

MYP 배지의 난황 농도에 따른 *Bacillus cereus*의 배양 특성

홍수영, 서유미, 강창열, 이병우*, 권무식*, 이진성[§]
(주)나래바이오테크 부설 미생물소재연구소

*성균관대학교 유전공학과

lejis@naraebio.com

Growth Characterization of *Bacillus cereus* by Egg-Yolk Concentrations Supplemented in MYP

Su Young Hong, Yu Mi Seo, Chang Youl Kang,
Byungwoo Lee*, Moosik Kwon* and Jin-Sung Lee[§]
Research Institute of Naraebiotech Inc.

*Dept of Genetic Engineering, SungKyunKwan Univ.

요 약

현재 *Bacillus cereus*의 정량 및 정성 분석을 위해서 MYP 배지가 주로 사용되고 있으나 식품공전과 축산물의 가공기준 및 성분 규격 내에서 MYP의 주요 첨가물인 egg-yolk의 농도는 각각 2.5%와 5%로 서로 상이하어 대상이 되는 시료의 유래에 따라 각기 다른 MYP 배지를 제조해야 하는 불편함이 있다. 따라서 본 연구는 MYP 배지에 1%에서 10%로 10개 구간으로 egg-yolk의 농도를 첨가하여 이에 따른 *B.cereus*의 정량적 특성, lecithinase 활성대의 크기 및 육안 확인이 가장 좋은 구간대에 대한 관능평가를 실시하였다. 결과적으로 정량적 특성과 lecithinase 활성대의 크기는 농도가 증가할수록 비례하지 않음을 알 수 있었으며, lecithinase 활성대에 대한 관능평가는 2%의 egg yolk가 가장 확인이 용이한 것으로 평가되었다. 본 연구를 통해서 MYP에 첨가되는 egg-yolk의 최종 농도가 현재의 2.5%(식품), 5%(축산물)로 다르게 기준 되어 있는 것을 2% 또는 식품공전의 2.5%로 통합하여 개정하는 것이 가능하다고 판단되며 이러한 개정을 통하면 MYP 조성물 중 고가인 egg-yolk 제조 비용을 상당히 줄여 줄 것으로 기대된다.

1. 서론

*Bacillus cereus*는 토양세균의 일종으로 인간의 거주 및 생활환경에서, 그리고 먼지, 오수 및 하천 등에 걸쳐 널리 분포되는 그람 양성 호기성 세균이다[1]. *B.cereus*는 페니실린을 분해하는 효소를 가지고 있어 페니실린에 대해서 내성이 있으며 VP 반응과 citrate 이용 능력, catalase 생성 및 casein과 tyrosine 분해 능력에 양성을 갖는 생화학적 특성을 갖고 있다[2]. 같은 속에 속한 다른 *Bacillus* 세균과 구별되는 생화학적 특성은 β-용혈현상과 lecithinase 활성을 가지고 있어 egg-yolk에 대한 양성을 나타낸다[1, 2].

*B.cereus*는 토양에서 유래되는 식품 및 원료식품

에 포함되어 인간에게 식중독을 유발시켜 이들 세균은 식품 및 축산물의 품질관리에 있어서 중요한 세균이 된다[3].

현재 *B.cereus*의 정량 및 정성분석을 위한 배양과 추정시험은 Manitol-egg Yolk-Polymixin(MYP) 배지가 가장 많이 사용되고 있다[4, 5, 6]. 이 배지의 특성은 *B.cereus*가 보유한 lecithinase가 egg-yolk를 분해하면 집락 주변에 분홍색의 환(zone)을 생성하여 육안으로 추정 및 확인이 용이하기 때문이다. 그러나 현재의 식품공전[7]과 축산물의 가공기준 및 성분 규격[8] 내에서 *B.cereus*의 lecithinase 활성을 위해 첨가되는 기질인 egg-yolk 농도가 각각 2.5%와 5%로 다르기 때문에 검사시료가 식품이나 축산물이나에 따른 배지의 제조방법이 달라지는 불편함

이 있다. 따라서 두 가지 공전에 함께 적용할 수 있는 egg-yolk의 단일 농도에 대한 기준은 *B.cereus*를 대상으로 하는 세균 검사에 있어서 비용을 상당히 개선할 것으로 기대된다.

