

## 부패된 팥앙금으로부터 분리된 미생물의 동정과 그 균의 생리적 특성

이태규<sup>†</sup> · 노민환

우석대학교 대학원 생명공학과

### Identification and Physiological Characteristics of Microorganism Isolated from Spoiled Sweetened Adzuki Ann

Tae-Kyoo Lee<sup>†</sup> and Min-Hwan Roh

Dept. of Biotechnology, Woosuk Graduate School, Chonbuk 565-701, Korea

#### Abstract

In order to determine the causes of sweetened adzuki ann spoilage, the characteristics of microorganism isolated from spoiled adzuki ann were investigated. The isolated microorganism was gram-positive, rod-shaped and spore-forming bacteria; its surface was smooth and glazed. From the results of the assimilation test of 46 different biochemicals by the Vitec 2 Compact test and comparison of the cellular wall composition of fatty acid by the data bank of Midi Sherlock system, the microorganism was identified as *Bacillus subtilis*. D-value of the *B. subtilis* spore was 4.85 min at 115°C, 0.69 min at 121°C and 0.48 min at 125°C; Z-value was 9.71. The *Bacillus subtilis* growth was not observed below water activity of 0.92 at 45°C. However, bacteria growth increased gradually as water activity increased above 0.93.

**Key words:** adzuki ann, red bean paste, *Bacillus subtilis*, D-value, Z-value

#### 서 론

팥(小豆·赤豆; small red bean, adzuki bean, *Vigna angularis* W.F. WIGHT)의 식물학적 기원은 분명히 밝혀져 있지 않지만, 팥이 중국, 한국, 일본 등 동양의 온대지방에서만 재배되어온 점으로 미루어 보아 동양이 원산임은 분명하다고 하며, 특히 중국에서는 재배 역사가 오래되어 2,000년 전부터 재배되었다고 한다.

종실은 보통 원형에 가까운 것이 많지만 구형 또는 타원형에 가까운 것도 있다. 색은 주로 적색이지만 흑색, 회백색, 크림색, 담록색, 담황색 및 갈색인 것도 있다(1). 팥의 영양성분은 탄수화물은 56.6%, 단백질이 21.4%, 지질 0.6%, 섬유질이 3.7%, 회분 3.2%, 칼슘 124 mg, 인 413 mg, 철 5.2 mg 함유되어 있다. 그 밖에 K, P이 많고 Ca, Na은 적게 들어 있으며 비타민 B1이 많이 들어 있고 그 외 비타민류는 그리 많은 편이 아니다. 특수성분으로는 0.3% 가량의 saponin이 들어 있다(2).

최근에는 식생활의 서구화로 인해 빵류를 주식대용으로 소비하는 경향이 증가하고 있다(3). 빵의 종류는 매우 다양하며 많은 종류의 빵 안에는 소를 넣고 있다. 소는 주로 팥앙금을 널리 이용하고 있는데 빵 소비량의 증가에 따라 팥앙금의 수요도 늘어나고 있다. 팥앙금은 팥을 주원료로 하여 당

을 첨가한 제품으로 원료 팥이 앙금의 품질에 크게 영향을 미친다(4).

일본의 앙금 제조에 관한 미생물관리 연구동향을 살펴보면 팥앙금 중 반제품의 하나인 물앙금은 수분이 많고, 변질되기 쉬운 식품이기 때문에 장기간에 걸쳐 보존이 곤란하며, 이것이 앙금 제조업의 대량생산화를 방해하는 원인으로 보고되었다. 시판되는 물앙금은 수분 59.6~67.2%, 섬유질 2.37~8.75%, 세균수  $2.8 \times 10^4 \sim 1.2 \times 10^7$  CFU/g 수준으로 제품이 출시되고 있으며, 부패취의 원인균은 유산균이고 제조공정으로부터 2차 오염에 의해서 발생한다고 하였다(5). 또한, Hwang 등(4)은 팥앙금으로부터 변질균을 분리한 바도 있다.

우리나라에서 팥앙금의 유통 형태는 보존성이 좋은 가당 조림앙금이 대부분 유통되고 있으며, 가당 조림앙금은 당도, 사용하는 당의 종류에 따라 water activity가 다르기 때문에 팥 원료두에 부착되어 있는 내열성 아포균이 잔존하여 water activity에 따라 증식이 되고, 가공공정의 여러 단계를 거치면서 미생물에 오염되어 제품 변질의 원인이 되고 있다. 따라서 본 실험은 이러한 변질 제품에서 미생물을 분리하여 그의 특성 및 내열성, Aw의 안정성에 대한 조사를 실시하여 앙금 제품의 보존성 향상을 위하여 수행하였다.

