식품산업과 영양 10(1), 11~16, 2005 Food Industry and Nutrition

특집 : 두부류의 생산유동체계 현황 및 발전방향

수학적 정량평가 모델을 이용한 두부의 유통기한 예측 모델의 개발

신 일 식

강릉대학교 해양생명공학부

Development of Shelf-life Prediction Model of Tofu Using Mathematical Quantitative Assessment Model

Il-Shik Shin

Faculty of Marine Bioscience & Technology, Kangnung National University, Kangwon 210-702, Korea

서 론

예측 미생물학은 식품의 안전성 문제에 있어 가장 중요하고 큰 비중을 차지하는 위해미생물만을 대상으로 하여 이들의 생장을 수학적 모델에 의해 정량적으로 예측하고 평가하기 때문에 비교적 단순하면서도 효율이 높은 장점을 지니고 있다. 이러한 장점으로 인하여 미국과 영국 등을 중심으로 활발한 연구가 이루어지고 있으며, 이미 식품에 관한 각종 초기 조건을 입력하여 컴퓨터에 의한 계산을 실행함으로써 대상 미생물의 생잔변화를 예측 및 비교하고 그래프로 표현 가능한 프로그램의 개발이 진행되어 미국의 농무성(USPA)에서는 Pathogene Modeling Program (PMP), 영국의 농어식량성(MAFF)에서는 Food Micro-model(FMM)을 각각 개발하였다(1). 예측 미생물학에 사용되는 수학적 모델로서는 미생물의 성장을 표현하는 기본모델(1차 모델)과 미생물의 증식에 미치는 환경요인(온도, pH, 수분활성 등)의 영향을 표현하는 2차 모델 그리고 균의 종류와 기본적인 증식조건 등을 입력함으로써 균의 성장 변화를 시뮬레이션 할 수 있는 프로그램인 3차 모델로 구성되어 있다(2,3).

두부는 수용성 콩단백질을 응고시켜 압착한 제품으로 은백색의 부드럽고 수분함량이 높은 gel 상의 우수한 단백질 급원이다(4). 두부는 영양가와 소화율이 높으며 대두단백질의 아미노산 조성은 동물성 단백질과 유사하여 곡류 위주의 식생활에서 부족되기 쉬운 필수아미노산 함량이 높고 가격이 저렴한 장점을 가지고 있다(5). 하지만, 살균 또는 포장처리 하지 않은 일반두부의 경우, 높은 수분함량(80% 이상)을 지니고 있어서 보존성이 떨어지기 때문에, 정확한 유통기한 확보가 절실하게 요구되고 있다.

예측미생물학을 이용하여 식품의 유통기한을 예측하고자 하는 시도는 여러 가지 식품에 있어서 부패미생물 및 저장기간(shelf-life)에 대한 예측모델을 제시하였고 발전되어 왔다. 저온살균한 우유의 유통기한 예측모델(6-8)을 제시하였고, 포장한 어류(대구)의 유통기한 예측모델(9-11) 개발, 가금육의 유통기한 예측모델 개발(12) 등에 관한 연구가 있으나 두부에 관한 유통기한 예측모델의 개발에 관한 연구는 없는 실정이다.

이에 본 연구에서는 일반두부를 대상으로 온도 변화에 따른 부패 미생물의 생잔 변화를 정량적으로 예측하기 위한 수학적 정량 모델의 적용가능성을 검토하고, 정확한 유통기한 설정을 위한 수학적 정량 모델을 개발하였다.

재료 및 방법

시료

본 실험에 제공된 시료는 강릉초당두부(Gangneung, Gangwon, Korea)에서 생산된 일반두부로, 공장에서 제조되어 출고되기 직전의 두부를 냉장상태(4°C)로 실험실로 운반하여 사용하였다.

