

우리밀 식빵에서 분리된 로프박테리아의 생육 조건

전억한 · 이광석*

경희대학교, *경희호텔경영전문대학

Growth Conditions of Rope Bacteria Isolated from Korean Wheat Bread

Euk-Han Chun and Kwang-Suck Lee*

Department of Food Science and Technology, Kyung-Hee University

*Department of Culinary Science, International College of Hotel Administration Kyung-Hee University

Abstract

Bacterial strain showing the ropy characteristics was isolated from Korean wheat bread. Morphology of the isolate was rod and biochemical test revealed that the isolate was *Bacillus subtilis*. Growth of rope bacteria was about the same as other *Bacillus* species and inhibited below pH 5.6. Rope bacteria isolated from Korean wheat bread could not survive under the heat treatment of 10 min at 100°C, but could survive at 90°C.

Key words: Korean wheat bread, rope bacteria, *Bacillus*

서 론

빵 제품의 변질에 대한 연구는 크게 두가지 측면에서 이루어지며, 전분의 노화에 의한 속질의 변화와 곰팡이나 박테리아에 의한 껍질과 속질의 변화가 있다. 빵은 제조과정에서 필연적으로 많은 기계들과 비위생적인 환경에 놓이게 되며, 이러한 조건들은 결국 제품에서의 세균 번식을 촉진하게 된다. 또한 최종적으로 빵 제품들은 대부분 0.90~0.98의 수분활성도를 보이며⁽¹⁾, 판매를 위해서 포장을 하기 때문에 적당한 수분의 이동으로 인해 미생물의 번식에는 최적의 환경이 될 수가 있다⁽²⁾. 대부분의 식빵은 pH 5.7~6.0을 나타내므로⁽³⁾ 세균의 성장을 억제하는 요소로는 작용되지 않는다. 다행히 식빵은 180~200°C의 높은 온도의 열을 이용하여 굽는 제품이므로 대부분의 미생물들은 활성을 잃게된다. 그러나 부적절한 포장환경이나 방법들은 제품의 속질에 소수의 내열성 박테리아가 남게 될 수도 있다.

미국의 경우 1980년대에 들어서 소비자들의 건강제품에 대한 욕구로 자연가공 재료들의 사용과 보존제의 제거로 인해 ropy bread에 대해 상당한 문제가 발

생되고 있다⁽⁴⁾. 국내의 경우에도 최근 늘어가는 우리밀 빵에 대한 소비로 인해 이러한 문제가 항상 발생될 소지가 있다. 그러나 빵에서 검출되는 박테리아는 인간에 질병을 가져오는 종류가 아닌 것으로 알려져 있으며^(5,6), 세균의 농도가 낮은 경우에는 제품의 속질이 연하게 되고 짭짤은 멜론향이 발생된다. 반면에 세균의 농도가 높아지면 속질의 색이 갈색으로 변하고 단백질 분해능이 높은 효소의 영향으로 너무 무르게 되어^(7,8) 제품의 질은 상당히 떨어지게 된다.

따라서 본 연구는 우리밀을 이용한 빵 제품에서도 단백질 분해능이 뛰어난 효소를 가지고 있는 균주가 존재하며, 이 균주를 분리 및 동정하고 균주의 기본적인 생육 조건을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

Wheat bread의 제조

식빵의 제조에 사용한 배합은 Table 1과 같으며, 밀가루는 제일제당의 밀맥스와 (주)우리밀의 통밀가루 그리고 전밀가루로는 프랑스 Catherine사의 Panor Malte를 이용하였다. 생이스트와 활성글루텐은 각각 제니코 식품회사와 한중식품의 네델란드산 글루텐을 사용하였으며, 마가린은 롯데삼강의 그랜드 300-1을, 탈지분유는 회창유업의 뉴-밀키 100을 사용하였다. 반

Corresponding author: Kwang-Suck Lee, Department of Culinary Science, International College of Hotel Administration, Kyung-Hee University, 1 Hoiki-dong, Dongdaemun-ku, Seoul, 130-701, Korea

Table 1. Formula of the three kinds of wheat bread (B/P%)¹⁾

Ingredient	Wheat bread	Korean wheat bread	Wheat bran bread
Bread flour	100	80	80
Korean wheat flour		20	
Wheat bran flour			20
Sugar	8	8	8
Fresh yeast	3	3	3
Margarin	3	3	3
M.S.N.F. ²⁾	2	2	2
Salt	1.5	1.5	1.5
S-500	1.5	1.5	1.5
Wheat gluten		2	
Water	60	62	60

¹⁾Baker's percent.²⁾Milk Solids Non-Fat.

