



식중독을 유발하는 독소와 제어 - 바실러스 세레우스의 설사형 독소와 구토형 독소

Biotoxins Involved in Foodborne Disease and Their Control Enterotoxins and Emetic Toxin of *B. cereus*

김미경*, 최재천¹
Mi-Gyeong Kim*, Jae Chun Choi¹

식품의약품안전평가원 영양기능연구팀, ¹서울지방식품의약품안전청 유해물질분석과
Nutrition & Funtional Food Research Team, National Institute of Food& Drug Safety Evaluation
¹Test & Analysis Team, Seoul Regional Food and Drug Administration

I. 서론

1. 개요

*Bacillus cereus*는 내열성이 높은 내생포자를 생성하는 간균으로 주모성 편모를 가지고 있어서 운동성이 있는 그람양성의 통성혐기성균이다(1). 일반적으로, *B. cereus*는 토양 같은 자연계에 널리 분포하므로 식품에 혼입될 기회가 많아 농작물을 비롯한 유제품(2), 건조제품(3), 향신료(4), 식육 및 식육가공품, 유제품(5), 과일, 채소류 및 그 가공품, 즉석조리식품(6,7), 생선회 등(8)에서 많이 분리되고 있다. *B. cereus*가 속하는 *Bacillus* 속은 근거가 확실한 51종과 추가적인 몇 종으로 이루어져 있으며 34개의 type species로 분류되고 있다(1,9). 포자의 형태, 포자낭의 팽창유무에 따라 3개의 그룹으로 나뉘는데, *Bacillus* spp.의 모든

식중독 유발종은 group 1에 속하여 대표적인 식중독 원인균인 *B. cereus*도 포자낭이 팽윤되어 있지 않고 포자는 타원형이거나 원통형으로 세포의 중앙 또는 말단에 위치하고 있다. Group 1에 속하는 *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. anthracis* 등의 16S rDNA는 유사도가 매우 높아 PCR 방법으로 이들 균주간의 동정이 쉽지 않으며 이들 균주를 한 개의 종으로 묶어야 한다는 보고(10,11)도 있다. Endotoxin crystal의 유무에 따라 *B. thuringiensis*와 구별이 되며 운동성 및 rhizoid growth에 따라 *B. mycoides*와 구별되며 용혈성 및 운동성의 여부에 따라 *B. anthracis*와 구별이 된다고 보고(12)되어 있으며 분자역학적 분류실험방법 중 하나인 PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis)를 수행하여 *B. cereus*와 *B. anthracis*를 구별할 수 있다는 보고(13,14)도 있다.

*B. cereus*의 성장과 생존 특성은 매우 다양하여 저

Corresponding author: Mi-Gyeong Kim
Nutrition and Funtional Food Research Team, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation
5 NokBeon-dong, Eunpyung-gu, Seoul, Korea
Tel: +82-2-380-1666
Fax: +82-2-385-7081
email: angelmg@kfda.go.kr

온균은 4~5°C에서 성장할 수 있고 30~35°C에서는 성장할 수 없는 반면에, 중온균은 15°C와 50~55°C 사이에서 성장하며 최적성장온도는 30~40°C이다. 생존과 성장을 위한 최소한의 수분 활성도의 범위는 0.93이며(15), *B. cereus*가 견딜 수 있는 최대한의 염분 농도는 pH 6~7, 30~35°C의 조건에서 7%이다(16).

B. cereus 포자는 135°C에서 4시간 동안 가열하여도 견딜 수 있는 내열성을 가지고 있으나 균 자체는 63°C에서 30분, 100°C에서 1분 이내에 사멸이 가능하다. *B. cereus*는 *Clostridium perfringens*와 달리 음식물에서 쉽게 포자를 형성하며 *B. cereus*는 *Clostridium perfringens*보다 가열공정에서 생존할 가능성이 훨씬 높아 유통식품 중에서 검출될 확률이 높다.

2. *Bacillus cereus*의 독소 및 식중독

*B. cereus*에 의한 식중독은 이 균이 생산하는 독소에 의해 발생되는데, 이러한 독소는 설사형(diarrhoeal type)과 구토형(emetic type)으로 구분된다(표 1). 설사형의 경우는 8~16 시간의 잠복기를 가지며, 오염된 식품 섭취 후 소장에서의 영양세포의 생육 동안 생성된 다양한 설사형 독소에 의해 발병한다. 설사형 독소인 enterotoxin은 분자량이 5.5~6만의 고분자단백질

로서 약 17개의 아미노산으로 구성되어 있으며 장관 내에서 이 균이 증식함으로써 생산되며 trypsin에 의해서 분해되고 60°C, 20분간의 가열로 파괴되며 pH 변화에도 민감하다(17). 결찰장관내의 액체저류현상과 모세혈관의 투과성의 항진작용 등 다른 균이 생산하는 enterotoxin과 같은 생물활성을 갖는다(18,19). Enterotoxin에 의한 식중독 증상은 설사 및 어지럼증과 복통들이 일어나고 메스꺼움이 설사와 동반되기도 한다. 설사형의 경우에는 고기를 기본으로 하는 식사들과 스프, 채소, 푸딩과 소스 같은 다양한 음식과 관련되어 있는 것으로 알려져 있다(5). 설사형 독소(enterotoxin)는 대수증식기 후반에 생성되며 낮은 온도에서는 독소가 생산되지 않으며, 독소생산 최적온도는 30°C라고 보고되었다(20).

Hsieh 등(21)은 *B. cereus* group의 모든 균주에서 enterotoxin 중 한 가지는 반드시 존재하고 이들은 Chinese hamster ovary (CHO) 세포에 세포독성을 가지고 있어 식품에서 이들의 검출은 중요하다고 하였으며 또한 *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. thuringiensis* 균주 사이에 유사한 toxigenic profile을 발견하여 *B. cereus*보다는 모든 *B. cereus* group을 검출하는 것이 식품안전성 차원에서 중요하다고 하였다.

구토형의 경우는 수 시간 이내의 짧은 잠복기를 가지는데 식품에서 미리 형성된 작은 고리형 폴리펩타

표 1. Comparison of the two types of disease caused by *Bacillus cereus*(26)

	Diarrhoeal syndrome	Emetic syndrome
Infective dose	10 ⁵ -10 ⁷ (total)	10 ⁵ -10 ⁸ (cells/g)
Toxin produced	In the small intestine of the host	Preformed in foods
Type of toxin	Protein	Cyclic peptide
Incubation period	8-16 h (occasionally >24 h)	0.5-5 h
Duration of illness	12-24 h (occasionally several days)	6-24 h
Symptoms	Abdominal pain, watery diarrhoea and occasionally nausea	Nausea, vomiting, and malaise
Foods most frequently implicated	Meat products, soups, vegetables, pudding/sauces and milk/milk products	Fried and cooked rice, pastry, noodles



이드인 emetic toxin (cereulide)에 의해 발생되며 cereulide는 4개의 아미노산 또는 oxy-acid의 삼반복의 고리구조로 이루어져 있으며 이 고리구조는 한외여과막을 통과하는 분자량 1.2 kDa의 저분자펩타이드로, 화학적으로 potassium ionophore인 valinomycin과 매우 유사하다(22). Cereulide는 *B. cereus*의 정지기 동안 생성되며(23,24) 포자가 형성되기 직전인 정지기에도 도달하자마자 배양액에서 cereulide의 축적이 시작된다고 보고(25)되었으며 열, 산, 알칼리, 단백질 가수분해효소에도 저항력을 갖는다(26~28). 이러한 이유로 구토를 일으키는 독소가 더 쉽게 질병을 일으키며 주증상으로는 구역질, 구토, 위경련 등이 있으며, 쌀밥, 볶음밥, 스파게티 등의 곡류제품에 의한 것이 압도적으로 많은 것으로 보고되고 있는 등 전분질이 많은 식품에서 많이 생성된다(24,29). 또한 emetic toxin 생성은 계란이나 식육의 형태인 필수아미노산이 풍부한 전분질 식품에서 cereulide의 위해도가 증가된다는 보고도 있다(30). Emetic toxin은 산화적 인산화(oxidative phosphorylation)를 저해하여 미토콘드리아에 독성을 나타내며(22,31), 수핵지 정자의 운동성을 저해하며(32) 또한 emetic toxin을 생성하는 균주는 전분을 분해하지 않아서 salicin 발효능이 없다고 보고되고 있으며(23,33~35), hemolysin BL (Hbl)을 생성하지 않아서 설사원성 균주보다 더 작은 용혈환을 생성한다는 보고가 있다(32,34).

설사형 독소는 5 종류가 알려져 있는데 hemolytic enterotoxin(hemolysin BL, Hbl), nonhemolytic enterotoxin(Nhe), enterotoxin T(BceT), cytotoxin K(CytK), enterotoxin FM이 있다. 이 중 Hbl 및 Nhe는 세 가지 성분으로 된 독소로서 Hbl은 binding component B, lytic proteins L₁, L₂로 구성되어 있으며 각각 *hblA*, *hblD*, *hblC* 유전자에 의해 제어되며 Nhe는 A, B, C의 세 개의 단백질로 구성되어 있으며 *nheA*, *nheB*, *nheC* 유전자에 의해 제어된다.(26,36).

Enterotoxin T는 41 kDa의 단백질로서 식중독과 관련이 있는지 확실하지 않으나, Hbl, Nhe는 식중독 발생과 관련이 있다. Cyt K는 34 kDa의 독소로서 *Clostridium perfringens*의 β -toxin에 의한 식중독 증세와 유사하여 1998년 프랑스에서 발생한 심각한 *B.*

cereus 식중독 증세와 관련이 있다고 보고되어 있다(36).

Hbl과 Nhe 독소는 상용화된 키트로 확인할 수 있으며 BCET-RPLA kit(Oxoid, UK)는 Hbl의 L₂를 검출하며(38) *Bacillus diarrheal enterotoxin visual immunoassay kit*(BDE-VIA, Tecra International Pty Ltd., Australia)는 ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay) 원리를 이용하여 주로 Nhe의 41 kDa protein인 NheA를 검출한다(26).

