pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 40, No. 1, pp. 13~17 (2025)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2025.40.1.13

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

국내에서 분리된 *Geobacillus thermodenitrificans* subsp. *Calidus*와 *Ureibacillus suwonensis* 포자의 열 저항성 평가

남주희 · 정두영 · 최시온 · 정현정 · 김중범*
순천대학교 식품공학과

Evaluation of Thermal Resistance in *Geobacillus thermodenitrificans* subsp. *Calidus* and *Ureibacillus suwonensis* Spores Isolated in Korea

Ju-Hee Nam, Du-Yeong Jung, Zi-On Choi, Hyun-Jung Jung, Jung-Beom Kim*
Department of Food Science and Technology, Sunchon National University, Suncheon, Korea

(Received November 3, 2024/Revised December 18, 2024/Accepted December 20, 2024)

ABSTRACT - We assessed the thermal resistance of *Geobacillus thermodenitrificans* subsp. *Calidus* and *Ureibacillus suwonensis* spores, and evaluated their availability as sterilization indicator microorganisms in retort foods. The *G. thermodenitripicans* subsp. *Calidus* (ND08S60D-3) and *U. suwonensis* (YS03D60-1) used in this study were provided by the National Nakdong River Biological Resource Center (NIBR). The D-value of *G. thermodenitrificans* subsp. *Calidus* spores at 121°C was 1.6±0.03 min, and Z-value was 31.2±1.49°C. For *U. suwonensis* spores, the D-value at 121°C was 1.2±0.02 min, and Z-value was 31.1±0.48°C. Both strains exhibited higher D-values at 121°C compared to the D-value of *Clostridium botulinum* spores, which are commonly used for confirming sterilization in food products. Therefore, the spores of the domestic isolates *G. thermodenitrificans* subsp. *Calidus* and *U. suwonensis* could be viable alternatives to *C. botulinum* spores for determining the sterilization efficacy of retort foods.

Key words: Thermal resistance, Spore, *Ureibacillus suwonensis, Geobacillus thermodenitrificans* subsp. *Calidus*

현대인의 생활 습관과 식생활 변화에 따라 가정 간편식의 소비가 급격히 증가하고 있다. 특히 레토르트 식품은 긴 저장기간과 간편한 조리 방식으로 인해 각광 받고 있다. 레토르트 식품의 소비 증가와 더불어, 소비자들 사이에서는 멸균된 식품의 안전성에 대한 우려가 중요한 문제로 떠오르고 있다. 멸균 과정을 거친 식품은 미생물의 사멸로 장기 저장성을 보장하지만, 소비자들은 이러한 공정이 식품의 영양과 맛, 그리고 전반적인 품질에 영향을 미칠 수 있다는 우려가 있다[1,2]. 또한 멸균이 완벽하지 않을 경우, 발생할 수 있는 식품 안전사고는 소비자 신뢰에 부정적인 영향을 미칠 수 있다[3]. 따라서 최근 미생물 오염으로 인한 식품 사고가 주목받으면서, 멸균 여부를 검증할 수 있는 방법의 중요성이 강조되고 있다[4].

레토르트 식품은 식품공전 상 "제조·가공 또는 위생 처리된 식품을 12개월 초과하여 실온에서 보존 및 유통할 목적으로 단층 플라스틱필름이나 금속박 또는 이를 여러 층으로 접착하여, 파우치와 기타 모양으로 성형한 용기에 제조·가공 또는 조리한 식품을 충전하고 밀봉하여 가열살균 또는 멸균한 것"으로 정의하고 있다[5]. 레토르트 식품의 미생물학적 안전성을 보장하기 위해 멸균 처리가 필수적으로 진행되고 있다. 레토르트 식품의 멸균을 위해서는 "제품 중심의 온도가 120°C 이상에서 4분 이상 열처리하거나 또는 이와 동등 이상의 효력이 있는 방법으로 열처리하여야 한다."고 규정하고 있다[5]. 현재 레토르트 식품의 멸균 여부를 확인하기 위해, 식품 공전의 세균발육실험이나 레트로트 식품의 멸균 목표 미생물인 *Clostridium botulinum* 포자의 사멸 여부를 확인하고 있다[6].

