

영·유아용 식품원료의 *Bacillus cereus*와 일반세균 모니터링 및 제조공정 중 미생물 품질제어

정우영 · 엄준호 · 김병조 · 주인선 · 김창수 · 김미라 · 변정아 · 박유경 · 손상혁 · 이은미 · 정래석 · 나미애 · 육동연 · 강지연 · 허옥순 · 윤민호^{1*}

대전지방식품의약품안전청 유해물질분석과, ¹충남대학교 생물환경화학학과

Monitoring *Bacillus cereus* and Aerobic Bacteria in Raw Infant Formula and Microbial Quality Control during Manufacturing

Woo-Young Jung, Joon-Ho Eom, Byeong-Jo Kim, In-Sun Ju, Chang-Soo Kim, Mi-Ra Kim, Jung-A Byun, You-Gyoung Park, Sang-Hyuck Son, Eun-Mi Lee, Rae-Seok Jung, Mi-Ae Na, Dong-Yeon Yuk, Ji-Yeon Gang, Ok-Sun Heo, and Min-Ho Yoon^{1*}

Hazardous Substances Analysis Division, Daejeon Regional Food and Drug Administration

¹Department of Bio-Environmental Chemistry, College of Agriculture and Life Sciences, Chungnam National University

Abstract The purpose of this study was to examine the presence of *Bacillus cereus*, aerobic bacteria and coliforms in the raw material of infant formulas and investigate the manufacturing process in terms of microbial safety. Among ten kinds of raw infant formula material samples (n=20), *Bacillus cereus* appeared in two (n=4). Aerobic bacteria were not detected in raw infant formula material or maximum 4.15 log CFU/g. Eleven species of aerobic bacteria were isolated and 76% of them were *Sphingomonas paucimobilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizobium radiobacter*, or *Stenotrophomonas maltophilia*. A Pearson's correlation analysis revealed that the most influential factors for detecting *Bacillus cereus* were aerobic bacteria and coliforms. In other words, when the measured values of aerobic bacteria and coliforms were higher, the possibility that *Bacillus cereus* would appear increased. In a regression model to predict *Bacillus cereus*, the rate of appearance was correlated with aerobic bacteria and coliforms, and its contribution rate for effectiveness was 86%. Improving microbial quality control by pasteurization, spray dry, popping and extrusion resulted in a decrease in the numbers of *Bacillus cereus*, aerobic bacteria and coliforms in the raw materials. The results suggest that a hazard analysis and critical control point system might be effective for reducing microbiological contamination.

Key words: *Bacillus cereus*, aerobic bacteria, infant formulas, coliforms, microbial quality control.

서 론

영·유아용 식품은 성인이 섭취하는 식품과는 다르게 국내의 경우 식품공전(2008년, 식품의약품안전청)에서 대장균군(coliforms) 음성, *Bacillus cereus*는 10² CFU/g 이하로 미생물 기준을 설정, 관리되고 있다. 영·유아는 성인과 달리 오염된 식품을 섭취하여 발생하는 세균성 설사나 장염 등에 의해서도 신체적, 경제적 손실이 크게 발생함에 따라 완제품이나 원료에 대한 미생물학적 오염현황을 제어하고 조사할 필요가 있다. Park 등(1)은 국내 판매 영·유아용 조제분유 99종의 제품 중 일반세균(aerobic bacteria)은 92종 제품에서 검출(92%), 대장균군은 12종 제품에서 검출(12%), *B. cereus*는 29종 제품에서 검출(29%) 되었다고 하였다. 영·유아가 섭취하는 제품에서 일반세균, 대장균군, *B. cereus* 검

출로 인한 위해발생이 상존함에 따라 원료에서의 미생물과 완제품 제조공정에서 오염을 제어하기 위한 체계적인 연구가 필요하다. 그러나, 완제품과 원료에 대한 제조공정 특성을 고려한 미생물학적 오염현황에 대한 체계적인 연구는 부족하다.

*Bacillus cereus*는 토양 및 야채, 곡류, 우유 등 식품 원료에서도 흔히 발견되는 그람양성균으로, 대부분의 식품 가공 처리 과정에서 생존 가능한 포자 형성균이다(2,3). *B. cereus*는 구토형 및 설사형의 두가지 유형의 식중독을 일으킨다(4). 구토형 식중독은 특정 *B. cereus*에 오염된 식품에서 균들이 증식하면서 생성된 대사산물인 cereulide라는 내열성의 펩타이드 독소를 섭취한 경우 발생된다(5). 식중독 역학조사 자료에 의하면, 학교 및 보육 시설, 식당에 공급된 우유, 볶음밥, 샐러드, 파스타 및 주스 등이 *B. cereus* 식중독의 원인식품으로 밝혀졌으며, 오염농도는 1.30 log CFU/g-9.00 log CFU/g인 것으로 보고하였다(6).

Duc 등(7)은 영아용 곡류조제식의 섭취로 인하여 12개월과 9개월의 유아에게 격렬한 구토를 동반한 식중독이 발생되었고, Rowan 등(8)은 유럽의 여러 나라에서 유통되는 100여개 조제분유에 대하여, 호냉성 *B. cereus* 검출유무와 설사형 독소 검출을 조사하였다. Sarrías 등(9)은 스페인에서 생산되는 쌀에 대해서 모니터링 한 결과, 모든 검체에서 *B. cereus*를 분리하였다. Reyes 등(10)에 의하면 칠레의 학교급식에 사용되는 분말유에 대한 *B.*

*Corresponding author: Min-Ho Yoon, Department of Bio-Environmental Chemistry, College of Agriculture and Life Sciences, Chungnam National University. Daejeon 305-764, Korea

Tel: 82-42-821-6733

Fax: 82-42-823-9241

E-mail: mhyoon@cnu.ac.kr

Received January 27, 2010; revised March 2, 2010;

accepted March 30, 2010

cereus 시험을 한 결과, 45.9%에서 *B. cereus*가 검출되었으며, 검출된 시료 중 84%에서 오염농도는 2.00 log CFU/g 이하를 나타내었다. Rowan 등(8)은 유럽의 여러 나라에서 유통되는 100여개 조제분유에 대하여, 호냉성 *B. cereus* 검출유무와 설사형 독소를 검출하였다. 이 중 38 균주가 분리되었고, 5.00 log CFU/mL 이상에서 장독소가 검출되었다. Wijnands 등(11)은 네델란드의 8개의 식품군에서의 *B. cereus*의 검사를 실시하였으며, 그로부터 분리된 균주들에 대하여 독소 gene 확인시험을 한 결과, 모두 하나 이상의 enterotoxin gene을 보유하였으나, cereulide 생성균의 빈도는 낮았다고 보고하였다. 본 연구에서는 미생물학적 오염현황을 알아보기 위해 *B. cereus*, 대장균군, 일반세균수를 조사하였으며, 일반세균을 동정하여 오염균종을 파악하고자 하였다. 또한, 영·유아용 식품과 원료에 대한 미생물학적 오염을 제어하기 위한 방안을 조사하기 위해 살균(pasteurization), 분무건조(spray dry), 팽화(popping) 및 압출(extrusion) 등의 열처리 여부를 조사하였다.

