

자몽종자추출물, EDTA와 열 병행에 의한 *Bacillus cereus* 포자 불활성화 상승효과

양승국¹ · 김정지¹ · 김석중² · 오세욱^{1*}

¹국민대학교 식품영양학과
²동덕여자대학교 식품영양학과

Synergistic Effect of Grapefruit Seed Extract, EDTA and Heat on Inactivation of *Bacillus cereus* Spore

Seung-Kuk Yang¹, Jung-Jee Kim¹, Seok Joong Kim², and Se-Wook Oh^{1*}

¹Dept. of Food and Nutrition, Kookmin University, Seoul 136-702, Korea

²Dept. of Food and Nutrition, Dongduk Women's University, Seoul 136-714, Korea

Abstract

The efficacy of antimicrobial agents and heat treatments on spore inactivation was investigated. Grapefruit seed extract (GFE) and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) were used and as antimicrobial agents, and heat treatments were conducted at 70°C, 80°C, and 90°C for 30 minutes. Heat treatments at 90°C were the most effective on spore inactivation as a single treatment and caused a 2.3 log reduction. When combined with a single treatment to discover synergistic effects, 1% GFE with 80°C heat treatments and 0.5 mM EDTA with 80°C heat treatments resulted in 2.1 log and 3.2 log reductions, respectively, though they did not show reductions at each single treatment (GFE 1% (v/v), EDTA 0.5 mM, 80°C). So it was concluded that by combining GFE, EDTA in low concentration treatment, and heat treatment, *B. cereus* spores can be effectively inactivated.

Key words: *Bacillus cereus* spore, grapefruit seed extract, lysozyme, EDTA, heat treatment

서 론

*Bacillus cereus*는 그람 양성균이며 호기성, 혐기성 조건에서도 생존하는 균으로서 구토형, 설사형의 두 종류 식중독을 일으킨다(1). 설사형 식중독을 유발하는 독소는 열에 민감하여 56°C, 5분 열처리로 불활성화 되지만 구토형 독소는 열에 안정한 것으로 알려져 있으며 감염 후 1~6시간 후에 증상이 발생한다(1-3). *B. cereus*는 다양한 환경에서 포자를 형성하는 균으로 포자 자체는 독성이 없지만 고기와 같은 단백질이 풍부한 육제품, 유제품과 과채류 등에서 포자로 생존하다가 생육하기 좋은 환경이 되면 영양세포로 발아하여 식중독을 유발한다(3-5). 포자는 외부환경으로부터 자신을 보호하는 특성이 있어 일반 영양세포보다 열, 항산화, 방사선, 화학제품 등의 살균처리에 보다 높은 내성을 가지고 있기 때문에 불활성화 하기 어려운 것으로 알려져 있다(6-9).

한편, 콩을 주원료로 하는 우리나라 전통 발효식품인 된장, 고추장은 제품 특성상 자연으로부터 유래된 다양한 곰팡이와 세균이 존재하여 발효, 숙성 과정에서 대사 작용을 통해 된장의 맛과 향을 내지만 *Bacillus* 종과 산 생성 미생물에 의한 오염 및 식중독 발생 등 식품 안전 측면에서 부정적이기도 하다(10,11). 이에 식약청은 장류 미생물 기준 규격 개

정에서 *B. cereus*의 정량 기준을 고시하였다(12). 또한 메주로 제조되는 전통식품인 간장은 가열살균 방법이 사용되고 있으나 내열성 미생물과 *Bacillus* 포자 잔존, 포장 시 2차 오염 등의 가능성이 있어 보존성 향상을 위해 항균제를 병행 사용하기도 한다(13).

