pISSN 1229-1153 *J. Fd Hyg. Safety*
Vol. 29, No. 3, pp. 207~210 (2014)
http://dx.doi.org/10.13103/JFHS.2014.29.3.207

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

영유아를 대상으로 한 유통식품 중 *Bacillus cereus* 오염실태 연구

박민정* · 홍해근 · 손종성 · 권연옥 · 임영식 · 이현호 · 김구환
경기도보건환경연구원북부지원

A Study on the Contamination of *Bacillus cereus* in Baby Food on the Online Market

Park Min-jung*, Hong Hae-geun, Son Jong-seong, Kwon Yeon-ok, Lim Young-sik, Lee Hyun-ho, and Kim Gu-hwan
Gyeonggi-do Institute of Health and Environment, North Branch
(Received May 24, 2014/Revised June 10, 2014/Accepted September 2, 2014)

ABSTRACT - *Bacillus cereus* is food poisoning bacteria frequently occured in starch food. Most of the delivery foods for infant is classified as ready-to-cook food. But unlike food for infant and young children, there are no standards and specifications of *Bacillus cereus* in ready-to-cook food. The purpose of this study is to examine the presence of *Bacillus cereus*, aerobic bacteria and coliforms in the food for infant and young children sold through internet. *B. cereus* was detected in 9 samples (8.3%), total aerobic bacteria was detected over 10^6 CFU/g in 4 samples and coliforms were not detected in any samples. This will provide basic data for standards and specifications of *Bacillus cereus* in ready-to-cook food.

Key words : *Bacillus cereus, Bacillus thuringiensis,* Food for infant and young children, Ready-to-cook food

생활수준이 향상되고 맞벌이 가구가 증가하는 등 사회 구조 변화에 따른 식생활 양식의 변화로 간편하게 섭취할 수 있는 편의식품과 ready-to-eat-food의 개발과 소비가 증가하고 있다[1]. 또한 영유아 자녀에게 이유식을 직접 만들어 먹이기 어려운 여성을 위해 조리된 이유식을 집으로 배달해주는 이유식 판매업체가 다수 등장하고 있고, 시장 규모도 점차 확대되고 있다. 이러한 업체들은 홈메이드 방식을 강조하며 영유아를 위한 위생과 안전성 등을 내세우고 있다. 그러나 다양한 식재료를 사용하고 보존제 등을 첨가하지 않아 제조 또는 배달과정에서 미생물에 노출될 경우 쉽게 변질·부패될 수 있어 철저한 위생관리가 필수적이다[2].

*Bacillus cereus*는 토양 및 야채, 곡류, 우유 등 식품 원료에서 흔히 발견되는 그람양성균으로 대부분의 식품 가공처리 과정에서도 생존 가능한 포자 형성균이다[3-4]. *B. cereus*는 사람에게 설사형 및 구토형의 두 가지 유형의 식중독을 일으킨다[5-6]. 설사형 식중독은 *B. cereus*가 소장에서 성장하는 동안에 생산되는 enterotoxin에 의해 발생하며[7] 단백질이 포함된 식육 제품이나 채소스프, 소스, 푸딩 등의 식품에서 주로 발생한다. 또한 구토형 식중독의 원인독소는 식품에서 *B. cereus*가 영양세포상태로 성장하거나 발아하는 동안에 생산된 독소로 쌀, 파스타, 국수 등을 튀기거나 조리한 전분질 식품에 의해서 발생한다[8].

배달 이유식과 어린이 반찬류의 대부분은 식품유형이 즉석조리식품으로 되어 있으며 최근 기타 영·유아식으로 바뀌어가는 추세이다. 기타 영·유아식에는 *B. cereus*의 기준이 1 g 당 100 이하로 관리되고 있으나 즉석조리식품에는 *B. cereus*의 기준이 없는 실정이다. 본 연구에서는 인터넷에서 판매되는 배달이유식을 중심으로 일반세균, 대장균군, *B. cereus*의 오염실태를 조사하였으며 *B. cereus*의 설사유발 독소 유전자 및 구토유발 독소유전자 분포를 파악하였다.