한편, emetic toxin인 cereulide는 고리구조로 된 1.2 kDa의 dodecadepsipeptide[(D-o-leu-D-ala-L-o-val-L-val)₃]로서 규명(37)되었으며 gene product가 아닌, 비리보솜적으로 합성되는 것으로 보고되고 있다(22). 최근, 비리보솜 cereulide synthetase의 부분적 확인과 특징이 밝혀졌으며(39) cereulide는 미토콘드리아막에 ionophore로서 작용하며 산화적 인산화를 방해한다(22,31). Emetic toxin의 검출방법으로는 HEp-2 cell vacuolation assay, cell cytotoxicity assay (MTT assay), LC-MS, sperm motility inhibition assay 등이 있다(24,25,30,32,40).

3. 식중독 발생 현황

미국에서는 1988년부터 1992년까지 2,423건의 식중독사고가 발생하여 77,375명의 환자가 발생하였다. 그 중 *B. cereus*가 원인물질인 식중독은 21건, 433명의 환자가 발생하였으며 중국음식이 가장 흔한 원인이었다(41). 우리나라에서는 식품의약품안전청의 식중독 통계(42)에 따르면 *B. cereus*에 의한 식중독이 2001년 1건에 20명, 2003년 3건에 198명, 2004년 2건에 84명, 2005년 1건에 24명, 2006년 5건에 54명, 2007년 1건에 50명의 발생이 보고되었다(표 2).

*B. cereus*에 의한 식중독 증상은 각 나라별로 차이가 있는데, 일본의 경우 구토형이 설사형 보다 10배나 더 빈번하게 발생하는 반면 유럽과 북미에서는 설사형이 더 빈번하게 발생하는 것으로 보고되었으며(43) 이는 이들 국가에서 소비되는 식품과 조리습관차이 때문으로 보인다. 국내에서 *B. cereus*에 의한 식중독은 다른 식중독 원인물질에 비하여 발생건수 및 환자수가 적은 것으로 나타나 있지만 이는 *B. cereus*로 인한 식

표 2. Outbreaks of *B. cereus* food poisoning in Korea(42)

Year	Outbreaks	Regions	Patients	Cause
2004	2	Jeonbuk	11	ready to eat compound foods
		Jeonbuk	73	ready to eat compound foods
2005	1	Gyeonggi	24	grains and grain products
		Gyeongbuk	8	shellfish, eggs, vegetables
		Gyeonggi	21	shellfish, drinking water
2006	5	Ulsan	6	unknown
		Jeonnam	17	ready to eat compound foods
		Jeonnam	7	meats and meat product
2007	1	Gyeongbuk	50	unknown

중독 증세가 *Staphylococcus aureus*나 *Clostridium perfringens*와 유사하고 식중독 증세가 경미하여 보고 건수가 적기 때문인 것으로 사료되며 우리나라의 주식 이 쌀임을 감안하면 일본과 유사하게 emetic toxin에 의한 *B. cereus* 식중독이 많이 발생할 것으로 예상된다. 또한, 식품 중 *B. cereus*의 검출빈도가 다른 세균에 비하여 높으므로 노약자 등 건강취약계층이 증가하고 즉석편의식품의 섭취가 증가하고 있는 시점에서 이 균의 위험성은 간과할 수 없는 것으로 사료된다.

*B. cereus*에 의한 설사형 증상은 *Cl. perfringens* 식중독과 그 증상이 유사하고 음식을 섭취한 지 6~16시간 이후에 수인성 설사 및 어지러움과 복통 등이 일어난다. 또한 메스꺼움이 설사와 동반되기도 하지만 대부분 구토는 없으며 이 증상들은 24시간 정도 지속되다가 회복된다. 구토형의 증상으로는 1~5시간의 잠복기에 메스꺼움, 구토를 일으키지만, 가끔 심한 복통 및 설사를 일으키기도 하며 증상은 24시간 이내에 가라앉는다. 이 증상은 *Staphylococcus aureus*에 의해 발생하는 식중독 증상과 유사하다. *B. cereus* 식중독을 일으키기 위하여는 많은 균수가 요구되는데 발생과 관련된 식품에서 발견된 수는 설사형이 $5.0 \times 10^5 \sim 9.5 \times 10^8$ 이고 구토형은 $1.0 \times 10^3 \sim 5.0 \times 10^{10}$ 이었다. 현재 미국 FDA에서 식중독을 일으켜 건강에 해를 끼칠 수 있는 *B. cereus*의 균수를 10^6 CFU/g 이상이라고 밝히고 있으나 1×10^4 *B. cereus* 이상에 노출될 수 있는 식품에 대해서는 위험성이 고려되어야 하므로, 그람 당

10^4 *B. cereus*가 reference dose로 고려되어야 한다는 보고도 있다(41).

4. 식중독 치료 및 예방

B. cereus 식중독 환자는 경과도 양호하여 1일 이내에 회복되기 때문에 치료에 대하여는 그다지 중요시되고 있지 않다(9). *B. cereus*는 방어기구가 약해진 숙주에 패혈증, 폐렴, 심내막염, 수막염 등의 중증 기회주의적 감염을 일으키기도 하기 때문에 식중독 환자의 치료보다 *B. cereus* 감염증의 치료 쪽이 더 중요시되고 있다(9,44,45). 이 균은 β -lactamase를 생산하기 때문에(46) penicillin계 약제는 효과가 없을 뿐만 아니라 오히려 균교대증으로 인한 내성을 형성하기 때문에 clindamycin 또는 clindamycin과 gentamicin의 병용에 의한 화학요법을 이용하고 있다(9).

*B. cereus*는 원료에서 오염되는 것이 많기 때문에 자연환경 중의 상재세균 중의 하나인 이 균의 식품오염을 근본적으로 방지한다는 것은 현실적으로 불가능하며, 조리 등의 열을 가하여도 사멸하지 않고 포자형태로 존재하다가 성장하기 좋은 조건이 되면 빠르게 증식하여 병원성을 나타내기 때문에 식품 원료의 오염을 최소화하고, 열처리, pH, Aw, additive의 적절한 조합으로 생육을 조절하여야 하는 등 *B. cereus*의 관리가 절대적으로 필요하다.



5. 연구목적

최근 들어 식품산업의 발달과 위생관리기술의 향상에 불구하고 우리나라에서는 매년 식중독 발생사례가 증가하고 있는 추세에 있으며, 또한 과거에는 5~9월에 집중적으로 식중독이 발생하였으나, 최근에는 지구온난화 및 실내온도의 상승 등 환경의 변화로 계절에 관계없이 연중 발생하는 양상을 보이고 있다.

국내에서는 *B. cereus*로 인한 식중독이 다른 세균으로 인한 식중독에 비하여 많이 발생하는 편은 아니나 외국에서는 *B. cereus*로 인한 식중독으로 사망사고도 적지 않게 일어나고 있으며(36,47,48) 근래 웰빙의 영향에 따라 저온살균, 날로 섭취하는 식품이 증대됨에 따라 포자를 생성하는 호기성균인 *B. cereus*로 인한 식중독이 증가할 것으로 예상된다.

따라서 본 연구는 국내유통식품에서 분리한 *B. cereus*의 설사형 독소(enterotoxin) 생성능을 조사하는 한편, 쌀을 주식으로 하는 식생활로 인하여 구토형 식중독의 위험성이 상대적으로 높은 편이므로 구토형 독소(emetic toxin) 확인 및 정량을 위하여 LC/MS/MS를 이용한 분석법을 확립하였다. 온도 및 시간에 따른 enterotoxin 및 emetic toxin의 생성능 조사 및 독성정보를 확보함으로써 유통 중 식품에 오염된 *B. cereus*의 생육으로 인한 식중독 발생의 위험을 과학적으로 관리하고 예방하기 위한 방안을 제시하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. *Bacillus cereus*의 분리 · 동정

다양한 식품에서 분리한 *B. cereus* 257균주 및 표준균주 12주를 함께 사용하여 실험하였다. 표준균주로는 한국생명공학원에서 분양받은 *B. cereus* KCTC 1094, KCTC 1092, KCTC 1013, KCTC 3624, KCTC 1014와 American Type Culture Collection (ATCC)에서 분양받은 ATCC 53522, ATCC 14579, ATCC 14893을 사용하였으며 식중독 환자의 구토물에서 분리한 F 4810/72 균주(49)를 중앙대학교에서

제공받아 emetic toxin 양성균주로 사용하였다.

2. *Bacillus cereus*의 분리(50)

시료 25 g을 멸균된 stomacher bag에 취하여 멸균 생리식염수 225 ml을 가하고 균질화한 시험용액을 Mannitol egg yolk polymyxin agar (MYP ; Oxoid, UK)에 도말한 후 30°C에서 24~48시간 동안 배양한다. 배양 후, 혼탁한 환을 가지는 분홍색의 전형적인 집락을 선택하여 rhizoid growth를 보이지 않는 균주들을 분리하여 BBL Crystal GP (BD, USA)로 확인 시험을 하였다. BBL Crystal GP에서 확인된 *B. cereus*는 API 50CHB (BioMerieux, France)를 사용하여 49개의 당발효능을 조사하였고, API 20E (BioMerieux, France)를 이용하여 12가지의 추가적인 생화학적 시험 후, apiweb (<https://apiweb.biomerieux.com>)상에서 동정하였다.