재료 및 방법

영·유아용 식품원료 및 제품

2007년 2월부터 2008년 6월까지 식품공전 식품유형 분류[제 4. 식품별 기준 및 규격 중 12. 특수용도식품으로 분류된 조제유류(Milk Formula, MF), 영아용 조제식(Infant Formula, IF), 성장기용 조제식(Follow-up Formula, FF), 영·유아용 곡류 조제식(Cereal based Formula, CF), 기타 영·유아식(Baby Food, BF) 및 영·유아용 특수조제식품(Formula for special Medical Purposes, FMP)]에 의한 6가지 식품유형에 사용하는 주요원재료를 대상으로 하였다. 대상 실험재료는 dextrin(A사, Incheon, Korea), lactose(B사, USA) organic brown rice powder(C사, Anseong, Korea), mixed organic vegetable powder(C사), extrusion rice powder(C사), alpha rice powder(D사, Gwangju, Korea), organic alpha rice powder (D사), lactose(E사, Denver, USA), mixed skim milk powder(F사, Germany), skim milk powder(G사, Yangju, Korea), whole milk powder(G사), Infant formula M(H사, Gongju, Korea)을 사용하였다.

대장균군 및 일반세균수 측정방법

해당 검체를 25 g을 취하여 멸균 생리식염수 225 mL를 가하고 Pulsifier(PUL 100E, Microgen Bioproducts, Camberley, Surrey, UK)로 15초간 혼합하여 시험용액으로 하고, 시험용액 1 mL와 각 단계 희석액 1 mL를 2배 이상의 세균수 측정용 plate count agar (Oxoid, Hampshire, England)에 접종하여 35±1에서 24-48시간 배양(Yeon-u E.N.G, BI-125-4S, Daejeon, Korea)한 후 생성된 집락수를 계산하고 그 평균 집락수를 희석배수에 곱하여 세균수를 산출하였으며, 검출된 세균을 gram stain(BioMeriux, Color Gram 2-F, Hazelwood, MO, USA)한 후 microscope(DM2500, Leica, Wetzlar, Germany)관찰, Vitek® 2(BioMeriux, Inc., Marcy-l'Etoile, France)을 이용하여 생화학적 시험검사를 실시하였다. 또한 대장균군 시험을 위하여, 각 검체의 시험용액 1 mL를 10 mL durham 관을 포함한 lactose broth(Oxoid, Hampshire, England) 및 brilliant green lactose broth(BD, Le pont de claux, France)에 가하고, incubator(BI-125-4S, Yeon-u E.N.G) 35±1°C에서 48±3시간 배양하고 가스 발생 여부를 관찰하였다.

Bacillus cereus 오염도 조사방법

Bacillus cereus 측정을 위하여, 멸균된 인산완충 희석액으로 균

질화한 검액을 한 백금이를 MYP 한천배지(Oxoid)에 접종하여 30°C에서 48시간 배양(BI-125-4S, Yeon-u E.N.G)하여 전형적인 집락을 선별하였다. 정량시험으로는 균질화된 검액 총 1 mL를 5개의 MYP 한천배지(Oxoid)에 나누어 접종한 후, 30°C에서 24시간 배양하였다. 전형적인 집락을 보통한천배지(Oxoid)에 계대하여 배양시킨 균들은 gram stain(BioMeriux), β-Hemolysis 여부를 관찰하였고, 또한 API 50CHB, API 20E(BioMeriux), Vitek® 2(BioMeriux)를 이용한 생화학적 시험검사를 통하여 *B. cereus*를 확인하였다. 또한, *B. cereus*로 확인된 경우라도 *B. cereus*와 *B. thuringiensis*를 구분하기 위해, gram stain(BioMeriux) 후에 microscope (Leica, DM2500)를 통해 1,000 배율로 확대하여 crystal-forming인 경우 *B. thuringiensis*로 구분하였다.

영·유아용 식품원료의 미생물 오염도 및 미생물학적 품질관리 방안 조사방법

영·유아용 식품의 미생물 오염에 대하여 원재료 유래 여부를 파악하기 위하여, 영·유아용 식품원료 10종인 dextrin(A사), lactose(B사)/lactose(E사), organic brown rice powder(C사), mixed organic vegetable powder(C사), extrusion rice powder(C사), alpha rice powder(D사), organic alpha rice powder(D사), mixed skim milk powder(F사), skim milk powder(G사), whole milk powder (G사)의 일반세균, 대장균군, *B. cereus*를 측정하여 미생물 품질수준을 파악하였다.

미생물 품질수준이 파악된 영·유아용 식품원료 10종을 이용하여 완제품으로 가공하였을 경우 완제품 가공공정에 설정된 드럼건조(drum drying, drum surface temperature: 100-135°C), 분무건조(spray drying, inlet air temperature: 135-204°C), 살균(pasteurization, UHT 130-150°C/1-4 sec), 미생물 저감화 방안(hazard analysis and critical control point system)이 적정한지를 평가하기 위해 제조공장(H사)에서 미생물 품질수준이 파악된 영·유아용 식품원료 10종으로 가공한 완제품 Infant formula M(H사)의 일반세균, 대장균군, *B. cereus*를 측정하였다. 즉, 완제품 Infant formula M(H사)의 제조공정에 대장균군, *B. cereus* 등에 오염된 원료를 배합, 가공하여 완제품에 미치는 영향을 파악하고자 하였다.

또한, 영·유아용 식품을 제조할 경우, 대장균군, *B. cereus* 등의 미생물 품질관리 방안을 조사하기 위해 국·내외 발표된 문헌을 조사하였으며, 상용화된 영·유아용식품 설비 제조업체인 Niro(Copenhagen Denmark)사의 권장 제조방법을 조사하였다. 이를 통해, 국·내외 문헌 및 상용화된 영·유아용 식품 설비 제조업체인 Niro사의 권장 제조공정과 본 연구에 사용된 Infant formula M(H사) 제조사의 미생물 품질관리 방안의 적합성을 비교하여, 미생물 적으로 안전한 영·유아용 식품의 생산가능성을 파악하고자 하였다.

