도상수(k)에 미치는 영향의 2차 모델에 의한 정량화

(가) 온도의 변화에 따른 최대증식속도상수(k)의 정량평가모델

초기 균수와 온도에 따른 최대증식속도상수(k)의 변화를 관찰한 결과, 초기 균수에 따른 최대증식속도상수(k)의 유의적인 차이는 없었으며 ($P>0.05$), 따라서 초기균수 항이 없는 온도와 최대증식속도상수(k)간의 상호작용을 표현하는 변화는 2차 모델인 평방근 모델을 사용하여 최적 온도 이하의 범위에서 $\sqrt{k} = b (T - T_{min})$ 형태로 정량화하였다. 한편, 초기 균수를 고려할 경우, $k = a + bT + cA_0$ 형태(type 1.)과 Sigmaplot 7.0(SPSS institute)의 Gauss-Newton 알고리즘을 사용한 비선형 회귀분석을 통하여 $k = a \cdot \exp(-0.5(((T-T_{max})/b)^2 + ((A_0-A_{0max})/c)^2))$ 형태(type 2)의 다항식으로 나타내었다.

(나) 다항식을 이용한 최대증식속도상수(k)의 실험치와 예측치의 비교

부패세균의 실험을 통하여 구한 최대증식속도상수(k , 실험치)와 평방근 모델식과 다항식에 의해 예측된 최대증식속도상수(k , 예측치)를 비교한 결과, 실험치와 예측치가 잘 일치하는 것을 알 수 있었다.

(다) 2차 모델식과 Gompertz 모델에 의한 균의 성장

최대증식속도상수(k)에 미치는 온도와 초기균수의 영향을 모델화한 정량평가 모델식으로 서로 다른, 온도, 조건에서 균의 최대증식속도상수(k)를 예측할 수 있었다. 이를 바탕으로 균의 성장 곡선을 표현하는 Gompertz식에 적용함으로써, 각 조건에서 Gompertz식에 의한 균의 성장이 예측 가능하게 되었다. 초기 균수 1.0×10^2 , 온도 20°C 에서의 반복실험을 통한 성장(실험치)과 평방근모델과 다항식모델에 의해 예측된 균의 성장 곡선(예측치)을 비교한 결과 두 모델 모두 실험치와 잘 일치하는 것을 알 수 있었다.

라. 저장 온도에 따른 포장 연제품의 유통기한 예측

(1) 저장 온도에 따른 포장 연제품내 미생물 증식

출고 3일 이내의 게맛살의 포장을 개봉하지 않은 채로 10°C , 15°C , 20°C , 25°C 에 저장하면서 일정 시간 간격으로 생균수의 변화를 측정하였다.

(2) 저장 온도에 따른 포장 연제품내 미생물 증식 속도 상수

각 저장 온도에서 균의 성장을 바탕으로 온도와 최대증식속도상수(k)의 상호작용을 표현하는 변화는 2차 모델인 평방근 모델을 사용하여 최적 온도 이하의 범위에서 $\sqrt{k} = b (T - T_{min})$ 형태로 정량화하였다.

(3) 포장 연제품의 저장 온도에 따른 유통기한

실제 포장 연제품의 저장 기간 동안 관능적인 이취감과 점질물의 형성을 바탕으로 제품의 shelf-life를 결정하였다. 5명의 패널을 대상으로 시간에 따라 냄새, 외관, 촉감 관능적인 평가를 실시하였고, 동시에 생균수의 측정을 병행하였다. 그 결과, 관능적인 이취의 발생은 5 log CFU/g, 점질물의 발생은 6 log CFU/g 부근에서 나타났다. 따라서 관능적 최소 한계(MOL, Minimum Off-odor Level)를 5 log CFU/g으로 설정할 경우, shelf-life의 관계식은 Gompertz 모델의 변형으로 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$\text{Shelf life (hr)} = M - \frac{\ln\left(-\ln\frac{(MOL - A_0)}{C}\right)}{\frac{k \cdot e}{C}}, \quad M = \frac{\ln(-\ln(A_0 - A_{low}))}{\frac{k \cdot e}{C}}$$

한편, 온도와 최대증식속도상수(k)는 평방근 모델식은 $\sqrt{k} = 0.0196(T - 4.58173)$ 으로 각 온도에서 최대증식속도상수(k)를 구할 수 있다. 각 온도에서 균의 성장예측과 MOL 시점을 평방근 모델과 Gompertz 모델을 통해 예측한 결과 실제 실험값과 유사한 것을 알 수 있었으며, 관능적 최소 한계 시점은 10℃, 15℃, 20℃, 25℃에서 각각, 19.41, 5.29, 2.42, 1.38일로 나타났으며, 수식에 의한 6℃에서는 269일로 초기 출고 후 10℃ 미만의 저장 온도를 유지 할 경우, 표시 유통기한인 30일 보다 오래 보존이 가능한 것으로 판단 되어 진다

2. 예측모델의 computing 기술 적용 및 웹(web) 기반 그래픽 인터페이스 개발

이 장에서는 예측정량평가모델의 각 실행화면을 이용하여 프로그램의 구현을 통한 연구 결과를 보여준다.

가. 로그인과 초기화면

사용자는 등록된 사용자 아이디와 비밀번호를 이용하여 등록된 사용자임을 확인 받은 후에 모델 프로그램을 사용 할 수 있게 되며, 각 사용자별로 별도의 데이터베이스를 구축하여 다른 사용자의 사용과는 관계없이 모델을 이용할 수 있다. 사용자의 등록을 위해서는 시스템의 보안을 위하여 오프라인을 이용하여 시스템 관리자가 등록을 한 후에 사용자에게 통보하면 사용이 가능하다. 또한 인터넷을 이용하여 프로그램을 실행하기 때문에 동시에 여러 사용자가 실행할 수 있는 다중사용자의 기반을 제공한다.

로그인 후에는 초기 화면으로 이동한다. 이 초기 화면은 예측정량평가모델의 기본적인

개요를 소개하며 이 화면에서 각 균류 모델을 선택할 수 있다. 또한 이 초기 화면은 각 모델의 사용 중에 언제나 돌아 올 수 있다.

초기화면의 우측하단에는 *L. monocytogenes*, *V. parahaemolyticus*, 두부 부패균, 게맛살 부패세균 중 하나의 균류 모델을 선택할 수 있는 화면이 있으며, 각 균류 모델에서 다른 균류 모델로 전환할 경우에는 초기 화면으로 돌아 올 필요 없이 각 모델에서 다른 모델로 전환할 수 있다.

나. *Listeria monocytogenes* 모델

그 다음 화면은 각각 *L. monocytogenes*에 대한 모델의 개요 및 실험방법에 대한 설명을 하는 화면이다. 모든 화면은 기본적으로 동일한 형태로 구성되며 사용 중에 다른 모델을 선택하면 쉽게 전환할 수 있다.

인자값을 클릭하면 *L. monocytogenes*의 수치 모델에서 사용되는 각 인자값을 설명하며, 인자값을 입력하면 결과를 예측할 수 있는 화면을 볼 수 있다. 온도와 pH를 입력하면 시간의 변화에 따른 Log 균수 CFU/g의 값을 보여준다. 또한 GT(세대기간), LT(유도기시간), 최대균수에 도달하는 시간을 값으로 보여준다. 온도와 pH 값은 입력 오류를 줄이기 위하여 주어진 구간내의 값을 선택할 수 있으며 이 값은 사용자별로 저장이 된다.

다. *Vibrio parahaemolyticus* 모델

V. parahaemolyticus 모델의 개요, 실험방법, 각 인자값 등을 설명하는 화면도 있으며, *V. parahaemolyticus*의 수치 모델을 이용할 수 있다. 여기서는 최초균수, 온도, pH 등을 입력하면 시간의 변화에 따른 Log 균수 CFU/g의 값에 대한 그래프를 볼 수 있다. 또한 *L. monocytogenes* 모델과 마찬가지로 GT(세대기간), LT(유도기시간), 최대균수에 도달하는 시간을 값으로 보여준다.

라. 게맛살 부패균 모델

게맛살 부패세균 모델의 개요, 실험방법, 인자값을 설명하는 화면도 나타내었다. 게맛살 부패세균의 수치 모델을 이용할 수 있으며, 초기균수와 온도를 입력하면 시간의 변화에 따른 Log CFU/g의 값에 대한 그래프를 볼 수 있으며, 또한 GT(세대기간), LT(유도기시간), 최대균수에 도달하는 시간을 값으로 볼 수 있다.

마. 종료화면

모델 실행의 종료를 할 수 있는 로그아웃 화면이 있으며, [확인] 버튼을 누르면 예측정량평가모델을 사용할 수 있는 화면으로 다시 이동한다.

V. 연구개발결과의 활용계획

1. 핵심기술 또는 연구결과

가. 포장연제품의 병원미생물에 대한 예측프로그램 개발 및 serve 운영

- 포장연제품 실제 가공 공정상의 환경인자 값의 변화를 추적하고, 예측 프로그램에 의해 특정 병원미생물의 생장을 PC를 통하여 연속적으로 모니터링
- 적용대상 식품의 확대 및 이에 따른 모델 개발과 예측프로그램의 개량을 도모

나. 포장연제품의 부패미생물에 대한 예측프로그램 개발 및 serve 운영

- 포장연제품의 유통상의 환경인자 값의 변화를 추적하고, 예측 프로그램에 의해 유통기한을 예측
- 미생물학적 미스 제품에 대한 Recall 예측 가능
- 적용대상 식품의 확대 및 이에 따른 모델 개발과 예측프로그램의 개량을 도모

다. 포장연제품의 신제품 개발 시 가공공정의 미생물학적 조건 설정 가능

- 신제품 개발 시 병원미생물의 살균조건을 컴퓨터 프로그램으로 예측 가능
- 신제품의 유통조건을 컴퓨터 프로그램으로 예측 가능

2. 산업재산권 (특허출원예정)

- *V. parahaemolyticus*의 성장예측 프로그램
- *L. monocytogenes*의 성장예측 프로그램

3. 논문게재

- 수학적 모델을 이용한 *Listeria monocytogenes*의 성장 예측
- 수학적 모델을 이용한 *Vibrio parahaemolyticus*의 성장 예측
- 수학적 모델을 이용한 포장연제품의 유통기한 예측 (SCI 논문 투고 준비 중)

4. 학회발표

- 한국식품과학회 5건 발표
- 한국수산학회 3건 발표

5. 활용방안

- 포장연제품을 대상으로, 실제 가공 공정상의 환경인자 값의 변화를 추적하고, 예측 프로그램에 의해 특정 병원미생물의 생장을 PC를 통하여 연속적으로 모니터링 한다.
- 적용대상 식품의 확대 및 이에 따른 모델 개발과 예측프로그램의 개량을 도모한다.
- 관련 기술의 특허 획득을 통한 고유 기술 확보
- 학내 벤처기업의 설립과 예측 프로그램의 제품화
- 전문 인력의 양성과 관련업체로의 고용확대
- 필요로 하는 업체에 대하여 생산 제품과 가공공정에 적합한 예측프로그램의 개발 및 제품화 → 현장이용자에 대한 교육 → 생산공정 가동 시에 실시간으로 모니터링→ 결과 보관 →오염사고 시에 대비
- 기술 및 Know how 축적을 통한 제품 및 기술 수출

6. 기대효과

최근에 들어, 전 세계적으로 병원미생물에 의한 식중독 사건이 확대됨에 따라 식품의 안전성에 관한 국제적 규제가 강화되고 있다. 우리나라의 경우 전체 식품 수출량 중에서 차지하는 수산물의 비중과 원재료의 특성상 다른 식품에 비해 병원 및 병원미생물에 의한 오염 확률이 높은 점등을 고려 할 때, 수산 가공식품의 미생물학적 안전성 확보는 제조회사의 존폐까지도 결정 할 수 있는 중요한 문제이다. 이에 본 연구의 성과가 수산가공식품 관련 산업과 경제에 미치는 기대 효과를 요약하면 다음과 같다.

- 기존의 미생물학 안전성 확인을 위해 반복되는 미생물 접종시험·보존시험에 소요되는 시간, 인력, 경비를 절감 할 수 있다.
- 제품의 안전성 문제로 인한 무역 마찰 시에 미생물학적 안전성에 대한 객관적 기준을 제시 할 수 있다. → 리콜에 의한 피해 감소
- 미생물의 정량적 평가 자료를 제시함으로써 정밀한 CCP를 설정할 수 있어 HACCP 시스템의 도입시 경비 절감이 가능하다.
- 제조과정 중에 문제가 발생하였을 경우, 재활용 가능성 혹은 전량 폐기 여부를 결정하는데 결정적인 역할을 담당한다.
- 생산 및 수출의 안정성 확보와 이로 인한 관련 종사자의 고용 안정은 물론이며 수산 가공식품 산업 전반의 안정적 발전과 활성화에 기여할 것이다.

가. 정량적

- 총 매출액 2,500억, 총 수출액 1,300억 (2001년) 의 어육연제품의 미생물학적 안전성 확보

나. 정성적

- 포장연제품의 미생물학적 안전성 확보 → 국민건강 증진
- 전문 인력의 양성과 관련업체로의 고용확대
- 필요로 하는 업체에 대하여 생산 제품과 가공공정에 적합한 예측프로그램의 개발 및 제품화
- 생산공정 가동 시에 실시간으로 모니터링 → 결과 보관 → 오염사고 시에 대비

Summary

Predictive microbiology has been used to model the population dynamics of a number of pathogenic and spoilage bacteria of foods. This is possible due to the reproducible nature of microorganisms response to the environment (McMeekin et al., 1993). Therefore by gathering a detail knowledge of the growth rate response to the dominant environmental parameters of temperature, water activity (A_w) and pH, it is possible to predict the extent of microbial proliferation under conditions within the range of experimental values tested. The results are incorporated into a mathematical model, which may enable the evaluation of food safety and remaining shelf life of a food (Dalgaard et al., 1997; McMeekin et al., 2002; Jagannath and Tsuchido, 2003).

Predictive models in food microbiology are classified as primary, secondary and tertiary: the most widely used primary model for describing microbial growth is the Gompertz equation (Whiting and Buchanan, 1994). From this primary model, secondary models of either the polynomial or the square root type have been developed to predict microbial growth rate, generation time or lag time as a function of several control factors affecting microbial growth in foods, i.e. temperature, water activity (A_w), pH, sodium salts, etc. (Delignette-Muller et al., 1995).

This study deals with the development of predictive models and computer softwares that are able to predict the growth of *V. parahaemolyticus* and *Listeria monocytogenes* in response to temperature, pH and initial cell number using mathematical models. These informations allow the prediction of *V. parahaemolyticus* and *Listeria monocytogenes* growth under conditions different from those tested experimentally but within the studied range of temperature and pH.

Chapter 1. Development of Predictive model and Construction of Database for Pathogenic Bacteria

Modeling was carried out in two stages. The first stage involved modeling the bacterial growth curves using a modified Gompertz function whose expression is:

$$\text{Log } N = A + C \exp [-\exp\{-B(T-M)\}] \quad (1)$$

where $\log N$ is the decimal logarithm of bacterial counts (CFU/ml) as time t , A is the asymptotic log count as time decreases indefinitely (approximately equivalent to the log of the initial bacterial counts), C is the log count increment as time increases indefinitely, that is the number of growth cycles, B is the relative maximum growth rate at time M (hours^{-1}), M is the time required to reach the maximum growth rate (hr). Using these parameters, the specific growth rate [$k=B \square C/e$, with $e=2.7182$], generation time [$G=(\log 2)e/BC$] and lag phase duration [$L=M-(1/B)$] were derived.

In the second stage, growth rate was modeled as a function of temperature and pH. The generation times were converted to their reciprocal, the growth rate k , and polynomial model of k was calculated for model fitting to homogenize the variance in growth rate estimates. Polynomial models were generated for the three initial bacterial counts. As the results of 27 experiments were available, $\ln k$ was calculated using the following equation

$$K (\ln k) + C_1 + C_2 T + C_3 pH + C_4 T^2 + C_5 pH^2 + C_6 T pH + \dots \quad (2)$$

where $C_1, C_2, C_3 \dots$ were parameters, T is the temperature. The Square root model of k was also used calculated for model fitting to homogenize the variance in growth rate estimates. As the results of 27 experiments were available, \sqrt{k} was calculated using the following equation

$$\sqrt{k} = b (T - T_{min}) [1 - \exp(-c(T - T_{max}))] \dots \quad (3)$$

where b is parameter, T_{min} is temperature when k is to be minimum and T_{max} is temperature when k is to be maximum. The parameters that are most fitted to k from Gompertz function were made using the SPSS (version 10.0) statistical software.

In order to evaluate the goodness of fit of the observed data and predictive model, response surface model and multiple linear regressions were performed and calculated, respectively.

1. Development of predictive model of *V. parahaemolyticus*

The maximum growth rate (k) of *V. parahaemolyticus* became fast according as rising of

temperature and was fastest at 37°C. It became, however, a little slow at 40°C. The lag time (*LT*) and generation time (*GT*) became also short according as rising of temperature and was shortest at 37°C. They became, however, a little long at 40°C. There were not significant differences in *k*, *LT* and *GT* by pH and initial cell number.

We could get polynomial model, $f = a \cdot \exp(-0.5 \cdot (((T-T_{max})/b)^2 + ((pH-pH_{max})/c)^2))$, to express the combination effects of temperature and pH under each initial cell number use Gauss-Newton Algorithm of Sigma plot 7.0 (SPSS Inc.). The relative coefficients of experimental *k* and predictive *k* were 0.966, 0.979 and 0.965 under initial cell number of 1×10^2 , 1×10^3 and 1×10^4 colony form unit (CFU)/ml, respectively. We found that experimental *k* and predictive *k* were almost same from response surface model and experimental growth data and predictive growth curve were also almost same from fitting of polynomial model to Gompertz equation.

2. Development of predictive model of *L. monocytogenes*

The maximum growth rate (*k*) of *L. monocytogenes* became fast according as rising of temperature and was fastest at 37°C. It became, however, a little slow at 40°C. The lag time (*LT*) and generation time (*GT*) became also short according as rising of temperature and was shortest at 37°C. They became, however, a little long at 40°C. There were not significant differences in *k*, *LT* and *GT* by pH and initial cell number.

We selected the square root model, $\sqrt{k} = b (T - T_{min}) [1 - \exp(c(T - T_{max}))]$, to predict the growth rate *k* because there was not significant differences in growth rate *k* by initial cell number and compared the square root model to polynomial model, $f = a \cdot \exp(-0.5 \cdot (((T-T_{max})/b)^2 + ((pH-pH_{max})/c)^2))$, to express the effects of temperature under each initial cell number use Gauss-Newton Algorithm of Sigma plot 7.0 (SPSS Inc.). The relative coefficients of experimental *k* and *k* from the square root model, and *k* from the polynomial model were 0.95 and 0.92, respectively. We, therefore, found that the square root model is more fit to experimental *k* than the polynomial model. The experimental growth data and predictive growth curve were also almost same from fitting of square root model to Gompertz equation.

3. Development of predictive model of putrefactive bacteria isolated from imitation crab sticks

We isolated putrefactive bacteria, *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* from imitation crab sticks to predict the shelf-life of it. The portions of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* are 60% and 34%, respectively. The k , LT and GT of mixture of two bacteria inoculated in Imitation crab sticks were measured from Gompertz model to predict the growth of putrefactive bacteria in imitation crab sticks.

The maximum growth rate (k) of putrefactive bacteria became fast according as rising of temperature and the lag time (LT) and generation time (GT) became also short according as rising of temperature. There were not significant differences in k , LT and GT by initial cell number. We selected the square root model, $\sqrt{k} = b (T - T_{min})$, to predict the growth rate k because there was not significant differences in growth rate k by initial cell number and compared the square root model to polynomial model, $k = a + bT + cA_0$, to express the effects of temperature under each initial cell number use Gauss-Newton Algorithm of Sigma plot 7.0 (SPSS Inc.). The relative coefficients of experimental k and k from the square root model, and k from the polynomial model were 0.88 and 0.87, respectively. We, therefore, found that the square root model is more fit to experimental k than the polynomial model. The experimental growth data and predictive growth curve were also almost same from fitting of square root model to Gompertz equation.

4. Prediction of shelf-life of imitation crab sticks by storage temperature

The shelf-life of imitation crab sticks was decided basis of viable cell number of putrefactive bacteria, off-odor and slime materials. The off-odor was occurred at 5 log CFU/g and the slime materials were appeared at 6 log CFU/g. Therefore we found that minimum off-odor level (MOL) is 5 log CFU/g. From these results, predictive model for shelf-life was calculated as follow model that is modified from Gompertz model.

$$\text{Shelf life (hr)} = M - \frac{\ln\left(-\ln\left(\frac{MOL - A_0}{C}\right)\right)}{\frac{k \cdot e}{C}}, \quad M = \frac{\ln\left(-\ln(A_0 - A_{low})\right)}{\frac{k \cdot e}{C}}$$

The k was calculated from square root model, $\sqrt{k} = 0.0196(T-4.58713)$, at each storage temperature. We found that experimental shelf-life, and predictive shelf-life from square root model and Gompertz model are almost same. We could also predict that the shelf-lives of imitation crab sticks are 19.41, 5.29, 2.42 and 1.38 days at 10°C, 15°C, 20°C and 25°C respectively.

Chapter 2. Computer Application of Predictive model and Development of Web Graphic User Interface

1. The objectives and significance of the study

We implemented a computer software for simulating of microorganic multiplication. With simulation using this software, users can predict the number of microorganism without lab experiments.

2. The contents and scope of the study

First, we build numerical models based on lab experiments and implemented a computer program based on the numerical models. For verification, we repeated comparing the program results and real results of multiplications from the lab experiments and modifying the program. We also tested the program through end users of the software for correctness, convenience and performance.

The program runs on the host machine and users can use this program on web browsers via internet that the program is portable and easy maintenance.

CONTENTS

Chapter I. Introduction	28
Section 1. Purpose	28
Section 2. Necessity of this study	30
1. Technological aspects	30
2. Economical • Industrial aspects	31
3. Social • Cultural aspects	32
Section 3. Bounds of this study	33
1. Development of Predictive model and Construction of Database for Pathogenic Bacteria	33
2. Computer Application of Predictive model and Development of Web Graphic User Interface	34
Section 4. References	35
Chapter II. Information of domestic and foreign technology related this study	38
1. Foreign technology	38
2. Domestic technology	38
3. Prospects	39
Chapter III. Research contents and Results	40
Section 1. Development of Predictive model and Construction of Database for Pathogenic Bacteria	40
1. Development of predictive model of <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	40
a. Introduction	40
b. Materials and Methods	41
c. Results and Discussion	43
d. Conclusions	55
e. References	56
2. Development of predictive model of <i>Listeria monocytogenes</i>	59
a. Introduction	59
b. Materials and methods	60
c. Results and discussion	62
d. Conclusions	69
e. References	71
3. Development of predictive model of putrefactive bacteria related to packaged surumi in	

media	75
a. Introduction	75
b. Materials and methods	76
c. Results and discussion	79
d. Conclusions	92
e. References	94
4. Development of predictive model of putrefactive bacteria in packaged surumi	96
a. Introduction	96
b. Materials and methods	96
c. Results and discussion	99
d. Conclusions	109
e. References	109
5. Development of predictive model for shelf-life of packaged surumi	112
a. Introduction	112
b. Materials and methods	112
c. Results and Discussion	115
d. Conclusions	120
e. References	120
Section 2. Computer Application of Predictive model and Development of Web Graphic User Interface	122
1. Materials and Methods	122
a. Operation system of predictive program	122
b. Development of predictive program	122
s. Guarantee for accuracy of predictive program	124
d. Constitution of program	124
2. Results and Discussion	126
a. Log in and beginning screen	126
b. Predictive program of <i>L. monocytogenes</i>	126
c. Predictive program of <i>V. parahaemolyticus</i>	126
d. Predictive program of putrefactive bacteria	134
e. Ending screen	134
Chapter IV. Purpose achivement and contribution to the related fields	140
Section 1. Purpose achivement	140

Section 2. Contribution to the related fields	141
Chapter V. Application plans of the study results	143
Chapter VI. Informations of world science and technology	146

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	28
제 1 절 연구개발의 목적	28
제 2 절 연구개발의 필요성	30
1. 기술적 측면	30
2. 경제·산업적 측면	31
3. 사회·문화적 측면	32
제 3 절 연구개발의 범위	33
1. 병원미생물의 예측 정량평가모델의 개발 및 database 구축	33
2. 예측모델의 computing 기술 적용 및 웹(web) 기반 그래픽 인터페이스 개발	34
제 4 절 참고문헌	35
제 2 장 국내외 기술개발 현황	38
1. 국외의 관련연구현황	38
2. 국내의 연구현황	38
3. 앞으로 전망	39
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	40
제 1 절 병원미생물의 예측 정량평가모델의 개발 및 database 구축	40
1. <i>Vibrio parahaemolyticus</i> 의 성장예측모델 개발	40
가. 서 론	40
나. 재료 및 방법	41
다. 결과 및 고찰	43
라. 결 론	54
마. 참고 문헌	56
2. <i>Listeria monocytogenes</i> 의 성장 예측 모델	59
가. 서 론	59
나. 재료 및 방법	60
다. 결과 및 고찰	62
라. 결 론	69
마. 참고 문헌	71
3. 포장 연제품 관련 부패 세균의 성장 예측 모델	75
가. 서 론	75

나. 재료 및 방법	76
다. 결과 및 고찰	79
라. 결 론	92
마. 참고 문헌	94
4. 포장 연제품 내 부패 세균의 예측 정량 평가 모델	96
가. 서 론	96
나. 재료 및 방법	96
다. 결과 및 고찰	99
라. 결 론	109
마. 참고 문헌	109
5. 저장 온도에 따른 포장 연제품의 유통기한 설정 모델	112
가. 서 론	112
나. 재료 및 방법	112
다. 결과 및 고찰	115
라. 결 론	120
마. 참고 문헌	120
제 2 절 예측모델의 computing 기술 적용 및 웹(web) 기반 그래픽 인터페이스 개발	122
1. 연구수행방법	122
가. 예측정량평가 모델 프로그램의 운영 형태	122
나. 예측 모델 프로그램 개발	122
다. 예측 모델 프로그램 정확성 확보	124
라. 프로그램의 구성	124
2. 연구결과 및 고찰	126
가. 로그인과 초기화면	126
나. <i>L. monocytogenes</i> 모델	126
다. <i>V. parahaemolyticus</i> 모델	126
라. 개맛살 부패균 모델	134
마. 종료화면	134
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	140
제 1 절 연구개발 목표의 달성도	140
제 2 절 관련분야에의 기여도	141
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	143
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	146

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

식품 중의 병원 및 부패미생물에 의한 건강피해는 과학적 기술이 진보한 현대에 있어서도 여전히 세계적으로 중요한 문제이다. 그 배경으로서 계란을 매개로 한 *Salmonella Enteritidis*, 최근 일본을 강타한 장관출혈성대장균 O157:H7에 의한 식중독 사건의 세계적인 발생 및 특히 구미에서 문제가 되고 있는 식품을 원인으로 한 *Listeria monocytogenes*에 의한 집단감염 사례 등이 있다^{7,8)}.

이와 같은 상황에서 식품의 미생물학적 안전성을 확보하기 위해서 최근 또 하나의 새로운 흐름으로서 식품 중에서의 미생물의 증식, 생산 및 사멸을 수학 모델을 이용하여 정량적으로 해석, 예측하는 연구가 특히 구미에서 많이 이루어지고 있다^{9,10,11,12)}. 이 새로운 연구 분야는 예측식품미생물학(Predictive Food Microbiology)이라고 불리며, 각종 조건 하에서 식품 중의 미생물의 거동을 예측할 수 있는 해석수단으로서의 가치가 인정되고 있다. 이 같은 예측식품미생물학의 발달과 함께 병원 및 병원미생물에 오염된 식품을 섭취하는 것에 의한 감염의 Risk(위험도)를 정량적으로 평가하고자 하는 움직임이 구미 각 국에서 시작되어, FAO(Food and Agricultural Organization)/WHO (World Health Organization) 합동의 CODEX 위원회(CODEX Alimentarius Commission)에서는 그 guide line의 작성이 진행 중에 있다¹³⁾.

예측미생물학은 품질보존의 측면에서 생선식품의 미생물에 의한 변패 예측과, 안전성의 측면에서 식중독균의 발육에 미치는 환경요인의 영향에 관한 2가지의 분야에 대하여 1960년 이후의 연구에 의하여 축적된 지식을 기초로 발전하여 왔다¹⁴⁾. 전자는 어패류, 식육 및 우유의 냉장온도와 보존기한의 관계 해명으로부터 출발하였고, Australia, Canada, 미국 중서부의 대학 등에서 주로 연구가 진행, Ratkowsky 등이 먼저 균의 발육속도와 온도와의 관계의 모델식을 발표하였다¹⁵⁾. 후자는 소시지나 어육 중의 식중독균의 거동 혹은 독소생산에 미치는 온도, pH, 수분활성 등의 영향에 대해서 거의 같은 시기부터 주로 영국의 식품관계 연구기관이나, 미국의 대학에서 연구가 진행되고 있다. Software가 실용화된 것은 병원균을 주 대상으로 한 영국의 Food Micromodel⁴⁾과 미국의 Pathogen Modeling Program³⁾이다. Food Micromodel과 Pathogen Modeling Program에서는 1차 모델식에 Gompertz가 1825년에 인구동태의 조사결과를 경험식으로서 제시한 Gompertz관수를 적용시키고 있지만¹⁶⁾, 그 후 Baranyi 등의 개변식¹⁷⁾을 영국에서는 이용하고 있다. 그러나, 이 식을 그대로 적용하는 경우에는 최적발육온도보다도 높은 온도역에의 외삽, 혹은 발육하한에 가까운 온도역에서는 실험치와의 적합성이 나빠지기

때문에, Ratkowsky 등은 카고시마 대학의 太田과 平原의 논문¹⁸⁾에 힌트를 얻어 평방근 모델을 제창하고, 또 영국 유니레바 연구소의 group은 Arrhenius식으로부터 얻은 Schoolfield의 식¹⁶⁾을 채용하고 있다. 그러나 수산가공식품에서 문제가 되는 병원미생물을 대상으로 한 수치 예측 모델식에 관한 연구는 찾아보기 힘들다.

식품유래의 병원미생물에 의한 위해성을 정량화 하려는 시도가 최근 국제적으로 식품 안전 상 관심도가 높은 *S. Enteritidis*, *L. monocytogenes*, 장관출혈성 대장균 O157:H7의 3균종을 대상으로 보고되어 있다. *S. Enteritidis*에 대하여 Whiting과 Buchanan은⁹⁾ 껍질을 제거한 저온살균 계란으로 마요네즈 가공시에 감염균의 위해성을 “The Unit Operation Approach method”에 의해 정량화 하였다. Miller 등¹⁹⁾은 *L. monocytogenes*의 식품미생물학적 안전기준치를 미생물학적 위해성 평가모델을 작성하여 해석하였다. 또한, Marks 등²⁰⁾은 마쇄 쇠고기의 생산에서 소비에 이르기까지의 장관출혈성 대장균 O157:H7의 전체적인 위해성에 대하여 정량적인 위해성 모델을 개발하였다. 더욱이 Brown 등²¹⁾은 계육제품에 의한 *Salmonella* 감염증에 대하여 컴퓨터 그래픽으로 표현할 수 있는 정량적 평가모델을 개발하였다. 이는 미생물학적 위해성을 평가하는 종합적인 전문 프로그램으로서는 최초라 할 수 있다.

국내의 경우 수산식품에 있어서 특정균을 배지에 접종하고 온도, pH, 수분활성 등, 일정한 조건하에서 경시적으로 생균수를 측정하고, 그것을 수학적으로 취급하기 쉬운 형태(일반적으로 대수)로 변환한 값을 시간에 대하여 plot한 1차 모델(예, 미생물의 열사멸곡선, 발육곡선)과 온도 등 발육에 영향을 미치는 요인의 값을 변화시킨 경우, 1차 모델식의 parameter의 변화를 모델화한 2차 모델(반응속도정수와 온도와의 관계를 나타내는 Arrhenius식, 열사멸곡선으로부터 얻어지는 D-value(또는 F-value)와 가열온도와의 관계 등)은 있지만, 관련 병원미생물을 대상으로 각 요인의 어느 범위 내에서의 각각의 값에 대응하는 균의 반응의 정량적 정보가 얻어질 수 있도록 2차 모델을 조합하여 소프트화 하고, 이용자가 그 수치와 그것을 도형화해서 PC로서 쉽게 이용할 수 있도록 한 3차 모델(웹기반 인터넷 프로그램)의 개발에 관한 연구는 전무한 실정이다. 또한 본 연구과제에서 제시한 포장연제품 관련 병원미생물의 예측 정량평가모델 및 PC용 software 개발에 관한 연구는 아직 없기 때문에 관련 기술의 발전을 선도하기 위하여서는 이 분야의 연구가 시급하다고 생각한다.

따라서 본 연구는 첫째, 포장연제품 관련 병원미생물의 주요 환경인자별 기본 정량평가모델 확립하고, 둘째, 복합 환경인자별 병원미생물의 예측 정량평가모델의 개발 및 database 구축하여 셋째, 병원미생물에 대한 예측 정량평가모델을 컴퓨터 프로그램화하여 넷째, 일반사용자를 위한 PC용 예측 software의 개발 및 웹기반 그래픽 인터페이스 개발하고, 다섯째, 포장연제품 생산현장에서의 예측프로그램 적용하기 위하여 수행되었다.

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

20세기 후반의 경제 및 과학기술의 눈부신 발전에도 불구하고 식품 중의 대표적인 병원 미생물에 의한 건강피해는 아직까지도 세계적으로 심각한 문제가 되고 있다. 이에 식품의 품질과 안전성에 관한 새로운 대책 기술의 필요성이 요구되었으며, 그러한 기술의 하나로 “Predictive food microbiology(예측미생물학)”의 중요성이 대두되게 되었다. 최근 들어, 미국과 유럽을 중심으로 대단히 활발한 연구가 이루어지고 있는 예측미생물학은 지금까지의 상당한 시간과 인력 그리고 경비가 소요되는 미생물 접종시험·보존시험을 대체하여 식품의 원재료로부터 소비에 이르기까지의 전 과정 중에 병원미생물의 성장에 대하여 수학적 모델을 이용한 예측과 제어가 가능하기 때문에, 대상 식품중의 병원 미생물의 정량적 위험도평가(Quantitative risk assessment)를 위한 저 비용의 유효수단으로 인정되고 있다¹⁾. 또한, 식품의 안전성을 확보하기 위하여서는 지금까지의 일반적 위생관리 기준만으로는 부족하기 때문에 이를 보완하기 위한 국제적 기준으로서 HACCP 시스템이 도입되어 가장 유효한 종합적 위생관리 수단으로 인식되기에 이르렀다. 그러나 HACCP가 식품의 원재료에서 소비에 이르기까지의 전 과정에 내재된 모든 위해 요소의 파악을 필요로 하는 데에 비해, 예측 미생물학은 식품의 안전성 문제에 있어 가장 중요하고도 큰 비중을 차지하는 위해 미생물만을 그 대상으로 하여, 이들의 성장을 수학적 모델에 의해 정량적으로 예측하고 평가하기 때문에 비교적 단순하면서도 효율이 높은 점에서 차별화되고 있다. 그리고, 이러한 수학적 모델의 적용은

첫째, 정성적 분석결과 및 경험치의 의존도가 높은 HACCP 시스템의 단점 보완과 발전에도 크게 기여하고 있다¹⁾. 즉, 식품의 미생물에 의한 위해 평가(HA)가 가능하며, 중요관리점(CCP)을 수학적 모델을 이용하여 정량적으로 분석할 경우, 식품의 각 가공공정 조건을 정밀도가 높은 CCP의 허용한도 이내에서 결정하고, 제어할 수 있다.

둘째, 수학적 모델을 이용한 미생물 성장 변화의 정량적 평가가 크게 주목을 받게 된 데에는 컴퓨터의 발달과 보급이 크게 기여하였다. Parameter(계수)의 숫자가 많은 수학적 모델에 있어서, 그 값들을 실험 결과로부터 계산에 의해 구하기까지는 많은 노력과 시간을 필요로 하지만 최근 Personal Computer(PC)의 보급과 해석 프로그램의 개발에 의해 이들의 계산 처리가 신속히 이루어지게 되었으며, 편리한 관련 software의 개발을 통하여 미생물에 관한 지식이 없는 일반 사용자들에게 있어서도, 각종 환경요인을 입력함으로써 식품 중의 각종 미생물의 성장 변화를 예측 할 수 있게 되었다.

예측 미생물학에 관한 연구는 병원균 및 변태균·부패균을 대상으로 1980년대 후반부터 급속도로 발전하였으며, 지역별로는 미국을 시작으로 영국, 네덜란드 등과 같은 유럽의 각 선진국과 호주 등지에서 정보화 시대에 대응하는 국제적인 흐름의 하나로 활발한 연구가 이루

어지고 있다²⁾. 이러한 연구의 성과로 미국 농무성(USDA)의 병원균 모델 프로그램인 Pathogen Modeling Program(PMP)³⁾과 영국 농어식량성 (MAFF)의 Food Micromodel⁴⁾이 실용화 되어있다. 아시아 국가 중에서는 일본이 유일하게 이 분야에 관한 연구를 최근에 들어 진행시키고는 있으나, 아직까지 실용화 프로그램은 개발되어 있지 않다.

한편, 미국과 유럽 그리고 일본과 같은 선진국가들을 중심으로 식품의 안전성 확보와 자국 국민의 건강관리 그리고 관련 산업분야의 국제경쟁력 향상을 위한 수단으로 예측미생물학 분야에 대한 연구 및 투자를 강화하고 있는 국제정세에 비하여, 국내의 경우에는 그 필요성이 절실히 강조됨에도 불구하고 현재까지 예측미생물에 관한 연구보고는 전무한 실정이다. 미생물 오염에 의한 식중독 사고 중, 수산물 관련 식품이 차지하는 비중과 또한 우리 국민의 기호와 수출에 차지하는 비중 등을 고려할 때, 수산 가공식품을 대상으로 현장 적용성을 고려한 미생물 정량평가모델의 개발과 식품산업 관련자가 이용하기 편리한 PC용 예측소프트웨어의 개발에 관한 연구의 필요성이 절실히 요구되고 있다.

2. 경제·산업적 측면

현재, 전 세계의 식품산업은 그 생산 규모 면에 있어서 대형화되어 가는 추세에 있으며, 저장·유통 수단의 발달로 말미암아 생산지에서 소비지까지의 범위가 크게 확대되었다. 또한, 식량자원 및 가공식품 등이 경제원리에 의해 전 세계에 유통되고 있는 상황에서, 병원미생물에 의한 식품 오염의 기회 및 오염 미생물 증식 가능성이 크게 증대되고 있으며, 그 피해가 단 시간 내에 전 세계로 확대될 가능성이 있다. 그러므로, 식품의 미생물학적 안전성에 관한 문제는 국가간의 국제적 분쟁 가능성과 무역 마찰 등으로도 이어질 수 있는 것이다. 따라서, 식품의 안전성에 관한 문제는 국제적 규모에서 취급하게 되었으며, GATT의 UR 협정 중, 주요 조항의 하나인 SPS(Sanitary and Phytosanitary)에서는 “식품의 안전 확보의 수단으로 수입 제한을 할 경우, 그 방법을 과학적 근거에 입각하여야만 한다”라고 밝히고 있다⁵⁾.

미국의 경우, 지금까지 매년 병원성 세균에 의한 식중독 사고로 인한 인명피해와 막대한 경제적 손실을 초래하고 있으며, 이에 대해 미국 정부는 ‘위험한 식품의 유통은 상당한 경제적 희생을 지불하여서라도 저지하겠다’라는 입장을 취하고 있다. 그 결과, 1997년 1월 25일에 미국의 클린턴 대통령은 식품의 안전성 확보를 위해 「Food Safety Initiative」를 발표하고, 4,300만 달러(약 516억원)의 예산을 요구함과 동시에, 정부의 각 관련 기관에 대하여 식품의 안전성 확보를 위한 대책을 요구하였다. 그 결과 제출된 대책보고서 중, 주목할 항목으로 “Risk Assessment의 개발”을 들 수 있다⁶⁾.