3. PCR을 이용한 독소유전자 검출

1) PCR을 이용한 enterotoxin 유전자 검출 시험

각각의 균주를 tryptic soy broth (TSB)에서 18시간 동안 배양시켜 얻은 균액 1.5 ml를 원심분리(14,000 rpm, 10분, 4°C)하여, 상등액을 버리고 침전물을 멸균 증류수 100 µl로 현탁시켜 95°C에서 20분간 가열한 후 다시 원심분리(14,000 rpm, 10분, 4°C)하여 상등액을 PCR의 DNA template로 사용하였다. Enterotoxin 생산을 유도하는 유전자로서, Hbl 독소 단백질 복합체를 coding하는 *hblA*, *hblC* 및 *hblD*의 3개의 유전자와 Nhe 독소 단백질을 coding하는 3개의 유전자인 *nheA*, *nheB* 및 *nheC* 그리고 그 외 *cytK*, *bceT* 및 *entFM* 등 총 9개의 유전자 검출 시험을 수행하였다(51). *bceT*를 제외한 8개의 enterotoxin 유전자 검출을 위하여 *nheB* 등 4종의 유전자를 확인하는 set A와 *entFM* 등 4종의 유전자를 확인하는 set B의 두 종류로 구성된 multiplex PCR을 수행하였다. 각 유전자 검출을 위한 primer에 대한 염기서열 및 PCR 산물의 크기 등은 표 3에 요약하였다. *bceT* 검출을 위하여 BceT detection kit (Kogene Biotech, Korea)

표 3. PCR primers for detection of enterotoxin gene used in this study

Group	Target Gene	Primer	Primer Sequence(5'-3')	Size (bp)	Ref.
Set A	<i>nhe B</i>	BA-NheB-F	5'-GTCGGATACGCAAAACTTCA-3'	209	Lee <i>et al.</i> , 2006
		BA-NheB-R	5'-GCGCCCGTAGCAATAAC-3'		
	<i>nhe C</i>	BA-NheC-F	5'-GCTGGGGTGGCAACGAG-3'	414	
		BA-NheC-R	5'-TCCGCTTTTAATTTTCCACTATCC-3'		
	<i>hbl A</i>	BA-HblA-F	5'-GATTAATACAGGGGATGGAGAAAC-3'	501	
		BA-HblA-R	5'-CTGCGTGGACATATAAGTAAGAGC-3'		
<i>hbl D</i>	BA-HblD-F	5'-GACCGCTCAAGAACAAAAGTAGG-3'	738		
	BA-HblD-R	5'-GCGCCAAGAGCCGAGAGT-3'			
Set B	<i>ent FM</i>	BA-entFM-F	5'-CAAAGACTTCGTAACAAAAGGTGGT-3'	290	KCDC
		BA-entFM-R	5'-TGTTTACTCCGCCTTTTACAAACTT-3'		
	<i>hbl C</i>	BA-HblC-F	5'-CCTATCAATACTCTCGCAACACCAAT-3'	386	
		BA-HblC-R	5'-TTTTCTTGATTCGTCATAGCCATTTCT-3'		
	<i>nhe A</i>	BA-NheA-F	5'-ATTACAGGGTTATTGGTTACAGCAGT-3'	475	
		BA-NheA-R	5'-AATCTTGCTCCATACTCTCTTGGATGCT-3'		
	<i>cytK</i>	BA-cytK-F	5'-ATCGGGCAAATGCAAAAACACAT-3'	800	
		BA-cytK-R	5'-ACCCAGTTTGCAAGTCCGAATGT-3'		
<i>bceT</i>	KFB 101-4	unknown	303		

을 사용하였다.

2) PCR을 이용한 emetic toxin 유전자 검출 시험

각 균주들의 emetic toxin 유전자 검출을 위하여 *Bacillus cereus* (CRS gene) PCR detection kit (Takara, Japan)을 사용하여 PCR을 실시하였다. Cereulide nonproducing strain은 cereulide synthetic (CRS) gene이 결여되어 있으므로 이 kit는 *B. cereus*와 *B. cereus* group에 속하는 *B. thuringiensis*와 *B. anthracis*의 cereulide를 생성하는 균주를 검출할 수 있으며 lecithinase gene까지 동시에 검출이 가능하다. DNA template는 enterotoxin 유전자 검출을 위한 PCR 시험을 위하여 추출된 DNA를 동일하게 사용하였다. PCR mixture 조성은 제조사의 지시에 따랐으며 PCR 증폭조건은 denaturation (95°C, 5분)→40 cycles<denaturation (95°C, 30초)/primer anneal-

ing (55°C, 30초)/DNA extension (72°C, 30초)→ final extension (72°C, 7분)로 하였다.

4. 면역학적 방법에 의한 enterotoxin 검출 시험

대표적인 전분함유식품인 김밥과 단백질 식품으로 근래에 들어 생식 섭취가 늘고 있는 두부를 시료로 선택하여 각각 10 g씩 무균적으로 절단한 후 미리 준비된 총 4개의 균주를 혼합한 현탁액을 김밥 및 두부에 100 µl씩 표면 접종하여 초기균(표 4)의 농도가 10³~10⁴ CFU/g이 되도록 하였다. 시료를 10, 20, 30, 37°C 등의 온도조건에서 일정기간 동안 보관하면서 *B. cereus*의 생육변화 및 독소 분석에 사용하였다.

온도별, 시간별로 채취한 김밥 및 두부로 BCET-RPLA, BDE-VIA kit, LC/MS/MS로 실험하여 식품 종류, 저장온도 및 시간에 따른 enterotoxin 및 emetic toxin 생성능을 비교 검토하였다. BCET-RPLA를



표 4. *Bacillus cereus* strains used for growth modeling

Strain	Source	Enterotoxin profile						
		Nhe		Hbl		BceT	CRS	
		<i>nhe</i>	BDE-VIA	<i>hbl</i>	RPLA	<i>bceT</i>	<i>crs</i>	LC/MS/MS
ATCC 14579	ATCC	+	+	+	+	+	-	-
F 4810/72	Vomit from patient	+	+	-	-	-	+	+
M-114	Frozen foods	+	-	+	+	+	-	-
M-343	Kimbab	+	+	-	-	-	+	+

수행하기 위해서는 제조사의 지시에 따라 배양시간별 시료 10 g을 0.85% saline 10 ml에 잘 현탁하고 원심분리 (900 g, 30분, 4°C)한 후 상등액을 필터하여 실험에 사용하였다. BDE-VIA를 수행하기 위해서는 제조사의 지시에 따라 배양시간별 시료 10 g을 20 ml Tris buffer에 3분간 현탁하고 원심분리 (3000 g, 10분, 4°C)한 후 상등액을 필터하여 5 ml를 취한 후 50 µl의 sample additive를 첨가하여 pH 7, 8로 조정된 후 실험에 사용하였다.

5. LC/MS/MS에 의한 emetic toxin 검출 시험

Emetic toxin의 검출방법으로는 cell cytotoxicity assay(MTT assay)(40), sperm motility inhibition assay(30,32), LC/MS(25,52,53)등이 있으나 동물세포와 정자를 이용한 실험은 번거로울 뿐만 아니라 LC/MS에서는 emetic toxin이 극미량 존재할 경우 정확한 정량이 어렵다고 사료되어 LC/MS/MS에 의한 emetic toxin의 확인 및 정량을 실시하였다. 김밥 등 고형검체에 emetic toxin 생성 균주를 접종한 후 각 온도별, 시간별로 배양하면서 검체 10 g을 취하여 20 ml의 메탄올에 첨가하여 균질화하였다. 상등액 5 ml를 질소가스하에서 휘발시키고 잔여물은 1 ml 메탄올로 녹인 후 분석할 때까지 -20°C에서 보관하였다(40).

Emetic toxin에 대한 스크리닝 방법으로 MRM (multiple reaction monitoring) 모드를 이용한 LC/MS/MS 방법을 확립하여 *B. cereus*로 인한 구토형 식중독의 원인인 emetic toxin을 신속하게 미량까지 검출가능하게 하였다.

1) 표준용액의 제조 및 회수율 시험

Emetic toxin인 cereulide는 상용화되어 있지 않고 위험성도 높으므로 분자구조적으로 유사한 depsipeptide인 valinomycin (Sigma, USA)을 표준품으로 사용하였으며, methanol에 녹여 10,000 ppb, 1,000 ppb, 100 ppb, 10 ppb, 1 ppb의 표준용액을 조제한 후 이를 검량선 및 회수율용의 working solution으로 사용하였다.

2) 시험용액의 조제 및 분석

분석에 있어 chromatograph는 Nanospace SI-2™ liquid chromatograph (Shiseido Co., Ltd, Yokohama, Japan)을 사용하였으며 LC와 연결된 tandem mass spectrometer (MS/MS)는 Finnigan TSQ Quantum Discovery MAX™ tandem mass spectrometer (Thermo Electron Corporation, San Jose CA, USA)를 각각 사용하였고 데이터 처리 및 기기 운영프로그램으로 TSQ Quantum™ 1.4 software를 이용하였다. LC/MS/MS의 기기 분석조건은 표 5에 나타내었다.

III. 결과 및 고찰

I. PCR을 이용한 독소 유전자 검출

1) PCR을 이용한 enterotoxin 유전자 검출

식품에서 분리된 총 257개의 *Bacillus cereus* 균주를 대상으로, *B. cereus*가 생산하는 5종의 enterotoxin, 9개의 enterotoxin 유전자 확인시험을 수행하였다.

표 5. LC/MS/MS' analytical conditions

Column	Cardenza CD_C18, 30*3 mm, 5 μ m, (Imtakt Coporation)			
Oven Temp	35°C			
Injection Volume	10 μ l			
Detector mode	Ionization mode	ESI	Spray discharge (V)	4,800
	Sheath gas (N ₂)	40 psi	Capillary temp.	350°C
	Aux gas (N ₂)	15 psi	Skimmer offset	10
	CID gas (Ar)	1.5 psi	Collision energy (V)	30~45
	Scan width	0.01 m/z	Scan time	0.005 s
	Polarity	positive		
Mobile Phase	A: 5 mM ammonium acetate in DW : ACN (1:9) B: 5 mM ammonium acetate in DW : ACN (8:2)			
Isocratic	A (95%) : B (5%)			
Flow rate	0.6 ml/min			

¹LC/MS/MS ; Liquid Chromatography Mass-Mass Spectrometry

9가지 독소 중 8가지 독소유전자확인시험을 두 개의 set로 나누어 multiplex PCR을 실시하였다. Multiplex PCR의 setA는 *hblD* (738 bp), *hblA* (501 bp), *nheC* (414 bp), *nheB*(209 bp)로 구성되며, setB는 *cytK* (800 bp), *nheA* (475 bp), *hblC* (386 bp), *entFM* (290 bp)으로 구성되며 해당되는 set의 유전자들에 상응하는 크기의 PCR 산물을 생성하는 primer로 PCR을 수행하였다. *bceT*는 상용화된 BceT detection kit (Kogene Biotech, Korea)를 사용하여 확인하였다.

