



## 저장 온도에 따른 *Bacillus cereus*의 성장 변화 및 독소 생성 변화

김현욱 · 김기환 · 박범영 · 오미화\*

농촌진흥청 국립축산과학원

### Growth and Toxin Production of *Bacillus cereus* during Storage at Different Temperatures

Hyoun Wook Kim, Ki-Hwan Kim, Beam Young Park and Mi-Hwa Oh\*

National Institute of Animal Science, RDA, Suwon 441-350, Korea

#### Abstract

Food safety is a global health goal, and food-borne disease are a significant public health threat throughout the world. Dairy products are susceptible to contamination through a wide variety of physical, microbial, and chemical hazards. Risks of microbiological hazards are of immediate and serious concern to human health. Milk was inoculated with *Bacillus cereus* and stored at 10, 15, 20, and 30°C for 7 days. We monitored the effect of the temperature on growth rate and variance of toxin production. The growth rate of *B. cereus* was suppressed in low temperature. We confirmed that the growth rate and the toxin production were accelerated when the storage temperature was increased. *B. cereus* began to produce toxins when the number of bacteria was higher than 10<sup>7</sup> CFU/mL. Therefore, managing the storage temperature of milk is important to inhibit the growth and the toxin production of *B. cereus*.

Keywords: *Bacillus cereus*, diarrhoea enterotoxin, milk, storage

#### 서 론

최근 생활수준의 향상으로 건강과 안전한 먹을거리에 대한 국민들의 관심이 증가하고, 수입자유화에 따른 식품의 교역량이 증가에 따라 식품안전사고가 증가하면서 우유 등 축산물의 안정성 확보의 중요성이 대두되고 있다.

CODEX의 ‘Code of hygienic practice for milk and milk products’ 중 5.2 위생 제어 체제의 중요 사항들, 5.2.1 온도와 시간의 제어에서는 안전하고 위생적인 제품의 생산을 위하여 우유 생산에서부터 최종제품까지 온도관리가 중요하다고 강조하고 있으며, ‘축산물의 가공기준 및 성분규격’에서는 “식육 또는 살균 또는 멸균처리하였거나 더 이상 가공, 가열조리를 하지 않고 그대로 섭취하는 가공품에서

는 특성에 따라 살모넬라(*Salmonella* spp.), 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 장염비브리오(*Vibrio parahaemolyticus*), 클로스트리디움 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*), 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*), 대장균 O157:H7(*Escherichia coli* O157:H7) 등 식중독균이 검출되어서는 아니된다.”라고 명시하고 있다.

우유는 우수한 영양성분으로 인하여 가장 완벽한 식품으로 평가 받고 있지만, 우수한 영양성분으로 인하여 미생물의 증식에 좋은 환경을 제공할 수 있기 때문에 병원성 미생물 등 미생물의 오염에 주의하여야 한다(Kim, 2000; Lee *et al.*, 2011). 우유 및 유제품은 생산으로부터 최종제품까지 외부환경의 노출, 이물의 혼입 등에 의해 생물학적 위해 요소에 노출될 가능성이 높기 때문에 적절한 위생관리방법이 중요하며, 모든 과정에서 미생물의 오염 및 증식을 막기 위하여 낮은 온도에서 저장하여야 한다.

*Bacillus cereus*는 그람 음성균의 아포형성균으로 자연계에

\* Corresponding author: Mi-Hwa Oh, National Institute of Animal Science, RDA, Suwon 441-350, Korea. Tel: +82-31-290-1689, Fax: 82-31-290-1697, E-mail: woogi78@korea.kr

널리 분포하고 있으며, *B. cereus*의 아포는 열에 쉽게 파괴되지 않기 때문에 식품제조공정에서 중요하게 관리되고 있다. 특히 바실러스균은 내열성의 아포를 생성하기 때문에 우유의 살균공정에서 적절한 살균이 이루어지지 않을 경우, 아포를 형성하여 우유 중에 존재하면서 증식에 적당한 온도가 되었을 때 다시 증식을 시작하여 식품의 오염시킬 수 있다. 또한 *B. cereus*는 증식하면서 독소를 생성하는 대표적인 독소형 식중독균이며, 이들이 생산하는 독소는 내열성이기 때문에 가공공정 중 파괴되지 않고 우유 중에 잔류하여 식중독을 유발할 수 있다.