<sup>†</sup>Corresponding author. E-mail: leetkyoo@hanmail.net  
Phone: 82-63-290-1437, Fax: 82-63-290-1530

## 재료 및 방법

### 팥앙금 부패균의 분리 및 동정

팥앙금은 (주)대두식품에서 2005년 7월~8월에 생산되어 변질된 통팥앙금(5 kg, 나일론+폴리에틸렌 포장)을 사용하였다. 균의 분리에 사용된 배지는 Nutrient agar와 Nutrient broth(Oxoid사, Basingstoke, Hampshire, England)를 사용하였다. 부패된 팥앙금에서 부패를 일으키는 균주를 멸균 생리식염수에 희석하여 Nutrient agar에 접종한 다음 35°C 항온기에서 24시간 배양한 후 생성된 colony를 따내어 몇 차례 분리과정을 거쳐 콜로니 모양과 색 및 현미경관찰을 근거로 순수 분리되었음을 확인하였다. 분리된 균주는 현미경을 통한 형태적, Gram 염색을 포함한 미생물 동정 System인 VITEK 2 COMPACT(bioMerieux, Marcy l'Etoile, France)를 사용(6), 균의 농도를 2 McF로 맞추고 BCL 카드를 이용하여, 46개의 생화학적 반응을 조사 비교함으로써 동정하였고, 또한 TSA(tryptic soy agar)에 streaking하여 37°C에서 24시간 배양하고 그 집락을 긁어 Midi sherlock 시스템의 방법(7)에 준해 일련의 유도화 과정을 행하여 gas chromatography로 세포벽에 함유된 지방산의 조성을 측정하여 Midi Sherlock 시스템의 표준 균주의 자료 및 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology(8)와 비교 분석을 통하여 균주의 속과 종을 동정하였다.

### 주사현미경(SEM) 관찰

Petri-dish에서 18시간 배양한 균주를 2.5% para-formaldehyde-2.5% glutaraldehyde(4°C, phosphate buffer, pH 7.2) 전고정액에서 2시간 동안 침지하고, 0.1 M 인산완충액(pH 7.2, 4°C)으로 10분씩 3회 세척한 다음, 1% OsO<sub>4</sub>(25°C, 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2)에서 2시간 동안 후 고정하였다. 고정이 끝난 시료는 동일 완충액으로 2~3회 세척한 다음, ethanol 농도를 고농도에서 저농도로 순차적으로 20분씩 탈수하였다. 또한 propylene oxide(spurr's low viscosity 사용)를 사용하여 동일한 탈수 절차를 반복하였다. 다음 탈수 처리한 시료에 isoamyl acetate를 첨가하고 critical point dryer로 완전 건조시킨 후 SC<sub>5</sub>O<sub>2</sub> sputter coater를 이용하여 도금한 다음 주사현미경(S4700, Hitachi, Tokyo, Japan)으로 20 kV에서 관찰하였다(4).

### 열저항성 시험

팥앙금에서 순수 분리한 균주를 Nutrient broth 배지에서 35°C, 24시간 배양한 후 4°C에서 3~4일 냉장 보관하여 포자를 생성시켰다(9). 균체를 0.85% saline 용액 10 mL로 희석하여 TDT 시험관에 초기균수가 10<sup>7</sup>~10<sup>8</sup> CFU/mL 되게 1 mL씩 분주하고 화염 밀봉하였다(10). 화염 밀봉한 포자현탁액 ampule을 항온유조(oil bath, Daeyung, Korea)에 넣고 115°C에서 5, 10 및 15분간 열처리하였으며, 121°C에서는 1분, 2분, 3분간, 125°C에서는 1분, 2분, 3분간 열처리하고 흐

르는 물에 급속히 냉각시킨 후 Nutrient agar에 접종하여 35°C 항온기에서 배양한 후 생균수를 측정하여 생존 포자수를 산출하였다. D-value(decimal-reduction time)는 각 온도에서 미생물의 농도를 1/10로 감소시키는데 필요한 시간으로서 성장곡선의 직선적 부분, 즉 1차 함수적으로 감소하는 범위에서 시간을 구하였다. Z-value는 3개의 D-value를 이용하여 직선 회귀방정식을 구한 뒤 D-value가 1 log cycle 감소하는데 필요한 온도의 변화를 구하였다(11-13).

