*J. Fd Hyg. Safety*
Vol. 23, No. 4, pp. 343~347 (2008)

**Journal of Food Hygiene and Safety**
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

# 선식에서 *Bacillus cereus*의 분리 및 특성 조사와 열에 대한 사멸률 연구

**조용선* · 정은영 · 이명기[1] · 양철영[2] · 신동빈**
한국식품연구원 식품분석센타, [1]한국식품연구원 전통식품연구단
[2]을지대학교 식품과학부 건강식품과학

# Survival, isolation and characterization of *Bacillus cereus* from Sunshik

Yong-Sun Cho*, Eun-Young Jung, Myung-Ki Lee[1], Cheul-Young Yang[2], and Dong-Bin Shin
*Food Analysis Center, Korea Food Research Institute,*
*[1]Traditional Food Research Group, Korea Food Research Institute,*
*[2]Major in Health and Food Science, School of Natural Food Science,*
*College of Health Industry, Eulji University*
(Received November 21, 2008/Revised November 29, 2008/Accepted December 8, 2008)

**ABSTRACT** – Recently, Sunshik has been issued because of easy-cook and well-being food. Sunshik basically was made of the heated cereals. Amount of spore-forming *Bacillus cereus* was detected and it has been caused some problem of food safety. *B. cereus* was isolate from 57 out of 161 Sunshik samples resulting in the isolation rate of 35.4 %. Quantitative analysis of 57 samples showed that 21 samples were less than 100 CFU/g, 33 samples were between 100 and 1,000 CFU/g and distinctively even 3 (1.9 %) samples had over 1,000 CFU/g. Typical morphology of *B. cereus* isolated from Sunshik was observed on MYP agar and then further characteristics was identified by using VITEK 2 (Biomeriux, France). 53 strains out of 57 strains isolated from Sunshik (about 93.0 %) produced diarrheal enterotoxin in brain heart infusion broth which was detected by the Bacillus cereus enterotoxin reversed passive latex agglutination test kit (Oxoid England). The D-values of the *B. cereus* spores were 75 °C (37.1mim), 80 °C (22.5mim), 85 °C (4.9mim), and 90 °C (3.1mim) respectively. The Z-value was calculated 12.8 °C in Sunshik sample inoculated with *B. cereus*. Therefore, the management of *B. cereus* in Sunshik is required for the food-safety.

**Key words:** *Bacillus cereus*, Enterotoxin, D-values, Z-values

*Bacillus cereus*는 그람 양성 균으로서 포자를 형성하며, 운동성을 지닌 호기성 균이나 혐기적 상태에서도 잘 자란다[1]. 이 균은 토양, 물, 공기 등 자연계에서 흔히 발견되는 미생물로 식품에 혼입될 가능성이 높아 과채소류, 과채류가공품, 곡류 건조제품, 향신료, 식육 및 식육가공품, 유제품 그리고 즉석 조리식품 등에 오염될 확률이 매우 높은 것으로 보고되고 있다[2].

*B. cereus*는 일정한 생육 조건이 되면 독소를 생성하며, 생성된 독소에 의하여 식중독이 발생한다. *B. cereus*에 의하여 생성된 독소는 diarrhoeal type과 emetic type의 두 가지가 있다. Diarrhoeal type은 *B. cereus*가 소장에서 성장하는 동안에 생산되는 enterotoxin에 의해 발생하며[3] diarreal syndromes는 단백질이 포함된 식육 제품이나 채소수프, 소스, 푸딩 등의 식품에서 주로 발생한다. Emetic type의 독소는 식품에서 *B. cereus*가 영양 세포상태로 성장 하거나 발아하는 동안에 생산된 독소로 쌀, 파스타, 국수 등을 튀기거나 조리한 전분질 식품에 의해서 발생 한다[4]. 특히 *B. cereus*는 불안전한 조리과정을 거친 식품을 48 °C이하로 유지한 경우 빠른 증식을 하여 식중독을 다수 일으키나, *B. cereus*에 의한 식중독 증상은 미약하고 보통 24시간 내에 치료가 가능하므로 식중독 발생 건수에 비해 보고가 많이 되어지고 있지 않다[5].