통계적 방법

영·유아용 식품원료의 *B. cereus* 검출과 일반세균수, 대장균군 인자가 미치는 영향을 알아보기 위해 *B. cereus* 검출율과 일반세균수, 대장균군에 대한 상관분석을 실시하여 Pearson 상관계수를 구하였고, 유의성 검정을 실시하였다. 또한, *B. cereus* 검출을 예측하기 위하여 회귀분석을 실시하여 출현 예측모델을 구하였다. 통계처리는 SPSS ver. 17.0(SPSS Inc., USA)에서 실시하였다.

결과 및 고찰

영·유아용 식품원료의 미생물 오염도 조사결과

본 연구에서는 각 원료에 대한 일반세균수를 알아보기 위해 영·유아용 식품원료 10종(n=20) 검사결과 4종(n=8)에서 검출(40%) 되었으며, 3.21 ± 3.64 log CFU/g으로 나타났으며, 최고 4.15 log CFU/g에서 최저 1.86 log CFU/g(검출한계 10^1 CFU/g)의 분포를 보였다. Table 1과 같이 영·유아용 식품원료인 skim milk powder(G사, NO. 1, n=2), whole milk powder(G사, NO. 2, n=2), mixed skim milk powder(F사, NO. 3, n=2), lactose(E사, NO. 4, n=1)/lactose(B사, NO. 4, n=1), dextrin(A사, NO. 5, n=2), organic brown rice powder(C사, NO. 6, n=2), mixed organic vegetable powder(C사, NO. 7, n=2), alpha rice powder(D사, NO. 8, n=2), organic alpha rice powder(D사, NO. 9, n=2), extrusion rice powder(C사, NO. 10, n=2)를 사용하여 생산된 제품인 Infant formula M(H사, NO. 11, n=2)에서는 일반세균수, 대장균군, *B. cereus*가 검출되지 않았다(Table 1).

영·유아용 식품원료에서 분리된 일반세균 분포를 조사한 결과 총 11종이 분리 되었으며, 분리된 일반세균 중 76%를 차지하는 우점종은 *Sphingomonas paucimobilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizobium radiobacter*, *Stenotrophomonas maltophilia* 순으로 나타났다(Table 2). 분리된 균종 중 *S. paucimobilis*, *P. fluorescens*는 전체의 50% 이상을 나타내 영·유아용 식품원료의 주요 오염균으로 나타났다.

대장균군은 총 10종(n=20)의 원료 중 organic brown rice powder(C사) 1종(n=2)에서 1.00 log CFU/10 g으로 검출(10%) 되었으며, 다른 원료에서는 대장균군이 검출되지 않았다. 총 10종(n=20)의 원료 중 *B. cereus*가 검출된 원료는 2종(n=4, 20%)이었으며, 1.02 ± 1.36 log CFU/g으로 나타났으며 최고 1.81 log CFU/g에서 최저 1.60 log CFU/g(검출한계 10^1 CFU/g)의 분포를 보였다. *B. cereus*가 검출된 원료로는 기타가공품의 유형인 organic brown rice powder(C사) 및 mixed organic vegetable powder(C사) 이었으며, 검출된 *B. cereus*의 동정결과는 Table 3에 나타내었다. 한편, *B. cereus* 확인을 위해서는 선택배지 외에도 추가 확인시험이 요구된다는 것을 알 수 있었다. 생화학 시험으로는 *B. cereus*와 *B. thuringiensis*의 분류가 불가능하고 *B. thuringiensis*가 생성하는 toxin crystal 확인을 통하여 분류할 수 있다(12,13). 그러나, Hsieh 등(14)은 *B. thuringiensis* 역시 *B. cereus*와 같은 장독소들을 생산하고 병원성도 같다고 분류하였으므로, 두 종을 구별할 필요가 없이 *B. cereus* group으로 함께 관리하는 것이 합리적이라고 사료되나 식품 중 두 균종을 구분할 수 있는 시험방법이 식품공전에 명시 되어야 할 것으로 판단된다. 본 연구에서는 *B. cereus*와 *B. thuringiensis* 검출율을 비교한 결과 crystal-forming인 *B. thuringiensis*가 10%, *B. cereus*가 90%로 *B. cereus*가 우세하였다.

본 연구에서는 *B. cereus*의 검출에 영향을 주는 환경인자를 조사하기 위해 Pearson 상관분석을 실시한 결과, 일반세균수와 대장균군이 *B. cereus* 검출에 영향을 미치는 것으로 나타났고, 일반세균수와 대장균군 검출이 높을수록 *B. cereus*의 검출가능성이 증

Table 1. Microbial distribution in major ingredients of food and infant formulas

NO ³⁾	Ingredients	Manufacture Process	Microbiological Level (n=22)		
			APC ¹⁾ (log CFU/g)	Coliforms (log CFU/10 g)	<i>B. cereus</i> (log CFU/g)
1	Skim milk powder (n=2)	Centrifuge→Homogenization→Cream separation→Pasteurization→Spray drying	NG ²⁾	NG	NG
2	Whole milk powder (n=2)	Centrifuge→Homogenization→Pasteurization→Spray drying	NG	NG	NG
3	Mixed skim milk powder (n=2)	Centrifuge→Cream separation→Pasteurization→Cheese→Whey separation	1.86	NG	NG
4	Lactose (n=2)	Centrifuge→Cream Separation→Pasteurization→Cheese→Whey Removal	NG	NG	NG
5	Dextrin (n=2)	Protein Separation→Spray drying	NG	NG	NG
6	Organic brown rice powder (n=2)	Milling→Foreign matter removal→Grinding→Packing	4.15	1.00	1.81
7	Mixed organic vegetable powder (n=2)	Drying→Foreign matter removal→Grinding→Packing	3.41	NG	1.60
8	Alpha rice powder (n=2)	Milling→Foreign matter removal→Popping→Grinding→Packing	NG	NG	NG
9	Organic alpha rice powder (n=2)	Milling→Foreign matter removal→Popping→Grinding→Packing	NG	NG	NG
10	Extrusion rice powder (n=2)	Milling→Foreign matter removal→Extrusion→Grinding→Packing	2.07	NG	NG
11	Infant formula M (n=2)	Preparation Mixing→Gelatination→Drum drying and crushing→Granulation→Mixed cold→processing material→Storing in silo→Gas packing & sealing→Box packing	NG	NG	NG

¹⁾APC: aerobic total cell count, each value means the average of replicate results.

