

반응표면 분석을 이용한 *Salmonella enteritidis*의 증식 효능 평가

홍 정 미 · 정 호 준 · 이 흥 근
서울대학교 환경보건학과
(2002년 7월 7일 접수; 2002년 11월 13일 채택)

Assessment of the Effectiveness of a Natural Antimicrobial substance on *Salmonella enteritidis* using Response Surface Analysis

Jeong-Mi Hong, Hyo-June Jeong and Hong-Keun Lee

Dept. of Environmental Health Science, Graduate School of Public Health, Seoul National Univ., Seoul 110-799, Korea
(Manuscript received 7 July, 2002; accepted 13 November, 2002)

This study was performed to investigate the single and combined effect of concentrations of garlic juice according to the pH and temperature on the growth of *Salmonella enteritidis* in brain heart infusion broth, and to develop Response surface model for the effect of concentrations of garlic extract. The results of electric conductivity of *Salmonella enteritidis* growing in the range of incubation temperature (25~42°C), pH (5.5~9.0) and concentration of garlic juice (0~0.8%) showed that a badge with high temperature had low D.T.value and concentration of garlic extract were significantly correlated with D.T.value ($p < 0.01$). Growth of *Salmonella enteritidis* in the condition of 37°C and pH 7.0 presented the lowest D.T.value.

Key words : *Salmonella enteritidis*, Response surface analysis, Electric conductivity.

1. 서 론

물이나 식품의 안전성을 위협하는 요인 중 가장 중요한 것은 바로 미생물로 인한 수인성 전염병 혹은 식중독의 발생이다¹⁾. 이를 방지하기 위해서는 미생물로 인한 오염을 미연에 방지하고 물이나 식품에 존재하는 미생물의 증식을 억제하고 사멸하는 각종 기술의 효율적인 도입과 실행이 요구된다. 이를 통해 신속하게 수중에 존재하는 수인성 전염병 유발 미생물의 거동을 파악할 수 있다. 그러나 전통적으로 사용되었던 미생물 시험 방식(standard plate count method)은 정확하기는 하나 시간이 많이 걸리고 노동수요가 많다²⁾. 이러한 단점들을 보완하기 위해 여러 가지 대체 방식들이 등장하고 있으며 이들 방식은 시간과 노동의 절약을 가져왔다.

이러한 대체 방식 중의 하나로 Impedance me-

thod(전기 전도도 측정법)를 들 수 있는데, 1898년 처음으로 미생물에 의해 배지안의 전기전도도가 변한다는 사실이 발견되어 미생물의 측정에 응용되고 있다. 이는 미생물이 대사작용을 하면서 낮은 전하의 고분자 배지성분들을 높은 전하의 저분자 물질로 전환시키며, 그 결과 배지 내의 저항이 감소하고 따라서 전기전도도가 증가되는 원리를 이용한 것이다³⁾. 미생물의 증식에 따른 전기적 특성의 변화탐지가 가능한 시점(detection time value ; D.T. value)은 초기균량, 시험미생물의 증식 특성 및 배지의 특성에 따라 다르며, 이 시점은 대개 시험된 미생물의 수가 $10^6 \sim 10^7$ cfu/mL 정도에 도달하는 시간이다⁴⁾.

개발된 측정장비들에 의해 생산된 많은 데이터와 개인용 컴퓨터의 공급으로 이제는 미생물의 수를 측정하고 관찰하는 수준에서 미생물의 거동을 예측하는 예측미생물학으로 급속도로 발전하게 되었다. 예측미생물학은 여러 가지 환경요인에 대한 미생물의 반응에 대한 수식과 수학적 모델로의 표현이라고 할 수 있으며, 이로써 물이나 식품의 품질과 미

Corresponding Author : Hyo-June Jeong, Dept. of Environmental Health Science, Graduate School of Public Health, Seoul National Univ., Seoul 110-799, Korea.
Phone : +82-2-740-8871
E-mail : jeong1208@dreamwiz.com