식생활의 간편화 추세에 의거 식사 대용으로 각광을 받는 선식은 채소, 견과류나 해조류 등의 식품류를 볶아서 건조 후에 분쇄 혼합하여 포장한 것으로, 포장 후 더 이상 가열 처리 과정 없이 섭취하는 식품이다. *B. cereus*는 endospore를 형성하여 제조 열처리 과정에서 완전히 사멸되지 않으며 생존한 포자는 일정 조건이 되면 다시 증식되므로 선식의 경우 그 위해성이 문제시 되고 있다[6]. 포자는 5-6 log spores/g의 범위에서 일반적인 감염 수치이며

*Correspondence to: Yong-Sun Cho, Korea Food Research Institute, 516, Baekhyun-dong, Bundang-gu, Sungnam-si, Gyeonggi-do 463-746, Republic of Korea
Tel : 82-31-780-9242 Fax : 82-31-780-9280
E.mail : yscho@kfri.re.kr

과거부터 *B. cereus*의 포자를 비활성화 시키기 위한 여러 가지 방법이 연구 되어 오고 있다[7]. 포자는 수분활성도($a_w$)에 의해서 열에 대한 저항성이 영향을 받으며 식품에 포함되어 있는 용질에 의해서 $a_w$를 감소시키면 특이한 내열성 효과를 나타낸다고 보고되어 있다[8].

최근의 연구 결과에 의하면 생식 및 선식에서 포자를 형성한 *B. cereus*가 상당수 검출되어 안전성에 문제화 되어 식품공전에서는 관련 식품에서 *B. cereus*에 대한 정량 규격이 설정 되었다. 일부 *B. cereus*의 효율적인 관리 및 저감화를 위한 연구가 이루어 졌으나 아직 이에 대한 연구가 더 필요한 실정이라고 사료된다[9]. 따라서 본 연구에서는 시중에서 유통되고 있는 선식을 수거하여 제품 중의 *B. cereus*를 정량함으로서 오염 수준을 파악하고자 하였으며, 선식에서 분리한 균주의 생화학적 특성을 규명하고 이에 따른 독소 형태를 파악하고자 하였다. 또한 저감화를 위한 방안의 일환으로 선식의 제조 과정에서 *B. cereus*의 열처리 과정에 대한 사멸 정도를 측정하였다.

## 재료 및 방법

### 시험 재료

국내 시중에서 판매하고 있는 선식을 2006년 5월부터 12월까지 70점, 2007년 5월부터 12월까지 91점을 구입하여 시료로 사용하였다. 시료는 매장에서 임의적으로 곡식을 선정하여 직접 갈아서 제조한 제품을 선정하였다. *B. cereus* (ATCC 11778)은 한국미생물보존센터(KCCM)에서 분양하여 사용하였다.

### 시험 방법

#### *B. cereus* 정량 시험

시료 25 g을 취하여 225 mL의 멸균인산완충용액에 가하고 균질화 하였다. 균질화 한 시험액을 MYP agar (Merck, Germany) 5매에 200 μl씩 도말한 뒤 30 °C에서 24시간 배양 한 후 혼탁한 환을 가지며 lecithinase를 분해한 분홍색 집락을 선별 계수하였다. 계수한 평판에서 5개 이상의 전형적인 집락을 선별하여 Nutrient agar (Merck, Germany)에 접종하고 30 °C에서 24시간 배양 한 후 VITEK 2 (Biomerieux, France)를 이용하여 동정하였다. 동정이 확인된 균수에 희석배수를 곱하여 최종 집락수를 산정하였다[10].

#### Enterotoxin 확인 시험

분리 동정한 균주를 Brain heart infusion broth (Merck, Germany)에 접종하여 35 °C에서 6-18시간 배양 하였다. 배양액을 3,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상등액을 시험 용액으로 사용하였다. 시험 용액은 Bacillus cereus enterotoxin reversed passive latex agglutination(BCET-RPLA)kit (Oxoid England)를 사용하여 각각 감작 latex와 대조 latex를 첨가하여 10분간 교반한 후, 20 °C에서 18~20시간 방치 후 latex의 침강상을 육안으로 관찰하여 결과를 판정하였다[11].

#### Starch 가수분해 시험

*B. cereus*의 전분 가수분해를 알아보기 위하여 Nutrient agar (Merck, Germany)에 가용성 전분을 0.2 %(w/v) 첨가하고 이에 분리 동정한 균주를 도말하여 30 °C에서 48시간 배양하였다. Lugol's liquor를 이용하여 자란 집락 주위에 가하여 clear zone이 있는 균주를 전분 가수분해 양성으로 판정하였다[4].