본 연구에서 분리된 총 257개의 *B. cereus* 균주에 대하여 9종의 enterotoxin 유전자의 검출결과를 이용하여, 총 28개의 enterotoxin gene profile로 분류되어(표 6) enterotoxin 유전자의 다양성을 나타내었다. 식품에서 분리한 *B. cereus*와 식중독을 유발한 *B. cereus*의 enterotoxin profile을 비교한 연구결과를 보면 설사형 식중독을 유발한 균주는 *cytK*는 73%, *hbl-nhe-cytK* enterotoxin gene는 63%가 보유하고 있는데 반하여 식품분리균주는 *cytK* 37%, *hbl-nhe-cytK* enterotoxin 유전자는 33%가 가지고 있으며, 설사형 균주에 비하여 식품분리균주는 *nhe*, *hbl* gene polymorphism을 보이고 독소 발현이 되지 않는 것으로 보

고(55)되고 있어 국내식중독유발 *B. cereus*에서의 독소유전자 검출 정도와 독소 발현에 관한 연구 및 식품 분리균주와의 비교검토가 필요한 것으로 사료되었다.

2) PCR을 이용한 emetic toxin 유전자 검출

일반적으로 *B. cereus*는 β -용혈성을 가지고 있어서 혈액천배지 상에서 4 mm 정도의 두꺼운 용혈환을 생성하는 것으로 알려져 있으나 emetic toxin을 생성하는 균주는 용혈성이 거의 없거나 용혈환이 1~2 mm 정도의 약한 용혈성을 가진다는 보고(32,34)가 많다.

또한 emetic toxin을 생성하는 균주는 대부분 전분을 분해하지 못하는 것으로 알려져 있고 혈청형 시험결과 H1 형이 많은 것으로 보고되고 있으나(23,34,35) *B. cereus*의 H 항혈청은 상용화되어 있지 않다. *B. cereus* 식중독 또는 *B. cereus* 관련 임상문제를 조사하고자 할 때 영국의 Central Public Health Laboratory의 식품위생실험실에서만 편모(H)항원에 기초한 혈청형 시험이 이용되고 있어(56) 국내의 대부분의 실험실에서 항혈청 시험이 거의 이루어지지 않고 있다. Cereulide 생성균주는 용혈성이 낮고 salicin 발효 음성, 전분가수분해음성이라는 보고(23,32,33,34,35)가 많으나, Thorsen 등(57)은 전분가수분해양성인



표 6. Enterotoxin gene profiles of *B. cereus* isolated in this study

profile	Nhe			Hbl			entFM	cytK	bceT	Strain No.(%)
	nheA	nheB	nheC	hbIA	hbIC	hbID				
1	+ ^a	+	+	+	+	+	+	+	+	40 (15.6)
2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	11 (4.3)
3	+	+	+	+	+	+	+	-	+	28 (10.9)
4	+	+	+	+	+	+	+	-	-	5 (1.9)
5	+	+	+	+	+	-	+	+	+	2 (0.8)
6	+	+	+	+	+	-	+	-	+	3 (1.2)
7	+	+	+	+	+	-	+	-	-	2 (0.8)
8	+	+	+	-	-	-	+	+	+	12 (4.7)
9	+	+	+	-	-	-	+	-	+	3 (1.2)
10	+	+	+	-	-	-	+	+	-	5 (1.9)
11	+	+	+	-	-	-	+	-	-	14 (5.4)
12	+	+	-	-	-	-	+	-	-	3 (1.2)
13	+	-	-	+	+	+	+	-	+	3 (1.2)
14	-	+	+	+	+	-	+	-	-	2 (0.8)
15	-	+	+	-	-	-	+	-	-	6 (2.3)
16	-	+	+	+	-	-	-	-	+	3 (1.2)
17	-	+	+	+	-	-	-	-	-	2 (0.8)
18	-	+	+	-	-	-	-	-	-	3 (1.2)
19	-	+	-	+	-	-	+	-	+	3 (1.2)
20	-	+	-	-	-	-	+	-	+	2 (0.8)
21	-	+	-	-	-	-	+	-	-	8 (3.1)
22	-	+	-	-	-	-	-	-	+	4 (1.6)
23	-	+	-	-	-	-	-	-	-	24 (9.3)
24	-	-	+	-	-	-	+	-	-	5 (1.9)
25	-	-	-	+	-	-	+	-	-	2 (0.8)
26	-	-	-	-	+	-	+	-	-	3 (1.2)
27	-	-	-	-	-	-	+	-	-	5 (1.9)
28	-	-	-	-	-	-	-	-	+	6 (2.3)

*+ : A PCR product of expected size was seen.

- : No PCR product was formed.

Some toxin profiles were excluded in above table and each profile corresponded to only one strain.

cereulide를 생성하는 *B. weihenstephanensis*를 보고 하였다.

Emetic toxin은 NRPS (nonribosomal peptide

synthetase sequence)에 근거하여 cereulide gene을 target으로 하여 primer가 제작되어(58), PCR을 실시 하여 용이하게 emetic toxin 생성균주를 검출할 수 있

게 되었다. 본 실험에서는 *Bacillus cereus* (crs gene) PCR detection kit (Takara, Japan)을 사용하여 PCR 을 실시하였으며 동 kit는 emetic toxin 유전자 뿐만 아니라 lecithinase 유전자까지 검출할 수 있고 emetic toxin crs 유전자 증폭산물의 크기는 426 bp이고 lecithinase 유전자 증폭산물의 크기는 227 bp이다. 그림 1 에서와 같이 F 4810/72를 emetic toxin 양성 대조균주로 하여 실험한 결과, 식품에서 분리된 균주 중 총 14균주에서 emetic toxin 유전자가 검출되었다.

Emetic toxin 양성대조균주로 F 4810/72 균주를 사용하여 비교 실험한 결과, emetic toxin (cereulide) 생성균주는 전분가수분해음성으로 나타났고 용혈성은 없거나 2 mm 이하의 약한 용혈환을 생성하는 균주였으므로 전분가수분해능 및 용혈성 시험은 향후 emetic toxin 생성 균주검출을 위한 예비시험으로 사용하면 될 것으로 사료된다. 그러나 대부분 실험실에서 *B. cereus* 검출시험 시, 용혈성이 강한 *B. cereus* 집락이 우선 선택되기에 emetic toxin의 생성이 의심되는 *B. cereus* 를 검출하지 못하여 구토형 *B. cereus* 식중독발생을 인식하지 못한 점도 있었을 것으로 사료되어 *B. cereus* 검출시험을 할 때 MYP 한천배지 및 혈액한천배지를 동시에 사용하여 실험하는 방법이 강구되어야 할 것이다(59). Emetic toxin 유전자가 검출된 식품유형은 원료육 2건, 장류 2건, 장류가 포함된 즉석반찬 5건, 김

밥 1건, 소스류 2건, 비가열과실채소류음료 1건으로 바로 섭취할 수 있는(Ready to eat ; RTE) 제품의 비율이 높아 RTE 제품에 관한 식중독균 관리가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료되었다.

3. 면역학적 방법에 의한 enterotoxin 검출

응집반응을 이용하여 용해성 항원인, hemolytic enterotoxin 생성 유무를 확인하는 BCET-RPLA를 수행한 결과, 총 257개 중 121개의 균주, 즉 47.1%의 양성율을 나타내었다.

Non-hemolytic Enterotoxin (Nhe)을 확인하기 위한 TECRA 상용키트인 BDE-VIA™의 반응이 종료 후, 405 nm 파장에서 흡광도를 측정한 결과, 양성 판정 기준치 0.2보다 높은 값을 갖는 well들은 Color card와 육안 비교에서 명확하게 양성으로 판정할 수 있었다. BDE-VIA™를 이용한 결과 총 257개 균주 중 193개의 균주 즉, 75.1%가 양성 반응을 나타내었으며 BCET-RPLA 및 BDE-VIA™에서 모두 양성을 나타낸 균주는 다양한 식품유형에서 분리된 74개 균주로 28.8%의 양성율을 나타내었다. 분리균주 중 51%가 BCET-RPLA 에서 양성율, BDE-VIA™에서는 85%가 양성이었다는 보고(60)보다는 양성비율이 다소 낮지만 비슷한 경향을 보였다.

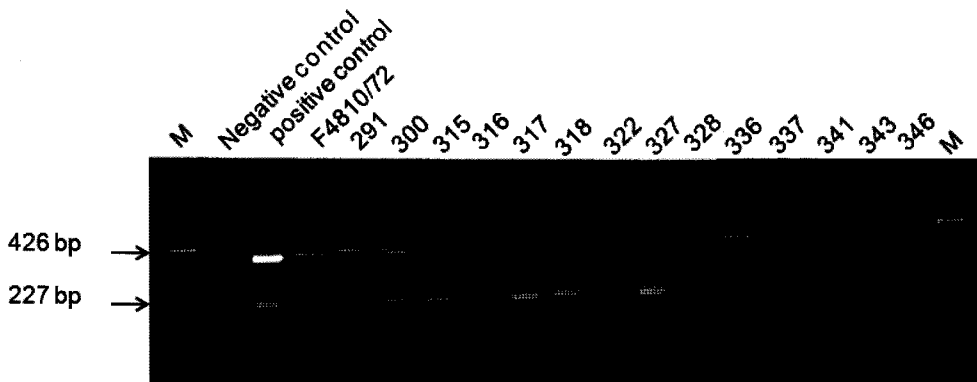


그림 1. PCR results for emetic toxin gene.
 lane M, molecular marker (100bp ladder)
 lane F4810/72, isolated *B. cereus* from vomit
 lanes 291 to 346, strain names of isolated *B. cereus* from foods

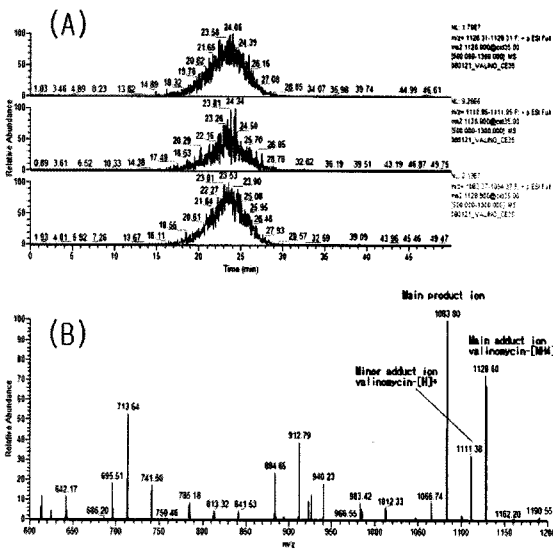


그림 2. Chromatogram (A) and mass spectrum (B) of valinomycin by LC/MS/MS.

