KOREAN J. FOOD & NUTR.
Vol. 12. No. 6. 569~574(1999)

식품위생관련 세균에 대한 가열처리 조건의 최적화

권 오 진 · 이 보 순*
대경대학 호텔제과제빵과, *대경대학 호텔조리과

Optimization of Heating Conditions for Bacteria Associated with Food Hygiene

Oh-Jin Kwon and Bo-Soon Lee*
Dept. of Hotel Baking Technology, Taekyeung College. Kyeungsan 712-850, Korea
**Dept. of Hotel Culinary Art. Taekyeung College, Kyeungsan 712-850, Korea*

Abstract

Response surface methodology(RSM) was applied to determine the optimum heating conditions(temperature and time) for the inactivation of bacteria associated with food hygiene. Coefficients of determinations(R^2) for the cell growth were 0.9155 ($P<0.05$) in *Pseudomonas aeruginosa*, 0.8997($P<0.05$) in *Escherichia coli*, 0.9690 ($P<0.01$) in *Salmonella typhimurium*, 0.9393($P<0.05$) in *Enterobacter aerogenes* and 0.7905 in *Vibrio parahaemolyticus*. The growth of strains was significantly affected by the temperature and time, and reaction to temperature was most closely correlated to the inhibition of growth. On the basis of superimposed contour maps of cell growth, the optimum range of heating conditions were 55.62~60℃ and 19.25~30 min.

Key words: food hygiene, bacteria, heating condition.

서 론

최근 육류식품의 병원성 미생물 오염은 매우 심각한 공중보건 문제의 하나이며 전세계적으로 인류건강에 위협을 주고 있으므로 이의 예방은 식품산업에서 매우 중요하다[1~4]. 이러한 관점에서 식품의 미생물학적 안전성을 확보하기 위해서는 가열처리가 매우 효과적이다[5]. 그러나 가열처리에 의한 미생물의 살균은 미생물의 종류, 온도, 공기의 조성, 식품의 성분 등에 따라 감수성이 다르므로 살균목적에 따라 온도 및 시간 등을 조절하여야 한다[6~8]. 실제 식품에서 모든 미생물의 완전 불활성화를 위해서는 다소 높은 온도의 가열처리가 요구되나 식품자체의 이화학적 및 기호성의 변화를 최소로 하기 위해서는 가급적 낮은 온도 및 단시간으로 살균목적을 달성하기 위한 연구가 시도되고 있다[9~14]. 그러나 식품에 오염된 모든 미생물들을 살균하기 위한 최적의 가열처리 조건을 잡기 어렵기 때문에 이를 정확히 판단할 수 있는 객관적 기준설정이 필요하다. 또한 제품개발, 공정개선, 품질관리 등의 식품가공 분야에서도 여러가지 변수의 최적화가 요구되고 있으며, 특히 최근에 와서는 실험설계와 computer program을 이용한 반응표면 분석방법의 응용연구가 활발하게 진행되고 있다[15~18].

이에 본 연구는 반응표면분석법(response surface methodology)을 이용하여 식품위생관련 미생물의 불활성화에 미치는 가열처리 온도 및 시간을 최적화하고자 중심합성계획에 의해 설계된 반응조건별로 가열처리한 후 SAS program으로 분석하였다.

* Corresponding author : Oh-Jin Kwon

재료 및 방법

1. 시험균주 및 배지

시험에 사용된 미생물은 한국미생물보존센터로부터 구입한 그람음성균인 *Escherichia coli*(ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa*(ATCC 27853), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Enterobacter*

aerogenes(ATCC 13048) 및 *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC 17802)를 사용하였다. 각종 미생물에 사용된 배지로는 *V. parahaemolyticus*는 3% NaCl이 첨가된 nutrient broth(NB, Difco laboratories, Detroit, MI, USA)와 nutrient agar(NA, Difco)를 사용하였고, 그 외의 세균들은 NB(Difco)와 NA(Difco)를 사용하였다.