최근 국민 생활수준 향상으로 인공적으로 합성된 항균제에 대한 소비자 기피 현상이 확대되고 있으며(14) 그 결과 천연항균제, lysozyme, 박테리오신, 유기산 등이 대용품으로 주목받고 있다. Lysozyme은 계란 흰자 등에 함유된 효소로서 미생물 세포벽인 peptidoglycan의 N-acetylglucosamine과 N-acetylmuramic acid의 결합을 제거하여 항균활성을 나타낸다고 알려져 있지만 상대적으로 peptidoglycan 층이 얇은 그람 음성균은 lysozyme에 저항성이 있다고 보고되었다(15,16). 또한 자몽종자추출물은 천연항균제로서 미생물의 세포막 기능을 약화시키고, 세포증식 기작을 방해하여 항균효과가 있다고 보고되고 있다(14). 천연 항균제 이외의 물질로서 ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)는 2가의 양이온과 복합체를 만들어 지질다당류와 같은 고분자막 사이에 염교로 작용하여 미생물 세포막을 불안정하게 만든다고 알려져 있다. EDTA는 영양세포에 대한 항균 실험은 일부 수행되었지만 포자에 대한 실험은 소수 연구가 보고되

*Corresponding author. E-mail: swoh@kookmin.ac.kr
Phone: 82-2-910-5778, Fax: 82-2-910-5249

고 있다(16,17).

포자 불활성화 연구는 단독처리뿐 아니라 병행처리에 대한 연구가 많이 진행되고 있으며 불활성화 효율도 높다고 알려져 있다. 최근 항균제와 열(6), 초고압과 열(18), 초고압과 항균제(19), 항균제와 pH 조절(20), UV 조사와 오존(21) 등의 병행처리에 대한 연구가 보고되고 있다.

본 연구는 *Bacillus* 포자의 효과적인 불활성화 조건을 파악하기 위해 주로 세포막과 세포벽에 관여하여 미생물을 사멸시키는 것으로 알려져 있는 lysozyme, 자몽종자추출물의 천연항균물질 및 EDTA와 열(70°C, 80°C, 90°C)을 단독처리 및 병행처리 하여 포자 불활성화 효율을 측정하였다.

재료 및 방법

실험균주 및 시약

Bacillus cereus(ATCC 21772)는 50% glycerol stock으로 -80°C에서 보관중인 균주를 사용하였다. 균주 및 포자 배양 배지로서 nutrient broth(NB, Oxoid, Hampshire, England), nutrient agar(NA, Oxoid)를 사용하였다. 천연 항균제인 자몽종자추출물은 성남시에 위치한 서울식연에서 구입하였으며 lysozyme, EDTA를 포함한 모든 시약은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

포자 제조

*B. cereus*를 NA로 옮겨 30°C에서 18시간 배양한 뒤 백금이를 이용하여 단일콜로니를 취하여 NB에 접종하였다. 접종 후 30°C에서 18시간 배양 후 배양액 2 mL를 취하여 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 을 5 µg/mL 농도로 첨가한 NB에 접종한 뒤 30°C에서 3일간 배양하여 포자를 제조하였다. 포자가 형성된 평판배지에 0.1% triton X-100을 포함한 0.1 M NaCl(saline solution) 5 mL를 주입한 뒤 spreader를 이용하여 포자를 회수하였다. 회수된 포자는 4,000×g에서 20분간 원심분리 하여 상등액을 제거한 뒤 saline solution을 이용하여 3회 반복 세척 후 최종 10 mL로 현탁하였다. 회수된 포자는 4°C에서 보관하였고 실험 직전에 80°C에서 10분간 열처리하여 영양세포를 사멸시킨 뒤 실험에 사용하였다. 포자의 확인은 Schaeffer and Fulton 포자 염색법을 사용하였고, 포자는 녹색, 영양세포는 붉은색으로 나타나며 Olympus BX51(Olympus America Inc, Melville, NY, USA) 현미경으로 확인하였다. 회수된 포

자의 최종 농도는 10^8 CFU/mL 수준이었다.

