

저장온도에 따른 마른김(*Pyropia pseudolinearis*)의 *Bacillus cereus* 성장예측모델 개발

최만석^{1,2} · 김지윤^{1,2} · 전은비^{1,2} · 박신영^{1,2*}

¹경상대학교 해양산업연구소, ²경상대학교 해양식품생명의학과

Predictive Growth Models of *Bacillus cereus* on Dried Laver *Pyropia pseudolinearis* as Function of Storage Temperature

Man-Seok Choi^{1,2}, Ji Yoon Kim^{1,2}, Eun Bi Jeon^{1,2} and Shin Young Park^{1,2*}

¹Institute of Marine Industry, Gyeongsang National University, Tongyeong 53064, Korea

²Department of Seafood and Aquaculture Science, Gyeongsang National University, Tongyeong 53064, Korea

Predictive models in food microbiology are used for predicting microbial growth or death rates using mathematical and statistical tools considering the intrinsic and extrinsic factors of food. This study developed predictive growth models for *Bacillus cereus* on dried laver *Pyropia pseudolinearis* stored at different temperatures (5, 10, 15, 20, and 25°C). Primary models developed for specific growth rate (SGR), lag time (LT), and maximum population density (MPD) indicated a good fit ($R^2 \geq 0.98$) with the Gompertz equation. The SGR values were 0.03, 0.08, and 0.12, and the LT values were 12.64, 4.01, and 2.17 h, at the storage temperatures of 15, 20, and 25°C, respectively. Secondary models for the same parameters were determined via nonlinear regression as follows: $SGR = 0.0228 - 0.0069 * T_1 + 0.0005 * T_1^2$; $LT = 113.0685 - 9.6256 * T_1 + 0.2079 * T_1^2$; $MPD = 1.6630 + 0.4284 * T_1 - 0.0080 * T_1^2$ (where T_1 is the storage temperature). The appropriateness of the secondary models was validated using statistical indices, such as mean squared error ($MSE < 0.01$), bias factor ($0.99 \leq B_f \leq 1.07$), and accuracy factor ($1.01 \leq A_f \leq 1.14$). External validation was performed at three random temperatures, and the results were consistent with each other. Thus, these models may be useful for predicting the growth of *B. cereus* on dried laver.

Keywords: *Bacillus cereus*, Dried laver, Gompertz equation, Predictive growth model, Storage temperature

서론

김(Laver *Pyropia* sp.)은 홍조 식물문, 홍조강, 김 파래목, 김 파래과에 속하며, 한국뿐만 아니라 일본·중국 등의 해외에서도 식용하며, 증산(增産)을 위해 양식하는 대표적 품목이다(KATI, 2019; Kwon et al., 2018). 김은 현재 국내 수산물 수출품 1위 품목으로 그 액수는 매년 계속해서 증가하여 2019년에는 5.8억 달러의 역대 최고 수출액을 달성하였다(MOF, 2020). 김은 칼슘, 마그네슘, 철분, 아연, 비타민 등이 많이 함유되어 있어 영양가가 풍부하며 맛이 좋아 예로부터 각종 미네랄, 식이 섬유 및 영양소의 공급원으로 애용되어 온 영양 기호식품이다(Kim et al., 2014). 최근에는 건강식을 선호하는 소비자들을 중

심으로 health snack으로 인식되어 소비가 확대되고 있으며 특히 일본인들에게 한류 상품으로 가장 높은 구매율을 나타내는 식품이 되었다(Lim and Lim, 2013; Lee, 2018). 한편, 국내 대부분의 김 가공업체는 지하수와 저수지의 물을 끌어다 원초를 세척하며 따로 살균 공정을 거치지 않고 마른김을 생산하고 있어 식품안전성 면에서 위생관리에 취약하다. Kim et al. (2006)의 비가공 농수산식품의 미생물오염도 평가 연구에서, 김의 일반세균과 대장균군은 각각 2.8-7.1 log CFU (colony forming unit)/g 및 1.0-1.8 log CFU/g로 검출되었다. 또한, 미역에서는 약 1-logCFU/g수준으로 *B. cereus*가 5건 검출되었다고 보고하였다. Lee et al. (2017)은 돌김 중 *B. cereus*가 약 2-log CFU/g로 검출되었다고 보고하였다. 마른김의 국내 *B. cereus*의 기준

*Corresponding author: Tel: +82. 55. 771. 9143 Fax: +82. 55. 772. 9149

E-mail address: sypark@gnu.ac.kr



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2020.0699>

Korean J Fish Aquat Sci 53(5), 699-706, October 2020

Received 27 May 2020; Revised 26 June 2020; Accepted 4 August 2020

저자 직위: 최만석(대학원생), 김지윤(대학원생), 전은비(대학원생), 박신영(교수)

범위가 g당 1,000 이하이므로 김의 미생물 오염도 평가 연구들은 기준 범위 이내로 적합하였지만, *B. cereus*는 김의 주요 관리 대상 식중독세균이라고 할 수 있다(Lee et al., 2017; MFDS, 2019). *B. cereus*의 성장 최적 온도는 28-35°C이며 균주에 따라 최저 4-5°C, 최대 55°C에서도 성장이 가능하다(MFDS, 2016; Jo et al., 2017; NIFDS, 2019). 특히, 김이 생산되는 해역의 수온은 4.5-15°C 전후이며, 마른 김의 표면온도는 약 21°C이다(Kim and Shin, 2014; Yoon, 2014). 김은 주로 상온에서 유통 및 보관되므로 5-25°C의 저장온도에서의 부적절한 관리는 *B. cereus*가 g당 1,000 이상(>3-log CFU/g) 성장하여 위해성을 보일 수 있다(MFDS, 2019). 또한, 이전의 연구에 따르면 일반적으로 식품의 *B. cereus*가 10⁵ CFU/g이면 식중독을 일으킬 수 있다(Ziane et al., 2019). 따라서, 5-25°C의 저장 온도에서 마른김의 *B. cereus*에 대한 생육패턴의 확인이 필요하다.