한편 국내의 고차가공 어육연제품은 맛살류를 위주로 1998년 현재 43,369톤을 수출하여, 106,688,000달러의 외화를 획득한 주요 수출품목이나, 수산 가공식품은 원재료의 특성상 병원성 세균의 오염에 의한 식중독 발생 가능성이 높기 때문에 오염 미생물의 생장 변화를 신속

하고 객관적으로 평가하고, 예측할 수 있는 「수학적 모델」의 적용은,

첫째, HACCP에서 요구하는 각종 위해 요소 파악에 소요되는 경비를 절감 할 수 있을 것이다. 이러한 「수학적 모델에 의한 정량적 평가 및 예측」의 적용은 장래의 HACCP 시스템 도입시에 상당한 시간과 인력 및 비용이 소요되는 미생물 접종실험·보존실험 등의 정성분석을 대체 하여 비용 절감뿐만 아니라 보다 과학적이고 객관적인 자료를 제공 할 수 있다. 둘째, 「수학적 예측 모델」에 의하면 식품의 제조과정 중에 문제가 발생하였을 경우, 그 제품 중의 미생물의 성장변화를 정량적으로 예측 할 수 있기 때문에, 그 제품의 재활용이 가능한지, 빨리 이용해야만 되는지, 혹은 폐기 할 것인가를 객관적으로 판단이 가능하며, 따라서 셋째, 포장연제품의 생산 및 수출의 안정성 확보와 이로 인한 관련 종사자의 고용 안정화에 기여하며, 넷째, 수산 가공식품 산업 전반의 안정적 발전과 활성화에 기여할 수 있을 것이다.

3. 사회·문화적 측면

최근, 병원 미생물에 의한 식중독 사건이 전 세계적으로 빈번하게 발생하여 유행처럼 번지고 있으며, 국내의 경우에도, 매년 비브리오 패혈증을 중심으로 한 식중독 사건이 끊이지 않아 다수의 인명 피해가 발생하고 있다. 한편, 최근 들어 전 세계적으로 발생하고 있는 식중독 사건의 특징은 품질관리 시설을 갖춘 식품회사에서 생산된 가공제품을 통한 발병이란 점과 사회적으로 위생에 관한 의식 및 관리 수준이 비교적 강화되어 있는 미국과 선진 유럽국가에서 많이 발생하고 있으며, 그 규모 면에 있어서도 점점 대형화 되어가고 있는 추세라는 점이다. 이러한 특징은 사회의 발전과 식생활 문화의 변화에 따른 결과로 여겨지고 있다. 즉, 인구의 도시집중과 life style의 변화에 의해 가공식품과 외식의 의존도 및 편리 지향주의적 경향에 의한 패스트푸드의 수요가 증가하였으며, 한편으로는 건강식품 및 자연식품에 대한 선호도가 현저하여 저염도·저당도 식품의 수요가 증가하였다. 이에 식품 산업에서는 이러한 요구에 대응하여 냉장보관이 가능한 조리 식품을 대량으로 생산하였고, 식품 본래의 특성을 가능한 변화시키지 않고 첨가물의 사용을 제한한 처리가공법과 제품개발에 노력을 기울이게 되었다. 그러나 이러한 소비자의 요구에 대응한 제품은 *Listeria monocytogenes*와 같은 저온성 병원 미생물의 감염에 노출되게 되었고, 온도처리, 수분활성, pH, 식품첨가물 등의 조건을 유해 미생물에 있어서 유리한 방향으로 변화시킨 결과가 되고 말았다. 대량생산된 제품이 냉동차·냉장차에 의해 장거리로 운반되고, 그 사이에 부적절한 취급의 기회가 발생하는 등, 유통기구의 대규모화 또한 그 위험성을 증대시켰다. 더욱이, 일단 사고가 일어나면 환자의 발생이 광범위한 지역에서 대량으로 발생한다는 것이다. 그밖에 경제발전과 소득증대 그리고 현대 의학의 발전으로 인하여 병원 미생물에 대한 면역력이 떨어지는 고령화 인구가 증가하였으며, 에이즈 환자수의 증가와 같은 요인에 의해서도 사고의 가능성이 높아지고 있다. 이와 같은 사회·문화적 변화 속에서 날로 대형화 되어가고 있는 병원 미생물에 의한 식품의 오염사

고는 해당 국가의 국민건강 관리에 대한 커다란 문제점이 되고 있을 뿐만 아니라, 식품에 대한 불신으로까지 이어져 식품산업 및 사회 전체의 문제로 대두되고 있다. 따라서 수산식품에 대한 기호성이 높은 우리나라의 경우, 수산식품에 대해 신뢰할 수 있는 사회적으로 안정된 분위기를 조성하고, 국민의 건강한 문화생활 영위에 대한 기여도 등을 고려할 때, 식품관련 병원미생물의 변화를 신속히 그리고 정량적으로 평가하고 나아가서는 그 변화를 예측할 수 있는 소프트웨어 개발연구의 필요성은 매우 높다고 할 것이다.

제 3 절 연구개발의 범위

1. 병원미생물의 예측 정량평가모델의 개발 및 database 구축

가. 병원미생물의 제조현장 관련 각종 환경 인자에 대한 성장변화 조사

포장연제품의 주요 대상 병원 미생물인 *Vibrio parahaemolyticus*와 *Listeria monocytogenes*를 선정하고, 포장 연제품(계맛살)의 조성파 유사한 모의배지 개발하여 제조현장에 관련된 대표적 환경인자로서 온도와 pH를 선정하여 서로 다른 환경조건(배양온도 및 pH 변화)하에서 균의 성장을 조사하였다.

나. 주요 환경 인자별 기본 정량평가모델의 개발

기본성장 예측모델로서의 Gompertz 모델식의 적용 가능성을 검토하였으며 균의 성장에 미치는 온도와 pH의 영향을 정량적으로 평가하였다.

다. 포장연제품을 이용한 복합 환경인자 별 병원미생물의 예측정량평가모델의 개선 및 확립

15회 이상의 반복실험을 통하여 온도, pH 등 복합 환경 인자별 병원미생물의 정량평가 모델을 개선하였으며, 평방근 모델(Square root model)과 다항식 모델(Polynomial model)을 이용하여 제조현장의 환경인자인 온도, pH, 등에 대한 병원미생물의 성장예측모델을 완성하였으며 복합 환경조건(초기균수, 배양온도 및 pH 변화)하에서 균의 성장을 조사하였다.

라. 포장연제품에 대한 예측정량평가모델의 각 parameter에 미치는 영향의 수치화 및 database 구축

예측정량평가모델의 각 parameter에 미치는 환경인자의 영향을 2차식을 이용하여 수치

화하고, 반복실험을 통하여 수치화한 환경인자의 영향을 database한 후 database를 이용하여 환경인자의 변화에 따른 병원미생물의 성장을 예측하였다.

마. 실제 포장연제품에서의 접종실험을 통한 표준소프트웨어의 적용성 향상

포장연제품에서 부패미생물을 분리하여 예측정량평가모델을 확립한 후, 부패미생물을 포장연제품에 직접 접종하여 예측정량평가모델을 완성하였고 반복실험을 통하여 복합 환경조건(배양온도 및 pH 변화) 하에서 포장연제품에 있어서 부패미생물의 성장을 예측하는 정량평가모델을 개선하고 완성하였다.

바. 시뮬레이션을 통한 신뢰도 확인

실제 포장연제품을 대상으로 확립된 예측정량평가모델을 컴퓨터 프로그래밍하고 프로그래밍된 컴퓨터모델에서 얻은 값과 실제 실험에서 얻은 값을 비교하여 신뢰도를 확인하였으며 오차 범위를 $\pm 10\%$ 이내로 줄이기 위한 정량평가모델의 개선 및 프로그램을 개선하였다.

2. 예측모델의 computing 기술 적용 및 웹(web) 기반 그래픽 인터페이스 개발

가. 병원미생물에 대한 환경 인자별 수치계산 모델의 개발

병원미생물의 증식 예측 모델에 따른 환경 인자별 컴퓨터 계산 모델을 완성하였으며 미생물 성장환경의 예측 프로그램에서의 결과는 실험 모델과 컴퓨터를 이용한 수치모델의 결과의 비교를 통하여 정확도를 확인하였다.

나. 표준 소프트웨어(프로그래밍 타입)의 개발

컴퓨터의 기종에 관계없이 인터넷에서 사용이 가능하도록 웹을 기반으로 하는 GUI (Graphic User Interface) 환경을 구축하였으며, 사용자별로 아이디와 비밀번호를 부여하여 각 개인별로 데이터베이스를 구축할 수 있도록 하였으며 데이터베이스의 보안을 유지하고 GUI (Graphic User Interface)를 이용하여 사용자가 데이터를 마우스만을 이용하여 쉽게 입력하고 그래프의 결과를 쉽게 출력할 수 있도록 개발하였다. 또한 좀더 다양하고 편리한 그래픽 환경을 위한 프로그램을 개선하였다.

다. 포장연제품에 대한 예측정량평가모델의 parameter 변화를 적용한 수정 다항식의 도출

수치모델 표현 시 속도를 개선하고 mySQL 데이터베이스 사용으로 데이터를 체계적이고 안전하게 관리하며, PERL(Practical Extraction and Report Language) 스크립트 언어에서 PHP (Personal Home Page tools) 스크립트언어 사용으로 코드를 간소화하였으며 수치모델의 보다 더 정확한 표현을 위해서 수치모델을 하나의 이미지로 다운로드 가능하도록 프로그램을 개선하였다.

라. 표준소프트웨어의 일반 PC용 제품 개발

예측정량평가 프로그램은 실험을 통하여 얻어진 (i) *Listeria monocytogenes*, (ii) *Vibrio parahaemolyticus*, (iii) 게맛살 부패세균 등에 대한 예측용 계산모델을 이용하여 주어진 초기 균수, 온도 등의 인자값에 대한 균류의 예측 결과를 수식 그래프를 보여준다. 예측 모델 프로그램에서는 서버 컴퓨터에서의 계산 환경을 구축하여 각 사용자의 개인용 프로그램이 아닌 인터넷에 연결된 웹 브라우저만 있으면 어디에서도 사용이 가능하도록 하였다. 또한 사용자별로 아이디와 비밀번호를 부여하여 각 사용자가 별도의 데이터베이스를 구축할 수 있도록 하였으며, 데이터베이스의 보안을 유지할 수 있도록 하였다.

마. 인터페이스 개발 및 웹서버를 이용한 인터넷 프로그램 적용: 100% 목표 달성

사용자가 쉽게 사용할 수 있도록 인터넷 상에서 웹을 기반으로 하는 GUI(Graphic User Interface)를 이용하였으며, 이러한 웹기반의 예측모델 프로그램은 사용자가 간단하고 쉽게 데이터를 입력하고 그래프의 결과를 화면에 출력할 수 있도록 구현하였다. 미생물 성장환경의 예측 프로그램의 검증은 위하여 실제 실험 모델의 결과와 컴퓨터를 이용한 수치모델의 결과를 비교하여 정확도를 분석하였다.

제 4 절 참고문헌

1. Buchanan, R. L. and R. C. Whiting, 1998. Risk assesment: a means for linking HACCP plans and public health. J. Food Prot., 61, 1531-1534.
2. Ross, T. and T. A. McMeekin. 1994. Predictive microbiology. Int. J. Food Microbiol., 23, 241-264.
3. Buchanan, R. L. 1991. Using spreadsheet software for predictive microbiology application. J. Food Safety, 11, 123-134.
4. McClure, P. J., C, de W. Blackburn, M. B. Cole, P. S. Curtis, J. E. Jones, J. D. Legan, I. D. Ogden, M. W. Peck, T. A. Roberts, J. P. Sutherland and S. J. Walker. 1994. Modeling the growth, survival and death of microorganisms in foods: the UK Food Micromodel Approach.

- Int. J. Food. Microbiol., 23, 265-275.
5. ICMSF working group on microbial risk assesment. 1998. Potential application of risk assesment techniques to micobiological issues related to international trade in food and food products. J. Food Prot., 61, 1075-1086.
 6. N. Tanaka. 1998. Food safety problems and challenges in the 21st century. Jpn. J. Food Microbiol. 15(1), 65-70.
 7. Swerdlow, D. L. and Altekruise, S. F. 1998. Food-borne Diseases in the Global Village. Emerging Infections 2. Scheld, W. M., Craig, W. A. and Hughes, J. M. (eds), p. 273-294, American Society for Micrbiology, Washington.
 8. WHO. 1996. The Wold Health Report 1996.
 9. Whiting, R. C. and R. L. Buchanan. 1997. Development of a quantitative model for *Salmonella enteritidis* in pasteurized liquid egg. Int. J. Food Microbiol., 36, 111-125.
 10. Hathaway, S. C. and L. C. Roger. 1997. A regulatory perspective on the potential use of microbial risk assesment in international trade. Int. J. Food Microbiol., 36, 127-133.
 11. Dalgaard, P. and L. V. Jørgensen. 1998. Predicted and observed growth of *Listeria monocytogenes* in seafood challenge tests and in naturally contaminated cold-smoked salmon. Int. J. Food Microbiol., 40, 105-115
 12. Cassin, M. H., A. M. Lammerding, E. C. D. Todd, R. William and R. S. McColl. 1998. Quantitative risk assesment for *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef hamburgers.
 13. CODEX Alimentarius Commission. 1998. Draft principles and guidelines for the conduct of microbiological risk assesment. ALINORM99/13A.
 14. Faber, J. M. 1986. Predictive modeling of food deterioration and safety: Foodborne Microorganisms and Their Toxins. Pierson, M. D. and N. J. Stern (eds), p 57-90, Marcel Dekker, New York.
 15. Ratkowsky, D. A., J. Olley, T. A. McMeekin and A. Ball. 1982. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. J. Bacteriol., 149, 1-5.
 16. Whiting, R. C. 1997. Microbial database building. What have we learned? Food Technol., 51(4), 82-84.
 17. Baranyi, J. and T. A. Roberts. 1995. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. Int. J. Food Microbiol., 26, 199-218.
 18. Ohta, F. and T. Hirahara. 1977. Degradation of nucleotides in cool-stored carp muscle. Mem.

Fac. Fish. Kagoshima Univ., 26, 97-102.

19. Miller, A. J., R. C. Whiting and J. L. Smith. 1997. Use of risk assesment to reduce listeriosis incidence. *Food Technol.*, 51, 100-103.
20. Marks, H. M., M. E. Colemann, C. T. J. Lin and T. Roberts. 1998. Topics microbial risk assesment: dynamic flow tree process. *Risk Anal.*, 18, 309-328.
21. Brown, M. H., K. W. Davies, C. M. P. Billon, C. Adair and P. J. McClure. 1998. Quantitative microbiological risk assesment: principles applied to determining the comparative risk of Salmonellosis from chicken products. *J. Food Prot.*, 61, 1446-1453.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 국외의 관련연구현황

식품의 미생물학적 안전성을 확보하기 위해서 최근 또 하나의 새로운 흐름으로서 식품 중에서의 미생물의 증식, 생산 및 사멸을 수학 모델을 이용하여 정량적으로 해석, 예측하는 연구가 특히 구미에서 많이 이루어지고 있다^{3,4,5)}. 이 새로운 연구 분야는 **예측식품미생물학 (Predictive Food Microbiology)**이라고 불리며, 각종 조건 하에서 식품 중의 미생물의 거동을 예측할 수 있는 해석수단으로서의 가치가 인정되고 있다. 이에 예측식품미생물학의 발달과 함께 병원미생물에 오염된 식품을 섭취하는 것에 의한 감염의 Risk(위험도)를 정량적으로 평가하고자 하는 움직임이 구미 각국에서 시작되고 있으며 FAO(Food and Agricultural Organization)/WHO (World Health Organization) 합동의 CODEX 위원회(CODEX Alimentarius Commission)에서는 그 guide line의 작성이 진행 중에 있다⁶⁾.

식품유래의 병원미생물에 의한 위해성을 정량화 하려는 연구는 식품 안전상 관심도가 높은 *S. enteritidis*, *L. monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7의 3 균종을 대상으로 보고되어 있으며 Brown 등²⁰⁾은 계육제품에 의한 *Salmonella* 감염증에 대하여 컴퓨터 그래픽으로 표현할 수 있는 정량적 평가모델을 개발하였다. 이는 미생물학적 위해성을 평가하는 종합적인 전문 프로그램으로서는 최초로 할 수 있다.

2. 국내의 연구현황

수산가공 식품을 포함한 전체 식품 중의 병원미생물을 대상으로, 그 성장변화에 미치는 환경인자의 영향에 대하여 일반적인 연구 결과는 보고 되어 있으나 관련 병원미생물을 대상으로 각 요인의 어느 범위 내에서의 각각의 값에 대응하는 균의 반응을 정량적으로 해석하는 수치계산 모델 및 예측 프로그램 개발에 관한 연구는 아직까지 보고 된 바 없다. 또한 예측 프로그램을 일반 사용자가 PC상에서 손쉽게 이용할 수 있도록 하는 소프트웨어의 개발은 전무한 상태이다.

선진국이 막대한 비용을 투자하여 식품의 안전성 확보를 위한 연구개발을 서두르고 있는 현재, 국내의 현실은 경비문제로 이에 크게 미치지 못하고 있는 실정이다. HACCP 시스템 도입 이전에 경비 절감과 동시에 식품의 안전성을 보장 할 수 있는 대체 방안이 절실히 요구되도 있으며 그러한 대체 방안으로서 가장 유효한 수단이 **[식품 관련 미생물에 대한 수학적 정량 평가 모델]**의 적용이다. 수산가공식품 중 튀김어묵은 튀김시의 가열온도가 100℃ 이상으로 이 과정에서 대부분의 미생물이 사멸되며, 통조림식품도 가열살균공정만 확실히 관련되

면 미생물에 의한 오염은 거의 없다. 그러나 포장연제품은 증자나 살균온도가 100℃ 이하로서 비교적 저온으로 고온성 세균의 생장이 예상되며, 냉각이나 유통의 경우, 10℃ 이하를 유지하지 않으면 저온성병원미생물에 의한 오염의 기회가 상당히 높다. 따라서 포장연제품 관련 병원미생물의 예측 정량평가모델 및 PC용 software 개발에 관한 연구가 절실히 필요한 실정이다.

3. 앞으로 전망

전 세계적으로 현재 개발되고 있는 정량평가 모델의 대부분이 미생물 배지 상에서 각종 환경요인을 변화시킨 조건에서 data를 해석하고 개발한 것이다. 또한 몇몇 식품제조현장 적용모델의 경우에도 자국의 필요성에 따라 대상 식품재료 및 병원 균주가 일부에 국한되어 있다. 따라서 앞으로는 다양한 종류의 식품과 각 식품의 특성을 고려한 예측모델의 개발이 필요하다. 이에 국내의 경우에는 미국과 유럽의 관심도가 비교적 낮으면서도 우리 식생활에서는 중요한 위치를 차지하는 수산가공 식품을 대상으로 차별화 된 현장적용 모델의 개발이 요구된다.

본 연구가 성공적으로 이루어진다면

- 첫째, 각종 식품의 종류별 특성을 고려한 예측 프로그램을 개발할 수 있으며,
- 둘째, 국내 최초의 고유기술 개발로 인한 관련 연구의 활성화에 기여할 수 있다.
- 셋째, 또한 금후 HACCP 시스템의 전면적 시행에 있어서 HACCP 시스템의 단점을 보완하고, 기준 근거를 제공할 수 있으며,
- 넷째, 정보화 기술의 도입에 있어서 뒤떨어진 식품 산업분야에 새로운 자극이 될 수 있으며, 국내 정보화 관련 전문가에 대한 새로운 아이템 제공의 계기가 될 것이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 병원미생물의 예측 정량평가모델의 개발 및 database 구축

1. *Vibrio parahaemolyticus* 의 성장예측모델 개발

가. 서론

식품은 그 영양적 가치 및 기호성 등에 못지않게 인간의 질병 예방 및 건강을 유지하는 차원에서 반드시 위생학적 안전성이 확보되어야만 한다. 그러나 해마다 국내외적으로 병원미생물에 의한 식중독 사건이 끊임없이 발생하고 그 규모면에 있어서도 대형화되고 있는 추세이다. 더욱이 교통수단의 발달로 인하여 짧은 시간 내에 생산제품의 국가 간 유통이 광범위하게 이루어짐에 따라 식품의 위생학적 안전성 확보는 국제적인 문제점으로 대두되고 있다 (McMeekin 등, 1993). 이에 식품의 위생학적 안전성 확보를 위한 유효수단으로서 HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) 시스템의 개념이 전 세계적으로 도입되고 있으며, 국내의 경우에도 일부 분야에서 도입되어 사용되고 있다. 또한, HACCP 시스템의 도입과 더불어, 최근에는 미국과 유럽 국가 등을 중심으로 식품중의 미생물의 성장변화를 수학적 모델을 이용하여 예측하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다.

예측미생물학 (Predictive food microbiology) 이라고 불리우는 이 연구 분야는 수학적 모델을 이용하여 식품의 원료로부터 제조공정, 유통, 보관, 판매, 소비에 이르기까지의 전 과정에서 병원 및 부패미생물의 거동을 정량적으로 예측하고 제어함을 목적으로 하고 있다. 예측미생물학에서 사용되는 수학적 모델로서는 미생물의 성장을 표현하는 기본 모델(1차 모델)과 미생물의 증식에 미치는 환경요인(온도, pH, 수분활성 등)의 영향을 표현하는 2차 모델 그리고 균의 종류와 기본적인 증식 조건 등을 입력함으로써 균의 성장 변화를 예측 (simulation)할 수 있는 프로그램인 3차 모델로 구성되어 있다 (Coleman and Marks, 1999).

예측미생물학의 적용은 식품의 안전성 문제에 있어 가장 중요하고도 큰 비중을 차지하는 위해미생물만을 대상으로 하여, 이들의 성장을 수학적 모델에 의해 정량적으로 예측하고 평가되기 때문에 비교적 단순하면서도 효율이 높으며 이러한 수학적 모델의 적용은 정성적 분석결과 및 경험치의 의존도가 높은 HACCP 시스템의 단점 보완과 발전에도 크게 기여하고 있다 (Baker, 1995; Notermans 등, 1995). 즉, 식품의 미생물에 의한 위해 평가(HA)가 가능하며, 중요관리점(CCP)을 수학적 모델을 이용하여 정량적으로 분석할 경우, 식품의 각 가공공

정 조건을 정밀도가 높은 중요관리점(CCP)의 적절한 허용한도 이내에서 결정하고, 제어할 수 있다.

이와 같은 예측미생물학의 특징은 위해미생물의 성장변화에 대한 보다 객관적이며 정량적인 평가가 가능하여 HACCP 시스템의 단점을 보완 할 수 있을 뿐만 아니라 (Baker, 1995; Notermans 등, 1995), 기존의 미생물 검사법에 비하여 매우 신속한 예측이 가능하다. 그러므로, 시간과 인력, 경비 등이 소요되는 미생물 접종시험·보존시험을 대체하여, 식품의 원재료로부터 소비에 이르기까지의 전 과정 중에 병원미생물의 성장에 대하여 수학적 모델을 이용한 예측과 제어가 가능하고, 이로 인해, 대상 식품중의 병원 미생물의 정량적 위험도 평가 (Quantitative risk assessment)를 위한 저 비용의 유효수단으로 인정되고 있다(Ross and McMeekin, 1994). 따라서, 이러한 유효성으로 말미암아 미국, 영국 등을 중심으로 활발한 연구가 이루어 지고 있으며, 이미 식품에 관한 각종 초기 조건을 입력하여 컴퓨터에 의한 계산을 실행함으로써 대상 미생물의 성장변화를 예측·비교하고 graph로 표현 가능한 program의 개발이 진행되어 미국의 농무성(USPA)에서는 Pathogen Modeling Program, 영국의 농어식량성(MAFF)에서는 Food Micromodel을 각각 개발하였다(Yano, et. al. 1998). 그러나 이들 program을 이용하더라도 식품 중의 모든 미생물의 증식을 완전히 예측하는 것은 불가능하며, 계속된 program의 개선 및 연구가 진행 중에 있다.

한편, 삼면이 바다로 둘러싸인 국내의 경우, 식품소재 중의 수산물이 차지하는 비중이 외국에 비하여 높을 뿐만 아니라 다양한 수산가공제품의 개발이 이루어져 왔다. 그러나 어·패류를 중심으로 한 수산물의 경우 그 특성상 위해미생물에 의한 오염의 확률이 높으며, 수산물의 대표적 병원미생물이라고 할 수 있는 장염비브리오의 경우, 이로 인한 식중독 사고가 매년 끊임없이 발생하고 있어 이에 대한 대책이 필요한 실정이다. 또한 WTO 체제의 출범 이후, 국제간의 무역에 있어서도 식품의 위생학적 안전성 확보를 위한 정량적 평가법의 도입과 관련 자료제시에 대한 요구가 점점 증대됨에 따라 예측미생물학의 도입이 유효한 수단으로서 크게 주목되고 있다.

이에 본 연구에서는 수산식품에서 대표적 식중독 세균으로 문제가 되고 있는 *Vibrio parahemolyticus*에 대하여 현재 국내 상당한 수요를 차지하는 수산 가공식품인 게맛살에서의 성장변화를 정량적으로 예측하는 수학적 모델의 개발을 통한 *V. parahemolyticus*의 위해도 평가를 위한 기초자료를 제공하고자 온도, pH에 대한 성장 예측모델을 개발하였다.

나. 재료 및 방법

(1) 공시 균주

(가) 공시 균주

본 실험에 사용한 균주는 *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 2210001로 한국생명공학연구원 유전자은행(KCTC)으로부터 분양 받아 3% NaCl을 첨가한 brain heart infusion broth (BHI, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)에 15%의 glycerol를 첨가하여 -80℃에 동결보관하면서 실험전 MIC broth에서 37℃, 24시간 전배양하여 사용하였다.

(나) 공시 균주의 배양

공시균주의 배양은 향후, 균의 성장 모델을 포장연제품인 게맛살에 적용하기 위해 게맛살 성분과 유사한 배지(Modified Imitation Crab broth, MIC broth; 10g Peptone, 10g Yeast extract, 10g Dextrose, 10g Sodium chloride, 10g Disodium phosphate / ℓ)를 사용하였다.

균의 성장에 미치는 온도, pH 및 초기 균수 등 환경인자의 영향을 알아보기 위하여 동결 보존한 균주를 45℃ water bath에서 급속 해동한 후, 미리 준비한 멸균 MIC broth 50ml에 접종하고 37℃ incubator (Sanyo, Japan)에서 24시간 전배양 하였다. 전배양 한 균주를 18ml의 멸균 생리 식염수(3% NaCl)를 이용해 10배씩 희석하여 200ml의 MIC broth에 초기 균수가 10^2 , 10^3 , 10^4 CFU/ml가 되도록 접종하고 온도 15, 20, 37, 40℃, pH 6, 7, 8에서 각각 배양하였다.

(다) 균의 성장 측정

각 실험구별 시간의 경과에 따른 균의 성장은 일정시간 간격으로 Plate count agar (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)를 사용하여 표준 평판 배양법(AOAC, 2000)으로 생균수를 측정하여 나타내었다.

(2) Gompertz model의 적용

균의 sigmoid 한 형태의 성장을 표현하기 위해 사용하는 연속함수의 식은 지금까지 여러가지의 형태로 보고되어 있으나 그중에서 특히 Gompertz model에 관한 연구가 가장 많으며 영국과 미국에서 각각 개발된 food micromodel (FMM) and Pathogen Modeling program (PMP)경우에도 Gompertz model을 사용하고 있다.

$$\text{Log}(Nt) = A + C \cdot \exp(-\exp(-B(t - M)))$$

t : 배양시간(hr)

N(t) : 배양시간에 따른 균수(CFU/ml)

A : 초기 균수의 log값(CFU/ml)

C : 균수 증가량의 log값(초기 균수와 최대 균수의 차, CFU/ml)

- M : 발육속도가 최대가 되는 시점의 시간
- B : 시간 M에서의 발육 속도(최대 발육 속도)

일반적으로 각 각의 배양 곡선에서 12-16개의 생균수값을 얻었으며, 15반복을 통한 실험 결과 값을 Gompertz model 에 대입하여 균의 생육지표치인 최대증식속도 상수($k = BC/e$)를 구하였다.

(3) 환경 요인의 영향

균의 증식을 대표하는 균의 생육 지표로써, 최대 증식속도 상수(k)와 유도기(LT), 세대시간(GT)을 실험을 통한 Gompertz 모델에 의하여 도출하였으며. 최대 증식 속도 상수에 미치는 초기 균수, 온도의 영향을 각 각 One-way ANOVA-test를 실시하여 Duncan's multiple range test (Duncan, 1955)로 처리 평균간의 유의성 ($P < 0.05$)을 SPSS (SPSS Inc., 2000) program (Ver. 10.0)으로 검정하였다. 또한 이들의 복합적인 관계를 Square root model과 Polynomial model 로 정량화 하였다.

(4) Parameter들의 결정과 모델의 평가

각 환경 조건 온도 15, 20, 37, 40°C와 초기 균수 10^2 , 10^3 , 10^4 CFU/ml 조건에서 Gompertz model로부터 구한 최대 증식속도 상수(k)와 환경 조건과의 관계를 규명하기 위하여 Square root model, Polynomial model에 각 각 적용하여 SPSS (SPSS Inc., 2000) program (Ver. 10.0)를 이용하여 각 식의 parameter를 결정하고 Sigma Plot (SPSS Inc., version 7.0)로 도식화 하였으며, 각 배양 조건을 대입하여 실제 실험으로부터 구한 최대 증식속도 상수(k)와 모델식으로부터 구한 최대 증식속도 상수(k)와의 상관 관계를 비교하였다.

(5) *V. parahaemolyticus*의 성장 예측

MIC broth 상에서의 게맛살 부패세균의 최대 증식속도 상수(k)의 온도와 초기 균수에 따른 정량 평가 모델을 Square root model, Polynomial model을 이용하여 정량화 하였으며, 정량 평가 모델에 의해 예측된 최대 증식속도 상수(k)를 이용해 Gompertz 모델에 의한 균의 예측성장을 나타내었다.

다. 결과 및 고찰

(1) 환경 조건에 따른 균의 생육 지표치의 변화

각 환경 요인에 따른 균의 증식을 예측하기 위하여 균의 증식을 대표하는 생육지표로

써, 최대 증식속도 상수(k), 유도기(LT), 세대시간(GT)을 Gompertz 모델로부터 구하였다.

$$\text{Log}N = A + C \times \exp[-\exp\{-B \times (t - M)\}]$$

$$k = BC/e$$

$$GT \text{ (hr)} = (\log 2) e / BC$$

$$LT = M - (1/B)$$

(가) 최대 증식속도상수(k)에 미치는 환경요인의 영향

*V. parahaemolyticus*의 온도, pH, 초기균수에 따른 최대 증식속도 상수(k)의 변화를 Table 1과 Fig. 1에 나타내었다. 각 온도 실험구별로 초기 균수에 따른 최대 증식속도 상수(k)의 변화는 유의적인 차이는 나타나지 않았지만 15°C 실험구에서 1×10^2 CFU/ml일 때 다른 초기균수보다 큰 최대 증식속도 상수(k) 값을 나타내었고 최대 증식속도 상수(k)는 온도에 지배적인 영향을 받는 것으로 나타났다. Miles 등 (1994)에 따르면, 최대 증식속도 상수(k)는 pH 6.5에서 pH 8.9 범위에서 비교적 일정하다고 보고한바 있으며, 본 실험에서도 이와 유사하게 pH에 따른 최대 증식속도 상수(k)의 유의적인 차이는 없었다.

(나) 유도기(LT)에 미치는 환경요인의 영향

균의 유도기(LT)에 미치는 환경 요인의 영향을 알아보기 위하여 *V. parahaemolyticus*의 초기 균수를 다르게 하여 서로 다른 온도 및, pH 조건 하에서 배양하였으며, 그 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 유도기(LT)에 미치는 온도의 영향은 온도가 높아질수록 유도기(LT)는 짧아지며, 37°C에서 가장 짧은 유도기(LT , 1.69 ± 0.303 hr)를 나타내었으며 40°C에서는 유도기(LT)가 다시 길어졌다. 초기 균수와 pH에 따른 유도기(LT)의 유의적인 차이는 없었다 ($P > 0.05$).

(다) 세대 시간(GT)에 미치는 환경요인의 영향

균의 세대시간(GT)에 미치는 환경 요인의 영향을 알아보기 위하여 *V. parahaemolyticus*의 초기 균수를 다르게 하여 서로 다른 온도 및, pH 조건 하에서 배양하였으며, 그 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 세대시간(GT)에 미치는 온도의 영향은 온도가 높아질수록 세대시간(GT)은 짧아지며, 37°C에서 가장 짧은 세대시간(GT , 0.31 ± 0.041 hr)를 나타내었으며, 37°C 보다 높은 온도에서는 세대시간(GT)은 길어졌다. 한편, 초기 균수와 pH에 따른 세대시간(GT)의 유의적인 차이는 없었다($P > 0.05$).

Table 1. Effects of temperature, pH and initial cell number on maximum specific growth rate(k) of *V. parahaemolyticus*¹

pH	Initial level (Log CFU/ml)	Maximum specific growth rate(k) (hr ⁻¹)			
		15°C	20°C	37°C	40°C
6	2	0.11±0.01 ^b	0.40±0.05	1.08±0.09	0.88±0.04
	3	0.09±0.01 ^a	0.36±0.04	1.01±0.06	0.91±0.02
	4	0.09±0.01 ^a	0.36±0.07	0.98±0.12	0.88±0.04
7	2	0.11±0.02	0.37±0.06	1.10±0.16	0.80±0.04
	3	0.09±0.01	0.32±0.02	1.08±0.13	0.88±0.03
	4	0.10±0.03	0.31±0.04	0.98±0.19	0.86±0.03
8	2	0.11±0.02 ^b	0.35±0.06 ^b	0.99±0.02	0.88±0.02 ^b
	3	0.08±0.02 ^a	0.26±0.04 ^a	0.99±0.07	0.92±0.06 ^a
	4	0.10±0.01 ^b	0.25±0.03 ^a	0.93±0.07	0.87±0.05 ^b

¹Values (mean±s.d. of 15 times replication) in same column not sharing a common superscript are significantly different (P<0.05).

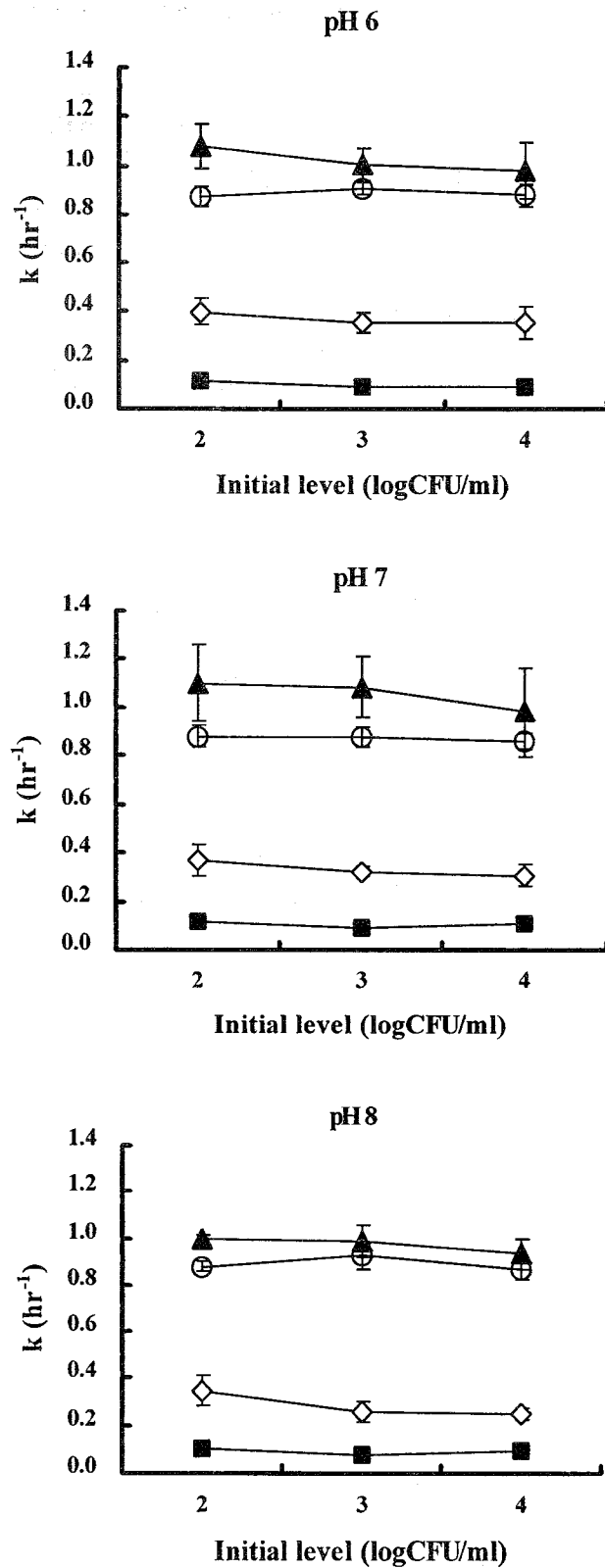


Fig. 1. Effects of temperature, pH and initial cell number on maximum specific growth rate (k) of *V. parahaemolyticus* (■, 15°C;◇, 20°C;▲, 37°C;○, 40°C). Error bars indicate standard deviations (n=15).

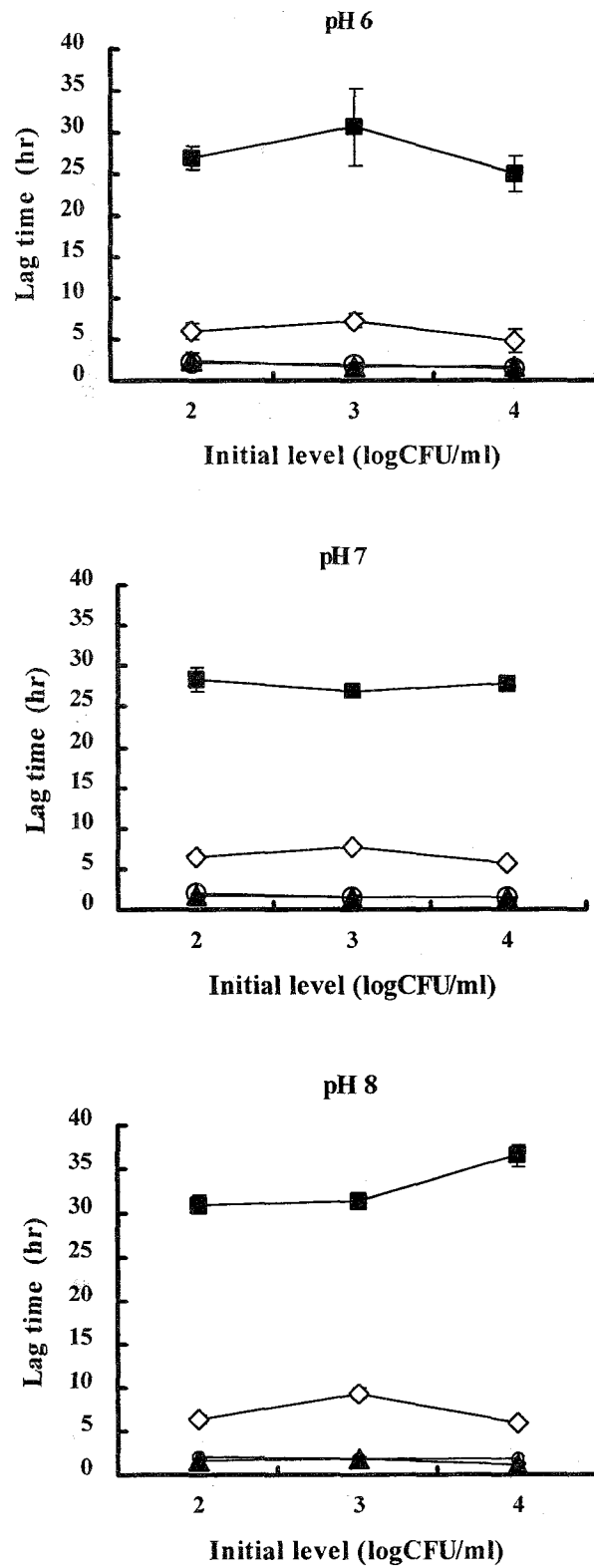


Fig. 2. Effects of temperature, pH and initial cell number on lag time (*LT*) of *V. parahaemolyticus*. Error bars indicate standard deviations (n=15).