단독처리에 의한 포자 불활성화

열처리에 의한 포자 불활성화는 포자현탁액 1 mL를 취한 후 9 mL의 saline solution과 혼합한 후 70°C, 80°C, 90°C로 조정된 항온수조(SH-501, ACT tech, Seoul, Korea)에서 30분 열처리하였다. 항균제에 의한 포자 불활성화는 lysozyme (10, 100, 1,000 mg/L), 자몽종자추출물(0.2, 1, 5%), EDTA (0.125, 0.5, 1 mM)를 포자현탁액에 처리한 후 shaking incubator(VS-8480SF, Vision, Seoul, Korea)를 이용하여 25°C에서 200 rpm 조건에서 30분 동안 반응시켰다.

병행처리에 의한 포자 불활성화

우선적으로 병행처리를 위한 항균제 선발은 lysozyme (100 mg/L), 자몽종자추출물(1%), EDTA(0.5 mM)를 포자현탁액에 처리한 후 shaking incubator를 이용하여 25°C에서 200 rpm 조건에서 30분 반응시킨 후 연속적으로 80°C에서 30분 열처리 하였다. 병행처리에 의한 포자 불활성화는 자몽종자추출물(0.2, 1, 5%)과 EDTA(0.125, 0.25, 0.5 mM)를 포자현탁액에 처리한 후 연속적으로 70°C, 80°C, 90°C의 온도 조건에서 열처리 하였다.

불활성화 효율 측정

단독 및 병행처리 반응 종료 후 saline solution을 이용하여 10진 희석한 뒤 NA 배지에 도말하여 37°C에서 24시간 배양한 후 형성된 집락 수를 계수하였다. 형성된 집락은 포자가 발아된 것으로 판정하여 CFU/mL 단위로 나타내었다.

통계분석

실험은 3 반복 실시하였으며 결과의 분석은 SPSS software(version 19.0, IBM, New York, NY, USA)의 ANOVA와 Turkey's(T) test, 독립표본 T 검정을 사용하여 5% 유의수준($p < 0.05$)에서 각 처리구간의 유의적 차이를 분석하였다.

결과 및 고찰

열 및 항균제 단독 처리에 의한 포자 불활성화

열, 항균제를 단독 처리하였을 때 *B. cereus* 포자의 불활성화 결과를 Table 1에 나타내었다. 10~1,000 mg/L 농도로

Table 1. Heat and antimicrobial activities of lysozyme, grapefruit seed extract (GFE) and EDTA against *B. cereus* spores

Lysozyme (mg/L)	CFU/mL ²⁾	Antimicrobial agent ¹⁾			Temperature		
		GFE (%)	CFU/mL	EDTA (mM)	CFU/mL	°C	
0	8.4±0.08 ^{a3)}	0	8.4±0.08 ^a	0	8.2±0.31 ^a	25	8.4±0.08 ^a
10	8.7±0.49 ^a	0.2	8.2±0.36 ^a	0.125	8.1±0.40 ^a	70	8.5±0.01 ^a
100	8.3±0.23 ^a	1	8.3±0.10 ^a	0.25	8.2±0.25 ^a	80	8.4±0.03 ^a
1000	8.2±0.27 ^a	5	8.3±0.23 ^a	0.5	8.2±0.20 ^a	90	6.1±0.20 ^b

¹⁾Antimicrobial agents were used at 25°C.

²⁾Data represent means±standard deviation of three measurements.

³⁾Mean with the same letter within a column (following the values) are not significantly different ($p < 0.05$).

처리된 lysozyme과 0.2~5%(v/v) 농도의 자몽종자추출물, 0.125~0.5 mM 농도의 EDTA를 25°C에서 30분간 반응시킨 결과 모든 처리구에서 포자 불활성화 효과가 없었다. 동일한 온도에서 반응시간을 2배로 연장하였을 때에도 효과가 없는 것으로 나타났다. 70°C, 80°C, 90°C로 열처리한 결과 70°C, 80°C에서는 포자 불활성 효과가 없었지만 가장 고온 조건인 90°C에서 약 2.3 log(p<0.05) 수준의 포자 불활성화가 발생하였다. 따라서 항균제를 사용하는 것보다는 90°C 이상의 고온처리가 포자 불활성화에 효과적임을 알 수 있었다. 이러한 결과는 Cho 등(7)이 *B. subtilis* 포자에 대한 90°C 단독 열처리 불활성 실험 결과와 유사하였다.