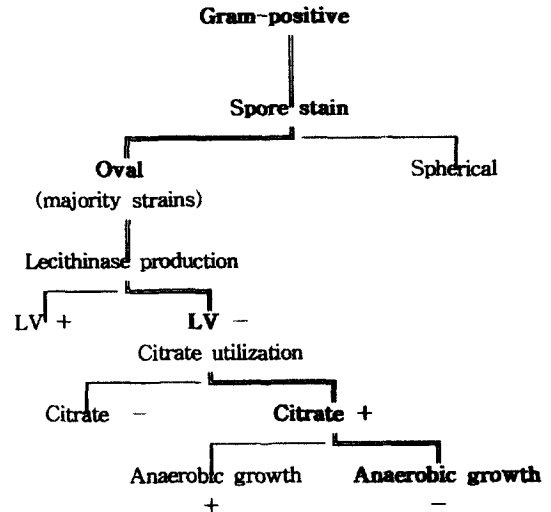
죽은 후염법과 수온조절법을 이용하여 27~28°C를 유지하였으며, 대영공업사의 1.5 HP 수직반죽기를 이용하였다. 1차발효와 2차발효는 50분을 실시하였으나 우리밀의 경우에만 60분간 시행하였으며, 대영공업사의 dough conditioner를 이용하였다. 분할은 450 g씩 손으로 하였으며, 굽기는 steam oven (한영기업)을 사용하여 185°C의 윗불과 180°C의 밑불로 28분간 실시하였다.

로프 박테리아의 분리

박테리아의 검출을 위해서 사용한 식빵은 AACC method 10-10B[®]에 의한 직접법으로 제조하였으며, 주재료인 밀가루는 수입밀, 우리밀, 그리고 전밀가루를 사용하여 colony 형성의 유무를 비교하였다. 박테리아의 분리를 위해서 사용된 세가지 식빵은 높은 열에 의해 불활성된 세균에 회복기간을 주기 위해서 35°C와 75%의 상대습도에서 24시간 dough conditioner에 보관한 후 사용하였다. 멸균된 도구를 이용하여 가운데 속질 부분을 1 g 채취하여 9 mL의 멸균수에 담아 Vortex mixer (Type 37600, Maxi Mix II)를 이용하여 혼합한 후 평판도말법으로 순수배양하여 37°C의 incubator VS-1203P3 (Vision scientific co.)에서 2일간 관찰하였다. 실험에 사용된 배지는 tryptone 5 g, yeast extract 2.5 g, glucose 1 g, agar 15 g, distilled water 1,000 mL이었다. 또한 고체배지는 pH meter 345 (Corning)를 이용하여 pH를 7.0으로 조정된 후 멸균하여 사용하였다.

로프 박테리아의 동정

박테리아의 동정을 위해서는 A Color Atlas of

**Fig. 1. Primary steps in the identification of *Bacillus* species**

Bacillus Species의 동정법⁽¹⁰⁾에 따라 순수 배양된 균주를 채취하여 gram stain, microscopic survey, scanning electron microscope (SEM), lecithovitellin/lecithinase production test (LV reaction), citrate reaction, propionate reaction 등을 하였다(Fig. 1). 그리고 생명공학 연구소 유전자은행(KCTC)으로부터 로프박테리아의 유사균주인 *Bacillus licheniformis* (KCTC 1657), *Bacillus subtilis* (KCTC 1028), *Bacillus cereus* (KCTC 1012) 등을 분양받아 검증하였다.

균주의 관찰을 위해서는 Olympus BH-2 microscope를 10×100로 하여 simple staining과 gram staining 한 후에 사용하였으며, Sigma사의 Gram Stain을 이용하였다. 또한 Stereoscan 440 SEM을 이용하여 30,000배로 확대하여 관찰하였다. SEM의 관찰에 사용된 균주는 1일 전에 agar를 제외한 tryptone broth에서 배양하여 가장 활성이 좋은 것을 선택하였다.

LV reaction을 보기 위해서 사용한 주된 배지는 pH 7.0의 Kendall's BC medium이었으며, 성분은 ammonium dihydrogen phosphate 0.5 g, KClO₃ 0.1 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.1 g, yeast extract 0.1 g, distilled water 500 mL, agar 10 g이었다. 지시약으로는 1% alc. bromocresol purple 2 mL를 첨가하였다. 주배지 90 mL에 1 g의 mannitol을 뜨겁게 해서 녹인 후 50°C로 식힌다. 이 용액에 계란 노른자와 식염수의 비율이 1:1인 egg emulsion을 만들어서 10 mL를 투입하여 평판 배지를 만들어 사용하였다.