²⁾NG: negative.

³⁾NO: 1-10, ingredients of food; 11, end product.

Table 2. Cultural characteristics, viable cell counts and identification of microorganism in raw material of foods for infants and young children

Characteristics	Isolation groups of microorganisms ¹⁾			
	Strain A	Strain B	Strain C	Strain D
Cultural characteristics of colony				
Size (diameter, mm)	2-4	4-7	2-4	1-3
Shape	Circular	Circular	Circular	Circular
Margin	Entire	Entire	Ciliate	Entire
Color	Yellow	White	White or beige	Brown
Motility	Motile/nonmotile	Motile	Motile	Motile
Identification				
Gram staining	Negative	Negative	Negative	Negative
Size (wide×length, μm)	0.2-1.4×0.5-4.0	0.5-1.0×1.5-5.0	0.5-1.0×1.2-3.0	0.5×1.5
Oxygen demand	Aerobic	Aerobic	Aerobic	Aerobic
Catalase test	+	+	+	+
Oxidase test	+/-	+	+	-
Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE	+	-	-	+
ADONITOL	-	-	+	-
L-Pyrrolyl-ARYLAMIDASE	-	+	-	-
BETA-GALACTOSIDASE	+	-	+	-
H ₂ S PRODUCTION	-	-	+	-
BETA-N-ACETHYL-GLUCOSAMINIDASE	-	-	-	+
Glutaryl Arylamidase pNA	+	-	-	-
D-GLUCOSE	-	+	+	-
GAMMA-GLUTAMYL-TRANSFERASE	-	-	-	+
BETA-GLUCOSIDASE	-	-	+	+
D-MANNOSE	-	+	+	-
BETA-XYLOSIDASE	-	-	+	-
L-Proline ARYLAMIDASE	-	+	-	+
PARATINOSE	-	-	+	-
Tyrosine ARYLAMIDASE	+	+	+	-
D-SORBITOL	-	-	+	-
SACCHAROSE/SUCROSE	-	-	+	-
D-TAGATOSE	-	-	+	-
D-TREHALOSE	-	-	+	-
CITRATE (SODIUM)	-	-	-	+
MALONATE	-	-	-	+
ALPHA-GLUCOSIDASE	+	-	+	-
SUCCINATE alkalisation	-	-	-	+
ALPHA-GALACTOSIDASE	-	-	+	-
PHOSPHATASE	-	-	-	+
Glu-Gly-Arg-ARYLAMIDASE	-	-	-	+
Species identification	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Rhizobium radiobactor</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Confidence by Vitek® 2 system (%)	98	99	95	99

¹⁾Isolation groups of microorganisms: +(positive), -(negative).

가되는 경향을 나타내었다(Table 4). 회귀분석을 통한 *Bacillus cereus* 출현 예측 모델은 아래식과 같이 도출되었으며, 회기식의 유효성을 나타내는 기여율은 86%로 평가 되었다(Table 5).

$$Bacillus\ cereus = 2.252 + 0.007[\text{total colony counts}] - 3.616[\text{Coliforms}]$$

(R=0.934, R²=0.873, adjusted R²=0.858, p<0.01).

Kim 등(15)은 미곡창고 오염균주에 대한 연구에서 *S. paucimobilis*, *Arthrobacter atrocyaneus*가 전체의 50% 이상을 차지하는 주요 오염균으로 나타났다고 한 바 있으며, 시금치를 포함한 대부

분의 야채는 물을 함유하고 있음으로 미생물이 증식하기에 적당하다고 한 바 있다(16). 본 연구에서 영·유아용 식품의 주요 원료에서 분리된 균종 중 *S. paucimobilis*는 Kim 등(15)이 미곡창고로부터 분리한 오염균주에 대한 연구결과와 일치하였다.

원유(raw milk)를 원재료로 가공한 원료에서는 모두 *B. cereus*가 검출되지 않았으며, 일반세균수는 mixed skim milk powder(F사, Germany)에서 1.86 log CFU/g으로 나타났다. 곡류나 야채를 원료로 생산된 원료에서의 *B. cereus*가 검출 되었으며, 일반세균수는 organic brown rice powder(C사)에서 4.15 log CFU/g으로,

Table 3. Biochemical patterns of *Bacillus cereus* observed by Vitek® 2

No	Biochemical details	Result ¹⁾	No	Biochemical details	Result ¹⁾
1	BETA-XYLOSIDASE	-	24	D-MANNITOL	-
2	L-Lysine-ARYLAMIDASE	-	25	D-MANNOSE	+
3	L-Aspartate ARYLAMIDASE	-	26	D-MELEZITOSE	-
4	Leucine ARYLAMIDASE	-	27	N-ACETHYL-D-GLUCOSAMINE	+
5	Phenylalanine ARYLAMIDASE	+	28	PALATINOSE	-
6	L-Proline ARYLAMIDASE	-	29	L-RHAMNOSE	-
7	BETA-GALACTOSE	-	30	BETA-GLUCOSIDASE	+
8	L-Pyrrolyl-ARYLAMIDASE	+	31	BETA-MANNOSIDASE	-
9	ALPHA-GALACTOSIDASE	-	32	PHOSPHORYL CHOLINE	-
10	Alanine ARYLAMIDASE	-	33	PYRUVATE	+
11	Tyrosine ARYLAMIDASE	-	34	ALPHA-GLUCOSIDASE	-
12	BETA-N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE	+	35	D-TAGATOSE	-
13	Ala-Phe-Pro ARYLAMIDASE	-	36	D-TREHALOSE	+
14	CYCLODEXTRINE	-	37	INULIN	-
15	D-GALACTOSE	-	38	D-GLUCOSE	+
16	GLYCOGENE	-	39	D-RIBOSE	+
17	myo-INOSITOL	-	40	PUTRESCINE assimilation	-
18	METHYL-A-D-GLUCOPYRANOSIDE acidification	-	41	GROWTH IN 6.5% NaCl	+
19	ELLMAN	-	42	KANAMYCIN RESISTANCE	+
20	METHYL-D-XYLOSIDE	-	43	OLEANDOMYCIN RESISTANCE	-
21	ALPHA-MANNOSIDASE	-	44	ESCURIN hydrolyse	+
22	MALTOTRIOSE	+	45	TETRAZOLIUM RED	+
23	Glycine ARYLAMIDASE	+	46	POLYMXIN_B RESISTANCE	+

¹⁾Result: + (positive), - (negative).

mixed organic vegetable powder(C사)에서 3.41 CFU/g으로, extrusion rice powder(C사)에서 2.07 log CFU/g으로 각각 나타났다.

