발효주류의 미생물학적 위해요소

Microbiological Hazards in the Fermented Alcoholic Beverages

김선애, 심문보[1], 전영욱[1], 이민석*

Sun Ae Kim, Moon Bo Sim[1], Young Wook Jeon[1], and Min Suk Rhee*

고려대학교 생명과학대학 식품공학과, [1]하이트진로 R&D 센터

Department of Food Bioscience and Technology, College of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, [1]Hitejinro R&D center

Ⅰ. 서론

오늘날 급속한 경제성장 및 다양한 사회활동으로 인해 주류 소비는 꾸준히 증가하고 있다. 특히 막걸리, 약주, 기타 과실주와 같은 우리나라 전통 발효주는 세계 주류 품평회에서도 좋은 성적을 거두는 등 국제 주류 시장에서의 입지와 위상이 점점 높아지고 있다. 현재 우리 발효주에 대해 세계 주류시장에 선보일 품질인증제도는 시행되고 있지만 안전성을 입증할 수 있는 기초자료 및 미생물 기준·규격 등의 제도적 장치가 불충분하여 국제교역에 걸림돌이 될 수 있는 실정이다. 발효주류에서 안전성 문제가 제기될 경우 수출 및 관련 산업의 경제적 파급효과는 상당할 것으로 예상되며 한식 세계화를 적극 추진하는 시점에서 국가적 신뢰도 저하에 따른 손실을 초래할 수 있다. 한편 주류의 환경(높은 알콜 함량, 낮은 pH, 제한된 영양, 높은 CO_2 함량, 항균물질 함유 등)에서는 미생물이 생존할 수 없다는 일반적인 인식으로 인해 주류관련 업계 및 학계에서 위해미생물의 검출 및 저감화 연구는 상대적으로 등한시되어 왔다(Kourtis, 2001, March 등, 2005, Menz 등, 2009). 또한 발효주류는 주로 중·소규모, 영세 생산업체에서 지역별, 생산자의 특성에 따라 비정형화된 방법으로 생산되는 경우가 많아 공정 및 미생물학적 위해와 관련된 과학적·체계적 자료가 매우 불충분한 실정이다. 발효주류의 미생물학적 위해요소 연구 및 관리 방안의 부재는 국내 유통 발효주류에 대한 소비자의 불안감을 조장할 수 있으며, 발효주류산업의 발전과 질적 성장 도모를 위해서는 지속적인 관련 연구 및 소비자 계도가 필요하다. 이에 본고에서는 발효주류의 정의 및 분류, 국내외 기준·규격, 발효주류의 위해미생물 검출현황, 위해미생물의 발효주류 내 생존 추이, 발효주류 생산 단계의 위해미생물 저감효과에 대한 고찰을 토대로 발효주류의 위생 안전 관리 방안을 모색하고자 한다.

* Correspondence to: Prof. Min Suk Rhee
Department of Food Bioscience and Technology, College of Life Sciences and Biotechnology, Korea University,
5-1 Anam-dong, Sungbuk-gu, Seoul, 136-713, Repulic of Korea
Tel: 82-3290-3058 Fax: 82-2-3290-4984 E-mail: rheems@korea.ac.kr

Ⅱ. 본론

1. 발효주류의 정의 및 국내외 기준 · 규격

대한민국 주세법 제 3조에서는 '주류'라 함은 "주정과 알콜분 1도 이상의 음료를 말하며 약사법에 의한 의약품으로서 알콜분 6도 미만의 것을 제외한다."라고 정의하고 있다(국가법령정보센터, 2012). 식품공전에서는 주류를 '곡류, 서류, 과일류 및 전분질원료 등을 주원료로 하여 발효 등 제조 · 가공한 양조주, 증류주 등 주세법에서 규정한 주류를 말한다'라고 정의하고 있다. 발효주류는 탁주, 약주, 청주, 맥주, 과실주로 분류되며 각각의 종류 및 특징은 다음 표 1과 같다.

2010년 국세청이 전담해왔던 주류의 위생 · 안전관리 업

표 1. 대한민국 주세법 상 발효주류의 종류 및 정의

분류	특징
탁주	1) 곡류와 국 및 물을 원료로 하여 발효시킨 술덧을 여과하지 아니하고 혼탁하게 제성한 것 2) 곡류 외의 전분이 포함되어 있는 물료와 국 및 물을 원료로 하여 발효시킨 술덧을 여과하지 아니하고 혼탁하게 제성한 것 3) 곡류 · 곡류 외의 전분이 포함되어 있는 물료와 국 및 물을 원료로 하여 발효시킨 술덧을 여과하지 아니하고 혼탁하게 제성한 것 4) '1)' 내지 '3)'의 규정에 의한 주류의 원료에 당분을 첨가하여 발효시킨 술덧을 여과하지 아니하고 혼탁하게 제성한 것 5) '1)' 내지 '4)'의 규정에 의한 주류의 발효 · 제성과정에 대통령령이 정하는 물료를 첨가한 것
약주	1) 곡류와 국 및 물을 원료로 하여 발효시킨 술덧을 여과 · 제성한 것 2) 곡류 외의 전분이 포함되어 있는 물료와 국 및 물을 원료로 하여 발효시킨 술덧을 여과 · 제성한 것 3) 곡류 · 곡류 외의 전분이 포함되어 있는 물료와 국 및 물을 원료로 하여 발효시킨 술덧을 여과 · 제성한 것 4) '1)' 내지 '3)'의 규정에 의한 주류의 원료에 당분을 첨가하여 발효시킨 술덧을 여과 · 제성한 것 5) '1)' 내지 '4)'의 규정에 의한 주류의 발효 · 제성과정에 대통령령이 정하는 물료를 첨가한 것
청주	1) 곡류 중 쌀(찹쌀을 포함한다) · 국 및 물을 원료로 하여 발효시킨 술덧을 여과 · 제성한 것 또는 그 발효 · 제성과정에 대통령령이 정하는 물료를 첨가한 것 2) '1)'의 규정에 의한 주류의 발효 · 제성과정에 대통령령이 정하는 주류 또는 물료를 혼합하거나 첨가하여 여과 · 제성한 것으로서 대통령령이 정하는 알콜분의 도수 범위 안의 것
맥주	1) 엿기름(밀엿기름을 포함한다. 이하 같다) · 홉(홉성분을 추출한 것을 포함한다. 이하 같다) 및 물을 원료로 하여 발효시켜 제성하거나 여과 · 제성한 것 2) 엿기름과 홉, 쌀 · 보리 · 옥수수 · 수수 · 감자 · 전분 · 당분 또는 캐러멜 중 하나 이상의 것과 물을 원료로 하여 발효시켜 제성하거나 여과 · 제성한 것 3) '1)' 또는 '2)'의 규정에 의한 주류의 발효 · 제성과정에 대통령령이 정하는 주류 또는 물료를 혼합하거나 첨가하여 인공적으로 탄산가스가 포함되도록 하여 제성한 것으로서 대통령령이 정하는 알콜분의 도수 범위 안의 것
과실주	1) 과실(과실즙과 건조시킨 과실을 포함한다. 이하 같다) 또는 과실과 물을 원료로 하여 발효시킨 술덧을 여과 · 제성하거나 나무통에 넣어 저장한 것 2) 과실을 주된 원료로 하여 당분과 물을 혼합하여 발효시킨 술덧을 여과 · 제성하거나 나무통에 넣어 저장한 것 3) '1)' 또는 '2)'의 규정에 의한 주류의 발효 · 제성과정에 과실 또는 당분을 첨가하여 발효시켜 인공적으로 탄산가스가 포함되도록 하여 제성한 것 4) '1)' 또는 '2)'의 규정에 의한 주류의 발효 · 제성과정에 과실즙을 첨가한 것 또는 이에 대통령령이 정하는 물료를 첨가한 것 5) '1)' 또는 '2)'의 규정에 의한 주류의 발효 · 제성과정에 대통령령이 정하는 주류 또는 물료를 혼합하거나 첨가한 것으로서 대통령령이 정하는 알콜본의 도수 범위 안의 것 6) '1)' 내지 '5)'의 규정에 의한 주류의 발효 · 제성과정에 대통령령이 정하는 물료를 첨가한 것