2. 균주의 배양과 현탁액의 조제

시험균주를 각각의 사면배지에 24시간 수회 계대배양 후 이것을 동일한 액체배지 100ml에 1 백금이를 접종하여 *E. aerogenes, V. parahaemolyticus*는 30℃, 그 외의 균주들은 37℃에서 24시간 진탕배양(120rpm)한 다음 현탁액 1ml를 다시 새로운 액체배지 100ml에 접종하고 8시간 진탕배양시켜 대수기의 세포를 얻었다. 이 세포 현탁액을 4℃에서 10분간 원심분리(9,000×g)하여 얻은 균체를 냉 0.1M phosphate buffer(pH 7.1)로 2회 세척, 원심분리하여 최종 세포의 농도가 10^7~10^9 CFU/ml가 되도록 조절하였다.

3. 실험계획

50, 55℃ 및 60℃에서의 가열처리시 미생물의 증식에 미치는 영향을 monitering하고자 실험계획으로서 중심합성계획을 사용하였으며 반응표면회귀분석을 위해 SAS(statistical analysis system) program을 사용하였다. 가열처리시 2가지 요인(독립변수)은 반응온도(X_1) 및 반응시간(X_2)이며 각 변수들은 -1, 0, 1의 세단계로 부호화하였고 실험조건들은 반응온도는 50℃(-1), 55℃(0) 및 60℃(1)로, 반응시간은 10분(-1), 20분(0) 및 30분(1)으로 각각 나타내었다. 미생물의 불활성화에 관련된 반응변수(Y_n)로서는 *P. aeruginosa*(Y_1), *E. coli* (Y_2), *S. typhimurium*(Y_3), *E. aerogenes*(Y_4), *V. parahaemolyticus*(Y_5) 등으로 하였다. 이때 2가지 반응조건에 따른 2차 회귀모형식은 식 (1)과 같다. 그리고 회귀분석 결과 임계점이 최대점과 최소점이 아니고 안정점일 경우에는 능선분석을 하여 최적점을 구하였다.

$$Y_n = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{12}X_1X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 \quad \cdots\cdots (1)$$

여기서, Y_n는 위생관련 세균들의 불활성화, X_1 및 X_2는 독립변수, b_0는 절편, b_n은 회귀계수이다.

4. 가열 처리

가열처리는 시험균주의 세포 현탁액 2.0ml를 멸균 시험관(∅1.0×10cm)에 넣고 50, 55 및 60℃±0.2의 항온수조에서 각각 10, 20 및 30분간 가열처리한 후 균 현탁액을 살균된 냉 0.1M phosphate buffer로 적절히 희석하여 각 미생물에 적합한 배지가 들어 있는 petri dish에 0.2ml씩 접종하여 spreader로 도말하고 *E. aerogenes, V. parahaemolyticus*는 30℃, 그외의 균주들은 37℃에서 배양한 후에 형성된 집락을 계수하였다.

결과 및 고찰

1. 미생물의 생육특성

여러가지의 가열처리 조건에서 위생관련 세균들의 생육에 미치는 영향을 모니터링하고자 각 요인변수에 따른 반응변수의 값(Table 1)을 반응표면 분석하여 이들의 contour map을 Fig. 1에 나타내었다. 2가지 요인변수인 가열처리 온도(50~60℃) 및 시간(10~30분)이 변환될 때 반응변수인 *P. aeruginosa*(Y_1), *E. coli*(Y_2), *S. typhimurium*(Y_3), *E. aerogenes*(Y_4) 및 *V. parahaemolyticus*(Y_5)의 생육에 대한 반응표면 회귀계수는 Table 2와 같고 이를 반응표면 회귀식으로 나타내면 다음의 식 (2)~(6)과 같다. 이 때 R_2은 Y_1은 0.9155($P<0.05$), Y_2는 0.8997($P<0.05$), Y3는 0.9690($P<0.01$), Y_4는 0.9393($P<0.05$)로서 유의성이 인정되었으나 Y_5는 0.7905로서 유의성이 인정되지 않았다.