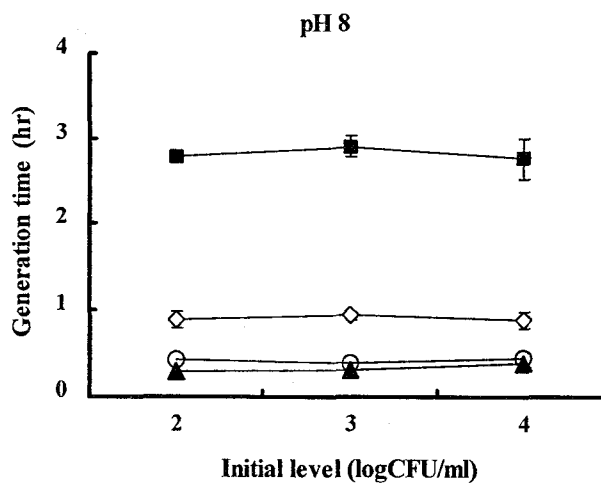
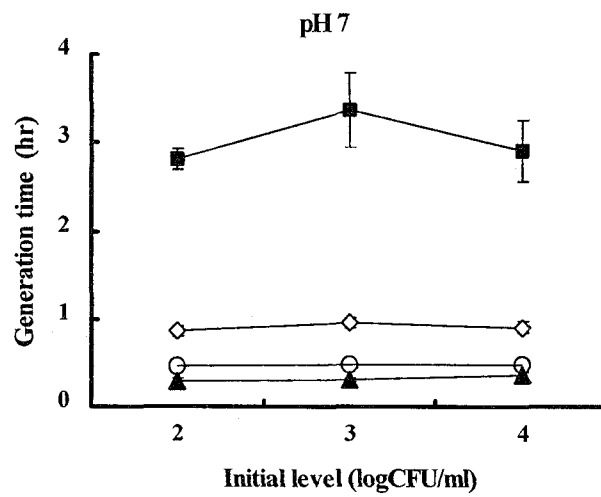
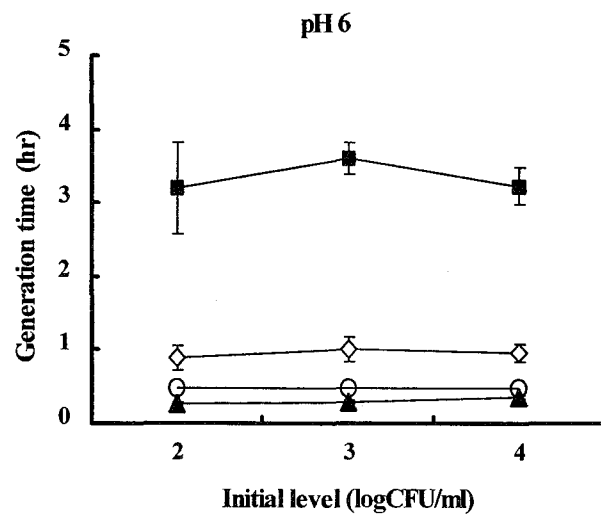


Fig. 3. Effects of temperature, pH and initial cell number on generation time (GT) of *V. parahaemolyticus*. Error bars indicate standard deviations (n=15).

(1) 환경 조건이 최대증식속도상수(k)에 미치는 영향의 2차 모델에 의한 정량화

(가) pH와 온도의 변화에 따른 초기균수 별 정량평가모델

각 초기 균수에서 pH와 온도에 따른 최대증식속도상수(k)의 변화를 통계적 분석을 통해 model화하였다. 초기 균수와 pH에 따른 최대증식속도상수(k)의 유의적인 차이는 나타나지 않았으며 ($p>0.05$). Miles 등 (1994)에 따르면, 최대증식속도상수(k)는 pH 6.5에서 pH 8.9 범위에서 비교적 일정하다고 보고한바 있다. 이 같은 pH 범위는 대부분의 어류나 게, 새우 등의 갑각류, 패류 등의 해양 생물의 pH 범위와 일치하므로, 수산 식품의 원료 또는 가공식품에 있어서 병원성 인자인 *V. parahaemolyticus*의 성장 예측 모델의 변수 범위로 적용할 수 있다고 하였다.

각 초기균수 조건에서 pH와 온도의 복합적인 영향을 표현하기 위해서 Sigmaplot 7.0(SPSS Inc.)의 Gauss-Newton 알고리즘을 사용한 비선형 회귀분석을 통하여 $f=a \cdot \exp(-0.5(((T-T_{max})/b)^2 + ((pH-pH_{max})/c)^2))$ 형태의 다항식으로 나타내었으며, 각 parameter 값을 Table 2에 나타내었다. 각 초기 균수에 따른 상관관계는 0.966, 0.979, 0.965이며 초기균수에 따른 최대증식속도상수(k)의 유의적인 차이가 없으므로 초기균수 조건을 무시할 경우, 상관관계가 0.966으로 나타났다.

(나) 온도의 변화에 따른 최대증식속도상수(k)의 변화

초기 균수와 pH에 따른 최대증식속도상수(k)의 유의적인 차이는 없었으며($P>0.05$), 따라서, Ratkowsky 등 (1983), Zwietering 등 (1991, 1994)이 정의한 초기균수를 고려하지 않은 온도와 최대증식속도상수(k)간의 상호작용을 표현하는 2차 모델인 평방근 모델의 확장된 형태를 사용하여 $\sqrt{k} = b (T - T_{min}) [1 - \exp(c(T - T_{max}))]$ 로 통합하여 정량화 하였다 (Table 3).

Miles 등 (1997)은 *V. parahaemolyticus*의 증식 속도에 미치는 온도와 수분활성에 관한 연구에서 4 종류의 다른 strain의 *V. parahaemolyticus*의 생육이 가능한 최저 온도는 5.3~8.3°C인 반면, 최대 온도는 45.3°C~48°C이며, 최적 온도는 37~39°C로 보고하였다. 한편, 본 실험의 square root model에 의한 *V. parahaemolyticus*의 생육 최저 온도는 9.5°C, 최대 온도는 49.9°C로 유사한 결과를 나타내었다.

(다) 다항식을 이용한 최대증식속도상수(k)의 실험치와 예측치의 비교

*V. parahaemolyticus*의 실험을 통하여 구한 최대증식속도상수(k)와 $f=a \cdot \exp(-0.5(((T-T_{max})/b)^2 + ((pH-pH_{max})/c)^2))$ 다항식에 의해 예측된 최대증식속도상수(k) 값을 비교한 결과를 Fig. 4에 나타내었으며, 평방근모델의 확장된 형태인 $\sqrt{k} = b (T - T_{min}) [1 - \exp(c(T$

- T_{max}))에 의한 결과를 Fig. 5에 나타내었다.

다항식모델에 의한 예측치는 실험치와 근사값을 나타내고 있으며, 평방근모델에 의한 예측치도 실험치와 높은 상관관계를 가지고 있는 것을 알 수 있었다.

Table 2. Parameters of Polynomial model for prediction of maximum specific growth rate (k) of *V. parahaemolyticus* at different initial cell number

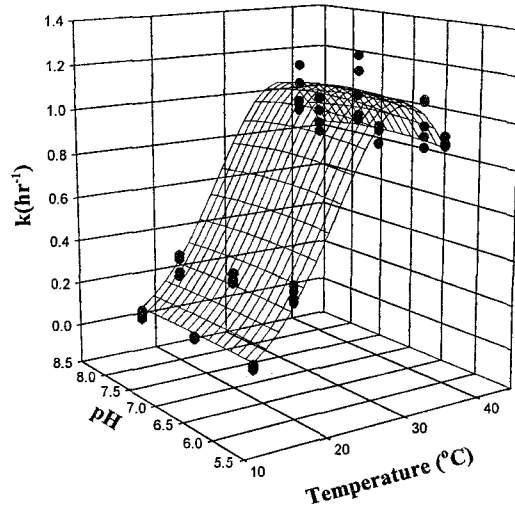
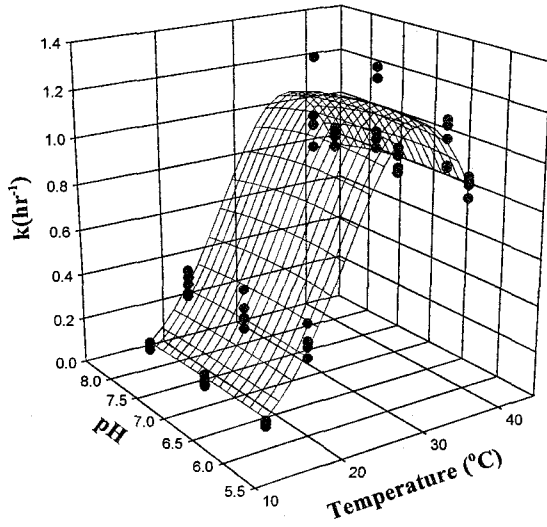
Initial level (CFU/ml)	Parameter					R^2
	a	b	c	T_{max}	pH_{max}	
1.0×10^2	1.18642	8.79753	3.79321	33.4201	6.62192	0.966
1.0×10^3	1.11402	8.93174	4.2621	34.2014	6.89355	0.979
1.0×10^4	1.02322	9.61076	9.63489	34.9752	4.73513	0.965
Unification	1.09724	9.0909	4.67523	34.1378	6.58586	0.966

Table 3. Parameters of Square root model for prediction of maximum specific growth rate (k) of *V. parahaemolyticus*

		Statistical analysis				S. E. of Estimate	R^2
		Coefficient	S. E	t-value	P		
Square root model	T_{min}	9.5459	0.3554	26.8617	<0.0001	0.0436	0.977
	T_{max}	49.980	0.9566	52.2472	<0.0001		
	a	0.0636	0.0057	11.1888	<0.0001		
	b	0.0663	0.0129	5.1318	<0.0001		

1.0×10^2 CFU/ml

1.0×10^3 CFU/ml



1.0×10^4 CFU/ml

Unification

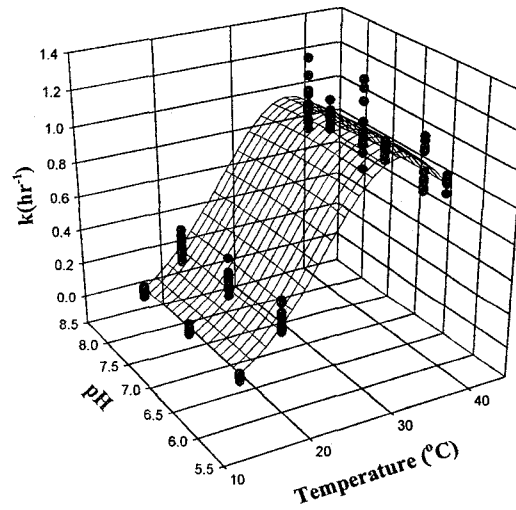
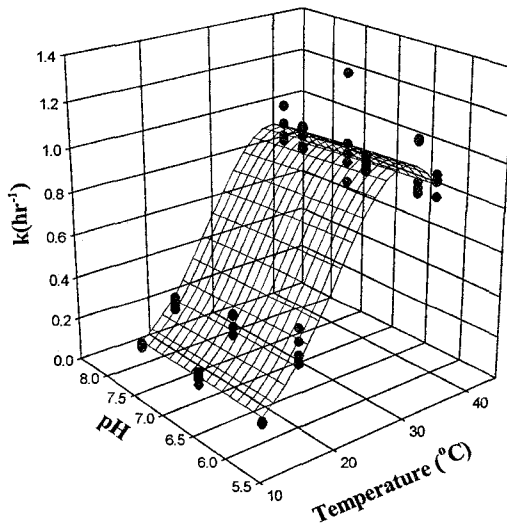


Fig. 4. Comparison of experimental k and predictive k by response surface model of *V. parahaemolyticus* at different culture condition (●, Experimental k ; ▣, Predictive k).

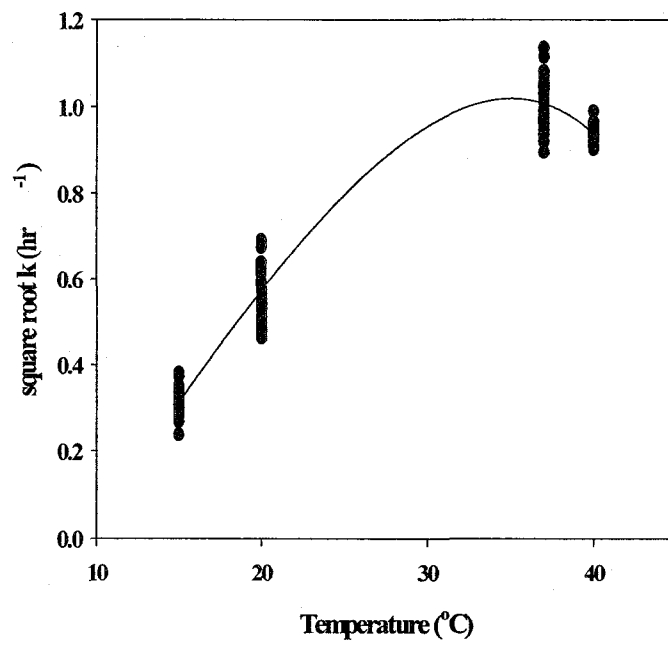


Fig. 5. Comparison of experimental \sqrt{k} and predictive \sqrt{k} by Square root equation of *V. parahaemolyticus* at different culture condition (●, Experimental \sqrt{k} ; —, Predictive \sqrt{k}).

(라) 2차 모델식과 Gompertz 모델에 의한 균의 성장

Table 1의 최대증식속도상수(k)에 미치는 온도와 pH의 영향을 모델화한 정량평가모델 식으로 서로 다른 초기 균수, 온도, pH 조건에서 균의 최대증식속도상수(k)를 예측하였다. 이를 바탕으로 균의 성장 곡선을 표현하는 Gompertz식에 적용함으로써, 각 조건에서 Gompertz 식에 의한 균의 성장이 예측 가능하게 되었다. 초기 균수 1.0×10^3 , 온도 37°C , pH 6에서의 반복실험을 통한 성장곡선(실험치)와 같은 조건에서의 다항식에 의한 예측 성장 곡선(예측치)를 비교한 결과를 Fig. 6에 나타내었다.

실험치와 예측치는 잘 일치하고 있으며, 이러한 최대증식속도상수(k)에 관한 정량적인 모델은 *V. parahaemolyticus*의 환경 요인에 대한 성장을 손쉽게 모니터링 할 수 있으며, 수분활성이나 좀더 넓은 pH 범위, 여러 첨가물의 농도, 포장시 충전하는 N_2 또는 CO_2 농도나 이러한 조건들 간의 상호 작용 같은 물리 화학적인 요인에 관한 추가적인 연구가 계속 되어질 경우, 보다 완벽하게 균의 성장을 예측할 수 있을 것으로 기대된다.

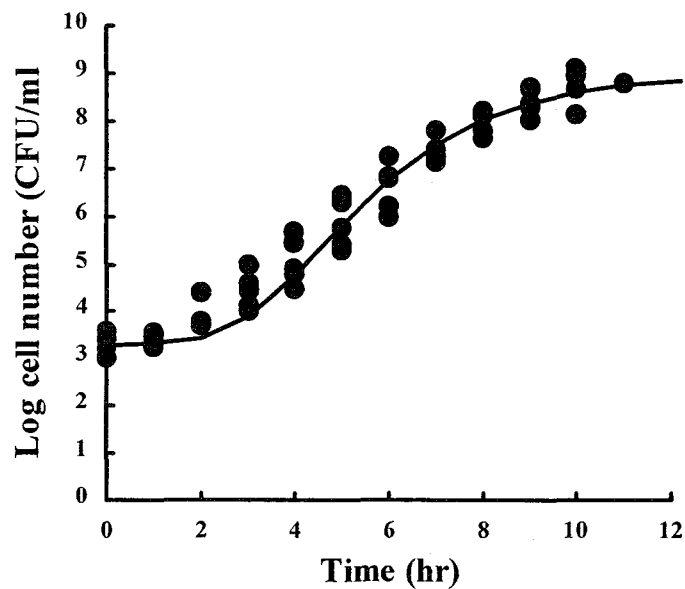


Fig. 6. Predictive growth curve of *V. parahaemolyticus* by Polynomial model (Initial cell number, 10^3 CFU/ml; Temperature, 37°C ; pH 6). ●, Experimental data; —, Growth curve by Polynomial model

라. 결론

*V. parahaemolyticus*는 해양 또는 기수 지역에 주로 분포하는 호염성 세균으로 (Bergey's Manual, 1984) 1950년에 일본 오사카에서 마른 멸치에 의한 식중독 원인균으로 처음 분리되었고 (Fujino 등, 1953), 주로 익히지 않거나 덜 가열된 수산물을 쉽게 접할 수 있는 많은 아시아권 나라에서 자주 찾아볼 수 있는 식품 유래 병원성 세균이다 (Joseph 등, 1983). Wong 등 (1992; 1995)은 일반 또는 냉장 수산식품, 심지어 냉동식품에서도 *V. parahaemolyticus*가 검출된다고 보고하였으며, *V. parahaemolyticus*에 오염된 식품을 섭취하였을 경우, 대부분 복통, 구토, 설사를 포함하는 급성 위장염을 일으키며 (Potasman 등, 2002), 감염기전은 Kanagawa 현상(KP)을 일으키는 단백질 내열성 용혈독소인 thermostable direct hemolysin(TDH)가 분비되어 식중독을 야기하는 것으로 알려져 있다 (Nishibuchi 등, 1985; Honda 등, 1993). 비록, 일반적인 수산 식품이나 해양 환경에서 분리되어지는 종은 KP negative strain 이나 KP negative strain의 TDH-related haemolysin (TRH)에 의해서도 식중독이 발생한다고 보고되어 있다 (Kelly and Stroh, 1989; Okuda 등, 1997).

이러한 *V. parahaemolyticus*에 대한 수산 식품의 위험도 평가를 위해 Sumner, J and Ross, T (2002)는 호주에서 소비되고 있는 수산 식품에 대해, 소비량과 식중독 발생 빈도를 바탕으로, 식품별 원인 균의 위험도를 순위로 정하였다 (Table 4). 여기에 따르면 조리된 새우에 포함된 *V. parahaemolyticus*의 위험도가 37위로 다른 *Vibrio* 종과 마찬가지로, 중금속 독소나 독소형 세균 다음으로 높은 순위를 차지하고 있는 것으로 나타났다.

한편, 본 연구에서는 위와 같이 수산 식품에 문제시 되는 *V. parahaemolyticus*를 대상으로 온도, pH 및 초기균수 등 다양한 환경 조건에의 균의 성장 실험 결과를 데이터 베이스화 하여, 이를 바탕으로 수학적 모델을 통한 균의 성장을 정량적으로 표현함으로써, 위험도 평가를 위한 좀 더 명확한 근거를 제시하기 위해, 각 초기 균수에 따른 균의 증식지표인 최대 증식속도상수(k)와 온도, pH의 관계는 다음과 같이 나타내었다.

$$1 \times 10^2 \text{ CFU/ml} : k = 1.18 \cdot \exp(-0.5(((T-33.42)/8.80)^2 + ((\text{pH}-6.62)/3.79)^2))$$

$$1 \times 10^3 \text{ CFU/ml} : k = 1.11 \cdot \exp(-0.5(((T-34.20)/8.93)^2 + ((\text{pH}-6.89)/4.26)^2))$$

$$1 \times 10^4 \text{ CFU/ml} : k = 1.02 \cdot \exp(-0.5(((T-34.98)/9.61)^2 + ((\text{pH}-4.73)/9.63)^2))$$

초기균수와 pH에 따른 최대증식속도는 유의적인 차이가 없었으므로 $k = 1.10 \cdot \exp(-0.5(((T-34.14)/9.09)^2 + ((\text{pH}-6.59)/4.67)^2))$ 와 평방근 모델의 확장된 형태인 $\sqrt{k} = 0.06 (T - 9.55) [1 - \exp(0.07(T - 49.98))]$ 로 나타내었다.

Table 4. Risk rankings of hazard/product pairings of significance for the Australian seafood industry

Hazard/product pairing	Selected population	Risk ranking
Ciguatera in reef fish	General Australian population	45
Ciguatera in reef fish	Recreational fishers, Queensland	60
Scombrototoxicosis	General Australian population	40
Algal biotoxin in shellfish—controlled waters	General Australian population	31
Algal biotoxin—during an algal bloom	Recreational gatherers	72
Mercury in predaceous fish	General Australian population	24
Viruses in oysters—contaminated waters	General Australian population	67
Viruses in oysters—uncontaminated waters	General Australian population	31
<i>V. parahaemolyticus</i> in cooked prawns	General Australian population	37
<i>V. cholerae</i> in cooked prawns	General Australian population	37
<i>V. vulnificus</i> in oysters	General Australian population	41
<i>L. monocytogenes</i> in cold-smoked seafoods	General Australian population	39
<i>L. monocytogenes</i> in cold-smoked seafoods	Susceptible (aged, pregnant, etc.)	45
<i>L. monocytogenes</i> in cold-smoked seafoods	Extremely susceptible (AIDS, cancer)	47
<i>C. botulinum</i> in canned fish	General Australian population	25
<i>C. botulinum</i> in vacuum packed smoked fish	General Australian population	28
Parasites in sushi/sashimi	General Australian population	31
Enteric bacteria in imported cooked shrimp	General Australian population	31
Enteric bacteria in imported cooked shrimp	Susceptible (aged, pregnant, etc.)	48

마. 참고 문헌

- AOAC, 2000. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists Internal. 16th edition. volume 1.
- Baker, D.A., 1995. Application of modelling in HACCP plan development. *Int. J. Food Microbiology*, 25, 251-261.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(Noel R. Krieg, John G. Holt ed.). 1984. Vol.1, Williams & Wilkins,Baltimore & London 518-535.
- Coleman M.E. and Marks H.M., 1999. Qualitative and quantitative risk assessment. *Food Control*. 10, 289-297.
- Dunacn, D.B., 1955. Multiple-range and multiple F test. *Biometrics*, 11, 1-42.
- Fujino, T., Okuno, Y., Nakada, D., Aoyoma, A., Fukai, K., Mukai, T. and Ueho, T., 1953. Onthe bacteriological examination of shirasu food poisoning. *Med. J. Osaka Univ.* 4, 299-304.
- Honda, T. and Lida, T., 1993. The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of the thermostable direct haemolysin and related haemolysins. *Rev. Med. Microbiol.* 4, 106-113.
- Joseph, S.W., Colwell, P.R., Kaper, J.B., 1983. *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic virios. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 10, 77-123.
- Kelly, M.T., Stroh, E.M., 1989. Urease-positive, Kanagawa-negative *Vibrio parahaemolyticus* from patients and the environment in the Pacific Northwest. *J. Clin. Microbiol.* 27, 2820-2822.
- McKellar, R.C., Lu, X. and Knight, K.P., 2001. Proposal of a novel parameter to describe the influence of pH on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiology*, 73, 2-3, 11, 127-135.
- Miles, D.W., 1994. Predicting the growth of *Vibrio parahaemolyticus*. B.Sc. (Hons) Thesis, University of Tasmania.
- Miles, D.W., Thomas Ross, June Olley and Thomas A. McMeekin. 1997. Development and evaluation of a predictive model for the effect of temperature and water activity on the growth rate of *Vibrio parahaemolyticus*, *Int J. Food Microbiology*. 38, Issues 2-3, 133-142.
- Nishibuchi, M., Ishibashi, M, Takeda, T. and Kaper, J.B., 1985. Detection of the thermostable direct hemolysin gene and related DNA sequences in *Vibrio parahaemolyticus* and other *Vibrio* species by the DNA colony hybridization test. *Infect.*

Immun. 49, 481-486.

- Notermans, S., Gallhoff, G., Zwietering, M.H and Mead, G.C., 1995. The HACCP concept: specification of criteria using quantitative risk assesment. *Food Microbiology*, 12, 81-90.
- Okuda, J., Ishibashi, M., Hayakawa, E., Nishino, T., Takeda, Y., Mukhopadhyay, A.k., Garg, S., Bhattacharya, S.K., Nair, G., Nishibuchi, M., 1997. Emergence of a unique O3;K6 clone of in calcutta, India, and isolation of strains from the same clonal group from Southeast Asin travelers arriving in japan. *J. Clin. Microbiol.* 35, 3150-3155.
- Potasman, I., Paz, A. and Majed, O., 2002. Infectious outbreaks associated with bivalve shelfish consumption: a worldwide perspective. *Clin. Infect. Dis.* 35, 921-928.
- Presser, K. A, Ratkowsky, D. A., Ross, T., 1997. Modelling the growth rate of *Escherichia coli* as a funrion of pH and lactic acid concentration. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2335-2360.
- Ratkowsky, D.A., Ross, T., 1995. Modelling the bacterial growth/no growth interface. *Lett. Appl. Microbial.* 20, 29-33.
- Ratkowsky, D.A., Lowry, R.K., Mcmeekin, T.A., Stokes, A.N. and Chandler, R.E., 1983. Model for bacterial culture growth rate throught the entire biokinetic temperature range, *J. Bacteriology*, 154, June, 1222-1226.
- T. Ross, T. and McMeekin T.A., 1994. Predictive microbiology, *Int. J. Food Microbiology*, Volume 23, Issues 3-4, November, Pages 241-264
- SPSS Inc., 2000. SPSS base 10.0 for window, SPSS Inc., 444N. Michigan Avenue, Chicago, IL, 60611.
- Sumner, J and Ross, T., 2002. A semi-quantitative seafood safety risk assessment, *Int. J. Food Microbiology*, Volume 77, Issues 1-2, 25 July, Pages 55-59
- Whiting, R.C. and Bagi, L.K., 2002. Modeling the lag phase of *Listeria monocytogenes*, *Int. J. Food Microbiology*, Volume 73, Issues 2-3, 11, March, 291-295.
- Wong, H.C., Ting, S.H., Shieh, W.R., 1992. Incidence of toxigenic vibrios in foods available in Taiwan. *J. Appl. Bacteriol.* 73, 197-202
- Wong, H.C., Chen, L.L, Yu, C.M., 1995. Occurrence of vibrio in frozen seafoods and survival of psychrotrophic *Vibrio cholerae* in broth and shrimp homogenate at low temperature. *J. Food Prot.* 58, 263-267
- Yano, Nobuhiro. 1998. Predictive Microbiology and Its Application in Food Industry. *Jpn. J. Food microbiology*, 15(2), 81-87.
- Zwietering, M.H., de Koos, J.T., Hasenack, B.E., de Wit, J.C., van 'T Riet, K., 1991. Modeling of bacterial growth as a function of temperature. *Appl. Environ. Milcobiol.* 57, 1094-1101

Zwietering, M.H., Cuppers, H.G.A.H., de Wit, J.C., van 'T Riet, K., 1994. Evaluation of data transformations and validation of a model for the effect of temperature on bacterial growth. *Appl. Environ. Milcobiol.* 60, 195-203.

2. *Listeria monocytogenes* 의 성장 예측 모델

가. 서론

*Listeria monocytogenes*는 식중독 세균 중에서 다양한 식품에서 문제시 되고 있으며, 냉장, 냉동 같은 극한의 여건에서도 생육이 가능하며 면역력이 저하된 사람들에게 패혈증, 수막염 및 유산 등의 리스테리아 감염증(listeriosis)이나 설사, 복통, 발열, 두통 등을 일으키는 중요한 병원성 세균이다 (Faber and Peterkin, 1991). listeriosis의 발생과 연관이 있는 식품으로는 우유, 치즈, 야채, 샐러드, 육가공품 등이 있으며, 익히지 않고 섭취하는 수산물이나 저온 훈제 연어 같은 수산 가공 식품에서도 그 위해성이 주목되고 있다 (Ross 등, 2000).

식품의 위생학적 안전성 확보를 위한 유효수단으로서 HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) 시스템의 개념이 전 세계적으로 도입되고 있으며(Walls 1997), 이와 더불어 예측 미생물학은 인간이 식품에 존재하는 병원성 미생물에 대해 어느 정도의 위험에 노출되었는가를 평가하기 위한 획기적인 방법의 일환으로 부각되고 있다 (Ross 등, 2000). 이러한 식품중의 미생물의 성장변화를 수학적 모델을 이용하여 예측하고자 하는 예측 미생물학의 연구는 영국, 미국, 일부 유럽에서 활발히 진행 되고 있으며 (McMeekin 등, 1993), 미생물의 성장을 위한 예측 모델의 종속 변수로 온도와 수분활성, pH 등이 대표적으로 포함되어 왔다.

Listeria monocytogenes 의 모델의 경우 온도, 수분활성, pH, 유기산, NaNO_2 , CO_2 농도 등이 균의 생육에 미치는 영향에 대해서 보고한 바 있다. (Nerbrink 등, 1999; Razavilar and Genigeorgis, 1998; Lebert 등, 1998; Fernandez 등, 1997; McClure 등, 1997; Farber 등, 1996; George 등, 1996; Murphy 등, 1996; Farber 등, 1995; Duffy 등, 1994; Duh and Schaffer, 1993; Grau and Vanderlinde, 1993; Patterson 등, 1993; Buchanan and Philips, 1990). 하지만 대부분 일반 배지에서 의 성장이나 육류를 대상으로한 결과들이며, 최근에 들어 일부 포장 연어나, 대구의 가공 식품에 대한 연구가 이루어져 있다 (Dalgaard, 1997; 2002). 반면에, 우리나라에서는 기초적인 예측 미생물학 분야의 연구도 이루어지지 않고 있는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 식품유래 병원성 미생물인 *L. monocytogenes* 대하여 현재 국내 상당한 수요를 차지하는 수산 가공식품인 게맛살에서의 *L. monocytogenes*의 위해도 평가를 위한 기초 연구 자료로 활용하고자 실험에 임하였다.

나. 재료 및 방법

(1) 공시 균주

(가) 공시 균주

본 실험에 사용한 균주는 *Listeria monocytogenes* ATCC 19113으로 한국생명공학연구원 유전자은행 (KCTC)로부터 분양 받아 brain heart infusion broth (BHI, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)에 전배양 하여 1ml의 vial tube에 15%의 glycerol를 첨가하여 -80℃에 동결보관하면서, 실험전 MIC broth(Modified Imitation Crab broth, MIC broth; 10g Peptone, 10g Yeast extract, 10g Dextrose, 10g Sodium chloride, 10g Disodium phosphate / ℓ)에 37℃에서 24시간 전배양하여 사용하였다.

(나) 공시 균주의 배양

공시균주의 배양은 향후, 균의 성장 모델을 포장연제품인 게맛살에 적용하기 위해 게맛살 성분과 유사한 배지 (MIC broth)를 사용하였다.

균의 성장에 미치는 온도, pH 및 초기 균수 등 환경인자의 영향을 알아보기 위하여 동결 보존 하던 균주를 45℃ water bath에서 급속 해동한 후, 미리 준비한 멸균 MIC broth 50ml에 접종하고 37℃ incubator (Sanyo, Japan)에서 24시간 전배양 하였다. 전배양 한 균주를 18ml의 멸균 생리 식염수(0.85% NaCl)를 이용해 10배씩 희석하여 200ml의 MIC broth에 초기 균수가 10^2 , 10^3 , 10^4 CFU/ml가 되도록 접종하고 온도 15, 20, 25, 37, 40℃, pH 7에서 각각 배양하였다.

(다) 균의 성장 측정

각 실험구별 시간의 경과에 따른 균의 성장은 일정시간 간격으로 Plate count agar (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)를 사용하여 표준 평판 배양법(AOAC, 2000)으로 생균수를 측정하여 나타내었다.

(2) Gompertz model의 적용

균의 sigmoid 한 형태의 성장을 표현하기 위해 사용하는 연속함수의 식은 지금까지 여러 가지의 형태로 보고하고 있으나 그 중에서 특히 Gompertz model에 관한 연구가 가장 많으며 영국과 미국에서 각각 개발된 Food micromodel (FMM) and Pathogen Modeling program (PMP)경우에도 Gompertz model을 사용하고 있다.

$$\text{Log}(Nt) = A + C \cdot \exp(-\exp(-B(t - M)))$$

t : 배양시간(hr)

N(t) : 배양시간에 따른 균수(CFU/ml)

A : 초기 균수의 log값(CFU/ml)

C : 균수 증가량의 log값(초기 균수와 최대 균수의 차, CFU/ml)

M : 발육속도가 최대가 되는 시점의 시간

B : 시간 M에서의 발육 속도(최대 발육 속도)

일반적으로 각 각의 배양 곡선에서 12-16개의 생균수값을 얻었으며, 15반복을 통한 실험 결과를 Gompertz model 에 대입하여 균의 생육지표치인 최대 증식속도 상수($k = BC/e$)를 구하였다.

(3) 환경 요인의 영향

균의 증식을 대표하는 균의 생육 지표로써, 최대증식속도 상수(k)와 유도기(LT), 세대시간(GT)을 실험을 통한 Gompertz 모델에 의하여 도출하였으며, 최대증식속도 상수(k)에 미치는 초기 균수, 온도의 영향을 각 각 One-way ANOVA-test를 실시하여 Duncan's multiple range test (Duncan, 1955)로 처리 평균간의 유의성 ($P < 0.05$)을 SPSS (SPSS Inc., 2000) program (Ver. 10.0)으로 검정하였다. 또한 이들의 복합적인 관계를 square root model과 polynomial model 로 정량화 하였다.

(4) Parameter들의 결정과 모델의 평가

각 환경 조건 온도 15, 20, 25, 37, 40°C와 초기 균수 10^2 , 10^3 , 10^4 CFU/ml 조건에서 Gompertz model로부터 구한 최대증식속도 상수(k)와 환경 조건과의 관계를 규명하기 위하여 Square root model, Polynomial model에 각 각 적용하여 SPSS (SPSS Inc., 2000) program (Ver. 10.0)를 이용하여 각 식의 parameter를 결정하고 Sigma Plot (SPSS Inc., version 7.0)로 도식화 하였으며, 각 배양 조건을 대입하여 실제 실험으로부터 구한 최대증식속도 상수(k)와 모델식으로부터 구한 최대증식속도 상수(k)와의 상관관계를 비교하였다.

(5) *L. monocytogenes*의 성장 예측

MIC broth 상에서의 *L. monocytogenes*의 최대증식속도 상수(k)의 온도와 초기 균수에 따른 정

량 평가 모델을 Square root model, Polynomial model을 이용하여 정량화 하였으며, 정량 평가 모델에 의해 예측된 최대증식속도 상수(k)를 이용해 Gompertz 모델에 의한 균의 예측성장을 나타내었다.

다. 결과 및 고찰

(1) *Listeria monocytogenes*의 성장 예측 모델의 개발

(가) 환경 조건에 따른 균의 생육 지표치의 변화

각 환경 요인에 따른 균의 증식을 예측하기 위하여 균의 증식을 대표하는 생육지표로써, 최대증식속도 상수(k), 유도기(LT), 세대시간(GT)를 Gompertz 모델로부터 구하였다.

$$\text{Log}N = A + C \times \exp[-\exp\{-B \times (t - M)\}]$$

$$k = BC/e$$

$$GT \text{ (hr)} = (\log 2) e / BC$$

$$LT = M - (1/B)$$

① 최대증식속도상수(k)에 미치는 환경요인의 영향

균의 최대증식속도상수(k)에 미치는 환경 요인의 영향을 알아보기 위하여 *L. monocytogenes*의 초기 균수를 다르게 하여 서로 다른 온도에서 배양하였으며, 그 결과를 Table 1과 Fig. 1 에 나타내었다. 최대증식속도상수(k)에 미치는 온도의 영향은 온도가 높아질수록 값이 증가하여, 37°C에서 가장 높은 값을 나타내었으며 40°C에서는 감소하였다. 초기 균수에 따른 최대증식속도상수(k)의 변화에서는 유의적인 차이는 없었다. (P>0.05).

② 유도기(LT)에 미치는 환경요인의 영향

Augustin 등 (2000b)은 균의 증식에 있어서 유도기(LT)에 미치는 영향은 초기 접종균이 배양되었던 온도에 영향을 받는다고 보고한 바 있으며, 전배양을 하는 온도가 높을수록 *Listeria monocytogenes* 유도기(LT)가 짧아진다고 하였으며, 이 관계를 모델식화하였다. 본 연구에서는 균의 유도기(LT)에 미치는 환경 요인의 영향을 알아보기 위하여 각기 다른 초기 균수와 온도에서 *L. monocytogenes*를 배양하여, Gompertz model로부터 균의 유도기(LT)를 구하였으며 그 결과를 Table 2와 Fig. 2에 나타내었다. 그 결과, 20°C 실험구를 제외한 온도 실험구에서 초기균수에 따른 유도기(LT)는 유의적인 차이가 없었으며,

온도에 따른 유도기(LT)는 온도가 높아질수록 유도기(LT)는 감소하지만 온도 40℃에서는 37℃ 보다 긴 유도기(LT)를 나타내었다.

Table 1. Effects of temperature and initial cell number on maximum specific growth rate (k) of *L. monocytogenes*¹

Initial level (Log CFU/ml)	Maximum specific growth rate (k , hr ⁻¹)				
	15℃	20℃	25℃	37℃	40℃
2	0.16±0.024	0.25±0.037	0.39±0.021	0.69±0.97	0.56±0.05
3	0.15±0.012	0.25±0.014	0.35±0.047	0.64±0.06	0.57±0.08
4	0.17±0.018	0.22±0.029	0.40±0.050	0.63±0.07	0.54±0.05

¹Values (mean±s.d. of 15 times replication) in same column not sharing a common superscript are significantly different ($P<0.05$).

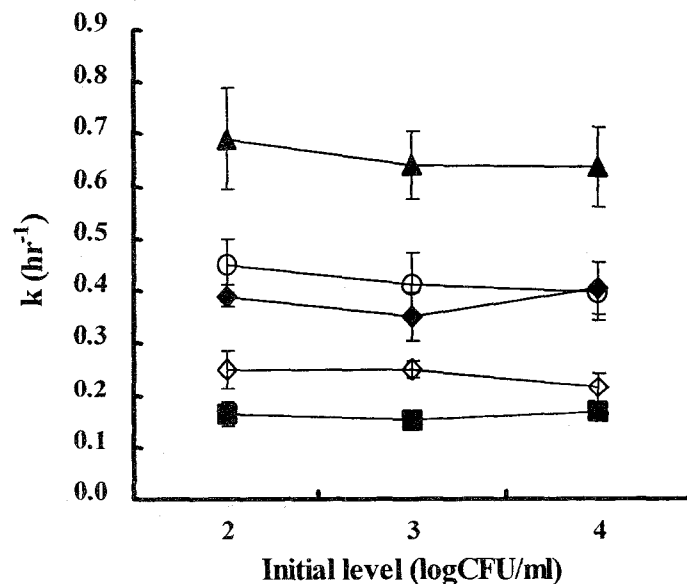


Fig. 1. Effects of temperature and initial cell number on maximum specific growth rate (k) of *L. monocytogenes* (■, 15℃;◇, 20℃;◆, 25℃;▲, 37℃;○, 40℃). Error bars indicate standard deviations ($n=15$).

Table 2. Effects of temperature and initial cell number on lag time (LT) of *L. monocytogenes*¹

Initial level (Log CFU/ml)	Temperature (°C)				
	15°C	20°C	25°C	37°C	40°C
2	10.44±1.73	7.30±0.71 ^a	3.78±0.41	2.23±1.28	2.44±0.20
3	11.37±0.69	7.12±0.87 ^{ab}	3.51±1.24	2.23±0.37	2.78±0.39
4	10.40±0.72	5.69±1.49 ^b	3.44±0.72	2.09±0.33	2.66±0.55

¹Values (mean±s.d. of 15 times replication) in same column not sharing a common superscript are significantly different (P<0.05).

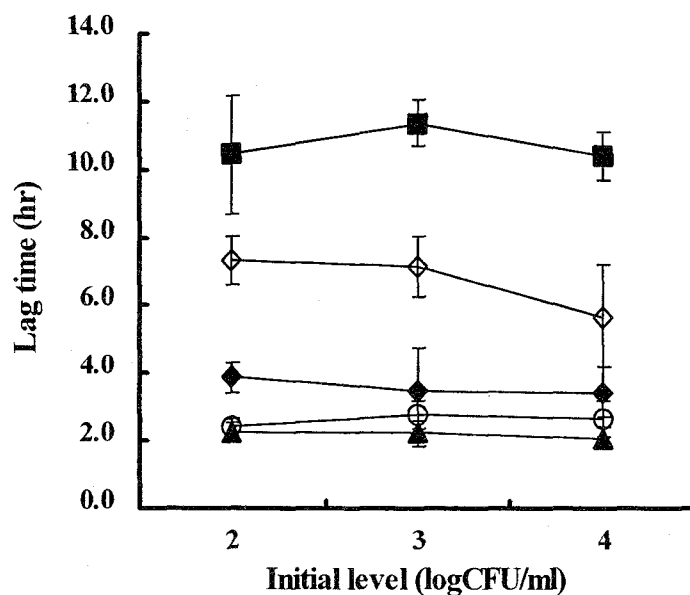


Fig. 2. Effects of temperature and initial cell number on lag time (LT) of *L. monocytogenes* (■, 15°C;◇, 20°C;◆, 25°C;▲, 37°C;○, 40°C). Error bars indicate standard deviations (n=15).

