

온도와 시간을 주요 변수로 한 냉장 돈육에서의 native isolated *Listeria monocytogenes*에 대한 성장예측모델

홍종해 · 심우창¹ · 천석조¹ · 김용수¹ · 오덕환² · 하상도³ · 최원상⁴ · 박경진^{1,5,*}

강원대학교 수의학과, ¹한국보건산업진흥원, ²강원대학교 바이오산업공학부,

³중앙대학교 식품공학과, ⁴동국대학교 생명공학과,

⁵National Food Safety & Toxicology Center and the Food Safety Policy Center, Michigan State University

Predictive Growth Model of Native Isolated *Listeria monocytogenes* on raw pork as a Function of Temperature and Time

Chong-Hae Hong, Woo-Chang Sim¹, Seok-Jo Chun¹, Young-Su Kim¹, Deog-Hwan Oh², Sang-Do Ha³, Weon-Sang Choi⁴, and Gyung-Jin Bahk^{1,5,*}

Department of Veterinary Medicine, Kangwon National University

¹Korea Health Industry Development Institute

²School of Biotechnology and Bioengineering, Kangwon National University

³Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University

⁴Department of Biotechnology, College of Natural Sciences, Dongguk University

⁵National Food Safety & Toxicology Center and the Food Safety Policy Center, Michigan State University

Model was developed to predict the growth of *Listeria monocytogenes* in raw pork. Experiment condition for model development was full 5-by-7 factorial arrangements of temperature (0, 5, 10, 15, and 20°C) and time (0, 1, 2, 3, 18, 48, and 120 hr). Gompertz values A, C, B, and M, and growth kinetics, exponential growth rate (EGR), generation time (GT), lag phase duration (LPD), and maximum population density (MPD) were calculated based on growth data. GT and LPD values gradually decreased, whereas EGR value gradually increased with increasing temperature. Response surface analysis (RSA) was carried out using Gompertz B and M values, to formulate equation with temperature being main control factor. This equation was applied to Gompertz equation. Experimental and predictive values for GT, LPD, and EGR, compared using the model, showed no significant differences ($p < 0.01$). Proposed model could be used to predict growth of microorganisms for exposure assessment of MRA, thereby allowing more informed decision-making on potential regulatory actions of microorganisms in raw pork.

Key words: predictive growth model, *Listeria monocytogenes*, raw pork

서 론

냉장 또는 냉동상태로 저장, 운반, 판매되는 돈육을 포함하는 대부분의 축산물에서, 5°C 이하의 저온에서도 증식하고 냉동조건에서도 생존 가능한 것으로 알려진 *Listeria monocytogenes*는 축산물의 안전성을 위협하는 중요한 미생물학적 위해요인으로 인정되고 있다(1,2). 특히 식육 및 계육 등 축산물에서 높은 분리율을 보여 이들 오염된 축산물이 사람에게 위해를 일으킬 가능성이 높은 것으로 추정된다(3).

*L. monocytogenes*는 1980년대 초 캐나다와 미국에서 발생한 식중독에 대한 역학조사에서 식품매개질병의 원인균으로 확인되었고, 이 후 많은 역학조사에서 여러 종류의 식품이 관련된 것으로 보고되었다(4,5). 최근에 식품의 안전성 확보를 위한 새로운 기술로서 특정한 환경조건하의 식품 중에서 병원성미생물의 성장과 생존, 사멸 등을 수학적으로 기술하여 식품 내 병원성미생물의 상태를 예측하는 예측식품미생물학(Predictive food microbiology) 분야의 연구가 활발하며, 그 중요성이 크게 대두되고 있다(6,7). 예측식품미생물학은 식품의 원재료에서 제조, 유통, 보관, 판매, 소비까지의 전 과정에서 병원성 및 부패미생물의 변동을 정량적으로 해석하여 성장과 생존 및 사멸을 예측함으로써 현장에서 이들 오염 미생물을 효과적으로 제어하도록 한다. 따라서 식품에서의 병원성 미생물의 성장과 사멸에 영향을 미치는 pH, Aw, NaCl 함량과 같은 내부적인 요인과 온도, 시간, 대기상태 등의 외부적인 요인(8)에 대해서 이들 요인

*Corresponding author: Gyung-Jin Bahk, National Food Safety & Toxicology Center, B51C Food Safety & Toxicology BLDG, Michigan State University, East Lansing, MI, 48824-1314
Tel: 517-432-3100 (125)
Fax: 517-432-2310
E-mail: bahk@msu.edu, parkkj@khidi.or.kr

간의 조합과 상관성 규명에 수학적 모델을 이용하고 있다. 1980년대 이후 예측식품미생물학 모델은 이론적으로 또한 응용적인 면으로도 급성장하였고, 식품 내 병원성미생물의 성장 및 사멸을 예측하는 수학적 모델을 도입한 컴퓨터 프로그램이 이미 실용화되고 있다(9). 그러나 환경 내 존재하는 여러 요인에 대한 다양성이나 변이성을 설명할 수 있는 확률적 통계 모델의 활용 및 미생물 자체의 생리적 특성을 충분히 반영하는데 미흡한 상태이다(10). 이러한 제한점에도 불구하고 식품업계의 식품위생관리 강화 등 산업체 현장에서의 활용은 점차 확대 될 것으로 예상된다(11).