$$Y_1 = 8723.6428 - 255.4143X_1 - 95.3036X_2 + 1.3750X_1X_2 + 1.8828X_1^2 + 0.2557X_2^2 \quad \cdots\cdots (2)$$

$$Y_2 = 340733 - 10839X_1 - 2846.3178X_2 + 42.7850X_1X_2 + 86.4343X_1^2 + 8.6036X_2^2 \quad \cdots\cdots (3)$$

$$Y_3 = 455070 - 15149X_1 - 1955.1726X_2 + 31.7350X_1X_2 + 126.0514X_1^2 + 2.4778X_2^2 \quad \cdots\cdots (4)$$

$$Y_4 = 188486 - 6130.4857X_1 - 1154.5131X_2 + 16.7650X_1X_2 + 50.0971X_1^2 + 4.2593X_2^2 \quad \cdots\cdots (5)$$

$$Y_5 = 320995 - 9542.6210X_1 - 4525.5619X_2 + 64.3820X_1X_2 + 71.1108X_1^2 + 18.9927X_2^2 \quad \cdots\cdots (6)$$

가열처리 온도 및 시간이 균주들의 생육에 미치는 영향을 보면 Fig. 1과 같다. 처리온도와 시간이 높을수록 균주의 생육을 억제하였으며 특히, 고온일때는 단시간, 저온에서는 장시간 처리가 균주의 불활성화에 좋게 나타났다. 가열처리 온도 및 시간에 대하여 변수분석을 하여 본 결과, Table 3과 같으며 처리온도에

Table 1. Experimental data for inhibition of bacterial growth under different conditions of heating temperature and time

No.	Independent variables		Dependent variables				
	Temp. (℃)	Time (min)	*P.*[2] *aeruginosa*	*E.*[2] *coli*	*S.*[3] *typhimurium*	*E.*[3] *aerogenes*	*V.*[4] *parahaemolyticus*
1	50(-1)[1]	10(-1)	380	10000	10000	5000	13000
2	50(-1)	30(1)	65	1400	3600	1600	5
3	60(1)	10(-1)	65	44	75	48	120
4	60(1)	30(1)	25	1	22	1	1.4
5	55(0)	20(0)	42	23	77	60	42
6	55(0)	20(0)	42	23	77	60	42
7	60(1)	20(0)	31	4	42	16	20
8	50(-1)	20(0)	300	2900	6000	2000	120
9	55(0)	30(1)	38	3	25	43	3
10	55(0)	10(-1)	250	300	210	320	380

[1]Parenthesises are the coded symbols of levels of independant variables.
Cell population: [2], cells(CFU/ml)×10^4; [3], cells(CFU/ml)×10^5; [4], cells(CFU/ml)×10^2.

Table 2. Regression coefficients of the second order polynormials[1] for three response variables

Coefficient	*P. aeruginosa* Y_1	*E. coli* Y_2	*S. typhimurium* Y_3	*E. aerogenes* Y_4	*V. parahaemolyticus* Y_5
b_0	8723.6428	340733.0000**	455070.0000***	188486.0000**	320995.0000
Linear					
b_1	-255.4143	-10839.0000*	-15149.0000***	-6130.4857**	-9542.6210
b_2	-95.3036*	-2846.3178**	-1955.1726**	-1154.5131**	-4525.5619*
Interactions					
b_{12}	1.3750*	42.7850**	31.7350**	16.7650**	64.3820*
Quadratic					
b_{11}	1.8828	86.4343*	126.0514***	50.0971**	71.1108
b_{22}	0.2557	8.6036	2.4778	4.2593	18.9927
% Variability explained(R_2)	0.9155	0.8997	0.9690	0.9393	0.7905
Probability of F	0.0287	0.0397	0.0041	0.0152	0.1534

[1]Model on which X_1=temperature, X_2=time is: $Y_n=b_0+b_1X_1+b_2X_2+b_{12}X_1X_2+b_{11}X_1^2+b_{22}X_2^2$
(Y_n:dependent variables, b_0:intercept, b_n:regression coefficients)
Significant at *, 10% level; **, 5% level; ***, 1% level.