③ 세대시간(GT)에 미치는 환경요인의 영향

균의 세대시간(GT)에 미치는 환경 요인의 영향을 알아보기 위하여 각기 다른 초기 균수와 온도에서 *L. monocytogenes* 배양하여, Gompertz model로부터 균의 세대시간(GT)을 구하였으며 그 결과를 Table 3과 Fig. 3에 나타내었다.

(나) 환경 조건이 최대증식속도상수(k)에 미치는 영향의 2차 모델에 의한 정량화

① 온도의 변화에 따른 최대증식속도상수(k)의 정량평가모델

각 환경 조건인 초기 균수와 온도에 따른 최대증식속도상수(k)의 변화를 관찰하였다. 초기 균수에 따른 최대증식속도상수(k)의 유의적인 차이는 없었으며 ($P>0.05$), 따라서 초기균수 향이 없는 온도와 최대증식속도상수(k)간의 상호작용을 표현하는 변화는 2차 모델인 평방근 모델을 사용하여 $\sqrt{k} = b (T - T_{min}) [1 - \exp(c(T - T_{max}))]$ 형태로 정량화 하였다. 한편, 초기 균수를 고려할 경우, Sigmaplot 7.0(SPSS institute)의 Gauss-Newton 알고리즘을 사용한 비선형 회귀분석을 통하여 $f = a \cdot \exp(-0.5(((T-T_{max})/b)^2 + ((A_0-A_{0max})/c)^2))$ 형태의 다항식으로 나타내었으며, 각 각의 parameter 와 통계적 분석치를 Table 4에 나타내었다.

환경요인과 최대증식속도상수(k)에 관한 모델들 중 가장 적합한 모델은 Square root model 이라고 보고한 바 있으며(Zwietering 등, 1990; Ratkowsky 등, 1991, 1996; Schaffner,1994), Alber and Schaffner (1992), Ratkowsky 등 (1996), Delignette-Muller (1998) 은 (1996) 세대시간(GT)과 유도기 시간(LT), LT/GT의 관계는 log 형태로 표현하는 것이 가장 적합하다고 보고하였다.

본 연구에서는 최대증식속도상수(k)와 환경요인간의 관계를 평방근모델과 다항식 모델을 사용하여 나타낸 결과, 상관관계가 각각 0.95, 0.92로 평방근모델이 좀 더 나은 적용성을 나타내었다.

② 다항식을 이용한 최대증식속도상수(k)의 실험치와 예측치의 비교

L. monocytogenes 의 실험을 통하여 구한 최대증식속도상수(k)와 평방근모델과 다항식 모델에 의해 예측된 최대증식속도상수(k)를 비교한 결과를 Fig. 4와 5에 나타내었다.

평방근모델과 다항식모델에 의한 예측치는 실험치와 근사값을 나타내고 있으며, 평방근모델에 의한 예측치가 다항식모델의 예측치에 비하여 실험치와 다소 높은 상관관계를 가지고 있는 것을 알 수 있었다.

③ 2차 모델식과 Gompertz 모델에 의한 균의 성장

Table 4의 최대증식속도상수(k)에 미치는 온도와 pH의 영향을 모델화한 정량평가 모델식으로 서로 다른 초기 균수, 온도, pH 조건에서 균의 최대증식속도상수(k)를 예측할 수 있었다.

Table 3. Effects of temperature and initial cell number on generation time (GT) of *L. monocytogenes*¹

Initial level (Log CFU/ml)	Temperature (°C)				
	15°C	20°C	25°C	37°C	40°C
2	2.12±0.32	0.91±0.45	0.81±0.12	0.66±0.05	0.67±0.03 ^{ab}
3	2.03±0.19	1.09±0.12	0.89±0.18	0.64±0.07	0.68±0.01 ^b
4	1.93±0.36	1.26±0.21	0.76±0.06	0.66±0.05	0.64±0.01 ^a

¹Values (mean±s.d. of 15 times replication) in same column not sharing a common superscript are significantly different ($P<0.05$).

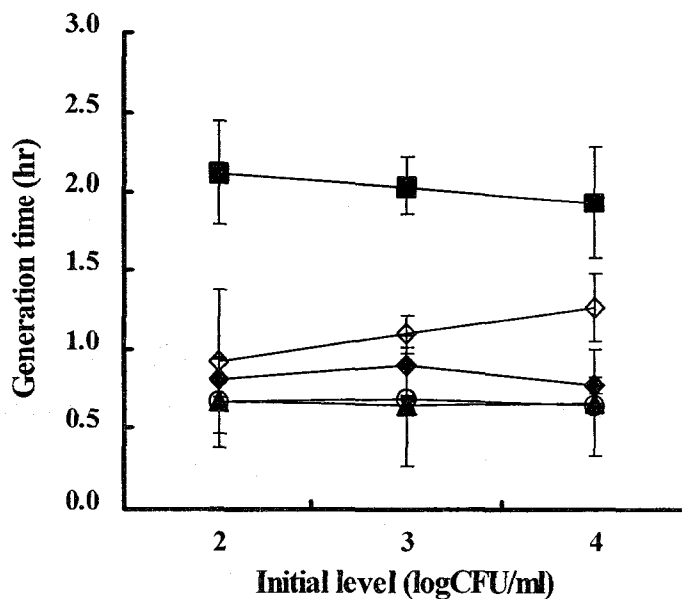


Fig. 3. Effects of temperature and initial cell number on generation time (GT) of *L. monocytogenes* (■, 15°C;◇, 20°C;◆, 25°C;▲, 37°C;○, 40°C). Error bars indicate standard deviations (n=15).

Table 4. Parameters of Square root model and Polynomial model for prediction of maximum specific growth rate (k) of *L. monocytogenes*

		Statistical analysis					
		Coefficient	S. E	t-value	P	S. E. of estimate	R ²
Square root model	T _{min}	-3.4170	1.5597	-2.1909	0.0317	0.0369	0.95
	T _{max}	44.5128	1.1393	39.0689	<0.0001		
	b	0.0215	0.0014	15.0434	<0.0001		
	c	0.3600	0.1110	3.2448	0.0018		
Polynomial model	T _{max}	36.0549	0.7489	48.143	<0.0001	0.0575	0.92
	A _{0max}	-8.11943	10.0187	-0.0262	0.9792		
	a	0.7103	2.6224	0.2708	0.7873		
	b	11.8487	0.7107	16.6726	<0.0001		
	c	21.5899	4.7555	0.0708	0.9437		

A₀, initial cell level (Log CFU/ml)

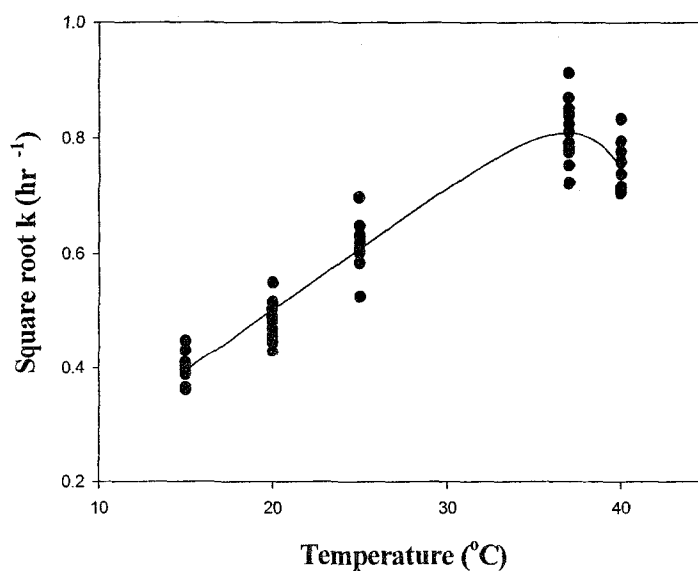


Fig. 4. Comparison of experimental \sqrt{k} and predictive \sqrt{k} by Square root equation of *L. monocytogenes* at different culture condition (●, Experimental \sqrt{k} ; —, Predictive \sqrt{k}).

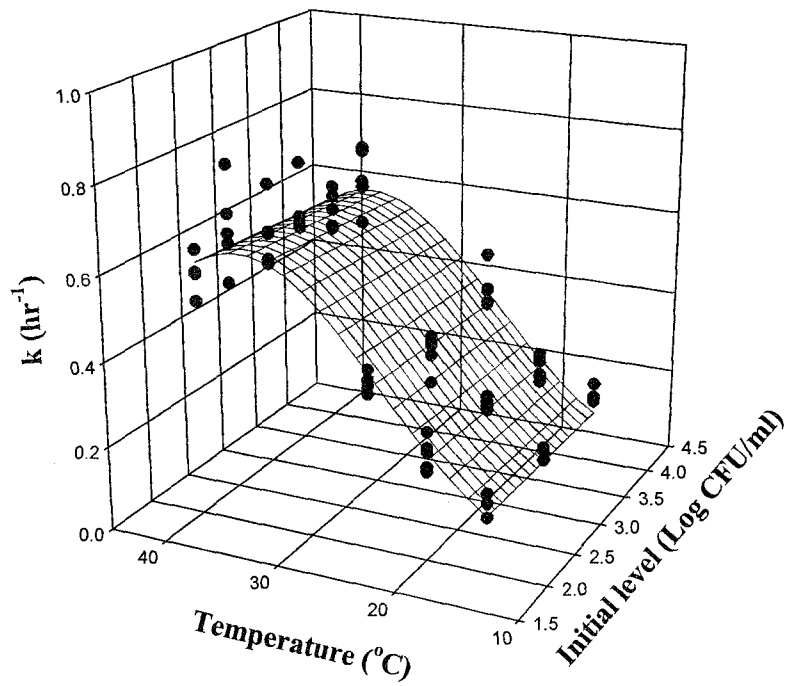


Fig. 5. Comparison of experimental k and predictive k by Polynomial equation of *L. monocytogenes* at different culture condition (\bullet , Experimental k ; \boxtimes , Predictive k).

이를 바탕으로 균의 성장 곡선을 표현하는 Gompertz식에 적용함으로써, 각 조건에서 Gompertz 식에 의한 균의 성장이 예측 가능하게 되었다. 초기 균수 1.0×10^2 , 온도 25℃에서의 반복실험을 통한 성장곡선과 평방근모델에 의한 예측 성장 곡선을 Fig. 6에 나타내었다.

실험치와 예측치는 잘 일치하고 있으며, 이러한 최대증식속도상수(k)에 관한 정량적인 모델은 *L. monocytogenes*의 환경 요인에 대한 성장을 손쉽게 모니터링 할 수 있으며, 수분활성이나 좀더 넓은 pH 범위, 여러 첨가물의 농도, 포장시 충전하는 N₂ 또는 CO₂ 농도나 이러한 조건들 간의 상호 작용 같은 물리 화학적인 요인에 관한 추가적인 연구가 계속되어질 경우, 보다 완벽하게 균의 성장을 예측할 수 있을 것으로 기대된다.

라. 결론

이상의 결과로, 본 실험에서 설정한 환경 요인 중, 각 초기 균수에 따른 *L. monocytogenes*의 최대증식속도상수(k), 유도기(LT), 세대시간(GT)의 유의적인 차이는 없는 것으로 밝혀졌으며, 온도가 지배적인 영향을 미치는 것으로 나타났다. 균의 증식 지표인 속도상수와 온도의 관계를 Square root model과 초기균수의 항을 포함한 Polynomial model로 각 각정량화 하였으며, 다음과 같이 나타내었다.

$$\text{Square root model: } \sqrt{k} = 0.0215 (T + 3.417) (1 - \exp(0.3600(T - 44.5128)))$$

$$\text{Polynomial model: } k = 0.7103 \cdot \exp(-0.5(((T-36.0549)/b)^2 + ((A_0+8.1194)/21.5899)^2))$$

위 두 가지 형태의 정량평가식의 상관관계는 각각 0.95와 0.92로 Square root model이 좀더 나은 적용성을 보여주었으며, Square root model을 사용하여 각 온도 조건에서 Gompertz model을 이용한 균의 증식을 예측 할 수 있었다.

*L. monocytogenes*는 listeriosis를 일으키는 중요한 식중독 세균으로 이에 대해서는 기본적인 많은 연구가 되어있으며, pH, NaCl, organic acid, 등 다양한 환경요인에 대한 다양한 종류의 예측 모델이 발표된바 있다 (Augustin, 2000b). 하지만 Surimi를 기본으로 하는 어육 연제품의 수요가 많은 우리나라의 식생활 특성과 여건에 맞는 모델은 나와 있지 않으며, 게맛살 성분 배지에서의 *L. monocytogenes* 성장 모델인 이를 바탕으로 실제 게맛살에 대한 HACCP system 중 위해 분석에 있어서 식중독을 유발하는 *L. monocytogenes*에 대한 정량적인 위해도 평가가 가능할 것으로 기대된다.

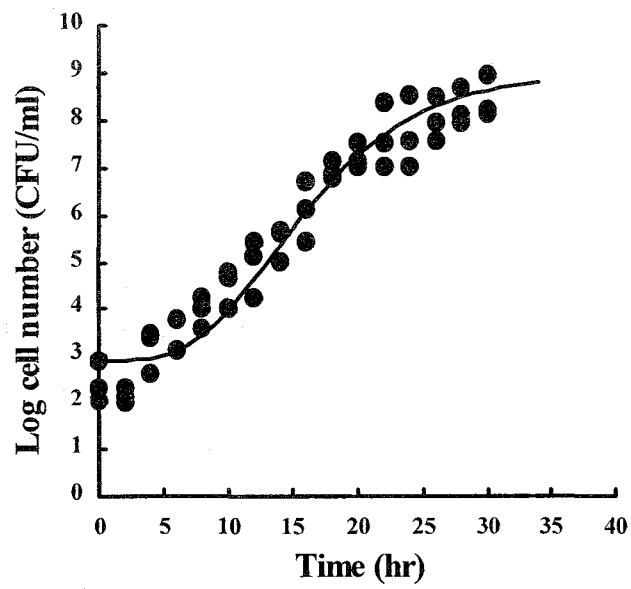


Fig. 6. Predictive growth curves of *L. monocytogenes* by predictive model (Initial cell number, 10^2 CFU/ml; Temperature, 25°C). ●, Experimental data; —, Growth curve by Square root model.

마. 참고 문헌

- AOAC, 2000. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists Internal. 16th edition. volume 1.
- Alber, S.A., Schaffner, D.W., 1992. Evaluation of data transformations used with square root and Schoolfield models for predicting bacterial growth rate. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3337-3342.
- Augustin, Jean-Christophe and Vincent Carlier., 2000a. Modelling the growth rate of *Listeria monocytogenes* with a multiplicative type model including interactions between environmental factors. *Int. J. Food Microbiology.* 56, 53-70.
- Augustin J.C., Rosso L. and Carlier V., 2000b, A model describing the effect of temperature history on lag time for *Listeria monocytogenes*, *Int. J. Food Microbiology*, Volume 57, Issue 3, 169-181
- Baker, D.A., 1995, Application of modelling in HACCP plan development. *Int. J. Food Microbiology*, 25, 251-261.
- Baranyi J., Ross T., McMeekin T. A. and Roberts T. A., 1996, Effects of parameterization on the performance of empirical models used in 'predictive microbiology', *Food Microbiology*, Volume 13, Issue 1, February , Pages 83-91
- Bolton. L.F., Frank, J.F., 1999. Defining the growth/no growth interface for *Listeria monocytogenes* in Mexican-style cheeses based on salt, pH, and moisture content. *J. Food Prot.* 62. 601-609
- Buchanan, R. L. and Phillips, J. G. (1990) Response surface model for predicting the effects of temperature, pH, sodium chloride content, sodium nitrite concentration and atmosphere on the growth of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 53, 370-376 .
- Carr, J.G., Norris. J.R., Pettipher. G. L., Wiley. J., 1897, *Essays in Agricultural and Food Microbiology*. London, 291-307.
- Dalgaard, P., Ole Mejlholm and Hans Henrik Huss. 1997, Application of an iterative approach for development of a microbial model predicting the shelf-life of packed fish, *International Journal of Food Microbiology*, Volume 38, Issues 2-3, 16 September, Pages 169-179
- Dalgaard, P., Buch, P., Silberg, S., 2002. Seafood spoilage predictor-development and distribution of a product specific application software. *Int. J. of Food Microbiology*, 73, 343-349.
- Delignette-Muller, M.L., 1998. Relation between the generation time and the lag time of bacterial growth kinetics. *Int. J. Food Microbiol.* 43, 97-104.

- Duh, Y. H. and Schaffer, D.W., 1993. Modeling the effect of temperature on the growth rate and lag time of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot. 56, 205-210.
- Dunacn, D.B., 1955. Multiple-range and multiple F test. Biometrics, 11, 1-42
- Faber, J.M., Peterkin, P.I., 1991. *Listeria monocytogenes* a foodborne pathogen. Microbil. Rev. 55, 476-511.
- Farber, J.M., Cai, Y. and Ross, W.H. (1996) Predictive modeling of the growth of *Listeria monocytogenes* in CO₂ environments. Int. J. Food Microbiol. 32, 133-144.
- Fernandez, P. S., George, S.M., Sills, C. C. and Peck, M.W. (1997) Predictive model of the effect of CO₂, pH, temperature and NaCl on the growth of *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol. 37, 73-85.
- George, S. M., Richardson, L. C. C. and Peck, M.W., 1996. Predictive models of the effect of temperature, pH and acetic and lactic acids on the growth of *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol. 32, 73-90.
- Grau, F. H. and Vanderlinde, P. B., 1993. Aerobic growth of *Listeria monocytogenes* on beef lean and fatty tissue: equations describing the effects of temperature and pH. J. Food Prot. 56, 96-101.
- Lebert, I., Begot, C. and Lebert, A., 1998. Development of two *Listeria monocytogenes* growth models in a meat broth and their application to beef meat. Food Microbiol. 15, 499-509.
- Larpin, S., Sauvageot, N., Pichereau, V., Laplace, J.M. and Auffray, Y., 2002, Biosynthesis of exopolysaccharide by a *Bacillus licheniformis* strain isolated from rony cider, Int. J. Food Microbiology, 77, 1-9.
- McClure, P. J., Beaumont, A. L., Sutherland, J. P. and Roberts, T. A. (1997) Predictive modelling of growth of *Listeria monocytogenes*. The effects on growth of NaCl, pH, storage temperature and NaNO₂. Int. J. Food Microbiol. 34, 221-232.
- McKellar, R.C., Lu, X. and Knight, K.P., 2001, Proposal of a novel parameter to describe the influence of pH on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiology, 73, 2-3, 11, 127-135
- Miles, D.W., Thomas Ross, June Olley and Thomas A. McMeekin. 1997. Development and evaluation of a predictive model for the effect of temperature and water activity on the growth rate of *Vibrio parahaemolyticus*, Int J. Food Microbiology. 38, Issues 2-3, 133-142
- Murphy, P. M., Rea, M. C. and Harrington, D., 1996. Development of a predictive model for growth of *Listeria monocytogenes* in a skim milk medium and validation studies in a range of dairy products. J. Appl. Bacteriol. 80, 557-564.
- Nerbrink, E., Borch, E., Blom, H. and Nesbakken, T., 1999. A model based on absorbance data on

- the growth of *Listeria monocytogenes* and including the effects of pH, NaCl, Na-lactate and Na-acetate. *Int. J. Food Microbiol.* 47, 99-109.
- Notermans, S., Gallhoff, G., Zwitering, M.H and Mead, G.C., 1995, The HACCP concept: specification of criteria using quantitative risk assessment. *Food Microbiology*, 12, 81-90.
- Patterson, M. F., Damoglou, A. P. and Buick, R. K., 1993. Effects of irradiation dose and storage temperature on the growth of *Listeria monocytogenes* on poultry meat. *Food Microbiol.* 10, 197-203.
- Presser, K. A, Ratkowsky, D. A., Ross, T., 1997. Modelling the growth rate of *Escherichia coli* as a function of pH and lactic acid concentration. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2335-2360.
- Ratkowsky, D.A., Ross, T., McMeekin, T.A., Olley, J., 1991. Comparison of Arrhenius-type and Bełhradek-type models for prediction of bacterial growth in foods. *J. Appl. Bacteriol.* 71, 452-459.
- Ratkowsky, D.A., Ross, T., 1995. Modelling the bacterial growth/no growth interface. *Lett. Appl. Microbiol.* 20, 29-33.
- Ratkowsky, D.A., Ross, T., Macario, N., Dommett, T.W., Kamperman, L., 1996. Choosing probability distributions for modelling generation time variability. *J. Appl. Bacteriol.* 80, 131-137.
- Ratkowsky, D.A., Lowry, R.K., Mcmeekin, T.A., Stokes, A.N. and Chandler, R.E., 1983, Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range, *J. Bacteriology*, 154, June, 1222-1226.
- Razavilar, V. and Genigeorgis, C., 1998. Prediction of *Listeria* spp. growth as affected by various levels of chemicals, pH, temperature and storage time in a model broth. *Int. J. Food Microbiol.* 40, 149-157.
- Ross T., Dalgaard P. and Tienungoon S., 2000. Predictive modelling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products, *Int. J. Food Microbiology*, Volume 62, Issue 3, 20 December, 231-245.
- SPSS Inc., 2000. SPSS base 10.0 for window, SPSS Inc., 444N. Michigan Avenue, Chicago, IL, 60611.
- Walls, I. and Scott, V.N., 1997. Use of predictive microbiology in microbial food safety risk assessment, *Int. J. Food Microbiology*, 36, 97-102.
- Whiting, R.C. and Bagi, L.K., 2002, Modeling the lag phase of *Listeria monocytogenes*, *Int. J. Food Microbiology*, Volume 73, Issues 2-3, 11, March, 291-295.

- Yano, Nobuhiro. 1998. Predictive Microbiology and Its Application in Food Industry. *Jpn. J. Food microbiology*, 15(2), 81-87.
- Zwietering, M.H., de Koos, J.T., Hasenack, B.E., de Wit, J.C., van 'T Riet, K., 1991. Modeling of bacterial growth as a function of temperature. *Appl. Environ. Milcobiol.* 57, 1094-1101.
- Zwietering, M.H., Cuppers, H.G.A.H., de Wit, J.C., van 'T Riet, K., 1994. Evaluation of data transformations and validation of a model for the effect of temperature on bacterial growth. *Appl. Environ. Milcobiol.* 60, 195-203.

3. 포장 연제품 관련 부패 세균의 성장 예측 모델

가. 서론

오늘날과 같이 다양화, 대중화된 사회에서 식품의 미생물학적 안전성은 발달된 사회임을 대변하는 중요한 척도이다. 식품의 위생학적 안전성의 확보를 위한 새로운 기술로서 수학적 정량평가 모델을 이용하여 미생물의 성장 변화를 예측하는 예측 미생물학이 최근 크게 대두되고 있다. 이것은 예측 미생물학이 식품의 위생학적 안전성 확보에 중요한 역할을 하고 있으며, 현재의 식품미생물학에 있어서 중요한 필수요소가 되었음을 시사하고 있는 것이다(Yanno, 1998).

경제 및 과학기술의 눈부신 발전에도 불구하고 식품중의 대표적인 병원 미생물에 의한 식중독 피해는 아직까지도 세계적으로 심각한 문제가 되고 있다. 현재, 전 세계의 식품산업은 그 생산 규모 면에 있어서 대형화되어 가는 추세에 있으며, 저장·유통 수단의 발달로 말미암아 생산지에서 소비지까지의 범위가 크게 확대되었다.

또한, 식량자원 및 가공식품 등이 경제원리에 의해 전 세계에 유통되고 있는 상황에서, 병원미생물에 의한 식품 오염의 기회 및 오염 미생물 증식 가능성이 크게 증대되고 있으며, 그 피해가 단 시간 내에 전 세계로 확대될 가능성이 있는 실정이다.

전 세계적으로 발생하고 있는 식중독 사건의 특징은 품질관리 시설을 갖춘 식품회사에서 생산된 가공제품을 통한 발병이란 점과 사회적으로 위생에 관한 의식 및 관리 수준이 비교적 강화되어 있는 미국과 선진 유럽국가에서 많이 발생하고 있으며, 그 규모 면에 있어도 점점 대형화 되어가고 있는 추세라는 점이다 (McMeekin 등, 1993).

이에 식품의 품질과 안전성에 관한 새로운 대책 기술의 필요성이 요구되었으며, 그러한 기술의 하나로 예측미생물학(Predictive microbiology)의 중요성이 대두되게 되었다. 최근 들어, 미국과 유럽을 중심으로 대단히 활발한 연구가 이루어지고 있는 예측미생물학은 지금까지의 상당한 시간과 인력 그리고 경비가 소요되는 미생물 접종시험·보존시험을 대체하여 식품의 원재료로부터 소비에 이르기까지의 전 과정 중에 병원미생물의 성장에 대하여 수학적 모델을 이용한 예측과 제어가 가능하기 때문에, 대상 식품중의 병원 미생물의 정량적 위험도 평가(Quantitative risk assessment)를 위한 저 비용의 유효수단으로 인정되고 있다 (Ross and McMeekin, 1994).

또한, 식품의 안전성을 확보하기 위해서는 지금까지의 일반적 위생관리 기준만으로는 부족하기 때문에 이를 보완하기 위한 국제적 기준으로서 HACCP 시스템이 도입되어 가장 유효한 종합적 위생관리 수단으로 인식되기 시작되었다.

예측미생물학은 식품의 안전성 문제에 있어 가장 중요하고도 큰 비중을 차지하는 위해미생물만을 대상으로 하여, 이들의 성장을 수학적 모델에 의해 정량적으로 예측하고 평가되기

때문에 비교적 단순하면서도 효율이 높으며 이러한 수학적 모델의 적용은 정성적 분석결과 및 경험치의 의존도가 높은 HACCP 시스템의 단점 보완과 발전에도 크게 기여하고 있다 (Baker, 1995; Notermans 등, 1995). 즉, 식품의 미생물에 의한 위해 평가(HA)가 가능하며, 중요관리점(CCP)을 수학적 모델을 이용하여 정량적으로 분석할 경우, 식품의 각 가공공정 조건을 정밀도가 높은 중요관리점(CCP)의 적절한 허용한도 이내에서 결정하고, 제어할 수 있다.

이러한 수학적 모델을 이용한 예측 미생물학의 발달은 최근 Personal Computer(PC)의 보급과 편리한 관련 software의 개발을 통하여 미생물에 관한 지식이 없는 일반 사용자들에게 있어서도, 각종 환경요인을 입력함으로써 식품 중의 각종 미생물의 성장 변화를 예측 할 수 있게 되었다.

예측 미생물학에 관한 연구는 병원균 및 부패균을 대상으로 1980년대 후반부터 급속도로 발전하였으며, 지역별로는 미국을 시작으로 영국, 네덜란드 등과 같은 유럽의 각 선진국과 호주 등지에서 정보화 시대에 대응하는 국제적인 흐름의 하나로 활발한 연구가 이루어지고 있다(Yanno, 1998). 이러한 연구의 성과로 미국 농무성(USDA)의 병원균 모델 프로그램인 Pathogen Modeling Program(PMP)과 영국 농어식량성 (MAFF)의 Food Micromodel이 실용화 되어있다. 아시아 국가 중에서는 일본이 유일하게 이 분야에 관한 연구를 최근에 들어 진행시키고는 있으나, 아직까지 실용화 프로그램은 개발되어 있지 않다. 한편, 미국과 유럽 그리고 일본과 같은 선진 국가들을 중심으로 식품의 안전성 확보와 자국 국민의 건강관리 그리고 관련 산업분야의 국제경쟁력 향상을 위한 수단으로 예측미생물학 분야에 대한 연구 및 투자를 강화하고 있는 국제정세에 비하여, 국내의 경우에는 그 필요성이 절실히 강조됨에도 불구하고 현재까지 예측미생물에 관한 연구보고는 전무한 실정이다. 우리나라도 미생물 정량평가모델의 개발과 식품산업 관련자가 이용하기 편리한 PC용 예측소프트웨어의 개발에 관한 연구의 필요성이 절실히 요구되고 있는 실정이다.

따라서 본 연구는 고차 수산가공식품인 포장연제품에서 부패균을 분리하고 그 성장을 수학적 모델을 통해 정량화함으로써 환경조건에 따른 게맛살의 부패균의 성장을 예측하여 유통 조건 별로 제품의 미생물적 변화를 모니터링하고 나아가 정확한 위험도 평가와 더불어 유통기한의 예측을 위한 기초 자료를 제공하고자 실험에 임하였다.

나. 재료 및 방법

(1) 부패 세균의 분리, 동정 및 성장

(가) 부패 세균의 분리

한성 수산식품(주)의 게맛살 제품을 25℃ incubator에서 5일간 방치한 후 균질화한 현탁액 100 μ l를 도말 평판법에 의해 BHI(Brain heart infusion, Difco. co. USA)agar plate 에 도말한 후, 37℃에서 24시간 배양하였다. 배양 후, 평판상에 나타난 colony를 외형적인 특징별로 counting 하고 검출 빈도가 높은 colony의 특징이 뚜렷한 두 종류의 colony를 순수 분리하여 게맛살의 주 부패 세균으로 정하였다. 분리한 부패 세균은 검출 비율에 따라 혼합 한 후, MIC 배지에 24시간 이상 배양하였다. 배양액은 15%의 glycerol을 첨가하여 2ml의 vial tube에 분주하고 -80℃에서 동결 보관하면서 실험에 사용하였다.

(나) 부패 세균의 배양학적 성상

① 형태학적 특성

분리 균주를 BHI broth에 접종하여 37℃에서 24시간 배양한 후, hanging drop method에 의해 현미경을 통해 운동성을 관찰하였고, Gram 염색을 통해 균의 형태 및 Gram 염색성을 관찰하였으며, malachite green 용액을 가하여 60초간 증탕한 후에 포자 형성의 유무를 관찰하였다.

② 생리, 생화학적 특성

㉠ Catalase 시험

분리 균주를 BHI agar 배지에 접종하여 37℃에서 24시간 배양한 후에 3%의 H₂O₂에 한 백금이의 균을 접종하여 가스 생성여부를 관찰 하였다.

㉡ Indole 생성

분리 균주를 1% tryptone nutrient broth 배지에 접종하여 32℃에서 이틀간 배양한 후, Kovac's 시약 5ml를 시험관 기벽을 따라 흘러내리게 하여 가볍게 흔들어 준 후 정치하여 색깔을 관찰하고 적색으로 변하면 양성으로 판정하였다.

㉢ 기타 생화학적 시험

ONPG, gelatin 액화성, V-P reaction, Arginine dihydrolase 생성 여부와 당의 이용에 관한 시험은 API kit(API 50CHB, Bio Merieux, France)를 이용하여 관찰하였다.

③ 부패 세균의 성장 측정

부패세균은 게맛살 성분과 유사하게 조제한 배지 MIC broth에서 37℃ 24시간 전배양한 후

성장에 미치는 초기 균수 및 온도와 같은 환경인자의 영향을 알아보기 위해 동결 보존하던 균주를 45°C water bath에서 급속 해동한 후, 미리 준비한 멸균 MIC broth 50ml에 접종하고 37°C incubator (Sanyo, Japan)에서 24시간 전배양 하였다. 전배양 한 균주를 18ml의 멸균 생리 식염수(0.85% NaCl)를 이용해 10배씩 희석하여 200ml의 MIC broth에 초기 균수가 10¹, 10², 10³CFU/ml가 되도록 접종한 후, 온도 15, 20, 25°C에서 배양하면서, 초기 균수 별로 시간의 경과에 따른 균의 성장을 일정시간 간격으로 Plate count agar (Diffco Laboratories, Detroit, MI, USA)를 사용하여 표준 평판 배양법(AOAC, 2000)으로 생균수를 측정하였다.

(2) Gompertz model의 적용

균의 sigmoid 한 형태의 성장을 표현하기 위해 사용하는 연속함수의 식은 지금까지 여러 가지의 형태로 보고하고 있으나 그 중에서 특히 Gompertz model에 관한 연구가 가장 많으며 영국과 미국에서 각각 개발된 Food micromodel (FMM) and Pathogen Modeling program (PMP)경우에도 Gompertz model을 사용하고 있다.

$$\text{Log}(Nt) = A + C \cdot \exp(-\exp(-B(t - M)))$$

t : 배양시간(hr)

N(t) : 배양시간에 따른 균수(CFU/ml)

A : 초기 균수의 log값(CFU/ml)

C : 균수 증가량의 log값(초기 균수와 최대 균수의 차, CFU/ml)

M : 발육속도가 최대가 되는 시점의 시간

B : 시간 M에서의 발육 속도(최대 발육 속도)

일반적으로 각 각의 배양 곡선에서 12-16개의 생균수값을 얻었으며, 15반복을 통한 실험 결과를 Gompertz model 에 대입하여 균의 생육지표치인 최대증식속도상수($k = BC/e$)를 구하였다.

(3) 환경 요인의 영향

균의 증식을 대표하는 균의 생육 지표로써, 최대증식속도상수(k)와 유도기(LT), 세대시간(GT)을 실험을 통한 Gompertz 모델에 의하여 도출하였으며. 최대 증식 속도 상수에 미치는 초기 균수, 온도의 영향을 각 각 One-way ANOVA-test를 실시하여 Duncan's multiple range test (Duncan, 1955)로 처리 평균간의 유의성 ($P < 0.05$)을 SPSS (SPSS Inc., 2000) program (Ver. 10.0)으

로 검정하였다. 또한 이들의 복합적인 관계를 Square root model과 Polynomial model 로 정량화 하였다.

(4) 배지상의 parameter들의 결정과 모델의 평가

각 환경 조건 온도 15, 20, 25℃와 초기 균수 10^2 , 10^3 , 10^4 CFU/ml 조건에서 Gompertz model로부터 구한 최대증식속도상수(k)와 환경 조건과의 관계를 규명하기 위하여 Square root model, Polynomial model에 각각 적용하여 SPSS (SPSS Inc., 2000) program (Ver. 10.0)을 이용하여 각 식의 parameter를 결정하고 Sigma Plot (SPSS Inc., version 7.0)로 도식화 하였으며, 각 배양 조건을 대입하여 실제 실험으로부터 구한 최대증식속도상수(k)와 모델식으로부터 구한 최대증식속도상수(k)와의 상관관계를 비교하였다.

(5) 부패 세균의 성장 예측

MIC broth 상에서의 게맛살 부패세균의 최대증식속도상수(k)의 온도와 초기 균수에 따른 정량 평가 모델을 Square root model과 두 가지 타입의 Polynomial model을 이용하여 정량화 하였으며, 정량 평가 모델에 의해 예측된 속도상수를 이용해 Gompertz 모델에 의한 균의 예측성장을 나타내었다.

다. 결과 및 고찰

(1) 게맛살 부패 세균의 분리 및 생화학적 특성

(가) 부패 세균의 분리

한성수산식품(주)의 게맛살 제품을 25℃ incubator에서 5일간 방치한 후 균질화하여 현탁액 100 μ l를 도말 평판법에 의해 BHI agar plate에 접종하고 배양한 결과, 게맛살의 부패에 영향을 미치는 주요 세균은 colony의 특징 별로 두 가지 strain(A, B)으로 나눌 수 있었다. 두 균주간의 부패한 게맛살 내 점유 비율은 각각 60%와 34%로 나타났다.

(나) 부패 세균의 생화학적 특성

분리 균주의 동정을 위하여 Gram stain, motility, spore stain, catalase test, ONPG 및 생화학적 특성을 관찰하였으며, 그 특징을 Table 1과 2에 나타내었다. A, B 균주 모두 Gram positive, 간균으로 포자를 형성하였으며, B 균주의 colony는 점질물을 생산하였다.

API kit 50CH를 이용한 49종류의 당 이용 시험을 실시하여 균을 동정한 결과, 게맛살 부패의 주 원인 세균인 A 균주는 내열성 포자를 형성하는 *Bacillus subtilis* 와 B 균주는 탄소원으로 당을 분해하여 exopolysaccharide(EPS)를 생산하는 *Bacillus licheniformis*로 판단되었다. Larpin 등 (2002)은 *Bacillus licheniformis*는 glucose, fructose 또는 sucrose를 분해하여 대수 증식기의 중간지점에서 가장 많은 양의 EPS를 생산한다고 보고하였으며, Carr 등 (1987)은 *B. licheniformis*와 특정 Lactic acid bacteria에 의해 생성된 EPS는 맥주나, 와인에 로프 현상을 일으켜 품질의 저하를 야기 시킨다고 보고하였다. *B. subtilis*는 내열성 포자를 형성하여 일반적인 가열에 의한 식품에서 살아남은 포자에 의해 *B. subtilis*의 증식이 일어날 수 있으며, Spilimbergo 등 (2003)은 초임계 CO₂를 이용해 60°C 90 bar에서 2시간 처리하면 완전히 포자를 불활성화 할 수 있다고 보고하였다.

(2) 환경 조건에 따른 균의 생육 지표치의 변화

(가) 부패균의 성장 - 배지 내

게맛살의 부패에 영향을 미치는 주요 세균은 60%의 *B. subtilis* 와 34%의 *B. licheniformis*의 두 그룹으로 나눌 수 있다. 게맛살 내 부패 세균의 증식을 예측하기 위하여, 점유 비율에 맞게 균을 혼합하여 MIC broth에 초기균수 별로 접종하고 서로 다른 온도에서 배양하면서 일정 시간 마다 생균수를 측정하여 시간에 따른 부패 세균의 증식을 측정하였다 (Fig. 1).

2차 모델에 의한 혼합균의 증식을 예측하기 위하여 일반적으로 sigmoid 한 균의 증식을 표현하는 Gompertz 모델을 사용하였으며(Gibson 등, 1988; Willocx 등, 1993), 균의 증식을 대표하는 생육지표로써, 최대 증식속도상수(k), 유도기(L), 세대시간(G)를 Gompertz 모델로부터 구하였다 (Yano. 1998).

$$\text{Log}N = A + C \times \exp[-\exp\{-B \times (t - M)\}]$$

$$k = BC/e$$

$$\text{generation time (hr)} = (\log 2) e / BC$$

$$\text{lag time} = M - (1/B)$$

Table 1. Morphological characteristics of putrefactive bacteria isolated from imitation crab sticks

	strain A	strain B
Gram stain	+	+
Form	rod	rod
Spore	+	+
Motility	+	+
rope	-	+

Table 2. Physiological and biological characteristic of putrefactive bacteria isolated from imitation crab sticks

	strain A	<i>B. subtilis</i>	strain B	<i>B. licheniformis</i>
Catalase	+	+	+	+
ONPG	+	+	+	+
Indole	-	-	-	-
V-P	+	+	+	+
Arginine dihydrolase	-	-	+	+
Gelatinase production	+	+	+	+

주 원인 세균인 A 균주는 내열성 포자를 형성하는 *Bacillus subtilis* 와 B 균주는 탄소원으로 당을 분해하여 exopolysaccharide(EPS)를 생산하는 *Bacillus licheniformis*로 판단되어진다. Larpin 등 (2002)은 *Bacillus licheniformis*는 glucose, fructose 또는 sucrose를 분해하여 대수 증식기의 중간지점에서 가장 많은 양의 EPS를 생산한다고 보고하였으며, Carr 등 (1987) 은 *B. licheniformis*와 특정 Lactic acid bacteria에 의해 생성된 EPS는 맥주나, 와인에 로프 현상을 일으켜 품질의 저하를 야기 시킨다고 보고하였다. *B. subtilis* 는 내열성 포자를 형성하여 일반적인 가열에 의한 식품에서 살아남은 포자에 의해 *B. subtilis*의 증식이 일어날 수 있으며, Spilimbergo 등 (2003)은 초임계 CO₂를 이용해 60°C 90 bar에서 2시간 처리하면 완전히 포자를 불활성화 할 수 있다고 보고하였다.

(2) 환경 조건에 따른 균의 생육 지표치의 변화

(가) 부패균의 성장 - 배지 내

계맛살의 부패에 영향을 미치는 주요 세균은 60%의 *B. subtilis* 와 34%의 *B. licheniformis* 의 두 그룹으로 나눌 수 있다. 계맛살 내 부패 세균의 증식을 예측하기 위하여, 점유 비율에 맞게 균을 혼합하여 MIC broth에 초기균수 별로 접종하고 서로 다른 온도에서 배양하면서 일정 시간 마다 생균수를 측정하여 시간에 따른 부패 세균의 증식을 측정하였다 (Fig. 1).