### 수분활성도(Aw)의 영향

수분활성도에 따른 균의 증식 양상을 보기 위하여 glycerol을 Nutrient broth에 첨가하면서 수분활성도 측정기(Novasina Humidat IC, Swiss)를 사용하여 수분활성도를 0.88, 0.90, 0.92, 0.94로 조절하였다. 수분활성도를 조절한 nutrient broth-glycerol 배지에 균을 접종하여 25°C, 35°C, 45°C에서 96시간 배양하면서 24시간마다 표준한천배지에 표준한천배양법(14)으로 생균수를 계수하였다.

## 결과 및 고찰

### 팥앙금 부패균의 형태적 및 생리적 특성

부패된 팥앙금에서 분리된 균주의 형태적 및 생리적 특성을 조사한 결과는 Table 1과 같다. 그람양성의 막대형으로 포자를 형성하고 형성된 집락은 원형으로 점질성의 물질을 생산하는 mucoid type이었으며, 표면은 smooth 하였고 광택을 나타내었다. 호기성 세균으로 catalase positive, utilization citrate, gelatin hydrolysis, starch hydrolysis, Voges-Proskauer reaction에 양성으로 조사되었으며, Bergey's

**Table 1. Morphological and physiological characteristics and fatty acid composition of cell walls of the strain isolated from spoiled sweetened adzuki ann**

Characteristics	Results
Morphological characteristics	
Gram staining	+ <sup>1)</sup>
Shape	rod
Spore formation	+
Mobility	+
Physiological characteristics	
Catalase	+
Utilization citrate	+
Gelatin hydrolysis	+
Starch hydrolysis	+
Voges-Proskauer reaction	+
Fatty acids composition <sup>2)</sup>	
15:0 iso	20.21%
15:0 ante	35.06%
16:0	2.71%
17:0 iso	20.16%
17:0 ante	14.24%

<sup>1)</sup>90% or more of strain are positive.

<sup>2)</sup>By MIDI sherlock systems.

Manual of Determinative Bacteriology와 비교한 결과 *Bacillus subtilis*의 유연군주로 생각된다.

균의 형태를 관찰하고자 1차 gram staining하여 주사전자 현미경을 통하여 본 결과는 Fig. 1과 같다. Fig. 1에서와 같이 균의 형태가 간균으로 나타났으며, Table 1의 결과와 일치함을 알 수 있었다.

#### 균주의 동정

미생물 동정 시스템인 VITEK 2 COMPACT를 이용하여 분리된 균주의 46가지 생화학적 반응을 조사 비교한 결과는

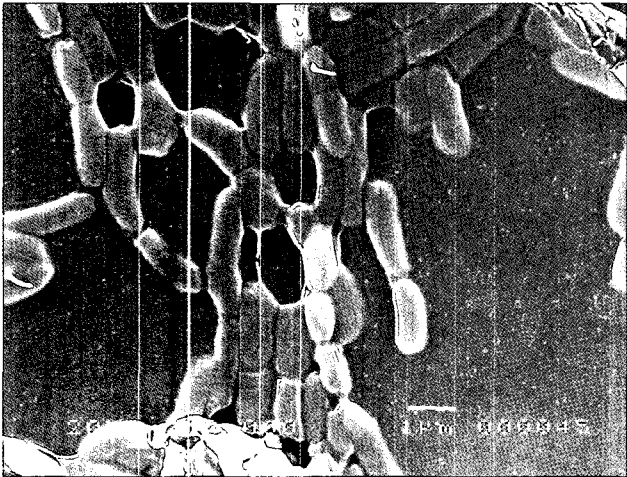


Fig. 1. Scanning electron micrograph of *Bacillus subtilis* isolated from spoiled sweetened adzuki ann (20 kV).

Table 2와 같다. 상기 형태적, 생리적 특성과 VITEK 2 COMPACT 결과 팔앙금의 부패 원인균은 *Bacillus subtilis*로 97.0%의 identify를 보였다. Table 1은 보다 더 정확한 동정을 위하여 부패균의 세포벽 지방산 조성을 분석한 결과 인데 Midi sherlock 시스템의 data bank와 비교 분석 시 그 유사성이 0.724임을 보여주며, VITEK 2 COMPACT 결과로 분석한 균과는 유의차가 없이 동정되었다.

본 연구에서 분리된 균주는 Natio(5)가 팔물앙금에서 분리 동정한 *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus polymyxa*의 5가지 균주중의 하나인 *Bacillus subtilis*와 같은 균이었지만, Hwang 등(4)이 팔앙금에서 분리 동정한 *Bacillus stearothermophilus*와는 다른 균으로 생각된다.