(출처: 주세법 시행령 제 3조)

표 2. 베트남의 발효주류 미생물 기준 · 규격

분류	Keg beer	캔맥주, 병맥주, 25도 이하 알콜 음료
호기성 세균	1,000 CFU/ml 이하	10 CFU/ml 이하
식중독 세균	*Escherichia coli, Clostridium perfringens* 음성/ml	*Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Streptococci faecal, Pseudomonas aeruginosa, Clostridium perfringens* 음성/ml
효모, 곰팡이	100 CFU/ml 이하	-

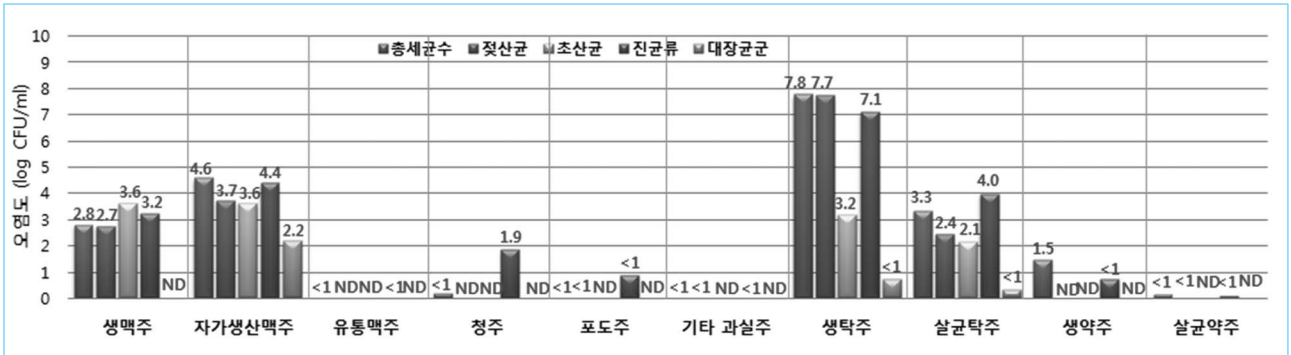
(출처: Vietnam's Ministry of Health, 2010)

무가 식품의약품안전처에 이관되었다. 식품공전 상에는 모든 발효주류 주종에 대해 일반세균수, 대장균군, 위해미생물에 대한 미생물 기준은 부재하며 살균탁주, 살균약주에 한해 개별 규격으로 진균수 음성 기준만이 존재한다. 한편 식품공전의 공통규격으로 '제 5. 식품별 기준 및 규격'에서는 더 이상의 가공, 가열조리를 하지 않고 그대로 섭취하는 가공식품에 대하여 *Bacillus cereus* 3 log CFU/g 이하의 기준을 적용하고 있다.

식품관련 국제기구 및 미국, 캐나다, 영국, 프랑스, 독일, 유럽연합, 러시아, 중국, 일본, 대만, 베트만 등의 정부부처 및 주류관련 협회에 문의하여 발효주류의 미생물 기준 및 규격에 대하여 조사한 결과 중국과 베트남을 제외한 대부분의 국가에서 기준 · 규격을 설정하지 않고 있는 것으로 나타났다. 중국에서는 *Salmonella*와 *Staphylococcus aureus*에 대하여 n, c, m법을 적용한 정량기준을 규정하고 있다(n=5, c=0, m=0/25 ml)(China's Ministry of Health, 2011). 베트남에서는 keg beer와 알콜 함량 25도 이하의 저도주류에 대해 미생물 규격을 적용하고 있는데(Vietnam's Ministry of Health, 2010), keg beer의 경우 총세균수 1,000 CFU/ml 이하, 효모 및 진균류 100 CFU/ml 이하로 관리하고 있으며 *Escherichia coli*와 *Clostridium perfringens*에 대해서는 음성 규격이 존재한다(표 2). 저도주류는 총세균수 10 CFU/ml 이하, *E. coli, S. aureus, Streptococci faecal, Pseudomonas. aeruginosa, C. perfringens* 불검출로 관리하고 있다.

