

*Bacillus cereus*菌의 增殖速度와 孢子的 耐熱性에 關한 研究

李 明淑 · 張 東錫

釜山東義工業專門大學 食品工業科, 釜山水產大學 食品工學科
(1981년 8월 29일 수리)

Growth Rate of *Bacillus cereus* and Heat Resistance of its Spores

Myeong-Sook Lee and Dong-Suck Chang*

Department of Food Processing, Dong Eui Technical Junior College of Busan

*Department of Food Science and Technology, National Fisheries University of Busan

(Received August 29, 1982)

Abstract

The growth rate and heat resistance of two types of *Bacillus cereus* isolated from cooked rice were observed. The FB-1 strain showed positive to haemolysis and negative to starch hydrolysis, but FB-2 strain positive to both reaction.

The cell number of *B. cereus* FB-1 reached to more than 10^7 cells/ml within 6 to 12 hours at 25~35°C when cultured on the medium of cooked rice homogenate (cooked rice 30 g + phosphate buffer solution 80 ml), but the numbers at its maximum growth were only 10^4 ~ 10^6 cells/ml at 45~55°C. The specific growth rate of FB-1 strain were 0.82hr^{-1} at 20°C, 1.76hr^{-1} at 30°C, 2.21hr^{-1} at 35°C and 1.84hr^{-1} at 40°C, respectively. D-values of FB-1 and FB-2 spores at 70~100°C were in the range from 18 to 3.1 min and 23.5 to 3.7 min, respectively.

序 論

*Bacillus cereus*菌은 gram 陽性, 好氣性的 有孢子桿菌으로 自然界에 널리 分布하며 各種 食品, 特히 澱粉을 主原料로 한 食品에서 많이 分離되고 있다^(1~10).

*B. cereus*菌은 食品이나 一般 有機物의 腐敗 原因菌으로 알려져 왔으나^(2,3) 最近에는 유럽이나 日本 등에서 이 菌에 의한 食中毒 事例가 多數 報告되어^(11~14), 이에 關한 研究가 各國에서 活潑히 進行되고 있다. 즉 *B. cereus*菌에 의한 食中毒 症狀^(2,11), 食中毒 發症菌量⁽³⁾, 食中毒의 原因毒素^(15,16), 그리고 *B. cereus*孢子的 耐熱性^(4,17) 등에 關한 報告가 계속되고 있다.

따라서 米飯類를 主食으로 하고 있는 우리 나라에서

도 이 菌에 關한 研究가 時急하나, 澱粉을 主原料로 한 食品을 對象으로 *B. cereus*菌의 分布狀態와 그 生理的 特性에 關한 報告⁽¹⁸⁾외에는 거의 없는 實情이다.

本 研究는 저자 등⁽¹⁸⁾이 밥에서 直接 分離한 *B. cereus*菌의 溫度에 따른 增殖速度와 耐熱性을 알아보기 爲하여 食中毒과 直接關聯이 있다고 알려져 있는 溶血性 陽性과 澱粉 液化能 陰性的 性質을 가진 菌株⁽²⁾와 食中毒 發生과 直接關聯은 없으나 市販食品에서 分布度가 가장 높은 菌株^(5,18)를 使用菌株로 하여 實驗한 結果를 報告하는 바이다.

材料 및 方法

使用菌株

本 實驗에 使用한 菌株는 저자 등⁽¹⁸⁾이 밥에서 直接 分離한 *B. cereus* 菌叢에서 食中毒 發生에 直接 關聯이 있는 性質을 가진 菌株(以下 FB-1)와 食中毒 發生과 直接 關聯은 없으나 市販食品에서 分布度가 가장 높다고 報告된 菌株(以下 FB-2)^(5,18)이었으며 그 生化學的 性質은 Table 1과 같다.