두부 부패균의 분리 및 동정

두부로부터 부패세균을 분리하기 위하여 실험실로 운반한 두부를 상온(25~28°C)에서 48시간 방치하였다. 부패한 시료 20 g을 멸균 생리식염수 180 mL와 혼합하여 Stomacher 400(Seward Co., London, England)로 230 rpm에서 1분 동안 균질화시킨 후, brain heart infusion agar(Difco, BD Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA)에 도말평판법으로 도말하여 35°C의 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 분리균주는 colony의 특징 별로 분리하였고, 점유율이 높은 group을 두부의 주 부패세균으로 선

E-mail: shinis@kangnung.ac.kr
Phone: 033-640-2346. Fax: 033-640-2346

정하였다. 분리된 균주는 gram staining, flagella staining, motility test, spore staining 등의 세균학적 특성과 API 20E kit와 API 50 CH kit(API system S.A, Montalieu-Veroieu, France)를 이용한 생화학적 특성을 조사하여 동정하였다.

두부에서 두부 부패세균의 생육지표치 측정

두부를 일정크기(약 25×20×80 mm)로 절단 후 500 mL의 멸균 beaker에 한 조각씩 넣고, 15, 20, 25°C에서 각각 배양하면서 일정시간(1~12 hr)마다 표준평판계수법(5)으로 생균수(37°C, 24 hr)를 측정하여 생육지표치인 최대증식속도상수(maximum specific growth rate constant, k), 세대시간(generation time, GT), 유도기(lag time, LT)를 측정하였다.

초기균수별 두부 주 부패균의 생육지표치 측정

공장에서 제조된 두부의 초기균수를 조절하는 것은 불가능하기 때문에 두부와 유사한 배지를 이용하여 초기균수에 따른 부패세균의 생육지표치를 측정하였다. 즉 두부의 주 부패세균으로 밝혀진 균주 A(*Acinetobacter calcoaceticus*)와 균주 B(*Bacillus subtilis*)를 전배양하여(1.0×10^7 CFU/mL) 균수가 7:1로 되도록 혼합한 후, 두부의 성분과 유사한 배지인 tryptic soy broth(TSB, Difco, BD Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA)에 초기균수가 1.0×10^3, 1.0×10^4, 1.0×10^5 CFU/mL가 되도록 접종하고, 15, 20, 25°C에 배양하면서 일정시간(1, 2, 6 hr)마다 표준평판계수법(5)으로 생균수를 측정하였다.

Gompertz model의 적용

균의 sigmoid한 형태의 성장을 표현하기 위해 사용하는 연속함수의 식은 Gompertz가 1825년에 인구동태의 조사결과를 경험식으로서 제시한 Gompertz model(식 1)(13)을 사용하였으며, 1회의 배양실험에서 시간의 경과에 따른 12~16개의 생균수 값을 얻었으며, 15반복을 통한 실험결과치를 Gompertz model에 대입하여 균의 증식을 대표하는 생육 지표인 최대증식속도상수(k), 유도기(lag time, LT), 세대시간(generation time, GT)을 도출하였다.

$$\mathrm{Log(Nt)=A+C\cdot exp(-exp(-B(t-M)))} \quad (1)$$

t: 배양시간(hr)
Nt: 배양시간에 따른 균수(CFU/mL)
A: 초기 균수의 log값(CFU/mL)
C: 균수 증가량의 log값(초기 균수와 최대 균수의 차, CFU/mL)
M: 증식속도가 최대가 되는 시점의 시간
B: 시간 M에서의 증식속도(최대증식속도, hr^{-1})

$k(hr^{-1})=BC/e$

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

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

도출된 최대증식속도상수, 유도기, 세대시간에 미치는 초기 균수와 온도의 영향을 각각 One-way ANOVA-test를 실시하여 Duncan's multiple range test(14)로 처리, 평균값 간의 유의성($p<0.05$)을 SPSS program(SPSS Inc., 2000, ver. 10.0)으로 검정하였다.