2. 발효주류 내 위해미생물 검출 수준

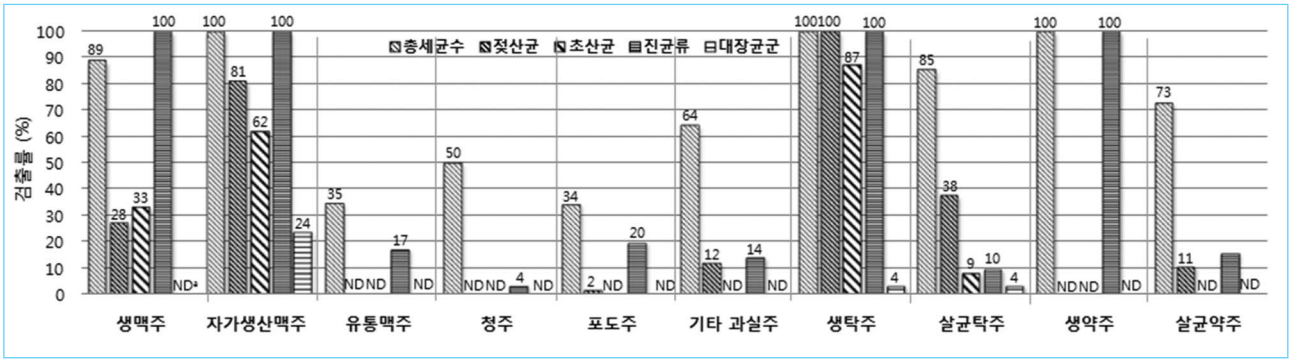
발효주류의 미생물 검출 연구는 위해미생물 보다는 발효미생물 및 부패세균에 집중되어 수행되어 국내 발효주류의 위해미생물 검출 현황 연구가 미비한 실정이다. 본고에서는 본 연구진이 용역과제의 일환으로 수행한 국내 유통 발효주류의 위해미생물 검출 실태 분석 결과를 소개하고자 한다(식품의약품안전평가원, 2012). 총 636건의 발효주류(생맥주, 자가생산맥주, 유통맥주, 청주, 포도주, 기타 과실주, 생탁주, 살균탁주, 생약주, 살균약주)에 대한 총세균수, 젖산균, 초산균, 진균류, 대장균군의 검출률과 평균 검출량을 그림 1과 2에 각각 나타내었다.



[a]ND, not detected.

그림 1. 국내 유통 발효주류의 미생물 정량분석 결과: 검출률

(출처: 식품의약품안전평가원, 2012)



[a]ND, not detected.

그림 2. 국내 유통 발효주류의 미생물 정량분석 결과: 평균 검출량

(출처: 식품의약품안전평가원, 2012)

주종별 총세균수는 자가생산맥주(100.0%)와 생탁주(100.0%)의 모든 시료에서 검출되었으며, 그 다음으로 생맥주(88.9%), 살균탁주(85.4%), 약주(74.2%), 기타 과실주(64.2%), 청주(50.0%), 유통맥주(34.8%), 포도주(34.4%) 순으로 검출률이 높게 나타났다(그림 1). 총세균수 평균 검출량은 생탁주에서 7.8 log CFU/ml로 가장 높았고, 그 다음으로 자가생산맥주(4.6 log CFU/ml), 살균탁주(3.3 log CFU/ml), 생맥주(1.2 log CFU/ml), 생약주(1.5 log CFU/ml), 살균약주(0.1 log CFU/ml) 순으로 나타났다(그림 2). 그 외 청주, 포도주, 기타 과실주의 경우 25 ml 당 10 CFU 미만의 미미한 수준의 총세균수가 검출되었다(그림 2).

젖산균의 경우 유통맥주와 청주 시료에서는 검출되지 않았으며, 생탁주(100.0%)의 검출률이 가장 높았고 그 다음으로 자가생산맥주(81.0%), 살균탁주(37.8%), 생맥주(27.8%), 기타 과실주(12.3%), 약주(10.5%), 포도주(2.0%) 순으로 나타났다(그림 1). 젖산균 검출량은 불검출인 유통맥주와 청주 시료 이외에 포도주, 기타 과실주, 약주 시료에서는 미미한 검출량을 보였으며, 생탁주에서 7.7 log CFU/ml로 가장 높았다(그림 2).

초산균은 생탁주, 자가생산맥주, 생맥주, 살균탁주에서 검출되었으며 검출 수준은 생맥주(3.6 log CFU/ml)에서 가장 높았다(그림 1, 2).

진균류는 별도의 살균 공정이 없고 발효미생물로 효모나 누룩을 사용하는 생맥주, 자가생산맥주, 생탁주에서는 모든 검사대상 시료에서 검출되었다(그림 1). 진균류 검출량은 생탁주(7.1 log CFU/ml)에서 가장 높았으며, 자가생산맥주(4.4 log CFU/ml), 살균탁주(4.0 log CFU/ml), 생맥주(3.2 log CFU/ml), 청주(1.9 log CFU/ml) 순이었으며, 유통맥주, 포도주, 기타 과실주, 약주의 경우 25 ml 당 10 CFU 미만 수준의 미미한 검출량을 나타냈다(그림 2). 검출된 진균류의 균총분석 결과 알콜발효에 사용된 위해성이 없는 효모(*S. cerevisiae*)와 곰팡이(*Penicillium* spp., *Aspergillus* spp.)가 대부분인 것으로 나타났다.

위생지표세균인 대장균군의 경우 자가생산맥주(23.8%), 살균탁주(3.7%), 생탁주(3.5%) 시료에서 검출되었으며, 그 외 주종에서는 검출되지 않았다(그림 1). 특이적으로 대장균군은 자가생산맥주에서 평균 2.2 log CFU/ml의 높은 검출량을 보였으며, 그 외 생탁주, 살균탁주에서는 10 CFU/ml 이하로 검출되었다(그림 2).

미생물 검출률 및 검출량이 높은 일부 탁주 시료에 대한 *B. cereus* 정량분석 결과 생탁주 20건(42.6%), 살균탁주 14건(30.4%)에서 검출되었으며, 평균 검출량은 각각 0.7, 1.4 log CFU/ml 수준이었다. *B. cereus*는 흙에 기인하는 재배 작물인 곡류에 검출될 가능성이 크며, 쌀, 밀, 과실을 주원료로 하는 발효주류의 특성 상 필연적으로 검출될 수 있다. 식중독을 일으킬 수 있는 *B. cereus*의 수준은 설사형 식중독의 경우 10^5–10^7 cells, 독소형 식중독의 경우 10^5–10^8

표 3. 국내 유통 발효주종별 미생물 정성분석 결과

주종	양성 시료 수/전체 시료 수(검출률, %)		
	Bacillus cereus	*Escherichia coli*	기타[a]
생맥주	1/18 (5.6)	ND[b]	ND
자가생산맥주	23/42 (54.8)	ND	ND
유통맥주	1/46 (2.2)	ND	ND
청주	7/28 (25.0)	ND	ND
포도주	9/105 (8.6)	ND	ND
기타 과실주	13/106 (12.3)	ND	ND
생탁주	47/85 (55.3)	2/85 (2.4)	ND
살균탁주	50/82 (61.0)	ND	ND
생약주	37/124 (29.8)	ND	ND

[a]*Campylobacter jejuni, Clostridium perfringenes, Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes, Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus, Yersinia enterocolitica;* [b]Not detected.