다른 원료에 비하여 일반세균수가 3.41 log CFU/g 이상으로 검출된 원료에서 *B. cereus*는 organic brown rice powder(C사)에서 1.81 log CFU/g, mixed organic vegetable powder(C사)에서 1.60 log CFU/g으로 검출되었다. 이들 두 원료들의 가공공정을 살펴보면 도정(milling), 이물제거 및 단순 분쇄(grinding)를 거쳐 제조되었다. 이는 원료의 가공공정에서 포함된 살균(pasteurization), 분무건조(spray dry), 팽화(popping) 및 압출(extrusion) 등의 열처리 공정이 없는 것을 알 수 있었다. Hwang 등(1)은 국내 대형마트에서 유통 중인 조제분유의 미생물 검사결과 일반세균수는 1.83±0.68 log CFU/g으로 나타났으며 최고 4.50 log CFU/g 최저 1.00 log CFU/g의 분포를 보인하고 하였으며, *B. cereus*는 0.69±0.32 log CFU/g으로 나타난다고 한 제품 분석결과와 비교하면 원료로부터 일반세균과 *B. cereus*가 제품으로 미생물 오염이 전이(carry over) 가능함을 유추할 수 있었다.

영·유아용식품의 미생물학적 품질관리 방안 조사결과

본 연구에서는 영·유아용 식품원료의 경우, 제조공정에 살균, 분무건조, 팽화 및 압출 등의 열처리 공정이 없는 경우에는 일반세균, 대장균군, *B. cereus*의 검출 가능성이 상재되어 있음을 알 수 있었다(Table 1). 그러나, 대장균군, *B. cereus*가 오염된 원료를 가공하여 생산된 완제품 Infant formula M(H사, Kongju, Korea)의 경우는 일반세균, 대장균군, *B. cereus*가 검출되지 않았으며 이를 통해 안전한 영·유아용 식품생산이 가능함을 확인 하였다(Table 1). Fig. 1과 같이 Infant formula M(H사)의 경우 제조공정상에 설정된 미생물 제어공정으로 드럼건조(drum drying, drum surface temperature: 100-135°C), 분무건조(spray drying, inlet air tempera-

ture: 135-204°C), 살균(UHT 130-150°C/1-4 sec), 미생물 저감화 방안(hazard analysis and critical control points, HACCP)이 있었다. 이를 통해 안전한 영·유아용 식품의 미생물학적 품질관리가 가능한 것으로 확인 되었다.

대장균군, *B. cereus* 등의 미생물 품질관리 방안으로 설정된 국·내외 발표 문헌과 상용화된 영·유아용 식품 설비 제조업체인 Niro사의 권고 제조방법을 조사한 결과, 영·유아용 식품원료에 대장균군, *B. cereus* 등의 유해성 미생물의 오염가능성이 상재되어 있음에 따라 안전한 영·유아 식품의 생산을 위한 미생물학적 품질관리 방안을 다음과 같이 제시하고 있다. 영·유아용 식품의 제조공정은 크게 세 가지로 분류할 수 있다. 모든 원료 성분들이 건조된 분말상태로 공급되어 수화과정(hydration)없이 혼합되는 분말배합공정(dry blending)과 각 원료성분들이 액상으로 조제되어 살균·건조되는 액상배합공정(wet-mix process) 공정이 있으며, 또한 액상배합공정에 분말배합공정이 결합된 통합공정이 있다(17). 분말배합공정은 수화과정이 없으므로 제품의 제조 공정과정에서 *B. cereus*가 증식될 가능성은 희박하나, 원료자체의 *B. cereus*의 오염수준이 최종제품의 오염수준을 좌우하게 된다. 따라서 엄격한 원료관리를 통하여 영·유아용 식품에서 효과적인 *B. cereus* 관한 안전한 관리를 할 수 있을 것으로 사료된다. 영·유아용 식품의 생산 공정인 액상배합공정은 각 원료들을 액상인 상태로 조제되고, 이를 균질(homogenization) 하고 열처리(pasteurization)한 후, 분무건조(spray dry) 하는 공정이다(17,18). 이때, 열처리에 의해 쉽게 파괴되는 비타민류 등은 분무건조 된 후, 다시 혼합될 수 있는데, 이것이 통합공정이며 액상배합공정 및 통합공정에서는 일부 공정들이 미생물의 오염, 증식 또는 사멸 등에 영향을 줄 수 있다(17,18). Jung 등(19)은 초유(colostrum)를 분무건조(spray dry)할 경우 대장균군은 3.14 log CFU/mL에서

Table 4. Pearson correlation between *Bacillus cereus*, total colony counts and coliforms

Item	T.S ¹⁾	Coliforms	<i>Bacillus cereus</i>
T.S ¹⁾	1.000	0.940**	0.920**
Coliforms	0.940**	1.000	0.809**
<i>Bacillus cereus</i>	0.920**	0.809**	1.000

¹⁾T.S: total solids.

**Marked correlations are significant at $p < 0.01$.

불검출로 사멸되었고, 일반세균수는 6.47 log CFU/mL에서 3.94 log CFU/mL로 감소한다고 하였으며, 이는 분무건조(spray dry) 공정에서 열풍에 의해 미생물이 사멸함을 의미한다. 본 연구의 수행을 위해 확인한 제조공정은 통합공정으로 영·유아용 식품이 제조되고 있었다. 조제분유와 조제식은 원료 중 유성분의 함량으로 구분되며, 두 식품유형의 제조공정에는 특이한 차이는 없었다. 그러나, 곡류, 두류, 서류 등 전분질 원료를 주원료(최종제품에서 고형분 기준 25% 이상)로 하는 곡류조제식은 조제분유 및 조제식과는 제조 공정에 차이가 있었다(17,18).

Bryan(20)은 조제분유와 이유식에 주요 원료로 사용하는 원유(raw milk)에 결핵(tuberculosis), 브루셀라병(brucellosis), 디프테리아(diphtheria), 성홍열(scarlet fever), Q-열(Q-fever), 위장염(gastroenteritis) 등과 *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*와 같은 병원성 미생물의 오염 가능성을 제기하였고, Muytjens 등(21)은 35개 국가에서 생산하는 141개의 조제분유의 52%에서 Enterobacteriaceae를 분리하였다. Park 등(22)은 우유를 UHT(ultra high temperature)살균 후 보존할 경우 포자형성균 발아 가능성이 있다고 하였다. 따라서 살균을 통한 병원성 미생물의 제어가 필요하나, 조제분유 제조를 위해 과도한 살균은 제품의 품질저하를 가져온다고 보고 하였다(23,24).