따라서 본 연구에서는 MYP 배지의 첨가물인 egg-yolk의 농도에 따른 *B.cereus*의 정량평가와 lecithinase의 활성대의 크기 및 육안 확인의 관능평가를 수행함으로써 *B.cereus*의 배양 및 이에 대한 검사에 egg-yolk 최적 농도를 규명하고자 수행하였다.

2. 재료 및 방법

MYP의 제조는 500ml에 10g의 Peptic digest of animal tissue, 1g의 Meat extract, 10g의 D-manitol, 10g의 Sodium chloride, 0.025g의 Phenol red, 15g의 agar의 조성비를 갖는 MYP Agar base와 polymixin(100,000unit/liter)을 HIMEDIA(India)로부터 구입하여 사용하였다.

Egg-yolk는 식품공전에 기재된 방법대로 무균대안에서 계란을 1시간 동안 0.1% HgCl₂에 담근 다음 70% ethanol에 30분 담근 후 계란의 노른자만을 추출하여 동량의 0.85%의 식염수를 첨가하여 최종 농도가 50%가 되도록 제조하였으며 MYP에 첨가한 egg-yolk는 최종 농도를 1%에서 10%까지 각 1% 구역대로 하여 MYP 배지의 온도가 50℃가 되었을 때 첨가하였다.

Egg-yolk의 농도별 정량평가는 한국미생물보존센터(KCCM)에서 분양받은 *B.cereus*를 TS(Soyabean Casein Digest) broth에 접종하고 분광광도계를 사용하여 OD₆₀₀=0.3으로 세균의 농도를 맞춘 다음 1ml을 0.85% 식염수에 분주하여 10⁻¹에서 10⁻⁵까지 단계별로 희석하고 희석액 0.2ml을 egg-yolk 농도별로 첨가된 MYP 배지에 도말하여 30℃에서 24시간 동안 배양한 후 계수하여 log₁₀CFU/ml로 나타내었다. 정량분석은 각 egg-yolk 농도별로 5반복을 실시하였다.

각각의 egg-yolk 농도에 따른 MYP 배지의 recovery rate의 산출을 위해서 증균배지인 TSA(Soyabean Casein Digest agar)를 1리터 기준으로 15g의 Pancreatic digest of casein, 5g의 Papaic digest of soyabean meal, 5g의 Sodium chloride, 15g의 Agar의 비율로 조성된 HIMEDIA사(India) 제품을 대조군 배지로 사용하였다.

*B.cereus*의 lecithinase의 활성을 간접적으로 확

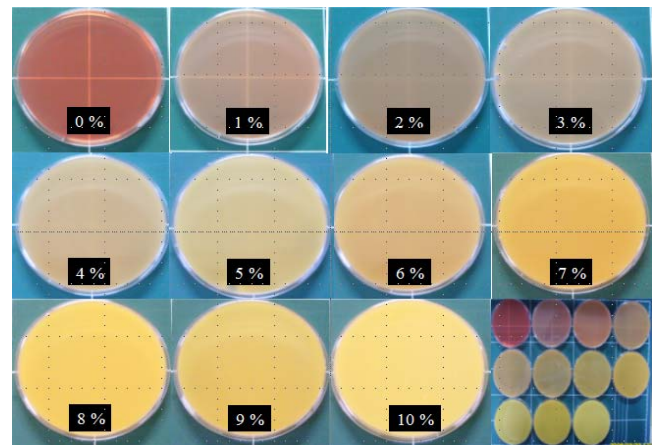
인하는 분홍색 환의 크기의 측정은 각 egg-yolk 농도별로 도말된 배지에서 5개의 집락을 선별하여 5mm 간격의 측정자로 실측하였다.

*B.cereus*의 Egg-yolk에 대한 lecithinase의 활성에 대한 관능평가는 성균관대학교 유전공학과 3학년(40명)을 대상으로 실시하였다. 이때의 대조군은 egg-yolk가 첨가되지 않은 MYP 배지를 사용하였으며 실험군은 egg-yolk가 1%에서 10%까지 10개 구간으로 첨가된 MYP 배지를 대상으로 lecithinase 활성이 육안으로 가장 좋은 egg-yolk 농도를 1순위 및 2순위를 정하는 방법으로 실시하였다.

3. 결과

3.1. Egg-yolk 농도별 정량 평가

Egg-yolk 농도를 1%에서 10%로 10구간으로 하여 제조한 MYP의 성상은 Fig. 1에서 처럼 농도가 증가할수록 빨강색에서 주황색으로 나타난다.