(출처: 식품의약품안전평가원, 2012)

cells로 보고되고 있다(Granum 등, 1997). 하지만 *B. cereus* 검출량이 100 CFU/ml 이하(생탁주 평균: 0.7 log CFU/ml, 살균탁주 평균: 1.4 log CFU/ml)로 나타나 실제로 주류를 섭취하여 인체에 노출되는 양은 식중독을 일으킬 수 있는 위해수준에 비해 매우 낮은 수준이었다.

다양한 발효주종 중 우리 전통 발효주인 탁주의 미생물 균총이 가장 풍부하였으며, 균총의 대부분은 젖산균, 효모 등의 발효미생물인 것으로 판단된다. 다만 별도의 살균공정을 거치지 않는 생탁주의 경우 대부분의 미생물 농도가 살균탁주에 비해 더 높을 뿐만 아니라 술의 품질을 저해하는 초산균의 검출량도 더 높게 나타나기 때문에 탁주의 품질관리를 위한 업체 특성별 표준을 마련하고, 전략적 관리방안을 도출해야 할 것으로 판단된다.

E. coli 및 8종 위해미생물(*B. cereus, Camphylobacter jejuni, C. perfringens, E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes, Salmonella spp., S. aureus, Yersinia enterocolitica*)의 정성분석 결과는 표 3과 같다. *B. cereus*는 모든 주종에서 검출되었으며 특히 살균탁주(61.0%), 생탁주(55.3%), 자가생산맥주(54.8%), 생약주(50.0%)에서의 검출률이 높게 나타났다. *E. coli*는 생탁주 2건(전체 1.2%, 생탁주 내 2.4%)에서 검출되었으며 이외의 위해미생물은 검출되지 않았다.

*B. cereus*는 독소형 식중독을 유발하는 균으로, 이 균이 생성하는 독소는 diarrhoeal type(설사형 식중독 유발), emetic type(구토형 식중독 유발)의 두가지 형태로 보고되고 있다(Granum, 1997, Ehling-Schulz 등, 2004). 설사형 식중독은 *B. cereus*가 소장에서 증식하는 동안 생성되는 이열성독소(heat labile enterotoxin)에 의해 유발되며, 현재까지 hemolysin BL(*hblC, hblD, hblA*에 의해 전사), nonhemolytic enterotoxin(*nheA, nheB, nheC*에 의해 전사), cytotoxin CytK(*cytK*에 의해 전사) 세 종류의 장독소(enterotoxin)가 식중독을 유발시키는 주요 독소로 알려져 있다. 최근에는 enterotoxin FM(*entFM* 유전자에 의해 전사) 또한 식중독 유발 가능성이 있는 독소로 보고되고 있다(Dohmae 등, 2008). 구토형 식중독의 경우에는 cereulide라 불리는 single heat stable peptide toxin에 의해 발생하며, 최근 연구에 의해 cereulide 독소가 *ces* gene의 작용에 의해 생성되는 것으로 밝혀졌다(Ehling-Schulz 등, 2005, 2006).

다양한 발효주류에서 분리된 185개의 *B. cereus* 분리균주의 독소 유전자 분포 분석 결과 9개의 독소 유전자(*hblA, hblC, hblD, nheA, nheB, nheC, entFM, ctyK, ces*) 중 *nheC*가 169개 균주(91.4%)에서 분리되어 가장 검출률이 높게 나타났으며, 이어 *entFM*(151균주, 81.6%), *nheB*(116균주, 62.7%), *nheA*(106균주, 57.3%)로 NHE complex 독소를 가장 빈번하게 보유하고 있는 것으로 나타났다(식품의약품안전평가원, 2012). 이 외에도 *hlb, cytK* 또한 반 이상에서 검출되어 발효주류에서 분리된 *B. cereus*는 다양한 장독소 유전자를 보유하고 있는 것으로 생각된다(식품의약품안전평가원, 2012). 반면 구토형 독소는 매우 낮은 검출률(2.2%)을 보였다. 따라서 발효주류에서 식중독이 발생한다면 구토형보다는 설사형으로 나타날 가능성이 큰 것으로 판단된다.

3. 발효주류 내 주요 위해미생물의 저장 중 생존 추이

발효주는 다양한 원료에 발효미생물을 접종하여 생산하는 생합성 제품으로(Lea와 Piggott, 2003) 생산 공정 중 미생물의 증식 및 활성 유지에 적합한 환경이 꾸준히 유지되어 위해미생물의 생존에도 호의적인 환경을 제공할 수 있다. 보통 발효주류의 pH는 3.5-4.0, 알콜 함량은 4-13% 수준으로 미생물의 생존이 불가능하다고 인식되고 있지만(Kourtis, 2001, March 등, 2005, Menz 등, 2009), 선행연구에 의하면 이러한 환경에서 다양한 위해미생물(*E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* 등)의 장기 생존이 가능한 것으로 밝혀졌다(Zhao 등, 1993; Miller와 Kaspar, 1994; Oyarzabal 등, 2003; 김 등, 2008). 특히 미생물이 주류의 발효과정과 같이 산도가 서서히 감소하는 환경에 장시간 노출되면 산에 대한 적응(acid adaptation)을 통해 높은 내산성을 보유할 수 있다. 뿐만 아니라 발효주의 생산과정에서는 알콜뿐만 아니라 당, 유기산, 아미노산 등 각종 영양 성분이 생성되기 때문에 위해미생물이 이러한 영양성분을 기반으로 생존할 가능성이 있다.

다양한 발효주류(맥주, 청주, 적포도주, 백포도주, 생탁주, 살균탁주)에 주요 위해미생물(*B. cereus*, *E. coli* O157:H7, *S.* Typhimurium, *S. aureus*, *L. monocytogenes*) 및 *B. cereus* 포자를 접종한 후 생존 추이를 관찰하는 모의실험 결과는 그림 3과 같다(Kim 등, 2014a, 2014b). 발효주류에 접종된 위해미생물 및 포자의 균수는 증가하지 않고 점진적으로 줄어들거나 유지되어 유통 중 발효주류에서 위해미생물은 증식할 수 없는 것으로 나타났지만 생존이 불가능 할 것이라는 일반적인 인식과는 달리 일부 주종에서 위해미생물의 장시간 생존이 관찰되었다.