최근에는 특정 식중독의 원인이 되는 병원성 미생물을 관리를 위한 방법으로 예측 미생물학(predictive food microbiology, PFM) 분야가 활발히 연구되고 있다(Park et al., 2019a). 어떤 특정 식중독세균에 오염된 식품을 섭취하는 경우 해당 식품의 위해 정도를 과학적으로 그리고 정량적으로 평가하는 정량적 미생물위해평가(quantitative microbial risk assessment, QMRA)중의 노출평가(exposure assessment)에서 예측미생물학은 식중독세균의 증식, 성장, 사멸에 대한 수학적 모델을 제공한다(Bahk et al., 2005). 예측 미생물학은 식품의 재료에서 생산, 유통, 판매, 소비 및 보관 전 과정에서의 각 식품이 갖게 되는 Aw, pH, NaCl 함량과 같은 식품의 고유 특성인 내부적 요인(intrinsic factor)과 식품의 미생물의 성장에 영향을 끼치는 저장 온도, 습도, 대기 상태 등의 외부적 요인(extrinsic factor)을 수학적 모델을 사용하여 식중독세균 혹은 부패세균의 성장을 예측하여 위해요인을 사전에 차단 및 관리할 수 있는 방법으로 인정되고 있다(Chen, 2007; Koseki and Isobe, 2007). 따라서, 예측 미생물학은 식중독 예방에 큰 효과가 있는 것으로 평가되고 있으나 현재 *B. cereus*에 대한 성장예측모델은 농산품(e.g. 쌀, 파스타, 콩), 육가공품(e.g. 우유, 햄, 닭고기), ready-to-eat 식품 등에 한정되어 있으며 수산식품에 대한 모델 개발을 거의 찾아볼 수가 없다(FAO/WHO, 2002; Park et al., 2010; Enkhjargal et al., 2013; Juneja et al., 2019).

김의 생산, 유통 및 소비 전 과정에서 부적절한 온도 관리는 세균 오염 증식의 주요 원인이 될 수 있다. 김의 *B. cereus*에 관한 성장 예측에 관한 연구는 향후 김의 식품 위생학적 및 안전성 관리를 위한 기초 연구 자료가 될 것이라고 사료된다. 따라서, 본 연구에서는 미생물학적 안전성 확보를 위해 국내와 해외에서 수요가 많은 마른 김에 *B. cereus*를 대상으로 다양한 저장 온도 조건에 따른 이 균의 성장을 예측할 수 있는 모델을 개발하였다.

재료 및 방법

시험균주 및 시험균액

본 연구에서 사용한 *Bacillus cereus* (ATCC 11778, ATCC 14579, ATCC 14893)는 American type culture collection에서 분양 받은 것으로 glycerol stock으로 -80°C에서 보관중인 균주를 사용하였다. 보존 배양된 각 시험 균주는 tryptic soy broth (TSB; BD/Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)에 접종하여 37°C의 배양기에서 18-24시간 동안 2차 배양시킨 후 본 실험에 사용하였다. 배양된 시험균주는 10,000 g로 10분 동안 원심 분리한 후 침강된 펠릿(pellet)을 10 mL의 0.1% 펩톤수에 현탁하였다. 이 현탁액을 0.1% 펩톤수를 이용해 단계 희석한 각각의 균주를 합쳐 3-4 log CFU/mL 수준의 농도를 지닌 cocktail로 제조하고 이를 시험 균액으로 사용하였다.

김 시료 및 실험설계

본 연구에서 사용된 마른김(*Pyropia pseudolinearis*)은 M마트(Tongyeong, Korea)에서 구입한 김을 사용하였다. 시험균의 접종 전 김 시료의 표면 잔존미생물 제거를 위해 70% 에탄올로 표면을 닦은 후, 멸균된 가위를 이용해 가로 6 cm, 세로 6 cm의 크기로 절단하여 1 g을 칭량해 petri dish (90×15 mm)에 담아 사용하였다. 이렇게 제조된 시료는 김의 주요 생산 및 유통 공정에서 *B. cereus* 성장과 관련한 중요한 인자로 선택된 저장온도 변수에 따라 5, 10, 15, 20 및 25°C로 결정하였다. 저장온도별 균의 성장 속도를 고려하여, 각 시간대별로 시료를 채취하여 분석하였다. 각각의 실험은 2회 반복하였고 각 샘플링 시간별로 3개의 시료를 사용하여 분석하였다.

접종 및 균수측정

시험균액은 김 시료에 10 μL씩 10군데 점-접종(spot-inoculation)한 후 biological safety cabinet (CHC Lab Co., Daejeon, Korea) 내에서 2차 오염을 방지하면서 미생물이 표면에 잘 부착되도록 1시간 동안 건조한 후 저장온도별로 보관하였다.

각 저장온도별로 배양된 김을 멸균액에 0.1% 펩톤수로 10배 희석하여 stomacher를 이용하여 균질화 하였다. 0.1% 펩톤수로 균질화된 시험용액을 각각 10진 희석법으로 희석하여 1 mL을 petri dish (90×15 mm)에 분주하고 45-50°C 정도로 식힌 tryptic soy agar (TSA; BD/Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)를 petri dish에 주입평판법(pour plate method)으로 배양해주었다. 미생물의 증식은 식품공전(MFDS, 2019)에 따라 표준한천평판 균수측정법(standard plate count method)으로 35±1°C에서 48±2시간 배양한 후 15-300개의 집락을 형성한 배지만 계수하여 log CFU/g으로 나타냈다.