재료 및 방법

재료

본 연구에 사용된 검체는 인터넷에서 판매되고 있는 배달이유식 및 영유아용 반찬 106건을 구입하여 사용하였다. 식품유형별로 구분하면 기타 영·유아식 27건, 즉석조리식품 79건이었다.

*Correspondence to: Park Min-jung, Gyeonggi-do Institute of Health and Environment, North branch, 1, Cheongsa-ro, Uijeongbu-si, Gyeonggi-do 480-764, Korea
Tel: 82-31-8030-5923, E-mail: enrogel@gg.go.kr

검체의 전처리

식품공전[9]에 따라 검체 25 g을 무균적으로 취하여 멸균 인산완충액 225 mL를 가하여 stomacher (Bag Mixer 400, interscience, France)로 균질화한 후 시험용액으로 하였다.

대장균군 및 일반세균수 측정

일반 세균수는 시험용액 1 mL와 10배 단계 희석액 1 mL씩을 멸균 페트리접시 2매에 무균적으로 취하여 Plate count agar (Difco, France)를 무균적으로 분주하고 검체와 배지를 잘 혼합하여 응고시킨 후 배지를 중첩시켜 확산집락의 발생을 억제시킨 다음 35~37°C에서 24~48시간 배양하여 1개 평판 당 30~300개의 집락을 생성한 평판을 택하여 g 당 집락수를 계산하였다.

대장균군은 시험용액 1~0.1 mL를 2개씩 Brilliant Green Lactose Bile Broth (Oxoid, England)에 가하여 35~37°C에서 48 ± 3시간 배양한 후 가스 발생여부를 확인하였다.

*Bacillus cereus*의 동정 및 정량

시험용액의 단계별 희석용액 0.2 mL씩 5장을 도말하여 총 접종액이 1 mL이 되게 한 후 30°C에서 24 ± 2시간 배양한 후 집락 주변에 lecithinase를 생성하는 혼탁한 환이 있는 분홍색 집락을 계수하였다. 이 전형적인 집락을 선별하여 Tryptic soy agar (Oxoid, England)에 도말하여 API 50CHB와 API 20E test kit (bioMerieux, France)를 이용한 생화학 시험을 하여 동정하였다. 또한 독소유전자를 확인하기 위해 *Bacillus cereus* 6-toxin detection kit (Kogenebiotech, Korea)를 사용하여 PCR하였으며 *B. cereus*와 *B. thuringiensis*를 구분하기 위해 *Bacillus cereus* detection (Bc/Bt distinguish) PCR kit (Jinsungunitech, Korea)를 사용하여 PCR하였고 0.5% basic fuchsin을 이용하여 현미경으로도 확인하였다.

결과 및 고찰

일반세균수 및 대장균군

이유식 106건의 세균수 검사결과 균이 검출되지 않은 것부터 최대 1.1×10^6 CFU/g까지 검출되었다. 기타 영·유아식에서는 12건(44%)에서 최대 2.5×10^3 CFU/g, 즉석조리식품에서는 46건(58%)에서 최대 1.1×10^6 CFU/g으로 대체적으로 즉석조리식품에서 세균수가 많이 검출되었다 (Table 1). 특히 즉석조리식품 중 4건에서는 세균수 기준인 10^5 CFU/g을 초과하였다.

대장균군은 106건 모두에서 검출되지 않았다.

B. cereus 분리 및 동정

106건의 검체 중 총 9건에서 *B. cereus*가 10~3.6×10^3 CFU/g 범위로 검출되었다(Table 2).