#### 수분활성도의 영향

균의 수분활성도에 따른 생균수의 변화를 관찰하기 위하여 25°C, 35°C, 45°C에서 96시간 배양한 결과 25°C에서는 균이 증식되지 않았고, 35°C에서는 수분활성도 0.94에서만 약간 증식되었지만 45°C에서는 균이 활발히 증식하였다(Fig. 2). Fig. 2에서 보는 바와 같이 24시간 이내 1 log cycle 정도 감소한 후 다시 증가하는 경향을 보이니 수분활성도 0.92 이하에서는 증가되지 않는 것으로 조사되었다. 특히, 45°C 배양시 수분활성도 0.94 조건에서는 균수가 계속적으로 증가하는 경향을 보였다.

일반적으로 세균의 최저 수분활성도가 0.91(15)인 점을 고

Table 2. Characteristics of biochemical utilization<sup>1)</sup> of the isolated strain

Biochemical	Results	Biochemical	Results
Beta-Xylosidase	+	D-Mannitol	+
L-Lysine-arylamidase	-	D-Mannose	+
L-Aspartate arylamidase	(+) <sup>2)</sup>	D-Melezitose	-
Leucine arylamidase	+	N-Acetyl-D-glucosamin	-
Phenylalanine arylamidase	+	Palatinose	+
L-Proline arylamidase	-	L-Rhamnose	-
Beta-Galatosidase	+	Beta-Glucosidase	(-) <sup>3)</sup>
L-Pyrrolydonyl-arylamidase	+	Beta-Mannosidase	-
Alpha-galatosidase	+	Phosphoryl choline	-
Alanine arylamidase	-	Pyruvate	+
Tyrosine arylamidase	+	Alpha-Glucosidase	+
Beta-N-Acetyl-glucosaminidase	+	D-Tagatose	-
Ala-Phe-Pro arylamidase	-	D-Trehalose	+
Cyclodextrine	+	Inulin	+
D-Galactose	-	D-Glucose	+
Glycogene	+	D-Ribose	(+)
myo-Inositol	+	Putrescine assimilation	-
Methyl-A-D-glucopyranoside	+	Growth in 6.5% NaCl	+
Ellman	+	Kanamy Cin resistance	-
Methyl-D-xyloside	-	Oleandomy Cin resistance	-
Alpha-Mannosidase	-	Esculin hydrolyse	+
Maltotriose	+	Tetrazolium red	+
Glycine arylamidase	+	Plomixin-B resistance	-

<sup>1)</sup>VITEK 2 COMPACT was used.

<sup>2)</sup>Weak positive. <sup>3)</sup>Weak negative.

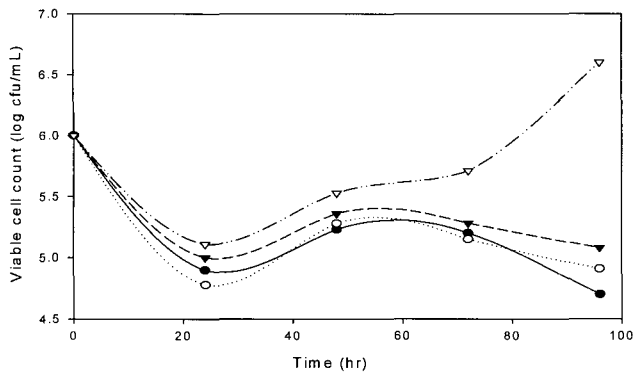


Fig. 2. Changes of total viable cell population of *Bacillus subtilis* isolated from spoiled sweetened adzuki ann in various water activity ( $A_w$ ) for 96 hr at 45°C.

●-,  $A_w$  0.88; ○-,  $A_w$  0.90; ▼-,  $A_w$  0.92; ▽-,  $A_w$  0.94.  
 려해 볼 때 팥앙금에서 분리한 변질 원인균인 *Bacillus subtilis*는 수분활성도 0.94에서는 균이 증식하기 양호한 조건으로 생각된다. 앙금 제품을 실온에서 유통할 경우 세균의 성장이 어려운 25°C 이하로 유통하거나 혹은 25°C 이상으로 유통할 경우에는 수분활성도를 0.92 이하로 조정하여 유통하는 것도 변질을 예방할 수 있을 것으로 사료된다.