병행처리 조합 선발 실험

70°C, 80°C 온도에서는 포자 불활성화가 발생하지 않았으므로 항균제와 병행처리 함으로써 포자 불활성화 가능성을 타진하고자 하였다. 열처리 조건을 80°C로 고정한 후 lysozyme, 자몽종자추출물, EDTA와 병행처리 하였다. 100 mg/L lysozyme, 1% 자몽종자추출물, 0.5 mM EDTA 농도로 항균제를 25°C에서 30분간 반응시킨 후 80°C 항온수조에서 30분간 열처리 후 포자 불활성화를 측정하여 Fig. 1에 나타내었다. 그 결과 lysozyme과 열처리 병행 시 포자 불활성화가 발생하지 않았지만, 자몽종자추출물과 열처리, EDTA와 열처리 처리구에서 각각 2.1, 3.2 log(p<0.05) 수준의 포자 불활성화가 발생하였다. 자몽종자추출물, EDTA와 80°C 열처리는 단독으로 처리 시 포자 불활성화 효과가 없었지만, 병행처리를 통하여 상승효과가 발생하였음을 알 수 있었다. 이는 Shin 등(6)이 *B. cereus* 포자에 대하여 85°C에서 30분간 자몽종자추출물을 처리한 결과와 유사하였고 병행처리 순서를 바꾸어 열처리를 한 후 25°C에서 각 항균제를 처리하였을 때에는 포자 불활성화 효과가 없었다. 이러한 결과를 토대로 80°C 열처리와 병행하여 효과가 없었던 lysozyme은

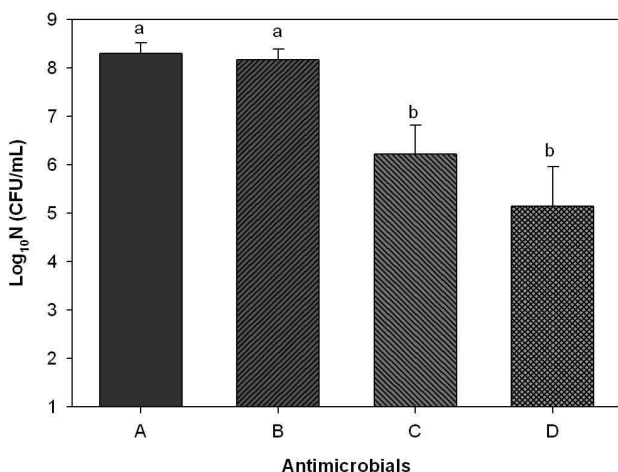


Fig. 1. Synergistic effect of antimicrobial treatment with 80°C heat treatment for 30 min. (A) Control, (B) Lysozyme 100 mg/L, (C) GFE 1%, (D) EDTA 0.5 mM. Values with different letters indicate significant difference (p<0.05).

Table 2. Population (log₁₀ CFU/mL)¹⁾ of spores in different concentration of grapefruit seed extract (GFE) at different temperature for 30 min

Concentration of GFE (%)	Temperature (°C)		
	70	80	90
0	8.4 ± 0.18 ^{ab2)}	8.4 ± 0.18 ^a	8.3 ± 0.26 ^a
0.2	8.5 ± 0.20 ^a	7.9 ± 0.11 ^b	4.8 ± 0.43 ^b
1	8.4 ± 0.16 ^{ab}	6.9 ± 0.28 ^c	4.5 ± 0.34 ^b
5	8.1 ± 0.08 ^b	< detection limit ³⁾	< detection limit

¹⁾Data represents means ± standard deviations of three measurements.

²⁾Means with the same letter within a column (following the values) are not significantly different (p<0.05).

³⁾Detection limit was 2 log CFU/mL.

다음 단계 실험에서 제외하였고, 자몽종자추출물과 EDTA를 대상으로 농도와 온도 조건에 따른 포자 불활성화 효과를 검토하였다.