생물학적 안전성에 대한 결정을 내리는데 정확성을 부여할 수 있다⁵⁾. 본 연구에서 사용된 전기전도도 측정방식도 이러한 예측미생물학의 한 단면을 보여주는 대표적인 예라고 할 수 있다. 전기전도도법은 D.T.value에 의존한 오염된 검체의 미생물 수와의 관계에 관한 것들로서 D.T.value와 미생물 수와의 연관성을 파악한 후에 이를 검체의 D.T.value 측정 및 병행된 표준평판배양법으로 평가하고, 두 방법 간의 통계적 연관성(statistical correlation)을 통해 미생물 수를 간접 추정하는데 이용되어 왔다^{6,7)}. 본 연구에서는 온도, pH 및 항균제(마늘즙)의 농도가 *Salmonella enteritidis*의 성장에 미치는 영향을 조사하기 위해 전기전도도를 측정하여 각 온도, pH 및 항균제의 농도를 변수로 하는 모델을 개발하고 이를 항균제 사용을 통해 미생물의 성장을 제어하는데 이용하고자 한다.

2. 실험재료 및 방법

2.1. 실험 재료

2.1.1. 실험균주

본 실험에 사용한 균주는 표준균주 *Salmonella enteritidis*(ATCC 4931)를 서울시 보건환경연구원에서 분양받아 lactose broth에서 $36 \pm 1^\circ\text{C}$, 48시간 배양하여 1% peptone, 37% glycerol배지에 진하게 부유시켜 -35°C 에 보관하였다. 시험균주는 Mac-Conkey agar에 도말하여 $36 \pm 1^\circ\text{C}$, 48시간 배양한 후 $0 \sim 4^\circ\text{C}$ 에 냉장보관 하였다가 3일마다 계대배양 시키면서 사용하였다⁸⁾. 시험용 균주는 백금 루프를 이용하여 멸균 생리식염수 10ml에 접종한 다음, 그 중 1ml를 취하여 lactose broth(Difco) 50ml에 접종하고, 37°C 에서 24시간동안 200rpm으로 진탕배양(shaking incubator, Vision Scientific Co. Ltd.)하였다. 이를 BHI(brain heart infusion) broth에 단계별로 희석하여 시험균액($1.4 \sim 1.8 \times 10^3$ cfu/ml)으로 사용하였다.

2.1.2. 항균물질의 제조

껍질을 제거한 마늘을 증류수로 세척한 후 물기를 제거한 다음, homogenizer로 1분 동안 마쇄하고 거즈를 이용하여 압착한 후, 5mm filter로 거른 후 다시 $0.4 \mu\text{m}$ Millipore filter를 이용하여 여과 제균한 후 항균물질로 사용하였다⁹⁾.

2.1.3. 시험용 배지의 제조

121°C 에서 15분간 고압증기멸균한 BHI broth를 1N HCl과 1N NaOH을 이용하여 pH 5.5, pH 7.0, pH 8.0, pH 9.0으로 조정하고, 각각을 100ml 삼각 플라스크에 25ml씩 넣고, 준비된 마늘즙을 0 %, 0.2

%, 0.3 %, 0.4 %, 0.5 %, 0.6 %, 0.7 %, 0.8 %로 넣고 균일하게 혼합되도록 하였다.

2.2. 실험 방법

2.2.1 실험계획

전기전도도 측정법은 온도(25, 30, 37, 42°C), pH(5.5, 7, 8, 9) 그리고 마늘즙의 농도(0~0.8%)로 $4 \times 4 \times 8$ full factorial 실험을 진행하였다¹⁰⁾. 온도, pH, 마늘즙의 농도 등의 단위 차이에서 오는 모델식의 오류를 방지하기 위해 Table 1과 같이 각각의 변수를 -1에서 1사이의 값으로 코드화하여 실험하였다.

Table 1. Variable transformation for experiment design

Variable	Uncoded	Coded
Temp	25	-1
	30	-0.412
	37	0.412
	42	1
pH	5.5	-1
	7	-0.143
	8	0.429
	9	1
Conc. of garlic extract (%)	0	-1
	0.2	-0.5
	0.3	-0.25
	0.4	0
	0.5	0.25
	0.6	0.5
	0.7	0.75
	0.8	1

2.2.2. 전기전도도 측정

전기전도도의 측정을 위해 Bactometer microbial monitoring system (Model 64, Vitek Instrument Ltd.)을 사용하였다. 배양기의 온도를 지정한 후, 2개의 알루미늄 전극을 갖는 well에 마늘즙을 첨가한 배지 0.5ml와 시험균액 0.1ml를 무균 상태로 주입하고, 이들 16개로 구성된 module을 incubator에서 배양시키면서 매 6분 간격으로 각 well의 전기전도도 변화와 전기전도도가 상승하기 시작한 시간(detection time ; D.T)을 자동적으로 측정하도록 하였다.