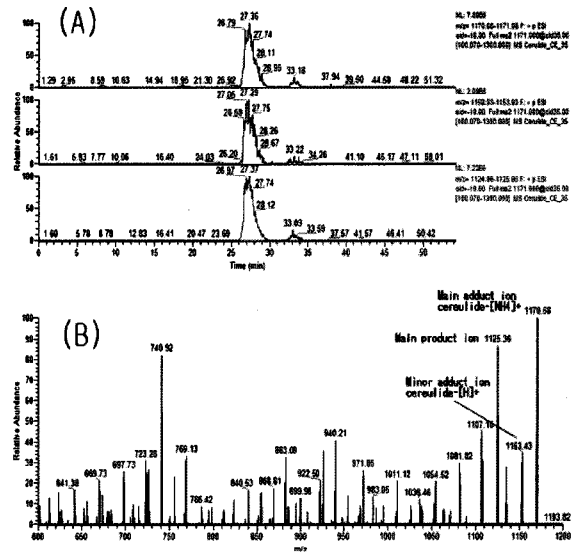


그림 3. Chromatogram (A) and mass spectrum (B) of cereulide by LC/MS/MS. The m/z of main adduct ion (parent ion), main product ion and minor adduct are 1171, 1125.36 and 1153.43, respectively.

4. LC/MS/MS에 의한 emetic toxin (cereulide) 검출

1) Cereulide와 valinomycin의 MRM 분석조건 확립

Cereulide와 valinomycin은 각각 cyclo (D-Leu-D-Ala-L-o-Val-L-Val)₃ (MW : 1152)와 cyclo (L-o-Ala-L-Val-D-o-Val-D-Val)₃ (MW : 1111.32)의 유사 성분배열을 지니는 36환의 depsipeptide이다 (37,61). LC/MS/MS를 이용한 MRM (multiple reaction monitoring) 분석법 확립을 위하여 Häggblom 등(25) 및 Pitchayawasin 등(52)의 방법에 따라 100 ppb의 valinomycin 표준용액을 질량분석기에 주입한 결과, major ion adduct인 valinomycin-NH₄⁺ ($m/z=1128.81$)과 minor ion adduct인 valinomycin-H⁺ ($m/z=1111.45$)를 확인하여 $m/z=1128.81$ 을 parent ion으로 하여 product ion (daughter ion)을 구한 결과 ion 변폭이 가장 적고 감도가 가장 큰 ion은 Ce (v) 35에서 $m/z=1083.8$ 임을 확인할 수 있었다(표 7). Valinomycin의 mass spectrum은 500에서 1,300 m/z 까지 scan하여 그림 2에 나타내었다. 전술한 바와

같이 cereulide 표준품은 상용화되어 있지 않기에 cereulide와 valinomycin의 구조적 유사성에 착안하여 major ion adduct가 cereulide-NH₄⁺ ($m/z=1171$), minor ion adduct가 cereulide-H⁺ ($m/z=1153$)일 것으로 추정하고 $m/z=1171$ 을 parent ion으로 하여 product ion을 구한 결과 ion 변폭이 가장 적고 감도가 가장 큰 ion은 Ce (V) 35에서 $m/z=1125.36$ 임을 확인할 수 있었다(그림 3).

2) 분석조건의 검증

시험법의 검증은 특이성, 직선성, 정확성, 정밀성 및 회수율 등을 토대로 판단하였으며(54) cereulide를 생성하는 배양액과 valinomycin을 혼합하여 분석한 결과 머무름 시간이 valinomycin 10.3분, cereulide는 16.9분으로, 주변의 분석방해물질들의 간섭 없는 매우 양호한 분리도를 보여 주었다. 검량선은 valinomycin 농도에 대한 피크면적으로 작성하였다. 회귀직선방정식은 $Y=-21206.8+21444.2x$ (Y ; 피크면적, x ; 분석농도 (ng/ml))이고 1~10,000 ng/ml의 농도범위에서

표 7. MRM (multiple reaction monitoring) conditions of valinomycin and cereulide

Compound	Ionization	Quasi molecular ion	1st/2nd transition		Collision energy(V)
			Q1 mass	Q3 mass	
Valinomycin	ESI+	[M+NH4] ⁺	1128.9	1111.33	35
				1083.8	35
Cereulide	ESI+	[M+NH4] ⁺	1171.0	1153.43	35
				1125.36	35

결정계수 (R^2)는 1.0으로 우수한 직선성을 보여 주었다(그림 4).

본 연구에서 valinomycin의 검출한계는 1.68 ppb, 정량한계는 5.62 ppb로 나타났다. Svensson 등(53)은 HPLC/MS를 사용하였을 때 cereulide의 검출한계는 10 pg/μ 즉 10 ppb로 보고하였으며 본 연구에서 LC/MS/MS 방법을 사용한 결과 검출한계는 1.68 ppb, 정량한계는 5.62 ppb로 나타나 본 연구의 검출한계가 다소 낮아서 미량의 emetic toxin이 존재할 경우에도 검출이 용이하게 될 수 있음을 시사해 준다.

정밀성은 개별적으로 수행된 동일한 과정의 분석으로 얻어진 결과들 사이의 일치하는 정도를 의미하는 것으로 매질에 첨가한 표준물질의 CV (coefficient of variation) 또는 CV의 절대값인 RSD (relative standard deviation)로 표현한다. 시료 6개를 준비하고 LOQ의 1, 1.5 및 2배 농도인 즉 5.62, 8.43 및 11.24ppb의 valinomycin을 첨가하여 분석한 결과, 8.5%의 RSD를 보여 주었다. 통상적으로 RSD는 매질 별 및 농도에 따라 LOQ 수준에서 15% 수준을 적합한 것으로 판단함을 고려할 때 만족할만한 수준인

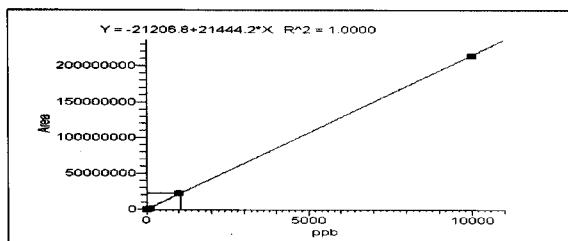


그림 4. Calibration curve of valinomycin by LC/MS/MS.

것으로 사료되었다.

시료 6개에 LOQ의 2배 농도인 11.24 ppb의 valinomycin을 첨가하여 분석한 결과 값과 valinomycin의 CRM (certified reference material)을 가지고 측정한 결과 값의 정확도는 -11.2%로 나타났다. 통상적으로 정확도는 분석 대상 성분의 양이 $\geq 10 \mu\text{g/l}$ 인 경우 -20~10%을 적합한 것으로 판단함을 고려할 때 만족할만한 수준인 것으로 사료되었다.

시료에 LOQ의 10배 농도인 56.2 ppb의 valinomycin을 첨가하여 분석한 결과 회수율은 85.7%를 보여 주었다. 통상적으로 회수율은 정량한계의 10배 농도에서 분석했을 때 70~110%를 적합한 것으로 판단함을 고려할 때 만족할 만한 수준인 것으로 사료되었다.

3) 시료분석결과

표 8과 같이 emetic toxin 양성대조균주로 사용한 F 4810/72 균주를 포함하여 emetic toxin 유전자를 보유한 15개의 *B. cereus*를 대상으로 LC/MS/MS에 의한 emetic toxin 시험 결과 15개 중 15개 균주 모두가 emetic toxin을 생성하는 것으로 나타났다. 우리나라와 식습관이 유사한 일본에서는 1990년대 이후부터 emetic toxin에 관한 많은 연구가 진행되고 있으나, 우리나라에서는 *B. cereus*의 emetic toxin에 관한 연구가 거의 전무한 실정이다. 식품에서 분리된 *B. cereus*에서 emetic toxin 유전자 및 emetic toxin이 검출되었음은 *B. cereus*가 기회감염균으로서 중요성이 부각되는 이 시점에서 시사하는 바가 크다.

Emetic toxin gene을 보유한 균주는 모두 BCET-RPLA 음성이고 BDE-VIA 결과 양성으로 나타났다.