Parameter들의 결정과 정량평가 모델의 개발

최대증식속도상수와 온도 및 초기균수와의 상관관계를 규명하기 위하여 Gompertz model로부터 구한 최대증식속도상수를 수학적 정량평가모델인 square root model(식 2, 15-17)에 적용하고 SPSS program(SPSS Inc., 2000, ver. 10.0)으로 각 식의 parameter를 결정한 후, Sigma Plot (SPSS Inc., ver 7.0)으로 도식화 하였으며 각 배양 조건을 대입하여 실제 실험으로부터 구한 최대증식속도상수와 모델식으로부터 구한 최대증식속도상수와의 상관관계를 비교하였다.

$$\sqrt{k}=b\ (T-T_{min}) \quad (2)$$

식 (2)에서 b는 직선의 기울기로부터 구해지는 상수, T_{min}은 균의 증식속도가 0이 되는 이론상의 최저온도(온도축의 절편)를 나타낸다.

Shelf-life(spoilage criterion) prediction model의 개발

온도와 초기균수에 따른 두부의 미생물학적 유통기한을 예측하기 위한 모델은 square root model을 이용하여 개발하였다. 개발된 정량 평가 모델에 의하여 예측된 최대증식속도상수를 이용하여 온도가 초기균수에 따른 두부의 미생물학적 유통기한을 Gompertz model로 예측, 증식곡선으로 나타내었으며, 관능적으로 부패를 느끼는 시점을 식으로 표현하기 위하여 균의 성장 곡선 중에서 inflection point를 기준으로 하여 유통기한 예측모델을 완성하였다. 또한, 관능적인 부패시점을 결정하기 위하여 10명의 패널을 구성하여 색, 맛, 냄새 등에 대해 5단계 평점법으로 평가하고, 두부의 이화학적 변화를 확인하는 실험으로 2-thiobarbiturbic acid(TAB) 값을 측정하였다(15).

결과 및 고찰

두부 주 부패세균의 분리

강릉초당두부에서 분리한 부패세균의 균수와 점유율을 Table 1에 나타내었다. 부패세균은 5종류의 균으로 분류되었으며, A균의 생균수가 평균 1.5×10^9 CFU/g으로 가장 많았으며 전체의 76%를 차지하였다. 그 다음이 B균으로 생균수는 평균 2.0×10^8 CFU/g이었으며 전체의 10%를 차지하여 A, B균이 두부의 주 부패세균임을 알 수 있었다.

Table 1. Variety and cell number of putrefactive bacteria in putrefied tofu[1)]

Group	Viable cell number (CFU/g)	Percentage (%)
A	$1.5\times10^9\pm5.0\times10^7$	76.3±2.2
B	$2.0\times10^8\pm1.5\times10^7$	10.3±0.8
C	$1.1\times10^8\pm4.0\times10^7$	5.8±2.1
D	$8.8\times10^7\pm1.5\times10^7$	4.5±0.8
E	$6.0\times10^7\pm3.0\times10^7$	3.1±1.6

[1)]Mean±standard error of three replications.

따라서 이후의 실험은 A, B균에 대하여 실시하였다.

두부 주 부패세균의 동정

두부의 주 부패세균인 A, B균에 대한 세균학적 특성 및 생화학적 특성을 조사한 결과는 Table 2 및 3과 같다. 부패세균 A는 Gram-negative 간구균으로 운동성이 있으며, 당 및 아미노산의 분해 등의 생화학적 실험결과 *Acinetobacter calcoaceticus*로 동정되었다. Shin 등(16)에 의하면 두부 부패에 관여하는 주요 미생물로 *A. calcoaceticus*를 동정한 것으로 보고하고 있다. 부패세균 B는 Gram-positive 간균으로 운동성이 있으며 포자를 형성하고, 당 및 아미노산의 분해 등의 생화학적 실험결과 *Bacillus subtilis*로 동정되었다.