위해미생물 생존추이는 1) 미생물의 형태(영양세포 vs 포자), 2) 미생물의 종류, 3) 발효주류의 종류에 따라 다르게 나타났다. *B. cereus* 영양세포의 경우 저장 기간에 따라 유의적으로 감소한 반면, 포자의 수는 28일 저장 시 감소하지 않고 초기 농도를 유지하였다(그림 3). *B. cereus* 포자는 스트레스 환경에서 영양세포보다 더 높은 저항성을 보유하고 있어 장시간 생존이 가능한 것으로 판단되며, 이는 발효주류 생산 과정 중 포자가 생성된다면 제품이 판매되는 동안 생존할 수 있는 가능성을 시사한다. 따라서 유통 제품에서 다수 검출되는 *B. cereus*는 영양세포보다는 포자 형태로 존재하는 것으로 추측할 수 있다. 맑은술(맥주, 청주, 포도주)에서는 *E. coli* O157:H7이 다른 위해미생물보다 높은 생존을 나타내었으며 *E. coli* O157:H7의 높은 산 저항성 때문으로 추정된다. 일반적으로 위해미생물의 생존은 맥주 〉 살균탁주 〉 생탁주 〉 청주 〉 적포도주, 백포도주 순으로 높게 나타났다(그림 3). 맥주는 다른 주종에 비해 낮은 알콜함량과 높은 pH를 보유하고 있어 비교적 위해미생물의 생존이 용이한 것으로 판단되며, 탁주의 경우 다른 주종에 비해 풍부한 영양성분과 고형물이 미생물 생존에 부분적으로 긍정적인 영향을 미친 것으로 생각된다. 살균탁주의 경우 생탁주보다 높은 미생물 생존이 관찰되었는데 이는 생탁주에 존재하는 미생물(젖산균 등)의 경쟁에 의해 접종 위해미생물의 생존이 저해된 것으로 생각된다. 포도주의 경우 제품에 존재하는 다양한 항미생물 성분(ferulic acid, methyl gallate, epicatechine, synaptic acid, *p*-hydroxybenxoic acid, gallic acid, vanillic acid, tryptophol, cumaric acid, caffeic acid 등)에 의해 위해미생물이 빠르게 감소된 것으로 판단된다(Fernandes 등, 2007, Gañan 등, 2009, García-Ruiz 등, 2012, Rodríguez Vaquero 등, 2007).

4. 발효주류 생산 공정의 위해미생물 저감효과

발효주는 과실의 당분이나 곡류의 탄수화물을 미생물이 분비하는 효소로 분해함으로써 알콜을 비롯한 다양한 성분(유기산, 아미노산, 단당류 등)을 생성하여 특유의 향과 맛을 내는 방식으로 생산된다(Lea와 Piggott, 2003). 따라서 유통과정 중 발효주가 특유의 향과 맛을 유지할 수 있도록 제품의 균총을 적정 수준으로 유지하면서 부패 및 위해미생물의 증식을 제어하고 품질을 유지할 수 있어야 한다. 이에 발효주류를 생산하는 다양한 업체에서는 발효주 내 미생물에 의한 지속적인 발효로 인해 발생하는 문제점을 해결하고 발

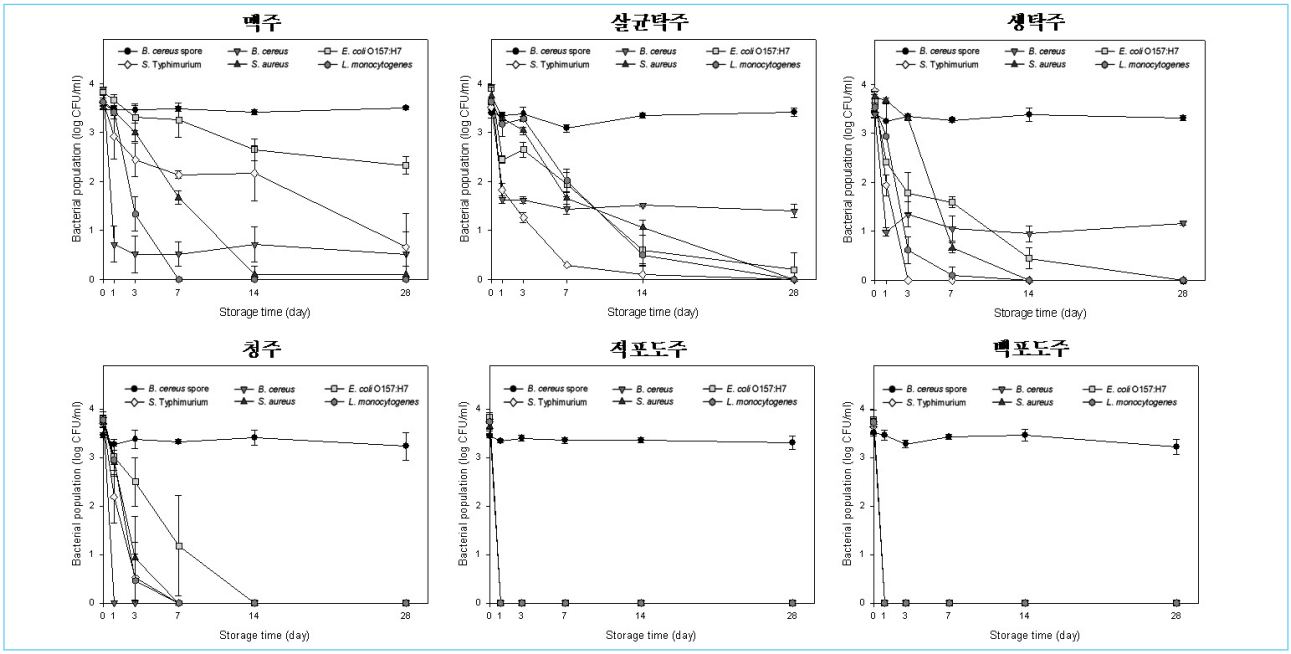


그림 3. 발효주류 내 위해미생물 및 *Bacillus cereus* 포자의 냉장온도(4°C)에서의 생존 추이

(출처: Kim 등, 2014a, 2014b)

효주의 저장성을 연장시키고자 저온가열법, 여과법 등을 도입해왔다. 본고에서는 유통 발효주류의 위해미생물 분석 결과를 기반으로 탁주와 자가생산맥주를 고위해 주종으로 선정하여 제품 생산 공정의 위해미생물 저감효과 조사 결과(식품의약품안전평가원, 2012)를 소개하고자 한다.

