KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 46, No. 4, pp. 522~525 (2014)
http://dx.doi.org/10.9721/KJFST.2014.46.4.522

KOREAN JOURNAL OF
한국식품과학회지
FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY

©The Korean Society of Food Science and Technology

연구노트

전통 장류를 이용한 소스제품에 접종된 *Bacillus cereus* spore의 발아에 미치는 온도 및 inosine monophosphate 첨가 효과

이민아 · 조은지[1] · 홍상필[1,*]
국민대학교 식품영양학과, [1]한국식품연구원 산업기반연구본부

Effect of Temperature and Inosine Monophosphate on Spore Germination of Artificially Inoculated *Bacillus cereus* in Traditional Korean Fermented Sauces

Min-A Lee, Eun-Ji Jo[1], and Sang-Pil Hong[1,*]
Department of Food and Nutrition, Kookmin University,
[1]Division of Platform Technology Research, Korea Food Research Institute

Abstract The effects of temperature and inosine monophosphate (IMP) on the germination of artificially inoculated *Bacillus cereus* spores in *ganjang*, *doenjang*, and *gochujang* sauces were investigated. The pH and salt concentration of the sauces were as follows: *ganjang* (4.84, 7.45%), *doenjang* (4.26, 5.07%), and *gochujang* (3.54, 3.24%), respectively. Treatment at 40°C or 80°C resulted in a *B. cereus* growth of 0.8 log CFU/g in *ganjang* sauce; this concentration increased to 2.25 log CFU/g and 1.21 log CFU/g, respectively, when 10 mM IMP was added. Compared with that for *ganjang* sauce, the germination effect was comparatively lower for *doenjang* sauce by 10 mM IMP+40°C treatment (0.46 log CFU/g) and 10 mM IMP+80°C treatment (0.85 log CFU/g). However, no germination effect was noted for *gochujang* sauce by any treatment in this study. Therefore, the results suggested that pH is an important factor affecting spore germination in sauces.

Keywords: *Bacillus cereus* spore, sauce, germination, inosine monophosphate, heat

서 론

*Bacillus cereus*는 중온성, 그람양성, 호기성, 내염성 및 내열성으로 알려져 있으며 포자를 생성하고 독소를 생산하여 식중독을 일으키는 유해균이다(1). *B. cereus*는 특히 대표적 전통식품인 장류에서 식품안전상의 문제가 되고 있고(2), 이를 이용하여 제조되는 다양한 소스류에서도 이를 피할 수 없으므로 안전한 유통을 위해서는 이들에 대한 제어연구가 필요하다.

B. cereus 영양세포(vegetative cell) 자체는 된장과 같은 고염의 장류에 인위적인 접종 후에는 극한 환경으로 인한 사멸 가능성이 높아 검출이 잘 안 되는 것으로 알려져 있다. 그러나 영양세포와 달리 포자(spore)는 검출되기 때문에 *B. cereus*의 살균을 위해서는 영양세포 보다 포자를 중심으로 다루어야 할 것이다(3).

Bacillus cereus 영양세포는 pH 5.5 이하, 7.5% NaCl 조건이나(4), 솔빈산, 안식향산, 초산, 개미산 및 젖산, nisin, oregano 추출물, 벤조인산, ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA), polyphosphate 첨가 조건에서 살균되는 것으로 보고되고 있다(5). 그러나 포자의 경우 오염원에 따라 차이가 다소 있지만 10^5 spore/mL가 zero base로 사멸하는 데 100°C에서 6분으로 보고되고 있고(5), 또한 많은 연구에서도 *B. cereus* 포자는 방사선 조사 및 초고압 처리 등 물리적 살균과 항균제와 같은 화학적 살균에도 내성이 강한 것으로 알려져 있다(3,5,6). 따라서 *B. cereus*를 보다 효과적으로 사멸시키기 위해서는 이들의 포자를 발아시켜 영양세포로 전환한 후 열을 가하여 살균하는 간헐살균방법(tyndallization)이 유효할 것으로 기대된다.

이와 관련하여 지금까지 *B. cereus* 포자의 효율적인 발아(germination)를 위해서는 40°C(7), 혹은 70-80°C로 처리하는 방법(8), 호기적 조건 유지(9), pH 중성-염기성 유지(10,11) 및 1.0-3.0% 염도 유지(11), 그리고 발아촉진제(germinant)로서 L-alanine 혹은 inosine을 첨가하는 방법이 유효하고, 이들과 함께 열처리를 병행할 경우에는 발아효과가 촉진될 수 있다고 보고되고 있다(8).