표 8. Characteristics of cereulide-producing strains among *Bacillus cereus* isolates

Strains	% ID ^a	API name	Emetic toxin gene	Emetic toxin	TECRA ^d	BCET		hblA			Origin	
						-RPLA	bceT	hblC	nheA	nheB		cytK
F 4810/72 ^b	78.7/21.1	<i>B. cereus</i> 2/ <i>B. anthracis</i>	+ ^c	+	5 ^d	-	-	-	-	+	-	Vomit from patient
M-291	72.3/24.7	<i>B. cereus</i> 2/ <i>B. anthracis</i>	+	+	5	-	-	-	+	+	-	Beef
M-300	55.5/42.2	<i>B. cereus</i> 2/ <i>B. anthracis</i>	+	+	5	-	-	-	+	+	-	Pork
M-315	81.7/18	<i>B. cereus</i> 2/ <i>B. anthracis</i>	+	+	5	-	-	-	-	+	-	Soy bean paste
M-316	66.9/32.7	<i>B. cereus</i> 2/ <i>B. anthracis</i>	+	+	5	-	-	-	-	+	-	Soy bean paste
M-317	66.9/32.7	<i>B. cereus</i> 2/ <i>B. anthracis</i>	+	+	5	-	-	-	-	+	-	RTE Side dish
M-318	64.9/25.4/9.4	<i>B. cereus</i> 1/ <i>B. cereus</i> 2/ <i>B. anthracis</i>	+	+	5	-	-	-	-	+	-	RTE Side dish
M-322	66.9/32.7	<i>B. cereus</i> 2/ <i>B. anthracis</i>	+	+	5	-	-	-	-	+	-	Sauce
M-327	67.6/29.8	<i>B. cereus</i> 2/ <i>B. anthracis</i>	+	+	5	-	-	-	-	+	-	RTE Side dish
M-328	62.6/35.7	<i>B. cereus</i> 2/ <i>B. anthracis</i>	+	+	5	-	-	-	-	+	-	RTE Side dish
M-336	85.1/14.5	<i>B. cereus</i> 1/ <i>B. anthracis</i>	+	+	3	-	-	-	-	+	-	Sauce
M-337	66.9/32.7	<i>B. cereus</i> 2/ <i>B. anthracis</i>	+	+	5	-	-	-	-	+	-	RTE Side fish
M-341	78.7/21.1	<i>B. cereus</i> 2/ <i>B. anthracis</i>	+	+	5	-	-	-	-	+	-	Non-heated fruit juice
M-343	94.6	<i>B. cereus</i> 2	+	+	5	-	-	-	-	+	-	Kimbab
M-346	51.4/47.6	<i>B. cereus</i> 2/ <i>B. anthracis</i>	+	+	5	-	-	-	-	+	-	RTE Side dish

^a% ID means the percentage of identification. ^b : emetic toxin producing reference strain ^csymbols ; +, positive, -, negative ^d, For the Tecra test, indices from 1 to 5 corresponded to the coloration intensity. According to the manufacturer's instructions, strains with an index of <3 were considered as negative.

며 *bceT* gene, *hbl* gene complex (*hblA*, *hblC*, *hblD*) 및 *cytK* gene은 모두 검출되지 않았으나 *nheB* 유전자는 모두 검출되어 emetic toxin 생성균주는 *hblC* 유전자 음성, BCET-RPLA 음성, *cytK* 음성, BDE-VIA kit에서 강한 양성을 나타내는 균주라는 보고와 일치하였다(33,62). API에 의한 동정결과는 M-336 균주를 제외하고 *B. cereus* group 2에 속하는 것으로 나타났으며 Choma 등(63)에 의하면 *B. cereus* group 2로 판정된 균주는 전분을 가수분해하지 못하는 균주라고 보고하였다. Cereulide는 사람에게는 치명적인 간질환을 유발하는 것으로 알려져 있으며(48) 현재까지의 연구결과로는 cereulide 생성이 *B. cereus*로 국한되어 있지만 저온내성 *Bacillus weihenstephanesis* 균주도 cereulide를 생성하여 8°C 정도의 낮은 온도에서도 cereulide를 생성한다는 보고(57)도

있어 냉장온도에서의 보관도 결코 안심하지 못할 것으로 사료된다. 바로 섭취할 수 있는 즉석섭취식품에 대한 수요가 증가하고 있는 실정에서 즉석반찬류, 김밥, 소스류에서 emetic toxin을 생성하는 균주가 검출된 사실은 식중독이 증가하고 있는 현 시점에서 중요하다 할 수 있다. 식중독 저감화를 위하여 즉석섭취식품을 대상으로 다양한 식중독균에 대한 연구가 진행되어야 할 것으로 사료되었다.

5. 온도와 시간에 따른 *Bacillus cereus*의 독소생성능

1) 생육시기 및 온도에 따른 Hbl 독소의 생성능

*B. cereus*를 접종한 김밥의 경우 30°C, 37°C에서 보

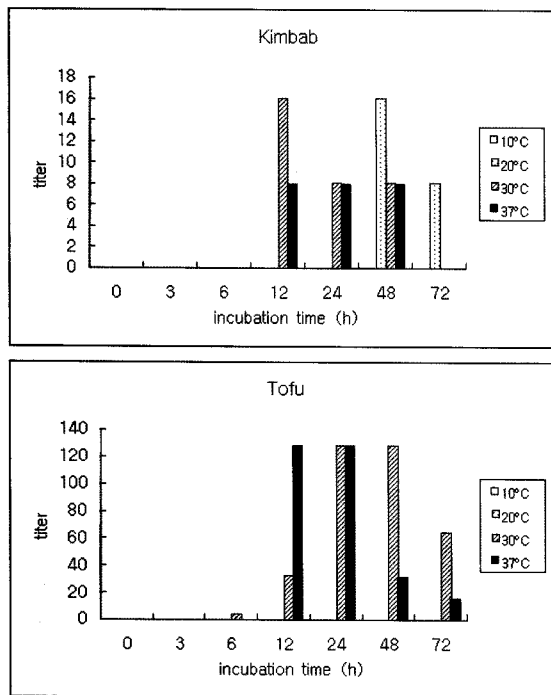


그림 5. Hemolytic enterotoxin titer of *B. cereus* in Kimbab and Tofu by BCET-RPLA kit.

관한 지 12시간 이후부터 BCET-RPLA 양성 결과 나타내었으며 보관온도 20°C에서는 48시간 이후부터 BCET-RPLA 양성이었으며 10°C에서는 BCET-RPLA 음성으로 나타났다. BCET-RPLA 양성 결과를 검토하여 본 결과, 30°C에서 12시간 배양 및 20°C

에서 48시간 배양 후, 균의 개수가 7 log(CFU/g) 이상이였으며 37°C에서 12시간 배양 후, 균수는 8 log(CFU/g) 이상이었다. *B. cereus*를 접종한 두부의 경우 10°C, 20°C에서는 Hbl 독소생성을 하지 못하였으나 30°C, 37°C에서는 12시간째부터 본격적으로 독소 생성이 시작되었으며 30°C에 보관한 김밥에서는 72시간까지 독소를 생성하였으나 37°C에 보관한 두부에서는 48시간째부터 독소생성이 현저하게 감소되었다. 30°C 12시간 배양 후, 균의 개수가 7 log(CFU/g) 이상이었고, 37°C 12시간 배양 후 균의 개수가 8 log(CFU/g) 이상이었어서, 김밥에서의 결과와 동일하게 두부에서도 균의 개수가 7 log(CFU/g) 이상이 되어야 Hbl 독소를 생성하는 것으로 판단되었다(그림 5).

2) 생육시기 및 온도에 따른 Nhe 독소의 생성능

BDE-VIA(Tecra International Pty Ltd., Australia)로 실험한 결과는 표 9에 나타내었다. 김밥 및 두부를 10°C, 20°C에서 배양하였을 때에는 생육시기에 관계없이 흡광도가 모두 0.2 미만으로 Nhe 독소를 생성하지 않았으며 30°C에서는 24시간 쯤부터 발색되기 시작하여 72시간까지 독소를 생성하였으며, 37°C의 경우 12시간 쯤부터 발색되기 시작하여 Nhe 독소를 생성하였으나 48시간 쯤부터는 독소를 생성하지 않았다. *B. cereus*를 접종한 김밥 및 두부에서는 8 log(CFU/g) 정도가 되어야 독소를 생성하는 것으로 나타났으며 20°C에서는 8 log(CFU/g) 이상이 되어도

표 9. Production of nonhemolytic enterotoxin in Kimbab and Tofu for *B. cereus* by BDE-VIA kit

	Kimbab				Tofu			
	10°C	20°C	30°C	37°C	10°C	20°C	30°C	37°C
0h	1	1	1	1	1	1	1	1
3h	1	1	1	1	1	1	1	1
6h	1	1	1	2	1	1	1	1
12h	1	1	2	3	1	2	2	3
24h	1	1	3	3	1	2	4	4
48h	1	2	3	2	1	2	4	2
72h	1	2	4	2	1	2	4	2

For the Tecra test, indices from 1 to 5 corresponded to the coloration intensity. According to the manufacturer's instructions, strains with an index of <3 were considered as negative.



독소를 생성하지 않는 것으로 보아 균수 뿐만 아니라 온도에 의한 영향을 많이 받는 것으로 보인다.

3) 생육시기 및 온도에 따른 cereulide의 생성능

Emetic toxin (cereulide)을 생산하는 균을 포함한 *B. cereus* 혼합균주를 김밥 및 두부에 접종하여 온도 별, 시간별, 검체별 emetic toxin 생성능을 비교하여 본 결과 단백질 식품인 두부에서는 온도 및 배양시기와 상관없이 독소를 생산하지 아니하여 전분질 식품에서 emetic toxin이 잘 생성된다는 보고와 일치하였다(24). 김밥의 경우, 그림 6과 같이 20°C에서 48시간 배양하였을 때, 30°C에서 24시간, 48시간 배양 후 emetic toxin을 생성하였고 30°C에서 48시간 배양하였을 때가 20°C에서 48시간 배양하였을 때보다 독소 생성량이 훨씬 높았으며 30°C에서는 24시간보다 48시간 배양하였을 때가 독소생성량이 훨씬 높았다.

37°C에서는 emetic toxin을 생성하지 않아 37°C에서는 cereulide 생성이 되지 않거나 생성량이 적고 적정온도는 15~30°C 이하라는 연구결과(25,64) 및 28~30°C에서 cereulide가 잘 생성된다는 보고(32)와 유사하였다. 또한, Carlin 등(65)은 emetic toxin을 생성하는 균주는 10°C 이하에서는 증식을 하지 않으며 emetic toxin은 가열한 후 따뜻하게 보관하는 음식에서는 특별한 risk의 우려가 있으나 냉장제품에는 risk가 없다고 보고하였다.

또한 식품에서 cereulide는 냉장온도에서 생성이 잘 안되고 그람당 10⁶이상의 *B. cereus*가 존재할 때 생성되는 것으로 나타나 본 연구결과와 유사하였으며(66)

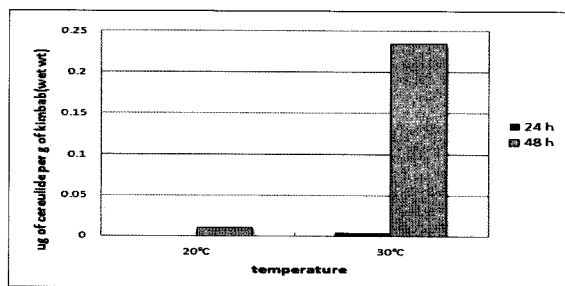


그림 6. Influence of temperature and incubation time on cereulide accumulation in Kimbab inoculated with *B. cereus*.