2.2.3. 전기전도도 변화 곡선의 모수 산출

Bactometer를 통해 나온 각각의 전기전도도의 변화곡선에서 30개의 점을 선택하여 Gompertz function¹¹⁾(식 1)에 적합시켰으며, SPSS (SPSS Inc.

Version 9.0)의 nonlinear regression procedure 중 sequential quadratic programming을 사용하여 모수(C,B,M)를 산출하였다^{12,13)}.

$$Y(t) = C[\exp\{-\exp(-B(t-M))\}] \quad (\text{식 1})$$

Y : 시간에 따른 전도도에서 초기 전도도값을 뺀 증가치(μS)

C : 시간이 무한대로 수렴할 때의 전도도 증가치(μS)

B : M에서 전도도의 상대적 변화속도(1/hr)

M : 최대 전도도의 변화를 나타내는 시간(hr)

t : 시간(hour)

3. 결과 및 고찰

3.1. 온도, pH 및 마늘즙의 농도가 D.T.value에 미치는 영향

배양온도가 *Salmonella enteritidis*의 D.T.Value

에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 각 pH에서 마늘즙 농도가 0 %인 경우의 D.T.value를 관찰한 결과, 증식 적정 온도⁴⁾가 37°C에 근접할수록 D.T.value가 낮아지는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1). 이는 배양온도가 증가하면서 D.T.value가 낮아진다는 기존의 연구¹⁴⁾와 일치하는 것이며 또한 증식 최적조건인 37°C, pH 7에서 가장 낮은 D.T.value를 나타내었고, 미생물이 증식하기 어려운 산성조건인 pH 5.5에서는 가장 높은 D.T.value를 나타내었다.

첨가한 마늘즙의 농도가 D.T.value에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 Figs. 2-5와 같이 각 조건별로 농도와 D.T.value의 상관관계를 분석하였다. 모든 조건에서 상관계수(r)는 0.85이상이었으며, 기울기는 모두 양의 값으로 나타나, 마늘즙의 농도가 증가하면 D.T.value가 증가하는 직접 선형관계(direct linear relationship)임을 알 수 있었다. 마늘즙의 항균성은 이미 여러 문헌^{9,15)}을 통해 알려진 바 있다.

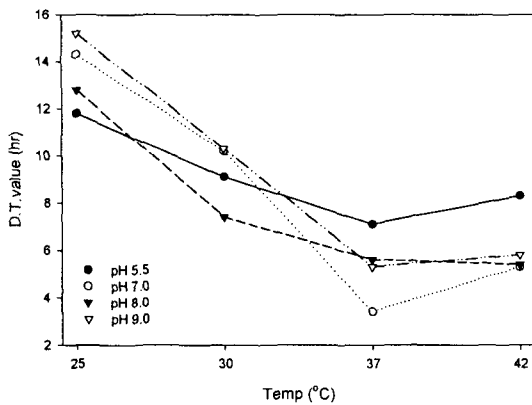


Fig. 1. Effect of the temperature and pH on the D.T.value of *Salmonella enteritidis*.

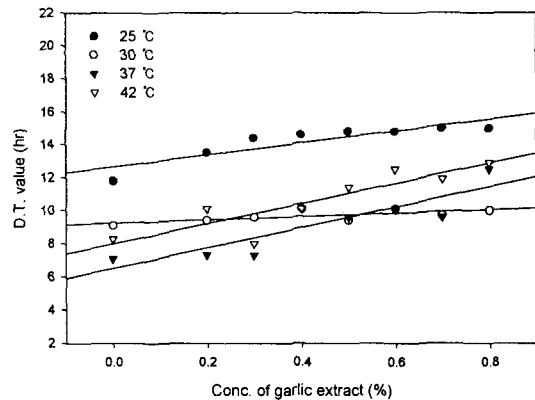


Fig. 2. Effect of the garlic extract concentration and temperature on the D.T.value of *Salmonella enteritidis* at pH 5.5.