본 연구에서는 상기의 조사 결과를 토대로 간장, 된장 및 고추장을 이용하여 개발한 소스 시제품에 *B. cereus* 포자를 접종하고 발아효과를 측정하였다. 발아 유도를 위해 40°C 혹은 80°C 열처리 및 유효 발아촉진제로 알려진 inosine 대신 유도체인 동시에 소스의 조미 소재인 inosine monophosphate (IMP)를 이용하여 첨가 효과를 검토하고, *B. cereus* 포자 제어를 위한 기초 데이터를 확보하고자 하였다.

*Corresponding author: Sang-Pil Hong, Division of Platform Technology Research, Korea Food Research Institute, Seongnam 463-746, Korea
Tel: 82-31-780-9098
Fax: 82-31-780-9160
E-mail: sphong@kfri.re.kr
Received March 17, 2014; revised April 18, 2014;
accepted April 18, 2014

재료 및 방법

실험재료

시판 된장, 고추장 및 간장(S 사)은 경기 성남시 소재 L백화점에서 구입하여 사용하였으며, *B. cereus* (ATCC 21772)는 50% glycerol stock으로 보관 중인 균주를 사용하였다.

소스의 제조

간장소스, 된장소스 및 고추장소스는 S사에서 개발한 레시피를 활용하였다. 소스의 주요 재료로 간장소스는 간장, 설탕, 물엿, 마늘, 생강, 참기름 등을 사용하였고, 된장소스는 된장, 쌀발효액, 청양고추, 식초, 설탕 등을 사용하였으며, 고추장소스는 고추장, 쌀발효액, 프락토올리고당, 사과식초, 마늘, 참깨 등을 사용하였다.

포자의 제조

Yang 등(3)이 제시한 방법에 따라 제조하였다. 즉 *B. cereus*를 nutrient broth (Difco, Detroit, MI, USA)에서 24시간 배양 후 5 μg/mL $MnSO_4$ (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA)를 포함한 nutrient agar (Difco)에 2 mL 접종하여 30°C, 3일간 배양하여 포자를 발생시켰으며 0.1% Triton X-100 (Daejung Chemical, Siheung, Korea)를 포함한 0.1 M NaCl 용액을 5 mL 주입한 뒤 spreader를 이용하여 포자를 회수하였다. 이후 4,000×*g*에서 20분 원심분리하여 상등액을 제거하고 saline으로 3회 반복 세척 후 최종 10 mL로 현탁하였다. 회수된 포자는 4°C에서 보존하면서 사용하였다.

포자 염색 및 관찰

포자 확인은 Schaeffer와 Fulton 포자염색법(12)을 사용하였다. 즉 시료 25 μL를 슬라이드상에 도말 후 열고정 하고 malachite green (5%) 용액(Fluka, Steinheim, Switzerland)을 마르지 않도록 계속 첨가해주면서 5분 간 가열하며 염색하였다. 염색이 끝난 후 safranin O (2.5%) 용액(Fluka)으로 20초 간 대조 염색한 후 다시 증류수로 세척하고 위상차현미경으로 포자를 관찰하였다(Fig. 1).

포자 접종 및 시료의 제조

4°C 보존 포자시료를 80°C에서 10분간 처리하여 영양세포를 사멸한 후 소스 접종에 사용하였다. 회수된 포자의 최종 농도는 10^7 CFU/mL 수준이었고 10^7 CFU/mL 포자를 10^5 spore/g 되도록 미리 UV 살균 처리한 polyethylene (PE) 필름에 충진된 소스에 접종하고 stomacher mixer (Bagmixer, Duksan, Seoul, Korea)에서 충분히 혼합하여 사용하였다.

포자 발아 효과 분석

포자 접종 소스를 40°C 혹은 80°C에서 각각 30분 및 15분 처리하거나, IMP (Sigma-Aldrich)를 10 mM 되도록 첨가하고 상기와 동일한 온도와 시간으로 처리하고 일부는 MYP agar (Merck, Darmstadt, Germany)배지에 도말 배양하여 N_0치를 측정하였고, 다른 일부는 TSB에 접종하고 이를 30°C에서 100분 간 배양한 후 발아된 영양세포를 80°C에서 10분간 처리하여 사멸시킨 다음 최종적으로 MYP 배지상에 30°C, 24시간 배양하여 잔존 포자수 N치를 측정하였다.