따라서 우유의 생산 및 유통과정 중 적절한 온도관리가 필요하며, 본 연구는 우유의 저장 중 *B. cereus*에 대한 안전성을 확보하기 위한 기초자료로서, 우유의 저장온도 및 시간에 따른 성장의 정도와 독소 생성량을 조사하였다.

## 본 론

본 실험에 사용한 *Bacillus cereus* KCCM 40935는 한국 미생물보존센터(KCCM)에서 분양받아 사용하였다. *B. cereus*는 실험 전 Tryptic Soy Broth(TSB, Difco, Detroit, MI, USA)에 접종한 후 30°C에서 24시간 동안 배양한 후 사용하였으며, 균주의 활성을 높이기 위하여 3회 반복을 전배양한 후 사용하였다. 실험에 사용한 시료는 제조 2일 이내의 시유를 시중에서 구입하여 사용하였다. 시료 200 mL *B. cereus*의 최종 농도  $1 \times 10^3$  CFU/mL가 되도록 접종한 후 10, 15,

20, 30°C에서 저장하면서 최초 24시간 동안은 2시간 간격으로(0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24시간) 시료를 채취하였고, 이후 28, 36, 48, 72, 96, 120, 144, 168시간 간격으로 시료를 채취하여 실험에 사용하였다.

각 시간별로 채취한 시료 10 mL를 0.1% 멸균 펩톤수를 이용하여 단계희석한 다음, Tryptic Soy Agar에 도말하여 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 모든 시료는 밀리리터당 콜로니형성단위(CFU/mL)로 측정된 후 Log CFU/mL로 전환하였으며, 모든 실험은 2개 시료를 1개 세트로 하여 3회 반복 실험하였다. 우유의 저장 온도 및 시간에 따라 *B. cereus*의 생산하는 설사형 독소(diarrhoea enterotoxin)를 검사하였다. 독소량은 Tecra® *Bacillus Diarrhoea Enterotoxin* Visual Immunoassay kit를 사용하여 측정하였으며, 414 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 결과를 확인하였다.

### 1. 우유의 저장온도에 따른 *B. cereus*의 성장 변화

우유의 저장온도에 따른 *B. cereus*의 성장 변화를 확인하기 위하여 *B. cereus*를 접종한 우유를 10, 15, 20, 30°C에서 각각 저장하면서 7일 동안 성장 변화를 측정하였다. 실험결과, 10°C 시료의 경우, 저장 48시간까지 균의 증식이 일어나지 않았으며, 저장 72시간(3일) 이후부터 증가하기 시작하였다(Fig. 1). Moon 등(2005)는 균의 성장속도는 초기균수보다는 온도에 지배적인 영향을 받는다고 하였는데, 이는 저장온도의 영향으로 초기에 환경에 적응하는 과정에서 성장이 지연되었기 때문이라고 판단된다. 15°C 저장 시료