대한 F-ratio가 *S. typhimurium*이 38.142로 가장 높게 나타났으며 그 다음이 *E. aerogenes*가 17.530로 유의성도 1% 이내의 유의수준에서 인정되었다. 처리시간은 *P. aeruginosa*가 7.359, *S. typhimurium*이 6.950으로서 5% 이내의 유의수준에서 유의성이 인정되었으나 *V. parahaemolyticus*는 10% 이내의 유의수준에서 유의성이 인정되지 않았다. 이러한 결과로 볼 때 *S. typhimurium*와 *E. aerogenes*는 온도가, *P. aeruginosa*와 *S. typhimurium*은 시간이 각각 균주의 생육억제에 주로 영향을 미치고 있었고 *V. parahaemolyticus*는 온도와 시간에 별 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. Sorqvist[19]는 *Y. enterocolitica*(Y_1, Y_2, Y_3), *C. coli* (C59, C165), *C. jejuni*(C1503)의 균주를 56, 58℃ 및 60℃에서 1~10분간 가열처리한 결과, 균주들은 처리

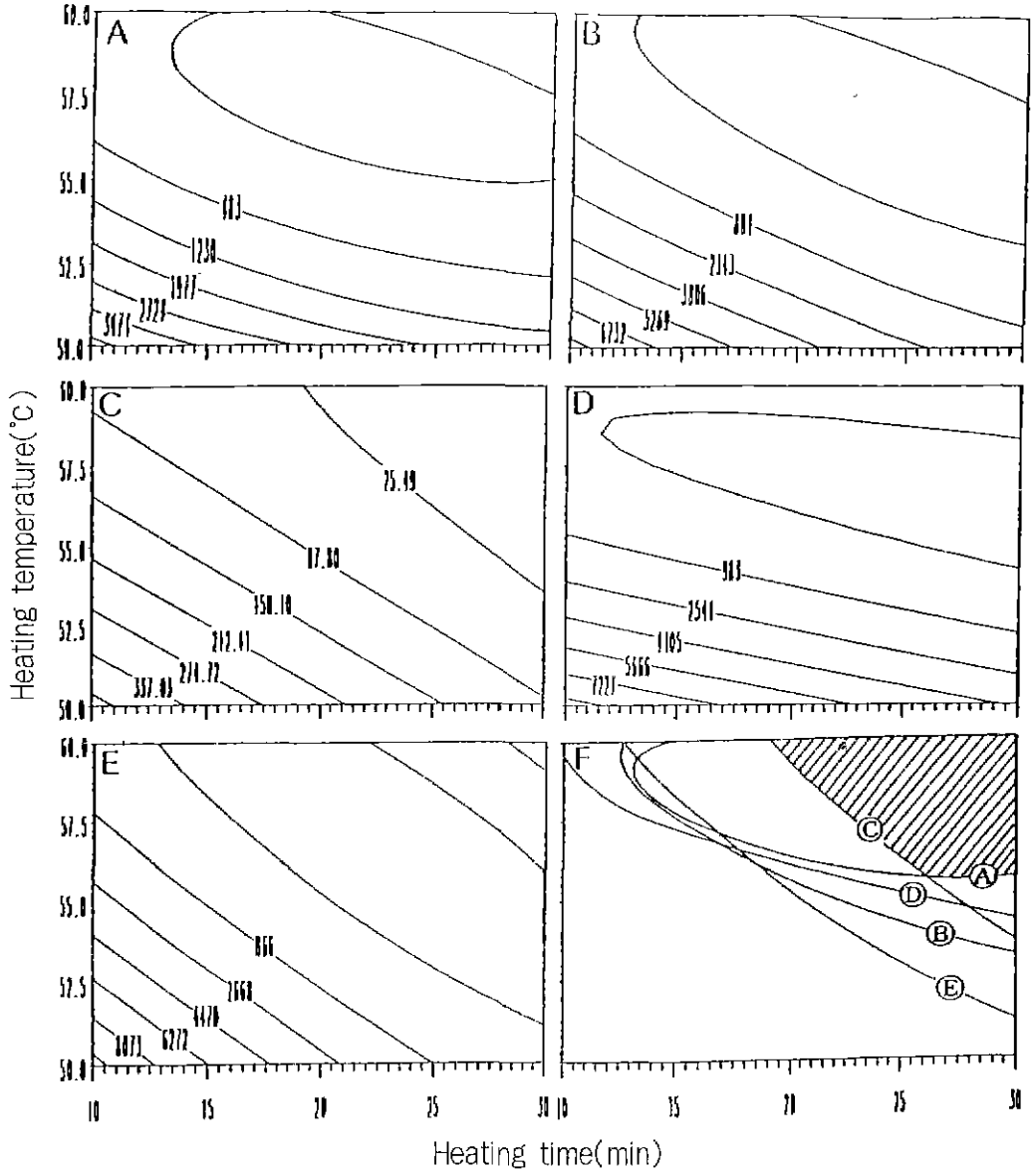

Fig. 1. Contour map for the effect of heating temperature and time on inactivation of microorganisms.
A: *E. aerogenes*, B: *E. coli*, C: *P. aeruginosa*, D: *S. typhimurium*, E: *V. parahaemolyticus*, F: Superimposed contour map for all over optimization.

Table 3. Analysis of variables for the overall effect of process variables on the responses for model food system

Heating conditions	F-Ratio				