#### 혈액 배지에서 Hemolysis 시험

0.85 % sodium chloride와 5 %(v/v) defibrinated나 oxalated blood가 함유된 Nutrient agar (Merck, Germany)에 분리 균주를 도말하여 30 °C에서 48시간 배양 후 β-hemolysis를 확인하였다[12].

#### *B. cereus*의 tryptic soy broth에서의 사멸률 시험

Tryptic soy broth (Merck, Germany)에 *B. cereus* ATCC 11778 균주를 30 °C에서 1주일 배양 한 후 5.0-6.0 log 포자가 되도록 하였다. 만들어진 포자는 tryptic soy broth (Merck, Germany)에 접종하여 75 °C, 80 °C, 85 °C, 90 °C의 각 온도에서 시간대별로 water bath (Vison, Korea)에서 열처리 한 후에 바로 냉각하였다. 냉각 후 포자 시험액을 일정 농도로 희석 후 Plate count agar (Merck, Germany)에 3 평판씩 분주하여 혼합희석평판배양법을 이용하였다. 시험 평판은 30 °C에서 24시간 배양한 후에 집락 수를 산정하였다. 산정한 집락수로 부터 각 온도별 D-value 및 Z-value를 산출하였다.

#### 선식에서의 *B. cereus* 사멸률 시험

선식을 이용한 사멸률 시험은 정성 시험을 통해 *B. cereus*가 검출되지 않은 선식을 UV하에서 20분간 방치한 후 이에 일정량의 포자를 접종하여 충분히 균질화한 다음 초기 접종 균수를 확인하고 tryptic soy broth 방법과 동일한 온도와 시간 조건에 따라 저감화 시험을 하였다. 선식에 포함되어 있는 다른 균주를 고려해서 MYP (Merck, Germany) 평판을 이용하여 집락수를 산정하였다.

## 결과 및 고찰

### *B. cereus* 정량 시험

시중 유통 중인 선식의 *B. cereus*의 오염 정도를 파악하기 위해 161점에 대해 정량 시험을 한 결과 Table 1과 같다. Table 1에서 보는 바와 같이 161점 중 57점(35.4 %)에

**Table 1.** Quantitative analysis of *B. cereus* from Sunshik

| Result (CFU/g) | | No. of samples | detection rate(%) |
|---|---|---|---|
| negative | | 104 | 64.6 |
| positive | less than 100 | 21 | 13.0 |
| | 100 over - less than 1,000 | 33 | 20.5 |
| | 1,000 over | 3 | 1.9 |
| Total | | 161 | 100 |

**Table 2.** Characterization of *B. cereus* strains isolated from Sunshik

| VITEK | BCET-RPLA | Starch hydrolysis | hemolysis | No. of samples |
|---|---|---|---|---|
| *B.crerus/B.thuringiensis* | + | + | + | 41 |
| *B.crerus/B.thuringiensis* | - | + | + | 7 |
| *B.crerus/B.thuringiensis* | - | - | + | 4 |
| *B.crerus/B.thuringiensis* | - | + | - | 1 |
| *B.crerus/B.thuringiensis* | + | - | + | 1 |
| *B.crerus/B.thuringiensis* | - | - | - | 3 |

서 *B. cereus*가 검출되었다. 검출된 시료 57점 중에 100 CFU/g 미만은 21점이고 100-1,000 CFU/g 미만은 33점, 1,000 CFU/g 이상은 3점으로 검출 되었다. 이는 박 등[13]이 보고한 생식의 $10^0$-$10^3$ CFU/g 정도의 오염도와는 유사한 수준으로 확인되었으나 조 등[14]이 보고한 생식의 양성률 43 %보다는 낮은 수치를 나타냈다. 이는 선식의 경우 제조 과정상 가열 처리 과정을 거치므로 생식에 비해 낮은 양성 수치를 나타나는 것으로 사료된다. 그러나 본 연구에서 정량한 시료 중 3점에서 1,000 CFU/g 이상이 검출되어 *B. cereus*가 가열처리에서도 사멸하지 않음을 알 수 있었다. 또한 가열 처리 후 건조를 통해서 낮은 수분 활성도를 가지는 선식의 특성에도 불구하고 *B. cereus*가 사멸하지 않는 것은 포자를 형성하고 있다가 발아한 것으로 사료된다.