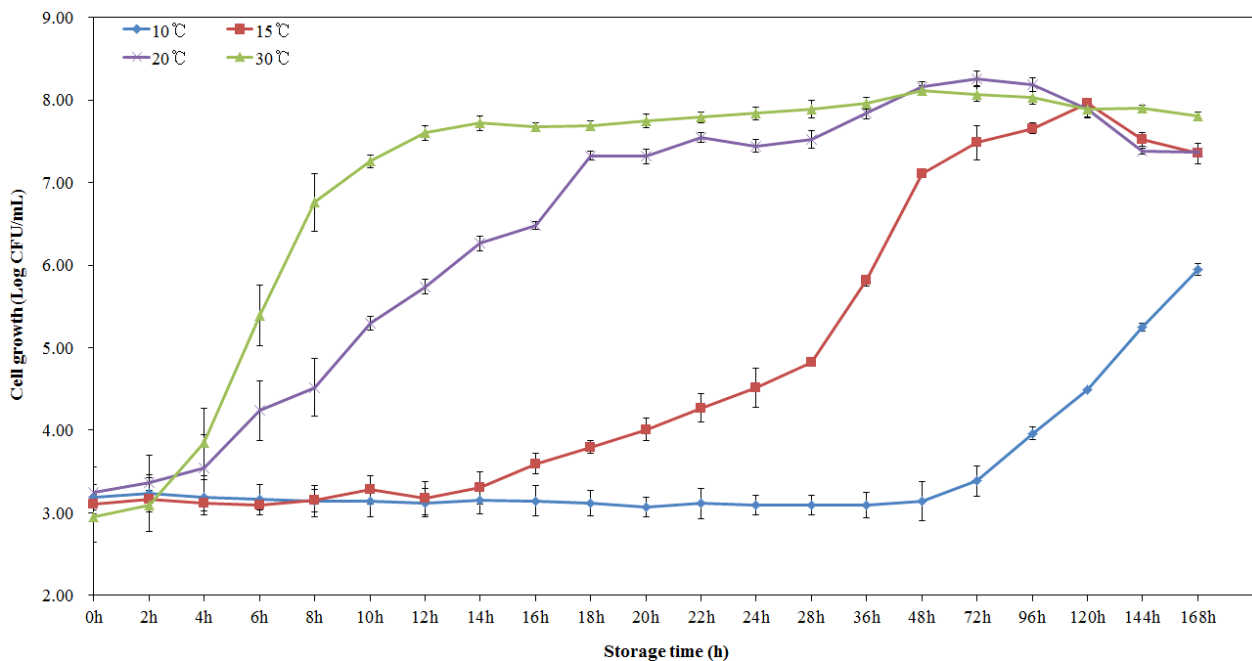


Fig. 1. Growth patterns of *B. cereus* according to the Storage temperature on milk.

의 경우 저장 8시간 이후 서서히 증가하기 시작하여 저장 120시간에 최대균수를 나타내었고, 이후 감소하기 시작하였다. 20°C 저장 시료는 저장 6시간째부터 증가하기 시작하여 저장이 종료시간까지 꾸준히 증가하였으며, 30°C에 저장한 시료는 저장 4시간째부터 증가하기 시작하여 저장 12~14시간 사이에 최대균수를 나타내었으며, 이후 일정한 균수를 유지하였다(Fig. 1).

*B. cereus*는 자연계에 널리 분포라고 있는 균으로서, 성장과 생존 특성은 매우 다양하고, 일반적으로 15°C와 50~55°C 사이에서 성장하며, 최적 성장온도는 30~40°C이다(AIFST, 2003). 특히 *B. cereus*가 생성하는 포자는 135°C에서 4시간 동안 가열하여도 견딜 수 있는 내열성을 가지고 있으며, 음식물에서 쉽게 포자를 형성할 수 있기 때문에 식품의 가열 공정에서 생존가능성이 높아 식품의 유통 중에 검출될 확률이 높다(김과 최, 2009).

## 2. 우유의 저장온도에 따른 *B. cereus* 독소 생성량 변화

*B. cereus*에 의한 식중독은 이 균이 생성하는 설사형(diarrhoea type)과 구토형(emetic type) 독소에 의해 발생하며, 독소형의 특징은 Table 1과 같다(Granum and Lund, 1997). Hsieh 등(1999)은 *B. cereus* 그룹의 모든 균주에서 enterotoxin 중 한 가지는 반드시 존재하고, 이들은 Chinese Hamster Ovary(CHO) 세포에 세포독성을 가지고 있어 식품에서 이들의 검출은 중요하다고 하였다.