2차 모델에 의한 혼합균의 증식을 예측하기 위하여 일반적으로 sigmoid 한 균의 증식을 표현하는 Gompertz 모델을 사용하였으며(Gibson 등, 1988; Willocx 등, 1993), 균의 증식을 대표하는 생육지표로서, 최대증식속도상수(k), 유도기(LT), 세대시간(GT)를 Gompertz 모델로부터 구하였다 (Yano, 1998).

$$\text{Log}N = A + C \times \exp[-\exp\{-B \times (t - M)\}]$$

$$k = BC/e$$

$$\text{generation time (hr)} = (\log 2) e / BC$$

$$\text{lag time} = M - (1/B)$$

(나) 최대 증식속도 상수에 미치는 환경요인의 영향

혼합균의 최대증식속도상수(k)에 미치는 환경 요인의 영향을 알아보기 위하여 계맛살 부패 세균의 초기 균수를 다르게 하여 서로 다른 온도에서 배양하였으며, 각 조건에서의 최대증식속도상수(k)를 Table 3과 Fig. 2 에 나타내었다. 최대증식속도상수(k)에 미치는 온도의 영향은 온도가 높아질수록 값이 증가하여 평균 0.34 hr⁻¹의 최대증식속도상수(k) 값

을 나타내었다. 이는 Ratkowsky 등 (1983) 이 전체 생육가능 온도 범위에서 미생물 배양의 증식속도 모델에서 보고한 *B. subtilis*의 최대증식속도상수(k)와 비슷한 결과이며, 혼합균 중 *B. subtilis*가 차지하는 비가 60% 이므로, 두 가지의 *Bacillus* sp.의 혼합인 부패균주에 대한 최대증식속도상수(k)는 혼합에 의한 차이는 없는 것으로 판단된다. 또한, 동일 온도 조건하에서 초기 균수에 따른 최대증식속도상수(k)는 15°C에서 초기 균수가 10^3 CFU/ml일 때 0.09로 가장 낮게 나타났으며, 20°C와 25°C에서는 유의적인 차이는 없었다 ($P>0.05$).

(다) 유도기(LT)에 미치는 환경요인의 영향

균의 유도기(LT)에는 복합적인 환경 요인이 영향을 미치는 것으로 보고하고 있으며 (Buchanan and Cygnarowicz, 1990; MeMeekin 등, 1993; Baranyi and Roberts, 1994; Zwieterin 등, 1994), 대부분 온도의 영향에 관한 연구가 이루어지고 있다 (Membre 등, 1999; Augustin 등, 2000; Gill 등, 2001).

균의 유도기(LT)에 미치는 환경 요인의 영향을 알아보기 위하여 각기 다른 초기 균수와 온도에서 부패세균을 배양하여, Gompertz model로부터 균의 유도기(LT)를 구하였다.

Table 4 및 Fig. 3에 나타난 온도와 초기 균수에 따른 유도기(LT)의 영향은 온도가 높아질수록 유도기는 짧아졌으며, 15°C 실험구에서는 초기균수가 10^4 일때 가장 긴 유도기(LT)를 나타내었으며, 다른 온도 실험구에서는 유의적인 차이는 없었다.

Mckellar 등 (2001)이 유도기(LT)와 pH의 관계를 지수적인 형태로 나타내었으며, 온도와 유도기(LT)의 관계를 본 실험에서 지수적인 형태로 Fig. 4에 나타내었다.

Augustin 등 (2000)은 균의 증식에 있어서 유도기(LT)에 미치는 영향은 초기 접종균의 상태에 영향을 받는다고 보고한 바 있으며, *Listeria monocytogenes*의 초기균수와 최대 증식속도상수 따른 유도기(LT)를 모델식화 하였으나, 본 실험의 계맛살 부패세균의 초기균수에 따른 유도기(LT)는 유의적인 차이가 나타나지 않는 상이한 결과를 보였다. 또한, Whiting 등 (2002)은 접종 전의 전배양 균의 대수증식기, 정지기, 사멸기 같이 접종시기에 따라 유도기(LT)에 차이가 난다고 보고하였으므로, 본 실험에서는 전배양의 대수증식기에서 균을 취하여 접종실험에 임하였다.

(라) 세대시간(GT)에 미치는 환경요인의 영향

균의 세대시간(GT)에 미치는 환경 요인의 영향을 알아보기 위하여 각기 다른 초기 균수와 온도에서 부패 세균을 배양하여, Gompertz model로부터 균의 세대시간(GT)을 구하였으며 그 결과를 Table 5와 Fig. 5에 나타내었다.

초기 균수에 따른 세대시간(GT)의 유의적인 차이는 없었으며, 세대시간(GT) 또한 온도

가 높아질수록 짧았으며, 세대시간(GT)은 속도상수와 반비례적인 관계를 나타내었다.

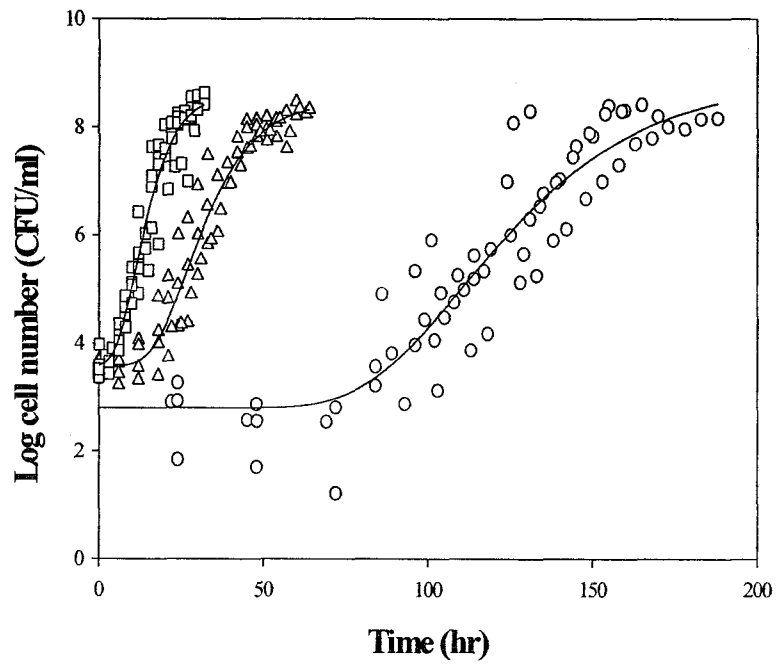


Fig. 1. Growth curves of putrefactive bacteria in Modified broth at different temperature (\square , 25°C; Δ , 20°C; \circ , 15°C).

Table 3. Effects of temperature and initial cell number on maximum specific growth rate (hr^{-1}) of putrefactive bacteria¹

Initial level (Log CFU/ml)	k (hr^{-1})		
	15°C	20°C	25°C
2	0.12±0.01 ^a	0.19±0.02	0.38±0.06
3	0.09±0.01 ^{ab}	0.19±0.02	0.33±0.06
4	0.10±0.03 ^b	0.16±0.03	0.31±0.04

¹Values (mean±s.d. of 15 times replication) in same column not sharing a common Superscript are significantly different ($P<0.05$).

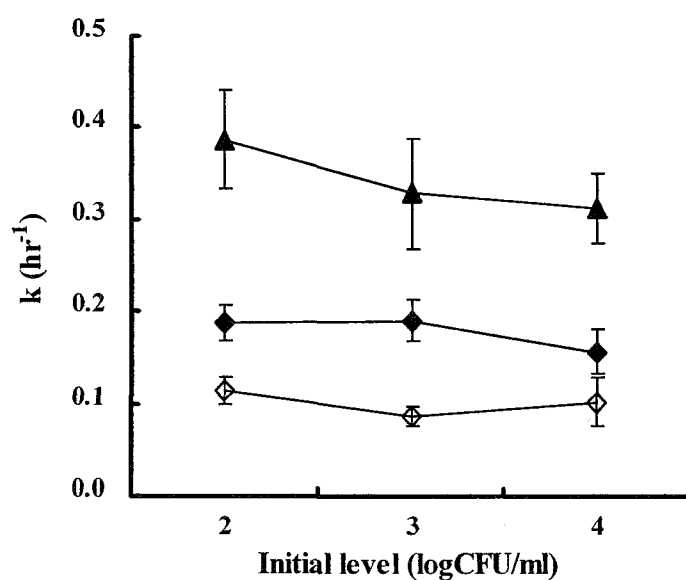


Fig. 2. Effects of initial cell number on maximum specific growth rate (k) of putrefactive bacteria at different temperature (■, 15°C;◇, 20°C;◆, 25°C). Error bars indicate standard deviations ($n=15$)

Table 4. Effects of temperature and initial cell number on lag time (LT) of putrefactive bacteria¹.

Initial level (Log CFU/ml)	Lag time (hr)		
	15°C	20°C	25°C
2	60.43±6.94 ^a	19.28±4.07	6.36±0.74
3	69.12±11.07 ^{ab}	15.42±6.20	5.38±0.94
4	72.05±11.46 ^b	12.43±3.93	6.03±1.83

¹Values (mean±s.d. of 15 times replication) in same column not sharing a common superscript are significantly different (P<0.05).

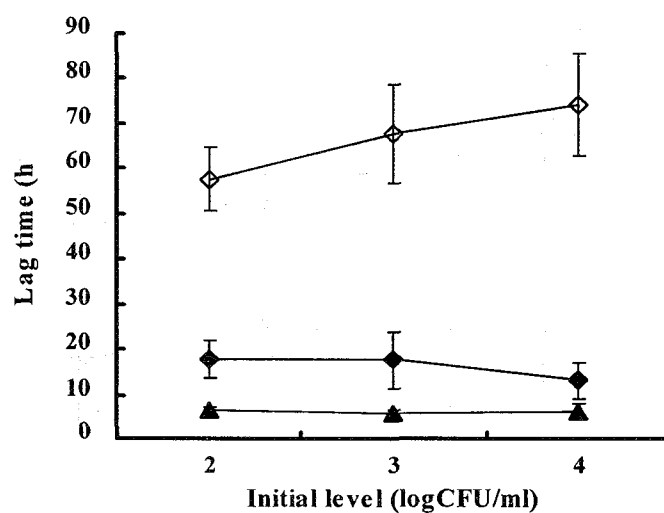


Fig. 3. Effects of temperature and initial cell number on lag time (LT) of putrefactive bacteria (■, 15°C; ◇, 20°C; ◆, 25°C). Error bars indicate standard deviations (n=15).

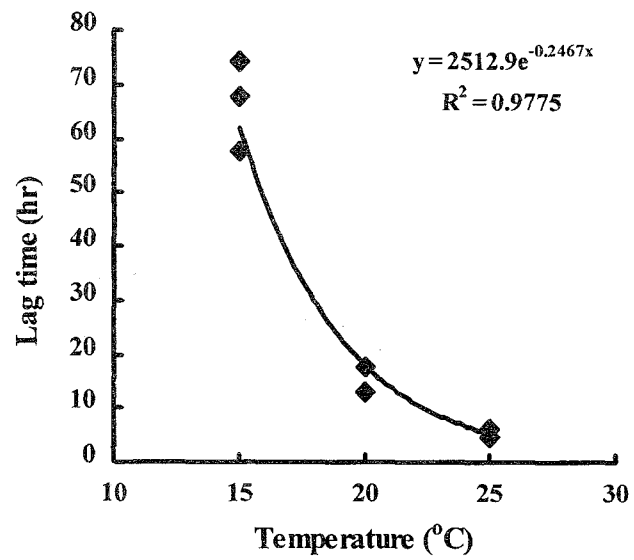


Fig. 4. Effects of temperature on lag time (*LT*) of putrefactive bacteria at the mean initial cell number.

Table 5. Effects of temperature and initial cell number on generation time (GT) of putrefactive bacteria¹

Initial level (Log CFU/ml)	Generation time (hr)		
	15°C	20°C	25°C
2	2.53±0.34 ^a	1.60±0.16 ^a	0.82±0.12
3	3.49±0.43 ^{ab}	1.60±0.18 ^a	0.95±0.21
4	3.13±0.79 ^b	1.96±0.32 ^b	0.97±0.11

¹Values (mean±s.d. of 15 times replication) in same column not sharing a common superscript are significantly different (P<0.05).

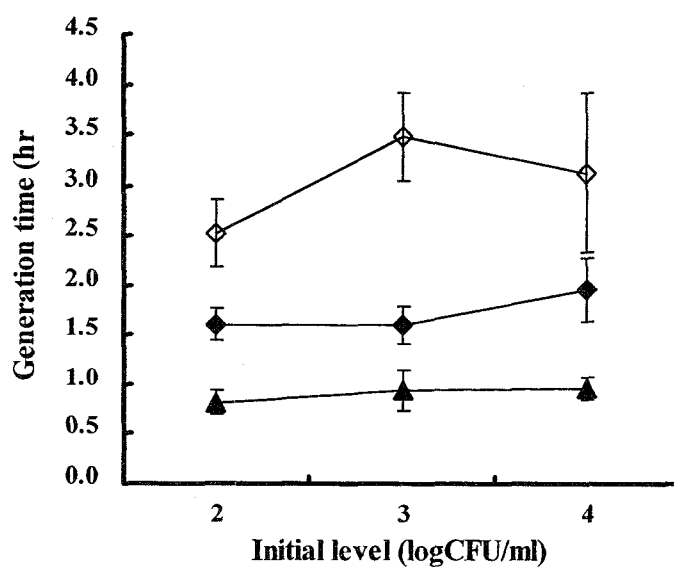


Fig. 5. Effects of temperature and initial cell number on generation time (GT) of putrefactive bacteria (■, 15°C; ◇, 20°C; ◆, 25°C). Error bars indicate standard deviations (n=15).

(3) 2차 모델에 의한 최대증식속도상수(k)에 미치는 환경 조건의 영향을 정량화

(가) 온도의 변화에 따른 최대증식속도상수(k)의 정량평가모델

각 환경 조건인 초기 균수와 온도에 따른 최대증식속도상수(k)의 변화를 관찰하였다. 초기 균수에 따른 최대증식속도상수(k)의 유의적인 차이는 나타나지 않았으며 ($P > 0.05$), 따라서 초기균수 향이 없는 온도와 최대증식속도상수(k)간의 상호작용을 표현하는 2차 모델인 평방근 모델을 사용하여 최적 온도 이하의 범위에서 $\sqrt{k} = b(T - T_{min})$ 형태로 정량화하였다. 한편, 초기 균수를 고려할 경우, $k = a + bT + cA_0$ 형태의 다항식으로 나타내었으며, 각각의 parameter 와 통계적 분석치를 Table 6에 나타내었다.

Square root model은 최대증식속도상수(k)와 온도의 영향을 정량화하는 식으로 Ratkowsky 등 (1983)은 Square root model을 사용하여 최대증식속도상수(k)와 온도의 관계를 구명하였다. b는 직선의 기울기로부터 구해지는 상수, T_{min} 과 pH_{min} 은 증식속도가 0이 되는 개념상의 최저온도와 최저 pH를 나타낸다.

또한 Miles 등 (1997)은 이를 확장하여 온도와 수분 활성 등을 환경요인으로 하여 일반배지에서 최대증식속도상수(k)와의 관계를 정량화하여 보고한바 있다. 이러한 Square root model 이외에도 Ratkowsky 등 (1995), Bolton 등 (1997), Presser 등 (1999), Augustin 등 (2000)은 균의 성장, 사멸, 생존, 독소 형성 등에 미치는 온도, 수분 활성, pH, 질소 량, 유기산 등 여러 환경요인의 영향에 대해서 표면응답법을 기본으로 하는 Polynomial model을 보고한 바 있으며, 다항식 모델의 경우, 최대증식속도상수(k) 또는 그 대수값($\ln k$)에 대하여 $k(\ln k) = f(T, pH, \dots)$ 의 관계에 있으며, 아래와 같은 형태로 표현할 수 있다.

$$k(\ln k) = C_1 + C_2 \cdot T + C_3 \cdot pH + C_4 \cdot T^2 + C_5 \cdot pH^2 + C_6 \cdot T \cdot pH + \dots + C_n$$

여기서 $C_1, C_2, C_3, \dots, C_n$ 은 실험을 통한 최대증식속도상수(k)와 각 변수값을 이용하여 SPSS 또는 SAS 등과 같은 통계분석 프로그램에 의해 구할 수 있으며, 복잡한 평방근모델식과 다항식에 대하여 Baranyi 등 (1996)은 그것의 불편함을 역설하였고, Dalgaard 등 (1997)은 Square root model의 확장식보다 간단한 Polynomial model의 더 적용성이 뛰어나움을 보고한바 있다.

(나) 다항식을 이용한 최대증식속도상수(k)의 실험치와 예측치의 비교

부패세균의 실험을 통하여 구한 최대증식속도상수(k)와 평방근 모델식과 평방근 다항식에 의해 예측된 최대증식속도상수(k)를 비교한 결과를 Fig. 6과 Fig 7에 나타내었다.

평방근모델식과 실험값들은 0.88의 상관관계를 나타내었으며, 다항식은 0.87의 상관관계

로 초기균수에 의한 최대증식속도상수(k)의 변화가 없었으므로 다항식보다는 평방근 모델식이 신뢰도가 높게 나타났다.

Table 6. Parameters of Square root model and Polynomial model for prediction of maximum specific growth rate (k) of putrefactive bacteria.

		Statistical analysis					
		Coefficient	S. E	t-value	P	S. E. of Estimate	R ²
Square root model	T _{min}	3.5089	0.9502	3.6929	0.0006	0.0409	0.83
	b	0.0266962	0.0015	17.8940	<0.0001		
Polynomial model	a	-0.2160	0.0377	-5.7351	<0.0001	0.0407	0.87
	b	0.0241	0.0015	16.2360	<0.0001		
	c	-0.0199	0.0074	-2.6712	0.0107		

A₀, Initial cell level (Log CFU/ml)

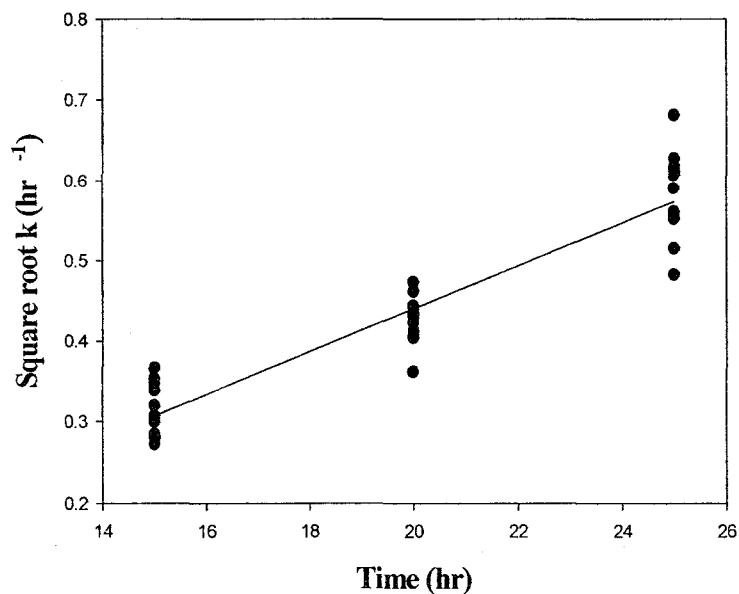


Fig. 6. Comparison of experimental \sqrt{k} and predictive \sqrt{k} by Square root equation of putrefactive bacteria at different culture condition (●, Experimental \sqrt{k} ; —, Predictive \sqrt{k}).

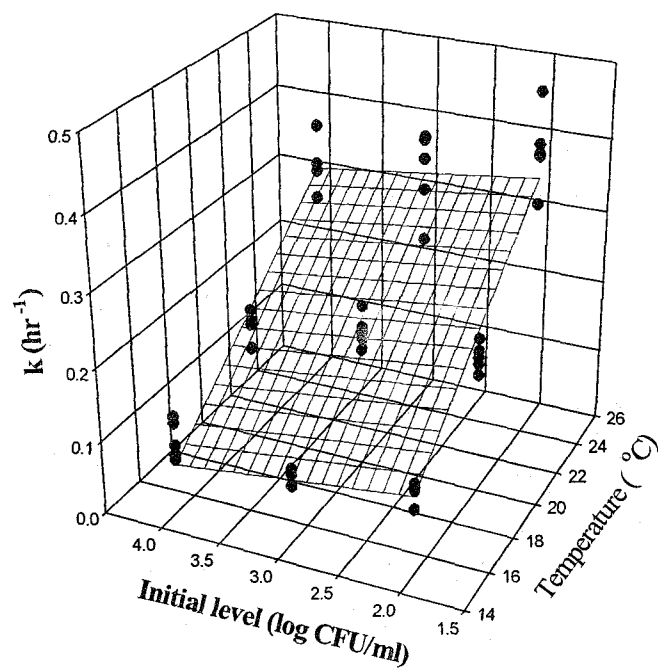


Fig. 7. Comparison of experimental k and predictive k by polynomial equation of putrefactive bacteria at different culture condition (●, Experimental k ; ▣, Predictive k).

(4) 2차 모델식과 Gompertz 모델에 의한 균의 성장

Table 4의 최대증식속도상수(k)에 미치는 온도와 pH의 영향을 모델화한 정량평가 모델 식으로 서로 다른 초기 균수, 온도, 조건에서 균의 최대증식속도상수(k)를 예측할 수 있었으며, 초기 균수 1.0×10^3 , 온도 25°C , pH 7에서의 반복실험을 통한 성장과 평방근모델과 다항식모델에 의해 예측된 균의 성장 곡선을 Fig. 8에 나타내었다. 이를 바탕으로 균의 성장 곡선을 표현하는 Gompertz식에 적용함으로써, 각 조건에서 Gompertz식에 의한 균의 성장이 예측 가능하게 되었다.

라. 결론

포장 연제품으로부터 분리한 주요 부패 세균은 내열성 포자를 형성하는 *B. subtilis* 와 탄소원으로 당을 분해하여 exopolysaccharide(EPS)를 생산하는 *B. licheniformis*로 나타났다. 게맛살의 제조 공정상 가열 처리 과정에서 *B. subtilis* 와 *B. Licheniformis* 등 내열성 포자를 형성하는 균은 완전히 사멸하지 않으며, 유통과정 중, 적정 온도와 시간이 경과함에 따라, 영양 세포를 형성하여 게맛살의 부패에 영향을 미치는 것으로 나타났다. 이러한 부패 세균의 증식에 대하여, 초기균수에 따른 최대증식속도상수(k)와 유도기(LT), 세대시간(GT)의 변화는 유의적인 차이가 나타나지 않았으며, 균의 성장에 초기균수 보다는 온도의 영향이 지배적인 것으로 나타났다. 또한 본 실험에서 유도기(LT)와 온도의 관계는 $LT(\text{hr}) = 2.5219e^{-0.2467 \cdot T}$ 의 관계가 성립하며, 생육 지표인 최대증식속도상수(k)에 대해, Square root model과 Polynomial model을 이용하여 온도와, 초기 균수 등 환경 요인에 대하여 정량화 하였으며, 다음과 같이 나타내었다.

$$\text{Square root model : } \sqrt{k} = 0.02669 (T-3.5689)$$

$$\text{Polynomial model : } k = -0.2160 + 0.0241T - 0.0199A_0$$

최대증식속도상수(k)에 대한 온도와 초기균수의 정량평가 모델로 특정 온도와 초기 균수에서 최대증식속도상수(k)를 계산해 낼 수 있으며, 계산된 최대증식속도상수(k)를 균의 기본 증식 모델인 Gompertz 모델에 적용하여 균의 성장 예측이 가능하였다.

본 실험을 통해, 온도와 초기균수가 균의 최대증식속도상수(k)에 미치는 영향을 간단히 수식으로 표현함으로써, 포장 연제품의 주 부패 세균의 게맛살의 성분과 유사한 배지상에서 환경 요인별 균의 성장을 손쉽게 모니터링 할 수 있게 되었다.

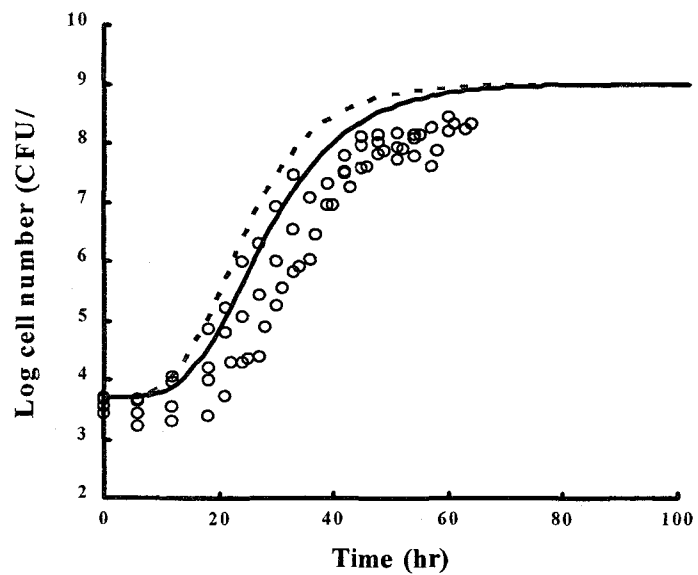


Fig. 8. Predictive growth curves of putrefactive bacteria by predictive model (Initial cell number, 10^3 CFU/ml; Temperature, 20°C ; pH 7). \circ , Experimental data; ----, Growth curve by Square root model; \cdots , Growth curve by Polynomial model

마. 참고 문헌

- AOAC, 2000. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists Internal. 16th edition. volume 1.
- Augustin, Jean-Christophe and Vincent Carlier., 2000. Modelling the growth rate of *Listeria monocytogenes* with a multiplicative typemodel including interactions between environmental factors. Int. J. Food Microbiology. 56, 53-70.
- Augustin J.C.,Rosso L. and Carlier V., 2000, A model describing the effect of temperature history on lag time for *Listeria monocytogenes*, Int. J. Food Microbiology, Volume 57, Issue 3, 169-181
- Baker, D.A., 1995, Application of modelling in HACCP plan development. Int. J. Food Microbiology, 25, 251-261.
- Baranyi J., Ross T., McMeekin T. A. and Roberts T. A., 1996, Effects of parameterization on the performance of empirical models used in 'predictive microbiology', Food Microbiology, Volume 13, Issue 1, February , Pages 83-91
- Bolton. L.F., Frank, J.F., 1999. Definding the growth/no growth interface for *Listeria monocytogenes* in Mexican-style chees based on salt, pH, and moisture content. J. Food Prot. 62. 601-609
- Carr, J.G., Norris. J.R., Pettipher. G. L., Wiley. J., 1897, Essays in Agricultural and Food Microbiology. London, 291-307.
- Dalgaard, P., Ole Mejlholm and Hans Henrik Huss. 1997, Application of an iterative approach for development of a microbial model predicting the shelf-life of packed fish, International Journal of Food Microbiology, Volume 38, Issues 2-3, 16 September, Pages 169-179
- Larpin, S., Sauvageot, N., Pichereau, V., Laplace, J.M. and Auffray, Y., 2002, Biosynthesis of exopolysaccharide by a *Bacillus licheniformis* strain isolated from ropy cider, Int. J. Food Microbiology, 77, 1-9.
- McKellar, R.C., Lu, X. and Knight, K.P., 2001, Proposal of a novel parameter to describe the influence of pH on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiology, 73, 2-3, 11, 127-135
- Miles, D.W., Thomas Ross, June Olley and Thomas A. McMeekin. 1997. Development and evaluation of a predictive model for the effect of temperature and water activity on the growth rate of *Vibrio parahaemolyticus*, Int J. Food Microbiology. 38, Issues 2-3, 133-142
- Notermans, S., Gallhoff, G., Zwitering, M.H and Mead, G.C., 1995, The HACCP concept:

- specification of criteria using quantitative risk assesment. *Food Microbiology*, 12, 81-90.
- Presser, K. A, Ratkowsky, D. A., Ross, T., 1997. Modelling the growth rate of *Escherichia coli* as a funrion of pH and lactic acid concentration. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2335-2360.
- Ratkowsky, D.A., Ross, T., 1995. Modelling the bacterial growth/no growth interface. *Lett. Appl. Microbial.* 20, 29-33.
- Ratkowsky, D.A., Lowry, R.K., Mcmeekin, T.A., Stokes, A.N. and Chandler, R.E., 1983, Model for bacterial culture growth rate throught the entire biokinetic temperature range, *J. Bacteriology*, 154, June, 1222-1226.
- Spilimbergo, S., Bertucco, A., Lauro, F. M. and G. Bertoloni, Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by supercritical CO₂ treatment, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, Volume 4, Issue 2, June 2003, Pages 161-165
- Whiting, R.C. and Bagi, L.K., 2002, Modeling the lag phase of *Listeria monocytogenes*, *Int. J. Food Microbiology*, Volume 73, Issues 2-3, 11, March, 291-295.
- Yano, Nobuhiro. 1998. Predictive Microbiology and Its Application in Food Industry. *Jpn. J. Food microbiology*, 15(2), 81-87.

4. 포장 연제품 내 부패 세균의 예측 정량 평가 모델

가. 서 론

예측 미생물학은 식품내의 미생물의 분포와 성장을 수학적인 정형화된 모델로 나타내기 위한 미생물학과 수학이 합쳐진 새로운 연구 분야로 주목 받고 있다 (Dens and Van Impe 2001). 예측 미생물학에 관한 연구는 병원균 및 부패균을 대상으로 1980년대 후반부터 급속도로 발전하였으며, 지역별로는 미국을 시작으로 영국, 네덜란드 등과 같은 유럽의 각 선진국과 호주 등지에서 정보화 시대에 대응하는 국제적인 흐름의 하나로 활발한 연구가 이루어지고 있다(Yanno, 1998). 이러한 연구의 성과로 미국 농무성(USDA)의 병원균 모델 프로그램인 Pathogen Modeling Program(PMP)과 영국 농어식량성 (MAFF)의 Food Micromodel에서 일부 병원성 미생물들의 배지상의 성장 모델로 개발이 되어있고, 그 외 많은 종류의 예측 모델이 개발 되어있다. 또한 최근에는 실제 식품을 대상으로 한 보다 구체적인 예측 모델이 보고되고 있다(Piyasena 등 1998; Lebert 등 2000; Dalgaard 등 1998). 하지만 이러한 모델들에는 여전히 많은 문제들이 있으며 이를 개선하기 위한 지속적인 연구가 필요하다. Dens 등 (1999)은 이런 문제점 중에 하나로 균질화된 식품 중의 미생물과 다른 유기물들 간의 상호작용에 대하여 설명하였으며, 이 후의 보고에서는 일정한 모양을 가지는 고체 식품에 따로 적용할 수 있는 모델에 관한 연구가 있다 (Dens 2001). 반면에, 국내 소비가 많은 어육 연제품의 경우, 관련 예측 미생물학 모델은 연구된 바가 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 고차 수산가공식품인 게맛살에서부터 부패균을 분리하고 게맛살내에서의 성장을 수학적 모델을 통해 정량화함으로써 환경조건에 따른 게맛살의 부패균의 성장을 예측하여 유통 조건별로 제품내의 미생물적 변화를 모니터링하고, 나아가 정확한 위험도 평가와 더불어 유통기한의 예측을 위한 기초 자료를 제공하고자 실험에 임하였다.

나. 재료 및 방법

(1) 부패 세균의 전배양, 게맛살 접종, 성장 측정

분리한 부패균은 검출 비율에 따라 혼합한 후, 게맛살 성분과 유사하게 조제한 배지(Modified imitation crab broth, MIC broth)에 15%의 glycerol를 첨가하여 -80℃에 동결보관 한 후 매 실험 시 MIC broth 50ml에 전배양하여 사용하였다.

(가) 혼합 부패균의 전배양

실험에 사용한 균주는 포장 연제품내에서 부패 세균을 분리한 후, 각각 따로 게맛살 성분과 유사하게 조제한 배지(Modified imitation crab broth, MIC broth)에서 37°C 24시간 전배양하였다. 배양액은 15%의 glycerol을 첨가하여 -80°C에서 따로 동결 보관 하였으며, 혼합균주는 동결 보관 중이던 *B. subtilis*와 *B. licheniformis*를 45°C water bath에서 급속 해동하여, 준비한 멸균 MIC broth 50ml에 접종하고 37°C incubator (Sanyo, Japan)에서 24시간 전배양 하였다. 전배양 된 균주는 게맛살에서 검출된 비율에 맞게 혼합하여 다시 전배양하였다. 전배양된 혼합 부패 세균은 15%의 glycerol를 첨가하여 -80°C에서 동결 보존하며, 매 실험시 45°C water bath에서 급속 해동 한 후, 멸균 MIC broth 50ml에 접종하고 37°C incubator (Sanyo, Japan)에서 24시간 전배양 하였다.

(나) 게맛살에의 접종

멸균된 2L 비커에 멸균 MIC broth 2L를 담고, 전배양된 혼합 부패 균을 18ml의 멸균 생리 식염수로 희석하여, 포장 연제품 15g을 절단 하여 침지하였을 때, 초기균수가 각각, 10^1 , 10^2 , 10^3 CFU/g가 되도록 MIC broth에 전배양 균을 접종한다. 포장 연제품을 15g 씩 절단하여, 초기 균수별로 혼합균이 접종된 배지에 1분간 침지한 후, 멸균 평판에 초기 균수 별로 균을 접종한 게맛살을 넣고 온도 15, 20, 25°C incubator에서 배양하였다.

(다) 제품내 부패 세균의 성장 측정

초기 균수 별로 온도에 따른 시간의 경과에 따른 균의 성장은 일정시간 간격으로 샘플을 취하여, Plate count agar (Diffco Laboratories, Detroit, MI, USA)를 사용하여 표준 평판 배양법 (AOAC, 1990)으로 생균수를 측정하여 나타내었다.

(2) Gompertz model의 적용

일반적으로 각각의 배양 곡선에서 12-16개의 생균수값을 얻었으며, 15반복을 통한 실험 결과를 Gompertz model 에 대입하여 균의 생육지표치인 최대 증식속도 상수($k = BC/e$)를 구하였다.

균의 sigmoid 한 형태의 성장을 표현하기 위해 사용하는 연속함수의 식은 지금까지 3-4 parameter의 Logistic model (Ratkowsky 1983; seber and wild, 1989) 등 여러 가지의 형태로 보고하고 있으나 그 중에서 특히 Gompertz model에 관한 연구가 가장 많으며 영국과 미국에서 각각 개발된 Food micromodel (FMM) and Pathogen Modeling program (PMP)경우에도 Gompertz model을 사용하고 있다.

$$\text{Log}(Nt) = A + C \cdot \exp(-\exp(-B(t - M)))$$

t : 배양시간(hr)

N(t) : 배양시간에 따른 균수(CFU/ml)

A : 초기 균수의 log값(CFU/ml)

C : 균수 증가량의 log값(초기 균수와 최대 균수의 차, CFU/ml)

M : 발육속도가 최대가 되는 시점의 시간

B : 시간 M에서의 발육 속도(최대 발육 속도)

(3) 환경 요인의 영향

균의 증식을 대표하는 균의 생육 지표로써, 최대증식속도상수(k)와 유도기(LT), 세대시간(GT)을 실험을 통한 Gompertz 모델에 의하여 도출하였으며. 최대증식속도상수(k)에 미치는 초기 균수, 온도의 영향을 One-way ANOVA-test를 실시하여 Duncan's multiple range test (Duncan, 1955)로 처리 평균간의 유의성 ($P < 0.05$)을 SPSS (SPSS Inc., 2000) program (Ver. 10.0)으로 검정하였다. 또한 이들의 관계를 Square root model과 Polynomial model로 정량화 하였다.

(4) Parameter들의 결정과 모델의 평가

각 환경 조건 온도 15, 20, 25℃와 초기 균수 $10^1, 10^2, 10^3$ CFU/ml 조건에서 Gompertz model로부터 구한 최대증식속도상수(k)와 환경 조건과의 관계를 규명하기 위하여 Square root model, Polynomial model에 각각 적용하여 SPSS (SPSS Inc., 2000) program (Ver. 10.0)를 이용하여 각 식의 parameter를 결정하고 Sigma Plot (SPSS Inc., version 7.0)로 도식화 하였다.

Parameter가 결정된 Square root model과 Polynomial model에 각 조건을 대입하여 실제 실험으로부터 구한 최대증식속도상수(k)와 모델식으로부터 구한 최대증식속도상수(k)와의 상관관계를 비교하였다.

(5) 게맛살내 부패 세균의 성장 예측

게맛살 부패세균의 최대증식속도상수(k)의 온도와 초기 균수에 따른 정량 평가 모델을 Square root model과 두 가지 타입의 Polynomial model을 이용하여 정량화 하였으며, 정량 평가 모델에 의해 예측된 최대증식속도상수(k)를 이용해 Gompertz 모델에 의한 균의 예측성장을 나타내었다.

다. 결과 및 고찰

(1) 환경 조건에 따른 균의 성장

(가) 부패 세균의 성장 - 포장 연제품내

게맛살의 부패에 영향을 미치는 주요 세균은 *B. subtilis* 와 *B. licheniformis* 의 두 그룹으로 나눌 수 있다. 두 그룹간의 부패한 게맛살 내 점유 비율은 각각, 60%와 34%로 나타났다. 게맛살 내 부패 세균의 증식을 예측하기 위하여, 점유 비율에 맞게 균을 혼합하여, 게맛살에 초기균수 $10^1, 10^2, 10^3$ CFU/g별로 접종하여 일정 시간 간격으로 서로 다른 온도에서 혼합균의 증식을 측정하였다 (Fig. 1). 또한, 2차 모델에 의한 혼합균의 증식을 예측하기 위하여 균의 증식을 대표하는 생육지표로써, 최대 증식속도상수(k), 유도기(LT), 세대시간(GT)를 Gompertz 모델로부터 구하였다.

(나) 최대증식속도상수(k)에 미치는 환경요인의 영향

혼합균의 최대증식속도상수(k)에 미치는 환경 요인의 영향을 알아보기 위하여 게맛살 부패 세균의 초기 균수를 다르게 하여 서로 다른 온도에서 배양하였으며, 각 조건에서의 최대증식속도상수(k)를 Table 1과 Fig. 2 에 나타내었다. 최대증식속도상수(k)에 미치는 온도의 영향은 온도가 높아질수록 값이 증가하였으며, control과 초기 균수에 따른 최대증식속도상수(k)의 유의적인 차이는 없었다($P>0.05$). 하지만 균을 접종하지 않은 실험구 15°C, 20°C, 25°C에서 각각, 0.06 ± 0.01 , 0.11 ± 0.04 , 0.24 ± 0.03 로 최대증식속도상수(k)가 가장 작게 나타났다.

본 실험에서 control은 출고 후 일주일 이내의 제품으로 균을 접종하지 않고 개봉한 상태의 제품을 일정 온도에서 일정 시간 이상 보관하였을 경우를 디자인한 것으로, 출고 초기 제품의 일반 생균수의 초기 균수는 10 CFU/g 이하로 검출되었다. control과 다른 초기 균수 조건에서의 최대증식속도상수(k)의 유의적인 차이는 없었다.

(다) 유도기(LT)에 미치는 환경요인의 영향

균의 유도기(LT)에 미치는 환경 요인의 영향을 알아보기 위하여 각기 다른 초기 균수와 온도에서 부패세균을 배양하여, Gompertz model로부터 균의 유도기(LT)를 구하였다 (Fig. 3). 초기균수에 따른 유의적인 차이는 없었으며($P>0.05$), 15°C 균을 접종하지 않은 실험구에서 44.68 ± 4.4 시간으로 가장 길게 나타났다. 유도기(LT)의 경우, 각 실험 온도 구간에서 최대증식속도상수(k)와는 달리, control과 실험구는 유도기(LT)에서 유의적인 차이가 나타났다. Whiting 등 (2002)은 접종 전의 전배양 균의 대수증식기, 정지기, 사멸기 같이

접종시기에 따라 유도기에 차이가 난다고 보고한 바 있으며, 제품의 출고 초기의 균수는 10 CFU/g 이하로 최대증식 속도는 초기균수에 따른 유의적인 차이는 나타나지 않았지만, 각 온도 실험구에서 접종한 균은 전배양의 대수증식기 때의 균으로, 균의 생육 활성이 가장 높은 영양 세포 상태이며, 제품내의 균은 제조 공정상에서 가열 공정을 거친 후, 대부분은 영양 세포는 사멸하고, 일부 포자를 형성하는 *B. subtilis*와 *B. licheniformis*가 포자 상태로 존재하므로, 제품 내에서 적응하여 영양 세포를 형성하는 시간이 길어 control의 유도기(LT)가 긴 것으로 판단된다(Table 2).

Augustin 등 (2000)은 균의 증식에 있어서 유도기(LT)에 미치는 영향은 초기 접종균의 상태에 영향을 받는다고 보고한 바 있으며, *Listeria monocytogenes*의 초기균수와 최대증식 속도상수(k)에 따른 유도기(LT)를 지수적인 형태로 모델식화 하였다. 본 실험에서는 온도와 유도기(LT)의 관계를 지수 형태로 Fig. 4에 $LT = 343.79e^{-0.1606T}$ 의 형태로 나타내었다.