멸균 여부를 확인하기 위해 식품공전에 세균발육실험이 등재되어 있으나 가온보존과 세균시험을 위해 최소 13일

*Correspondence to: Jung-Beom Kim, Department of Food Science and Technology, Sunchon National University, Suncheon, 57922, Korea
Tel: +82-61-750-3259, Fax: +82-61-750-3208
E-mail: okjbkim@sunchon.ac.kr

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution,and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

이 소요되어 검사에 장시간이 소요되는 단점이 있다[5]. 레토르트 식품의 멸균 여부를 확인하기 위해 사용되는 *C. botulinum*은 강력한 신경독소를 생성하는 병원성 세균으로, 식중독을 유발할 수 있으며 취급 및 관리에 주의가 필요하다. 또한 *C. botulinum*은 혐기성 세균으로 균주의 배양을 위해서 혐기성 배양 시스템과 관련된 특수 장비 및 기술이 사용된다[7].

D-value는 decimal reduction time으로, 특정 온도에서 미생물의 개체 수를 90% 감소시키는 데 소요되는 시간을 의미한다. 즉, 미생물의 초기 개체 수를 1 log 감소시키는 데 필요한 시간으로, D-value가 클수록 해당 미생물이 높은 열 저항성을 가지며, 짧은 시간 내에 사멸시키기 어렵다는 것을 의미한다[8]. D-value는 가열살균과정에서 미생물의 감소 정도를 평가하는 중요한 지표로 사용된다. Z-value는 미생물의 D-value가 1 log 감소하거나 증가하는 데 필요한 가열온도 변화를 나타낸다. Z-value는 미생물이 열에 얼마나 민감한지를 보여주는 지표로, 온도가 상승할수록 미생물의 사멸 속도가 얼마나 빨라지는지를 평가하는 데 사용된다. Z-value가 작을수록 온도 변화에 민감하여 가열 온도가 상승하면 미생물의 사멸 속도가 빠르게 증가한다[8].

Bacillus spp. 균주는 그람 양성균으로 대부분 내열성 포자를 형성하는 특성을 가지고 있어, 식품, 의료 기기, 제약 산업 등 다양한 분야에서 멸균 여부를 확인하는 미생물 균주로 이용되고 있다[9,10]. *Bacillus subtilis*와 *Geobacillus stearothermophilus* 포자는 의료폐기물 멸균 여부 검사의 표준지표생물로 사용되고, *Bacillus atrophaeus* 포자는 가열건조 멸균의 지표생물로 사용되는 등 *Bacillus* 속의 균주는 멸균 여부 확인에 다양하게 활용되고 있다[11-13]. 그러나 현재 이용되고 있는 *Bacillus* 속의 균주는 해외에서 도입된 균주로 멸균 지표 미생물로 이용 시 균주에 대한 로열티를 지급하여야 한다[14-16].

따라서, 본 연구에서는 국내에서 분리된 *Bacillus* spp. 포자의 열 저항성을 분석하여 레토르트 식품 멸균 여부 판정을 위한 지표 미생물로 사용 가능성을 확인하고자 하였다.

Materials and Methods

실험 재료

본 연구에서 사용된 균주는 *Geobacillus thermodenitrificans* subsp. *Calidus* (ND08S60D-3)와 *Ureibacillus suwonensis* (YS03D60-1)로, 국립낙동강생물자원관(Nakdonggang National Institute of Biological Resources, NNIBR)에서 제공받아 실험에 사용되었다. 포자 생성을 위해 nutrient agar (NA, MBcell, Seoul, Korea) 배지에 0.005% manganese (II) sulfate monohydrate ($MnSO_4 \cdot H_2O$, DaeJung Chmicals & Metals, Siheung, Korea)를 첨가하여 사용하였으며, 생균수 측정을 위해 tryptic soy agar (TSA, MBcell, Seoul, Korea)를 사용하였다.