정지기 이후에 잘 생성된다는 보고(23,24)와도 유사하였다. 총 cereulide 450 µg을 섭취하면 건강한 성인에게서 심각한 식중독을 유발하므로 그람당 cereulide 2~7 µg이 들어있는 밥 100 g을 섭취하면 식중독이 유발될 수도 있다는 보고(31)도 있는 반면 일본에서 식중독을 유발했던 식품검체의 emetic toxin 양이 0.01~1.28 µg/g이라는 보고(24)도 있다.

Enterotoxin 유전자 검사를 하였을 때 cereulide를 생성하지 않는 모든 균주는 Hbl 양성이었다고 보고된 연구결과(62)는 본 연구결과와 유사하여 향후 *B. cereus*의 독소 유전자 및 발현에 관한 심층적인 연구가 수반되어야 할 것으로 보인다.

결과적으로 cereulide 생성은 온도(25,64) 및 식품 성분(24)에 의해서 영향을 받는 것을 확인하였다. 본 연구결과 국내의 식습관상 식중독 위험성이 상대적으로 높은 cereulide를 식품이나 환경에서 신속하게 검출할 수 있으며 식품에서 직접 cereulide 추출 및 정량분석도 가능함을 알 수 있었다. *B. cereus*를 접종한 식품시료에서는 emetic toxin이 37°C에서는 생성되지 않은 반면 20°C, 30°C에서 emetic toxin이 생성되었으므로 식품보관온도가 실온인 20°C 정도라고 안심할 수 없다는 것을 말해준다. 특히 30°C에서는 24시간 만에 emetic toxin을 생성하는 것으로 밝혀져 *B. cereus* 식중독 예방에 참고하여야 할 것으로 사료되었다.

Enterotoxin의 경우 30°C, 37°C에서 잘 생성되는 반면 emetic toxin의 경우 실온 (20°C)에서도 잘 생성되는 것으로 조사되었다. 간편하게 섭취할 수 있는 즉석식품이 증가함에 따라 *B. cereus*에 의한 식중독도 증가할 가능성이 많아졌다. 저온 보존 등이 부적절한 김밥 등의 제품은 구입 후 또는 조리한 후 바로 섭취하고 부득이한 경우 10°C 이하의 온도에서 보관하여야 함을 알 수 있었다. 조리 후 냉장 보관하는 경우, 상온 (20°C)에 방치한 뒤 냉장보존하면 상온에서 포자가 발아할 수 있으므로 조리 후 곧 냉각하여 보존하여야 한다. 위해도가 낮은 세균이라 할지라도 노인, 어린이 등 면역체계가 약한 집단에서는 식중독 유발가능성을 배제할 수 없으므로 식품원료 단계에서의 철저한 위생관리를 하여 식중독균의 초기균수를 최소화

하는 등 원료의 오염 가능성을 줄이는 노력이 필요할 것으로 판단되었다.

IV. 결 론

포자를 생성하는 그람양성간균인 *Bacillus cereus*에 의한 식중독은 임상증세에 따라 설사형 식중독, 구토형 식중독으로 나뉘며 국내에서 지속적으로 발생하고 있는 실정이다. 식품에서 분리된 *B. cereus*에 대하여 PCR을 이용한 9종의 enterotoxin 유전자 검출 시험 결과, 분리균주의 35.4%가 Hbl 독소 생성에 관여하는 *hblA*, *hblC*, *hblD* 유전자를 모두 보유하고 있으며, 49.4%가 Nhe 독소 생성에 관여하는 *nheA*, *nheB*, *nheC* 유전자를 모두 보유하고 있었으며 분리균주의 72.7%가 *entFM* 유전자를, 29.2%가 *cytK* 유전자를, 46.7%가 *bceT* 유전자를 보유하고 있었다. 한편, PCR을 이용한 emetic toxin 유전자 검출 시험결과 식품 분리균주 257 균주 중 14개 균주가 emetic toxin 유전자를 보유하고 있었다.

B. cereus 혼합균주를 접종한 김밥 및 두부에서 온도별(10°C, 20°C, 30°C, 37°C)로 72시간까지 배양하면서 enterotoxin (Hbl 독소 및 Nhe 독소) 및 emetic toxin 생성능을 실험한 결과 Hbl 독소의 경우, 김밥에서는 10°C에서, 두부에서는 20°C 이하에서 독소를 생성하지 않았다. 김밥에서는 20°C에서 48시간, 30°C 및 37°C에서 12시간이 경과하여야 독소를 생성하였으며 두부에서는 30°C 및 37°C에서 12시간이 지나면 독소를 생성하여 *B. cereus*가 식품에 오염되었을 경우 Hbl 독소 생성에는 약 10^7 CFU/g의 균수가 필요한 것으로 사료되었다.

Nhe 독소의 경우, 김밥 및 두부 모두 20°C 이하에서는 독소를 생성하지 않았다. 김밥 및 두부 모두 30°C에서 24시간, 37°C에서는 12시간이 지나야 독소를 생성하여 *B. cereus*가 식품에 오염되었을 경우 Nhe 독소 생성에는 약 10^8 CFU/g의 균수가 필요한 것으로 사료되었다.

emetic toxin의 경우 10°C, 20°C, 30°C, 37°C에 보 관한 두부는 일정한 균수로 증가하더라도 emetic toxin을 생성하지 못하였고, 김밥은 10°C, 37°C에서

는 보관시간에 상관없이 emetic toxin을 생성하지 못하였다. 김밥은 20°C에서 48시간, 30°C에서 24시간, 48시간 쯤 emetic toxin을 생성하여 *B. cereus*가 식품에 오염되었을 경우 emetic toxin 생성에는 약 10^8 CFU/g의 균수가 필요하며 정지기 이후에 emetic toxin 생성이 시작되는 것으로 사료되었다.

이상의 연구결과를 통해, 독소생성에는 균수 뿐만 아니라 온도가 미치는 영향이 큰 것으로 판단되었으며 emetic toxin의 경우, 식품성분도 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다. 원재료의 오염을 최소화하고 식품의 온도제어를 통하여 세균의 성장을 저해하는 것이 식품안전관리에 중요하다고 사료되었다.

참고문헌

1. Claus D, Berkeley RCW. Genus *Bacillus* Cohn 1872, 174. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol 2 ed. The Williams and Wilkins Co, pp. 1105-1139(1986)
2. Ahmed AH, Moustafa MK, Marth EH. Incidence of *Bacillus cereus* in milk and some milk products. J. Food Prot. 46: 126-128 (1983)
3. Kim HU, Goepfert JM. Occurrence of *Bacillus cereus* in selected dry food products. J. Milk Food Technol. 34: 12-15 (1971)
4. Powers EM, Latt TG, Brown T. Incidence and levels of *Bacillus cereus* in processed spices. J. Milk Food Technol. 39: 668-670 (1976)
5. Granum PE, Baird-Parker TC. *Bacillus* spp. In : The Microbiological Safety and Quality of Food(eds B. Lund *et al.*), Aspen Publishers, Gaithersburg, MD. pp. 1029-1039 (2000)
6. Harmon SM, Kautter DA. Incidence and growth potential of *Bacillus cereus* in ready to serve foods. J. Food Prot. 54: 372-374 (1991)
7. Kaneko K, Hayashidani H, Ohtomo Y, Kosuge J, Kato M, Takahashi K, Shiraki Y, Ogawa M. Bacterial contamination of ready-to-eat foods and fresh products in retail shops and food factories. J. Food Prot. 62: 644-649 (1999)
8. Kim SH, Kim MG, Kang MC, Son YW, Lee CH, Kim IB, Lee YJ, Choi SY. Isolation and growth pattern of *Bacillus cereus* from ready to eat foods. Journal of Life Science, 14(4): 664-669 (2004)
9. Drobniewski FA. *Bacillus cereus* and related species. Clin. Microbiol. Rev. 6(4): 324-338(1993)
10. Kaneko T, Nozaki R, Aizawa K. Deoxyribonucleic acid relatedness between *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacil-*