돈육 포장공정은 공정상에 살균처리 과정이 없어 작업이 진행되면서 생산된 포장육의 오염은 원료도체보다 증가하는 것으로 보고 되었다(12), 저온성 세균인 *L. monocytogenes*는 작업장 실내온도인 15°C에서 충분히 증식 가능하고 여러 작업환경으로부터 교차오염이 발생하기 때문이며 HACCP 도입 등 위생관리 강화가 요구되는 작업장이다. 본 연구는 돈육 포장공정에서 위생적으로 중요한 *L. monocytogenes*를 지표균으로 하여 작업장 및 유통 환경에서의 온도와 시간을 control point로 하여, 돈육에 오염된 *L. monocytogenes*의 성장을 예측할 수 있는 모델을 개발하고 돈육포장 공정 및 유통단계에서의 과학적인 식품위생관리기준 설정근거를 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

시험 균주

본 실험에 사용된 균주는 돈육포장 공정(강원도 소재)에서 분리, 동정한 야생균주(native type) *L. monocytogenes* KL 101을 사용하였다. 시료에서 분리된 *L. monocytogenes* KL 101의 생화학적 성상은 GPI(Gram Positive Identification) card를 사용하여 Vitek(Vitek Jr. System, bioMerieux Vitek, Inc., Hazelwood, USA)으로 판정한 결과 대조균으로 사용한 *L. monocytogenes* ATCC 15313과 일치하였으며 β -hemolysis와 *Staphylococcus aureus*와의 CAMP 실험에서 양성을 나타냈다. 또한 VIDAS(mini VIDAS System, bioMerieux Vitek, Inc., Hazelwood, USA)를 이용한 확인시험에서도 *Listeria monocytogenes*로 판명되었으며 혈청형 실험결과 1/2a로 확인되었다. 본 연구에서는 돈육포장 공정중의 *Listeria monocytogenes*의 성장을 예측하기 위하여 실제 가공 현장 환경조건에 적용된 야생균주를 사용하였다. 분리된 균주는 10% glycerol을 첨가한 tryptic soy broth(TSB: Difco, Detroit, MI, USA)에 넣어 -70°C의 급속냉동고(VWR 4503C, VWR Co., USA)에 동결 보존하여 사용하였다.

시험 균액의 제조

동결 보존된 분리균주를 냉장온도에서 녹인 후 TSB에 접종하여 25°C에서 24시간 동안 전배양하고 tryptic soy agar(TSA: Difco, Detroit, MI, USA)에 도말하여 24시간 배양하였다. 평판상에 성장한 균을 백금이로 사용하여 멸균생리식염수에 현탁하여 4°C에서 10,000×g로 5분 동안 원심분리하여 cell pellet를 얻고 이를 salt peptone(0.85% NaCl, 0.05% Bacto peptone)으로 2회 세척한 후 0.1% peptone water 3L에 용해시켜 활성배양액을 제조하였다. Colorimeter(DR100 Colorimeter, HACH Co., USA)를 이용하여 제조된 배양액의 균수를 $5.0 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^8$ cfu/mL로 조절하였다. 이 배양액을 1.0×10^3 cfu/mL로 희석하여 시험균액으로 하고 TSA에 도말하여 25°C에서 24시간 배양한 다음 최종적인 균수를 확인하였다.

시료 돈육

돈육은 안심을 서울지역의 일반시장 정육점에서 냉장육 상태로 두께 0.5 cm, 가로, 세로 각각 5 cm의 크기로 구입하였으며 돈육에 부착되어 있는 자연균총을 제거하기 위하여 Ukuku 등(13)에서 사용한 방법을 활용하였다. 구입한 돈육은 70% 에탄올을 이용하여 10°C의 shaking incubator에서 100 rpm으로 1분간 표면 살균처리 한 후 clean bench에서 내부공기를 순환시키며 15분 정도 방치하여 표면의 수분을 제거한 후 시료로 사용하였다.

실험 설계 및 균수 측정

돈육포장 공정에서 *L. monocytogenes* 성장과 관련한 중요한 환경인자는 온도와 시간으로 가정하였으며, 이들 온도와 시간을 주요 변수로 설정하여 배양온도는 돈육포장 공정 작업장과 유통중 저장온도를 고려 0, 5, 10, 15, 20°C로 하였고 배양시간 역시 돈육포장 공정 작업장과 유통중 저장온도를 고려 0, 1, 2, 3, 18, 48, 120시간까지 배양하여 채취하였다. 이들 인자는 factorial design(5×7×3×2)을 적용하였으며 각각의 실험은 3회 이상 반복하였고 각 시료는 duplicate 이상 sampling 하였다.