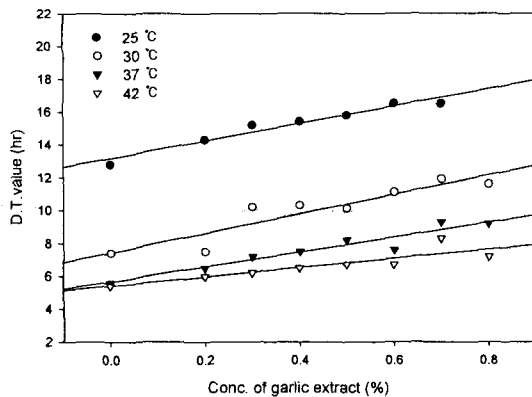


Fig. 3. Effect of the garlic extract concentration and temperature on the D.T.value of *Salmonella enteritidis* at pH 7.0.

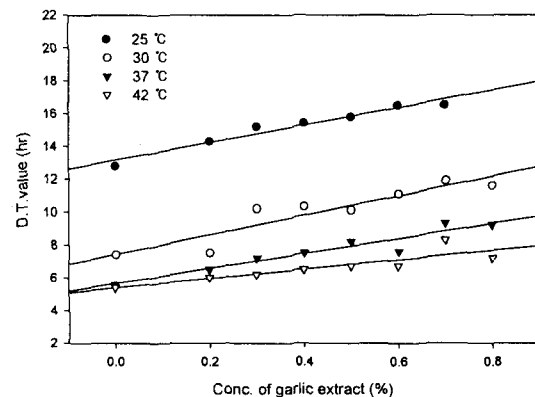


Fig. 4. Effect of the garlic extract concentration and temperature on the D.T.value of *Salmonella enteritidis* at pH 8.0.

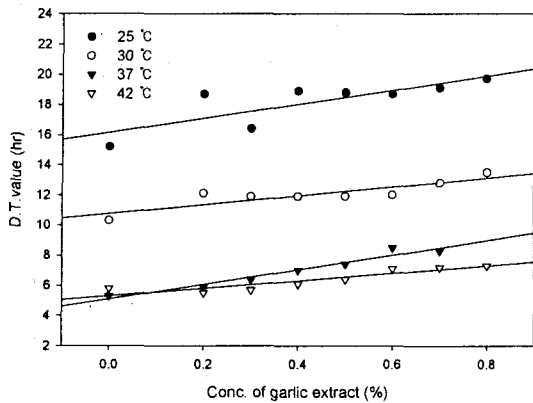


Fig. 5. Effect of the garlic extract concentration and temperature on the D.T.value of *Salmonella enteritidis* at pH 9.0.

마늘즙액 1~2% 이상에서는 미생물의 생육을 저해하거나 사멸하는 효과가 있으나 비교적 낮은 농도로 첨가된 향균물질은 마늘즙에 민감한 균들의 성장을 지연시키고, 나머지는 정상적으로 성장하게 한다고 알려져 있다. 따라서 D.T.value도 높아진다는 것을 이 실험 결과를 통해서도 관찰할 수 있었다.

3.2. D.T.value에 의한 항균효능 모델링

*Salmonella enteritidis*의 최대 D.T.value는 외부 요인인 온도, pH, 마늘즙의 농도 등의 복합적 상호작용으로 미생물 증식이 가장 지연되는 상황으로 해석할 수 있다. 이러한 상호작용 속에서 최대

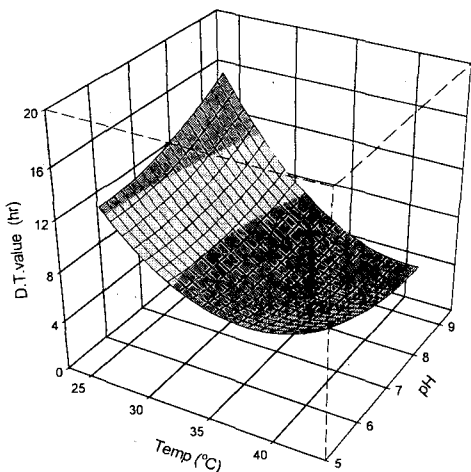


Fig. 6. Three-dimensional plot of D.T.value of *Salmonella enteritidis* at different temperature and pH in brain heart infusion treated with 0 % garlic concentration.