탁주 제조 공정 중 증자(steaming)는 쌀에 100℃ 이상의 강한 수증기로 전분을 호화시켜 각종 효소의 작용을 용이한 형태로 만드는 공정으로 미생물의 사멸이 예상된다. 30분간의 증자에 의해 쌀에 고농도로 접종된 미생물 영양세포(*B. cereus*, *E. coli*, *S. aureus*)는 모두 사멸되었으며, *B. cereus* 포자를 고농도(7.13 log)로 접종한 경우에는 3.9 log CFU/g, 저농도(3.7 log)로 접종한 경우에는 2.5 log CFU/g의 저감효과가 나타났다(표 4). 탁주 생산에 사용되는 쌀에서의 *B. cereus* 검출량은 1.5-2.4 log CFU/g으로 낮으며(7개 업체 방문 조사 결과) 실제 탁주 생산 공장에서 증자 단계 이후 *B. cereus*가 모든 시료에서 검출되지 않은 것으로 추측했을 때(식품의약품안전평가원, 2012), 증자 단계를 적절히 처리한다면 쌀에 존재하는 *B. cereus*를 제어하는 데 효과적일 것으로 판단된다. 이러한 결과로 미루어 추정해 볼 때 최종 제품에 잔존한 *B. cereus*는 제조공정 중 환경으로부터 오염되거나 증자단계 이후 첨가된 다양한 재료에서 오염된 것으로 판단된다.

표 4. 증자에 의한 쌀 내 위해미생물 및 *Bacillus cereus* 포자의 저감효과

미생물 및 포자	Bacterial population (log CFU/g)	
	증자 전	증자 후
Bacillus cereus	7.1 ± 0.08	ND[a]
Escherichia coli	8.1 ± 0.04	ND
Staphylococcus aureus	8.0 ± 0.03	ND
Bacillus cereus spore 고농도	7.1 ± 0.53	3.2 ± 0.30
Bacillus cereus spore 저농도	3.7 ± 0.39	1.2 ± 0.21

[a]ND, not detected (detection limit = 1 log CFU/g)

(출처: 식품의약품안전평가원, 2012)

가열살균은 발효주의 저장성을 연장시킬 수 있으나 쓴맛의 발현, 강한 악취생성, 변색 및 층 분리 등 제품의 품질 특

표 5. 국내 탁주 제조 업체의 탁주 살균 조건

업체		살균 방법
대규모	A	1차: 85℃ 1분 → 2차: 85℃ 2분
중·소규모	B	저온살균(65-70℃ 30분)
	C	2차: 85℃ 2분 → 2차: 저온살균(65-70℃ 30분)
	D	85℃ 3분
영세규모	E	저온살균(65-70℃ 30분)
	F	1차: 85℃ 1분 → 2차: 85℃ 2분
	G	High Temperature Short Time(95℃ 1분 이내)

(출처: 식품의약품안전평가원, 2012)

표 6. 자비에 의한 맥아즙 내 위해미생물 및 *Bacillus cereus* 포자의 저감효과

미생물 및 포자	Bacterial population (log CFU/ml)	
	자비 전	자비 후
Bacillus cereus	7.4 ± 0.30	ND[a]
Escherichia coli	7.8 ± 0.04	ND
Staphylococcus aureus	7.9 ± 0.03	ND
Bacillus cereus spore 고농도	8.3 ± 0.14	3.0 ± 0.71
Bacillus cereus spore 저농도	3.1 ± 0.08	ND

[a]ND, not detected (detection limit = 1 log CFU/g)

(출처: 식품의약품안전평가원, 2012)

성에 악영향을 미쳐 상품성을 저하시킬 수 있다(이 등, 1991; 목 등, 1998). 이 등(1991)은 생탁주를 60℃ 이하로 처리할 경우 저장 3일 이후부터 산도가 완만하게 증가하고 변패가 나타나 65℃ 이상 온도에서 처리해야 하며, 75℃ 이상 고온 처리 시에는 온도가 높아질수록 화독 냄새와 쓴 맛이 증가하여 전체적인 기호도가 저하되기 때문에 80℃ 수준에서 23초간 가열 살균하는 것이 적합하다고 보고하였다. 살균탁주는 일반적으로 생탁주에 비해 발효기간은 5-7일정도 더 거친 후 열을 가하는 살균처리가 이루어지며, 주세사무처리규정에 65℃ 이상에서 30분 이상 가열하거나 이와 동등 이상의 효력이 있는 방법으로 살균한다고 명시되어 있다. 국내 살균 탁주 생산 업체를 방문 조사한 결과 업체마다 표 5와 같은 고유의 살균법을 보유하고 있었다.

E. coli, *S. aureus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus casei* 균주를 탁주에 접종하여 내열성을 측정한 결과, 60℃에서 D-value가 각각 2.3, 9.1, 3.0, 5.0초로 식염수에 접종한 미생물의 D-value(각각 7.0, 18.0, 13.9, 11.0초)에 비해 낮게 나타났다(식품의약품안전평가원, 2012). 발효주류의 높은 알콜함량 및 낮은 pH 특성에 의한 열처리와의 조합작용으로 인해 탁주에서 미생물의 열저항성이 크게 감소되는 것으로 추측할 수 있다. 통상적으로 멸균개념으로 사용되는 12 × D-value인 Thermal Death Time(TDT)을 고려했을 때 탁주 살균에 사용되는 65℃, 30분의 열처리 또는 일반적인 저온살균조건인 60℃, 30분의 열처리는 탁주 내 존재하는 미생물 멸균에 충분한 것으로 판단된다. 실제로 *E. coli* 및 *S. aureus*를 접종한 탁주를 병에 주입한 후 60℃에서 10분간 저온살균처리 결과 *E. coli*와 *S. aureus* 모두 불검출 된 것을 확인하였다. 이 외에 도 HTST(High Temperature Short Time), UHT(Ultra High Temperature)에 의해서도 위해미생물을 충분히 제어 할 수 있었다(식품의약품안전평가원, 2012).