표면살균 처리된 돈육을 1L의 시험균액에 침지하여 100 rpm으로 30분 동안 shaking하면서 돈육에 시험균을 접종하였으며, 이 후 표면에 견고하게 접종되지 않은 균을 제거하기 위하여 멸균 증류수를 이용하여 3회 이상 세척하고 clean bench에서 건조시킨 후 실험설계에 따른 조건별로 배양하였다. 이때 일부 돈육은 배양시키지 않고 바로 시험하였으며 이를 계수하여 초기균수를 산정하였다.

각 조건별로 배양된 돈육을 멸균백에 넣고 0.1% buffered peptone water로 10배 희석하여 stomacher(Masticator, IUL, Spain)를 사용하여 균질화 하였다. 각각의 시료로부터 균질화된 용액 100 μ L를 취하여 Oxford listeria selective agar 표면에 Spiral Plater(Spiral System, Inc., USA)를 이용하여 plating한 후 25°C에서 48시간 배양하였다. 배양후 grid를 이용하여 area당 20~40개의 전형적인 집락이 있는 균수를 개수한 후 대칭이 되는 area의 균수와 합산하여 균수를 산출하였다. 최종 성장실험 결과는 SAS(Statistical Analysis System, Ver 8.1, Cory, NC, USA)의 ANOVA Duncan 검정($p < 0.05$)을 이용하여 통계적인 유의성을 검증하였다.

성장곡선의 fitting과 parameter 산정 및 모델 검증

돈육에서의 *L. monocytogenes*의 성장곡선은 실험설계에 따른 성장실험결과를 바탕으로 Gompertz equation에 의해 생성하였다. Gompertz equation의 변수인 A, C, B, M은 Guass-Newton iteration을 적용시킨 SAS의 non-linear regression 프로그램을 활용하여 산출하였다. 이 산출된 A, C, B, M을 이용하여 Table 1(14)의 식에 의거 대수성장율(EGR: exponential growth rate, Log(cfu/g)/hr), 세대시간(GT: generation time, hr), 잠복기간(LPD: lag phase duration, hr), 최대균수(MPD: Maximum population density, Log(cfu/g/hr))를 계산하였다(15,16). 한편 B, M의 경우는 SAS의 Response surface analysis에 의해 온도에 따른 회귀방정식을 산출하였다. 이 회귀방정식을 Gompertz equation에 적용하여 온도와 시간에 따른 *L. monocytogenes*의 성장균수(Log cfu/g)를 산출하였다. 최종적으로 개발된 모델에 대한 검증은 Smith-Simpson 등(17)에서 사용한 방법을 이용하여 GT, LPD, EGR에 대한 실험값(observed)과 예측값(predicted)의 비교를 통하여 실시하였다.

결과 및 고찰

돈육에서의 *L. monocytogenes* 성장

돈육에서의 *L. monocytogenes* 성장은 Table 2에서 보는 바와 같이 초기균수는 2.4~3.8 Log cfu/g으로 이러한 차이는 시험균액을 제조하고 이를 접종하는데 있어서의 오차로 볼 수 있다. 20°C를 제외한 대부분의 온도에서는 접종 후 3시간까지는 성장경향을 나타내지 않았으며 일부 온도 범위에서는 약간씩 감소하는 것으로 나타났다. 특히 0°C의 경우는 처음부터 감소하는 것으로 나타났으며, 5°C와 10°C의 경우, 18시간 이후부터는 각각의 온도 범위별로 증가하는 경향을 나타냈는데, 특히 48시간 이후의 증식은 통계적으로 유의한 수준이었다. 이는 실험에 이용한 *L. monocytogenes*가 낮은 온도의 돈육포장 공정에서 유효하였기 때문인 것으로 추정되었다. 본 연구의 실험결과에서와 같이 여러 연구 논문에서 *L. monocytogenes*는 10°C 이하의 냉장 저장 중인 여러 식육 및 가공식품에서 성장하는 것으로 알려져 있다(18,19). 따라서 돈육의 저장 및 유통과정에서 냉장 온도를 잘 관리하더라도 시간 경과에 따라서 *L. monocytogenes*는 증식이 가능하므로, 돈육 생산단계에서의 안전성 확보와 유통과정상의 위생적인 취급의 중요성을 확인할 수 있었다. 한편 15°C와 20°C의 경우도 18시간 이후부터는 성장이 크게 증가하는 것으로 나타났다.