*Bacillus cereus*의 계수

MYP 배지 분석법을 변형하여 계수하였다. 즉 시료 10 g을 취하여 20 mL의 멸균생리식염수를 가하여 2분간 고속 균질화하여 시험용액으로 하였다. 멸균 생리식염수를 사용하여 10진 희석액을 MYP agar (Merck)에 0.1 mL씩을 도말하여 30°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 집락 주변에 lecithinase를 생성하는 혼탁한 환을 갖는 분홍색 집락을 선별 계수하였다.

통계분석

실험은 모두 3회 반복하였고 SPSS (Statistical Package for the Social Science, ver. 18.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 통계분석하였으며 각 처리구 간의 유의성 검증을 위해 one-way ANOVA를 실시한 후 처리군의 평균값 간의 비교를 위해 Duncan의 다중검정(Multiple Range Test)을 이용하여 5% 유의수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

결과 및 고찰

발아 실험 설계

포자의 발아와 관련하여 조사하고 효과적인 조건으로 알려진 조건을 Table 1에 나타내었다. *B. cereus* 포자의 발아에 대한 각각의 인자의 효과를 볼 때, 열처리의 경우에는 40°C, 30분(7) 혹은 70-80°C, 15분 처리방법(8)이 유효하다고 보고되어 있으며 혐기적 조건 보다 호기적 조건에서 발아가 촉진된다고 알려져 있다(9). 또한 pH는 4.5-10.0 범위(10,11)에서, 염도는 1.0-3.0% 범위에서 발아가 촉진되며(11), 특히 발아촉진제로써 L-alanine 혹은 inosine이 사용될 경우 효과적으로 이들은 포자 내부의 막에 있는 특별한 수용체와 결합하여 발아가 일어난다고 보고되고 있다(8).

한편, 상기의 발아 인자들은 열처리와 병행할 경우 발아가 촉진될 수 있는 경우가 다수 보고되었다. Lovdal 등(8)은 *B. cereus* 포자를 비열처리구와 80°C, 15분 처리 후 100 mM L-alanine 함유 완충액에 접종한 경우 비열처리구와 달리 열처리구에서 발아가 일어났다고 하였다. 또한 Yang 등(3)은 호기상태 일 때 70°C 열처리와 L-alanine/inosine 발아촉진제 병행처리 조건을 기본 처리구로 고정하여 발아를 측정한 결과, 열처리를 하지 않은 포자는 2.81 log CFU/g 수준 발아한 반면 열처리 된 포자의 발아는 3.72 log CFU/g 수준으로 나타나 동일한 호기 상태라도 열처리

Table 1. Factors related to germination of *Bacillus cereus* spore

Factor	Effective Range	Inhibition
Heat	40, 80°C, 15, 30 min	>70-80°C
Germinants	inosine, L-alanine, L-serine	-
Air	O_2	CO_2
pH	4.0-10.0	<4.0
Salt	1.0-3.0%	>3%

Fig. 1. Phase-contrast image of stained *Bacillus cereus* spores (×1000).

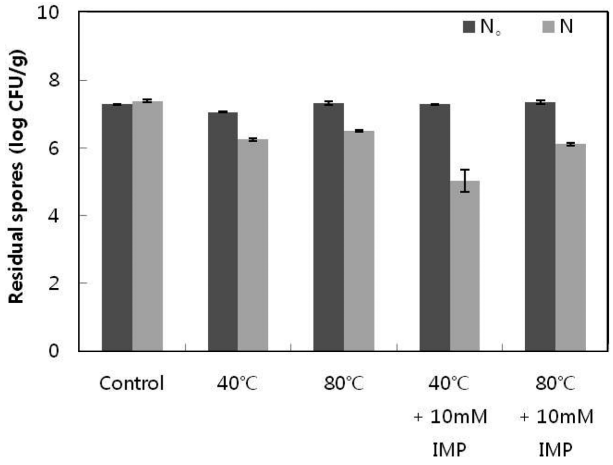

Fig. 2. Germination effect of temperature and IMP on artificially inoculated *Bacillus cereus* spore in Ganjang sauce. Results are shown as mean±SD.