### *B. cereus* 분리 균주의 특성

선식에서 분리한 *B. cereus*의 생화학적 특성을 통해서 독소 형태를 알아보고자 하였다. Table 2와 같이 BCET-RPLA를 이용하여 enterotoxin을 시험한 결과 총 57점 중 42점에서 양성(90.3 %)으로 대부분의 분리 균주는 enterotoxin을 생성함을 알 수 있었다. 이는 Sarrias 등[11]이 spanish 쌀인 곡류에 대해서 실험한 결과와 유사하였다. Starch hydrolysis양성은 전체 중 86.0 %이며 hemolysis는 양성은 93.0 %였다. Emetic toxin을 가진 *B. cereus*로 예상되는 균주의 생화학적 특성은 enterotoxin 음성이며 starch hydrolysis와 hemolysis 음성인 균주로[15-17] 총 57점 중 3점(5.3 %)이 검출되었다. 이 3점의 시료의 정량 결과가 두 점의 시료는 80 CFU/g이 검출되었고 다른 한 점의 시료는 160 CFU/g이 검출되어 Infective dose가 $10^5$-$10^8$ cells/g에 emetic toxin에 의한 식중독이 발생하므로 상대적으로 발병률은 낮은 것으로 보였다. 하지만 제조 과정에서 48 °C이하로 온도가 떨어지면 포자가 발아해서 *B. cereus*가 잘 자라게 되므로 이에 대한 관리가 요구 된다[5].

**Table 3.** Mean D-values (min) of *B. cereus* ATCC 11778 strains suspended in tryptic soy broth and heated at different temperatures

| Temperature (°C) | D-value (min) | correlation coefficient |
|---|---|---|
| 75 | 40.29 | -0.979 |
| 80 | 8.77 | -0.979 |
| 85 | 3.32 | -0.993 |
| 90 | 1.13 | -0.990 |

### 온도에 따른 *B. cereus*의 D-value

*B. cereus*에 대한 저감화 방안을 모색하고자 온도에 따른 90 % 사멸률인 D-value를 시험하였다. Table 3과 같이 tryptic soy broth에 포자를 접종하여 D-value를 산출한 결과 75 °C에서는 40.3분, 80 °C에서는 8.8분, 85 °C에서는 3.3분, 90 °C에서는 1.1분으로 나타났다. Sarrias[11]는 Spanish 쌀에서 분리한 *B. cereus*에 대해서 90 °C에서 D-value를 산출한 결과 4.6분에서 14.0분의 범위라고 보고하였다. 본 연구결과와의 차이는 균주의 특성에 기인한 것으로 사료된다. 가열 처리하는 과정 중에 *B. cereus*는 90 °C에서 10분 이상 가열해도 완전하게 사멸을 하지 않았는데 이는 선식의 제조 공정 과정 중에 고온으로 단시간 재료를 가열하는 과정에서는 *B. cereus*가 완전히 사멸하지 않았기 때문인 것으로 사료된다. 특히 Kim[7] 등에 의하면 고추장에서 분리한 균주의 경우는 85 °C에서 D-value가 45.05분이라고 보고하였는데 이는 고추장에 들어있는 소금 때문에 열 저항성이 상승한 것이라고 하였다. Margarita[8]의 연구결과에 의하면 식품 중의 소금은 수분 활성도를 떨어뜨리고 수분 활성도가 낮아지면 열에 대한 저항성이 높아진다고 하였다. 따라서 수분 활성도가 낮고 용질을 첨가하

는 선식에서의 *B. cereus*가 오염 되었을 때 열에 대한 저항성을 비교해 보기 위해 선식 시료에 일정량의 포자를 접종 한 후 온도에 따른 D-value를 측정한 결과는 Table 4와 같다. Table 4에서 보는 바와 같이 75, 80, 85 및 90 ℃에서의 D-value는 각각 37.1분, 22.5분, 4.9분 및 3.1분 이였다. 75 ℃와 80 ℃의 경우는 tryptic soy broth와 선식에서 현격한 차이를 보였는데 이는 수분 활성도가 낮은 선식으로 인해서 D-value가 커진 것으로 사료되며, 이로 인해서 포자가 발아하는 온도와 비슷해져서 높은 D-value가 측정되어진 것으로 예측되어진다.

### 온도에 따른 *B. cereus*의 Z-values 결과

온도별 *B. cereus*의 D-value를 이용하여 Z-value를 구한 결과 Fig 1과 같이 tryptic soy broth에서 9.8 ℃이며 선식에 접종한 경우는 Fig 2와 같이 12.8 ℃로 나타났다. Z-value 온도는 Sarrias[11]등이 쌀에서 분리한 *B. cereus*의 8종에 대해 Z-value를 산출한 결과 7.42 ℃에서 8.20 ℃로 보고하였으며, Johnson 등[18]은 6.8에서 13.9 ℃로 보고한 바 있다. 본 연구 결과와 이들의 연구결과를 보면 Z-value는 균의 상태에 따라서 차이가 있는 것으로 보인다. 그러나 선식에 직접 균주를 접종하고 얻은 수치가 아니므로 직접적인 비교는 어려운 것으로 사료된다.