[Fig. 1] Color of MYP medium supplemented with 0%~10% egg-yolk concentrations before plating *B.cereus*

Egg-yolk 농도별로 *B.cereus*의 5회 반복한 정량평가 결과는 egg-yolk의 농도가 증가할수록 *B.cereus*의 집락수가 비례하지 않는 것으로 나타났다. 식품공전 기준의 2.5% egg-yolk 농도 구역대인 2%와 3%의 정량결과는 각각 6.48±0.09와 6.47±0.11의 log₁₀CFU/ml이었으며 축산물 기준인 5%의 egg-yolk에서는 6.47±0.08의 log₁₀CFU/ml로 계수되었다(Table 1).

Egg-yolk 농도에 대한 recovery rate를 대조군 배지인 TSA와의 상대적인 비교 결과에서도 egg-yolk 농도가 증가할수록 recovery rate 증가하는 유의성이 없는 것으로 나타났다(Table 1).

[Table 1] Quantitative comparison of *B.cereus* by egg- yolk concentrations

E.Y. (%)	Recovery rate (%)	Mean±SE	Minimum	Maximum
0	99.08	6.53±0.18	6.23	6.72
1	98.63	6.50±0.06	6.44	6.61
2	98.33	6.48±0.09	6.34	6.59
3	98.17	6.47±0.11	6.36	6.62
4	99.39	6.55±0.14	6.36	6.69
5	98.17	6.47±0.08	6.38	6.60
6	98.48	6.49±0.09	6.39	6.61
7	97.57	6.43±0.11	6.30	6.56
8	98.33	6.48±0.12	6.34	6.64
9	99.84	6.58±0.08	6.50	6.69
10	97.72	6.44±0.11	6.34	6.62

전체적으로 대조군 배지인 TSA 배지에 대한 MYP 배지에서의 *B.cereus*의 recovery rate는 98.51±0.68 log₁₀CFU/ml로 산출되었다(Table 1).

3.2. Egg-yolk 농도별 lecithinase 활성대 크기

Egg-yolk를 농도별로 제조된 MYP 배지를 16시간, 24시간 및 36시간 동안 *B.cereus*를 배양하여 lecithinase 활성대의 크기를 비교한 결과, egg-yolk의 농도는 증가와 lecithinase의 활성대의 크기는 비례하지 않는 것으로 분석되었다(Table 2), 16시간 동안 배양할 경우에는 10%의 egg-yolk에서 활성대의 크기가 7.40±0.41mm로 가장 컸으며, 24시간과 46시간 배양 결과에서는 6%의 egg-yolk가 각각 11.60±0.22와 16.80±0.57mm로 가장 큰 lecithinase 활성대를 보이는 것으로 나타났다. 하지만, 각 배양시간 별로 lecithinase 활성대의 크기는 표준편차 범위내에 있는 것으로 나타났다.

[Table 2] Size comparison diameter of colony-containing lecithinase-activity zone

E.Y (%)	Incubation time (hr)	Mean±S.E.	Minimum	Maximum
0	16	2.20±0.52	2	2.5
	24	3.10±0.22	3	3.5
	36	4.70±0.27	5	4.5
1	16	7.70±0.44	7	8
	24	11.50±0.35	11.5	12
	36	16.70±0.27	16.5	17

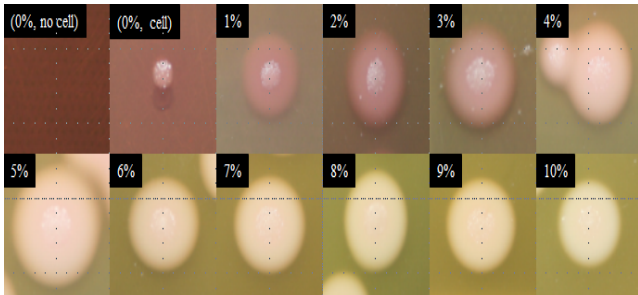
2	16	7.30±0.44	7	8
	24	10.90±0.22	10.5	11
	36	16.40±0.65	15.5	17
3	16	7.40±0.54	7	8
	24	11.30±0.44	11	12
	36	16.70±0.83	16	17
4	16	7.30±0.44	7	8
	24	10.80±0.57	10	11.5
	36	16.34±0.58	15.5	16.5
5	16	7.10±0.22	7	7.5
	24	10.70±0.27	10.5	11
	36	16.50±0.6	16	17.5
6	16	7.80±0.44	7	8
	24	11.60±0.22	11.5	12
	36	16.80±0.57	16	17.5
7	16	7.50±0.35	7	8
	24	11.00±0.35	10.5	11.5
	36	16.60±0.41	16	17
8	16	7.60±0.22	7.5	8
	24	10.90±0.22	10.5	11
	36	15.70±0.44	15	16
9	16	6.80±0.44	6	7
	24	10.70±0.27	10.5	11
	36	16.40±0.22	16	16.5
10	16	7.40±0.41	7	8
	24	11.10±0.22	11	11.5
	36	15.70±0.67	15	16.5