조제분유와 영·유아용 곡류조제식은 집유된 원유(raw milk)를 청정(clarification)한 후, 필요에 따라 살균(sterilization)하여 농축(concentration)하게 된다(25). 원유(raw milk)의 예비살균은 영양제 포상상태의 다른 경쟁균들은 사멸시켜, 상대적으로 *B. cereus* 등의 포자에게 생육하기 적절한 환경을 제공할 수 있다(22,26). 이같이 처리된 원유에 우유유도체, 분리대두단백, 탄수화물, 지질, 광물질, 비타민, 식품을 원료로 하여 제조된다(17,18).

조제공정이 진행되는 동안의 온도와 소요시간은 각 원료성분의 특성과 제조회사별로 차이가 있으나, 통상 50-70°C에서 조제되므로 포자상태의 *B. cereus*가 영양제포로 바뀌는 발아(germination)가 일어날 수 있다(27). 이때 살균조건은 제품의 특성이나 제조회사별로 차이가 있을 수 있으나, 130-150°C에서 1-4초 동안 열처리하는 UHT 살균 또는 72-75°C에서 15초 동안 열처리하는 HTST, 63-65°C에서 30분 동안 열처리하는 LTLT 살균방법이 채택될 수 있다(28). 이 같은 살균공정이 부적절할 경우 미생물 포자가 사멸되지 않고 생존할 수 있다(22). 살균이 끝난 조제농축

액은 135-204°C의 열풍을 유입하여 건조하며 건조기 밖으로 분유화 함께 방출되며 건조공정품의 품온은 45-80°C에 이른다(17,18).

Bacillus cereus 포자의 발아(germination) 온도는 60-85°C이며(29), D-value는 90°C에서 1.1 min이라고 보고하였다(30). Choi 등(31)은 미분(*Oryza sativa*)을 65°C에서 15 min 열풍으로 처리할 경우 *B. cereus*는 4.46 log CFU/g에서 0.14 log CFU/g으로 96.9% 감소하였다고 하였다.

따라서, 조제분유와 영·유아용 곡류조제식의 제조공정에서 *B. cereus* 포자의 발아를 위한 온도 유지와 90°C 이상의 열처리는 미생물 제어를 위한 방안으로 작용함을 알 수 있었다(18,27,31,32). 사용된 원료 중 *B. cereus*의 오염도가 가장 높았던 영·유아용 곡류조제식의 완제품 제조공정을 살펴보면, 곡류 등의 탄수화물 원료와 탈지분유나 유단백등의 단백질원 및 oil 등을 배합하여 수화한 후, 조제액을 호화(gelatination) 시킨다(18). 호화 온도는 제품의 특성에 따라 60-85°C 설정하게 되며, 포자상태의 *B. cereus*는 germination이 될 수 있다(32). 조제액(영양성분을 함유한 식품 원료를 수화시킨 용액 상태의 공정품)을 혼합하고 호화시킨 후 drum dryer에서 표면온도가 100-135°C로 건조 후 mill sifter 등으로 분쇄되며, 건조시의 열처리 조건은 Lee 등(32)이 언급한 영양제포 및 포자상태의 *B. cereus*를 제어할 수 있는 수준을 충족한다. 건조·살균된 공정품은 용해 및 분산성을 높이기 위한 과립화(granulation)를 거치고(29), 유산균이나 비타민 같은 열에 약한 비가열 원료들이 분말상태로 배합되며, Lee 등(32)이 언급한 *B. cereus*를 제어할 열처리 공정이 없는 공정인 저장, 가스충전, 권체 및 포장에 위한 환경적 요인을 통해서 미생물은 오염이 가능함을 추정할 수 있다. 영·유아용 식품의 원료는 *B. cereus*나 대장균군이 오염되어 있을 경우라도 열처리 공정이 *B. cereus*와 대장균군의 사멸조건을 충족할 경우, 열처리 공정이 없는 저장, 가스충전, 권체 및 포장에 위한 환경적 요인을 통한 미생물 오염이 되지 않는다면 안전한 제품의 생산이 가능할 것으로 유추할 수 있다.

Keum은(26) 우유내 병원성미생물의 오염을 최소화 하기위해 고안된 HACCP을 도입하여 원료의 생산에서부터 완제품 제조, 수송단계에 이르기까지 체계적인 관리의 필요성이 있다고 하였다. 조제분유의 Enterobacteriaceae 오염을 감소시키기 위해 HACCP에서 환경모니터링을 포함한 제조공장 위생관리 프로그램 시행의 필요성 및 조제분유 섭취단계에서 급여직전 70-90°C의 가열처리를 통한 오염수준 감소에 대하여 언급된 바 있다(17).

영·유아 식품 제조사는 미생물을 포함한 영·유아식의 안전성 확보를 위해 제조공정 및 설비 등의 교체, HACCP 적용 등 많은 노력을 기울이고 있으며(33), 외부 부유 미생물 등 혼입방지를 위하여 포장실 출입시 발판을 소독하고, air shower 및 hepa filter를 설치하여 10⁴ class 이하로 유지하였고, 포장 및 충전실은 향온, 향습의 공기가 공급되도록 하였다. 제조공정은 원료투입 공정을 제외하고 모두 밀폐된 공간에서 auto/semi auto system으로

Table 5. Regression summary for dependent variable

Item	Unstandardized coefficients		Standardized coefficients	t	p-value	R ²	adjusted R ²	
	B	Std. error of B	Beta					
B.C ¹⁾	Constant	2.252	2.086	-	1.079	0.296	0.873	0.858
	T.C.C ²⁾	0.007	0.001	1.374	5.417	0.000	-	-
	Coliforms	-3.616	1.899	-0.483	-1.904	0.074	-	-

¹⁾B.C: *Bacillus cereus*, ²⁾T.C.C: total colony counts.