Table 1. Detection rate of total aerobic bacteria and *B. cereus* in infant food

Food type	Food for infant and young children	Ready-to-cook food
No. of detected samples /total samples	12/27	46/79
Detection rate (%)	44	58

Table 2. Detection rate of *B. cereus* in infant food

Food type	Food for infant and young children	Ready-to-cook food
No. of detected samples /total samples	0/27	9/79
Detection rate (%)	0	11

*B. cereus*가 검출된 제품은 모두 즉석조리식품이었으며 이는 상대적으로 미생물기준이 엄격하지 않아서인 것으로 보인다. 기준이 100 CFU/g 이하로 설정되어 있는 기타 영·유아식과 달리 즉석조리식품에서는 *B. cereus*의 기준이 설정되어 있지 않아 잠재적 위험성이 큰 것으로 판단되며, 추가적인 조사 연구를 통해 *B. cereus*의 기준을 마련하여야 할 것으로 판단된다. 배달 이유식은 면역력이 취약하고 성장기 영양관리가 중요한 영유아가 주식으로 이용하고 있는 식품인 만큼 기타·영유아식 등으로 허가하여 관리하는 것도 좋은 방법이라고 하겠다.

B. cereus 독소유전자 분포

즉석조리식품으로부터 분리된 총 9주에 대한 *B. cereus*의 독소유전자 분석결과는 Fig. 1에 나타내었다. Cytotoxin K (CytK)는 cytotoxin protein 생산 *B. cereus*로부터 분리되었으며, *S. aureus*의 α-hemolysin과 *C. perfringens*의 β-toxin의 구조와 유사한 것으로 알려져 있다. c*ytK* 독소유전자에 대한 PCR 검출 결과 6주(66.6%)에서 585bp의 증폭밴드를 확인할 수 있었다. Nonhemolytic enterotoxin 중 *nheA*의 PCR 실험결과 8주(88.9%)에서 475bp의 증폭밴드를 확인할 수 있었다. 식중독과 관련해 어떠한 역할을 하는지 아직 알려져 있지 않은 *entFM*은 8주(88.9%)에서 각각 와 360~400bp의 밴드를 확인할 수 있었다. *B. cereus*가 생산하는 설사독소 중 가장 대표적인 독소유전자인 *bceT*는 PCR 결과 7주(77.8%)에서 303bp의 증폭밴드가 나타났으며 이러한 결과는 Kim 등[10]이 김밥과 떡으로부터 분리한 균주에서 62.5%의 검출빈도를 나타냈다고 보고한 것보다 다소 높은 경향을 보였다. Hemolysine BL 유전자 중 *hblC*는 3주(33.3%)에서 195bp의 증폭밴드를 확인할 수 있었다. 이 결과는 Kim 등[10]의 결과보다 낮은 검출율을 보였으나 Heinrichs 등[11]이 분리균주 중 31%가 *hbl*을 보유한다고 보고한 것과 유사하였다. 구토독소인 *cer*은 cereulide를 생성하는 유전자 중 일부로 알려졌고 4개의 아미노산

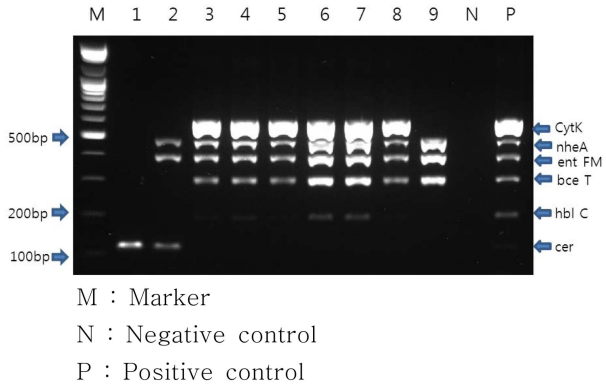

Fig. 1. PCR result of *B. cereus* 6 toxin genes.