이러한 결과를 보았을 때 이미 선식 원재료에서 오염된 *B. cereus*는 가열 처리로서 저감화 하기 어려운 것으로 보인다. 따라서 선식을 제조 할 때 원재료에서 *B. cereus*에 대한 오염을 제거 시키는 방안을 모색하여야 할 것으로 사료된다.

## 요 약

최근 식사대용으로 각광을 받는 선식은 포장 후 더 이상 가열 처리 과정 없이 섭취하는 식품으로 포자를 형성하여 열처리 과정에서 완전히 사멸되지 않으며 생존하는 *B. cereus*에 의한 위해성이 문제시 되고 있다. 따라서 시중에서 유통되고 있는 선식에 대한 *B. cereus*정량을 통해 오염 수준을 파악한 결과 선식 161점 중 57점 (35.4 %)에서 *B. cereus*가 검출되었고 검출된 시료 57점 중에 100 CFU/g 미만은 21점, 100-1000 CFU/g 미만은 33점, 1,000 CFU/g 이상은 3점이 검출되었다. 선식에서 분리한 *B. cereus*의 생화학적 특성을 통해 독소 형태를 알아본 결과는 enterotoxin 양성이 93 %이며 emetic toxin 의심 균주는 5.3 %였다. 이러한 *B. cereus*의 저감화를 위한 방안의 일환으로 선식의 제조 과정에서 *B. cereus*의 열처리 과정에 대한 사멸 정도를 측정하였다 측정한 결과 tryptic soy broth에 포자를 접종한 결과는 75, 80, 85, 90에서 40.3분, 8.8분, 3.3분, 1.1분이였다. 용질에 따라 수분 활성도가 낮아지면 열에 대한 저항성이 높아지므로 선식에 시료에 대한 D-value를 시험한 결과 75 ℃, 80 ℃, 85 ℃, 90 ℃에서 37.1분, 22.5분, 4.9분, 3.1분이였다. Z-value는 tryptic soy broth에서는 9.8 ℃이며 선식 시료에서는 12.8 ℃였다. 따라서 선식에서 *B. cereus*에 대한 관리가 요구되어진다.

**Table 4.** Mean D-values (min) of *B. cereus* ATCC 11778 strains spiked in Sunshik and heated at different temperatures

| Temperature (℃) | D-value (min) | correlation coefficient |
|---|---|---|
| 75 | 37.06 | -0.941 |
| 80 | 22.52 | -0.949 |
| 85 | 4.91 | -0.952 |
| 90 | 3.08 | -0.964 |

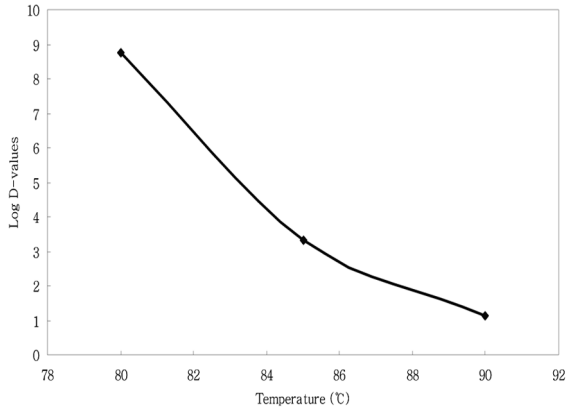


**Fig. 1.** Least-squares regression analysis of the thermal death time curve obtained for *B. cereus* ATCC 11778 spores suspended in tryptic soy broth.

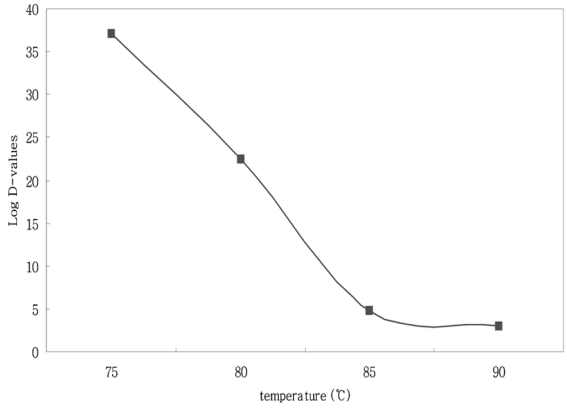


**Fig. 2.** Least-squares regression analysis of the thermal death time curve obtained for *B. cereus* ATCC 11778 spores spiked in Sunshik.