우유에 *B. cereus*가 오염되었을 때 주로 나타나는 독소형은 설사형 독소로서, 본 실험에서는 *B. cereus*의 성장에 따른 설사형 독소의 생성량 변화를 관찰하였다. 우유의 저장 온도 및 시간에 따른 *B. cereus* 독소 생성량 변화를 확인한 결과, 10°C 저장 시료의 경우 저장 96시간까지 변화가 없었으나, 저장 120시간 이후 증가하기 시작하였다. 15°C 시료의 경우, 저장 24시간까지 독소를 생성하지 않았으나, 저장

28시간 이후 독소를 생성하기 시작하여 저장 종료시점에는 20°C 및 30°C 시료와 유사한 결과를 나타내었다. 20°C 저장 시료는 18시간째부터 독소를 생성하기 시작하여 꾸준히 증가하였으며, 30°C 저장 시료는 10시간째부터 독소 생성이 시작하여 이후 *B. cereus*의 증식에 따라 급격히 증가하다가 저장 72시간부터 일정한 수준을 나타내었다(Fig. 2). 김과 최(2009)는 김밥과 두부에 *B. cereus*를 접종한 후 10, 20, 30, 37°C에 저장하였을 때 30°C와 37°C는 12시간 이후부터 독소를 생성하고, 20°C는 48시간 이후, 10°C는 음성으로 나타났다고 보고하였는데, 20°C와 30°C의 독소 생성 결과는 본 실험과 유사하나, 10°C는 다소 차이가 나는 결과를 나타내었는데, 이는 시료의 차이에 의한 것이라고 판단된다.

또한, 균수가 7 log CFU/mL 이상이 되었을 때 독소를 생성하기 시작하였는데, 이 결과는 김과 최(2009)의 보고와 유사한 것으로 판단된다.

## 결론

자연계에 널리 존재하는 그람양성의 간균인 *Bacillus cereus*는 국내에서 지속적으로 발생하고 있으며, 실제 낙농사육 현장 및 도축장 등에서 자주 분리되는 균주 중 하나이다. *B. cereus* 균주를 접종한 우유를 온도별(10, 15, 20, 30°C)에서 7일 동안 배양하면서 균의 성장 변화와 설사형 독소 생성능을 확인한 결과, 균수가 7 log CFU/mL 정도로 성장하였을 때 독소를 생성하기 시작하는 것으로 나타났으며, 30°C의 경우 약 10시간 경과 후, 20°C는 약 48시간 후부터 독소를 생성하는 것으로 나타났다. 이 결과를 보았을 때 설사형 독소의 생성에는 약 107 CFU/mL 이상의 균수가 필요한 것으로 판단된다.

본 연구의 결과, 우유 및 유제품에 오염된 *B. cereus*가 독소를 생성하기 위해서는 균수와 온도가 미치는 영향이 큰

Table 1. Characteristics of the two types of disease caused by *Bacillus cereus*

	Diarrhoea syndrome	Emetic syndrome
Infective dose	10 <sup>5</sup> ~10 <sup>7</sup> (total)	10 <sup>5</sup> ~10 <sup>7</sup> (total)
Toxin produced	In the small intestine of the host	Preformed in foods
Type of toxin	Protein	Cyclic peptide
Incubation period	8~16 h (occasionally > 24h)	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
Food most frequently implicated	Meat products, soups, vegetables, pudding/sauces and milk/milk products	Fried and cooked rice, pastry, noodles

\*Source: Granum and Lund (1997)