포자현탁액 제조

G. thermodenitrificans subsp. *Calidus*와 *U. suwonensis* 균주는 0.005% $MnSO_4 \cdot H_2O$이 첨가된 NA 배지에 획선도말한 후 35°C에서 최소 14일 이상 배양하였고, 멸균증류수와 cell scraper를 사용하여 배양된 균을 회수하였다[17]. 회수된 균액은 vortex mixer (SI-0256, Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA)로 혼합한 뒤, 1.5 mL eppendorf tube에 1 mL씩 분주하여 원심분리기(Smar R17, Hanil Science Co., Ltd., Daejeon, Korea)를 이용해 13,000 ×g에서 10분간 원심분리하였다. 이후 상층액을 제거한 뒤 멸균증류수 1 mL를 가하여 균질화하였으며, 13,000 ×g에서 10분간 원심분리한 과정을 3회 반복하여 회수된 포자는 4°C에서 최소 1달 이상 보관하여 숙성시켰다. 이 균액은 실험 직전에 85°C에서 30분 동안 열처리하여 영양세포를 사멸시킨 후 13,000 ×g에서 10분간 원심분리하였고, 상층액을 제거한 뒤 멸균인산완충희석용액 1 mL를 추가해 균질화한 뒤 다시 13,000 ×g에서 10분간 원심분리하였다[18,19]. 세척 과정은 3회 반복하여 시험용 포자현탁액을 얻었으며, Shaeffer and Fulton stain으로 염색된 푸른색 포자를 현미경(NB-2000T, NeoScience Co., Ltd., Seoul, Korea)으로 확인하였다(Fig. 1)[20,21]. 최종 회수된 포자의 농도는 6-8 log CFU/mL 수준으로 희석하였다.

포자의 열처리 및 생균수 측정

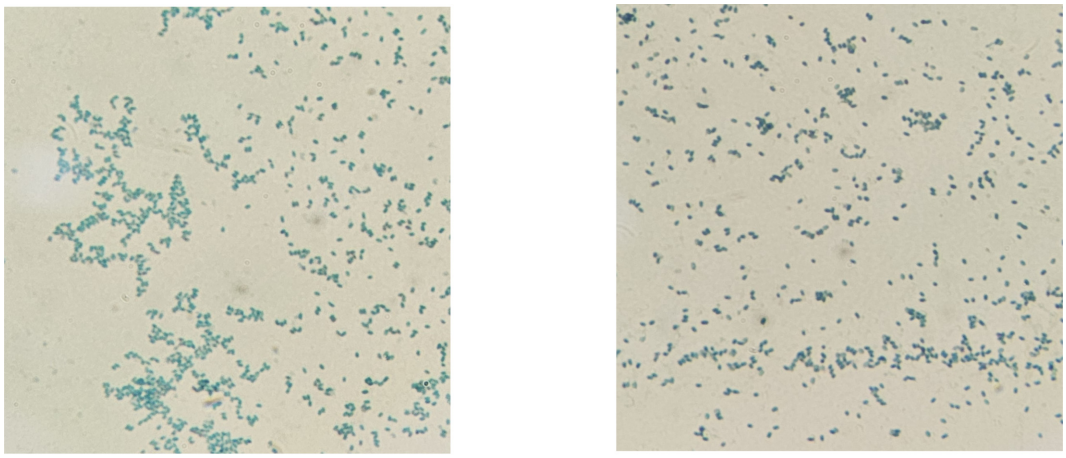
G. thermodenitrificans subsp. *Calidus*와 *U. suwonensis*의 포자현탁액을 111, 116°C에서 0-15분, 121°C에서 0-9분 동안 oil bath (WHB-11, Daihan Scientific, Wonju, Korea)에서 열처리하였다. 열처리한 포자현탁액을 시험용액으로 단계희석 후, petri dish에 시험용액을 1 mL 접종하여 TSA를 분주하였다. 분주 후 35°C에서 24±2시간 동안 배양하여 발아된 균 수를 계수하였다. 평균적으로 계수된 집락수에 희석배수를 곱하여 최종 생균 수를 산출하였다.

D-value, Z-value 산출

D-value는 미생물이 90% 사멸하는데 걸리는 시간을 의미하며, 사멸 속도 그래프에서 직선의 기울기를 이용해 시간을 산출하였다. Z-value는 D-value를 1 log 감소하는데 필요한 온도 변화량으로, 여러 온도에서의 D-value를 산출한 후, D-value와 온도 간의 관계를 통해 나타낸 그래프의 직선 회귀방정식을 이용하여 산출하였다[22,23].

통계분석

실험 균주의 온도 및 시간별 D-value와 Z-value의 통계처리는 SPSS V27 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) 프로그



(a) (b)

Fig. 1. Microscopic photograph of *Geobacillus thermodenitrificans* subsp. *Calidus* (a) and *Ureibacillus suwonensis* (b) spore.