자몽종자추출물과 열 병행처리에 의한 포자 불활성화

포자 불활성화에 대한 상승효과가 기대되는 자몽종자추출물과 열 병행처리 시의 포자 불활성 효과를 살펴보았다 (Table 2). 자몽종자추출물은 0.2, 1, 5%(v/v) 농도로 70°C, 80°C, 90°C 항온수조에서 열처리를 병행하였다. 70°C 온도 조건에서는 자몽종자추출물 모든 농도 조건에서 불활성 효과가 없었다. 80°C에서는 자몽종자추출물 0.2%, 1% 농도 조건에서 각각 0.5, 1.5 log(p<0.05) 수준의 불활성화가 일어났으며, 90°C에서는 각각 3.5, 3.8 log(p<0.05) 수준의 불활성화가 발생하였다. 특히 자몽종자추출물 5% 농도에서는 80°C, 90°C 열처리와 병행하였을 경우 검출한계(2 log CFU/mL) 이하로 저감되어 6 log 이상의 큰 포자 불활성화가 발생하였다. *B. cereus* 포자 불활성화는 자몽종자추출물 농도와 열처리 온도가 높아질수록 유의적으로 증가하였다. 자몽종자추출물은 미생물 세포벽을 약화시키는 것과 같이 열과 함께 포자의 외벽을 손상시키는 역할을 하는 것으로 생각되어진다.

EDTA와 열 병행처리에 의한 포자 불활성화

EDTA와 열 병행처리에 따른 포자 불활성화 실험 결과를 Table 3에 나타내었다. 실험에 사용된 EDTA 농도는 0.125, 0.25, 0.5 mM이었으며, 자몽종자추출물의 경우와 마찬가지로 70°C, 80°C, 90°C 열처리를 병행하였다. 70°C에서는 자몽

Table 3. Population (log₁₀ CFU/mL)¹⁾ of spores in different concentration of EDTA at different temperature for 30 min

EDTA (mM)	Temperature (°C)		
	70	80	90
0	7.6 ± 0.33 ^{a2)}	8.2 ± 0.29 ^a	7.5 ± 0.27 ^a
0.125	7.3 ± 0.58 ^a	7.7 ± 0.53 ^a	3.8 ± 1.14 ^b
0.25	7.2 ± 0.58 ^a	6.9 ± 0.85 ^a	4.2 ± 1.11 ^b
0.5	7.1 ± 0.72 ^a	5.2 ± 0.65 ^b	3.9 ± 0.61 ^b

¹⁾Data represents means ± standard deviations of three measurements.

²⁾Means with the same letter within a column (following the values) are not significantly different (p<0.05).

Table 4. Population (\log_{10} CFU/mL)¹⁾ of spores in different concentration of GFE (0.2%) and EDTA (0.125 mM) at different temperature for 30 min

Treatment	CFU/mL
GFE+EDTA	8.5±0.16 ^{a2)}
GFE+EDTA+heat (70°C)	8.2±0.12 ^a
GFE+EDTA+heat (80°C)	7.0±0.51 ^b
GFE+EDTA+heat (90°C)	4.5±0.16 ^c

¹⁾Data represents means±standard deviations of three measurements.

²⁾Means with the same letter within a column (following the values) are not significantly different ($p<0.05$).

종자추출물과 마찬가지로 포자 불활성화 효과가 없었다. 80°C에서는 EDTA 0.125 mM, 0.25 mM 농도에서는 포자 불활성화가 발생하지 않았지만, 0.5 mM 농도에서는 약 3 log($p<0.05$) 수준의 불활성화 효과가 있었다. 90°C에서는 EDTA 농도에 대한 효과보다는 열처리 효과가 상대적으로 큰 것으로 나타나 EDTA 농도에 따른 유의차는 없었다 ($p<0.05$).