	P. aeruginosa	*E. coli*	*S. typhimurium*	*E. aerogenes*	*V. parahaemolyticus*
Temp.(℃)	8.846**	9.430**	38.142***	17.530***	3.257
Time(min)	7.359**	4.988*	6.950**	5.223*	3.395

Significant at *, 10% level; **, 5% level, ***, 1% level.

Table 4. Pearson correlation matrix among variables

Variables	Temp.	Time	*P. aeruginosa*	*E. coli*	*S. typhimurium*	*E. aerogenes*
P. aeruginosa	-0.63958**	-0.58116*				
E. coli	-0.61719*	-0.38718	0.80473***			
S. typhimurium	-0.76270***	-0.26015	0.82159***	0.94634***		
E. aerogenes	-0.72177**	-0.31492	0.81224***	0.98216***	0.98291***	
V. parahaemolyticus	-0.43233	-0.44921	0.69281**	0.95430***	0.80799***	0.89237***

Significant at *, 10% level; **, 5% level; ***, 1% level.

Table 5. Predicted levels of optimum heating conditions for responses variables by the ridge analysis

Heating conditions	Levels for optimum responses				
	P. aeruginosa	*E. coli*	*S. typhimurium*	*E. aerogenes*	*V. parahaemolyticus*
Temp.(℃)	56.64	56.49	56.31	57.24	56.22
Time(min)	29.45	25.21	29.65	22.21	24.36
Morphology	minum	minuim	minuim	minuim	minum

온도 및 시간에 따라 생존율이 각각 차이가 있었다고 보고하였다.