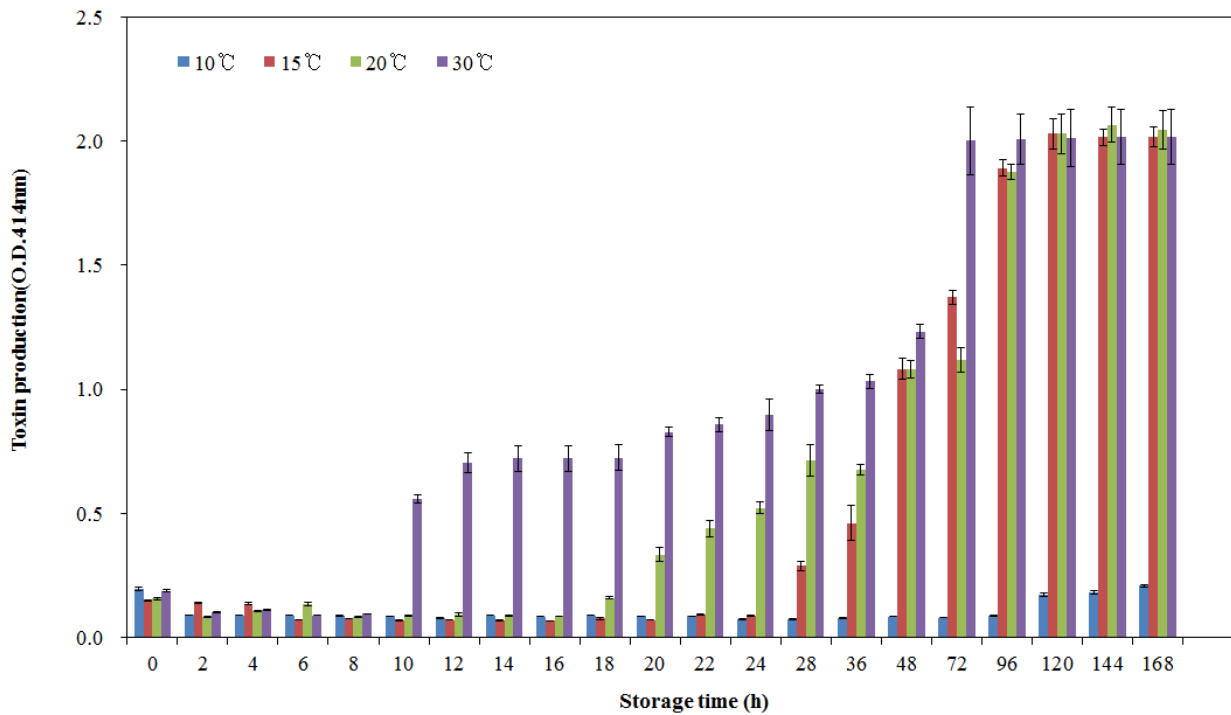


Fig. 2. Toxin production patterns of *B. cereus* according to the storage temperature on milk.

것으로 판단되었으며, 우유 및 유제품의 원재료의 오염과 제조공정 중의 교차오염을 최소화해야 하고, 가공·유통과정 중 온도의 관리를 통해 세균의 성장을 저해하는 것이 *B. cereus*에 의한 식품안전사고 예방과 식품안전관리에 중요한 것으로 판단된다.

## 감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 연구사업(세부과제명: 귀늘론계 항생물질의 ELISA 활용 진단기술 개발, 과제번호: PJ00932902)의 지원에 의해 이루어진 것입니다.

## 참고문헌

1. CODEX ALIMENTARIUS. 2009. Code of hygienic practice for milk and milk products. CAC/RCP 56-2004.
2. Granum, P. E. and Lund, T. 1997. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. FEMS Microbiol. Lett. 157: 223-228.
3. Hsieh, Y. M, Sheu, S. J., Shen, Y. L. and Tsen, H. Y. 1999. Enterotoxigenic profiles and polymerase chain reaction

detection of *Bacillus cereus* group cells and *B. cereus* strains from foods and food-borne outbreaks. J. Appl. Microbiol. 87:481-490.

4. Kim, O. K. 2000. Implementation of HACCP system of dairy products for safety and hygienic quality in Korea. J. Korean Dairy Techno. Sci. 18:9-21.
5. Lee, K. H., Ahn, J. H., Park, J. S. and Jeong, S. H. 2011. The influence of food-and mouth disease on dairy industries and safety management of dairy products. Food Sci. Indust. 44:16-28.
6. Moon, S. Y., Woo, G. J. and Shin, I. S. 2005. Development of predictive growth model of *Listeria monocytogenes* using mathematical quantitative assessment model. Korean J. Food Sci. Technol. 37:194-198.
7. 김미경, 최재천. 2009. 식중독을 유발하는 독소와 제어 - 바실러스 세레우스의 설사형 독소와 구토형 독소. 식품과학과 산업 6월호. 2-19.
8. 식품의약품안전처. 2014. 축산물의 가공기준 및 성분규격. 식약처 고시 제2011-43호.

(Received 25 November, 2014 / Accepted 1 December, 2014)