## 참고문헌

1. Per Einar, G., Terje, L. : *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol. Lett*., **157**, 223-228 (1997).
2. Ham, H.J. and Kim, M.S. : *Bacillus* spp.& *B. cereus* isolated

in dried marine products. *J. Fd. Hyg. Safety.*, **21**, 159-163 (2006).
3. Anwarul, H., Nicholas, J.R. : Phenotypic and genotypic characterisation of *Bacillus cereus* isolates Bangladeshi rice. *Int. J. Food Microbiol*., **98**, 23-34 (2005).
4. Valero, M., Hernandez-Herrero, L.A., Fernandez, P.S. and Salmeron, M.C. : Characterization of *Bacillus cereus* isolates from fresh vegetables and refrigerated minimally processed foods by biochemical and physiological tests. *Int. J. Food Microbiol*., **19**, 491-499 (2002).
5. Per, E.G. and Terje, L. : *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol. lett*., **157**, 223-228 (1997).
6. Valero, M., Hernandez-Herrero, L.A. and Giner, M.J. : Survival, isolation and characterization of a psychrotrophic *Bacillus cereus* strain from a mayonnaise-based ready-to-eat vegetable salad. *Int. J. Food Microbiol*., **24**, 671-677 (2007).
7. Kim Y.S., Ahn Y.S., Jeong D.Y. and Shin D.H. : Isolation and Identification of *Bacillus cereus* from Fermented Red Pepper-Soybean Paste(Kochujang) and Its Heat Resistance. *Food Sci. Biotechnol*., **17**, 123-129 (2008).
8. Margarita M., Sidonia M., Mercedes L., Ana B.A. and Roberto M. : Thermal inactivation *Bacillus cereus* spores affected by the solutes used to control water activity of the heating medium. *Int. J. Food Microbiol*., **53**, 61-67 (1999).
9. 식품의약품안전청 연구결과 보고서, 선식 등 기타곡류가공품 중 유해세균 오염실태 조사 (2006).
10. 식품의약품안전청, 식품공전 제 10 일반시험법 8. 미생물시험법 (2008).
11. Sarrias, J.A., Valero, M. and Salmeron, M.C. : Enumeration isolation and characterization of Bacillus cereus strains from Spanish raw rice. *Food Microbiol*., **19**, 589-595 (2002).
12. Douglas, J.B., Amy, C., and Lee, W. : Identification of hemolysin BL-producing *Bacillus cereus* isolates by a discontinuous hemolytic pattern in blood agar. *Appl. Environ. Microbiol*., **60**, 1646-1651 (1994).
13. Park, J.H. : Microbial risk analysis of principle food materials. Korea Food and Drug Administration (2003).
14. 조준일, 박용춘, 고수일, 정지연, 이선미, 조수열, 이광호, 임철주, 김옥희 : 시판생식의 위해미생물 오염도 조사. *J. Fd. Hyg. Safety.*, **23**, 257-263 (2008).
15. Valero, M., Hernadez-Herrero, L.A., Fernadez, P.S. and Salmeron, M.C. : Characterization of Bacillus cerues isolates from fresh vegetables and refrigerated minimally processed foods by biochemical and physiological tests. *Food Microbiol*., **19**, 491-499 (2002).
16. Pirhonen, T. I., Andersson, M.A., Jaaskelainen, E.L., Salkinoja-Salonen, M.S., Honkanen-Buzalski, T. and Johansson, T.M. : Biochemical and toxic diversity of *Bacillus cereus* in a pasta and meat dish associated with a food-poisoning case. *Int. J. Food Microbiol*., **22**, 87-91 (2005).
17. Suwicha, T., Amy, C., Lee, W. and Watanalai, P., : Phenotypic and genotypic comparisons reveal a broad distribution and heterogeneity of hemolysin BL genes among *Bacillus cereus* isolates. *Int. J. Food Microbiol*., **105**, 203-212 (2005).
18. Johnson, K.M., Nelson, C.L. and Busta, F.F. : Germination and heat resistance of *Bacillus cereus* spores associated with diarrheal and emetic food-borne illness. *J. Food Sci*., **47**, 1268-1271 (1982).