1차모델 개발

본 연구에서는 김의 저장온도에 따른 *B. cereus*의 최대 증식 속도(specific growth rate, SGR)와 유도기(lag time, LT) 및 최대개체군밀도(maximum population density, MPD)에 대하여 Graphad PRISM version 8 (Graphad Software, San diego, CA, USA) 프로그램을 이용하여 실험결과를 Gompertz equa-

tion에 대입하여 산출하였다. 1차 모델 Gompertz equation은 다음과 같다(Yang et al., 2016).

$$Y=N_0+C \times \exp [-\exp \{(2.718 \times \text{SGR}/C) \times (\text{LT}-X)+1\}]$$

Y, Viable cell count (log CFU/g)

N_0 , Initial log number of cells (log CFU/g)

C, Difference between the initial and final cell number (log CFU/g)

X, Incubation time (h)

성장예측 2차모델 개발

도출된 최대증식속도(SGR)와 유도기(LT)의 온도 및 초기 오염균수와와의 상관관계 규명을 위해 Gompertz model equation을 통해 구한 SGR과 LT 값을 SAS version 9.4 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA) 프로그램을 이용하여 도출된 매개변수를 수학적 정량평가모델인 polynomial equation에 대입하여 모델을 개발하였다. 2차 모델 polynomial equation은 다음과 같다 (Yang et al., 2016).

$$\text{SGR or LT}=b_0+b_1A+b_2A^2+\varepsilon$$

A, Storage temperature (°C)

b_0 - b_2 , Regression coefficients

ε , Random error

모델의 적합성 평가

개발된 *B. cereus* 성장예측 모델의 내부검증(internal validation)을 평가하기 위한 적합성 평가로 coefficient of determination (R^2), Mean square error (MSE), bias factor (B_f), accuracy factor (A_f) 값을 사용하였다(Park et al., 2019b). R^2 은 회귀분석식에서 종속변수 y의 데이터 Y_i 에 대하여 y_i 의 총변동합에 대한 변동합의 비율을 구한 값으로서 0에서 1사이의 값을 나타낸다 (Duffy et al., 1994). MSE는 미생물의 최대 증식속도에 대한 실험값과 예측 값의 차이를 이용하여 개발된 예측모델의 적합성을 평가하는 수치이다.

$$\text{MSE}=\sum \text{Log}(\text{observed values}-\text{predicted values})^2/n$$

B_f 는 실험을 통해 얻어진 실험값과 유도된 2차 모델식에서 얻어진 예측값의 평균 차이를 평가한 것이다.

$$B_f \text{ for SGR or LT} = 10^{\sum \text{Log}(\text{observed values}/\text{predicted values})/n}$$

A_f 는 실험을 통해 얻어진 실험값과 유도된 2차 모델식에서 얻어진 예측값의 평균 차이의 절대값을 평가한 것이다.

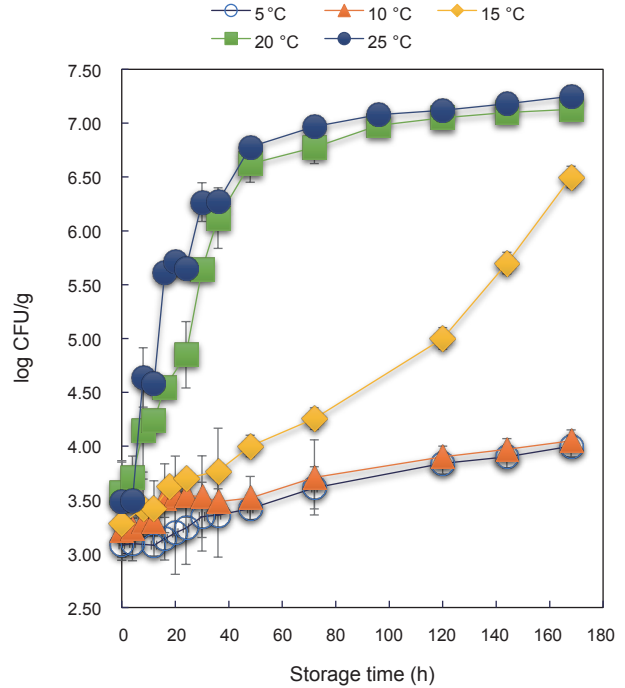


Fig. 1. Growth curves of *Bacillus cereus* on dried laver *Pyropia pseudolinearis* at 5, 10, 15, 20, 25°C. Error bars indicate the standard deviations for the mean of two replicates of three samples at each storage time and temperature.

$$A_f \text{ for SGR or LT} = 10^{\sum \text{Log}(\text{predicted values}/\text{observed values})/n}$$

마지막으로, 개발된 모델의 범위 내에서 모델개발에 사용하지 않은 온도(13, 18, 23°C)를 선정하여 위와 동일한 방법으로 실험하여 외부검증(external validation)을 평가하였다.

통계분석

모든 실험은 각 샘플링 시간별로 3개의 시료를 사용하여 2회 반복으로 수행하였으며, 통계프로그램은 SPSS version 25.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)에서 one-way ANOVA 중 Duncan's multiple range test를 사용하여 $P < 0.05$ 에서 각 온도별 SGR, LT 및 MPD의 유의성을 조사하였다. 또한, Paired t-test를 사용하여 $P < 0.05$ 에서 개발된 모델의 SGR, LT 및 MPD의 예측값과 실험값의 유의성을 조사하였다

결과 및 고찰

저장온도에 따른 *B. cereus* 생육 패턴 및 1차모델개발

각 저장온도(5, 10, 15, 20, 25°C)에 따른 김에서 *B. cereus* 성장변화는 Fig. 1에 나타났다. 마른 김의 초기 오염농도는 3.2-3.6 log CFU/g이었으며, *B. cereus*의 생육 패턴은 크게 3가지로 나누어졌다. 첫째, 냉장온도 5°C 및 10°C에서 보관된 마른 김은

가장 느린 균의 생육을 보였으며, 저장 7일차(168시간)에 약 4 log CFU/g에 도달하고 이후 균의 뚜렷한 성장이 관찰되지 않았다. Cronin and Wilkinson (2009)는 쌀을 4°C에서 냉장보관시 본 연구와 유사하게 *B. cereus*는 처음에 접종된 수준을 유지하였다고 보고하였으며, 반면에 10°C에서 보관한 쌀의 *B. cereus*는 3일차(72시간) 부터 급속히 성장하여 6일차(144시간)에는 약 6 log CFU/mL로 성장하였다.