성장예측모델

병원성미생물의 성장에 관한 모델은 probability-based model과 kinetics-based model의 두 가지로 구분된다. Probability-based model은 주로 포자형성균에 적용하며, kinetics-based model은 비포자형성균에 적용하는데(20), 따라서 본 연구에서는 비포자형성균인 *L. monocytogenes*에 대해서 kinetics-based model을 사용하였다. Kinetics-based model에는 square root, linear Arrhenius, non-linear Arrhenius model 등이 있으며, 이들 모델 중 square root model이 가장 광범위하게 연구되어 왔다. Square root model은 성장에 관계하는 여러 인자 중에서 온도만을 이용한 것으로, 대상 병원성균의 적정 성장 온도조건에서 growth rate와 lag phase duration만을 산출할 수 있는 단순한 linear model이다(21). 위의 모델들은 온도 등 단순한 인자만을 이용하는 모델이지만 이들 모델에 비하여 여러 환경인자를 고려하기 위하여 polynomial 또는 response surface regression 등 통계적인 접근을 시도하고 있으며, 여기에 “best-fit”를 나타내기 위한 non-linear regression의 접목으로 여러 다양한 인자들을 동시에 고려할 수 있는 모델 생성이 가능하게 되었다. 이러한 모델 생성에 대표적으로 이용되고 있는 것이 Gompertz

Table 1. Equations for Gompertz function and derived growth kinetics values

Gompertz's function	
$L(t) = A + C \exp(-\exp(-B(t - M)))$	
$L(t)$	Log count of bacteria at time (in hours) t [Log(cfu/g)]
A	Asymptotic log count of bacteria as time decreases indefinitely (i.e., initial level of bacteria [Log(cfu/g)])
C	Asymptotic amount of growth that occurs as t increase indefinitely (i.e., number of log cycles of growth [Log(cfu/g)])
M	Time at which the absolute growth rate is maximal [hr]
B	Relative growth rate at M [Log(cfu/g)/hr]
Derived Growth Kinetics Equations:	
Exponential growth rate (EGR) = BC/e [Log(cfu/g)/hr]	
Generation time (GT) = $\text{Log}(2)\exp(1)/BC$ [hr]	
Lag phase duration (LPD) = $M - (1/B)$ [hr]	
Maximum population density (MPD) = $A + C$	

equation(Table 1)이며, 본 연구에서도 이 식을 이용하였다. 미생물 성장관련 인자는 돈육을 대상으로 한 Mann 등(22)의 연구결과를 바탕으로 온도와 시간으로만 선정하였다. 하지만 온도의 조건은 미생물 성장에 적절한 온도가 아닌 작업장의 낮은 온도를 이용하였고, 온도와 시간만으로 성장예측 모델을 만든 Buchanan 등(23)의 방법을 참조하였다.

온도에 따른 성장곡선 data는 “best fit”된 Gompertz value로서 즉, A, C, B, M 의 값으로 나타내면 Table 3과 같다. 0°C의 경우는 성장을 하지 않은 no growth로 나타나 Gompertz 값을 산출할 수 없었다. Fitting 절차를 걸쳐 산출된 A, C, B, M 값을 바탕으로 Table 1의 공식에 의거 EGR, GT, LPD, MPD를 산출하였다.

LPD는 미생물이 새로운 환경에 적응하고 성장을 시작하기 위하여 주위환경에 적응하는 기간으로 볼 수 있다. 본 연구에서 LPD는 5°C에서 가장 높은 43.3시간을 나타냈고, 온도가 증가할수록 점차 감소하여 20°C에서는 16.5시간을 나타냈다(Table 3). 이러한 결과는 표준균주를 사전에 5°C에서 pre-incubation시킨 후 다시 5°C tryptose phosphate broth에서 LPD 값을 측정된 Buchanan 등(23)의 결과인 36.8 ± 12.0 시간과 어느 정도 유사한 것으로 볼 수 있으나, 20°C에서의 경우는 5°C의 경우와 동일한 조건으로 처리된 Buchann(23)의 결과인 36.7 ± 3.7 시간보다 낮게 나타났다. 이는 표준균주와 야생균주 그리고 broth와 돈육의 차이로 인한 것으로 보여진다. GT의 경우도 LPD와 마

Table 2. The growth of *L. monocytogenes* on inoculated raw pork meat during storage at different temperature¹⁾

Time (hr)	Temperature (°C)				
	0	5	10	15	20
0	2.74(0.01) ^a	3.49(0.02) ^a	3.75(0.03) ^a	2.40(0.03) ^a	3.87(0.03) ^a
1	2.71(0.18) ^a	3.50(0.15) ^a	3.53(0.05) ^a	2.58(0.20) ^{ab}	3.84(0.27) ^a
2	2.74(0.10) ^a	3.53(0.09) ^a	3.45(0.07) ^a	2.51(0.16) ^{ab}	3.96(0.08) ^a
3	2.61(0.14) ^b	3.52(0.07) ^a	3.69(0.09) ^a	2.64(0.05) ^b	4.56(0.08) ^b
18	2.62(0.16) ^b	3.57(0.07) ^a	3.65(0.18) ^a	3.99(0.12) ^c	4.91(0.10) ^b
48	2.40(0.15) ^c	4.17(0.06) ^b	4.40(0.14) ^b	4.59(0.05) ^c	
120		5.36(0.05) ^c	5.78(0.04) ^c		