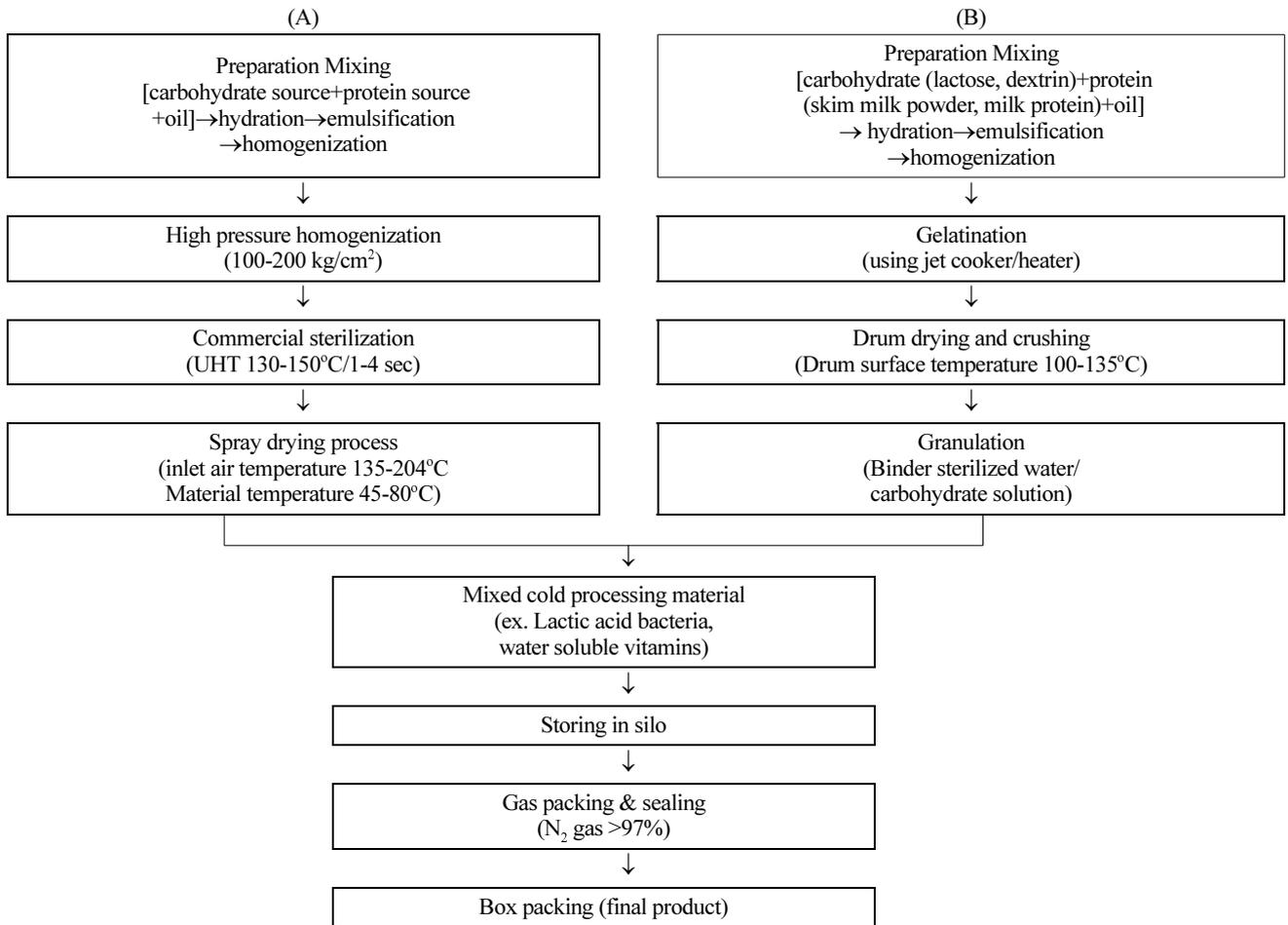


Fig. 1. An example of manufacturing process of milk/infant/formula (A) and cereal based formula (B).

생산되었다. 한국은 3월을 전후하여 발생하는 황사로 인하여 포자생성 미생물의 오염가능성이 높아짐에 따라, 특정 기간동안 부유 미생물을 집중적으로 관리할 필요가 있다(34). 그 외에도 금속성 이물 제거를 위한 자선기(10⁴ gauss) 및 금속탐지기(metal detector) 설치 및 불포화 지방 등의 산패억제, 충란(parasitic eggs) 발아 방지를 위하여 고순도의 질소가스 충전 등을 통하여 영·유아 식품이 안전하게 관리되고 있었다(25,33).

요 약

영·유아용 식품에 주로 사용되는 원료에 대한 미생물 오염도를 조사한 결과, 총 10종(n=20)의 원료 중 *B. cereus*가 검출된 원료는 2종(n=4, 20%) 이었고, 1.02±1.36 log CFU/g으로 나타났으며, *B. cereus*가 검출된 원료로는 organic brown rice powder(C사)와 mixed organic vegetable powder(C사) 이었다. 미생물이 검출되지 않거나 낮게 검출된 원료는 제조공정에 살균, 분무건조, 팽화 및 압출 등의 열처리 공정이 있었다. 각 원료에 대한 일반세균수를 알아보기 위해 10종(n=20) 검사결과 4종(n=8) 검출(40%) 되었으며, 3.21±3.64 log CFU/g으로 나타났다. 원료에서 분리한 미생물 분포를 조사한 결과 총 11종이 분리 되었으며, 분리된 일반세균 중 76%를 차지하는 우점종은 *S. paucimobilis*, *P. fluorescens*, *R. radiobactor*, *St. maltophilia* 순으로 나타났다. 본 연구에서는 영·유아식의 미생물 안전성 확보를 위해 원료 생산공정에 살균 등의 열처리 공정이 필요하며, 미생물에 오염된 원료를 사

용할 경우에도 생산공정에 드럼건조(drum surface temperature: 100-135°C), 분무건조(inlet air temperature: 135-204°C), 살균(pasteurization, UHT 130-150°C/1-4 sec), 미생물 저감화 방안의 제조공정을 거쳐 생산된 제품은 일반세균, 대장균군, *B. cereus*가 검출되지 않아 안전한 제품의 생산이 가능하였다. 또한, 영·유아용 식품을 제조할 경우 명확한 살균조건을 설정하고, 공정품의 품질평가를 거쳐야만 제품의 안전성을 확보할 수 있을 것으로 보인다.