둘째, 15°C의 저장온도에서 보관된 마른김의 *B. cereus*의 생육 패턴은 36시간까지는 균의 성장이 느리고 일정하였지만, 48시간부터는 균수가 급격히 증가하여 168시간에는 6.5 log CFU/g까지 성장하였으며 전체 저장온도 중에서 중간 형태의 균의 생육이 관찰되었다. 이 균은 지표수, 지하수 및 약수 등의 수중에도 존재할 수 있기 때문에 식품을 오염시켜 식품 부패 또는 식중독을 유발할 수 있고 그 감염량(infective dose)이 5 log cells/g 이상인 점을 고려하면, 이는 적절한 저장온도에서 김을 보관할 필요성이 있음을 시사하였다(Schoeni and Lee, 2005; Jo et al., 2017). 또한, 168시간(7일) 내에 김의 *B. cereus*가 정체가(stationary phase)에 도달하지 않을 가능성을 고려하여 추가로 8-10일 동안 15°C의 저장온도에서 *B. cereus* 균의 성장을 모니터링하였지만, 약 6.4-6.6 log CFU/g 이상 증식하지 못하였다(data not shown).

마지막으로, 20°C와 25°C에서 보관된 김의 *B. cereus*는 가장 빠른 생육 패턴을 보였는데 단지 48시간만에 6.5 log CFU/g 이상의 성장을 나타냈다. 특히, 25°C에 보관된 김의 *B. cereus*는 가장 짧은 저장 4시간 만에 급격한 균의 성장을 보여주었다. 이와 관련하여 Moon et al. (2005)은 균의 생육은 초기균수보다 온도에 지배적인 영향을 받으며, 새로운 환경에 적응하기 위하여 낮은 온도일수록 초기 성장이 지연된다고 보고하였다. 한편, 20°C와 25°C에서 48시간 이상 보관된 김의 *B. cereus*는 정체가 상태에 머물렀으며, 최대 7.2 log CFU/g까지 성장하였다. Kang et al. (2010)에 의하면 13°C의 저장 온도에서는 탄수화물 음식(e.g. 밥, 빵, 국수)이 식물성 단백질 식품(e.g. 두부, 삶은 콩나물)보다 훨씬 더 빠른 균의 성장을 보였으며 30°C의 저장 온도에서는 탄수화물 음식이 동물성 단백질 식품(e.g. 햄버거 패티, 훈제 치킨)보다 더 느린 균의 성장을 보고하였다. 이러한 연구 결과는 *B. cereus*와 같은 식중독균의 생육은 식품의 매트릭스와 식품의 고유 특성(pH, 수분활성도, 소금함량, 영양성분 등)인 내부적 요인(intrinsic factor) 차이에 따른 것으로 판단된다.

1825년 Gompertz가 인구동태 조사 결과를 경험식으로 제시한 Gompertz model equation은 Sigmoid형의 미생물 성장곡선을 표현하기 위해 사용하는 대표적인 연속함수 식이며, 현재 상용화 되는 pathogen modeling program (PMP) 등의 개발에 사용되었다(FAO/WHO, 2002). 각 온도별(5, 10, 15, 20, 25°C) 김에 오염된 *B. cereus*의 생육 결과(Fig. 1)를 기초로 저장 온도와 시간에 따른 MPD값과 변형된 Gompertz model equation을 적용하여 1차 모델링 SGR과 LT를 산출하였다(Table 1). Nauta

et al. (2003)의 연구에 의하면 *B. cereus*의 MPD는 6.0-8.5 log CFU/g 농도로 식품의 종류, 초기 균수, 환경 등에 따라 다르다. 본 연구에서 냉장온도 5°C 및 10°C에서 보관된 마른 김은 7일(168시간) 동안 *B. cereus*가 MPD에 도달하지 못하였으며, 이에 따른 SGR과 LT를 예측할 수 없었다. 또한, 15°C에서 저장된 김의 *B. cereus*는 아직 완전히 MPD에 도달하지 못하였을 가능성이 있는 MPD값을 6.5 log CFU/g으로 간주하였다. SGR은 미생물의 최대증식속도를 나타내며 저장 온도가 높아질수록 *B. cereus*의 SGR은 유의적으로 증가하였다($P<0.05$). 반면에, 미생물이 성장을 시작하기 이전에 주위 환경에 적응하는 기간을 나타내는 *B. cereus*의 LT는 저장 온도가 높아질수록 유의적으로 감소하였다($P<0.05$). 본 연구와 유사하게, Juneja et al. (2019)은 밥(cooked rice)에서 온도에 따른 *B. cereus* 성장을 측정된 연구에서 온도의 증가에 비례하여 *B. cereus* 생육 속도 또한 증가하였다고 보고하였다. 따라서, 김을 안전하게 보관 및 섭취하기 위해서는 가급적 서늘한 저장 온도에서 단시간 내에 보관하여 김의 미생물의 증식을 효과적으로 억제할 수 있다. 최대개체군밀도를 나타내는 MPD는 20°C, 25°C에서 각각 7.1, 7.3 log CFU/g이었으며 서로 간의 유의적 차이는 없었으며($P>0.05$), 15°C에서 저장된 김의 *B. cereus* (6.5 log CFU/g)보다 유의적으로 높은 MPD를 나타냈다($P<0.05$). 1차 모델링의 적합성을 나타내는 R²값은 1에 가까울수록 모델의 적합도가 높은 것을 나타내며, 15°C, 20°C, 25°C 저장온도에서 모두 0.98 이상으로 나타났다(Table 1). 따라서 Gompertz equation으로 산출한 1차 모델이 적합함을 증명하였다.