Table 1. D-value and Z-value of *Geobacillus thermodenitrificans* subsp. *Calidus* (ND08S60D-3)

Temperature (°C)	Time (min)	Mean±SD	D-value	Z-value
111	0	6.7±0.1[1)]	3.3±0.06	31.2±1.49
	5	4.5±0.1		
	10	2.6±0.0		
	15	2.2±0.1		
116	0	6.7±0.1	2.8±0.06	
	5	3.6±0.1		
	10	2.1±0.1		
	15	1.3±0.3		
121	0	6.7±0.1	1.6±0.03	
	3	4.6±0.1		
	6	2.2±0.1		
	9	0.7±0.5		

[1)] Log CFU/mL.

Table 2. D-value and Z-value of *Ureibacillus suwonensis* (YS03D60-1)

Temperature (°C)	Time (min)	Mean±SD	D-value	Z-value
111	0	8.0±0.0[1)]	2.4±0.01	31.1±0.48
	5	6.9±0.2		
	10	4.0±0.1		
	15	2.2±0.1		
116	0	8.0±0.0	2.5±0.02	
	5	5.9±0.0		
	10	4.0±0.1		
	15	2.0±0.1		
121	0	8.0±0.0	1.2±0.02	
	3	7.8±0.1		
	6	3.4±0.1		
	9	0.7±0.5		

[1)] Log CFU/mL.

램을 이용하여 수행하였으며, 독립표본 *t*-test로 집단 간의 평균값을 비교하여 $P<0.05$의 수준으로 유의적인 차이를 비교하였다.

Results and Discussion

포자 생성 확인

두 균주의 포자 생성 여부는 Fig. 1에 나타내었다. 열 저항성은 영양세포와 포자가 현격하게 차이가 나기 때문에 순수하게 포자만을 수확하여 실험에 사용하여야 한다. 따라서 두 균주의 포자를 확인하기 위해 열처리 후 냉장고에서 최소 30일 이상 숙성시켰으며, Shaeffer and Fulton stain 방법의 5% malachite green 시약을 통해 영양세포가 잔존하고 있는지 확인하였다[20,21]. 5% malachite green으로 염색할 경우 영양세포는 빨간색으로 염색되고 포자는 파란색으로 염색된다고 보고[20,21]되고 있다. 염색 후 현미경으로 관찰한 결과, 전체 슬라이드에서 파란색의 포자만 확인되어 두 균주 모두 열 저항성 실험에 사용이 가능한 것으로 판단하였다.

포자의 열 저항성

G. thermodenitrificans subsp. *Calidus* 포자의 살균 온도와 시간에 따른 D-value와 Z-value는 Table 1에 나타내었다. 포자는 111°C, 116°C, 121°C에서 각각 3.3±0.06분, 2.8±0.06분, 1.6±0.03분으로 나타났으며, Z-value는 31.2±1.49°C로 산출되

Table 3. Evaluation of thermal resistance between of *G. thermodenitrificans* subsp. *Calidus* and *U. suwonensis*

Bacteria	D-value (min)	*p*-value
G. thermodenitfiricans subsp. *Calidus*	1.6±0.03	0.122
U. suwonensis	1.2±0.02	

었다. *U. suwonensis* 포자의 살균 온도와 시간에 따른 D-value와 Z-value는 Table 2에 나타내었다. 포자는 111°C, 116°C, 121°C에서 각각 2.4±0.01분, 2.5±0.02분, 1.2±0.02분으로 나타났으며, Z-value는 31.1±0.48°C로 산출되었다. 통계분석 결과, 유의확률이 0.122로 P<0.05보다 크게 나타나 두 균주의 D-value 값에 유의적 차이가 없는 것으로 판단된다(Table 3).