포자의 열저항 특성

팥앙금 부패균으로 확인된 *B. subtilis*의 가열 온도에 따른 사멸 곡선을 나타낸 D-value와 Z-value는 Fig. 3, 4와 같다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 가열온도가 상승함에 따라 균주의 사멸율이 급격히 증가하였고, 같은 온도에서도 가열시간이 길어짐에 따라 균주의 사멸율이 크게 증가함을 알 수 있었다. 115°C, 121°C 및 125°C에서 포자의 열파괴에 대한 선형 회귀 방정식은 115°C에서는  $Y = -0.206X + 6.45 (R^2 = 0.9923)$ , 121°C에서는  $Y = -1.439X + 7.855 (R^2 = 0.9977)$ , 125°C에서는  $Y = -2.044X + 7.88 (R^2 = 0.9376)$ 를 나타내었다. 115°C에서 균의 D-value는 4.85분, 121°C에서는 0.69분, 125°C에서는 0.48분이었다. 이러한 결과는 Adul Ghani 등(16)과 Stumbo(17)가 보고한 저산성식품에서 *B. stearothermophilus*의 121°C에서의 D-value 4~5분, Hwang 등(4)이 변질 팥앙금에서 분

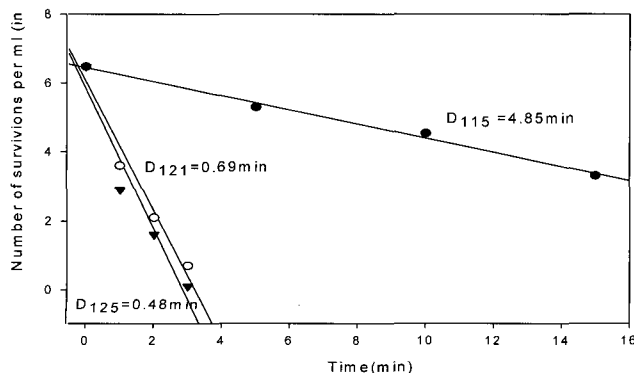


Fig. 3. Survival curves for *Bacillus subtilis* spores isolated from spoiled sweetened adzuki ann at 115, 121, and 125°C. ●-, 115°C; ○-, 121°C; ▼-, 125°C.

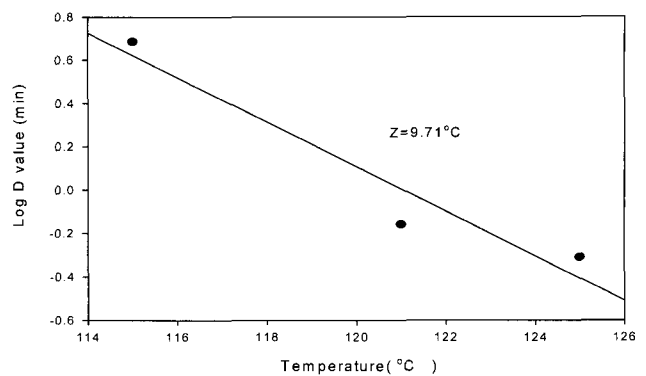


Fig. 4. Thermal death time curve of *Bacillus subtilis* isolated from spoiled sweetened adzuki ann.

리한 균주인 *B. stearothermophilus* 121°C에서의 1.69분에 비하여 작은 값을 나타냈다. Fig. 3의 결과로부터 얻은 결과를 이용하여 Z-value를 알기 위해 온도에 따른 D-value의 변화를 나타낸 결과는 Fig. 4와 같다. Fig. 4에서 보는바와 같이 Z-value에 대한 직선 회귀식은  $Y = -0.1029X + 12.455 (R^2 = 0.9308)$ 이다. 이 직선식으로부터 D-value를 1 log cycle 변화시키는데 소요되는 온도인 Z-value는 9.71°C였으며, 이 값은 Condon 등(18-20)이 *Bacillus subtilis*의 Z-value를 9.1°C라고 보고한 것과 유사하였다.

요 약

변질된 팥앙금에서 분리한 균주는 광학 및 전자현미경을 통하여 관찰한 결과 그람양성 간균으로 포자를 형성하고 형성된 집락은 원형으로 점질성의 물질을 생산하는 mucoid type이었으며, 표면은 smooth 하였고 광택을 나타내었다. 미생물 동정 시스템(MicroLog™ System, Release 4)인 VITEK 2 COMPACT을 이용하여 분리된 균주의 46개의 생화학적 분석을 비교한 결과 팥앙금의 부패 원인균은 *Bacillus subtilis*로 동정(97.0%)되었으며, 보다 더 정확한 동정을 위하여 부패균의 세포벽 지방산 조성을 분석하여 Midi sherlock 시스템의 data bank와 비교 분석시 그 유사성이 0.724로 분석되었다. *Bacillus subtilis*의 포자의 D-value는 115°C에서의 4.85분이었고, 121°C에서는 0.69분, 125°C에서는 0.48분이었으며, Z-value는 9.71°C이었다. 45°C에서 수분활성도에 따른 분리균의 생육 상태를 관찰한 결과 수분활성도 0.92이하에서는 균이 증식되지 않았고, 0.94에서는 증식되는 것으로 관찰되었다.