자몽종자추출물, EDTA와 열 병행처리에 의한 포자 불활성화

자몽종자추출물과 EDTA를 혼합하여 처리한 후 연속적으로 열처리하여 포자의 불활성화 정도를 측정하였으며 그 결과를 Table 4에 나타내었다. 실험에 사용된 자몽종자추출물과 EDTA 농도는 각각 0.2%, 0.125 mM 농도로서 Table 2, Table 3 실험에 적용한 최소농도로 실험하였다. 이는 산업적으로 활용 시 소량의 항균제를 활용하는 것이 바람직할 것으로 판단되었기 때문이다. 온도 처리는 항균제와 포자 현탁액을 25°C에서 30분 반응한 후 앞서 실험한 것과 동일 조건인 70°C, 80°C, 90°C에서 30분 열처리 하였다. 70°C에서는 자몽종자추출물과 열처리, EDTA와 열처리의 병행처리에서와 마찬가지로 유의적인 불활성화가 발생하지 않았다. 그러나 80°C, 90°C의 경우, 자몽종자추출물과 열처리, EDTA와 열처리를 병행한 것보다 높은 효과가 있었으며 특히 80°C 열처리 시 자몽종자추출물과 열처리, EDTA와 열처리의 경우 각각 0.5 log 수준으로 감소되었지만 자몽종자추출물, EDTA와 열처리를 병행한 경우 1.5 log로 보다 더 높은 불활성화 정도를 나타내었다. 또한 90°C의 경우, 자몽종자추출물과 열처리, EDTA와 열처리로 하였을 때 각각 3.5 log, 3.7 log 수준으로 포자 불활성화가 발생하였으나, 자몽종자추출물, EDTA와 열처리를 병행한 경우 4 log 수준의 포자 불활성화가 발생하여 미약한 상승효과가 있음을 알 수 있었다. 따라서 고농도 항균제 처리나 고온 단독 처리보다는 낮은 농도의 항균제와 열을 병행 처리하여 상승효과를 유도하여 포자를 살균하는 것이 식품 특성을 손상시키지 않고 포자를 불활성화 할 수 있는 효율적인 방법이라고 생각된다. 그러나 향후 식품을 대상으로 한 실험을 통하여 보다 정밀한 처리 조건이 설정되어야 할 것으로 사료된다.

요 약

본 실험에서는 천연항균제인 lysozyme, 자몽종자추출물, EDTA와 열처리를 병행하여 *Bacillus cereus* 포자에 대한 저감효과를 측정하였다. *B. cereus* 포자는 5 µg/mL MnSO₄·H₂O를 첨가한 nutrient agar에 접종, 3일간 배양하여 포자를 제조하였으며 실험 직전 80°C에서 10분간 열처리하여 영양 세포는 불활성화 시켰다. Lysozyme, 자몽종자추출물, EDTA를 항균제로 사용하였으며 열은 70°C, 80°C, 90°C 온도 조건으로 처리하였다. 단독처리 시 90°C 열처리 조건에서만 약 2.3 log 수준의 불활성 효과를 볼 수 있었다. 그러나 단독처리 조건에서 효과가 없었던 1% 자몽종자추출물과 0.5 mM EDTA 농도 조건으로 80°C 열처리를 병행한 경우 각각 2.1 log, 3.2 log 수준의 포자 불활성화 효과가 있어 상승효과가 발생하였음을 알 수 있었다. 따라서 저농도의 자몽종자추출물, EDTA와 열을 병행처리하면 상승효과에 의해 효율적인 포자 불활성화가 발생할 수 있음을 알 수 있었다.

감사의 글

2011년 국민대학교 교내연구비를 지원 받아 수행된 연구 결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