맥주 생산 공정 중 자비(boiling)는 맥아즙 내에 존재할 수 있는 미생물 및 효소작용을 억제하고 맥주 고유의 쓴맛을 형성하기 위해 맥아즙을 약 1-2시간 동안 끓이는 공정이다. 맥아즙에 위해미생물 및 *B. cereus* 포자를 임의 접종하여 자비(1시간) 전/후의 미생물수를 비교한 결과 자비 공정에 의해 위해미생물 영양세포는 모두 사멸되어 처리 후 시료에서는 검출되지 않았다(표 6). *B. cereus* 포자를 고농도(8.25 log CFU/ml)로 접종한 경우에는 5.25 log CFU/ml의 저감효과가 나타났고 저농도(3.06 log CFU/ml) 접종시에는 모두 사멸되었다. 맥아즙의 *B. cereus*의 검출수준을 고려했을 때(3개 업체 방문조사 결과 한 업체의 원료에서만 1.0 log CFU/g의 *B. cereus* 검출)(식품의약품안전평가원, 2012) 올바른 자비 공정을 수행한다면 *B. cereus* 포자까지 제어 가능할 것으로 판단된다.

5. 발효주류의 미생물학적 위해요소 관리방안

(1) 과학적 · 체계적 근거 기반으로 한 고위해 발효주류 선정 및 우선관리 필요

발효주류는 발효미생물의 첨가, 발효공정, 복잡한 제조공정, 제품 특성에 의해 미생물의 분포가 주종별로 매우 다양하기 때문에 주종별 적합한 안전관리가 필요하다. 유통맥주, 청주, 포도주, 기타 과실주, 약주는 미량의 미생물이 검출된 반면 생탁주, 살균탁주, 생맥주, 자가생산맥주는 다량의 미생물이 검출되어 탁주, 자가생산맥주 등 특정 품목의 안전성에 관한 추가 검토가 필요할 것으로 생각된다. 이처럼 주류의 종류 및 품목에 의해 발생할 수 있는 위생 · 안전성 문제를 고려하여 우선관리 대상 고위해 주종 및 품목을 선정한 후 순차적으로 관리 대상을 확대해 나가야 한다.

(2) 위해도를 고려한 합리적인 미생물 기준 · 규격 필요

현 식품공전에는 살균탁주, 살균약주에 한해 미생물 규격으로 진균류만 명시되어 있다. 살균탁주 및 살균약주에서 검출된 진균류의 균총분석 결과, 검출된 진균류 대부분이 위해성이 없는 효모나 곰팡이로 나타났으며, 진균류는 질병 발생과 직접적인 연관이 없기 때문에 현재의 진균류 규격으로 제품의 위생 · 안전성을 판단할 수는 없을 것으로 생각된다. 이에 현행 진균류 음성 규격보다는 현재의 검출수준을 반영한 위생지표세균 또는 위해미생물에 대한 규격 신설이 미생물학적 안전성 확보에 유효성이 높은 것으로 판단된다.

한편 *B. cereus*, *C. jejuni*, *C. botulinum*, *C. perfringenes*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *S. aureus*, *Y. enterocolitica*와 같이 식중독을 일으킬 수 있는 위해미생물은 다수의 식품에서 정량 · 정성 규격을 설정하여 관리하고 있다. 이 중 *B. cereus*, *C. perfringens*, *S. aureus*와 같이 위해도가 낮고 제품의 특성 및 공정 상 필연적으로 검출되거나 완전 제어가 불가능한 위해미생물에 대해서는 대국민 섭취량, 미생물의 특성(보관 · 유통 시 균의 생육, 위해도, 독소 등)을 고려한 위해평가를 통해 정량규격을 설정하고 있는 추세이다. 국내 유통 발효주류에서는 *B. cereus*만 검출되고 그 외의 위해미생물은 모든 제품에서 검출되지 않았다. 또한 위해미생물의 발효주류 내 생존추이를 관찰한 결과 시간이 경과함에 따라 사멸하는 것으로 나타나 위해미생물이 제품에 존재하더라도 질병을 일으킬 수 있는 균체량으로 증식하거나 독소를 생성하기에는 어려울 것으로 판단된다. 따라서 *B. cereus*를 제외한 위해미생물에 대한 규격 신설은 비합리적이고 실효성이 미비할 것으로 생각된다.

*B. cereus*는 발효주류의 특성 상 필연적으로 검출될 수 있으며 국내 유통 발효주류에 검출된 수준이 식중독을 일으키는 유효량보다 매우 낮은 수준이었다. 식중독을 일으키는 독소를 생성하려면 호기적 조건에서의 발아 및 증식이 수반되어야 하지만 발효주류의 환경이 미생물 성장에 용이하지 않으므로 증식하여 독소를 형성하기는 어려울 것으로 판단된다. 따라서 *B. cereus*의 기준 · 규격은 현재의 검출수준과 위해성을 고려하여 정량적으로 설정해야 할 것으로 판단된다.

(3) 올바른 미생물 제어공정 수행 및 오염 예방

본 연구진의 모의실험 결과 위해미생물 영양세포는 현재 발효주류 산업에서 적용하는 증자, 자비, 살균방법으로 충분히 제어가 가능하므로 올바른 공정을 수행함으로써 발효주류의 미생물학적 안전성을 확보할 수 있었다. 다만 *B. cereus* 포자는 영양세포보다 스트레스에 대한 내성이 크기 때문에 *B. cereus*가 고농도로 오염된 경우에는 완전 제어가 어렵다. 포자를 제어하기 위해서는 물리 · 화학적 처리를 높은 강도로 수행해야 하지만 높은 강도로 처리하는 것은 제품의 품질변화 및 효모 생존에 큰 변화를 야기한다. 또한 발효주류는 주세법 상 첨가할 수 있는 물질의 제한이 있고(주세법 제2조제1항), 제품의 품질(특히 맛과 향)이 항미생물 제제의 첨가로 인해 쉽게 변질될 수 있기 때문에 실제로 적용 가능한 물질에는 한계가 있다. 따라서 *B. cereus* 포자는 오염된 제품에서 제어를 하는 것 보다는 원재료 및 제조 공정 중에서의 오염을 원천적으로 제어하는 방법이 더욱 효율적일 것으로 판단된다.