환경 조건에 따른 균의 생육 지표치의 변화

Gompertz model로부터 구한 두부 부패균의 최대증식속도상수에 미치는 온도와 초기균수의 영향을 Table 4에

Table 2. Characteristics of strain A isolated from the putrefied soybean curd

Characteristics	Strain A	*Acinetobacter calcoaceticus*
Cell form	Rod and cocci	Coco bacilli
Gram stain	-	-
Motility	+	+
Catalase	+	+
β-Galactosidase	-	-
Arginine dihydroalse	-	-
Lysine decarboxylase	-	-
Ornithine decarboxylase	-	-
Citrate utilization	+	+
H_2S production	-	-
Tryptophane deaminase	-	-
Indole production	-	-
Gelatinase	-	-
Acid from glucose	+	+
mannitol	-	-
inositol	-	-
sorbitol	-	-
rhanmnose	-	-
sucrose	-	-
melibiose	+	+
amygdalin	-	-
arabinose	+	+

Table 3. Characteristics of strain B isolated from the soybean curd

Characteristics	Strain B	*Bacillus subilis*
Cell form	Rod	Rod
Gram stain	+	+
Spore stain	+	+
Motility	+	+
Catalase	+	+
Oxidase	-	-
Urease	+	+
Voges-Proskauer test	+	+
β-Galactosidase	-	-
Citrate utilization	+	+
Indole production	-	-
Tryptophane deaminase	+	+
Acid from glucose	+	+
mannitol	+	+
inositol	+	+
rhanmnose	-	-
sucrose	+	+
tagatose	-	-
galactose	-	-
ribose	-	-

나타내었다. 온도가 높아질수록 최대증식속도상수는 증가하여 25°C에서 가장 높은 값을 나타내었다. 그러나 동일한 온도 조건에서 초기균수에 따른 최대증식속도상수의 유의적인 차이는 나타나지 않았다($p<0.05$).

유도기와 세대시간의 경우도 온도가 높아질수록 짧아지는 경향을 보였으며, 모든 실험구에서 25°C일 때 가장 짧은 것으로 나타났다(Table 5). 그러나 초기균수에 따른 유도기와 세대시간의 유의적인 차이는 없었다($p<0.05$).

이상의 결과로 볼 때, 두부 부패세균의 경우 초기균수는 균의 최대증식속도상수, 유도기, 세대시간에 큰 영향을 끼치지 않으며 온도에 의해 지배적인 영향을 받는 것으로 사료된다. 따라서 정량평가 모델 및 유통기한 예측모델 개발 시에는 초기균수를 배제하고 온도에 따른 상관관계만을 표현하였다.

온도의 변화에 따른 최대증식속도상수의 정량평가모델

Fig. 1에 나타난 바와 같이 초기균수에 따른 최대증식속도상수의 유의적인 차이는 없었으므로($p<0.05$), Ratkowsky 등(17), Zwietering 등(18,19)이 정의한 초기균수를 고려하지 않은 온도와 최대증식속도상수 간의 상호작용을 표현하는 2차 모델인 square root model(식 2)을 사용하여 식 (3)과 같이 정량화 하였다.

$$\sqrt{k} = 0.016861\ (T+6.87095) \qquad (3)$$

정량평가 모델로부터 최대증식속도상수의 예측치와 실험치의 비교

식 (3)으로부터 예측한 최대증식속도상수와 실험치를

Table 4. Effects of initial cell number and temperature on specific growth rate constant (k) of putrefactive bacteria in tofu

Initial cell number (CFU/mL)	Specific growth rate constant (k, hr^{-1})		
	15°C	20°C	25°C
1.0×10^3	$0.11\pm0.03^{a1)}$	0.31 ± 0.06^{a}	0.62 ± 0.05^{a}
1.0×10^4	0.08 ± 0.02^{a}	0.22 ± 0.06^{ab}	0.61 ± 0.03^{a}
1.0×10^5	0.07 ± 0.02^{a}	0.28 ± 0.04^{a}	0.64 ± 0.02^{a}

[1)]Mean±SE of three replications in the same row not sharing a common superscript are significantly different ($p<0.05$).