*B. cereus*의 성장예측 2차모델 개발 및 적합성 평가

1차 모델링에서 계산된 SGR, LT, MPD 등이 환경적 변수인 저장온도에 따라 어떻게 변화하는지 예측하는 2차 모델링은 다

Table 1. Growth parameters of *Bacillus cereus* on dried laver *Pyropia pseudolinearis* obtained from the Gompertz equation for the primary modeling

Temperature (°C)	SGR (log CFU/h)	LT (h)	MPD (log CFU/g)	R ²
5	NG	NG	NG	NA
10	NG	NG	NG	NA
15	0.03±0.02 ^b	12.64±0.59 ^a	6.50±0.10 ^b	0.99
20	0.08±0.02 ^a	4.01±0.68 ^b	7.13±0.13 ^a	0.98
25	0.12±0.03 ^a	2.17±0.48 ^c	7.25±0.17 ^a	0.98

SGR, Specific growth rate; LT, Lag time; MPD, Maximum population density; CFU, Colony-forming unit; NG, No Growth; NA, No Application. The data are presented as mean values and standard deviation (three samples/condition of temperature). Means in a column with different letters (a-b for SGR or a-c for LT and MPD) differ significantly ($P<0.05$) by Duncan's multiple range test at the 5% level of probability.

음의 다항 2차방정식인 polynomial equation을 적용하여 산출하였다(Table 2).

SGR model for dried laver:

$$Y=0.0228-0.0069*T_1+0.0005*T_1^2$$

LT model for dried laver:

$$Y=113.0685-9.6256*T_1+0.2079*T_1^2$$

MPD model for dried laver:

$$Y=1.6630+0.4284*T_1-0.0080*T_1^2$$

T₁은 저장온도를 나타내며, polynomial equation으로 산출된 R²값은 SGR은 0.93, LT는 0.95, MPD의 경우 0.89이었다. 따라서 본 연구에서 예측된 2차 모델링 SGR, LT 값은 0.90 이상 이므로 모델링이 잘 되었으며 MPD는 15°C 저장온도의 실제 MPD에 도달하지 못하였을 가능성이 있음으로 0.90보다 약간 낮았지만 전체적으로 양호한 적합성을 나타냈다. 또한, 예측된 2차 모델 또한 저장온도에 따라 SGR값은 증가하였으며, LT값은 감소하였다. Kim and Oh (2014)의 연구는 15°C에서 저장된 당근의 *B. cereus*의 SGR은 0.032이며, LT는 14.57으로 본 연구의 15°C에서 저장된 김의 *B. cereus*의 SGR 0.03, LT 15.46과 유사한 결과를 보였다. 반면 25°C에서 저장된 당근의 *B. cereus*의 SGR 0.113, LT 5.01은 본 연구의 25°C에서 저장된 김의 *B.*

*cereus*의 SGR 0.15, LT 2.37과는 좀 더 큰 차이를 보였다. 이는 저장온도가 증가하면서 식품 매트릭스의 차이와 당근의 미산성 차아염소산수와 초음파의 병용 살균처리 효과가 균의 성장에 영향을 주었음을 시사한다.

2차 모델을 통해 예측된 모델의 신뢰성을 확보하기 위해서는 실제 적용 전에 통계적인 적합성 검증이 필요하다(FAO/WHO, 2002). 김의 저장온도별 *B. cereus*의 내부검증(internal validation)을 평가하기 위해 MSE, B_p, A_f값을 Table 3에 나타냈다. 먼저 MSE값은 0에 가까울수록 개발된 예측모델의 적합성이 높음을 의미하며 SGR, LT, MPD 모두 0.01보다 매우 작은 0에 가까운 값이 나왔으므로 적합하였다(Park et al., 2019b). B_p값은 1에 가까울수록 모델이 정확한 것을 나타내며 1보다 작은 경우는 과소 예측된 것이며, 1보다 크면 과대 예측된 것이다. 0.7보다 작거나 1.5보다 큰 값을 나타내면 모델이 적합하지 않아 사용이 불가능하다(Park et al., 2019a; Ross et al., 2000). 본 연구의 B_p값은 SGR (1.02), LT (1.07), MPD (0.99)이었으며, 모든 결과값이 신뢰할 수 있는 예측값을 제공할 수 있음을 나타냈다. A_f값은 1에 가까울수록 모델 적합성이 높음을 의미하며 값이 커질수록 부정확함을 나타낸다. 예를 들어, 계산된 A_f 값이 0.9-1.1 사이면 모델이 10% 과소 및 과대 예측된 것이다(Ross, 1996). 본 연구의 A_f 값은 SGR (1.14), LT (1.13), MPD (1.01)으로 SGR 및 LT의 A_f 값은 14, 13%의 오차가 있으나 다른 두 통계지표 MSE, B_p값이 매우 높은 적합성을 나타내므로 본 모델링은 통계적으로 신뢰성을 확보하였다.

Table 4는 본 연구에서 개발된 모델을 외부검증(external vali-

Table 2. Growth parameters of *Bacillus cereus* on dried laver *Pyropia pseudolinearis* obtained from the polynomial equation for the secondary modeling

Temperature (°C)	SGR (log CFU/h)	LT (h)	MPD (log CFU/g)
5	NG	NG	NG
10	NG	NG	NG
15	0.03	15.46	6.64
20	0.07	3.72	7.22
25	0.15	2.37	7.24

SGR, Specific growth rate; LT, Lag time; MPD, Maximum population density; CFU, Colony-forming unit; NG, No Growth; NA, No Application.

Table 3. Internal validation of the secondary modeling using statistical indices for growth parameters of *Bacillus cereus* on dried laver *Pyropia pseudolinearis*

	MSE	B _p	A _f
SGR (log CFU/h)	< 0.01	1.02	1.14
LT (h)	< 0.01	1.07	1.13
MPD (log CFU/g)	< 0.01	0.99	1.01

MSE, Mean square error; A_f, Accuracy factor; B_p, Bias factor; SGR, Specific growth rate; LT, Lag time; MPD, Maximum population density.