¹⁾Log cfu/g, Mean (Standard deviation), different letters within columns indicate a significant difference in microbial counts ($p < 0.05$)

Table 3. Effect of initial number of *L. monocytogenes* at different temperatures on growth kinetics of raw pork meat

Temp. (°C)	Gompertz value ¹⁾				LPD (hr)	EGR (Log cfu/g/hr)	GT (hr)	MPD (Log cfu/g)
	A	C	B	M				
5	3.73 (0.03)	5.27 (0.06)	0.15 (0.03)	50.01 (1.25)	43.32 (0.60)	0.29 (0.05)	28.83 (0.33)	9.00 (0.02)
10	3.75 (0.07)	5.37 (0.05)	0.21 (0.04)	38.15 (1.58)	33.33 (1.04)	0.41 (0.02)	21.17 (1.65)	9.12 (0.05)
15	2.40 (0.14)	5.73 (0.11)	0.28 (0.01)	28.13 (0.17)	24.5 (0.14)	0.58 (0.03)	17.04 (0.22)	8.13 (0.06)
20	3.78 (0.03)	5.55 (0.10)	0.32 (0.04)	19.68 (1.54)	16.57 (0.73)	0.65 (0.05)	14.01 (1.01)	9.28 (0.01)

¹⁾A = Log cfu/g, C = Log cfu/g, M = hr, B = Log cfu/g/hr, Mean (Standard deviation)

Table 4. Effects of temperature on the growth of *L. monocytogenes* in raw pork by Response Surface Models

Parameter	DF	Estimate	Standard error	t Value	Pr > t
Intercept	1	76.563928	15.074346	5.08	0.0010
Temp	1	-4.328653	2.272186	-1.91	0.0932
Temp*Temp	1	0.073900	0.072718	1.02	0.3393

M = 76.563928 - 4.328653 * Temp - 0.073900 * Temp * Temp

R² = 0.9482
F value: 22.47
Pr > F: 0.0014

Parameter	DF	Estimate	Standard error	t Value	Pr > t
Intercept	1	0.046687	0.101641	0.46	0.6582
Temp	1	0.018544	0.015321	1.21	0.2607
Temp*Temp	1	-0.000260	0.000490	-0.53	0.6103

B = 0.046687 + 0.018544 * Temp - 0.000260 * Temp * Temp

R² = 0.9266
F value : 13.14
Pr > F : 0.0067

찬가지로 온도조건이 높아질 수록 그 값이 점점 낮아지는 경향을 나타냈으며(Table 3), EGR의 경우는 반대로 온도가 높아질수록 점점 높아지는 경향을 나타냈다(Table 3). MPD는 온도의 영향을 거의 받지 않는 것으로 확인할 수 있었다. GT, EGR, MPD는 LPD와 달리 broth에서 표준균주를 이용한 실험결과들과 유사하였다. Table 3의 Gompertz 값 B와 M을 이용하여 온도를 주요 환경인자로 선정한 surface-response 분석 결과는 Table 4와 같다. 모델적합성(R²)이 M값의 경우 0.9482, B값의 경우는 0.9266으로 높게 나타났으며, 또한 M, B 값 모두 통계적으로 모두 유의하였다(p < 0.01). 이 반응식을 Table 1의 Gompertz 식에 적용시켜 특정시간에서 온도에 따른 *L. monocytogenes*의 성장정도를 추정하기 위하여 냉장돈육에서의 *L. monocytogenes* 성장예측 모델을 다음 식과 같이 개발하였다.

$$L(t) = A + C \exp(-\exp(-B(t-M)))$$

A = Initial contamination level

C = MPD - A

MPD = 9 Log cfu/g

B = 0.046687 + (0.018544 * Temp) - (0.000260 * Temp * Temp)

M = 76.563928 - (4.328653 * Temp) - (0.073900 * Temp * Temp)

t = time

Temp = temperature

일련의 미생물 성장실험결과에 의해 개발된 모델은 기존의 문헌이나 새로운 실험결과들에 의해 그 적합성을 검증하여야 한다. 개발된 모델에 대한 검증방법은 두 가지로 나눌 수 있는

데 그 하나는 특정한 조건에서의 미생물의 증식 값을 기존의 다른 모델과 비교하는 방법이고 다른 하나는 특정한 조건에서의 개발된 모델의 증식 값과 직접 실험에 의한 결과 값을 비교하는 방법이다. 본 연구에서는 개발된 모델에 대한 검증방법으로 GT, LPD, EGR에 대한 실험값(observed)과 예측값(predicted)을 비교하였다. 그 결과는 Fig. 1~3에서 보는 바와 같이 실험값과 예측값이 어느 정도 일치하고 있어 모델에 대한 신뢰성이 높은 것으로 판단된다. 즉, GT의 경우 상관계수(r) = 0.99324, 모델 적합성(R²) = 0.9865로, LPD의 경우는 r = 0.99835, R² = 0.9967, EGR의 경우는 r = 0.99291, R² = 0.9859로 나타났고 GT, LPD, EGR 모두 통계적으로 유의하였다(p < 0.01).