Table 5. Effects of initial cell number and temperature on generation time and lag time of putrefactive bacteria in tofu

Initial cell number (CFU/mL)	Generation time (hr)			Lag time (hr)		
	15°C	20°C	25°C	15°C	20°C	25°C
1.0×10^3	$2.68\pm0.98^{a1)}$	0.98 ± 0.14^{a}	0.49 ± 0.06^{a}	12.0 ± 1.14^{a}	3.98 ± 0.14^{a}	2.64 ± 0.09^{a}
1.0×10^4	3.98 ± 0.47^{ab}	1.38 ± 0.41^{b}	0.49 ± 0.03^{a}	10.7 ± 0.98^{a}	2.78 ± 0.39^{b}	2.39 ± 0.07^{ab}
1.0×10^5	4.34 ± 1.56^{b}	1.09 ± 0.29^{ab}	0.47 ± 0.03^{a}	11.7 ± 0.77^{a}	2.58 ± 0.89^{b}	2.23 ± 0.06^{a}

[1)]Mean±SE of three replications in the same row not sharing a common superscript are significantly different ($p<0.05$).

비교한 결과는 Fig. 1과 같다. 예측치와 실험치의 상관계수는 0.969로 잘 일치하였으며 이러한 결과는 Giffel과 Zwietering(20)이 square root model, square root model의 확장모델, modified Arrhenium model, polynomial model의 4가지 형태의 실험치와 예측치 사이의 상관관계를 비교하였을 때, square root model이 보다 높은 상관관계를 나타내었다고 보고한 결과와 유사하였다.

2차 모델식과 Gompertz model에 의한 두부 부패균의 성장예측

서로 다른 초기균수와 온도 조건하에서 square root model로 예측한 최대증식속도상수를 균의 성장곡선을 표현하는 Gompertz model에 적용함으로써 각 조건에서 Gompertz model에 의한 균의 성장을 예측할 수 있게 되었다.

초기균수 1.0×10^4 CFU/g, 온도 25°C에서 반복실험을 통한 성장곡선(실험치)과 같은 조건에서의 square root model에 의한 예측 성장 곡선(예측치)을 비교한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 실험을 통해 관찰된 균의 성장곡선 예측정량평가 모델을 이용한 성장곡선은 잘 일치하는 것으로 나타나, 이 예측정량평가 모델을 바탕으로 유통기한 예측모델을 개발하였다.

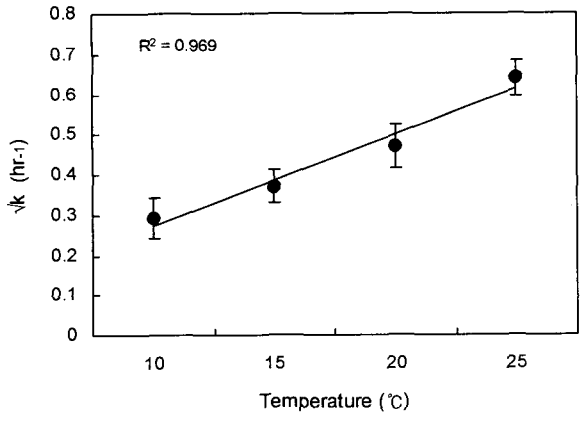

Fig. 1. Comparison of experimental √k and predictive √k by the square root model.
●, experimental √k; —, predictive √k.
Error bars indicate standard error (n=15).