Table 2. Estimation of parameters of response surface model

Variable	Estimated parameter	t	p
intercept	8.0604	30.480	0.0000
T	-4.2583	-28.562	0.0000
pH	-0.0584	-0.379	0.7052*
C	1.7294	9.468	0.0000
T ²	3.3029	12.166	0.0000
T · pH	-1.8395	-9.268	0.0000
pH ²	0.8416	3.377	0.0010
C · T	-0.2195	-0.921	0.3589*
C · pH	-0.0777	-0.315	0.7532*
C ²	-0.1899	-0.639	0.5243*
r ²	0.9123		

* : Not significant

D.T.Value를 추정하기 위해 온도(T)와 pH, 마늘즙의 농도(C)를 설명변수로 하고, 실험으로 얻은 D.T.value(Y)를 반응변수로 하여 Table 2와 같이 반응 표면분석을 시행하여 결과를 모델식으로 표현하였다(식 2).

$$D.T.value = 8.0604 - 4.2583T - 0.0584pH + 1.7294C - 1.8395T^2 - 0.2195TC - 0.0777pHC + 3.3029T^2 + 0.8416 pH^2 - 0.1897C^2 \quad (식 2)$$

온도, pH, D.T.value의 관계를 파악하기 위해 Fig. 6 및 7과 같이 3차원 그래프로 표현하였다. 3차원 그래프를 통해서 마늘즙의 농도가 0 %인 경

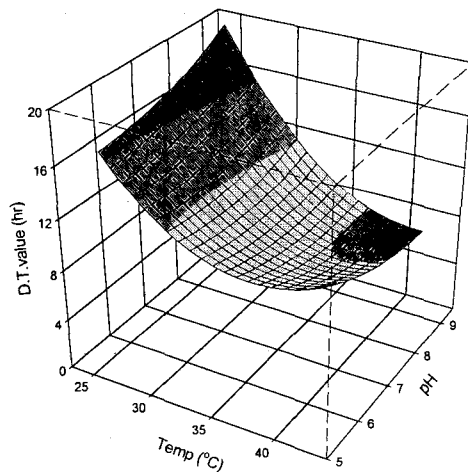


Fig. 7. Three-dimensional plot of D.T.value of *Salmonella enteritidis* at different temperature and pH in brain heart infusion treated with 0.8 % garlic concentration.

반응표면 분석을 이용한 *Salmonella enteritidis*의 증식 효능 평가

우와 0.8 %인 경우를 비교해 볼 때, 0.8 %에서 D.T.value의 수준이 전체적으로 높아졌음을 알 수 있으며, 온도가 최적 증식온도인 37°C에 가까울수록 D.T.value가 낮아진 것을 볼 수 있다. 개발된 모델은 결정계수(R²)가 0.9123으로서 1에 가까우며, 또한 선형효과(linear), 순수 이차효과(quadratic), 교차곱효과(crossproduct) 모두 유의한 것으로 나타났다. 따라서 가정된 반응모형이 자료를 잘 반영한다고 할 수 있다(Table 3).

그러나 등고선 분석을 통해 pH에 따라 온도가 마늘즙의 효과에 미치는 영향을 보면, 각각의 조건에 따라 복잡하게 상호 관련되어 관계를 해석하기에 매우 난해하였다(Figs. 8-11). 이것은 원래모형

에는 일차항뿐만 아니라 $\chi_1\chi_2$ 같은 교호작용이 나타내는 이차항이 포함되어 있기 때문이다. 따라서 정준분석(canonical analysis)을 실시하였는데, 절대

Table 3. Analysis of variance for fitting experimental data to response surface model

Regression	Degrees of freedom	Sum of squares	R-square	Prob > F
Linear	3	1545.6982	0.7278	0.0000
Quadratic	3	254.2591	0.1197	0.0000
Cross product	3	138.3980	0.0652	0.0000
Total regression	9	1938.3553	0.9127	0.0000

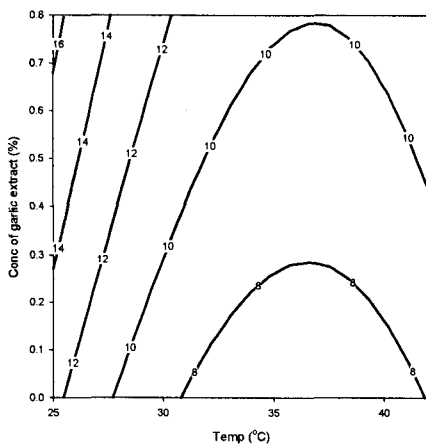


Fig. 8. Contour plot of D.T.value of *Salmonella enteritidis* at different temperature and concentrations of garlic extract treated with pH 5.5.