한계 및 응용

본 연구는 냉장돈육에서의 식중독 원인균이면서 냉장온도에서 성장이 가능한 *L. monocytogenes*에 대한 효과적인 위생관리를 위하여 온도-시간관계 측면에서 돈육 포장공정 및 유통조건 하에서의 *L. monocytogenes* 성장예측 모델을 제시하였다. 최근 성장예측모델 개발은 과거의 배지 등을 이용한 방법이 아닌 실제 해당식품에 직접 접종하여 모델을 개발하는 방향으로 전환되고 있다(24). 이러한 관점에서 볼 때 본 연구는 최초로 돈육에 예측미생물학 기법을 적용한 것으로 볼 수 있으며 더욱이 표준균주가 아닌 돈육포장공정에서 분리한 야생균주를 이용하였다는 점에서 그 의미가 크다고 할 수 있다.

하지만 본 성장예측모델의 실제 적용에 있어서는 몇 가지 한계를 지니고 있다. 우선 미생물성장관련 인자를 온도와 시간만으로 한정하였다는 것이다. 이는 앞서 언급된 것과 같이 Mann

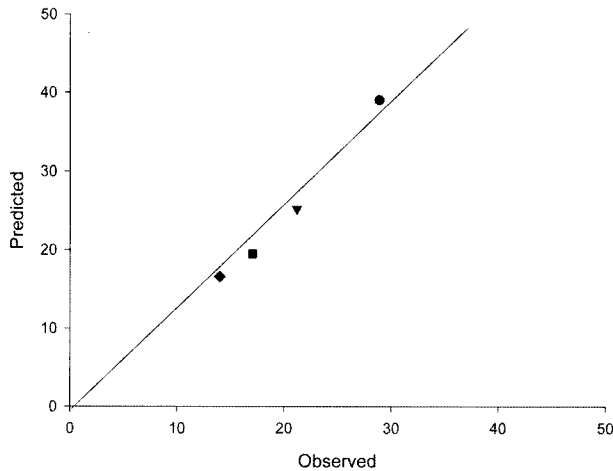


Fig. 1. Comparison of observed and predicted of GT (hour) for *L. monocytogenes* at various temperatures (●: 5, ▼: 10, ■: 15, ◆: 20 °C). $r = 0.99324$, $R^2 = 0.9865$.

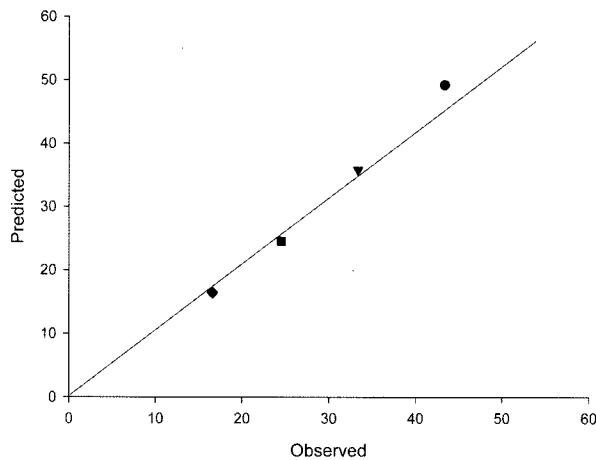


Fig. 2. Comparison of observed and predicted of LPD (hour) for *L. monocytogenes* at various temperatures (●: 5, ▼: 10, ■: 15, ◆: 20 °C). $r = 0.99835$, $R^2 = 0.9967$.

등(21)의 연구결과와 다른 가공식품과 달리 돈육포장공정의 경우 열처리나 식품첨가물의 첨가 등이 없는 단순 공정으로 이루어지기 때문에 미생물 성장과 관련하여 온도와 시간만을 중요한 인자로 선정하였다. 하지만 돈육의 pH나 수분활성도 등도 중요한 영향인자로 작용할 수 있을 것으로 보이며 어느 정도의 영향을 미칠지는 현재로서는 정확하게 결론 지을 수 없으므로 추후 이러한 인자에 대한 연구가 필요할 것으로 보인다. 또한 0°C의 경우에는 성장이 나타나지 않았으므로 이 온도에서의 본 모델의 적용은 어려울 것으로 보인다.