3.3. Egg-yolk의 농도별 lecithinase 활성대의 관능 평가

*B.cereus*가 발현하는 lecithinase의 활성에 의해 나타나는 분홍색 환에 대한 관능 평가(Fig. 2)는 “콜로니와 콜로니 주변의 lecithinase 활성대가 가장 분명하게 구별되는 egg-yolk 농도는 무엇인가?”라는 첫 질문에 40명의 검사자 중에서 1순위 첫번째로 52.5%(21명)가 2%의 egg yolk를 선택하였으며, 두 번째로 20%(8명)가 8%의 egg yolk를, 세번째로 10%(4명)가 5%의 egg yolk를 선택하였다. 다음의 질문으로 “두 번째로 확인이 구별되는 egg-yolk의 농도는 무엇인가?”에서는 첫번째로 32.5%(13명)가 5%의 egg yolk를, 두 번째로 22.5%(9명)가 2%의 egg-yolk를, 세번째로 20%(8명)가 7%를 선택하였다 (Table 3).

4. 고찰

본 연구에서는 *B.cereus*의 정량 및 정성 평가에 가장 많이 사용되는 MYP 배지에 첨가되는 egg-yolk의 최적 농도를 규명하고자 하는 것으로 현재의 식품공전에서는 2.5%, 축산물기준에서는 5%의 egg-yolk를 사용하도록 되어 있는 것이 식품의 유래에 따라서 MYP 배지를 제조할 때 불편함이 있어 2.5%와 5% 농도의 egg-yolk가 여러 가지 다른 농도의 egg-yolk와 비교할 때 정량적, 정성적 특성의 차이가 있는지를 확인하여 2.5% 또는 5%로 식품과 축산물 기준에 같은 egg-yolk 농도로 개정이 가능한지에 대한 가능성을 탐색하는 것이었다.



[Fig. 2] Lecithinase-activity zone classified by 1~10% final concentration of egg-yolk

[Table. 3] Physical test for discriminating lecithinase-activity zone classified by 1~10% concentration of egg-yolk

Egg yolk(%)	1st choice	2nd choice	Sum of choice
1	0	0	0
2	21	9	30
3	3	4	7
4	0	1	1
5	4	13	17
6	0	2	2
7	0	8	8
8	8	3	11
9	1	0	1
10	3	0	3
Total	40	40	80

결과적으로 egg-yolk의 정량평가는 egg-yolk의 농도가 증가하면서 상대적인 *B.cereus*의 세균수 증가가 유의하지 않다는 것을 TSA 배지를 대조배지로 비교함으로써 알 수 있었다. 특히 식품공전이 준하는 2.5% egg yolk 범위에 속하는 2%와 3%의 recovery rate가 각각 98.33%과 98.17로 축산물기준

의 5% 결과(98.17%)와 거의 차이가 없음도 알 수 있었다. 또한, *B.cereus*의 특징 중에 하나인 lecithinase 효소의 활성을 확인하는 lecithinase-activity zone의 크기와 egg-yolk 농도의 상관성을 평가한 결과에서도 egg-yolk 농도의 증가와 lecithinase-activity zone의 크기는 유의한 차이가 없음도 확인 할 수 있었다. 다만, 본 연구에서는 6%의 egg-yolk가 12시간, 24시간, 36시간의 배양시간 모두에서 각각, $7.80 \pm 0.44\text{mm}$, $11.60 \pm 0.22\text{mm}$, $16.80 \pm 0.57\text{mm}$ 로 가장 큰 lecithinase-activity zone을 형성하는 것으로 분석되었다.