식품의 멸균 지표 미생물로 널리 사용되는 *C. botulinum* 포자의 121°C에서 D-value는 0.21분, Z-value는 10°C로 보고[6]되고 있다. 그러나 *C. botulinum*은 실험실 환경에서 다루기 까다롭고 위험성이 높으며, 포자는 강한 독소를 생성할 수 있어 취급 시 고도의 안전 관리가 요구된다는 단점을 가지고 있다[24]. *C. botulinum* 포자의 위험성을 보완하기 위해, 식품의약품안전처에서는 밀봉된 제품의 중심부 온도를 120°C 이상에서 4분 이상 유지하거나 그와 동등한 수준의 멸균 처리를 권고하고 있다[6]. 레토르트 식품의 멸균 여부 확인에 사용되는 *C. botulinum* 포자의 D_{121} 값이 0.21분[6]인 것과 비교해 국내에서 분리된 *G. thermodenitrificans* subsp. *Calidus*와 *U. suwonensis* 포자의 D_{121} 값은 1.6분과 1.2분으로 *C. botulinum*의 포자보다 더 높은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 두 균주의 포자가 *C. botulinum* 포자보다 더 높은 열 저항성을 가지고 있는 것을 나타낸다. 따라서 식품의 멸균 여부를 검증하는 시험에 사용되는 *C. botulinum* 포자를 대체하여 *G. thermodenitrificans* subsp. *Calidus*와 *U. suwonensis* 포자를 사용할 수 있을 것으로 판단된다. 두 균주는 국립낙동강생물자원관(NNIBR)에서 제공된 국내 분리 균주로, 해당 균주들의 포자를 멸균 지표 미생물로 사용할 경우, 현행 세균발육시험 보다 검사 기간을 단축할 수 있고 해외 *Bacillus* spp. 균주에 대한 의존도를 낮춰 수입 로열티 부담을 해소할 수 있을 것으로 예상된다. 그러나 국내 분리 균주를 활용하여 bio indicator를 개발하려면 International Organization for Standardization (ISO) 11138-1에서 제시하는 포자 농도와 열 저항성 기준, ISO 11138-2의 고압증기 멸균 적용 가능성을 평가하여야 하므로 향후 이에 대한 추가연구가 필요하다.

Acknowledgement

본 연구는 2023년도 환경부의 재원으로 한국환경산업기술원(KEITI)의 지원을 받아 “병원 규모에 최적화된 감염우려 의료폐기물 멸균기 개발”을 수행한 연구결과입니다 (No. 20210033550003).

국문요약

본 연구에서는 내열성을 가지고 포자를 형성하는 *Bacillus* spp. 중 국내 분리 균주인 *G. thermodenitrificans* subsp. *Calidus*와 *U. suwonensis* 포자의 열 저항성 비교하여 레토르트 식품의 멸균 여부 확인에 이용 가능성을 판단하고자 하였다. *G. thermodenitrificans* subsp. *Calidus* 포자의 121°C에서 D-value는 1.6±0.03분이며, Z-value는 31.2±1.49°C으로 나타났다. *U. suwonensis* 포자의 121°C에서 D-value는 1.2±0.02분이며, Z-value는 31.1±0.48°C으로 나타났다. 두 균주 모두 식품의 멸균 여부 확인에 사용되는 *C. botulinum* 포자의 121°C에서의 D-value보다 높은 것으로 확인되었다. 따라서 레토르트 식품 멸균 여부를 판단하는데 *C. botulinum*과 함께 국내 분리 균주인 *G. thermodenitrificans* subsp. *Calidus*와 *U. suwonensis*의 포자를 사용할 수 있을 것으로 판단된다.

Conflict of interest

The authors declare no potential conflicts of interest.

ORCID

Ju-Hee Nam https://orcid.org/0009-0009-8189-2007
Du-Yeong Jung https://orcid.org/0009-0004-5965-2561
Zi-On Choi https://orcid.org/0009-0008-6965-6995
Hyun-Jung Jung https://orcid.org/0009-0003-1369-8532
Jung-Beom Kim https://orcid.org/0000-0002-0290-2687

References

1. Kwon, S.Y., Choi, I.J., Joo, Y.J., Yoon, J.H., Problems encountered in analyzing the market size, purchase, and consumption of HMR in the Republic of Korea. *Korean J. Community Nutr.*, **27**, 480-491 (2022).
2. Park, C.J., Design of continuous sterilizer for retort pouch. *J. Power Syst. Eng.*, **19**, 57-63 (2015).
3. Stumbo, C.R., 2013. Thermobacteriology in food processing, Elsevier, Amsterdam, Netherlands, pp. 5-15.
4. Lee, G.H., Case studies and success strategies for developing risk communications. *Safe Food*, **2**, 33-42 (2007).
5. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), Food code, MFDS, Cheongju, Korea (2023).
6. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), Guidelines for the recognition of equivalence in sterilization heat treatment of meat, eggs, and dairy products, MFDS, Cheongju, Korea (2018).