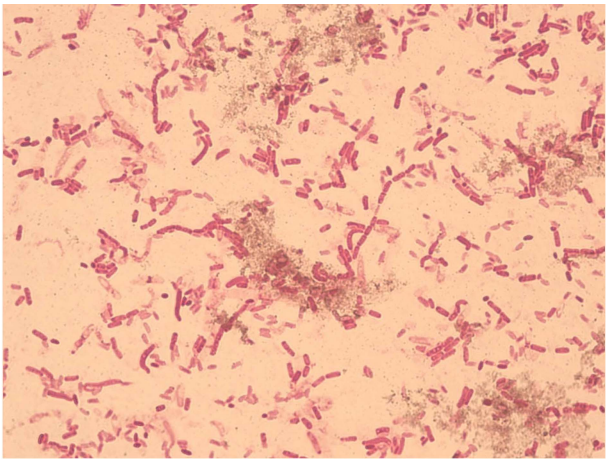

Fig. 2. *B. cereus* isolated from ready-to-cook food.

또는 oxy-acid의 삼반복 고리구조로 이루어져 있다. 구토독소는 126°C로 90분간 가열하여도 파괴되지 않는 열저항성과 산, 알칼리, 단백질 가수분해효소에도 저항성을 가지고 항체를 형성하지 않아 쉽게 질병을 일으킨다. *cer*은 2주(22.2%)에서만 증폭밴드가 나타났다. 이는 Jeon 등[12]이 쌀밥에서 분리한 *B. cereus* 균주에서 9개 중 7개가 구토형 식중독 유발 유전자만을 가지고 있다고 보고한 것과는 상반되나 다른 연구자의 보고[13-14]에 의하면 생쌀에서 분리한 94개의 *B. cereus*에서 단 한 균주도 구토독소를 생산하지 못했고, 즉석섭취식품에서 분리된 40개의 *B. cereus* 중에서 단 한 개 균주만 구토독소를 생산하고 있었다.

B. cereus 및 *B. thuringiensis* 선별 동정

*B. thuringiensis*는 식중독균으로 지정되어 있지 않으나 식중독균인 *B. cereus*와 생화학적 및 유전적으로 매우 유사하여 구분이 쉽지 않다. 현재 두 균주를 구분하는 일반적인 방법으로 *B. thuringiensis*에만 있는 결정체독소(Cry toxin, insecticidal toxin)[15-16]의 존재 유무를 광학현미경이나 전자현미경으로 관찰하는 방법이 주로 사용되고 있다. *B. thuringiensis*에서 포자형성을 유도하여 결정체독소의 존재를 광학현미경으로 관찰하는 방법은 배율이 낮아 정확도가 떨어지며 전자현미경으로 관찰하더라도 많은 시간과 비용 및 숙련도를 필요로 하는 문제가 있다. 최근 *cry* 유전자를 이용한 PCR로 구별하는 방법도 개발되었다. *B. thuringiensis*의 경우 *groEL* 밴드와 *cry1* 밴드 두 개를 확인할 수 있다.

Table 3. PCR result for distinguish *B. cereus* from *B. thuringiensis*

Strains	Target genes	
	groEL	*cry1*
1	+	-
2	+	-
3	+	-
4	+	-
5	+	-
6	+	-
7	+	-
8	+	-
9	+	-

여기서는 먼저 *B. cereus*와 *B. thuringiensis*를 구분하기 위해 현미경으로 관찰한 결과 결정체독소가 발견되지 않았으며(Fig. 2), PCR 시험법으로 확인한 결과 모두 *B. cereus* 임을 알 수 있었다(Table 3).

요 약

본 연구에서는 인터넷에서 판매되는 배달이유식의 위생안전성을 평가하고, *B. cereus*의 독소유전자 분포를 파악하여 즉석조리식품으로 구분되는 이유식의 *B. cereus* 기준설정을 위한 기초자료를 제공하고자 하였다. 기타 영·유아식 27건, 즉석조리식품 79건 등 총 106건에 대한 실험결과는 다음과 같다.

1. 이유식 106건의 세균수 검사결과 기타 영·유아식에서는 12건(44%)에서 최대 2.5×10^3 CFU/g, 즉석조리식품에서는 46건(58%)에서 최대 1.1×10^6 CFU/g으로 대체적으로 즉석조리식품에서 세균수가 많이 검출되었다.