Table 4. Comparison of the observed and predicted growth parameter values of *Bacillus cereus* on dried laver *Pyropia pseudolinearis*

Temperature (°C)	SGR (log CFU/h)		LT (h)		MPD (log CFU/g)	
	Observed	Predicted	Observed	Predicted	Observed	Predicted
13	0.02±0.02	0.01	25.13±0.24	23.07*	6.26±0.11	6.25
18	0.03±0.01	0.05	9.96±0.84	7.17*	7.01±0.10	7
23	0.09±0.01	0.12*	3.21±0.77	1.66	7.20±0.02	7.2

SGR, Specific growth rate; LT, Lag time; MPD, Maximum population density; CFU, Colony-forming unit; NG, No Growth; NA, No Application. The data are presented as mean values and standard deviation (three samples/condition of temperature). Asterisk (*) also indicates a significant difference between observed and predicted by paired t-test.

dation)하기 위하여 모델 개발에 사용하지 않은 13, 18, 23°C의 저장온도에서 실험하여 paired t-test를 사용하여 $P < 0.05$ 에서 개발된 모델의 예측값과 실험값을 비교하여 나타낸 것이다. 비교 결과, 23°C에서 저장된 *B. cereus*의 SGR값과 13°C 및 18°C에서 저장된 *B. cereus*의 LT값은 예측값과 실험값 간의 유의적인 차이가 있었지만($P < 0.05$), 대부분의 저장온도 및 샘플링 시간별 실험값과 예측값의 SGR, LT 및 MPD간의 유의적인 차이가 없었다($P > 0.05$). Walls and Scott (1996)의 생 쇠고기의 *E. coli* O157:H7의 성장을 예측 및 검증한 연구에서는 lag phase duration과 generation time의 예측값과 실험값의 t-test에 의한 유의적인 차이가 있었지만($P < 0.05$), exponential growth rate에서는 예측값과 실험값의 유의적인 차이가 없었다($P > 0.05$). 본 연구에서는 개발된 예측 모델의 보다 높은 신뢰성을 확보하기 위하여 외부검증에 대한 통계적인 적합성 평가를 추가적으로 실시하여 Table 5에 나타냈다. 외부검증의 MSE값은 SGR과 LT가 내부검증보다 다소 높은 0.04 및 0.03이 나왔지만, MPD를 포함한 모든 값이 0에 가까워 매우 높은 적합성을 나타냈다. B_f 값은 SGR (1.06), MPD (0.98)으로 1에 가까워 양호한 적합성을 나타냈으며, LT는 0.78로 비록 내부검증보다는 낮은 적합성을 나타냈지만, Ross et al. (2000)의 예측모델링에 관한 연구에서는 0.7-0.9 범위의 B_f 값은 신뢰할 수 있는 예측값이라 보고하였다. A_f 값은 SGR (1.47), LT (1.43), MPD (0.99)으로 1에 가까운 MPD는 매우 높은 예측 모델의 적합성을 나타냈으며, 1.50이하의 SGR과 LT값은 본 연구의 예측 모델이 신뢰할 수 있는 예측값을 제공하였음을 나타냈다(Bahk et al., 2005; Carrasco et al., 2006). 내부 및 외부 모델링 결과의 실험값과 예측값의 전체 비교는 Fig. 2에 나타냈으며, 모든 결과의 비교에 대한 회귀분석 결과 R^2 가 0.90 이상의 높은 상관관계를 보였으며 최종적으로 본 연구의 모델링은 받아들여질 수 있다고 판단하였다.

본 연구는 마른 김의 저장온도-시간 관계 측면에서 마른 김의 생산, 유통, 소비, 보관 전 과정에서 증식할 수 있는 *B. cereus*의 성장예측모델을 제시하였다. 수산물의 예측미생물학 연구는 아직 왕성하게 진행되지는 않았으나, 최근 성장예측모델 개발은 과거의 broth 상의 pilot study를 뛰어넘어 실제 식품의 각

Table 5. External validation of the secondary modeling using statistical indices for growth parameters of *Bacillus cereus* on dried laver *Pyropia pseudolinearis*

	MSE	B_f	A_f
SGR (log CFU/h)	0.04	1.06	1.47
LT (h)	0.03	0.78	1.43
MPD (log CFU/g)	< 0.01	0.98	0.99

MSE, Mean square error; A_p , Accuracy factor; B_p , Bias factor; SGR, Specific growth rate; LT, Lag time; MPD, Maximum population density.