(라) 세대시간(GT)에 미치는 환경요인의 영향

균의 세대시간(GT)에 미치는 환경 요인의 영향을 알아보기 위하여 각기 다른 초기 균수와 온도에서 부패 세균을 배양하여, Gompertz model로부터 균의 세대시간(GT)을 구하였다 (Table 3, Fig. 5). 세대시간(GT)의 경우, 20°C의 control 실험구가 다른 초기 균수 실험구에 비해 길게 나타났으며, 15°C와 25°C에서는 세대시간(GT)의 초기균수에 따른 유의적인 차이는 없었다.

(2) 2차 모델에 의한 최대증식속도상수(k)에 미치는 환경 조건의 영향을 정량화

(가) 온도의 변화에 따른 속도상수의 정량평가모델

각 환경 조건인 초기 균수와 온도에 따른 최대증식속도상수(k)의 변화를 관찰하였다. 초기 균수에 따른 최대증식속도상수(k)의 유의적인 차이는 나타나지 않았으며 ($P>0.05$), 따라서 초기균수 항이 없는 온도와 최대증식속도상수(k)간의 상호작용을 표현하는 변화는 2차 모델인 평방근모델을 사용하여 최적 온도 이하의 범위에서 $\sqrt{k} = b(T - T_{min})$ 형태로 정량화하였다. 한편, 초기 균수를 고려할 경우, $k = a + bT + cA_0$ 형태(type 1.)과 Sigmaplot 7.0(SPSS Inc.)의 Gauss-Newton 알고리즘을 사용한 비선형 회귀분석을 통하여 $k = a \cdot \exp(-0.5(((T - T_{max})/b)^2 + ((A_0 - A_{0max})/c)^2))$ 형태(type 2)의 다항식으로 나타내었으며, 각각의 parameter 와 통계적 분석치를 Table 4에 나타내었다.

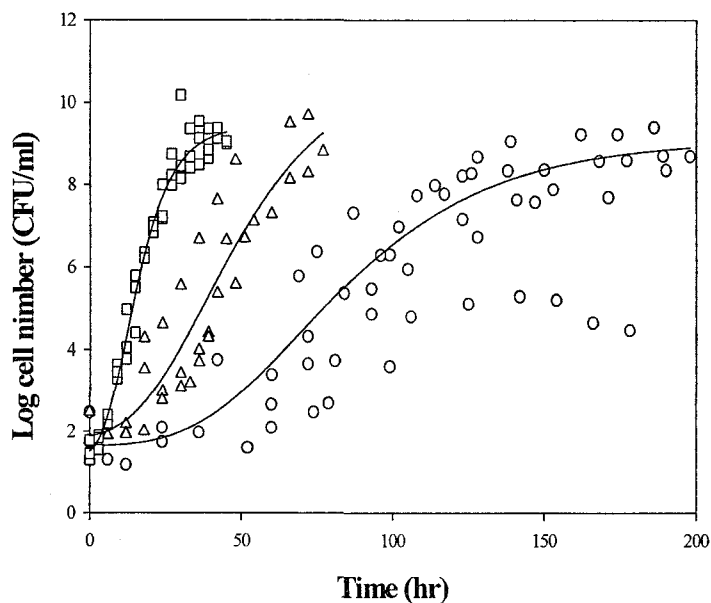


Fig. 1. Growth curves of putrefactive bacteria in imitation crab sticks at different temperature (\square , 25°C; Δ , 20°C; \circ , 15°C).

Table 1. Effects of temperature and initial cell number on maximum specific growth rate (k) of putrefactive bacteria in imitation crab sticks

Initial level (Log CFU/ml)	Maximum specific growth rate (hr^{-1})		
	15°C	20°C	25°C
control	0.06±0.01	0.11±0.04	0.24±0.03
1	0.08±0.01	0.18±0.02	0.34±0.07
2	0.07±0.04	0.15±0.05	0.33±0.07
3	0.08±0.02	0.16±0.03	0.33±0.06

¹Values (mean±s.d. of 15 times replication) in same column not sharing a common superscript are significantly different ($P<0.05$).

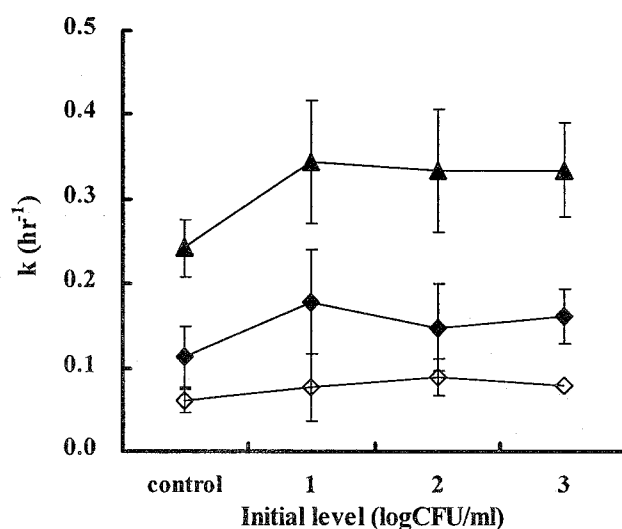


Fig. 2. Effects of temperature and initial cell number on maximum specific growth rate (k) of putrefactive bacteria in imitation crab sticks (◇, 15°C; ◆, 20°C; ▲, 25°C). Error bars indicate standard deviations ($n=15$).

Table 2. Effects of temperature and initial cell number on lag time (LT) of putrefactive bacteria in imitation crab sticks¹.

Initial level (Log CFU/ml)	Lag time (hr)		
	15°C	20°C	25°C
control	46.68±4.40 ^a	23.03±8.05 ^a	12.75±3.82 ^a
1	29.76±4.30 ^b	14.23±2.05 ^b	6.60±1.81 ^b
2	28.25±5.10 ^b	14.96±5.18 ^b	6.02±0.43 ^b
3	33.37±6.66 ^b	13.82±4.03 ^b	5.70±1.61 ^b

¹Values (mean±s.d. of 15 times replication) in same column not sharing a common superscript are significantly different ($P<0.05$).

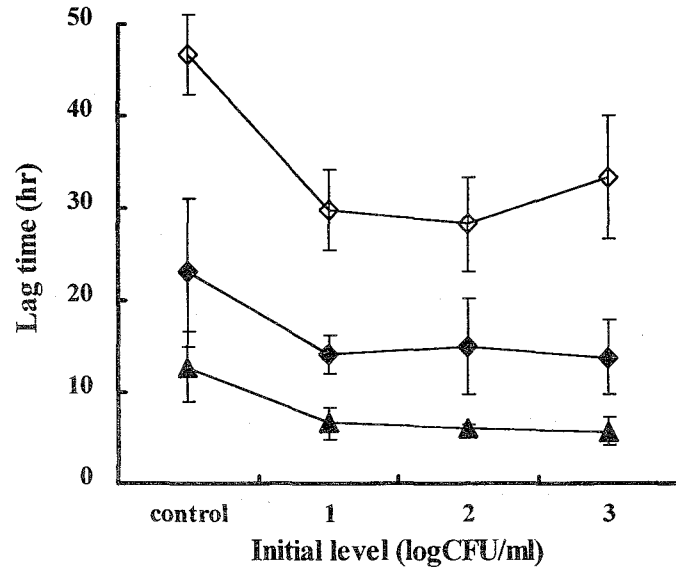


Fig. 3. Effects of temperature and initial cell number on lag time (*LT*) of putrefactive bacteria in imitation crab sticks (◇, 15°C; ◼, 20°C; ▲, 25°C). Error bars indicate standard deviations (n=15).

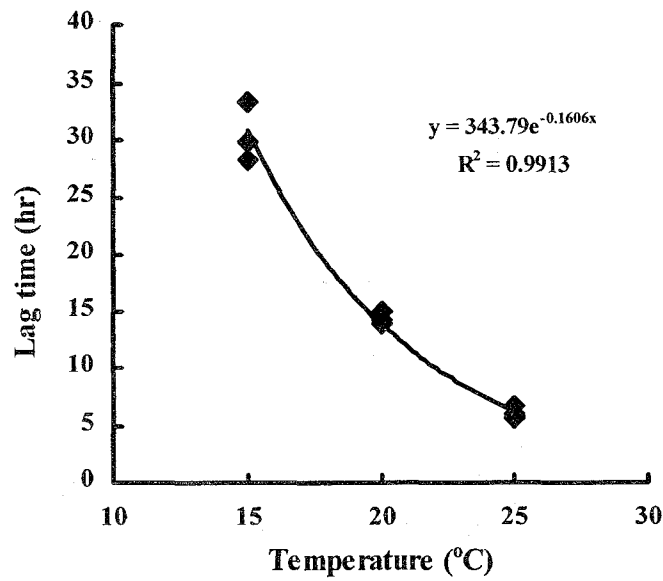


Fig. 4. Effect of temperature on lag time (*LT*) of putrefactive bacteria at the mean initial cell number in imitation crab sticks.

Table 3. Effects of temperature and initial cell number on generation time (GT) of putrefactive bacteria in imitation crab sticks¹

Initial level (Log CFU/ml)	Generation time (hr)		
	15°C	20°C	25°C
control	5.16±1.06	2.87±0.94 ^a	1.25±0.17
1	4.06±0.74	1.83±0.77 ^b	0.92±0.19
2	4.38±0.79	1.81±0.33 ^b	0.99±0.22
3	4.16±1.37	1.90±0.39 ^b	1.18±0.37

¹Values (mean±s.d. of 15 times replication) in same column not sharing a common superscript are significantly different ($P<0.05$).

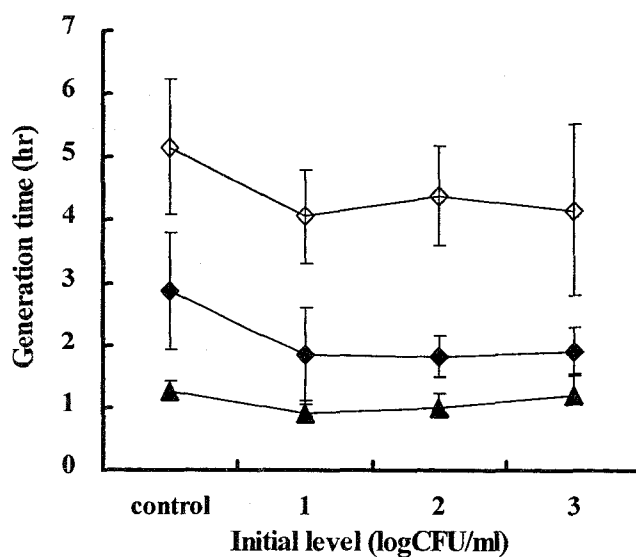


Fig. 5. Effects of temperature and initial cell number on generation time (GT) of putrefactive bacteria in imitation crab sticks (\diamond , 15°C; \blacklozenge , 20°C; \blacktriangle , 25°C). Error bars indicate standard deviations (n=15).

Table 4. Parameters of Square root model and Polynomial model for prediction of maximum specific growth rate (k) of putrefactive bacteria in imitation crab sticks.

		Statistical analysis					
		Coefficient	S. E.	t-value	P	S. E. of estimate	R ²
Square root model	T _{min}	6.2506	0.8640	7.2346	<0.0001	0.0474	0.881
	b	0.0306	0.0018	16.7560	<0.0001		
Polynomial model (type 1)	a	-0.310	0.0460	-6.7547	<0.0001	0.0537	0.804
	b	0.0257	0.0020	12.6470	<0.0001		
	c	-0.004	0.0104	-0.4182	0.6781		
Polynomial model (type 2)	T _{max}	52.9055	1.1120	0.8657	0.3922	0.0502	0.8372
	A _{0max}	-11.266	1058.8199	-0.0106	0.9916		
	a	2.2413	23.7921	0.9255	0.9255		
	b	14.857	14.6880	1.0115	0.3183		
	c	25.104	1041.3040	0.0241	0.9809		

A₀, Initial cell level (Log CFU/ml)

일반적으로, 균의 최대증식속도에 영향을 미치는 온도와 pH 같은 환경인자의 영향을 정량화 하기 위하여 다음과 같은 Square root model과 Polynomial model이 사용되어 지고 있다.

$$\sqrt{k} = b (T - T_{\min})\sqrt{(pH - pH_{\min})}$$

Square root model은 최대증식속도 상수(k)와 온도의 영향을 정량화하는 식으로 Ratkowsky 등 (1983)은 Square root model을 사용하여 최대증식속도 상수(k)와 온도의 관계를 구명하였다. b 는 직선의 기울기로부터 구해지는 상수, T_{\min} 과 pH_{\min} 은 증식속도가 0이 되는 개념상의 최저온도와 최저 pH를 나타낸다.

또한 Miles 등 (1997)은 이를 확장하여 온도와 수분 활성 등을 환경요인으로 하여 일반배지 상에서 최대증식속도 상수(k)와의 관계를 정량화하여 보고한바 있다. 이러한 Square root model 이외에도 Ratkowsky 등 (1995), Bolton 등 (1997), Presser 등 (1999), Augustin 등 (2000)은 균의 성장, 사멸, 생존, 독소 형성 등에 미치는 온도, 수분 활성, pH, 질소 량, 유기산 등 여러 환경 요인의 영향에 대해서 표면응답법을 기본으로 하는 Polynomial model을 보고한 바 있으며, 다항식모델의 경우, 최대증식속도 상수(k) 또는 그 대수값($\ln k$)에 대하여 $k(\ln k) = f(T, pH, \dots)$ 의 관계에 있으며, 아래와 같은 형태로 표현할 수 있다.

$$k(\ln k) = C_1 + C_2 \cdot T + C_3 \cdot pH + C_4 \cdot T^2 + C_5 \cdot pH^2 + C_6 \cdot T \cdot pH + \dots + C_n$$

여기서 $C_1, C_2, C_3, \dots, C_n$ 은 실험을 통한 최대증식속도 상수(k)와 각 변수값을 이용하여 SPSS 또는 SAS 등과 같은 통계분석 프로그램에 의해 구할 수 있으며, 복잡한 평방근모델 식과 다항식에 대하여 Baranyi 등 (1996)은 그것의 불편함을 역설하였고, Dalgaard 등 (1997)은 square root model 의 확장식보다 간단한 polynomial model의 더 적용성이 뛰어난 점을 보고한바 있다.

Square root model 과 두 가지 형태의 다항식을 비교한 결과, Square root model의 상관관계는 0.881로 다항식 형태의 모델식보다 다소 높은 신뢰도를 나타내었으며, 평면형태의 type 1의 다항식보다, $k = a \cdot \exp(-0.5((T - T_{\max})/b)^2 + ((A_0 - A_{0\max})/c)^2)$ 형태의 type 2의 다항식이 0.84로 보다 높은 신뢰도를 나타내었다.

(나) 다항식을 이용한 최대증식속도상수(k)의 실험치와 예측치의 비교

부패세균의 성장 실험을 통하여 구한 최대증식속도상수(k)와 평방근모델식과 다항식에 의해 예측된 최대증식속도상수(k)를 비교한 결과를 Fig. 6, Fig 7.에 나타내었다.

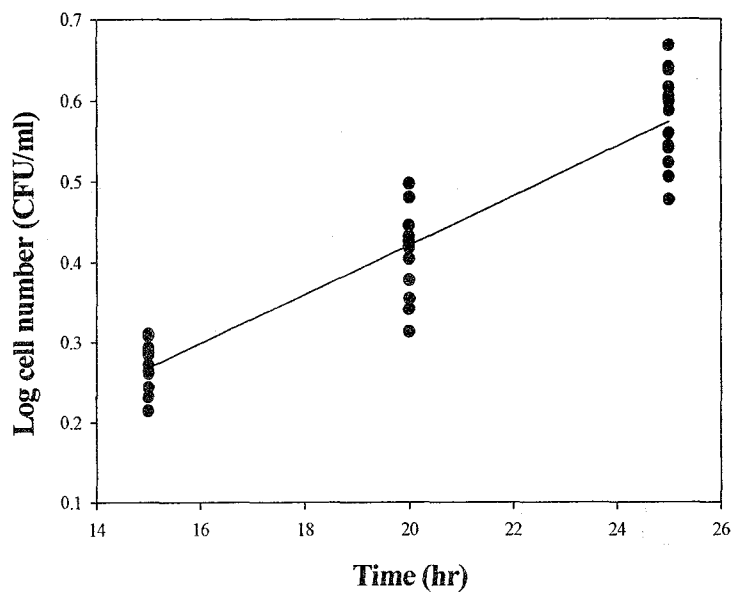


Fig. 6. Comparison of experimental \sqrt{k} and predictive \sqrt{k} by Square root equation of putrefactive bacteria in imitation crab sticks at different culture condition (●, Experimental \sqrt{k} ; —, Predictive \sqrt{k}).

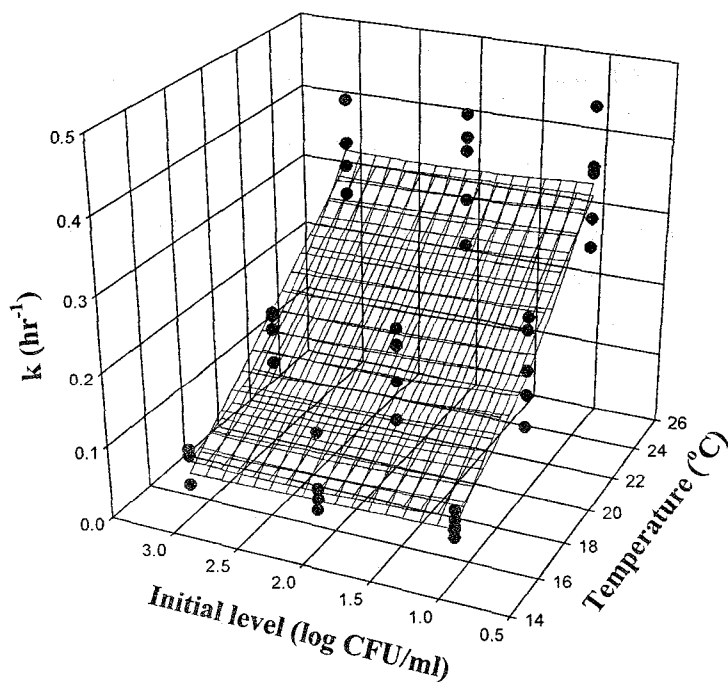


Fig. 7. Comparison of experimental k and predictive k by Polynomial equations (Type 1 and type 2) of putrefactive bacteria in imitation crab sticks at different culture condition (●, Experimental k ; ▣, Predictive k).

(다) 2차 모델식과 Gompertz 모델에 의한 균의 성장

Table 2의 최대증식속도상수(k)에 미치는 온도와 초기균수의 영향을 모델화한 정량평가 모델식으로 서로 다른, 온도, 조건에서 균의 최대증식속도상수(k)를 예측할 수 있었다. 이를 바탕으로 균의 성장 곡선을 표현하는 Gompertz식에 적용함으로써, 각 조건에서 Gompertz식에 의한 균의 성장이 예측 가능하게 되었다. 초기 균수 1.0×10^2 , 온도 20°C 에서의 반복실험을 통한 성장과 평방근모델과 다항식 모델에 의해 예측된 균의 성장 곡선을 Fig. 8에 나타내었다.

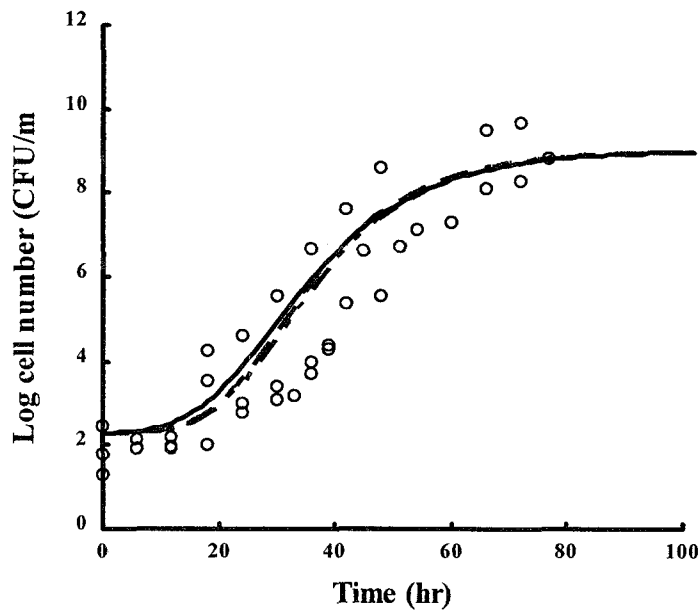


Fig. 8. Predictive growth curves of putrefactive bacteria in imitation crab sticks by predictive model (Initial cell number, 10^2 CFU/g; Temperature, 20°C). \circ , Experimental data; —, Growth curve by Square root model; ---, Growth curve by Polynomial model type 1 and type 2

라. 결론

앞의 연구 결과에서 계맛살의 부패 세균은 *Bacillus cereus*와 *Bacillus licheniformis*로 확인되었으며, 균의 증식 지표인 최대증식속도상수(k), 유도기(LT) 및 세대시간(GT)에 미치는 온도와 초기 균수의 영향을 알아보았다. 그 결과, 최대증식속도상수(k), 유도기(LT), 세대시간(GT)은 일부 온도 실험구에서 초기균수에 따른 유의적인 차이를 보였으나, 전반적으로 초기균수에 따른 증식 지표는 영향을 받지 않는 것으로 나타났으며, 초기 접종균수가 아니라 접종 전의 전배양된 균의 대수증식기, 정지기, 사멸기 같이 접종시기에 따라 최대증식속도상수(k), 유도기(LT), 세대시간(GT)에 차이가 난다고 보고하였다(Augustin, 2000).

한편, 실험에 사용한 혼합 부패 세균의 성장에 미치는 온도와 초기균수의 영향을 Square root model과 두가지 형태의 Polynomial model로 각각 정량화 하였다.

$$\sqrt{k} = 0.0306 (T - 6.2605)$$

$$k = -0.310 + 0.0257 \cdot T - 0.004 \cdot A_0$$

$$k = 2.2413 \cdot \exp(-0.5(((T-52.9055)/14.857)^2 + ((A_0-11.266)/25.104)^2))$$

정량화된 모델식을 바탕으로 균의 기본 증식 모델인 Gompertz model에 적용하여 온도, 초기 균수 같은 환경 요인에 따른 계맛살 부패균의 성장 예측이 가능하게 되었다.

마. 참고 문헌

- AOAC, 2000. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists Internal. 16th edition. volume 1.
- Augustin J.C., Rosso L. and Carlier V., 2000, A model describing the effect of temperature history on lag time for *Listeria monocytogenes*, Int. J. Food Microbiology, Volume 57, Issue 3, 169-181
- Baker, D.A., 1995, Application of modelling in HACCP plan development. Int. J. Food Microbiology, 25, 251-261.
- Baranyi J., Ross T., McMeekin T. A. and Roberts T. A., 1996, Effects of parameterization on the performance of empirical models used in 'predictive microbiology', Food Microbiology, Volume 13, Issue 1, February, Pages 83-91
- Bolton. L.F., Frank, J.F., 1999. Defining the growth/no growth interface for *Listeria monocytogenes* in Mexican-style cheeses based on salt, pH, and moisture content. J. Food

Prot. 62. 601-609

- Carr, J.G., Norris, J.R., Pettipher, G. L., Wiley, J., 1897, Essays in Agricultural and Food Microbiology. London, 291-307.
- Dalgaard, P., Ole Mejlholm and Hans Henrik Huss. 1997, Application of an iterative approach for development of a microbial model predicting the shelf-life of packed fish, International Journal of Food Microbiology, Volume 38, Issues 2-3, 16 September, Pages 169-179
- Dalgaard, P., Lasse Vigel Jorgensen, 1998. Predicted and observed growth of *Listeria monocytogenes* in seafood challenge test and in naturally contaminated cold-smoked salmon, Int. J. Food Microbiology, 40, 105-115
- Dens, E.J. and Van Impe, J.F., 2001. On the need for another type of predictive model in structure foods, Int. J. Food Microbiology, 64, 247-260.
- Dens, E.J., VEREecken, K. M. and VAN IMPE, J. F. 1999. A Prototype Model Structure for Mixed Microbial Populations in Homogeneous Food Products, journal of Theoretical Biology, Volume 201, Issue 3, 7, 159-170.
- Dunacn, D.B., 1955. Multiple-range and multiple F test. Biometrics, 11, 1-42
- Lebert, I., Robles-Olvera, V., Lebert, A., 2000. Application of polynomial model to predict growth of mixed cultures of *Pseudomonas* spp. and *Listeria* in meat, Int. J. Food Microbiology, 61, 27-39
- McKellar, R.C., Lu, X. and Knight, K.P., 2001, Proposal of a novel parameter to describe the influence of pH on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiology, 73, 2-3, 11, 127-135
- Notermans, S., Gallhoff, G., Zwitering, M.H and Mead, G.C., 1995, The HACCP concept: specification of criteria using quantitative risk assesment. Food Microbiology, 12, 81-90.
- Piyasena, P., Liou, S., McKellar, R.C., 1998. Predictive modelling of inactivation of *Listeria* spp. in bovine milk during high-temperature short-time pasteurization Int. J. Food Microbiology, 39, 167-173.
- Presser, K. A, Ratkowsky, D. A., Ross, T., 1997. Modelling the growth rate of *Escherichia coli* as a function of pH and lactic acid concentration. Appl. Environ. Microbiol. 63, 2335-2360.
- Ratkowsky, D.A., Ross, T., 1995. Modelling the bacterial growth/no growth interface. Lett. Appl. Microbiol. 20, 29-33.
- Ratkowsky, D.A., Lowry, R.K., Mcmeekin, T.A., Stokes, A.N. and Chandler, R.E., 1983, Model for bacterial culture growth rate throught the entire biokinetic temperature range, J. Bacteriology, 154, June, 1222-1226.

- Ratkowsky, D.A, 1983, Nonlinear regression modeling: A unified practical approach. Marcel Decker, INC., N.Y. USA.
- Seber, G.A.F and Wild, C.J. 1989, Nonlinear regression. John Wiley and Sons, N.Y.
- Spilimbergo, S., Bertucco, A., Lauro, F. M. and G. Bertoloni, Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by supercritical CO₂ treatment, Innovative Food Science & Emerging Technologies, Volume 4, Issue 2, June 2003, Pages 161-165
- SPSS Inc., 2000. SPSS base 10.0 for window, SPSS Inc., 444N. Michigan Avenue, Chicago, IL, 60611.
- Whiting, R.C. and Bagi, L.K., 2002, Modeling the lag phase of *Listeria monocytogenes*, Int. J. Food Microbiology, Volume 73, Issues 2-3, 11, March, 291-295.
- Yano, Nobuhiro. 1998. Predictive Microbiology and Its Application in Food Industry. Jpn. J. Food microbiology, 15(2), 81-87.

5. 저장 온도에 따른 포장 연제품의 유통기한 설정 모델

가. 서론

식품에 있어서 미생물학적 품질의 현격한 저하는 다시 말해 부패되었다고 할 수 있으며, 그것은 식품의 관능적이 특성에 있어서 사람이 섭취하기에 부적합한 상태로의 변화를 말한다. Gram and Dalgaard (2002)는 식품의 부패는 화학적인 반응이나 물리적인 손상을 통해 야기되지만 주로 미생물의 성장으로 인한 off-odor의 원인인 amine, sulfides, alcohols, aldehyde, ketones, organic acid 등과 같은 대사산물의 발생이 원인이라고 보고하였다. 육류, 수산물 등의 가공 포장 식품 내의 미생물의 증식은 온도나 충전 가스 같은 저장 상태와 포장 초기의 제품의 품질에 직접적인 영향을 받는다고 보고 하였고 (Dalgaard, 1995), 유통 기한의 설정을 위한 모델에는 온도와 초기 제품의 품질을 고려해야 한다고 하였다.

현재 영국 농어식량성 (MAFF)의 Food Micromodel과 Food Spoilage Predictor에는 *Brochothrix thermosphacta*, *Lactobacillus plantarium*, *Saccharomyces cerevisiae*, *zygosaccharomyces bailii* 등의 성장 모델이 개발되어 있으나 (Dalgaard 등, 2002), 어류의 주요 부패에 세균인 *Photobacterium phosphorium*, *Shewanella putrefaciens* 같은 균에 대해서는 개발된 모델이 없어 Dalgaard 등 (2002)에 의해 포장 어류 제품의 유통기한과 부패 세균의 성장에 관해 연구된 예가 있다. 국내의 경우, 어육 연제품의 소비량이 전체 수산물 중에서 많은 부분을 차지하고 있음에도 불구하고, 어육 연제품의 부패와 그에 관련하는 부패 세균에 연구가 활발하지 못한 실정이며, 유통기한의 설정도 경험적인 평가를 통해 이루어지고 있다.

따라서 본 연구에서는 surimi를 바탕으로 하는 수산 가공 식품으로써 국내에서 많이 소비되고 있으며, 냉장 포장 유통되고 있는 게맛살을 대상으로 선정하였다. 게맛살의 저장 온도 변화에 따른 미생물의 성장을 수학적인 균의 기본 증식 모델인 Gompertz model을 바탕으로 유통기한에 절대적인 영향을 미치는 온도에 대하여 정량화하고, 저장 온도에 따른 제품의 유통기한을 예측 할 수 있는 모델식을 이끌어 내고자 실험에 임하였다.

나. 재료 및 방법

(1) 포장 연제품의 저장

(가) 포장 연제품의 저장

본 실험에 사용한 포장 연제품은 (주)한성 게맛살 제품으로 출고 3일 내의 제품을 사용하였다. 저장 온도와 시간에 따른 게맛살 제품의 미생물학적, 관능적 변화를 관찰하기 위해 온도

10℃, 15℃, 20℃, 25℃에서 저장하였다.

(나) 제품내 미생물의 성장 측정

저장 온도와 시간의 경과에 따른 균의 성장은 일정시간 간격으로 제품 30g을 취하여, Stomacher bag에 270ml의 멸균 희석수 (0.85% NaCl)와 혼합하고 균질기(Stomacher 400, Seward, England)를 이용하여 30초간 균질화하였다. 생균수의 측정은 Plate count agar (Diffco Laboratories, Detroit, MI, USA)를 사용하여 표준 평판 배양법(AOAC, 2000)으로 측정하였다.

(다) 관능적 평가

일정 시간 간격으로 취하여진 시료는 5명의 패널을 대상으로 색, 냄새, 점질물의 형성 유무를 판단하게 하였다.

(2) Gompertz model의 적용

일반적으로 각 각의 배양 곡선에서 12-16개의 생균수값을 얻었으며, 실험 결과를 Gompertz model에 대입하여 균의 생육지포치인 최대 증식속도 상수($k = BC/e$)를 구하였다.

균의 sigmoid 한 형태의 성장을 표현하기 위해 사용하는 연속함수의 식은 지금까지 3-4 개의 parameter의 Logistic model (Ratkowsky 1983; Seber and Wild, 1989) 등 여러 가지의 형태로 보고하고 있으나 그 중에서 특히 Gompertz model에 관한 연구가 가장 많으며 영국과 미국에서 각각 개발된 Food micromodel (FMM) and Pathogen Modeling program (PMP)경우에도 Gompertz model을 사용하고 있다.

$$\text{Log}(Nt) = A + C \cdot \exp(-\exp(-B(t - M)))$$

t : 배양시간(hr)

N(t) : 배양시간에 따른 균수(CFU/ml)

A : 초기 균수의 log값(CFU/ml)

C : 균수 증가량의 log값(초기 균수와 최대 균수의 차, CFU/ml)

M : 발육속도가 최대가 되는 시점의 시간

B : 시간 M에서의 발육 속도(최대 발육 속도)

(3) 환경 요인의 영향

균의 증식을 대표하는 균의 생육 지표로써, 최대증식속도상수(k)와 유도기(LT), 세대시간(GT)을 실험을 통한 Gompertz 모델에 의하여 도출하였으며, 최대증식속도상수(k)에 미치는 저장 온도의 영향을 아래와 같은 Ratkowsky 등 (1982)의 Square root model로 정량화 하였다.

$$\sqrt{k} = b (T - T_{min})$$

온도와 최대증식속도상수(k)의 관계를 나타내는 Ratkowsky의 Square root model의 기본적인 온도에 관해 확장된 형태로는 Ratkowsky 2, 와 Ratkowsky 3 model 의 두 가지 형태로 나누어지며 다음과 같이 나타낼 수 있다 (Ratkowsky 등, 1983; Zwieterin 등, 1991, 1994).

$$\sqrt{k} = b (T - T_{min}) \{1 - \exp[c(T - T_{max})]\} \text{ -- Ratkowsy 2}$$

$$\sqrt{k} = b (T - T_{min}) \sqrt{\{1 - \exp[c(T - T_{max})]\}} \text{ -- Ratkowsy 3}$$

본 실험에서는 균의 최적 온도 이상의 온도 구간에 대해서는 실험을 하지 않았으며, T_{max} 를 포함하지 않는 형태의 Square root model을 사용하여 온도와 최대증식속도상수(k)의 관계를 정량적으로 나타내었다.

(4) Parameter들의 결정과 모델의 평가

각 환경 조건 온도인 10°C, 15°C, 20°C, 25°C에서 Gompertz model로부터 구한 최대증식속도상수(k)와 온도의 관계를 규명하기 위하여 Square root model에 적용하여 SPSS (SPSS Inc., 2000) program (Ver. 10.0)를 이용하여 각 식의 parameter를 결정하고 Sigma Plot (SPSS Inc., version 7.0)로 도식화 하였다.

Parameter가 결정된 Square root model에 각 온도 조건을 대입하여 실제 실험으로부터 구한 최대증식속도상수(k)와 모델식으로부터 구한 최대증식속도상수(k)와의 상관관계를 비교하였다.

(5) 게맛살내 부패 세균의 성장 예측

게맛살 부패세균의 최대증식속도상수(k)의 온도와 초기 균수에 따른 정량 평가 모델을 Square root model과 두 가지 타입의 Polynomial model을 이용하여 정량화 하였으며, 정량 평가 모델에 의해 예측된 최대증식속도상수(k)를 이용해 Gompertz 모델에 의한 균의 예측성장을 나타내었다.

다. 결과 및 고찰

(1) 저장 온도에 따른 포장 연제품내 미생물 증식

균을 접종하지 않은 출고 3일 이내의 게맛살을 포장을 개봉하지 않은 채로 온도 10℃, 15℃, 20℃, 25℃에 저장하면서 경시적인 생균수의 변화를 Fig. 1에 나타내었다.

앞선 연구에서 게맛살의 부패 세균은 *B. subtilis*와 *B. licheniformis*로 밝혀졌으며, Embarek (1994)는 몇몇 어육 가공품 중 저온 가열 살균 처리하는 포장 식품 중에서는 포자를 형성하는 *Clostridium* 이나 *Bacillus* 등이 증식할 수 있다고 보고한 바와 같다. 특정한 식품 중에서 검출되는 부패세균은 육류 가공품에서 *Lactobacillus curvatus* (Kant-Muermans 등, 1997), 온대성 해수 어류 가공품에서는 *Photobacterium phosphorium* (Dalgaard, 1995), 우유나 크림, 육류 같은 중성의 pH와 높은 수분활성을 가지는 냉장 보관 식품에서는 *Pseudomonas putida* (Neumeyer 등 1997a, b)등이 검출된다고 알려져 있다.

출고 초기, 제품의 미생물 수는 10 CFU/g 이하로 검출되었으며, 균의 최대 균수는 25℃에서 2.3×10^8 CFU/g으로 나타났다.

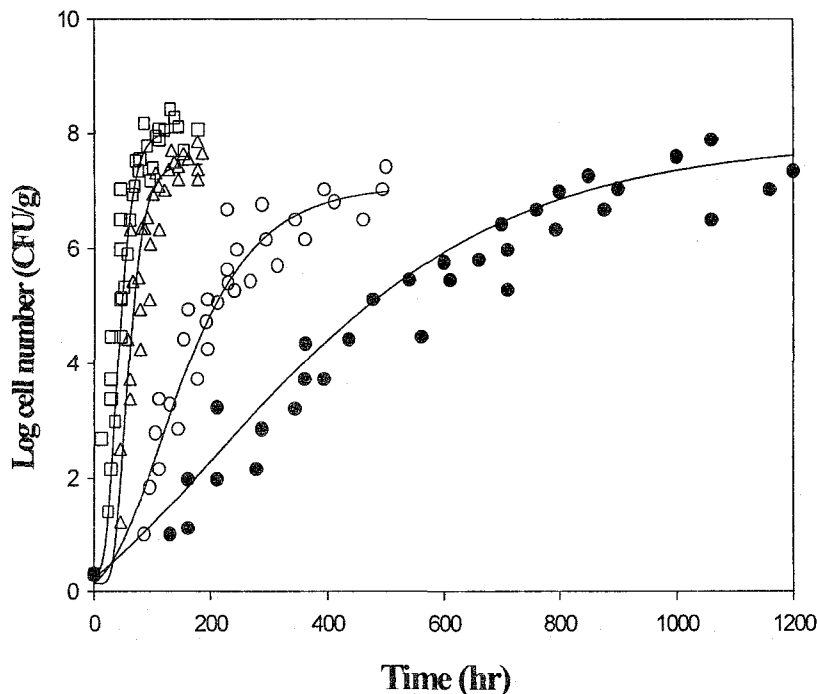


Fig. 1. Growth curves of bacteria in imitation crab sticks at different temperature (□, 25℃; △, 20℃; ○, 15℃; ●, 10℃).

(2) 저장 온도에 따른 포장연제품내 생육지표

각 저장 온도에서의 균의 성장을 Gompertz 모델로부터 구한 생육 지표인 최대증식속도상수(k), 유도기(LT), 세대 시간(GT)을 Table 1에 나타내었다.

최대증식속도상수(k)는 온도가 높아짐에 따라 증가하였으며, 유도기(LT)와 세대 시간(GT)은 감소하였다.

(3) 최대증식속도상수(k) 모델

각 저장 온도에서 균의 성장을 바탕으로 온도와 최대증식속도상수(k)의 상호작용을 표현하는 변화는 2차 모델인 평방근 모델을 사용하여 최적 온도 이하의 범위에서 $\sqrt{k} = b (T - T_{min})$ 형태로 정량화하여 Table 2 와 Fig. 2에 나타내었다.

(4) 포장 연제품의 저장 온도에 따른 유통기한

실제 포장 연제품의 저장 기간 동안 관능적인 이취감과 점질물의 형성을 바탕으로 제품의 shelf-life를 결정하였다. 5명의 패널을 대상으로 시간에 따라 냄새, 외관, 촉감 관능적인 평가를 실시하였고, 동시에 생균수의 측정을 병행하였다. 그 결과, 균의 초기 균수는 10 CFU/g 이하로 관찰되었으며, 균수의 증가량은 8 log cycle, 관능적인 이취의 발생은 5 log CFU/g, 점질물의 발생은 6 log CFU/g 부근에서 나타났다 (Fig. 3). 따라서 관능적 최소 한계(MOL, Minimum Off-odor Level)를 5 log CFU/g으로 설정할 경우, shelf-life의 관계식은 Gompertz 모델의 변형으로 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$\text{Shelf life (hr)} = M - \frac{\ln\left(-\ln\frac{(MOL - A_0)}{C}\right)}{\frac{k \cdot e}{C}} \quad M = \frac{\ln\left(-\ln\frac{(A_0 - A_{low})}{C}\right)}{\frac{k \cdot e}{C}}$$

$$A_0 \text{ (초기 균량)} = \log(2) \text{ CFU/g}$$

$$C \text{ (균수의 증가량)} = 8 \log \text{ CFU/g}$$

한편, 온도와 최대증식속도상수(k)는 평방근모델식인 $\sqrt{k} = 0.0196(T - 4.58173)$ 으로 각 온도에서 최대증식속도상수(k)를 구할 수 있다. Fig. 3은 각 온도에서 균의 성장예측과 MOL 시점을 평방근 모델과 Gompertz모델을 통해 예측한 것으로 실제 실험값과 유사한 것을 볼 수 있으며, 관능적 최소 한계 시점은 10℃, 15℃, 20℃, 25℃에서 각각, 19.41, 5.29, 2.42, 1.38일로 나타났으며, 수식에 의한 6℃에서는 269일로 초기 출고 후 10℃ 미만의 저장 온도를 유지 할 경우, 표시 유통기한인 30일 보다 오래 보존이 가능한 것으로 판단되어 진다.

Table 1. Growth parameters of bacteria in imitation crab sticks by Gompertz model

	10°C	15°C	20°C	25°C
k (hr ⁻¹)	0.014±0.005	0.031±0.003	0.108±0.016	0.156±0.013
LT (hr)	181.7±3.115	43.61±1.890	24.29±3.659	14.862±0.343
GT (hr)	22.79±8.980	9.775±0.840	2.835±0.419	1.937±0.166

k , Maximum specific growth rate; LT , Lag time; GT , Generation time.
mean±s.d. of 3 times replication.