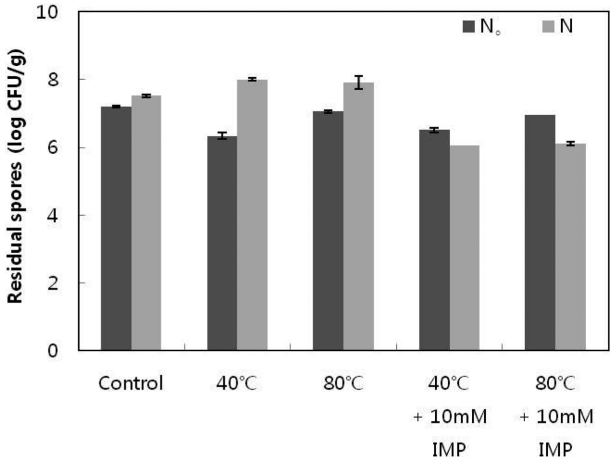

Fig. 3. Germination effect of temperature and IMP on artificially inoculated *Bacillus cereus* spore in Doenjang Sauce. Results are shown as mean±SD.

에 의해 발아 효과가 높아졌다고 보고하였다.

상기 조사결과를 볼 때 소스류에서 발아에는 40ºC 혹은 80ºC 열처리 및 inosine 성분이 유효한 발아효과를 보일 것으로 기대되고 있으므로 본 연구에서는 IMP가 소스류 제품에 조미증진용 소재로서 inosine 유도체인 점을 감안하여 40ºC 혹은 80ºC 열처리 및 inosine 성분 첨가구 등으로 발아 시험구를 설계하여 발아실험을 실시하였다.

소스에 접종된 포자의 발아에 미치는 온도 및 IMP 첨가 효과

간장, 된장 및 고추장을 이용하여 제조한 소스를 대상으로 *B. cereus* 포자를 접종하고 열처리 및 inosine의 유도체인 IMP 첨가 효과를 검토하였다. Fig. 2와 Table 2에 나타낸 바와 같이 간장소스에서의 발아시험 결과 변화가 없는 대조구와 달리 40ºC 혹은 80ºC 처리구는 모두 0.8 log CFU/g 수준 발아하여 대조구와 대비하여 유의적인 발아효과를 보였다. 또한 10 mM IMP를 첨가하여 40ºC 혹은 80ºC로 처리한 경우에는 IMP를 첨가하지 않은 처리구와 대비하여 발아 수준이 유의적으로 더욱 높아져 40ºC에서는 2.25 log CFU/g 수준 발아하였고 80ºC에서는 1.21 log CFU/g 수준 발아하는 것으로 나타났다. Fig. 3에 나타낸 된장소스의 경우에는 40ºC 혹은 80ºC로 처리하였을 때에는 발아효과를 보이지 않았으나 10 mM IMP를 첨가하고 40ºC 혹은 80ºC로 처리한 경우에는 발아효과를 보여 40ºC에서는 0.46 log CFU/g 수준의 발아효과를 보였고 80ºC에서는 이보다 높은 0.85 log CFU/g 수준의 발아효과를 보였다. 상기 된장소스의 발아효과는 간장소스의 발아효과에는 미치지 못하고 있는데 이는 간장소스와 된장소스의 환경 차이와 관련이 있을 것으로 생각된다.

한편 Fig. 4의 고추장소스의 경우, 40ºC 혹은 80ºC 처리구 및 10 mM IMP 첨가 후 40ºC 혹은 80ºC 처리구 모두에서 발아가 거의 일어나지 않는 것으로 나타나고 있어 고추장소스는 상기의 실험조건에서 포자의 발아가 진행되기 매우 어려운 환경인 것으로 판단되었다.

본 연구에서는 소스의 환경과 발아효과에 대한 관계를 파악코자 소스의 pH 및 염도를 측정하여 Table 3에 나타내었다. 먼저 pH에 있어서 발아효과가 가장 크게 나타난 간장소스는 pH 4.84인 반면 간장소스 다음으로 발아효과를 보인 된장소스의 pH는 4.26이었으며 발아효과를 전혀 보이지 않은 고추장 소스는 pH 3.54로 강한 산성 범위에 있음을 알 수 있었다.