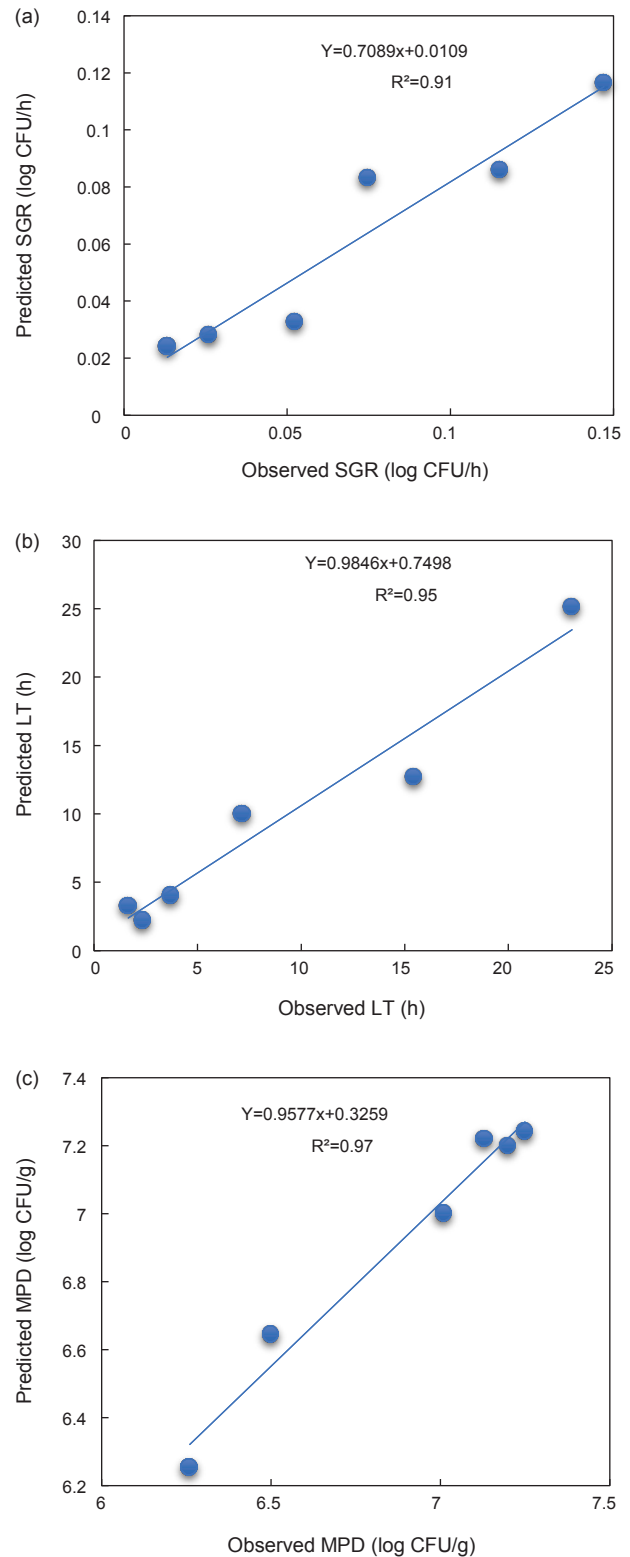


Fig. 2. Comparative plots of the observed and predicted SGR (a), LT (b), and MPD (c) for *Bacillus cereus* on dried laver *Pyropia pseudolinearis*.

위해요소 식중독균을 직접 집중하여 모델을 개발하는 방향으로 전환되고 있다(Juneja et al., 2019). 이러한 관점에서 볼 때, 본 연구는 김의 *B. cereus*에 관한 예측 모델을 제시하였으며, 3종의 *B. cereus* 균주를 culture cocktail 기법을 활용하여 다른 표준 균주에 대한 신뢰성을 확보하였다. 하지만 본 연구의 한계로는 미생물 성장관련 중요한 인자를 저장온도만으로 한정하였다는 것이다. 그러나, 본 성장예측 모델은 마른 김의 제조공정에서 HACCP 시스템 적용시 critical control point 및 한계기준 설정에 활용될 수 있으며, 또한 미생물위해평가(microbial risk assessment) 수행과정의 노출평가(exposure assessment)를 위한 simulation model에 적용하여 마른김의 제조, 유통 및 소비 전 과정에서 온도-시간 조건별 *B. cereus*의 성장이 추정 가능하며 이를 근거로 위생관리 및 기준설정에도 활용이 가능하리라 사료된다.

References

- Bahk GJ, Oh DH, Ha SD, Park KH, Joung MS, Chun SJ, Park JS, Woo GJ and Hong CH. 2005. Quantitative microbial risk assessment model for *Staphylococcus aureus* in Kimbab. Korean J Food Sci Technol 37, 484-491.
- Carrasco E, Garcia-Gimeno R, Seselovsky R, Valero A, Perez F, Zurera G and Todd E. 2006. Predictive model of *Listeria monocytogenes* growth rate under different temperatures and acids. Food Sci Technol Int 12, 47-56. <http://doi.org/10.1177/1082013206062234>.
- Chen H. 2007. Use of linear, Weibull, and log-logistic functions to model pressure inactivation of seven foodborne pathogens in milk. Food Microbiol 24, 197-204. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2006.06.004>.
- Cronin UP and Wilkinson MG. 2009. The growth, physiology and toxigenic potential of *Bacillus cereus* in cooked rice during storage temperature abuse. Food Control 20, 822-828. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.10.018>.
- Duffy LL, Vanderline PB and Grau FH. 1994. Growth of *Listeria monocytogenes* on vacuum-packed cooked meats: effects of pH, Aw, nitrite and sodium ascorbate. Int J Food microbiol 23, 377-390. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90164-3](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90164-3).
- Enkhjargal L, Min KJ and Yoon KS. 2013. Development and validation of predictive model for foodborne pathogens in preprocessed namuls and wild root vegetables. J Korean Soc Food Sci Nutr 42, 1690-1700. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2013.42.10.1690>.
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization). 2002. Principles and guidelines for incorporating microbiological risk assessment in the development of food safety standards, guidelines and related texts. Report of a Joint FAO/WHO Consultation ANNEX III, 18-22.
- Jo AH, Choi HN, Heo DB, Kwon SM and Kim JB. 2017. Prevalence and toxin characteristics of *Bacillus cereus* isolated from drinking cups in spring. J Food Hyg Saf 32, 50-56. <https://doi.org/10.13103/JFHS.2017.32.1.50>.
- Juneja VK, Golden CE, Mishra A, Harrison MA, Mohr T and Silverman M. 2019. Predictive model for growth of *Bacillus cereus* during cooling of cooked rice. Int J Food Microbiol 290, 49-58. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.09.023>.
- Kang KA, Kim YW and Yoon KS. 2010. Development of predictive growth models for *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* on various food matrices consisting of ready-to-eat (RTE) foods. Food Sci Anim Resour 30, 730-738. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2010.30.5.730>.
- KATI (Korea Agricultural Trade Information). 2019. Current state of exports and imports of laver in the last 5 years in Korea. Retrieved from <http://www.kati.net/product/basisInfo.do?lcdCode=MD178> on May 11, 2020.
- Kim AJ and Shin JK. 2014. Nonthermal sterilization of dried laver by intense pulsed light with batch system. Korean J Food Sci Technol 46, 778-781. <https://doi.org/10.9721/KJFST.2014.46.6.778>.
- Kim KW, Hwang JH, Oh MJ, Kim MY, Choi MR and Park WM. 2014. Studies on the major nutritional components of commercial dried lavers *Porphyra yezoensis* cultivated in Korea. Korean J Food Preserv 21, 702-709. <https://doi.org/10.11002/kjfp.2014.21.5.702>.
- Kim SH, Kim JS, Choi JP and Kim JH. 2006. Prevalence and frequency of food-borne pathogens on unprocessed agricultural and marine products. Korean J Food Sci Technol 38, 594-598.
- Kim SY and Oh DH. 2014. Predictive modeling of *Bacillus cereus* on carrot treated with slightly acidic electrolyzed water and ultrasonication at various storage temperatures. J Korean Soc Food Sci Nutr 43, 1296-1303. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2014.43.8.1296>.
- Koseki S and Isobe S. 2007. Prediction of pathogen growth on iceberg lettuce under real temperature history during distribution from farm to table. Int J Food Microbiol 104, 239-248. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.02.012>.
- Kwon K, Ryu DG, Jeong MC, Kang EH, Jang Y, Kwon, JY, Kim JM, Shin IS and Kim YM. 2018. Analysis of microbial contaminants and microbial changes during dried-laver *Pyropia* spp. Processing. Korean J Fish Aquat Sci 51, 8-14. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2018.0008>.
- Lee CS. 2018. A study on laver industry's global export competitiveness. J Int Trade Insur 19, 175-192.
- Lee EJ, Kim GR, Lee HJ and Kwon JH. 2017. Monitoring microbiological contamination, pre-decontamination, and irradiation status of commercial dried laver (*Porphyra* sp.) products. Korean J Food Sci Technol 49, 20-27. <https://doi.org/10.9721/KJFST.2017.49.1.20>
- Lim YE and Lim O. 2013. The study on the change of Korea