2. 106건의 검체 중 총 9건에서 *B. cereus*가 $10\sim3.6 \times 10^3$ CFU/g 범위로 검출되었으며 모두 즉석조리식품이었다.

3. *B. cereus*의 독소유전자 중 *cytK*는 6주(66.6%), *nheA* 및 *entFM*은 8주(88.9%), *bceT*는 7주(77.8%), *hblC*는 3주(33.3%)에서 검출되었으며 구토독소인 *cer*은 2주(22.2%)에서만 증폭밴드가 나타났다.

4. 분리된 균주는 *B. cereus*와 *B. thuringiensis*를 구분하기 위한 시험법에서 모두 *B. cereus*로 나타났다.

참고문헌

1. Choi S.K., Lee M.S., Lee K.H., Lim D.S., Lee K.H. and Kim

C.H.: Changes in quality of hamburger and sandwich during storage under simulated temperature and time. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour*, **18**, 27~34 (1998).
2. 소비자안전센터 소비자안전국 식의약안전팀, 시험검사국 식품미생물팀 : 영유아식품 안 전실태 조사 (2011).
3. Kim S.J., Jung J.H., Tahk H.M., Baek S.Y., Lee S.Y.: Effect of factors on the sporulation of *Bacillus cereus* and their thermal resistance. *J. Fd. Hyg. Safety*, **24**, 256~261 (2009).
4. Ankolekar, C., Rahmati, T., Labbe, R.G.: Detection of toxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spore in U.S. rice. *Int. J. Food Microbiol*, **128**, 460~466 (2008).
5. Kramer, J.M., Gilbert, R.J.: *Bacillus cereus* and other Bacillus species in foodborne bacterial pathogens. Doyle MP (ed). Marcel Dekker Inc., London, UK, pp. 21-70 (1989)
6. David A. Rasko, Michael R. Altherr, Cliff S. Han, Jacques Ravel : Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS Microbiology Reviews*, **29**, 303~329 (2005).
7. Anwarul, H., Nicholas, J.R.: Phenotypic and genotypic characterisation of *Bacillus cereus* isolates Bangladeshi rice. *Int. J. Food Microbiol*, **98**, 23~24 (2005).
8. 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).
9. 식품공전. 식품의약품안전처 (2013)
10. Kim J.B., Park Y.B., Park M.K., Shin S.W., Kwon Y.O., Ko H.U. and Kim J.C.: Distribution of toxin genes in *Bacillus cereus* isolated from cooked grains. 경기도 보건환경연구원보, pp.155~164 (2006)
11. Heinrich, J.H., Beecher, D.J., MacMillan, J.D. and Zilinskas, B.A.: Molecular cloning and characterization of the *hblA* gene encoding the B component of hemolysin BL from *Bacillus cereus. J. bacteriol*., **17**, 6760~6766 (1993).
12. Jeon J.H. and Park J.H.: Toxin gene analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated from cooked rice. *Korean J. Food Sci. Technol*., **42**(3), 361~367 (2010).
13. Ankolekar, C., Rahmati, T., Labbe', R.G.: Detection of toxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spores in U.S. rice. *Int. J. Food Microbiol*., **128**, 460~466 (2009).
14. Rosenquist, H., Smidt, L., Anderson, S.R., Jensen, G.B., Wilcks, A.: Occurence and significance of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* in ready-to-eat food. *FEMS Microbiol. Lett*., **250**, 129~136 (2005).
15. Maria, E. Vidal-Dominguez, Macarena Perez-Cenci, Graciela, L. Salerno, Corina, M. Beron : Genetic diversity of *cry* gene sequences of *Bacillus thuringiensis* strains analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis. *Curr. Microbiol.*, **62**, 866~870 (2011).
16. Alejandra Bravo, Sarjeet S. Gill and Mario Soberon : Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, **49**(4), 423~435 (2007).