- lus thuringiensis*. Microbiol. Immunol. 22: 639-641(1978)
11. Seki T, Chung C, Mikami H, Oshima Y. Deoxyribonucleic acid homology and taxonomy of the genus *Bacillus*. Int. J. Syst. Bacteriol. 28: 182-189 (1978)
 12. FDA/CFSSAN. Bacteriological Analytical Manual Chapter 14. *Bacillus cereus*.(2001)
 13. Harrell LJ, Andersen GL, Wilson KH. Genetic variability of *Bacillus anthracis* and related species. J. Clin. Microbiol. 33: 1847-1850 (1995)
 14. Zhong W, Shou Y, Yosida TM, Marrone BL. Differentiation of *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, and *B. thuringiensis* by using pulsed-field gel electrophoresis. Appl. Environ. Microbiol. 73(10): 3446-3449 (2007)
 15. ICMSF, Microbiology in Foods. 5. Characteristics of Microbial Pathogens, Blackie Academic and Professional, London (1996)
 16. AIFST. Foodborne microorganisms of public health significance. 6th ed. AIFST(NSW branch) Food Microbiology Group, Southwood Press Pty, Australia (2003)
 17. Shinagawa K, Sujiyama J, Terada T, Matsusaka N, Suggi S. Improved methods for purification of an enterotoxin produced by *Bacillus cereus*. FEMS Microbiol. Lett. 80: 1-6 (1991)
 18. Thompson NE, Ketterhagen MJ, Bergdoll MS, Schantz EJ. Isolation and some properties of an enterotoxin produced by *Bacillus cereus*. Infect. Immun. 43: 887-894 (1984)
 19. Beecher DJ, Macmillan JD. Characterization of the components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. Infect. Immun. 59: 1778-1784 (1991)
 20. Glatz BA, Goepfert JM. Defined conditions for synthesis of *Bacillus cereus* enterotoxin by fermenter-grown cultures. Appl. Environ. Microbiol. 32: 400-404 (1976)
 21. Hsieh YM, Sheu SJ, Chen YL, Tsen HY. Enterotoxigenic profiles and polymerase chain reaction detection of *Bacillus cereus* group cells and *B. cereus* strains from foods and foodborne outbreaks. J. Appl. Microbiol. 87: 481-490 (1999)
 22. Agata N, Ohta M, Mori M, Isobe M. A novel dodecadepsipeptide cereulide is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. FEMS Microbiol. Lett. 129: 17-20 (1995)
 23. Agata N, Ohta M, Mori M. Production of an emetic toxin, cereulide, is associated with a specific class of *Bacillus cereus*. Curr. Microbiol. 33(1): 67-69 (1996)
 24. Agata N, Ohta M, Yokoyama K. Production of *Bacillus cereus* emetic toxin(cereulide) in various foods. Int. J. Food Microbiol. 73: 23-27 (2002)
 25. Häggblom MM, Apetroaie C, Andersson MA, Salonen MSS. Quantitative analysis of cereulide, the emetic toxin of *Bacillus cereus*, produced under various conditions. Appl. Environ. Microbiol. 68(5): 2479-2483 (2002)
 26. Granum PE, Lund T. *Bacillus cereus* enterotoxins. FEMS Microbiol. Lett. 157: 223-228 (1997)
 27. Johnson KM. *Bacillus cereus* foodborne illness: an update. J. Food Prot. 47: 145-153 (1984)
 28. Kramer JM, Gilbert RJ. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In: Foodborne Bacterial Pathogens(ed. M. P. Doyle), p. 21-70. Marcel Dekker, New York.(1989)
 29. Yokoyama K, Ito M, Agata N, Isobe M, Shibayama K, Horii T, Ohta M. Pathological effect of cereulide, an emetic toxin of *Bacillus cereus*, is reversible in mice. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 24: 115-120 (1999)
 30. Jääskeläinen EL, Häggblom MM, Andersson MA, Salonen MSS. Atmospheric oxygen and other conditions affecting the production of cereulide by *Bacillus cereus* in food. Int. J. Food Microbiol. 96: 75-83 (2004)
 31. Jääskeläinen EL, Teplova V, Andersson MA, Andersson LC, Tammela P, Andersson MC, Pirhonen TI, Saris NEL, Vuorela P, Salonen MSS. In vitro assay for human toxicity of cereulide, the emetic mitochondrial toxin produced by food poisoning *Bacillus cereus*. Toxicology In Vitro. 17: 737-744 (2003)
 32. Andersson MA, Jääskeläinen EL, Shaheen R, Pirhonen T, Wijnands LM, Salonen MSS. Sperm bioassay for rapid detection of cereulide-producing *Bacillus cereus* in food and related environments. Int. J. Food Microbiol. 94: 175-183 (2004)
 33. Ehling-Schulz M, Svensson B, Guinebretière MH, Lindbäck T, Andersson M, Schulz A, Fricker M, Christiansson A, Granum PE, Märtilbauer E, Nguyen-The C, Salonen MSS, Scherer S. Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains. Microbiology. 151: 183-197 (2005)
 34. Shaheen R, Andersson MA, Apetroaie C, Schulz A, Shulz ME, Ollilainen VM, Salonen MSS. Potential of selected infant food formulas for production of *Bacillus cereus* emetic toxin, cereulide. Int. J. Food Microbiol. 107: 287-294 (2006)
 35. Shinagawa K. Serology and characterization of toxigenic *Bacillus cereus*. Neth. Milk Dairy J. 47: 89-103 (1993)
 36. Lund T, De Buyser ML, Granum PE. A new enterotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. Molecular Microbiology. 38: 254-261 (2000)
 37. Agata N, Mori M, Ohta M, Suwan S, Ohtani I, Isobe M. A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in Hep-2 cells. FEMS Microbiol. Lett. 121: 31-34 (1994)
 38. Beecher DJ, Wong ACL. Identification and analysis of the antigens detected by two commercial *Bacillus cereus* diarrhoeal enterotoxin immunoassay kits. Appl. Environ. Microbiol. 60: 4614-4616 (1994)
 39. Ehling-Schulz M, Vukov N, Schulz A, Shaheen R, Andersson M, Märtilbauer E, Scherer S. Identification and partial char-

- acterization of the nonribosomal peptide synthetase gene responsible for cereulide production in emetic *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(1): 105-113 (2005)
40. Finlay WJJ, Logan NA, Sutherland AD. Semiautomated metabolic staining assay for *Bacillus cereus* emetic toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(4): 1811-1812 (1999)
 41. Notermans S, Batt CA. A risk assessment approach for food borne *Bacillus cereus* and its toxins. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, 84: 51S-61S (1998)
 42. 식품의약품안전청 식중독예방홍보사이트(<http://fm.kfda.go.kr>)
 43. Granum PE. *Bacillus cereus* In : *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers* (eds M. Doyle *et al.*), p. 327-336. ASM Press, Washington, DC. (1997)
 44. Dobouix A, Bonnet E, Alvarez M, Bensafi H, Archambaud M, Chaminade B, Chabanon G, Marty N. *Bacillus cereus* infections in Traumatology-Orthopaedics Department: retrospective investigation and improvement of healthcare practices. *Journal of infection*, 50: 22-30 (2005)
 45. Weber DJ, Saviteer SM, Rutala WA, Thomann CA. In vitro susceptibility of *Bacillus* spp. to selected antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32(5): 642-645 (1988)
 46. Coonrod JD, Leadly PJ, Elickhoff TC. Antibiotic susceptibility of *Bacillus* species. *J. Infect. Dis.* 123: 102-105 (1971)
 47. Dierick K, Coillie EV, Swiecicka I, Meyfroidt G, Devlieger H, Meulemans A, Hoedemaekers G, Fourie L, Heyndrickx M, Mahillon J. Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*-associated food poisoning. *J. Clin. Microbiol.* 43(8): 4277-4279 (2005)
 48. Mahler H, Pasi A, Kramer JM, Schulte P, Scoging AC, Bar W, Krahenbuhl S. Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*. *N. Engl. J. Med.* 336: 1142-1148 (1997)
 49. Turnbull PC, Kramer JM, Jorgensen K, Gilbert RJ, Melling J. Properties and production characteristics of vomiting, diarrheal, and necrotizing toxins of *Bacillus cereus*. *Am. J. Clin. Nutr.* 32: 219-228 (1979)
 50. 식품공전, 제7 일반시험법 8. 미생물 시험법 21) *B. cereus* p. 113-114 (2005)
 51. 이복권 등. 항생제 내성 FoodNet 구축. 식품의약품안전청 연구결과보고서 (2006)
 52. Pitchayawasin S, Isobe M, Kuse M, Franz T, Agata N, Ohta M. Molecular diversity of cereulide detected by means of nano-HPLC-ESI-Q-TOF-MS. *Int. J. Mass Spectrometry.* 235: 123-129 (2004)
 53. Svensson B, Monthán A, Shaheen R, Andersson MA, Salonen MS, Christiansson A. Occurrence of emetic toxin producing *Bacillus cereus* in the dairy production chain. *International Dairy Journal.* 16: 740-749 (2006)
 54. APVMA (Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. October Guidelines for the validation of analytical methods for active constituent, agricultural and veterinary chemical products (2004)
 55. Guinebretière MH, Broussolle V, Nguyen-The C. Enterotoxigenic profiles of food poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains. *J. Clin. Microbiol.* 40(8): 3053-3056 (2002)
 56. Kramer JM, Gilbert RJ. *Bacillus cereus* gastroenteritis. In: *Food Poisoning; Handbook of natural toxins* (ed. A. T. Tu), vol 7, p. 119-153, Marcel Dekker, New York. (1992)
 57. Thorsen L, Hansen BM, Nielsen KF, Hendriksen NB, Phipps RK, Budde BB. Characterization of emetic *Bacillus weihenstephanensis*, a new cereulide-producing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(7): 5118-5121 (2006)
 58. Ehling-Schulz M, Fricker M, Scherer S. Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay. *FEMS Microbiol. Lett.* 232: 189-195 (2004)
 59. Pirhonen TI, Andersson MA, Jääskeläinen EL, Salonen MSS, Buzalski TH, Johansson TML. Biochemical and toxic diversity of *Bacillus cereus* in a pasta and meat dish associated with a food-poisoning case. *Food Microbiology.* 22: 87-91 (2005)
 60. Beattie SH, Williams AG. Detection of toxigenic strains of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. with an improved cytotoxicity assay. *Lett. Appl. Microbiol.* 28: 221-225 (1999)
 61. Isobe M, Ishikawa T, Suwan S, Agata N, Ohta M. Synthesis and activity of cereulide, a cyclic dodecadeptide ionophore as emetic toxin from *Bacillus cereus*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters.* 5: 2855-2858 (1995)
 62. Vassileva M, Torii K, Oshimoto M, Okamoto A, Agata N, Yamada K, Hasegawa T, Ohta M. A new phylogenetic cluster of cereulide-producing *Bacillus cereus* strains. *J. Clin. Microbiol.* 45(4): 1274-1277 (2007)
 63. Choma C, Guinebretière MH, Carlin F, Schmitt P, Velge P, Granum PE, Nguyen-The C. Prevalence, Characterization and growth of *Bacillus cereus* in commercial cooked chilled foods containing vegetables. *J. Appl. Microbiol.* 88(4): 617-625 (2000)
 64. Finlay WJJ, Logan NA, Sutherland AD. *Bacillus cereus* produces most emetic toxin at lower temperatures. *Lett. Appl. Microbiol.* 31: 386-389 (2000)
 65. Carlin F, Fricker M, Pielaat A, Heisterkamp S, Shaheen R, Salonen MS, Svensson B, Nguyen-the C, Ehling-Schulz M. Emetic toxin producing strains of *Bacillus cereus* show distinct characteristics within the *Bacillus cereus* group. *Int. J. Food Microbiol.* 109: 132-138 (2006)
 66. Jääskeläinen EL, Häggblom MM, Anderson MA, Vanne L, Salonen MSS. Potential of *Bacillus cereus* for producing an emetic toxin, cereulide, in bakery products : quantitative analysis by chemical and biological methods. *J. Food. Prot.* 66(6): 1047-1054 (2003)