Citrate reaction을 알아보기 위해서 사용된 배지는

pH 6.8의 Simmon's citrate agar medium이며, 성분은 NaCl 2.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.1 g, NH₄H₂PO₄ 0.5 g, K₂HPO₄ 0.5 g, citric acid 1 g, distilled water 500 mL, agar 10 g이었다. 지시약으로는 0.2% bromothymol blue 20 mL를 사용하였다. 사면배지와 평판배지를 만들어 균주를 접종한 후 37°C의 배양기에서 14일간 관찰하였다.

Propionate reaction을 위한 배지는 citric acid 대신에 sodium propionate을 첨가한 Simmon's citrate agar의 성분과 같다.

로프 박테리아의 생육 특성 측정

우리밀 식빵에서 검출한 rope bacteria와 비교균주인 KCTC 1012, KCTC 1657, KCTC 1028의 성장을 spectrophotometer (Shimadzu,co. UV-1201)을 이용하여 비교 측정하였다. 사용된 배지는 tryptone broth 99 mL에 1일 전에 계대배양된 1 mL의 배양액을 혼합하여 18시간 동안 580 nm의 파장에서 측정하였다.

일반적인 세균의 최적 pH와 식빵의 pH 조건들을 감안하여 pH 6.8~4.8을 범위로 하여 성장 특성을 살펴 보았다. 실험에 사용된 시료는 1일 전에 계대배양하여 1 N HCl과 0.1 M NaOH로 pH를 조절하였으며, spectrophotometer를 이용하여 580 nm에서 13시간 동안 측정하였다.

세균의 열에 대한 내성을 알아보기 위해서 thermal death point 결정법⁽¹¹⁾으로 16시간 동안 실험을 하여, 열 처리가 우리밀 식빵에서 검출된 rope bacteria의 생존에 미치는 영향을 알아보았다. 열처리기는 drying oven (Dai Han Trading Co.)을 사용하여 100°C와 90°C 그리고 80°C로 10분간 하였으며, 온도계를 이용하여 편차를 +5°C로 하여 항상 측정온도보다 높게 유지하였다.

결과 및 고찰

로프 박테리아의 분리 및 동정

세가지 밀가루를 이용하여 만든 모든 식빵에서 colony가 형성되었으며, 우리밀을 사용한 경우가 가장 빨리 1일 후에 나타난 반면 나머지들은 2일째에야 colony의 형성을 보이기 시작했다. 발견된 colony의 형태는 모두 동일하게 convex 형태로 가장자리가 smooth 하였으며, 백금이를 이용하여 잡아당겨 보았을 때에 끈적한 실과 같은 전형적인 rope bacteria의 특성⁽¹²⁻¹⁴⁾을 나타내었다. 또한 유사균주인 KCTC 1657, KCTC 1028, KCTC 1012의 결과도 같은 형태의 colony 형성을 보였다.

Fig. 2. Symmetrical division state for rope bacteria in Korean wheat bread (Stereoscan 440 at 30,000 X).

Table 2. Characteristics of rope bacteria isolated from Korean wheat bread

Characteristics	Results
Colony formation	Circular
Microscope survey	Rod cell
Gram staining	Positive
LV reaction	Negative
Citrate utilization	Positive
Propionate utilization	Negative
Anaerobic growth	Negative
Mannitol fermentation	Positive
Indole production	Negative

현미경을 이용한 관측에서도 세가지 모두 rod 형태로 나타났으며, Fig. 2와 같이 *Bacillus*와 동일한 형태를 나타냈다. 여러 동정실험에서 관찰된 반응의 결과를 종합해 보면 Table 2와 같이 나타난다.