2. 변수상호간의 상관관계

가열처리 온도 및 시간 등의 요인변수와 미생물 생육특성을 나타내는 반응변수들의 각각의 상관계수를 구해 본 결과는 Table 4와 같다. *S. typhimurium*, *E. aerogenes*, *P. aeruginosa* 및 *E. coli*의 생육은 가열처리 온도와 상관계수가 각각 -0.76270($P<0.01$), -0.72177($P<0.05$), -0.63958($P<0.05$) 및 -0.61719($P<0.1$)로서 높은 부(負)의 상관관계를 나타내었고 가열처리 시간과는 *P. aeruginosa*가 -0.58116의 상관계수로서 10% 수준에서 유의성이 인정되었지만 *V. parahaemolyticus*는 가열처리 온도 및 시간 등과 상관관계가 없었다. 한편 각 균주들간의 상관관계는 1 또는 5% 수준에서 유의성이 나타났다. 이와 같은 상관관계로 볼 때 가열처리 조건에서 처리온도 및 시간에 따라 균주의 생육에 유의적인 영향을 미치게 됨을 알 수 있었고 생육억제에는 처리온도가 가장 큰 상관관계가 있음을 알 수 있었다. 한편, Atanda와 Ikenebomeh[20]는 부패된 우유(whole milk)를 30분 가열처리하여 생균수를 조사한 결과, 55~65℃에서 10^4 CFU/ml(대조구: 10^2 CFU/ml)으로 별다른 차이가 없었으나, 70℃에서는 10^3 CFU/ml로 나타나 가열온도가 미생물의 불활성에 더 영향이 있다고 보고하였다.

3. 최대생육억제에 대한 가열처리 조건 예측

각 반응변수에 대한 회귀분석을 실시해 본 결과, 반응표면에서 정상점이 모두 안장점을 나타내고 있었다. 따라서 능선분석을 하여 최적점을 구해본 결과, Table 5에 나타낸 바와 같이 *P. aeruginosa*의 최대생육억제를 나타내는 가열처리 조건은 온도 56.64℃ 및 시간 29.45분이었으며 또한, *E. coli*는 56.49℃ 및 25.21분, *S. typhimurium*은 56.31℃ 및 29.65분, *E. aerogenes*는 57.24℃ 및 22.21분, *V. parahaemolyticus*는 56.22℃ 및 24.36에서 각각 균수가 최대로 감소될 수 있을 것으로 예측되었다. Fedio와 Jackson[11]은 *L. monocytogenes* 균주를 60℃에서 20분간 가열처리한 결과, 10^6 CFU/ml 이상의 균수가 감소되었다고 보고하여 본 실험에서의 예측치와 유사하였다.

4. 가열처리 조건의 최적화

가열처리 조건에 대한 이들 반응변수들의 값은 조금씩 다른 양상의 contour map을 나타내고 있으므로 위생관련 세균들에 대한 불활성화에 관련된 2가지 반응변수들의 높은 값을 다 같이 충족시킬 수 있는 최적조건을 얻기 위하여 이들 contour map을 모두 겹쳐서 superimposed contour map을 작성하여 보았다. 균주들의 불활성화를 최대화시킬 수 있는 예측된 가열처리 최적조건 범위는 Fig. 1(F)의 빗금친 부분이다. 가열처리에서 최적조건 범위는 가열온도 55.62~60.00℃, 가열시간 19.25~30.00분으로 각각 나타났고 이들 조건은 식품제조시 가열살균 공정에 이용할 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

반응표면분석법으로 식품위생관련 세균의 불활성화를 위한 가열처리 조건(온도, 시간)을 최적화하였다. 균주의 생육에 대한 반응표면 회귀식의 R^2은 *P. aeruginosa*가 0.9155($P<0.05$), *E. coli*는 0.8997($P<0.05$), *S. typhimurium*은 0.9690($P<0.01$), *E. aerogenes*는 0.9393($P<0.05$) 및 *V. parahaemolyticus*는 0.7905로 나타났다. 가열처리 온도 및 시간에 따라 균주의 생육에 유의적인 영향을 미치는 것으로 나타났으며, 생육억제에는 반응온도가 가장 큰 상관관계가 있음을 보여주었다. 각각의 가열처리 조건에 따른 균주의 불활성화를 종합하여 superimposed contour map을 작성한 결과, 55.62~60℃에서 19.25~30분간의 처리가 균주의 불활성화 최적조건이었다.