문 헌

- Hwang JY, Lee JY, Park JH. Microbiological quality and potential pathogen monitoring for powdered formulas from the local market. Korean J. Food Sci. Anim. Resour. 28: 555-561 (2008)
- Kim SJ, Jung JH, Tahk HM, Baek SY, Lee SY. Effect of factors on the sporulation of *Bacillus cereus* and their thermal resistance. J. Fd. Hyg. Safety 24: 256-261 (2009)
- Ankolekar C, Rahmati T, Labbe RG. Detection of toxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spore in U.S. rice. Int. J. Food Microbiol. 128: 460-466 (2008)
- Kramer JM, Gilbert RJ. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In Foodborne Bacterial Pathogens. Doyle MP (ed). Marcel Dekker Inc, London, UK, pp. 21-70 (1989)
- Monica ES, Fricker M, Scherer S. *Bacillus cereus* the causative agent of an emetic type of food-borne illness. Mol. Nutr. Food Res. 48: 479-487 (2004)
- Yeun CH, Song YB, Yoon CY, Jung WY, Cho SY, Kim MG, Song YM, Lee JH, Kang CS, Kuk JH, Bae MS, Kim JH, Joo IS, Kwak

- IS, Lim CJ, Lee KH, Kim OH. Prevalence of *Bacillus cereus* in foods for infants and young children. The Annual Report of KFDA, Korea. 11: 70-92 (2007)
7. Duc Le H, Dong TC, Lagan NA, Sutherland AD, J.Taylor SM. Cutting, cases of emesis associated with bacterial contamination of an infant breakfast cereal product. Int. J. Food Microbiol. 102: 245-251 (2005)
8. Rowan NJ, Anderson JG. Diarrhoeal enterotoxin production by psychrotrophic *Bacillus cereus* present in reconstituted milk-based infant formulae(MIF). Lett. Appl. Microbiol. 26: 161-165 (1998)
9. Sarrias JA, Valero M, Salmeron MC. Enumeration, isolation and characterization of *Bacillus cereus* strains from spanish raw rice. Food Microbiol. 19: 589-595 (2002)
10. Reyes JE, Bastias JB, Gutierrez MR, Rodriguez MO. Prevalence of *Bacillus cereus* in dried milk products used by children school feeding program. Food Microbiol. 24: 1-6 (2007)
11. Wijnand LM, Dufrenne JB, Rombouts FM, PH in Veld, Leusden FM van. Prevalence of potentially pathogenic *Bacillus cereus* in food commodities in the netherlands. J. Food Protect. 69: 2587-2594 (2006)
12. Park HW, Federici BA. Genetic factors affecting insecticidal crystal protein synthesis in *Bacillus thuringiensis*. Int. J. Indus. Entomol. 1: 1-7 (2000)
13. Choi SY, Cho MS, Kim TH, Kim JS, Park SK, Youn YN, Hong SS, Yu YM. Bioactive characterization of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* CAB133 isolated from domestic soil. Korean J. Appl. Entomol. 47: 175-184 (2008)
14. 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 food-borne outbreaks. J. Applied microbiol. 87: 481-490 (1999)
15. Kim JH, Lee SY, Kim KBWR, Song EJ, Kim AR, Park SM, Han CS, Ahn DH. Antimicrobial activity of electrolyzed alkaline water against spoilage of microorganisms in rice warehouses. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 36: 111-116 (2007)
16. Gillian AF, Christopher T, David O. The microbiological safety of minimally processed vegetables. Int. J. Food Sci. Technol. 34: 1-22 (1999)
17. Choi SH, Lee SB, Choi JW. Microbiological Safety of infant formula and baby food. J. Korean Dairy Technol. Sci. 23: 65-71 (2005)
18. Vagn Westergaard. 5th. Milk Powder Technology Evaporation and Spray Drying. K. Masters, Niro A/S, Copenhagen, Denmark. pp. 1-337 (2004)
19. Jeong SG, Ham JS, Kim DH, Ahn CN, Chae HS, You YM, Kwon IK, Lee SG. Research on the quality characteristics of domestic colostrum according to the processing methods employed. Korean J. Food Sci. Anim. Resour. 29: 457-465 (2009)
20. Bryan FL. Epidemiology of milk-borne diseases. J. Food Protect. 46: 637 (1983)
21. Muytjens HL, van der Roelofs-Willemse H, Jasper GHL. Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the family Enterobacteriaceae. J. Clin. Microbiol. 26: 743-746 (1988)
22. Park SY, Park JM, Yang JO, Jung HK, Chun HN, Lee BH. Microbial qualities and post-pasteurization contaminations of UHT milk produced in Korea. J. Korean Dairy Technol. Sci. 24: 9-18 (2006)
23. Whitney R Mcl. 3rd. Proteins of Milk. Fundamentals of Dairy Chemistry, Van Nostrand-Reinhold, New York, NY, USA, pp. 81-169 (1988)
24. Brown RJ. 3rd. Milk Coagulation and Protein Denaturation. Fundamentals of Dairy Chemistry, Van Nostrand-Reinhold, New York, NY, USA, p. 583 (1988)
25. Jeon JW, Yun SS, Juhn SL, Chun HN. The current quality control and state of scorched particles in infant formula in Korea. Korean J. Dairy Sci. Technol. 25: 55-60 (2006)
26. Keum JS. Pathogenic bacterias in milk and their characteristics. Korean Dairy Technol. 16: 35-43 (1998)
27. Shin HW, Lim YH, Lee JK, Kim YJ, Oh SW, Shin CS. Effect of commercial antimicrobial in combination with heat treatment on inactivation of *Bacillus cereus* spore. Food Sci. Biotechnol. 17: 603-607 (2008)
28. Park SI. A study on the sensory characteristics of virus heat treated milk. J. Fd. Hyg. Safety. 10: 19-22 (1995)
29. Lee SC, Kim EM, Chang KS. Optimization of fluidized bed agglomeration in the production of weaning food. Food Eng. Progress. 11: 89-95 (2007)
30. Cho YS, Jung EY, Lee MK, Yang CY, Shin DB. Survival, isolation, and characterization of *Bacillus cereus* from sunshik. J. Fd. Hyg. Safety. 23: 343-347 (2008)
31. Choi BK, Park SY, Ha SD, Kum JS, Lee HY, Park JD. Effect of drying methods of rice flour on growth properties. Korean J. Food Sci. Technol. 39: 295-298 (2007)
32. Lee MS, Chang DS. Growth rate of *Bacillus cereus* and heat resistance of its spores. Korean J. Food Sci. Technol. 14: 11-15 (1982)
33. Woon JH, Lee JY, Lim KJ. Strengthening measures of the hygiene control for infant formula based on milk. Safe Food 2: 5-19 (2007)
34. Bae KW, Kim JH, Kim YS, Park JS, Jee YK, Lee KY. Microbiological identification and distribution of metal components in suspended particulate matter during yellow sand phenomena at Taean region in 2003. Tuberculosis Resp. Dis. 58: 167-173 (2005)