문 헌

1. Cho JY. 1986. 田作. Hyeomunsa Press, Seoul, Korea. p 330-332.
2. Song JC. 2000. Food Material. Kyomunsa, Seoul, Korea. p 247-248.

3. Kim CS, Chung SK, Oh YK, Kim RY. 2003. Antimicrobial activity of green tea against microorganism in steamed bread. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 413-417.
4. Hwang CS, Kim HH, Oh BC, Kim YS, Shin DH. 2004. Identification and characteristics of microorganism isolated from spoiled red bean paste. *Food Sci Biotechnol* 13: 758-761.
5. Natio S. 1996. あんの製造に関する微生物管理について. *J Japanese Soc Food Engineering* 16: 160-171.
6. Wallet F, Lóiez C, Renaux E, Lemaitre N, Courcol RJ. 2005. Performances of VITEK 2 colorimetric cards for identification of gram-positive and gram-negative bacteria. *J Clin Microbiol* 43: 4402-4406.
7. Yoon SH, Kim JB, Lim YH, Hong SR, Song JK, Kim SS, Kwon SW, Park IC, Kim SJ, Yeo YS, Koo BS. 2005. Isolation and characterization of three kinds of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* JKK238 from Jeot-Kal of Korea traditional fermented fishes. *Kor J Microbiol Biotechnol* 33: 295-301.
8. John GH, Kreig NR, Sneath PHA. 1994. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 9th ed. Williams & Wilkins, MD, USA.
9. Fernandez PS, Go'mez FJ, Ocio MJ, Rodrigo M, Sanchez T, Martinez A. 1995. D value of *Bacillus stearothermophilus* spores as a function of pH and recovery medium acidulant. *J Food Prot* 58: 628-632.
10. Koo YJ, Lee SD, Shin DH, Yu TJ. 1981. Studies on thermal resistance of selected yeast strain for parsterilization of solid packed peach. *Korean J Food Sci Technol* 13: 43-52.
11. Hur JK, Lee SJ, Oh SJ, Kim SK, Baek YJ. 1993. Physiology characteristics and heat resistance of yeasts isolated from stirred yogurt. *Korean J Dairy Sci* 15: 56-65.
12. Doores S, Westhoff D. 1981. Heat resistance of *Sporolactobacillus inulinus*. *J Food Sci* 46: 810-812.
13. Shull JJ, Cargo GT, Ernst RR. 1963. Kinetics of activation of thermal death of bacterial spores. *Appl Microbiol* 11: 485-487.
14. Lee KH, Chang KH. 1961. Studies on thermal resistance bacteria. (Part. 1) On the thermal resistance of aerobic bacteria. *J Kor Microbiol* 3: 11-14.
15. Kim DY, Kwon YJ, Yang HC. 1990. *Food Chemistry*. Youngmunhwasa Press, Seoul, Korea. p 27.
16. Adul Ghani AG, Faird MM, Chen XD. 2002. Theoretical and experimental investigation of the thermal inactivation of *Bacillus stearothermophilus* in food pouches. *J Food Engineering* 51: 221-228.
17. Stumbo CR. 1973. *Thermobacteriology in food processing*. 2nd ed. Academic Press, New York. p 113.
18. Condo'n S, Palop A, Raso J, Sala FJ. 1996. Influence of the incubation temperature after heat treatment upon the estimated heat resistance value of spores of *Bacillus subtilis*. *Lett Appl Microbiol* 22: 149-152.
19. Condo'n S, Lopez P, Oria R, Sala FJ. 1989. Thermal death determination: design and evaluation of a thermoresistometer. *J Food Sci* 54: 451-457.
20. Yokoya F, York GK. 1965. Effect of several environment conditions on the "thermal death rate" of endospores of aerobic, thermophilic bacteria. *Appl Microbiol* 13: 993-999.

(2006년 9월 11일 접수; 2006년 10월 16일 채택)