두부의 유통기한 예측모델의 개발

초기균수 3.0×10^4 CFU/g, 온도가 25°C일 때, 두부가 관능적으로 변화하는 시점, TBA가 변화하는 시점과 미생물학적 변화를 Fig. 3에 나타내었다. 약 20시간 경과 후 관능적 변화가 나타났으며, 이는 미생물 성장 곡선 중 변곡점을 중심으로 2번의 세대시간이 지난 이후였다. 따라서 변곡점 이후 2번의 세대기를 거칠 때까지의 시간을 Dalgaard(11)가 개발한 Gompertz 변형 모델에 대입하여 두부의 유통기한을 예측할 수 있는 모델(식 4)을 개발하였다. 여기에서, No는 최초균수, Nmax는 최대균수, k는 최대증식속도상수를 나타낸다.

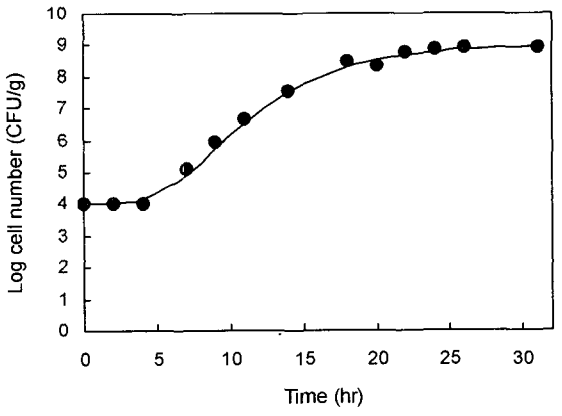

Fig. 2. Predictive growth curve of putrefactive bacteria in tofu at 25°C.
—, predictive growth curve; ●, experimental data.

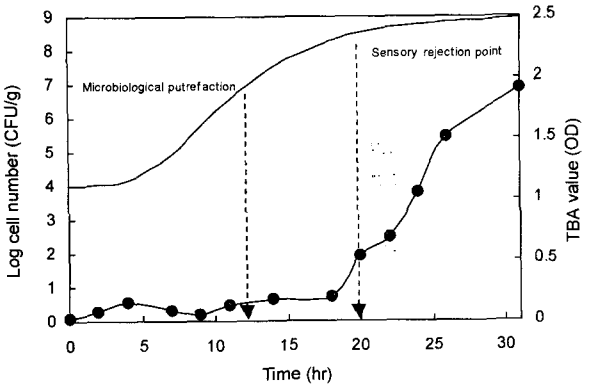

Fig. 3. Comparison of viable cell number, TBA value and sensory reject for prediction of shelf-life of soybean curd. —, Gompertz model curve; —●—, TBA value.

$$Spoilage-critrion(hr)=\frac{2\times \mathrm{Ln}2+\mathrm{Ln}[(Nmax/No)-1]}{k} \quad (4)$$

식 4의 유통기한 예측 모델로부터, 초기균수가 3×10^4 CFU/g일 때, 두부의 유통기한은 10°C에서 88시간, 15°C에서 52시간, 20°C에서 35시간, 25°C에서 24시간인 것을 예측할 수 있었다. 이러한 결과는 상온(20~25°C)에서 두부의 일반적인 유통기한이 하루 정도인 것과 거의 일치하였으며 관능적인 변화시점과도 잘 일치하는 것으로 나타났다.

요 약

식물성 단백질의 주요 공급원이며 우리나라 전통식품 중의 하나인 두부의 유통기한을 정량적으로 예측할 수 있는 수학적 모델을 개발하고자 온도와 초기균수에 따른 두부 부패세균의 성장 실험 결과를 데이터베이스화하여 이를 바탕으로 균의 성장을 정량적으로 평가할 수 있는 수학적 모델을 개발하였다. 균의 증식 지표인 최대증식속도상수(k), 유도기(LT), 세대시간(GT)은 온도에 지배적인 영향을 받았으며, 초기균수에 따른 유의적인 차이는 없었다 ($p<0.05$). 최대증식속도상수와 온도 및 초기균수의 상관관계를 나타내는 수학적 정량평가모델인 square root model을 이용하여 두부 부패세균의 성장을 정량적으로 예측할 수 있는 모델($\sqrt{k}=0.016861\,(T+6.87095)$)을 개발하였으며 실험치와 예측치의 상관계수는 0.969이었다. 이 예측 정량평가모델로부터 예측한 최대증식속도상수와 두부의 관능적 부패시점을 반영한 Gompertz 변형 모델을 이용하여 두부의 유통기한을 예측할 수 있는 모델($Spoilage-critrion(hr)=\frac{2\times \mathrm{Ln}2+\mathrm{Ln}[(Nmax/No)-1]}{k}$)을 개발하였다.