우리밀 식빵에서 분리된 박테리아는 LV 반응에서 음성을 나타내어, 1일 후에 도말 부위에 환모양이 생겨난 KCTC 1012 (*Bacillus cereus*)와는 반대반응을 보였다. 비교 실험에서는 rope bacteria로 분류되는 KCTC 1028 (*Bacillus subtilis*)과 KCTC 1657 (*Bacillus licheniformis*)은 우리밀 식빵과 같은 음성반응을 보였다. 따라서 우리밀에서 분리된 박테리아는 lecithin을 분해할 수 있는 효소를 만들어내며, mannitol의 발효를 가능하게 한다. 사면배지를 이용한 citrate reaction은 10일 째에 녹색에서 청색으로 변하여 양성반응을 보였으며, 평판배지에서는 7일만에 반응이 나타나서 접종방법에 의해서 반응속도의 차이가 나타났다. 일반적으로 *Bacillus subtilis*와 *Bacillus licheniformis*는 rope bacteria로 분리되며, 이의 구별을 위해서 propionate reaction을 하여 혐기성 조건에서의 성장을 살펴보았다^(10,15). 혐기조건에서 양성반응을 나타내는 *Bacillus licheniformis*와는 달리 식빵

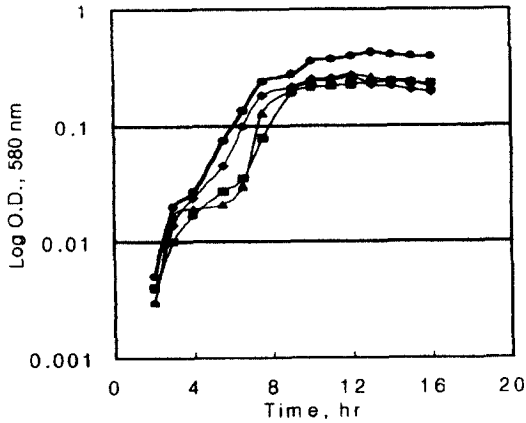


Fig. 3. Growth curves for *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, Rope bacteria grown on tryptone broth at 37°C. ◆—◆: KCTC1028, ■—■: ROPE, ▲—▲: KCTC1067, ●—●

에서 검출한 균은 음성반응을 보여 *Bacillus subtilis*의 일종인 것으로 판명되었다.

로프 박테리아의 생육환경

분양받은 다른 균주들과의 실험에서 나타난 생육곡선에서는 네가지의 균주가 비슷한 생육곡선을 보였으나(Fig. 3), KCTC 1657의 경우에는 적응기와 대수기 사이에 시간이 필요한 것으로 나타났으며, 우리밀에서 검출한 rope bacteria와 KCTC 1028의 유형이 가장 근접한 것으로 나타났다. 따라서 rope bacteria는 식빵을 구울 때에 처리된 열에 의해서 다소 적응기가 길어진 것으로 생각되며, 사멸기에서도 rope bacteria의 경우는 다소 완만한 곡선을 보여주어 열에 의해 생육곡선에 변화를 일으키는 것으로 사료된다.

Rope bacteria의 pH 환경변화에 따른 생육곡선을 살펴보았으며, rope bacteria는 pH 6.0을 기점으로 균주의 활성에 매우 뚜렷한 차이를 보였다(Fig. 4). 또한 실험에 의하면 pH 6.0 이상에서는 적응기와 대수기의 성장이 다를지라도 정상기에 이르는 시점은 거의 같은 것으로 나타났으며, pH 5.6 이하에서는 균주의 활성이 억제됨을 보여주었다. 결국 pH 5.8~6.0은 빵의 내부에 남아있는 rope bacteria의 활성에 좋은 조건이 되는 것으로 사료되며, 이와같은 세균의 생육을 억제하고자 하는 경우에는 pH 5.6 이하의 산성으로 제품을 완성하면 된다.

열의 변화에 따른 균주의 생육상태(Fig. 5)는 100°C에서 10분간 열처리한 균주의 경우 거의 성장이 없는 것으로 나타난 반면, 90°C와 80°C의 균주들은 온도가

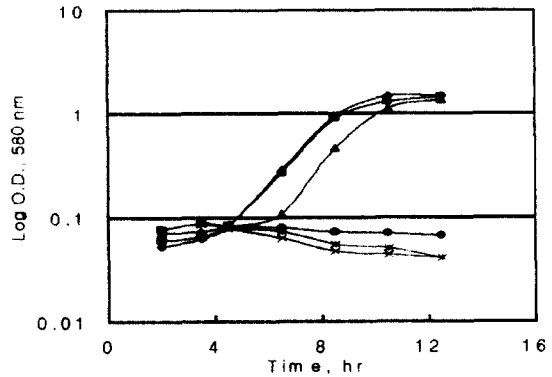


Fig. 4. O.D. values obtained from rope bacteria grown at various pH ranges, 35°C. ◆—◆: pH 6.8, ■—■: pH 6.4, ▲—▲: pH 6.0, ×—×: pH 5.6, *—*: pH 5.2, ●—●: pH 4.8