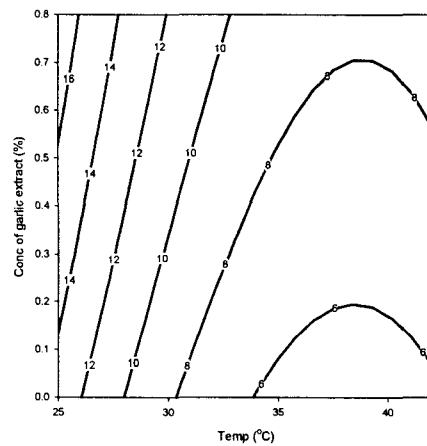


Fig. 9. Contour plot of D.T.value of *Salmonella enteritidis* at different temperature and concentrations of garlic extract treated with pH 7.0.

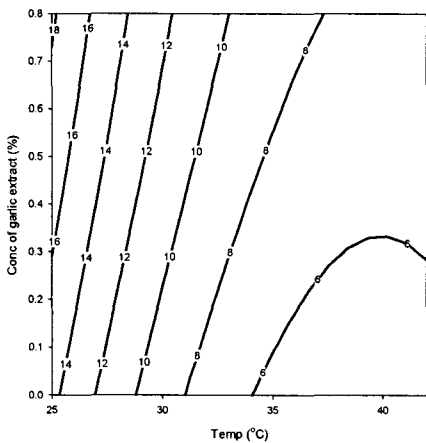


Fig. 10. Contour plot of D.T.value of *Salmonella enteritidis* at different temperature and concentrations of garlic extract treated with pH 8.0.

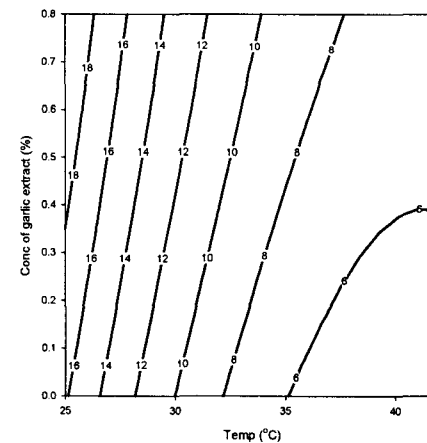


Fig. 11. Contour plot of D.T.value of *Salmonella enteritidis* at different temperature and concentrations of garlic extract treated with pH 9.0.

값 비교시 온도변수가 정준계수 3.6108로서 D.T. value에 가장 많은 영향을 미치고, 마늘즙의 농도는 정준계수가 0.1990으로서 영향을 덜 미치는 것으로 나타났다(Table 4).

개발된 모델을 이용하여 능선 분석(ridge analysis)을 실시한 결과 마늘즙의 최대 증식 억제조건은 25.3°C, pH 7.6 그리고 마늘즙의 농도 0.46 %였다(Table 5).

Table 4. Canonical analysis of response surface model

Eigenvectors	Eigenvectors		
	T	pH	C
3.610814	0.948849	-0.314802	-0.024183
0.542847	0.311196	0.945412	-0.096713
-0.199034	0.053309	0.084240	0.995019

Table 5. Estimated ridge of maximum response for variable D.T.value

Estimated response(hr)	Standard Error				
		T	pH	C	
15.9466	0.2711	coded	-0.97042	0.176995	0.16492
		uncoded	25.3°C	7.6	0.46%

4. 총괄 및 결론

수중에 존재하는 *Salmonella enteritidis*와 같은 주요 수인성 전염병균들은 온도, pH, 수분, 염, 항균성분 및 다른 미생물들과 같은 다양한 요인들과 상호작용하고 있으며, 이들 요인의 조절은 미생물의 성장을 제어하고자 하는 목적하에 주요한 관심사가 되어 왔다. 따라서 본 연구에서는 *Salmonella enteritidis*의 성장에 관여하는 환경요인 중 pH와 온도 그리고 항균성분으로서의 마늘즙이 단독으로 또는 복합작용에 의해 *Salmonella enteritidis*의 성장에 미치는 영향을 전기전도도 측정법으로 조사하고, 이를 정량적으로 표현하기 위해 수학적으로 모델링한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