Table 2. Comparison of germination effect (log No/N) in sauces

Treatment	Ganjang sauce	Doenjang sauce	Gochujang sauce
Control	0.00±0.00[a1)]	0.00±0.00	0.00±0.00
40ºC	0.81±0.03[b]	0.00±0.00	0.00±0.00
80ºC	0.82±0.34[b]	0.00±0.00	0.63±0.08
40ºC+10 mM IMP	2.25±0.34[d]	0.46±0.06	0.00±0.00
80ºC+10 mM IMP	1.21±0.09[c]	0.85±0.06	0.00±0.00

[1)]All values are mean±SD of three replications.
[a-d]Means in the same column with different superscripts are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 3. Comparison of pH and salinity of sauces

Sauces	pH	Salinity (%)
Ganjang sauce	4.84±0.03[1)]	7.45±0.04
Doenjang sauce	4.26±0.01	5.07±0.05
Gochujang sauce	3.54±0.03	3.24±0.04

[1)]All values are mean±SD of three replications.

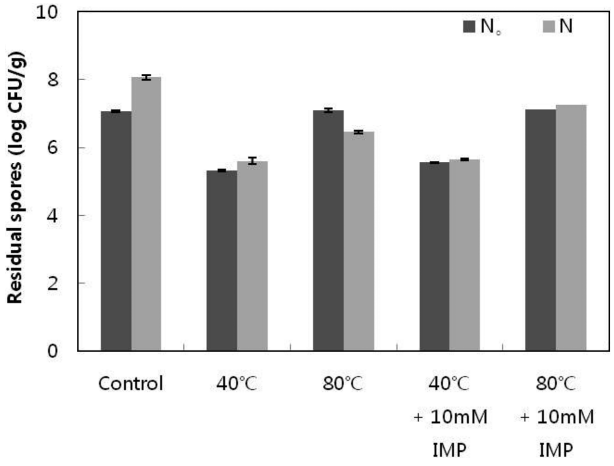

Fig. 4. Germination effect of temperature and IMP on artificially inoculated *Bacillus cereus* spore in Gochujang Sauce. Results are shown as mean±SD.

Alberto 등(10)은 *B. cereus*의 포자를 inosine과 L-alanine이 첨가된 buffer에서 산성인 pH 5.7 이하부터는 발아가 저해 되었다고 보고하였고, Lee 등(11)은 액체배지를 pH 2.0에서 pH 10.0까지 조정한 후 포자를 접종하여 48시간 배양한 결과 pH 4.0 이하에서는 포자상태로 존재하였으며, pH 4.5와 10.0에서는 포자가 완만히 성장하였고 나머지 pH에서는 포자가 활발히 증식하였다고 하였다. Yang(13)은 열처리 포자는 pH 4.5에서는 1.64 log CFU/g, pH 7.4에서는 3.61 log CFU/g 수준의 발아효과를 보였고 pH 9.8에서는 4.63 log CFU/g 수준의 발아효과를 보여주고 있어 상기 결과에서 소스의 pH가 포자의 발아에 영향을 주고 있을 가능성을 시사하고 있다.

한편 Table 3에 나타낸 소스류의 염농도는 간장소스가 7.45%로 가장 높았고 그 다음으로 된장소스 5.07%, 고추장소스 3.24%의 수준을 나타내었다. Lee 등(11)은 NaCl 농도에 따른 *B. cereus* 포자의 발아는 2% NaCl일 때 가장 활발하였고, 5% NaCl 이상에서는 농도와 비례하여 감소하는 결과를 나타냈다고 하였다. Yang(13)은 비열처리 및 열처리와 관계없이 NaCl 농도 1-3% 부근에서 발아가 가장 활발하며 NaCl이 존재하지 않거나, 5% 이상에서는 억제되는 경향을 나타내었다고 하였다.