- and Korean image by extension of Korean wave culture. *J Jpn Lang Lit* 57, 449-471. <https://doi.org/10.17003/jllak.2013.84.2.449>.
- MFDS (Korea Ministry of Food and Drug Safety). 2019. Food code regulations in Korea. Retrieved from https://www.mfds.go.kr/eng/brd/m_15/view.do?seq=69982 on May 6, 2020.
- MFDS (Korea Ministry of Food and Drug Safety). 2016. Microbial risk profile. MFDS Food Risk Assessment Department Report, MFDS, Cheongju, Korea, 3-38.
- MOF (Korea Ministry of Oceans and Fisheries). 2020. Current state of marine products exports in 2019. Retrieved from <https://www.mof.go.kr/iframe/article/view.do?articleKey=28414&boardKey=10&menuKey=376¤tPageNo=1> on May 4, 2020.
- Moon SY, Woo GJ and Shin IS. 2005. Development of predictive growth model of *Listeria monocytogenes* using mathematical quantitative assessment model. *Korean J Food Sci Technol* 37, 194-198.
- Nauta MJ, Litman S, Barker GC and Carlin F. 2003. A retail and consumer phase model for exposure assessment of *Bacillus cereus*. *Int J Food Microbiol* 83, 205-218. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00374-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00374-4).
- NIFDS (Korea National Institute of Food and Drug Safety Evaluation). 2019. Risk assessment of *Bacillus cereus* in pastes. NIFDS Food Risk Assessment Report, NIFDS, Cheongju, Korea, 1-33.
- Park HS, Bahk GJ, Park KH, Pak JY and Ryu K. 2010. Predictive model for growth of *Staphylococcus aureus* in Suyuk. *Food Sci Anim Resour* 30, 487-494. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2010.30.3.487>.
- Park SY, Choi SY and Ha SD. 2019a. Predictive modeling for the growth of *Aeromonas hydrophila* on lettuce as a function of combined storage temperature and relative humidity. *Foodborne Pathog Dis* 16, 376-383. <http://doi.org/10.1089/fpd.2018.2590>.
- Park SY, Zhang CY and Ha SD. 2019b. Predictive modeling for the growth of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on lettuce washed with combined chlorine and ultrasound during storage. *J Food Hyg Saf* 34, 374-379. <https://doi.org/10.13103/JFHS.2019.34.4.374>.
- Ross T. 1996. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *J Appl Bacteriol* 81, 501-508. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1996.tb03539.x>.
- Ross T, Dalgaard P and Tienungoon S. 2000. Predictive modelling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products. *Int J Food Microbiol* 62, 231-245. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00340-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00340-8).
- Schoeni JL and Lee wong AC. 2005. *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins. *J Food Prot* 68, 636-648. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.3.636>.
- Walls I and Scott VN. 1996. Validation of predictive mathematical models describing the growth of *Escherichia coli* O157:H7 in raw ground beef. *J Food Prot* 59, 1331-1335. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-59.12.1331>.
- Yang S, Park SY and Ha SD. 2016. A predictive growth model of *Aeromonas hydrophila* on chicken breasts under various storage temperatures. *LWT Food Sci Technol* 69, 98-103. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.01.016>.
- Yoon YH. 2014. Marine environments and production of laver farm at Aphae-do based on water quality and phytoplankton community. *Korean J Environ Biol* 32, 159-167. <https://doi.org/10.11626/KJEB.2014.32.3.159>.
- Ziane M, Leguerinel I and Membré JM. 2019. A quantitative microbiological exposure assessment of *Bacillus cereus* group IV in couscous semolina, Algeria. *Microb Risk Anal* 11, 11-22. <https://doi.org/10.1016/j.mran.2018.07.001>.