참고문헌

1. Archer, D. L. and Kvenberg, J. E.: Incidence and cost of food borne diarrheal disease in the United States, *J. Food Protect.*, 48, 887~894 (1987).
2. Bryan, F. L.: Foodborne diseases in the U. S. associated with meat and poultry, *J. Food Protect.*, 43, 140~150 (1980).
3. Heidelbaugh, N. D. and Menning, E. L.: Safety of foods of animal origin, *J. Amer. Vet. Med. Assn.*, 203, 199~205 (1993).
4. Roberts, T., Weiss, M. and Southard, L.: Issues in pork safety: costs, controls and incentives, *Agric. Outlook*, 201, 28~32 (1993).
5. Beran, G. W., Shoeman, H. P. and Anderson, K. F.: Food safety-an overview of problems, *Dairy Food Environ. Sanit.*, 11, 189~194 (1991).
6. Ahmed, N. M., Conner, D. E. and Huffman, D. L.: Heat-resistence *Escherichia coli* O157:H7 in meat and poultry as affected by product composition, *J. Food Sci.*, 60, 606~610 (1995).
7. Moats, W. A., Dabbah, R. and Edwards, V. M.: Survival of *Salmonella anatum* heated in various media, *Appl. Microbiol.*, 21, 476~481 (1971).
8. Schaffner, D. F., Hamdy, M. K., Toledo, R. T. and Tift, M. L.: *Salmonella* inactivation in liquid whole egg by thermoradiation, *J. Food Sci.*, 54, 902~905 (1989).
9. Bradshaw, J. G., Peeler, J. T., Corwin, J. J., Hunt, J. M., Tierney, E. P., Larkin, E. P. and Twedt, R. M.: Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in milk, *J. Food Protect.*, 48, 743~745 (1985).
10. Kim, K. T., Murano, E. A. and Olson, D. G.: Heating and storage conditions affect survival and recovery of *Listeria monocytogenes* in ground pork, *J. Food Sci.*, 59, 30~32 (1994).
11. Fedio, W. M. and Jackson, H.: Effect of tempering on the heat resistance of *Listeria monocytogenes*, *Lett. Appl. Microbiol.*, 9, 157~160 (1989).
12. Mackey, B. M. and Derrick, C. M.: The effect of prior heat shock on the thermoresistance of *Salmonella thompson* in foods, *Lett. Appl. Microbiol.*, 5, 115~118 (1987).
13. Mackey, B. M. and Derrick, C. M.: Changes in the heat resistance of *Salmonella typhimurium* during heating at rising temperatures, *Lett. Appl. Microbiol.*, 4, 13~16 (1987).
14. Tsuchido, T., Hayashi, M., Takano, M. and Shibasaki, I.: Alteration of thermal resistance of microorganisms in a non-isothermal heating process, *J. Antibacterial Antifungal Agents*, 10, 105~109 (1982).
15. Holt, S. D., Resurreccion, A. V. A. and Mcwatters, K. H.: Formulation, evaluation and optimization of tortillas containing wheat, cowpea and peanut fours using mixture response surface methodology, *J. Food Sci.*, 57, 101~107 (1992).
16. Floros, J. D. and Chinnan, M. S.: Seven factor response surface optimization of a double stage lye(NaOH) peeling process for pimento peppers, *J. Food Sci.*, 53, 631~638 (1988).
17. Guzman-Maldonado, H., Paredes-Lopez, O. and Dominguez, J.: Optimization of an enzymatic procedure for the hydrolytic depolymerization of amaranth starch by response surface methodology, *Wiss. U-Technol.*, 26, 28~33 (1993).
18. Mudahar, G. S., Toledo, R. T., Floros, J. D. and Jen, J. J.: Optimization of carrot dehydration process using response surface methodology, *J. Food Sci.*, 54, 714~719 (1989).
19. Sorqvist, S.: Heat resistance of *Campylobacter* and *Yersinia* strains by three methods, *J. Appl. Bacteriol.*, 67, 543~549 (1989).
20. Atanda, O. O. and Ikenebomeh, M. J.: Effect of heat treatments on the microbial load of 'nono', *Lett. Appl. Microbiol.*, 9, 233~235 (1989).

(1999년 11월 6일 접수)