- 1) *Salmonella enteritidis*를 다양한 온도(25°C, 30°C, 37°C, 42°C), pH(5.5, 7.0, 8.0, 9.0) 및 마늘즙(0~0.8%)에서 4×4×8 full factorial 조건하에 배양한 결과, *Salmonella enteritidis*의 37°C에 가까울수록 전기전도도의 특성 변화타지가 가능한 시점(D.T.value)이 단축되었다.
- 2) 항균물질인 마늘즙의 농도가 높아질수록 D.T. value가 증가하였으며 D.T.value를 반응변수

로 반응표면분석을 실시한 결과 다음과 같은 모델(R²=0.9321)이 성립하였다.

$$D.T.Value = 8.0604 - 4.2583T - 0.0584pH + 1.7294C - 1.8395TpH - 0.2195TC - 0.0777pHC + 3.3029T^2 + 0.8416 pH^2 - 0.1897C^2$$

- 3) 설명변수들 간의 선형효과, 교차효과, 순수 이차효과를 판단하기 위해 분산분석을 실시한 결과 모두 유의한 것으로 나타났으며, 능선 분석을 통하여 *Salmonella enteritidis*의 최대 증식 억제 조건은 23.6°C, pH 7.6, 0.46% 마늘즙, 이 때의 D.T.value는 15.9시간임을 확인할 수 있었다.

참 고 문 헌

- 1) Janet, E.C., 1999, Impact of changing consumer lifestyles on the emergency/reemergence of foodborne pathogen, *Emerging Infectious Disease*, 3(4), 45-54.
- 2) Wawerla, M., A. Stolle, B. Schalch, and H. Eisguber, 1999, Impedance microbiology: Applications in food hygiene, *Jour. of Food Prot*, 62(12), 1488-1496.
- 3) Felice, C.J., R.E. Madrid, J.M. Olivera, V.I. Rotger, and M.E. Valentinuzzi, 1999, Impedance microbiology: Quantification of bacterial content in milk by means of capacitance growth curves, *Jour. of Microbiological Methods*, 35, 37-42.
- 4) Jay, J.M., 1992, *Modern food microbiology* 4th ed., Chapman & Hall, 122-127pp.
- 5) McMeekin, T.A., J. Brown, K. Krist, D. Miles, K. Neumeyer, and D.S. Nichols, 1997, Quantitative microbiology: A basis for food safety, *Emerging Infectious Disease*, 3(4), 1-26.
- 6) Timms, S., K.O. Colquhoun, and C.R. Fricker, 1996, Detection of *Escherichia coli* in potable water using indirect impedance technology, *Jour. of Microbiological Methods*, 26, 125-132.
- 7) Madden, R.H. and J. McBride, 1999, Benefits of indirect impedimetry, using Rappaport-Valliadis broth for the detection of *Salmonella* in processed animal protein, *Int. Jour. of Food Microbio.*, 29, 387-390.
- 8) 이용욱, 박석기, 1996, 식품위생미생물시험법, 신광출판사, 81-115pp.
- 9) 김연순, 박경숙, 정규향, 신선택, 김현구, 1996, 마늘즙액의 대장균 생육 저해 작용, *Kor. Jour.*

반응표면 분석을 이용한 *Salmonella enteritidis*의 증식 효능 평가

- of Food Science Technology, 28(4), 730-735.
- 10) 박성현, 1995, 현대실험계획법, 민영사, 521-572pp.
 - 11) Grijspeerdt, K. and P. Vanrolleghem, 1999, Estimating the parameters for the Baranyi model for bacterial growth, Food Microbiology, 16, 593-605.
 - 12) Kutner, N. and N. Wasserman, 1998, Applied linear statistical models, 5th ed., Irwin, 1280-1303pp.
 - 13) 성내경, 1991, SAS/STAT-회귀분석, 자유아카데미, 163-199pp.
 - 14) 정지연, 1997, 전기전도도 측정을 이용한 대장균 O157:H7의 호기적 증식예측에 관한 연구, 서울대학교 보건대학원 석사학위논문.
 - 15) 지원대, 정민선, 최응규, 최동환, 정연건, 1998, 마늘즙의 미생물 증식억제 효과, 한국농화학회지, 41(1), 1-5.