하지만 몇몇 한계에도 불구하고 본 성장예측 모델은 우선적으로 냉장돈육 포장공정에 HACCP 시스템 적용시 Critical Control Point 및 한계기준 설정에 활용될 수 있다(6,25,26), 또한 미생물위해성평가(Microbial risk assessment) 수행과정에서 exposure assessment를 위한 simulation model에 접목하면 원료 돈육 생산에서 유통에 이르는 전 과정에서 온도-시간 조건별 *L. monocytogenes* 성장 가능성 추정이 가능하며, 이를 근거로 냉장돈육 유통과정의 위생관리 온도 및 시간설정에 활용이 가능할 것으로 보인다. 또한 본 모델에서는 초기 오염균수를 실제 오염수준보다 높은 수준의 균량을 접종하였지만 이전의 성

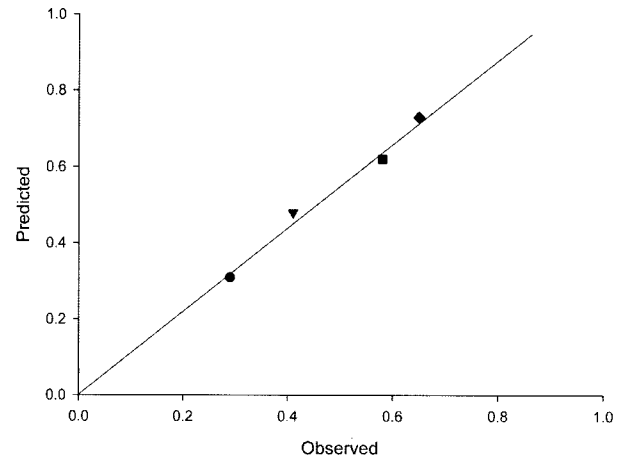


Fig. 3. Comparison of observed and predicted of EGR (Log cfu/hr) for *L. monocytogenes* at various temperatures (●: 5, ▼: 10, ■: 15, ◆: 20°C). $r = 0.99291$, $R^2 = 0.9859$.

장예측모델과 관련한 연구보고(27,28)에서 모델 개발에 영향이 없는 것으로 밝혀져 본 모델의 경우에도 초기 오염균수에 관계없이 적용이 가능한 것으로 보인다.

그러나 한편으로는 성장예측 모델의 신뢰성을 높여 좀더 정확한 risk 예측을 위해서는 모델 개발 과정에서 확률적 개념 적용이 필요하다는 의견이 제시되고 있다(24). 이는 기존에 개발된 모델에서는 대상 미생물의 특성에 맞는 다양성과 변이성이 충분히 고려되지 않았기 때문이다. 본 연구에서 제시한 모델도 확률적 개념이 아닌 point estimate로 나타나므로 미생물의 다양성과 변이성을 충분히 반영하지 못한 제한성이 지적될 수 있다. 확률적 개념 도입을 위해서는 대상 미생물이 노출되는 환경조건에 따른 다양한 반응에 대한 실험적 자료 확보가 필요한데, 여러 준비과정을 거쳐야 하는 어려움이 있겠으나 모델의 신뢰성을 높이기 위해서는 반드시 추진해야 할 과제인 것으로 판단된다.

요 약

본 연구는 냉장돈육에서의 식중독 원인균이면서 냉장온도에서 성장이 가능한 병원성균인 *L. monocytogenes*에 대한 적절한 위생관리를 제시하기 위하여 포장돈육 작업장 원료돈육에서 분리된 야생균주 *L. monocytogenes* 이용하여 돈육포장공정 및 유통조건에서의 *L. monocytogenes*에 대한 성장예측모델을 제시하고자 실시하였다. 성장실험은 온도 5, 10, 15, 20°C에서, 시간은 0, 1, 2, 3, 18, 48, 120 시간에서 실시하였으며, 이를 바탕으로 온도별 Gompertz value인 A, C, B, M의 값과 Growth kinetic인 exponential growth rate(EGR), generation time(GT), lag phase duration(LPD), maximum population density(MPD)를 산출하였다. GT, LPD는 온도가 상승할수록 그 값이 점점 낮아지는 경향을 나타냈으며, EGR의 경우는 반대로 온도가 높아질수록 점점 높아지는 경향을 나타냈다. Gompertz value 중 B와 M 값을 이용하여 온도를 주요 control factor로 선정 한 반응표면분석(Response surface analysis)을 실시하여 온도에 따른 다항식을 산출하였고 이 식을 Gompertz 식에 적용하여 온도와 시간에 따른 냉장돈육에서의 *L. monocytogenes*에 대한 성장정도를 예측할 수 있는 성장예측모델을 제시하였다. 개발된 성장예측모델에 대한 검증은 GT, LPD, EGR에 대한 실험값과 예측값

의 비교를 통하여 실시하였으며, 그 결과 GT, LPD, EGR 모두 통계적으로 유의하게 나타났다($p < 0.01$). 따라서 이 모델은 risk assessment 중 exposure assessment를 위한 성장예측모델로 충분히 이용가능 한 것으로 보이며, 추후 냉장돈육 위생관리기준에 대한 과학적 근거자료로 활용될 수 있을 것으로 보인다.

감사의 글

이 논문은 2003년 농림부 농림기술개발연구사업(20138-03-2-SB010) 및 교육인적자원부 학술연구조성사업비로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구(M01-2004-000-10022-0)되었으며 이에 감사 드립니다.