Table 2. Parameters of square root model for prediction of maximum specific growth rate of bacteria in imitation crab sticks.

		Statistical analysis					
		Coefficient	S. E	t-value	P	S. E. of Estimate	R ²
Square root model	T_{\min}	4.5173	1.0315	4.3795	<0.0014	0.0277	0.949
	b	0.0196	0.0014	13.7064	<0.0001		

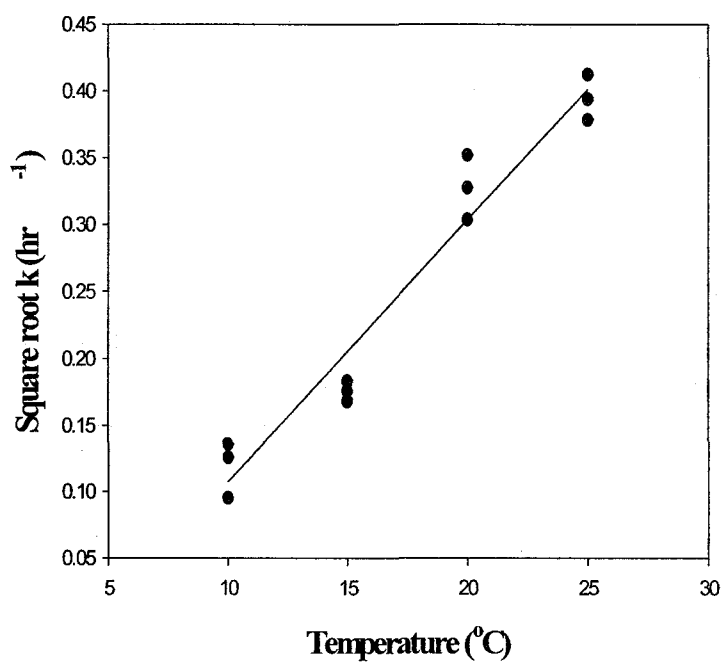


Fig. 2. Comparison of experimental \sqrt{k} and predictive \sqrt{k} by Square root model of bacteria in imitation crab sticks (●, Experimental \sqrt{k} ; —, Predictive \sqrt{k}).

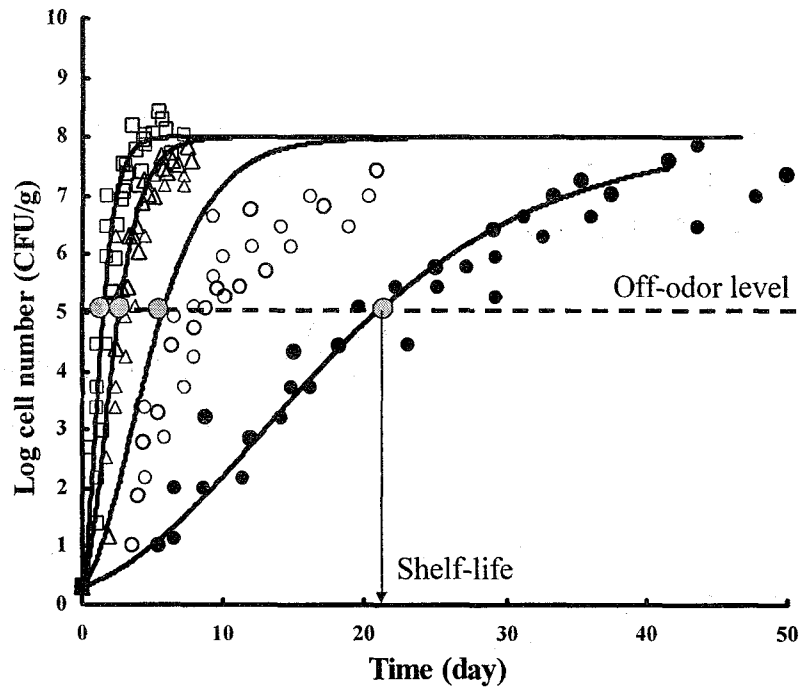


Fig. 3. Shelf-life prediction of packed imitation crab sticks by predictive model (\square , 25°C; Δ , 20°C; \circ , 15°C; \bullet , 10°C; —, Predictive growth curve by Square root model).

라. 결론

앞선 연구의 결과로, 게맛살의 가공 공정 중 가열 살균 처리를 통해 제품내 미생물의 완전 멸균 되지 않으며, *Bacillus subtilis*와 *Bacillus licheniformis*는 제품 내에서 포자를 형성, 잔존하여 일정 온도 조건에서 일정 시간이 지난 후에 영양 세포를 형성한 후, 성장하여 게맛살의 부패를 야기 시키는 것을 알 수 있었다. 게맛살 제품의 시간의 경과에 따른 각 온도에서의 관능적 평가 결과, 게맛살 내의 미생물의 수가 1×10^5 CFU/g 부근에서 최초의 off-odor가 발생하였으며, 1×10^6 CFU/g 부근에서 *B. licheniformis*에 의한 대사산물로서 점질 다당류가 생성되었다. 따라서 off-odor와 점질물에 의해 유통기한을 설정하였으며, 게맛살의 저장 온도와 최대증식속도상수(k)간의 정량 평가모델은 $\sqrt{k} = 0.0196 (T - 4.58173)$ 으로 정량화 하였으며, Square root model에 의한 증식 최저 온도는 4.58로 나타났다. 최대증식속도상수(k)와 유통기한의 관계는 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$\text{shelf-life (hr)} = M - \frac{\ln\left(-\ln\left(\frac{5 - 0.301}{8}\right)\right)}{\frac{k \cdot e}{8}}, \quad M = \frac{\ln\left(-\ln(0.301 - 0.300)\right)}{\frac{k \cdot e}{8}}$$

본 연구로부터 도출된 수식에 따라, 4°C이하로 저장 온도를 유지할 경우, 표시 유통기한보다 훨씬 길 것으로 판단되어지며, 20°C 이상의 상온에서는 2.42일부터 관능적인 이취의 발생이 나타나, 여름철 유통과정 중의 냉장 유지가 필수적인 것으로 나타났다.

마. 참고 문헌

- AOAC, 2000. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists Internal. 16th edition. volume 1.
- Ben Embrarek K, 1994. Microbiological safety and spoilage of sous vide fish product. PhD Thesis. Royal Veterinary and Agricultural University, Frederiksberg, Denmark.
- Dalgaard, P., 1995. Modelling of micro activity and prediction of shelf life for packed fresh fish. Int. J. Food microbiology, 26, 305-317.
- Gram, L., Dalgaard, P., 2002. Fish spoilage bacteria - problems and solutions. Current opinion in Biotechnology, 13, 262-266.
- Kant-Muermans, M.L.T., Stekelenburg, F.K., Zwietering, M.H., Huis in't Veld, J.H.J., 1997. Modelling the Shelf-life of Packed, Cooked Meat Products. World Congress on Food Hygiene, The Hague, pp. 53-57.
- Neumeier, K., Ross, T., McMeekin, T.A., 1997a. Development of a predictive model to describe

- the effects of temperature and water activity on the growth of spoilage pseudomonads. *Int. J. Food Microbiol.* 38, 45-54.
- Neumeyer, K., Ross, T., Thomson, G., McMeekin, T.A., 1997b. Validation of a model describing the effects of temperature and water activity on the growth of psychrotrophic pseudomonads. *Int. J. Food Microbiol.* 38, 55-63.
- Ratkowsky, D.A., Olley, J., McMeekin, T.A., Ball, A., 1982. Relation between temperature and growth rate of bacterial cultures. *J. Bacteriol.* 149, 1-5.
- Ratkowsky, D.A., Lowry, R.K., Mcmeekin, T.A., Stokes, A.N. and Chandler, R.E., 1983, Model for bacterial culture growth rate throught the entire biokinetic temperature range, *J. Bacteriology*, 154, June, 1222-1226.
- Seber, G.A.F and Wild, C.J. 1989, *Nonlinear regression*. John Wiley and Sons, N.Y.
- Vankerschaver, K., Willocx, F., Smout, C., Hendrickx, M., Tobback, P., 1996. The influence of temperature and gas mixtures on the growth of the intrinsic micro-organisms on cut endive: predictive versus actual growth. *Food Microbiol.* 13, 427-440.
- Zwietering, M.H., de Koos, J.T., Hasenack, B.E., de Wit, J.C., van 'T Riet, K., 1991. Modeling of bacterial growth as a function of temperature. *Appl. Environ. Milcobiol.* 57, 1094-1101
- Zwietering, M.H., Cuppers, H.G.A.H., de Wit, J.C., van 'T Riet, K., 1994. Evaluation of data transformations and validation of a model for the effect of temperature on bacterial growth. *Appl. Environ. Milcobiol.* 60, 195-203

제 2 절 예측모델의 computing 기술 적용 및 웹(web) 기반 그래픽 인터페이스 개발

1. 연구수행방법

가. 예측정량평가 모델 프로그램의 운영 형태

병원미생물의 예측 프로그램은 직접 실험의 결과로부터 얻어진 상수 데이터를 이용하여 예측 수식을 작성한 후 이를 프로그램으로 구현하였다. 프로그램은 인터넷에서의 보안 및 호환을 위하여 PC용 UNIX 운영체제인 Linux를 이용하였으며, 서버에서 인터넷에서 사용이 가능한 고급 프로그래밍 언어인 Java 언어를 사용하였다. 파일 입출력 관련 함수는 PHP 언어를 이용하여 구현한 후 이를 Java 프로그램에서 호출하였다. 그래픽 사용자 인터페이스 구현은 Java에서 제공하는 Applet 프로그램을 이용하여 사용자가 웹 브라우저를 이용하여 쉽게 사용이 가능하도록 하였다. 그림 1은 예측정량평가 모델 프로그램의 기본 운영 형태를 보여준다. 그림에서 알 수 있듯이 예측모델은 서버에서 실행이 되며 사용자는 인터넷을 통한 웹 브라우저를 이용하여 모델을 사용한다. 따라서 사용자는 프로그램을 따로 설치하거나 운영할 필요가 없이 인터넷이 연결되어 있는 어떤 컴퓨터에서 기종에 상관 없이 예측모델의 실행이 가능하다.

나. 예측 모델 프로그램 개발

(1) 사용 프로그래밍 언어

예측정량평가모델의 프로그램 개발 환경은 표 1과 같다. 예측 모델 프로그램에서는 인터넷프로그래밍 언어인 Java 프로그래밍 언어를 이용하였다. Java 프로그래밍 언어는 홈페이지에서 직접 프로그램의 호출 가능성이 가능하도록 하기 때문에 예측 모델을 인터넷 홈페이지와 연계하여 구축하였다. 사용자를 관리하고 각 사용자별로 데이터베이스를 구축하고 관리하기 위해서 MySQL을 이용하여 데이터의 체계적이고 안전한 관리가 이루어지도록 하였다. 또한 수치모델의 구현을 위해서는 PHP(Personal Home Page tools)스크립트언어 사용하여 구현하였으며, 이 언어는 이식성이 강하고 코드가 간소화되기 때문에 프로그램을 효율적으로 실행할 수 있다.

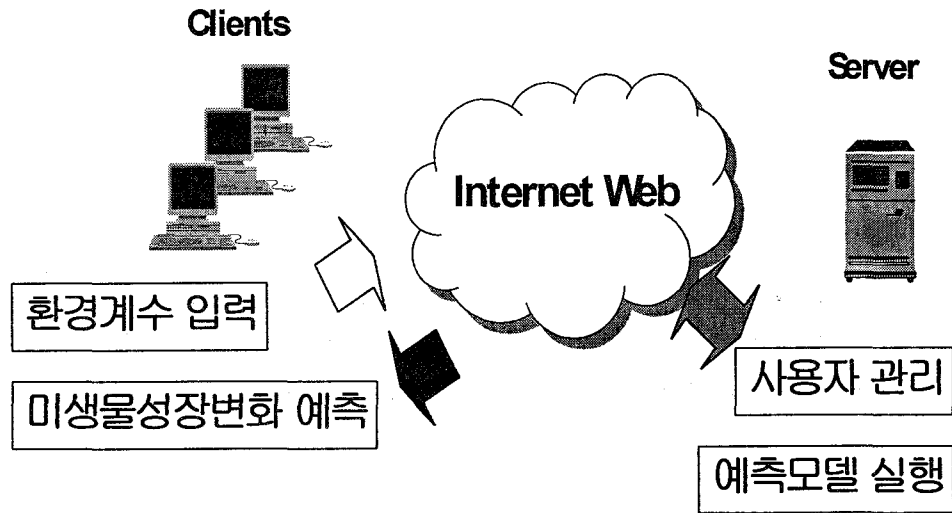


그림 1. 예측정량평가모델의 운영 형태.

표 1. 프로그램 개발 환경

프로그래밍 언어	Php, Java Applet, My SQL
그래픽 개발 툴	Adpbe Photoshop, Dream Weaver
프로그램 개발 운영체제	Linux 2.2.9

(2) 프로그램 개발 환경

프로그램의 개발환경은 일반 Windows 운영체제가 아닌 PC용 UNIX 운영체제인 Linux 운영체제 하에서 개발하였다. 이는 UNIX가 가진 장점을 최대한 활용하여 보안성 및 호환성 강화를 위한 것이다. 사용자는 호스트 컴퓨터에서 웹 브라우저를 통하여 프로그램을 사용하기 때문에 운영체제의 제한이 전혀 없이 간편하게 사용할 수 있다.

(3) 개발방법

(가) 이식성 강화

예측 모델 프로그램은 웹을 기반으로 하는 GUI (Graphic User Interface) 환경을 이용하여 다양한 컴퓨터 플랫폼에서의 이식성을 가질 수 있도록 개발하였으며, 기종에 관계없이 인터넷에 연결된 컴퓨터는 웹 브라우저를 이용하여 프로그램의 이용이 가능하도록 구현하였다.

(나) 사용자 편의 제공

사용자 계정을 부여하여 데이터베이스 보안 및 사용자 각각의 데이터베이스의 구축이 가능하도록 하여 계정을 이용한 다른 사용자의 데이터를 분리하여 편리성 부여하였고, 수치데이터의 직접 입력 및 드래그 버튼을 이용한 화면 입력이 가능하도록 하는 등 다양하고 편리한 그래픽 환경을 이용할 수 있도록 프로그램 개발하였다.

다. 예측 모델 프로그램 정확성 확보

컴퓨터 프로그램의 정확성 확보를 위하여 프로그램의 예측 결과와 실제의 실험 결과의 수치 비교를 통하여 프로그램의 정확성을 검토하였고 이를 기반으로 프로그램을 수정하여 최종적으로 정확성을 확보하였다.

라. 프로그램의 구성

예측정량평가모델은 *Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*, 게맛살 부패세균 등에 대하여 각각의 주어진 인자값에 대하여 병원미생물의 변화를 수식을 이용한 그래프로 보여주는 프로그램이다. 그래픽 인터페이스는 웹기반을 사용하므로 인터넷으로 연결된 어느 컴퓨터에서도 웹 브라우저를 사용하여 예측정량평가모델을 사용할 수 있다. 그림 2는 예측정량평가모델의 구성을 보여 준다. 최초에 로그인을 하여 프로그램을 시작하고, 로그아웃을 통하여 프로그램을 종료하며, *L. monocytogenes*, *V. parahaemolyticus*, 게맛살 부패세균

등의 균류에 대한 예측 모델을 사용할 수 있다. 그래픽 화면에서 각 모델은 통일된 고유의 색으로서 구분하였으며, 각 모델에서의 구성 요소는 크게 다음과 같다.

- 개요: 모델에 대한 개요 설명
- 실험방법: 수치를 얻기 위한 실험 방법에 대한 설명
- 인자값: 수치모델에서 사용되는 각 인자값에 대한 설명
- 수치모델: 인자값을 입력하고 결과를 알 수 있는 그래픽 화면

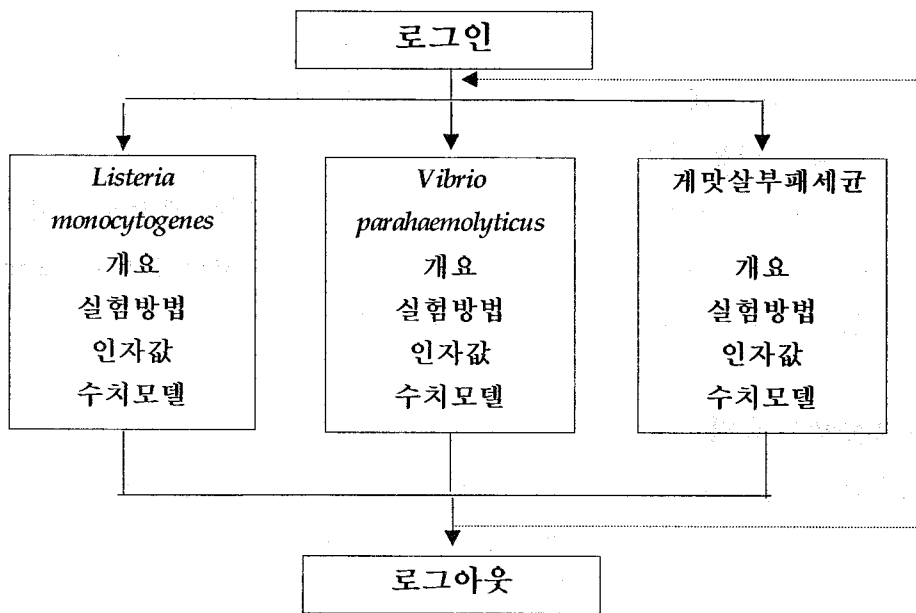


그림 2 예측정량평가모델의 프로그램 구성도.

2. 연구결과 및 고찰

가. 로그인과 초기화면

연구결과에서는 예측정량평가모델의 각 프로그램의 주요 코드와 실행화면을 이용하여 프로그램 구현에 대한 연구 결과를 보여준다. 그림 3은 사용자의 로그인 화면을 보여 준다. 사용자는 등록된 사용자 아이디와 비밀번호를 이용하여 등록된 사용자임을 확인 받은 후에 모델 프로그램을 사용 할 수 있게 되며, 각 사용자별로 별도의 데이터베이스를 구축하여 다른 사용자의 사용과는 관계없이 모델을 이용할 수 있다. 사용자의 등록을 위해서는 시스템의 보안을 위하여 오프라인을 이용하여 시스템 관리자가 등록을 한 후에 사용자에게 통보하면 사용이 가능하다. 또한 인터넷을 이용하여 프로그램을 실행하기 때문에 동시에 여러 사용자가 실행할 수 있는 다중사용자의 기반을 제공한다.

로그인 후에는 그림 4와 같은 초기 화면으로 이동한다. 이 초기 화면은 예측정량평가모델의 기본적인 개요를 소개하며 이 화면에서 각 균류 모델을 선택할 수 있다. 또한 이 초기 화면은 각 모델의 사용 중에 언제나 돌아 올 수 있다.

그림 5는 *L. monocytogenes*, *V. parahaemolyticus*, 두부 부패균, 계맛살 부패세균 중 하나의 균류 모델을 선택할 수 있는 화면을 보여 준다. 각 균류 모델에서 다른 균류 모델로 전환할 경우에는 초기 화면으로 돌아 올 필요 없이 각 모델에서 다른 모델로 전환할 수 있다.

나. *L. monocytogenes* 모델

그림 6과 7은 각각 *Listeria monocytogenes*에 대한 모델의 개요 및 실험방법에 대한 설명을 하는 화면을 보여 준다. 모든 화면은 기본적으로 동일한 형태로 구성되며 사용 중에 다른 모델을 선택하면 쉽게 전환할 수 있다.

그림 8은 *L. monocytogenes*의 수치 모델에서 사용되는 각 인자값을 설명하며, 그림 9는 이 인자값은 입력하여 결과를 예측할 수 있는 화면이다. 온도와 pH를 입력하면 시간의 변화에 따른 Log CFU/g의 값을 보여준다. 또한 GT(세대기간), LT(유도기시간), 최대균수에 도달하는 시간을 값으로 보여준다. 온도와 Ph 값은 입력 오류를 줄이기 위하여 주어진 구간내의 값을 선택할 수 있으며 이 값은 사용자별로 저장이 된다. 그림 10은 *Listeria monocytogenes* 수치 모델을 계산하기 위한 주요 코드이다.

다. *V. parahaemolyticus* 모델

그림 11, 12, 13은 *V. parahaemolyticus* 모델의 개요, 실험방법, 각 인자값 등을 설명하는 화면을 나타낸다. 그림 14는 *V. parahaemolyticus*의 수치 모델을 이용할 수 있는 화면이다.

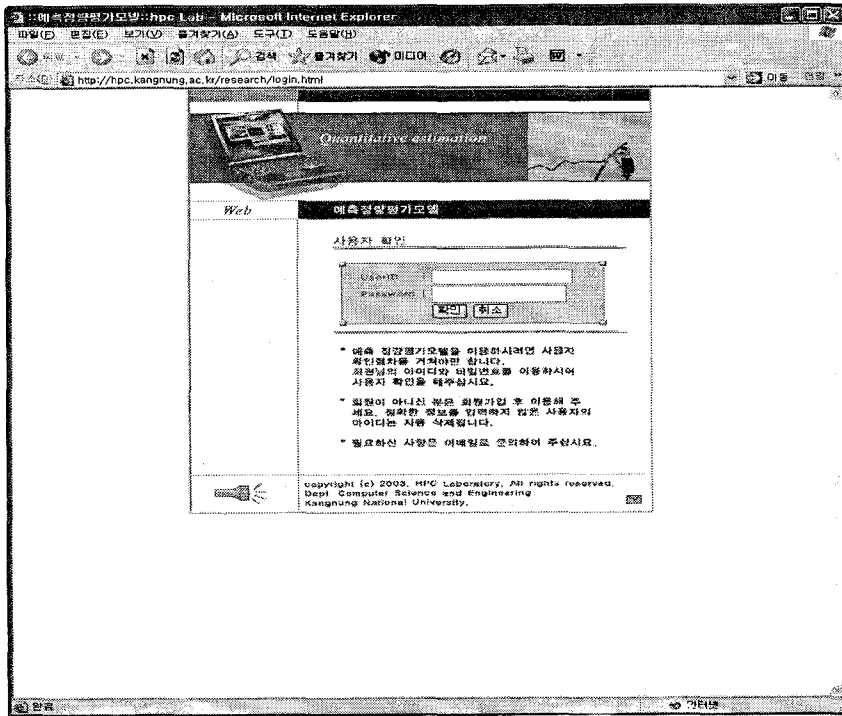


그림 3. 로그인 화면.

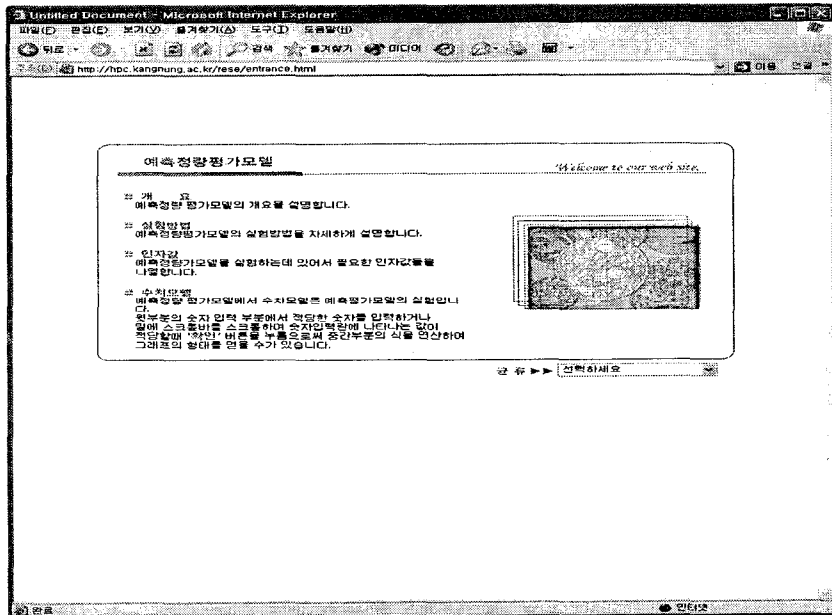


그림 4. 초기 화면.

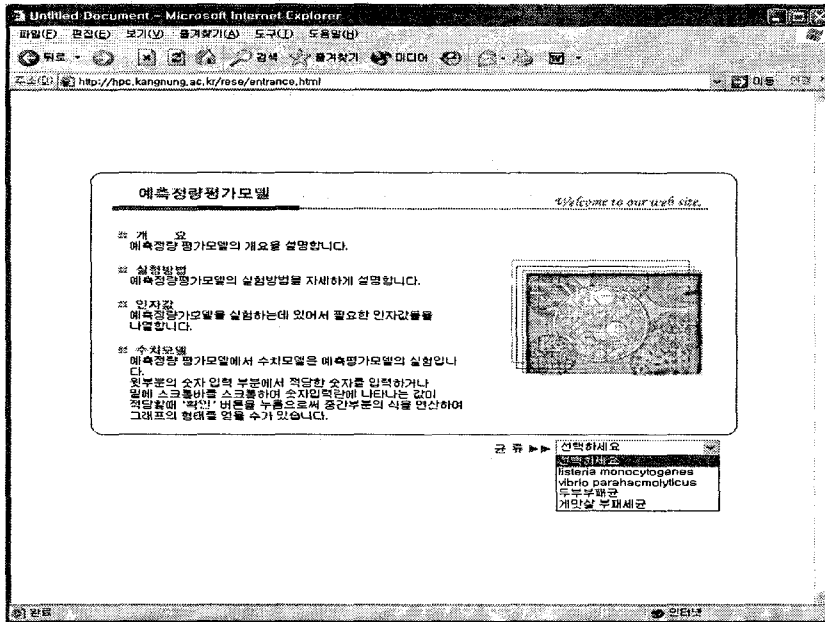


그림 5. 모델의 선택.

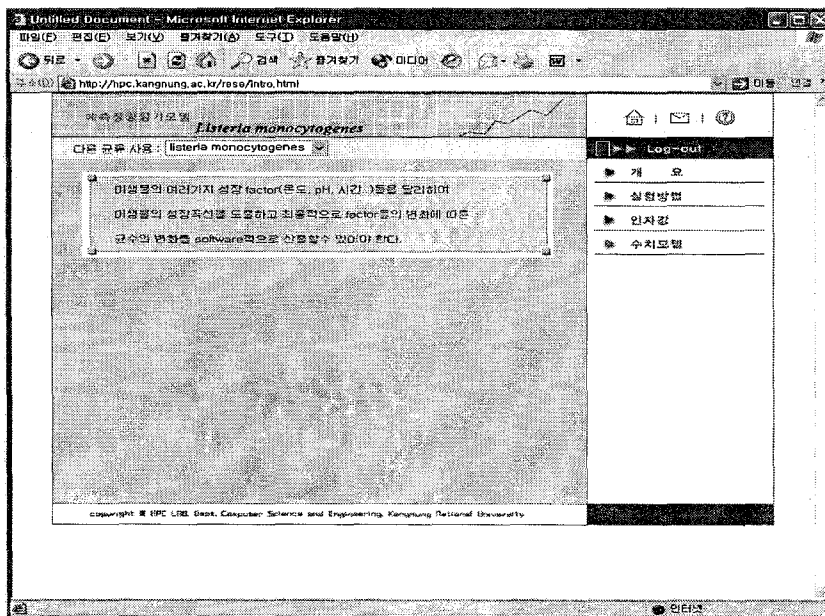


그림 6. *L. monocytogenes* 모델의 개요.

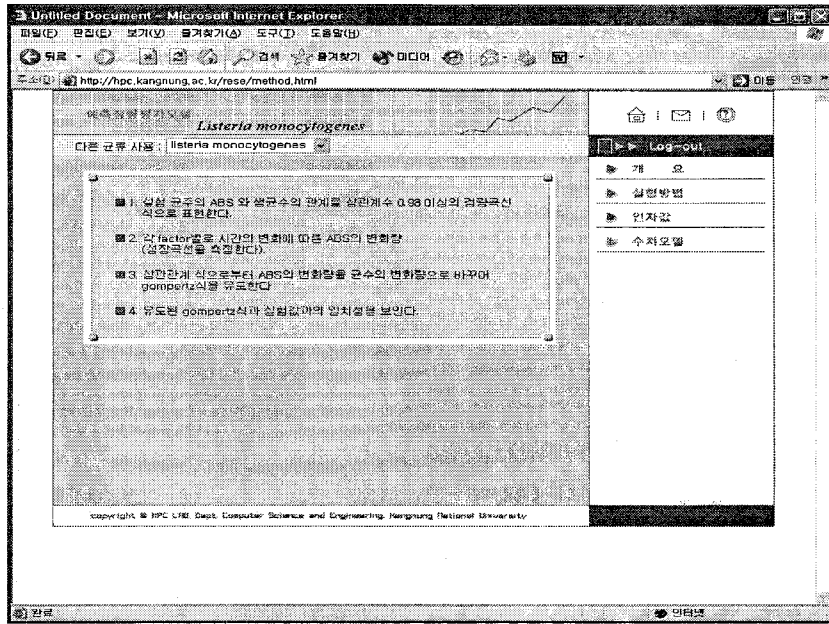


그림 7. *L. monocytogenes* 모델의 실험방법.

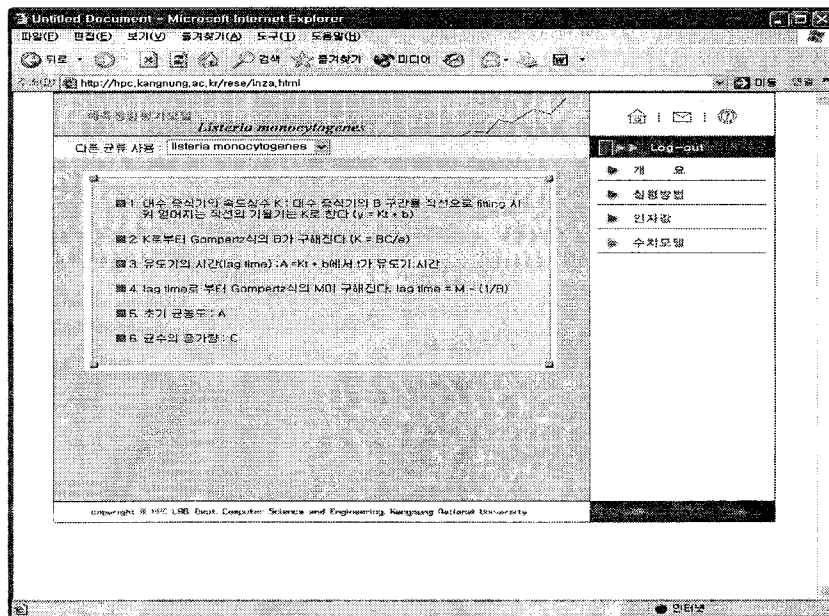


그림 8. *L. monocytogenes* 모델의 인자값.

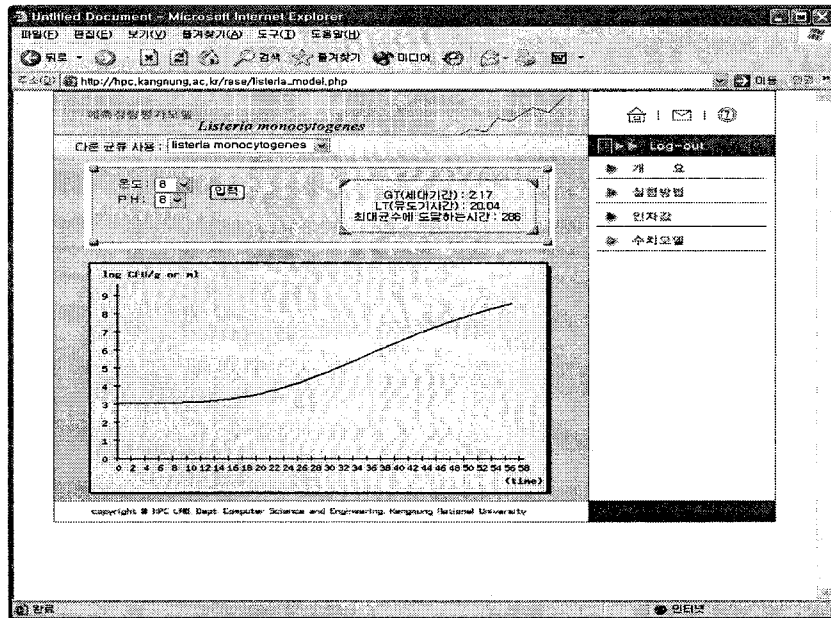


그림 9. *L. monocytogenes* 수치모델.

```

$temp = $nums[0];
    $ph = $nums[1];
    $log_cnt = 3;

    $k = -0.7489+0.005884*$temp+0.105*$ph;
    $first_cnt = 1000;

    $low_A = log10($first_cnt-1);
    $inc_C = 9 - $low_A;

    $e = 2.718;
    $B = $k*$e/$inc_C;

    $M = (log(-log(($log_cnt-$low_A)/$inc_C)))/$B;

    $temp_G = (log10(2))/$k;
    $temp_L = $M - (1/$B);

    $G = intval($temp_G*100)/100;
    $L = intval($temp_L*100)/100;

    $A= (($low_A*10000)-((($low_A*10000)-intval($low_A*10000))))/10000;
    $C = 9-$A;

    for($i=0; $i<1000 ; $i++){
        $temp_t = $A + ($C*(exp(-exp(-$B*( $i-$M)))));
        $T = $i;
        if($temp_t > 8.999999)
            break;
    }

```

그림 10. *L. monocytogenes* 수치 모델 코드.

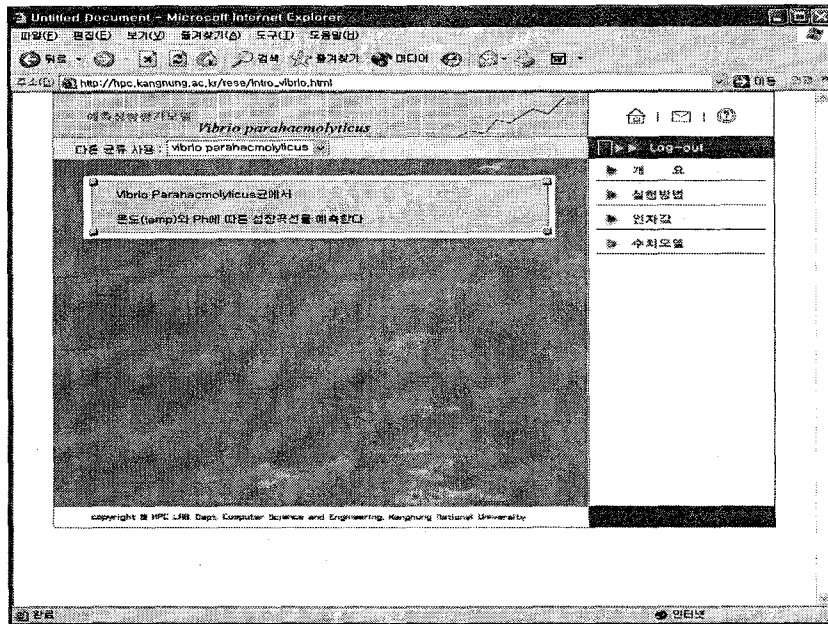


그림 11. *V. parahaemolyticus* 모델의 개요.

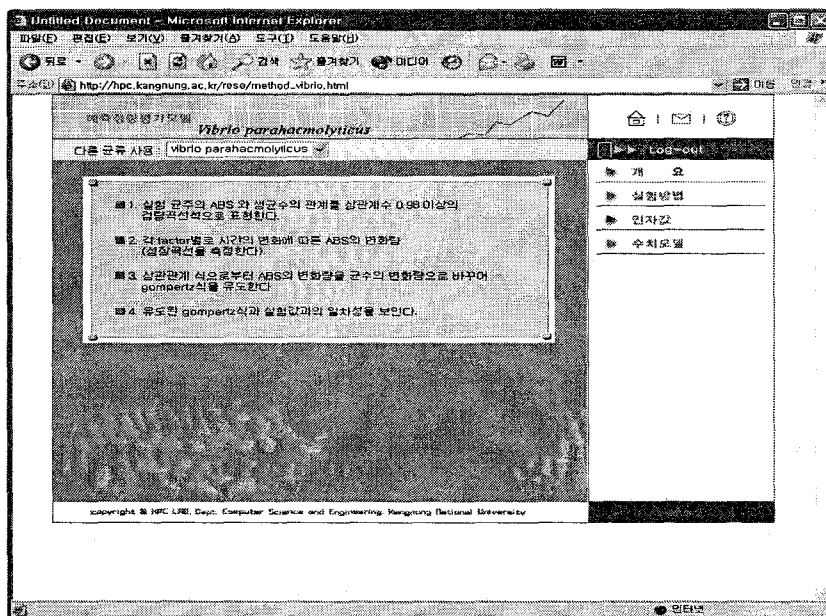


그림 12. *V. parahaemolyticus* 모델의 실험방법.

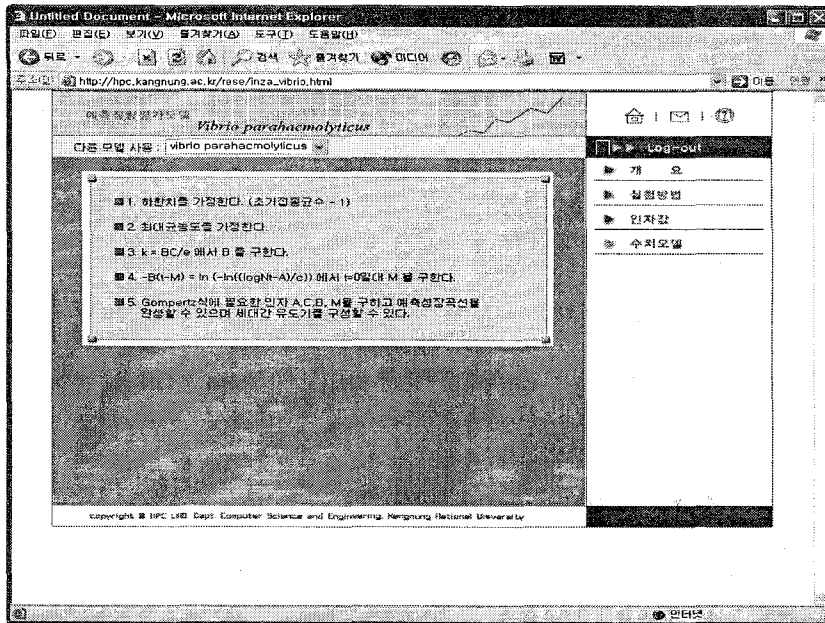


그림 60. *V. parahaemolyticus* 모델의 인자값.

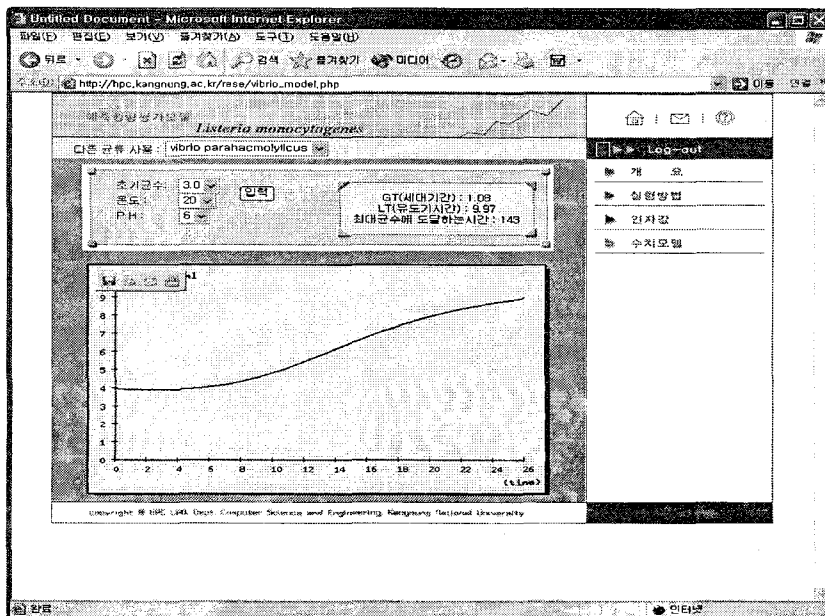


그림 14. *V. parahaemolyticus* 모델의 수치모델.

여기서는 최초균수, 온도, pH등을 입력하면 시간의 변화에 따른 Log CFU/g의 값에 대한 그래프를 볼 수 있다. 또한 *L. monocytogenes* 모델과 마찬가지로 GT(세대기간), LT(유도기시간), 최대균수에 도달하는 시간을 값으로 보여준다. 그림 15는 *V. parahaemolyticus* 수치 모델을 계산하기 위한 주요 코드이다.