문 헌

- Kim SJ, Jung JH, Tahk HM, Baek SY, Lee SY. 2009. Effect of factors on the sporulation of *Bacillus cereus* and their thermal resistance. *J Fd Hyg Safety* 24: 256-261.
- Schulz ME, Fricker M, Scherer S. 2004. *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. *Mol Nutr Food Res* 48: 479-487.
- Cho YS, Jung EY, Lee MK, Yang CY, Shin DB. 2008. Survival, isolation and characterization of *Bacillus cereus* from *Sunshik*. *J Fd Hyg Safety* 23: 343-347.
- Ankolekar D, Rahmati T, Labbe RG. 2009. Detection of toxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spores in U.S. rice. *Int J Food Microbiol* 128: 460-466.
- Abee T, Groot MN, Tempelaars M, Zwietering M, Moezelaar R, Voort M. 2011. Germination and outgrowth of spores of *Bacillus cereus* group members: diversity and role of germinant receptors. *Food Microbiol* 28: 99-208.
- Shin HW, Lim YH, Lee JK, Kim YJ, Oh SW, Shin CS. 2008. Effect of commercial antimicrobials in combination with heat treatment on inactivation of *Bacillus cereus* spore. *Food Sci Biotechnol* 17: 603-607.
- Cho HY, Yousef AE, Sastry SK. 1999. Kinetics of inactivation of *Bacillus subtilis* spores by continuous or intermittent ohmic and conventional heating. *Biotechnol Bioeng* 62: 368-372.
- Kim S, Yook HS, Choi C, Kim JO, Byum MW. 1998. Elimination of spore bacteria in beef by gamma irradiation. *J Fd Hyg Safety* 13: 294-298.
- Cho M, Kim JH, Yoon J. 2006. Investigating synergism during sequential inactivation of *Bacillus subtilis* spores with several disinfectants. *Water Res* 40: 2911-2920.

10. Lee HT, Kim JH, Lee SS. 2009. Analysis of microbiological contamination and biogenic amines content in traditional and commercial *Doenjang*. *J Fd Hyg Safety* 24: 102-109.
11. Kim DH, Yook HS, Youn KC, Sohn CB, Byun MW. 2001. Changed of microbiological and general quality characteristics of gamma irradiated *Kochujang* (fermented hot pepper paste). *Korean J Food Sci Technol* 33: 72-77.
12. KFDA. Natural additives, Korea food additives codex, Korean Food Standards Codex. available at: <http://www.kfda.go.kr/index.kfda?mid=92>. Accessed Jun. 30, 2011.
13. Song YH, Kim DH, Park BJ, Shin MG, Byun MW. 2001. Changes in microbiological and general quality characteristics of gamma irradiated *Kanjang* and *Shoyu*. *Korean J Food Sci Technol* 33: 338-344.
14. Park HK, Kim SB. 2006. Antimicrobial activity of grapefruit seed extract. *Korean J Food & Nutr* 19: 526-531.
15. Gill AO, Holley RA. 2003. Interactive inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysozyme, nisin and EDTA in the presence of nitrite and sodium chloride at 24°C. *Int J Food Microbiol* 80: 251-259.
16. Suzuki Y, Rode LJ. 1969. Effect of lysozyme on resting spores of *Bacillus megaterium*. *J Bacteriol* 98: 238-245.
17. Hughey VL, Johnson EA. 1987. Antimicrobial activity of lysozyme against bacteria involved in food spoilage and food-borne disease. *Appl Environ Microbiol* 53: 2165-2170.
18. Aoyama Y, Shigeta Y, Okazaki T, Hagura Y, Suzuki K. 2005. Germination and inactivation of *Bacillus subtilis* spores under combined conditions of hydrostatic pressure and medium temperature. *Food Sci Technol Res* 11: 101-105.
19. Lopez TJ, Roig AX, Trujillo AJ, Capellas M, Guamis B. 2003. Inactivation of spores of *Bicillus cereus* in cheese by high hydrostatic pressure with addition of nisin or lysozyme. *J Dairy Sci* 86: 3075-3081.
20. Mansour M, Amri D, Bouttefroy A, Linder M, Milliere J. 1999. Inhibition of *Bacillus licheniformis* spore growth in milk by nisin, monolaurin, and pH combinations. *J Applied Microbiol* 86: 311-324.
21. Jung YJ, Oh BS, Kang JW. 2006. Evaluation of disinfection characteristics of ozone, UV processes for *Bacillus subtilis* spores inactivation. *J Korean Soc Water Qual* 22: 672-677.

(2011년 8월 4일 접수; 2011년 9월 20일 채택)