본 연구에서의 소스류는 염농도에 서로 차이를 보였지만 모두가 염도 3.24% 이상으로 유효 발아조건 범위에서 벗어나고 있어서 발아가 저해되었을 가능성이 있음을 알 수 있었으며 따라서 상기 결과를 통해 향후 장류를 이용한 소스류의 *B. cereus* 포자를 제어하기 위해서는 열처리와 IMP의 동시 처리 및 pH와 같은 환경인자를 고려하여 보다 상세한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

장류를 이용한 소스 3종류(간장, 된장 및 고추장소스)에 대해 *Bacillus cereus* spore를 인위적으로 접종하고 40°C 혹은 80°C 처리구 및 40°C 혹은 80°C에 10 mM IMP 첨가 처리구로 나누어 포자의 발아를 유도한 다음 이들을 다시 80°C로 처리하는 방법을 통해 발아효과를 측정하였다. 간장소스의 경우 40°C와 80°C 처리에서 모두 0.8 log CFU/g 수준의 발아효과를 보였고 여기에 10 mM IMP를 첨가 시 40°C에서는 2.25 log CFU/g, 80°C 처리에서는 1.21 log CFU/g의 발아수준을 보여 처리구 간에 유의적인 차이를 나타내었다. 한편 된장소스는 40°C, 10 mM IMP 및 80°C, 10 mM IMP 처리 시 대조구 대비 각각 0.46 log CFU/g 및 0.85 log CFU/g로서 간장소스의 경우보다 낮은 발아수준을 나타내었고 고추장 소스의 경우에는 발아효과가 거의 나타나지 않았다. 상기 결과를 통해 열과 IMP 처리는 간장소스 내 *B. cereus* spore의 발아 유도에 응용이 가능하며 된장소스 및 고추장 소스에서 발아효율을 높이기 위해서는 pH 등 다양한 환경인자를 고려한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 2012년 농림수산식품기술기획평가원 기획과제 장류를 이용한 소스류 산업화 기술 연구사업 지원에 의해 수행되어 이에 감사를 드립니다.

References

1. Miller FP, Vandome AF, Mcbrewster J. *Bacillus Cereus.* Alphascript Publishing, Saarbrcken, Germany. pp. 1-2 (2010)
2. MFDS. Common standards &specifications for general foods. Available from: http://www.mfds.go.kr/files/upload/eng/Article_2._Common_Standards___Specification_for_General_Foods.pdf. Accessed Feb. 12, 2014
3. Yang SK, Kim JJ, Kim SJ, Oh SW. Synergistic effect of grapefruit seed extract, EDTA and heat on inactivation of *Bacillus cereus* spore. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 40: 1469-1473 (2011)
4. Koo MS. *Bacillus cereus*: An ambusher of food safety. Bull. Food Technol. 22: 587-600 (2009)
5. Takano M, Yokoyama M. Inactivation of Food borne microorganisms. Shinshobou, Tokyo, Japan. pp. 87-106 (1998)
6. Hornstra LM, de Leeuw, PLA, Moezelaar R, Wolbert EJ, de Vries YP, de Vos WM, Abee T. Germination of *Bacillus cereus* spores adhered to stainless steel. Int. J. Food Microbiol. 116: 367-371 (2007)
7. Collado J, Fernandez A, Rodrigo M, Martinez A. Modelling the effect of a heat shock and germinant concentration on spore germination of a wild strain of *Bacillus cereus.* Int. J. Food Microbiol. 106: 85-89 (2006)
8. Lovdal IS, Hovda MB, Granum PE, Rosnes JT. Promoting *Bacillus cereus* spore germination for subsequent inactivation by mild heat treatment. J. Food Protect. 74: 2079-2089 (2011)
9. Rosenfeld E, Duport C, Zigha A, Schmitt P. Characterization of aerobic and anaerobic vegetative growth of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* F4430/73 strain. Can. J. Microbiol. 51: 149-158 (2005)
10. Alberto A, Broussolle V, Mason DR, Carlin F, Peck MW. Variabillity in spore germination response by strains of proteolytic *Clostridium botulinum* types A, B and F. Lett. Appl. Microbiol. 36: 41-45 (2003)
11. Lee MS, Choi JD, Chang DS. Effect of pH, sodium chloride and potassium sorbate on the germination of *Bacillus cereus* spores in cooked rice homogenate. Korean J. Fish. Aquat. Sci. 16: 37-43 (1983)
12. Schaeffer AB, Fulton MD. A simplified method of staining endospores. Science 77: 194 (1933)
13. Yang SK. Effect of physical and chemical factors on spore germination of *Bacillus cereus.* MS thesis, Kookmin University, Seoul, Korea (2012)