성균관대학교 3학년 학생들을 대상으로 lecithinase-activity zone에 대한 최적의 육안 확인 기준을 egg-yolk 농도에 따른 관능평가는 1순위로 식품공전 기준인 2.5%의 범위에 속하는 2%와 3%의 egg-yolk를 선택한 학생이 60%(24명)이었으며, 2 순위의 육안 확인이 좋은 egg-yolk 농도는 축산물기준인 5%가 32.5%로 가장 높았다. 1순위, 2순위 선택 결과를 종합해 보면 식품공전 기준의 2~3% 범위의 egg-yolk가 46.25%로 가장 높았으며 그 다음으로 축산물기준인 5% egg-yolk가 21.25%이었다.

이상과 같이 본 연구를 통해서 MYP 배지에 첨가되는 egg-yolk의 농도는 정량적 결과에는 영향을 미치지 않으며, 배양시간별 lecithinase-activity zone의 크기도 *B.cereus*의 정성적 평가에 중요한 고려요인이 아닌 것을 알 수 있다. 하지만 lecithinase-activity zone을 구별하여 *B.cereus*의 유무를 추정하는 육안 확인에서는 현재의 2.5% egg-yolk를 기준으로 하는 식품공전 기준이 5% 기준인 축산물시험기준보다 좋다는 것을 관능평가로부터 알 수 있었다.

5. 결론

*B.cereus*는 토양에 상재하는 식중독 유발 세균으로 토양에서 유래하는 식품에 대해서는 주요 검사 대상 세균이다. *B.cereus*는 시험은 정성시험과 정량 시험 모두에서 MYP 배지가 가장 많이 사용되고 있는데[1, 3, 4, 5] MYP 배지 제조에 기본이 되는 MYP base에 egg-yolk와 그람 음성균의 생육을 저해시키는 항생제인 polymixin이 배지 분주 전에 첨가되기 때문에 여타의 배지보다는 제조의 불편함이 많다. 더구나 식품공전[7]과 축산물의 가공기준 및 성분 규격[8]의 egg-yolk의 최종 농도가 각각 2.5%

와 5%로 서로 다르기 때문에 대상 시료의 유래에 따라 서로 다른 농도의 egg-yolk를 MYP 배지에 첨가해서 제조해야 하는 번거로움도 있다. 하지만 지금까지 egg-yolk의 농도에 따른 MYP 배지의 성능평가가 보고되어 있지 않아 식품공전 및 축산물시험기준에 egg-yolk를 같은 농도로 개정 될 수 있는 기준을 제시하지 못하였다. 따라서 본 연구결과는 *B.cereus*의 정성 및 정량 평가용 MYP 배지에 첨가되는 egg-yolk의 농도를 식품공전에서 기준하는 2.5%로 축산물시험기준에 적용하여도 *B.cereus*의 정량 및 정성평가에 적합하다는 것을 제시한 데 의의가 있다고 사료되며 앞으로 축산물 시험기준중 egg-yolk의 최종농도를 5%에서 2.5%로의 개정을 제안하는데 중요한 결과로 활용될 수 있을 것이다.

또한, 본 연구로부터 MYP 제조시 비용이 많이 드는 egg-yolk의 비용을 크게 줄여 줄 것으로 기대되며 현재 상용화가 되고 있는 pre-plated 배지의 제품생산 단가를 줄여 줄 것으로 기대한다.

* 본 연구는 2008년 중소기업청의 “산학협력력 기업부설연구소 설치 지원사업”으로 지원된 과제입니다.

6. 참고문헌

- foods on a novel chromogenic plating medium, 2001, Food Microbiology, 18:231-238.
- [7] 식품공전일반시험법, 식품의약품안전청, 2008, 401-408.
- [8] 축산물의 가공기준 및 성분 규격, 국립수의과학검역원, 2008, 186-187.
- [1] Arnesen, L. P. S., A. Fagerlud and P. E. Granum, From soil to gut : *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins, 2008, EFMS Microbiology 32:579-606.
- [2] 진성유니텍 학술기획부, Food-Borne Pathogens, 2007, 321-335.
- [3] Ehling-Schulz M., M. Fricker and S. Scherer, *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness, Mol. Nutr. Food Res., 48: 479-487.
- [4] Mossel, D. A. A., M. J. Koopman, and E. Jongerijs., Enumeration of *Bacillus cereus* in Foods, 1967, Applied Microbiology, 15(3):650-653
- [5] Kim, H. U. and J. M. Goepfer, Enumeration and Identification of *Bacillus cereus* in Foods. 1971, Applied Microbiology, 22(4):581-587.
- [6] Peng, P., V. Ford, E. W. Frampton, L. Restaino, L. A. Shelef and H. Spitz, Isolation and enumeration of *Bacillus cereus* from