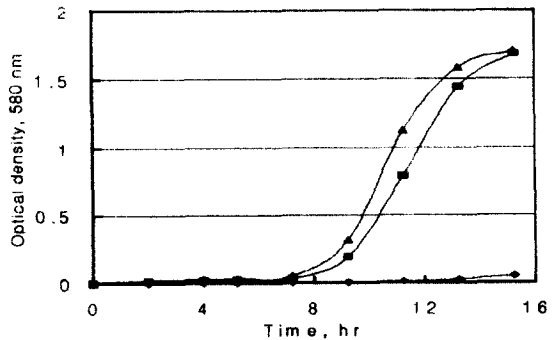


Fig. 5. Growth curves of rope bacteria isolated from Korean wheat bread against heat treatment at 80, 90, 100°C for 10 minutes. ◆—◆: Temp. 100°C, ■—■: Temp. 90°C, ▲—▲: Temp. 80°C

낮을수록 적응기가 짧아질 뿐이며 최종적으로 정상기에 도달하는 시점은 거의 같게 나타났다. 이러한 적응기의 차이는 열에 의해 세균의 활성이 더디게 되는 결과라고 생각하며, 90°C의 높은 열에 의해서도 다시 활성이 되는 것으로 보아 불충분한 굽기과정을 거친 제품에서는 항상 rope bacteria의 존재가 가능하게 된다.

요 약

우리밀을 이용하여 AACC method 10-10B로 만든 식빵을 이용하여 균을 검출하여 A color of atlas of *Bacillus* species에 나와있는 동정법에 의해 실험한 결과, rope bacteria로 알려진 *Bacillus subtilis*의 종류인 것으로 잠정적으로 확인하였다. 이 균의 활성은 pH 6.0을 기점으로 그 이상에서는 매우 좋았으며, pH 5.6 이하에서는 억제되었다. 또한 90°C에서 10분간의 열처리

에서도 다시 활성이 일어나는 것으로 조사되었다. 결국 rope bacteria의 발생은 제조공정에서 적절한 발효과정을 실행하여 제품의 pH를 낮추거나, 충분한 굽기과정으로 내부의 온도를 높이면 억제될 수가 있는 것으로 사료된다.

문 헌

1. Milling & Baking News : 1994-95 Reference source, Sosland Publishing Com., Kansas, Mo, p.74 (1994)
2. Kulp, K.: Staling of bread. American Institute of Baking, Technical bulletin, 1(8), 1 (1979)
3. Bakers digest : Source'85. Sosland Publishing Com., Kansas, Mo, p.15 (1984)
4. Jackel, S.S.: Natural breads may cause microbiological problems. Bakery, Sep., 138 (1980)
5. Fance, W.J.: Characteristics of good bread. In Bread making and flour confectionery, Routledge and Kegan Paul, London, p.93-96 (1972)
6. Harwood, C.R.: Bacillus. In Biotechnology Handbooks, Vol. 2, Plenum Press, New York, p.255 (1989)
7. Frazier, W.C. and Westhoff, D.C.: Contamination, preservation, and spoilage of cereals and cereal products. In Food Microbiology, McGraw-Hill Book Com., U.S. A., p.181 (1978)
8. Bennion, E.B.: Staleness in bread. In Breadmaking, 4th ed., Oxford University Press, London, p.152-159 (1967)
9. AACC: Approved methods of the American association of cereal chemists, 9th ed., American Association of Cereal Chemists Inc., St. Paul, MN (1995)
10. Parry, J.M., Turnbull, P.C.B. and Gibson, J.R.: A colour atlas of bacillus species, Wolfe Medical Publications Ltd., Ipswich, England, p.17, 36-38, 114 (1983)
11. Norrell, S.A. and Messley, K.E.: Physical control methods. In Microbiology laboratory manual, Prentice Hall, New Jersey, p.177-179 (1997)
12. Pyler, E.J.: The baking process. In Baking science and technology, Vol. 2, Siebel Publishing Com., Chicago, IL, p.755-757 (1982)
13. Doerry, W.: Minor ingredients for bread. In Breadmaking technology, American Institute of Baking, Manhattan, KS, p.158 (1995)
14. Kirk, R.S. and Sawyer, R.: Pearson's composition and analysis of foods, 9th ed., Longman Scientific, p.312 (1991)
15. Priest, F.G.: Systematics and ecology of Bacillus. In Bacillus subtilis and other gram-positive bacteria, Sonenshein, A.L., American Society for Microbiology, Washington, D.C., p.7-9 (1993)

(1998년 10월 22일 접수)