라. 게맛살 부패균 모델

그림 16, 17, 18은 게맛살 부패세균 모델의 개요, 실험방법, 인자값을 설명하는 화면을 각각 나타낸다. 그림 19는 게맛살 부패세균의 수치 모델을 이용할 수 있는 화면이다. 초기균수와 온도를 입력하면 시간의 변화에 따른 Log CFU/g의 값에 대한 그래프를 볼 수 있으며, 또한 GT(세대기간), LT(유도기시간), 최대균수에 도달하는 시간을 값으로 볼 수 있다. 그림 20은 게맛살 부패세균의 수치 모델을 계산하기 위한 주요 코드이다.

마. 종료화면

그림 21은 모델 실행의 종료를 할 수 있는 로그아웃화면이다. [확인] 버튼을 누르면 그림 3의 예측정량평가모델을 사용할 수 있는 화면으로 이동한다.


```

        $log_cnt = $nums[0];
        $temp = $nums[1];
        $ph = $nums[2];

        if($log_cnt==2){
            $k =
-0.998+0.6587*$ph+0.04328*$temp;
            $first_cnt = 100;
        }
        else if($log_cnt==3){
            $k = -0.766+0.02308*$ph+0.04526*$temp;
            $first_cnt = 1000;
        }else{
            $k = -0.768+0.06333*$ph+0.03036*$temp;
            $first_cnt = 10000;
        }

        $low_A = log10($first_cnt-1);
        $inc_C = 9 - $low_A;

        $e = 2.718;
        $B = $k*$e/$inc_C;

        $M = (log(-log(($log_cnt-$low_A)/$inc_C)))/$B;

        $temp_G = (log10(2))/$k;
        $temp_L = $M - (1/$B);

        $G = intval($temp_G*100)/100;
        $L = intval($temp_L*100)/100;

        $A=($low_A*10000)-(($low_A*10000)-intval($low_A*10000))/10000;
        $C = 9-$A;

        for($i=0; $i<1000 ; $i++){
            $temp_t = $A + ($C*(exp(-exp(-$B*(($i-$M))))));
            $T = $i;
            if($temp_t > 8.999999)
                break;
        }

```

그림 15. *V. parahaemolyticus* 수치 모델 코드.

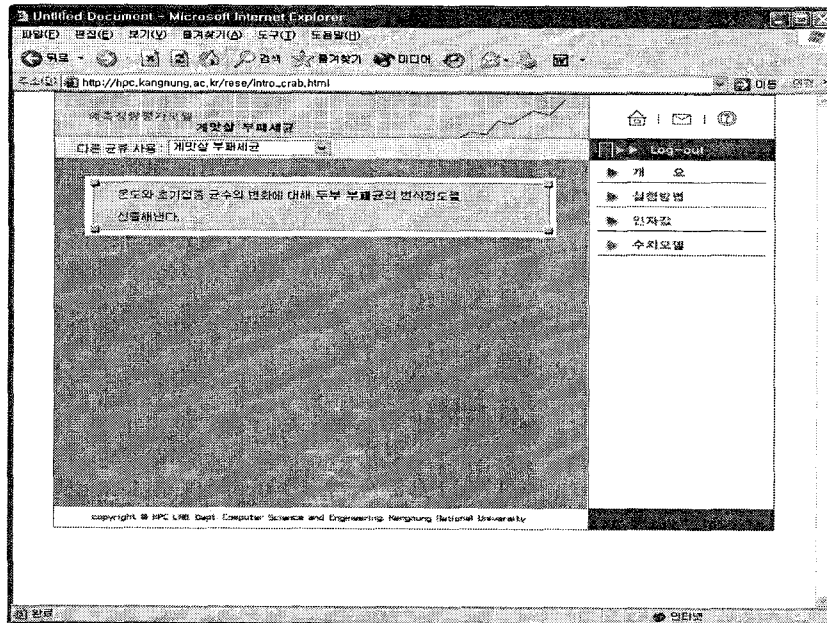


그림 16. 계맛살 부패세균 모델의 개요.

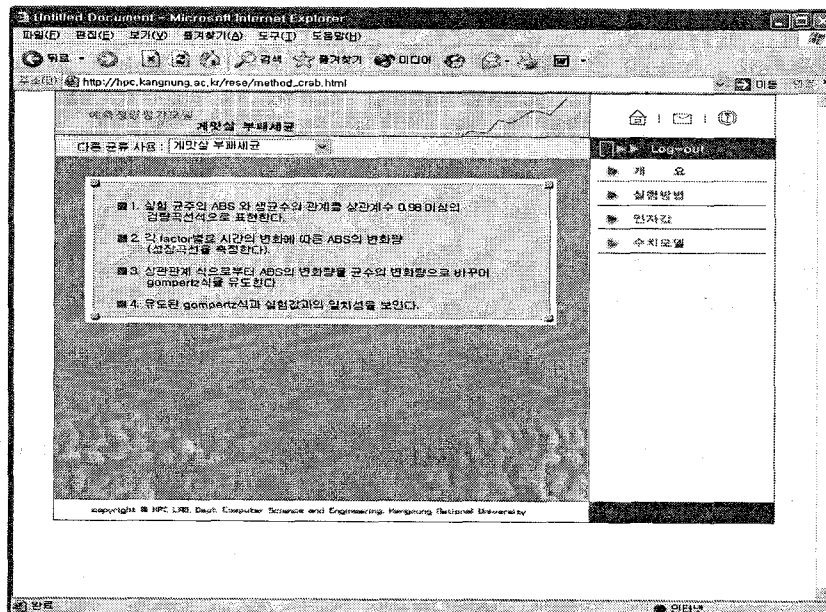


그림 17. 계맛살 부패세균 모델의 실험방법.

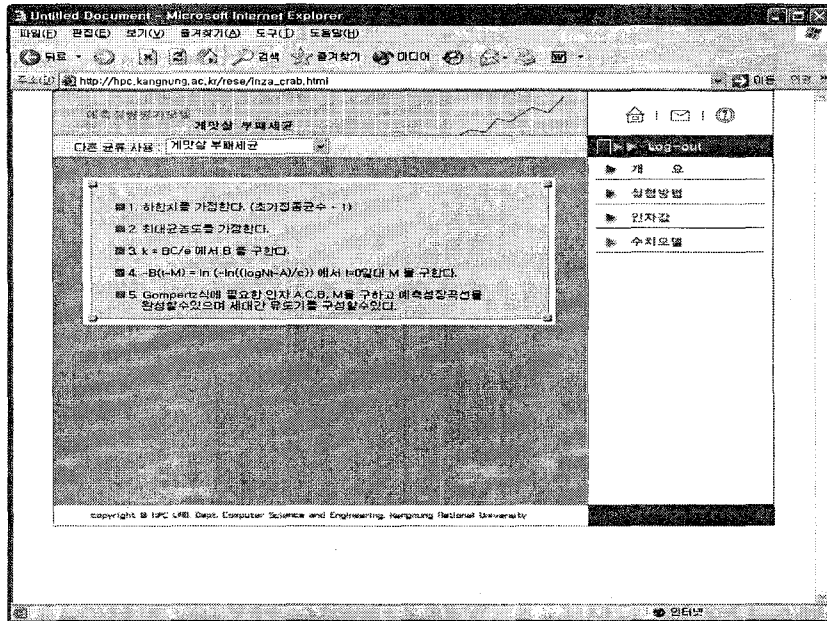


그림 18. 게맛살 부패세균 모델의 인자값.

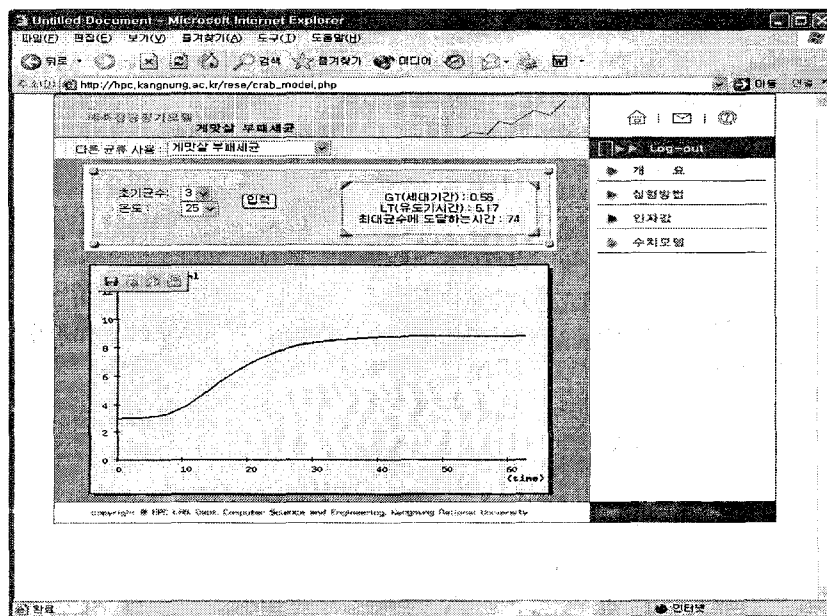


그림 19. 게맛살 부패세균의 수치모형.

```

if ($nums[0] == 1) $first_cnt = 10;

else if($nums[0] == 2) $first_cnt = 100;

else $first_cnt = 1000;
    $temp = $nums[1];
    $log_cnt = log10($first_cnt);
    if($log_cnt == 1){
        $k = (0.0304*($temp-6.0380));
    }
    else if($log_cnt == 2){
        $k = (0.0299*($temp-6.1617));
    }

else $k = (0.0261*($temp-4.4746));
    $low_A = log10($first_cnt-1);

$inc_C = 9 - $low_A;
    $e = 2.718;
    $B = $k*$e/$inc_C;
    $M =
log((-log(($log_cnt-$low_A)/$inc_C))/ $B);

$temp_G = log10(2)/$k;

$temp_L = $M - (1/$B);

$G = intval($temp_G*100)/100;

$L = intval($temp_L*100)/100;

$A=((($low_A*10000)-((($low_A*10000)-intval($low_A*10000))
)/10000;

$C = 9-$A;

for($i=0; $i<1000 ; $i++){
    $temp_t = $A +
($C*(exp(-exp(-$B*( $i-$M)))));
    $T = $i;
    if($temp_t > 8.999999)
        break;
}

```

그림 20. 게맛살 부패세균의 수치 모델 코드.

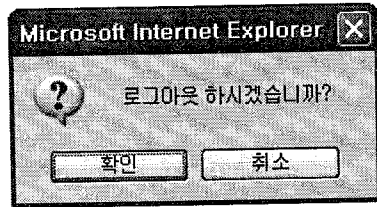


그림 21. 종료화면.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발 목표의 달성도

연구수행 년차	연구목표	연구 결과	목표달성도 (%)
1 차년도 (2001년)	병원미생물의 환경인자별 정량평가모델의 개발	<ul style="list-style-type: none"> ● <i>Vibrio sp.</i>, <i>Listeria sp.</i> 등에 대한 증식예측 모델 완성 ● 증식에 영향을 미치는 환경인자인 온도, pH, 등에 대한 병원미생물의 생장예측모델 완성 ● 예측 정량평가모델의 개발 완료 	100
	병원미생물에 대한 수치계산 모델 및 표준 소프트웨어의 기본 Tool 개발	<ul style="list-style-type: none"> ● 병원미생물의 증식 예측 모델에 따른 환경 인자별 컴퓨터 계산 모델의 완성 ● 컴퓨터의 기종에 관계없이 인터넷에서 사용이 가능하도록 웹을 기반으로 하는 GUI (Graphic User Interface) 환경 구축 완성 	100
2 차년도 (2002년)	예측 정량평가 모델의 개량 및 database 구축	<ul style="list-style-type: none"> ● <i>Vibrio sp.</i>, <i>Listeria sp.</i> 등에 대한 복합 환경인자별 병원미생물의 예측정량평가모델의 개선 및 확립 ● 제조현장의 환경인자인 온도, pH, 등에 대한 병원미생물의 생장예측모델 완성 ● 포장연제품에 대한 예측정량평가모델의 각 parameter에 미치는 영향의 수치화 및 database 구축 완성 	100
	예측 정량평가 모델의 프로그래밍 및 표준 소프트웨어의 개발	<ul style="list-style-type: none"> ● 수치모델 표현 시 속도 개선 ● mySQL 데이터베이스 사용으로 인한 데이터의 체계적이고 안전한 관리 ● PERL(Practical Extraction and Report Language) 스크립트 언어에서 PHP(Personal Home Page tools) 스크립트 언어 사용으로 인한 코드 간소화 및 수치모델의 보다 더 정확한 표현 	100
3 차년도 (2003년)	표준소프트웨어의 현장 적용 및 시뮬레이션	<ul style="list-style-type: none"> ● 포장연제품의 부패균을 분리하고 부패균의 환경인자(초기 균수, 온도)에 따른 균의 최대 증식 속도상수를 polynomial model을 이용해 나타내었다. ● 포장연제품에 부패세균을 접종하여 환경 인자(초기 균수, 온도 : 15, 20, 25℃, pH : 7)의 변화에 따른 최대 증식 속도 상수, 유도기, 세대 시간을 구하고, 균의 증식 지표인 최대 증식 속도상수 미치는 환경인자의 영향을 모델화 하였다. ● 부패세균의 각 초기 균수별 최대증식 속도에 미치는 영향을 polynomial model을 이용해 정량화하였다. 	100
	웹기반 그래픽 인터페이스 개발	<ul style="list-style-type: none"> ● 표준소프트웨어를 개발하여 웹서버를 운용하고 있음 ● 프로그램의 개선이 용이하도록 Linux system을 이용한 소프트웨어를 개발하였음 	100

제 2 절 관련분야에의 기여도

식품의 미생물학적 안전성을 확보하기 위해서 최근 또 하나의 새로운 흐름으로서 식품 중에서의 미생물의 증식, 생산 및 사멸을 수학 모델을 이용하여 정량적으로 해석, 예측하는 연구가 특히 구미에서 많이 이루어지고 있다. 이 새로운 연구분야는 **예측식품미생물학 (Predictive Food Microbiology)**이라고 불리며, 각종 조건 하에서 식품 중의 미생물의 거동을 예측할 수 있는 해석수단으로서의 가치가 인정되고 있다.

예측식품미생물학의 발달과 함께 병원미생물에 오염된 식품을 섭취하는 것에 의한 감염의 Risk(위험도)를 정량적으로 평가하고자 하는 움직임이 구미 각국에서 시작되어, FAO (Food and Agricultural Organization)/WHO (World Health Organization) 합동의 CODEX 위원회(CODEX Alimentarius Commission)에서는 그 guide line의 작성이 진행 중에 있다.

식품유래의 병원미생물에 의한 위해성을 정량화 하려는 연구는 식품 안전상 관심도가 높은 *S. enteritidis*, *L. monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7의 3 균종을 대상으로 수행되고 있으며, Brown 등은 계육제품에 의한 *Salmonella* 감염증에 대하여 컴퓨터 그래픽으로 표현할 수 있는 정량적 평가모델을 개발하였다. 이는 미생물학적 위해성을 평가하는 종합적인 전문 프로그램으로서는 최초라 할 수 있다.

국내의 경우, 수산가공 식품을 포함한 전체 식품중의 병원미생물을 대상으로, 그 성장변화에 미치는 환경인자의 영향에 대하여 일반적인 연구 결과는 있으나, 관련 병원미생물을 대상으로 각 요인의 어느 범위 내에서의 각각의 값에 대응하는 균의 반응을 정량적으로 해석하는 수치계산 모델 및 예측 프로그램 개발에 관한 연구는 아직까지 보고된 바 없으며, 또한 예측프로그램을 일반 사용자가 PC상에서 손쉽게 이용할 수 있도록 하는 소프트웨어의 개발은 전무한 상태이다.

한편 외국 연구사례의 대부분이 제한된 미생물을 대상으로 한 정량평가모델이 개발, 또는 개발 중에 있으며, 그 적용 식품도, 육류, 유가공품, 난제품 등에 한정되어 있고 수산가공식품, 특히 포장연제품에 관한 연구는 찾아보기 어려운 실정이다. 선진국이 막대한 비용을 투자하여 식품의 안전성 확보를 위한 연구개발을 서두르고 있는 현재, 국내의 현실은 경비문제로 이에 크게 미치지 못하고 있는 실정이며 HACCP 시스템 도입 이전에 경비 절감과 동시에 식품의 안전성을 보장 할 수 있는 대체 방안이 절실히 요구되고 있다. 그러한 대체 방안으로서 가장 유효한 수단이 「식품 관련 미생물에 대한 수학적 정량 평가 모델」의 적용이다. 수산가공식품 중 튀김어묵은 튀김시의 가열온도가 100℃ 이상으로 이 과정에서 대부분의 미생물이 사멸되며, 통조림식품도 가열살균공정만 확실히 관련되면 미생물에 의한 오염은 거의 없다. 그러나 포장연제품은 증자나 살균온도가 100℃ 이하로서 비교적 저온으로 고온성 세균의 생산이 예상되며, 냉각이나 유통의 경우, 10℃ 이하를 유지하지 않으면 저온

성병원미생물에 의한 오염의 기회가 상당히 높다. 따라서 포장연제품 관련 병원미생물의 예측 정량평가모델 및 PC용 software 개발에 관한 연구가 절실히 필요한 실정이다.

전 세계적으로 현재 개발되고 있는 정량평가 모델의 대부분이 미생물 배지 상에서 각종 환경요인을 변화시킨 조건에서 data를 해석하고 개발한 것이다. 또한 몇몇 식품제조현장 적용모델의 경우에도 자국의 필요성에 따라 대상 식품재료 및 병원 균주가 일부에 국한되어 있다. 따라서 앞으로는 다양한 종류의 식품과 각 식품의 특성을 고려한 예측모델의 개발이 필요하다. 이에 국내의 경우에는 미국과 유럽의 관심도가 비교적 낮으면서도 우리 식생활에서는 중요한 위치를 차지하는 수산가공 식품을 대상으로 차별화 된 현장적용 모델의 개발이 요구된다.

본 연구가 성공적으로 이루어진다면

첫째, 각종 식품의 종류별 특성을 고려한 예측 프로그램을 개발할 수 있으며,

둘째, 국내 최초의 고유기술 개발로 인한 관련 연구의 활성화에 기여할 수 있다.

셋째, 또한 금후 HACCP 시스템의 전면적 시행에 있어서 HACCP 시스템의 단점을 보완하고, 기준 근거를 제공할 수 있으며,

넷째, 정보화 기술의 도입에 있어서 뒤떨어진 식품 산업분야에 새로운 자극이 될 수 있으며, 국내 정보화 관련 전문가에 대한 새로운 아이템 제공의 계기가 될 것이다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 핵심기술 또는 연구결과

가. 포장연제품의 병원미생물에 대한 예측프로그램 개발 및 serve 운영

- 포장연제품 실제 가공 공정상의 환경인자 값의 변화를 추적하고, 예측 프로그램에 의해 특정 병원미생물의 생장을 PC를 통하여 연속적으로 모니터링
- 적용대상 식품의 확대 및 이에 따른 모델 개발과 예측프로그램의 개량을 도모

나. 포장연제품의 부패미생물에 대한 예측프로그램 개발 및 serve 운영

- 포장연제품의 유통상의 환경인자 값의 변화를 추적하고, 예측 프로그램에 의해 유통기한을 예측
- 미생물학적 미스 제품에 대한 Recall 예측 가능
- 적용대상 식품의 확대 및 이에 따른 모델 개발과 예측프로그램의 개량을 도모

다. 포장연제품의 신제품 개발 시 가공공정의 미생물학적 조건 설정 가능

- 신제품 개발 시 병원미생물의 살균조건을 컴퓨터 프로그램으로 예측 가능
- 신제품의 유통조건을 컴퓨터 프로그램으로 예측 가능

2. 산업재산권 (특허출원예정)

- *V. parahaemolyticus*의 성장예측 프로그램
- *L. monocytogenes*의 성장예측 프로그램

3. 논문게재

- 수학적 모델을 이용한 *Listeria monocytogenes*의 성장 예측
- 수학적 모델을 이용한 *Vibrio parahaemolyticus*의 성장 예측
- 수학적 모델을 이용한 포장연제품의 유통기한 예측 (SCI 논문 투고 준비 중)

4. 학회발표

- 한국식품과학회 5건 발표
- 한국수산학회 3건 발표

5. 활용방안

- 포장연제품을 대상으로, 실제 가공 공정상의 환경인자 값의 변화를 추적하고, 예측 프로그램에 의해 특정 병원미생물의 생장을 PC를 통하여 연속적으로 모니터링 한다.
- 적용대상 식품의 확대 및 이에 따른 모델 개발과 예측프로그램의 개량을 도모한다.
- 관련 기술의 특허 획득을 통한 고유 기술 확보
- 학내 벤처기업의 설립과 예측 프로그램의 제품화
- 전문 인력의 양성과 관련업체로의 고용확대
- 필요로 하는 업체에 대하여 생산 제품과 가공공정에 적합한 예측프로그램의 개발 및 제품화 → 현장이용자에 대한 교육 → 생산공정 가동 시에 실시간으로 모니터링 → 결과 보관 →오염사고 시에 대비
- 기술 및 Know how 축적을 통한 제품 및 기술 수출

6. 기대효과

최근에 들어, 전 세계적으로 병원미생물에 의한 식중독 사건이 확대됨에 따라 식품의 안전성에 관한 국제적 규제가 강화되고 있다. 우리나라의 경우 전체 식품 수출량 중에서 차지하는 수산물의 비중과 원재료의 특성상 다른 식품에 비해 병원 및 병원미생물에 의한 오염 확률이 높은 점등을 고려 할 때, 수산 가공식품의 미생물학적 안전성 확보는 제조회사의 존폐까지도 결정 할 수 있는 중요한 문제이다. 이에 본 연구의 성과가 수산가공식품 관련 산업과 경제에 미치는 기대 효과를 요약하면 다음과 같다.

- 기존의 미생물학 안전성 확인을 위해 반복되는 미생물 접종시험·보존시험에 소요되는 시간, 인력, 경비를 절감 할 수 있다.
- 제품의 안전성 문제로 인한 무역 마찰 시에 미생물학적 안전성에 대한 객관적 기준을 제시 할 수 있다. → 리콜에 의한 피해 감소
- 미생물의 정량적 평가 자료를 제시함으로써 정밀한 CCP를 설정할 수 있어 HACCP 시스템의 도입시 경비 절감이 가능하다.
- 제조과정 중에 문제가 발생하였을 경우, 재활용 가능성 혹은 전량 폐기 여부를 결정하는데 결정적인 역할을 담당한다.
- 생산 및 수출의 안정성 확보와 이로 인한 관련 종사자의 고용 안정은 물론이며 수산 가공식품 산업 전반의 안정적 발전과 활성화에 기여할 것이다.

가. 정량적

- 총 매출액 2,500억, 총 수출액 1,300억 (2001년) 의 어육연제품의 미생물학적 안전성 확보

나. 정성적

- 포장연제품의 미생물학적 안전성 확보 → 국민건강 증진
- 전문 인력의 양성과 관련업체로의 고용확대
- 필요로 하는 업체에 대하여 생산 제품과 가공공정에 적합한 예측프로그램의 개발 및 제품화
- 생산공정 가동 시에 실시간으로 모니터링 → 결과 보관 → 오염사고 시에 대비

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 연구사례의 조사

가. 제외국

식품 중의 병원 및 부패미생물에 의한 건강피해는 과학적 기술이 진보한 현대에 있어서도 여전히 세계적으로 중요한 문제이다. 그 배경으로서 계란을 매개로 한 *Salmonella Enteritidis*, 최근 일본을 강타한 장관출혈성대장균 O157:H7에 의한 식중독 사건의 세계적인 발생 및 특히 구미에서 문제가 되고 있는 식품을 원인으로 한 *Listeria monocytogenes*에 의한 집단감염 사례 등이 있다^{7,8)}.

이와 같은 상황에서 식품의 미생물학적 안전성을 확보하기 위해서 최근 또 하나의 새로운 흐름으로서 식품 중에서의 미생물의 증식, 생장 및 사멸을 수학 모델을 이용하여 정량적으로 해석, 예측하는 연구가 특히 구미에서 많이 이루어지고 있다^{9,10,11,12)}. 이 새로운 연구분야는 예측식품미생물학(Predictive Food Microbiology)이라고 불리며, 각종 조건 하에서 식품 중의 미생물의 거동을 예측할 수 있는 해석수단으로서의 가치가 인정되고 있다. 이 같은 예측식품미생물학의 발달과 함께 병원 및 병원미생물에 오염된 식품을 섭취하는 것에 의한 감염의 Risk(위험도)를 정량적으로 평가하고자 하는 움직임이 구미 각 국에서 시작되어, FAO(Food and Agricultural Organization)/WHO (World Health Organization) 합동의 CODEX 위원회(CODEX Alimentarius Commission)에서는 그 guide line의 작성이 진행 중에 있다¹³⁾.

(1) 예측미생물학의 흐름과 예측모델의 작성 및 검증

예측미생물학은 품질보존의 측면에서 생선식품의 미생물에 의한 변패 예측과, 안전성의 측면에서 식중독균의 발육에 미치는 환경요인의 영향에 관한 2가지의 분야에 대하여 1960년 이후의 연구에 의하여 축적된 지식을 기초로 발전하여 왔다¹⁴⁾. 전자는 어패류, 식육 및 우유의 냉장온도와 보존기한의 관계 해명으로부터 출발하였고, Australia, Canada, 미국 중서부의 대학 등에서 주로 연구가 진행, Ratkowsky 등이 먼저 균의 발육속도와 온도와의 관계의 모델식을 발표하였다¹⁵⁾. 후자는 소시지나 어육 중의 식중독균의 거동 혹은 독소생산에 미치는 온도, pH, 수분활성 등의 영향에 대해서 거의 같은 시기부터 주로 영국의 식품관계 연구기관이나, 미국의 대학에서 연구가 진행되고 있다. Software가 실용화된 것은 병원균을 주 대상으로 한 영국의 Food Micromodel⁴⁾과 미국의 Pathogen Modeling Program³⁾이다. Food Micromodel과 Pathogen Modeling Program에서는 1차 모델식에 Gompertz가

1825년에 인구동태의 조사결과를 경험식으로서 제시한 Gompertz관수를 적용시키고 있지만¹⁶⁾, 그 후 Baranyi 등의 개변식¹⁷⁾을 영국에서는 이용하고 있다. 그러나, 이 식을 그대로 적용하는 경우에는 최적발육온도보다도 높은 온도역에의 외삽, 혹은 발육하한에 가까운 온도역에서는 실험치와의 적합성이 나빠지기 때문에, Ratkowsky 등은 카고시마 대학의 太田과 平原의 논문¹⁸⁾에 힌트를 얻어 평방근 모델을 제창하고, 또 영국 유니레바 연구소의 group은 Arrhenius식으로부터 얻은 Schoolfield의 식¹⁶⁾을 채용하고 있다. 그러나 수산가공식품에서 문제가 되는 병원미생물을 대상으로 한 수치 예측 모델식에 관한 연구는 찾아보기 힘들다.

(2) 식품에의 적용

식품유래의 병원미생물에 의한 위해성을 정량화 하려는 시도가 최근 국제적으로 식품 안전상 관심도가 높은 *S. Enteritides*, *L. monocytogenes*, 장관출혈성 대장균 O157:H7의 3균종을 대상으로 보고되어 있다. *S. Enteritides*에 대하여 Whiting과 Buchanan은⁹⁾ 껍질을 제거한 저온살균 계란으로 마요네즈 가공시에 감염균의 위해성을 “The Unit Operation Approach method”에 의해 정량화 하였다. Miller 등¹⁹⁾은 *L. monocytogenes*의 식품미생물학적 안전기준치를 미생물학적 위해성 평가모델을 작성하여 해석하였다. 또한, Marks 등²⁰⁾은 마쇄 쇠고기의 생산에서 소비에 이르기까지의 장관출혈성 대장균 O157:H7의 전체적인 위해성에 대하여 정량적인 위해성 모델을 개발하였다. 더욱이 Brown 등²¹⁾은 계육제품에 의한 *Salmonella* 감염증에 대하여 컴퓨터 그래픽으로 표현할 수 있는 정량적 평가모델을 개발하였다. 이는 미생물학적 위해성을 평가하는 종합적인 전문 프로그램으로서는 최초라 할 수 있다.

나. 조사연구개발사례에 대한 평가

모델 soft의 실용성 여부를 판단하는 것은 식품산업의 이용자이지만, 현재의 soft는 실용화가 아직 일천한 단계이며, 시험적인 사용단계에 있다. 대상미생물은 일부의 균에 제한되어 있으며, 환경요인의 요소와 그 범위도 한정되어 있고, 개선의 여지가 많이 남아 있어서, 그 평가는 지금부터의 과제이다. 미생물의 발육, 사멸 등의 현상은 복잡한 구조를 가진 세포내에서의 변화가 종합적으로 나타난 것으로, 그 기구에 대해서 여러 가지 가설이 있지만, 해명되어 있지 않기 때문에 어느 모델도 결정적인 것으로는 생각할 수 없다. 예측모델의 유용성은 각 단계에서 이용되는 data와 가설의 신뢰도, 타당성에 의해 결정되며, 예측의 신뢰한계, 정확성은 모델 작성의 data의 범위내에 한정된다. 그 외에 균세포에 대한 stress의 영향기구, biofilm 중이나 불균일계 등의 micro 환경에서의 미생물의 거동 등 미생물학 각 분야의 새로운 지식 등을 어떻게 적절히 모델작성에 도입할 것인가, 거기에다 Quantitative Risk

Assesment의 진전과 어떻게 관련시켜 갈 것인가 하는 것도 중요한 과제로 되어 있다.

또한 본 연구과제에서 제시한 포장연제품 관련 병원미생물의 예측 정량평가모델 및 PC용 software 개발에 관한 연구는 아직 없기 때문에 관련 기술의 발전을 선도하기 위하여서는 이 분야의 연구가 시급하다고 생각한다.

2. 세부 기술사항의 검토분석

가. 국·내외 기술수준 비교표

예측미생물학은 최종적으로 식품에의 적용을 목적으로 하고 있으며, 정량적 평가를 행하는 중요한 의의는 농장에서 식탁까지의 각 공정의 안전성을 확보하는 것에 있다. 국내의 경우, 현재 정성적 관리 시스템인 HACCP system의 적용도 권고사항에 그치고 있으며, 여러 가지 병원 및 병원미생물의 생장에 대한 1차, 2차 모델식은 선진 외국과 큰 차이가 없으나, 이들 결과를 Database화하여 포장연제품에 있어서 병원미생물의 생장을 예측할 수 있는 PC용 software 개발에 관한 연구는 전무한 실정이다.

세 부 과 제	국내의 기술 수준	비 고
병원미생물의 예측 정량평가 모델의 개발 및 database 구축	선진국의 50%	1차, 2차 모델은 어느 정도 연구되어 있으나 database는 구축되어 있지 않음
예측모델의 computing 기술 적용 및 웹(web) 기반 그래픽 인터페이스 개발	선진국의 0%	미국, 영국은 개발되어 있으며 일본 및 선진국은 현재 개발 중.

나. 공정단위별로 주요 기술사항 및 그 기술수준

(1) 외국의 경우

(가) 포장연제품 관련 병원미생물의 예측 정량평가모델 개발 및 database 구축

현재 예측식품미생물학은 배지상에서 *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* 등 제한된 미생물을 대상으로 한 정량평가모델이 개발, 또는 개발 중에 있으며, 그 적용 식품도, 육류, 유가공품, 난제품 등에 제한되

어 있다. 포장연제품 관련 병원미생물인 *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella*, *Micrococcus*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Fecal E. coli*, 등에 대한 연구는 찾아보기 힘들다.

(나) 예측모델의 computing 기술 적용 및 웹(web) 기반 그래픽 인터페이스 개발

Software가 실용화된 것은 병원균을 주대상으로 한 영국의 Food Micromodel⁴⁾과 미국의 Pathogen Modeling Program³⁾이다. Food Micromodel과 Pathogen Modeling Program에서는 1차 모델식에 Gompertz가 1825년에 인구동태의 조사결과를 경험식으로서 제시한 Gompertz 관수를 적용시키고 있지만¹⁵⁾, 그 후 Baranyi 등의 개변식¹¹⁾을 영국에서는 이용하고 있다. 그러나, 이 식을 그대로 적용하는 경우에는 최적발육온도보다도 높은 온도역에 의 의심, 혹은 발육하한 가까이의 온도역에서는 실험치와의 적합성이 나빠지기 때문에, Ratkowsky¹⁵⁾ 등은 카고시마 대학의 太田과 平原의 논문¹⁶⁾에 힌트를 얻어 평방근 모델을 제창하고, 또 영국 유니레바 연구소의 group은 Arrhenius식으로부터 얻은 Schoolfield의 식¹¹⁾을 채용하고 있다.

(2) 기존 공정방법, 기술의 사례를 조사하여 다음 사항에 걸쳐 평가분석함.

(가) 기술적인 평가

예측 미생물학에 관한 연구는 병원균 및 변태균·부패균을 대상으로 1980년대 후반부터 급속도로 발전하였으며, 지역별로는 미국을 시작으로 영국, 네덜란드 등과 같은 유럽의 각 선진국과 호주 등지에서 정보화 시대에 대응하는 국제적인 흐름의 하나로 활발한 연구가 이루어지고 있다. 이러한 연구의 성과로 미국 농무성(USDA)의 병원균 모델 프로그램인 Pathogen Modeling Program(PMP)과 영국 농어식량성(MAFF)의 Food Micromodel이 실용화 되어있다. 아시아 국가 중에서는 일본이 유일하게 이 분야에 관한 연구를 최근에 들어 진행시키고는 있으나, 아직까지 실용화 프로그램은 개발되어 있지 않다.

(나) 경제적인 평가

어떤 식품의 안전성에 대하여 무역상대국간에 논쟁이 발생한 경우, 당사국은 소비자에게 미치는 Risk(위해)가 명백 한지의 여부, 혹은 수출국으로부터의 보증 기준이 수입국 내의 제조업에 대한 규제 기준보다도 엄격한지를 정량적, 객관적으로 평가 할 수 있어야 한다고 GATT는 규정하고 있다. 지금까지 식품의 안전성에 큰 문제가 발생하였을 경우, 그 위해 정도를 정량적으로 파악하기 이전에 전량회수 또는 폐기함으로써 막대한 경제적 손실을 초래하였다. 따라서 21세기의 보다 활발한 국제 자유무역 경쟁시대에 있어서는 식량

자원 및 가공식품의 안전성에 대한 객관적이며 정량적인 평가 방법이 관련 산업분야와 경제에 미치는 영향이 지대할 것으로 예상된다.

한편, 국내의 경우에는, 세계 각 선진국이 막대한 비용을 투자하여 식품의 안전성 확보를 위한 연구개발을 서두르고 있는 국제적 현실에 크게 미치지 못하고 있는 실정이다. 그 주된 요인으로서 경제적 부담을 손꼽을 수 있다. 수출에 주력하는 업체에 있어서 HACCP 시스템의 도입은 거의 필수적이라 할 수 있으나, 그 밖의 국내 소비를 위주로 하는 중소기업이나 소규모 생산업체에서 HACCP 시스템을 전면적으로 도입하기엔 어려움이 클 것으로 예상된다. 그러나 식품의 안전성은 국민 건강상 간과할 수 없는 중대한 문제이기 때문에, HACCP 시스템 도입 이전에 경비 절감과 동시에 식품의 안전성을 보장 할 수 있는 대체 방안이 절실히 요구된다. 그러한 대체 방안으로서 가장 유효한 수단이 「식품 관련 미생물에 대한 수학적 정량 평가 모델」의 적용이다.

(다) 산업기술에 미치는 파급효과 분석

본 연구는 수산 가공식품을 대상으로 한 최초의 실용화 모델개발을 목표로 하고 있으며, 식품의 종류별 특성을 고려한 예측 프로그램의 개발 확대 가능성을 지니고 있다. 또한 국내 최초의 고유기술 개발로 인한 관련 연구의 활성화에 기여할 수 있으며, 금후 HACCP 시스템이 전면적으로 시행될 경우, HACCP 시스템의 단점을 보완하고, 정밀한 CCP를 결정할 수 있는 자료를 제공할 수 있을 것이다. 그밖에, 정보화 기술의 도입에 있어서 뒤떨어진 식품 산업분야에 새로운 자극이 될 수 있으며, 국내 정보화 관련 전문가에 대한 새로운 아이템 제공의 계기가 될 것이다.

(3) 주요 관련기술의 검토

본 연구성과를 수산식품제조 산업현장에 적용할 경우에 관련 기술로서는, 예측프로그램의 입력요소인 각 가공공정상의 환경인자에 대하여 실시간으로 자동 측정할 수 있는 계측 기술과 자동제어 기술을 포함하는 온 라인 기술과 깊은 관련성을 지니고 있다.

3. 참고문헌

1. Buchanan, R. L. and R. C. Whiting, 1998. Risk assesment: a means for linking HACCP plans and public health. J. Food Prot., 61, 1531-1534.
2. Ross, T. and T. A. McMeekin. 1994. Predictive microbiology. Int. J. Food Microbiol., 23, 241-264.

3. Buchanan, R. L. 1991. Using spreadsheet software for predictive microbiology application. *J. Food Safety*, 11, 123-134.
4. McClure, P. J., C, de W. Blackburn, M. B. Cole, P. S. Curtis, J. E. Jones, J. D. Legan, I. D. Ogden, M. W. Peck, T. A. Roberts, J. P. Sutherland and S. J. Walker. 1994. Modeling the growth, survival and death of microorganisms in foods: the UK Food Micromodel Approach. *Int. J. Food. Microbiol.*, 23, 265-275.
5. ICMSF working group on microbial risk assesment. 1998. Potential application of risk assesment techniques to micobiological issues related to international trade in food and food products. *J. Food Prot.*, 61, 1075-1086.
6. N. Tanaka. 1998. Food safety problems and challenges in the 21st century. *Jpn. J. Food Microbiol.* 15(1), 65-70.
7. Swerdlow, D. L. and Altekruise, S. F. 1998. Food-borne Diseases in the Global Village. *Emerging Infections* 2. Scheld, W. M., Craig, W. A. and Hughes, J. M. (eds), p. 273-294, American Society for Micrbiology, Washington.
8. WHO. 1996. The Wold Health Report 1996.
9. Whiting, R. C. and R. L. Buchanan. 1997. Development of a quantitative model for *Salmonella enteritidis* in pasteurized liquid egg. *Int. J. Food Microbiol.*, 36, 111-125.
10. Hathaway, S. C. and L. C. Roger. 1997. A regulatory perspective on the potential use of microbial risk assesment in international trade. *Int. J. Food Microbiol.*, 36, 127-133.
11. Dalgaard, P. and L. V. Jørgensen. 1998. Predicted and observed growth of *Listeria monocytogenes* in seafood challenge tests and in naturally contaminated cold-smoked salmon. *Int. J. Food Microbiol.*, 40, 105-115
12. Cassin, M. H., A. M. Lammerding, E. C. D. Todd, R. William and R. S. McColl. 1998. Quantitative risk assesment for *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef hamburgers.
13. CODEX Alimentarius Commission. 1998. Draft principles and guidelines for the conduct of microbiological risk assesment. ALINORM99/13A.
14. Faber, J. M. 1986. Predictive modeling of food deterioration and safety: Foodborne Microorganisms and Their Toxins. Pierson, M. D. and N. J. Stern (eds), p 57-90, Marcel Dekker, New York.
15. Ratkowsky, D. A., J. Olley, T. A. McMeekin and A. Ball. 1982. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *J. Bacteriol.*, 149, 1-5.

16. Whiting, R. C. 1997. Microbial database building. What have we learned? *Food Technol.*, 51(4), 82-84.
17. Baranyi, J. and T. A. Roberts. 1995. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int. J. Food Microbiol.*, 26, 199-218.
18. Ohta, F. and T. Hirahara. 1977. Degradation of nucleotides in cool-stored carp muscle. *Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ.*, 26, 97-102.
19. Miller, A. J., R. C. Whiting and J. L. Smith. 1997. Use of risk assesment to reduce listeriosis incidence. *Food Technol.*, 51, 100-103.
20. Marks, H. M., M. E. Colemann, C. T. J. Lin and T. Roberts. 1998. Topics microbial risk assesment: dynamic flow tree process. *Risk Anal.*, 18, 309-328.
21. Brown, M. H., K. W. Davies, C. M. P. Billon, C. Adair and P. J. McClure. 1998. Quantitative microbiological risk assesment: principles applied to determining the comparative risk of Salmonellosis from chicken products. *J. Food Prot.*, 61, 1446-1453.