Ⅲ. 결론

본고에서는 국내 유통 발효주류의 미생물학적 안전성 실태를 파악하고 위생관리 방안을 도출하고자 국내외 발효주류 현황 및 미생물 관리 실태 분석, 국내 유통 발효주류의 총체적 미생물 평가 및 분리된 *B. cereus*의 독소 분포, 저장 중 발효주류 내 위해미생물 및 *B. cereus* 포자의 생존, 발효주류 생산 공정의 위해미생물 저감효과에 대한 조사를 수행하였다. 발효주류가 미생물 생존 및 성장이 어려운 환경(높은 알콜 함량, 낮은 pH, 제한된 영양, 높은 CO_2 함량, 항균물질 함유 등)임에도 불구하고 탁주, 자가생산맥주와 같은 특정 주종에는 *B. cereus*가 다수 검출되었으며 위해미생물의 장시간 생존이 가능한 것으로 나타나 일부 주종에 대한 관리가 필요할 것으로 생각된다. 또한 발효주류의 미생물학적 안전성 연구는 국제적으로 미흡한 분야로 향후 발효주류 환경에서의 미생물 생존 특성, 발효주류에서 분리된 균주의 특성 연구, 발효주류의 위해미생물 저감화 기술 개발과 같은 후발 연구가 수행되어야 할 것으로 판단된다. 본 연구는 발효주류의 실질적이고 체계적인 미생물 기준 · 규격 설정 및 관리방안 마련을 위한 기초자료로 활용 가능하며 향후 발효주류 관련 연구의 초석이 될 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 2011-2012년도 식품의약품안전평가원의 연구개발비(11162식품안06)로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. China's Ministry of Health: National food safety standard-fermented alcoholic beverages (2011)

2. Dohmae, S., Okubo, T., Higuchi, W., Takano, T., Isobe, H., Baranovich T. Kobayashib, S., Uchiyamac, M., Tanabec, Y., Itohd, M. and Yamamoto, T.: *Bacilus cereus* nosocomical infection from reused towels in Japan. *J. Hosp. Infect*. 69, 361-367 (2008)

3. Ehling-Schulz, M., Fricker, M. and Scherer, S.: *Bacillus cereus* the causative agent of an emetic type of food-borne illness. *Mol. Nutr. Food. Res*. 48, 479-487 (2004)

4. Ehling-Schulz, M., Guinebretiere, M.H., Monthán, A., Berge, O., Fricker, M. and Svensson, B.: Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus*. *FEMS. Microbiol. Lett.* 260, 232-240 (2006)

5. Ehling-Schulz, M., Vukov, N., Schulz, A., Shaheen, R., Andersson, M., Märtlbauer, E. and Scherer, S.: Identification and partial characterization of the nonribosomal peptide synthetase gene responsible for cereulide production in emetic *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 105-113 (2005)

6. Fernandes, J., Gomes, F., Couto, J.A. and Hogg, T.: The antimicrobial effect of wine on *Listeria innocua* in a model stomach system. *Food Control* 18, 1477-1483 (2007)

7. Gañan, M., Martínez-Rodríguez, A.J. and Carrascosa, A.V.: Antimicrobial activity of phenolic compounds of wine against *Campylobacter jejuni*. *Food Control* 20, 739-742 (2009)

8. García-Ruiz, A., Cueva, C., Gonzalez-Rompinelli, E.M., Yuste, M., Torres, M., Martín-Álvarez, P.J., Bartolomé, B. and Moreno-Arribas, M.V.: Antimicrobial phenolic extracts able to inhibit lactic acid bacteria growth and wine malolactic fermentation. *Food Control* 28, 212-219 (2012)

9. Granum, P.E.: *Bacillus cereus*. *In Fundamentals in food microbiology* (Doyle, M., Beuchat, L. and Montville, T. eds.) ASM Press, Washington, DC., pp. 327-336 (1997)

10. Kim, S.A., Kim, N.H., Lee, S.H., Hwang, I.G. and Rhee, M.S. Survival of foodborne pathogenic bacteria (*Bacillus cereus, Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, and *Listeria monocytogenes*) and *B. cereus* spore in the fermented alcoholic beverages. *J. Food Prot.* 77, 419-426 (2014a)

11. Kim, S.A., Park, H.J., Lee, S.H., Hwang, I.G. and Rhee, M.S.: Fate of major foodborne pathogens and *Bacillus cereus* spores in sterilized and non-sterilized Korean turbid rice wine (*Makgeolli*). Food Control 39, 139-145 (2014b)

12. Kourtis, L.: Implementation of hazard analysis critical control point (HACCP) system to the alcoholic beverages industry. *Food Rev. Int.* 17, 1-44 (2001)

13. Lea, A.G.H. and Piggott, J.R.: Fermented beverage production. Kluwer/Plenum, New York (2003)

14. March, C., Manclús, J.J., Abad, A., Navarro, A. and Montoya, A.: Rapid detection and counting of viable beer-spoilage lactic acid bacteria using a monoclonal chemiluminescence enzyme immunoassay and a CCD camera. *J. Immunol. Methods* 303, 92-104 (2005)

15. Menz, G., Aldred, P. and Vriesekoop, F.: Pathogens in beer. *In Beer in health and disease prevention* (Preed, V.R. eds.) Acadmic Press, Amsterdam, pp. 403-413 (2009)

16. Miller, L.G. and Kaspar, C.W.: *Escherichia coli* O157:H7 acid-tolerance and survival in apple cider. *J. Food Prot.* 57, 460-464 (1994)

17. Oyarzabal, O.A., Nogueira, M.C. and Gombas, D.E.: Survival of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* in juice concentrates. *J. Food Prot.* 66, 1595-1598 (2003)

18. Rodríguez Vaquero, M.J., Alberto, M.R. and Manca de Nadra, M.C.: Influence of phenolic compounds from wines on the growth of *Listeria monocytogenes. Food Control* 18, 587-593 (2007)

19. Vietnam's Ministry of Health. National technical regulation of food safety for alcoholic beverages (2010)

20. Zhao, T., Doyle, M.P. and Besser, R.E.: Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider with and without preservative. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2526-2530 (1993)

21. 국가법령정보센터: 주세법 시행령(대통령령 제23598호) (2012)

22. 김미령, 우호춘, 손원근: 시판 감귤주스, 매실주스 및 키위즙에서 *Listaria monocytogens*와 *Salmonella Typhimurium*의 생존성, *한국식품위생안전성학회지*, 23, 62-67 (2008)

23. 목철균, 이주연, 장학길: 약주 가열살균 조건의 최적화, *산업식품공학*, 2, 137-143 (1998)

24. 식품의약품안전평가원 용역과제: 발효주류의 미생물학적 위해요소에 대한 연구 (2012)

25. 이철호, 태원택, 김기명, 이현덕: 탁주의 저온 살균조건에 관한 연구, *한국식품과학회지*, 23, 44-51 (1991)