문헌

1. Rrackett RE. Presence of *Listeria monocytogenes* in food and water. Food Technol. 42: 162-164 (1988)
2. Shelf LA. listeriosis and its transmission by food. Prog. Food Nutri. 13: 362-382 (1989)
3. Truscott RB, Mcnab WB. Comparison of media and procedures for the isolation of *Listeria monocytogenes* from ground beef. J. Food Prot. 51: 626-628 (1988)
4. Schlech Wf, Lavigne PM, Bortolussi RA, Allen AC, Haldane AEV, Wort AJ, Hightower AW, Johnson SE, King SH, Nicholls ES, Broome CV. Epidemic listeriosis-evidence for transmission by food. New Eng. J. Med. 308: 203-206 (1983)
5. Wehr HM. *Listeria monocytogenes*-A current dilemma. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 70: 769-772 (1987)
6. Whiting RC. Microbial Modelling, Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 35: 467-494 (1995)
7. Van Impe JF, Poschet F, Geeraerd AH, and Vereecken KM. Towards a novel class of predictive microbial growth models. Int. J. Food Microbiol. 100: 97-105 (2005)
8. Karl M, Da-Wen S. Predictive food microbiology for the meat industry; A review. Int. J. Food Microbiol. 52: 1-27 (1999)
9. Panisello PJ, Quantick PC. Application of Food MicroModel predictive software in the development of hazard analysis critical control point (HACCP) systems. Food Microbiol. 15: 425-439 (1998)
10. McMeekin TA, Olley J, Ratkowsky DA, Ross T. Predictive microbiology: towards the interface and beyond. Int. J. Food Microbiol. 73: 395-407 (2002)
11. Mafart P. Food engineering and predictive microbiology: on the necessity to combine biological and physical kinetics. Int. J. Food Microbiol. 100: 239-251 (2005)
12. Hong JH, An SC. Isolation and Serotyping of *Listeria monocytogenes* in Pork Fabrication Processing Environment. J. Food Hyg. Safety 13: 425-429 (1998)
13. Ukuku D, Fett W. Behavior of *Listeria monocytogenes* inoculated on cantaloupe surface and efficacy of washing treatments to reduce transfer from rind to fresh-cut pieces. J. Food Prot. 65: 924-930 (2002)
14. Buchanan RL, Cygnarowicz ML. A Mathematical Approach toward Defining and Calculating the Duration of the Lag Phase. Food Microbiol. 7: 237-240 (1990)
15. Gibson AM, Bratchell N, Roberts TA. The effect of sodium chloride and temperature on the rate and extend of growth of *Clostridium botulinum* type A in pasteurized pork slurry. J. Appl. Bacteriol. 62: 479-490 (1987)
16. Buchannan RL, Stahl HG, Whiting RC. Effect and interaction of temperature, pH, atmosphere, sodium chloride and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot. 52: 844-851 (1989)
17. Smith-Simpson S, Schaffner DW. Development of a model to predict growth of *Clostridium perfringens* in cooked beef during cooling. J. Food Prot. 68:336-341 (2005)
18. Grau FH, Vanderlinde PB. Growth of *Listeria monocytogenes* on vacuum packaged beef. Meat Sci. Technol. 34: 518-519 (1988)
19. El-Shenawy MA, Marth MA. Inhibition and inactivation of *Listeria monocytogenes* by sorbic acid. J. Food Prot. 51: 842-847 (1988)
20. Buchanan RL. Predictive Microbiology: Mathematical Modeling of Microbial Growth in Foods. Am. Chem. Soc. 484: 250-260 (1992)
21. Buchanan RL. Predictive Food Microbiology. Trends Food Sci. Technol. 4: 6-11 (1993)
22. Mann JE, Smith L, Brashears MM. Validation of time and temperature values as critical limits for *Salmonella* and background flora growth during the production of fresh ground and boneless pork products. J. Food Prot. 67:1389-1393 (2004)
23. Buchanan RL, Klawitter LA. Effect of temperature history on the growth of *Listeria monocytogenes* Scott A at refrigeration temperatures. Int. J. Food Microbiol. 12: 235-246 (1991)
24. Nauta MJ. Modelling bacterial growth in quantitative microbiological risk assessment is it possible? Int. J. Food Microbiol. 73: 297-301 (2002)
25. Philip HE. Predictive microbiology and HACCP. J. Food Prot. Suppl.: 48-53 (1996)
26. Bahk GJ, Kim CN, Roh WS, Hong CH, Chun SJ, Sim WC, Oh WT, Rho MJ. Application of Predictive Food Microbiology Model in HACCP System of Milk. J. Food Hyg. Safety 16: 103-110 (2001)
27. Buchanan RL, Phillips JG. 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 (1990)
28. Duffy G, Sheridan JJ, Buchanan RL, McDowell DA, Blair IS. The effect of aeration, initial inoculum and meat microflora on the growth kinetics of *Listeria monocytogenes* in selective enrichments broths. Food Microbiol. 11: 429-438 (1994)

(2005년 7월 13일 접수; 2005년 9월 1일 채택)