7. Smith, L.D., *Clostridium botulinum*: characteristics and occurrence. *Rev. Infect. Dis*., **1**, 637-641 (1979).
8. Rahman, M.S., Guizani, N., Al-Ruzeiki, M.H., D- and Z-values of microflora in tuna mince during moist- and dry-heating. *LWT-Food Sci. Technol*., **37**, 93-98 (2004).
9. Rajashekhar, M., Shahanaz, E., Kalia, V., Biochemical and molecular characterization of *Bacillus* spp. isolated from insects. *J. Entomol. Zool. Stud.*, **5**, 581-588 (2017).
10. Kumar, A., Kumar, A., Pratush, A., Molecular diversity and functional variability of environmental isolates of *Bacillus* species. *SpringerPlus*, **3**, 1-11 (2014).
11. Fikri, E., Kurniati, I., Wartiniyati, W., Prijanto, T.B., Pujiono, P., Syarief, O., Khair, A.S.E., The phenomenon of medical waste recycling in Indonesia: contact time and chlorine dose as a disinfectant with the bio-indicator *Bacillus subtilis* and *Bacillus stearothermophilus*. *J. Ecol. Eng*., **22**, 47-58 (2021).
12. National Institute of Environmental Research (NIER), 2023. Waste process test standards, NIER, Incheon, Korea.
13. Sella, S.R., Vandenberghe, L.P., Soccol, C.R., *Bacillus atrophaeus*: main characteristics and biotechnological applications-a review. *Crit. Rev. Biotechnol.*, **35**, 533-545 (2015).
14. Mun, J.Y., Baek, S.Y., Park, H.Y., Ro, H.S., Yeo, S.H., Cultural characteristics of fungi strains isolated from Korean Nuruk. *J. East Asian Soc. Dietary Life*, **26**, 125-140 (2016).
15. Hwang, Y.S., Bae, S.H., Re-approach through the application of intellectual property laws on licensing fee to the right to reproduce. *J. Korea Res. Soc. Customs.*, **24**, 191-207 (2023).
16. Yi, S.H., Lee, S.Y., Application of microorganism from traditional foods and microbial gene bank. *Bull. Food Technol*., **24**, 74-79 (2011).
17. Guizelini, B.P., Vandenberghe, L.P., Sella, S.R.B., Soccol, C.R., Study of the influence of sporulation conditions on heat resistance of *Geobacillus stearothermophilus* used in the development of biological indicators for steam sterilization. *Arch. Microbiol.*, **194**, 991-999 (2012).
18. Berendsen, E.M., Zwietering, M.H., Kuipers, O.P., Wells-Bennik, M.H., Two distinct groups within the *Bacillus subtilis* group display significantly different spore heat resistance properties. *Food Microbiol*., **45**, 18-25 (2015).
19. Farmiloe, F.J., Cornford, S.J., Coppock, J.B.M., Ingram, M., The survival of *Bacillus subtilis* spores in the baking of bread. *J. Sci. Food Agric*., **5**, 292-304 (1954).
20. Bartholomew, J.W., Mittwer, T., A simplified bacterial spore stain. *Stain Technol*., **25**, 153-156 (1950).
21. Schaeffer, A.B., Fulton, M.D., A simplified method of staining endospores. *Science*, **77**, 194 (1933).
22. Adekanmi, A.A., Dapo, O.A., Adekanmi, A.S., Adekunle, M.T., Heat resistance of *Bacillus* species isolated from Tsire-Suya. *Int. J. Acad. Appl. Res*., **4**, 31-46 (2020).
23. Hassan, H.F., Ramaswamy, H.S., Heat resistance of *Geobacillus stearothermophilus* and *Clostridium sporogenes* in carrot and meat alginate purees. *J. Food Process. Preserv.*, **35**, 376-385 (2011).
24. Lindström, M., Kiviniemi, K., Korkeala, H., Hazard and control of group II (non-proteolytic) *Clostridium botulinum* in modern food processing. *Int. J. Food Microbiol*., **108**, 92-104 (2006).