감사의 글

본 연구는 2002년도 해양수산부 수산특정기술개발사업의 연구비지원과 중소기업청 산학연컨소시엄사업의 연구비 지원에 의해 수행된 연구 결과이며, 이에 깊이 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Ross T, McMeekin TA. 1994. Predictive microbiology. *Int J Food Microbiol* 23: 241-264.
2. Yano N. 1998. Predictive microbiology and its application in food industry. *Jpn J Food Microbiol* 15: 81-87.
3. Coleman ME, Mark HM. 1999. Qualitative and quantitative risk assessment. *Food Control* 10: 289-297.
4. Miller C, Denning H, Bauer A. 1952. Relation of nutrients in commercially prepared soybean curd. *Food Res* 17: 261.
5. AOAC. 2000. *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA.
6. Chandler RE, McMeekin TA. 1985. Temperature function integration and the prediction of the shelf-life of milk. *Aust J Dairy Technol* 40: 10-13.
7. Griffiths MW, Phillips JD. 1988. Prediction of the shelf life of pasteurized milk at different temperature. *J Appl Bacteriol* 65: 269-278.
8. Chandler RE, McMeekin TA. 1989. Temperature function integration as the basis of an accelerated method to predict the shelf life of pasteurized-homogenized milk. *Food Microbiol* 6: 105-111.
9. Gibson DM. 1985. Predicting the shelf life of packaged fish from conductance measurements. *J Appl Bacteriol* 58: 465-470.
10. Dalgaard P. 1995. Modelling of microbial activity and prediction pf shelf life of packed fish. *Int J Food Microbiol* 26: 305-318.
11. Dalgaard P, Mejlholm O, Huss HH. 1997. Application of an iterative approach for development of microbial model predicting the shelf-life of packed fish. *Int J Food Microbiol* 38: 169-179.
12. Pooni GS, Mead GC. 1984. Prospective use of temperature function integration for predicting the shelf life of non frozen poultry meat products. *Food Microbiol* 1: 67-68.
13. Ratkowsky DA, Ross T. 1995. Modelling the bacterial growth/no growth interface. *Lett Appl Microbiol* 20: 29-33.
14. Duncan DA. 1955. Multiple-range and multiple F test. *Biometrics* 11: 1-42.
15. Tarlaogis BG, Pearson AM, Dugan LR. 1962. The chemistry of the 2-thiobarbiturbic acid test for the determination of oxidative rancidity of foods. I. Some important side reactants. *J Am Oil Chem Soc* 39: 34.
16. Shin DH, Kim MS, Bae KS, Kho YH. 1992. Identification of putrefactive bacteria related to soybean curd. *Korean*

J Food Sci Technol 24: 29-30.
17. Ratkowsky DA, Lowry RK, McMeekin TA, Stokes AN, Chandler RE. 1983. Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. *J Bacteriol* 154: 1222-1226.
18. Zwietering MH, de Koss JT, Hasenack BE, de Wit, JC van'T Riek K. 1991. Modeling of bacterial growth as a function of temperature. *Appl Environ Milcobiol* 57: 1094-1101.
19. Zwietering MH, Cuppers HGAH, de Wit JC, van'T Riet K. 1994. Evaluation of data transformations and validation of a model for the effect of temperature on bacterial growth. *Appl Environ Microbiol* 60: 195-203.
20. Giffel MC, Zwietering MH. 1999. Validation of predictive models describing the growth of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* 46: 135-149.