Table 1. Biological characteristics of *Bacillus cereus* strains examined

Check items	FB-1	FB-2
V-P reaction	+	+
Citrate utilization	+	-
Nitrate reduction	-	-
Starch hydrolysis	-	-
Haemolysis	-	-
Catalase	-	-
Gelatin hydrolysis	-	-
Egg yolk reaction	-	-
Acid formation from		
Glucose	+	-
Xylose	-	-
Arabinose	-	-
Mannitol	-	-

方 法

가. 增殖速度

實驗室에서 취사한 밥을 無菌的으로 30 g 取하고 여기에 滅菌한 磷酸緩衝液 稀釋水를 180 ml 加하여 均質化한 液에 저자 등⁽¹⁸⁾이 행한 實驗과 同一한 方法으로 培養한 FB-1 種菌을 最初菌數가 3.0×10^3 cells/ml 되도록 接種하여 5°C에서 60°C까지, 5°C 間隔으로 區分하여 培養하였다. 各 溫度에서의 배양액을 一定한 時間 間隔으로 채취하여 A·P·H·A 方法⁽¹⁹⁾으로 生菌數를 測定하여 比增殖速度와 平均世代時間을 구하였다⁽²⁰⁾.

나. 胞子の 耐熱性

試驗菌株의 胞子生成은 potato dextrose agar(pH 7.1)에 菌을 接種하여 32°C에서 10日間 培養한 後 胞子가 90% 以上 形成된 것을 현미경으로 確認하고 滅균한 인산완충액 회석수에 集菌하여 2,500rpm으로 10分間 2回 遠心分離하여 胞子를 모았다. 이를 다시 10^9 cells/ml 程度되도록 滅균한 인산완충액 회석수에 현탁시킨 것을 被檢液으로 하였다⁽⁴⁾.

2,000 ml들이 등근바닥 플라스크에 990 ml의 滅균한 인산완충액 회석수를 넣고 加熱式 磁氣攪拌機로 加熱, 攪拌시키면서 所定의 溫度에 到達하면 被檢液을 10 ml

加하였다. 試驗溫度를 $90 \pm 0.5^\circ\text{C}$, $95 \pm 0.5^\circ\text{C}$, $100 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 로 調節 加熱하면서 時間別로 生菌數를 測定하여 死滅曲線을 求하였다.

結果 및 考察

培養溫度에 따른 菌의 增殖

培養溫度를 5°C에서 60°C까지, 5°C 間隔으로 區分하여 培養한 結果 增殖曲線은 Fig. 1과 같다.

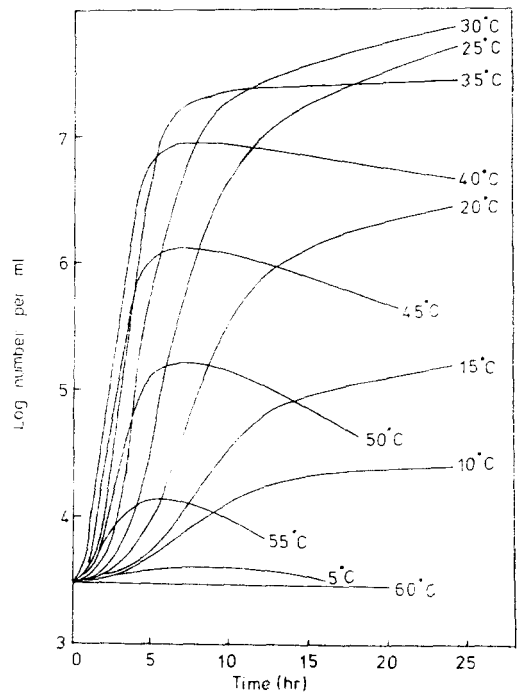


Fig. 1. Effect of temperature on the growth of *Bacillus cereus* FB-1 on cooked rice homogenate medium

Fig. 1에서와 같이 溫度에 따라 菌의 增殖 樣相은 달랐다. 溫度別로 考察해 보면 5°C와 60°C의 境遇 菌은 거의 增殖되지 않았으며 10°C에서 30°C까지의 境遇는 溫度가 上昇함에 따라 誘導期가 5時間에서 3時間으로 짧아지고 菌의 增殖도 현저하게 增加하여 25°C의 境遇는 12時間, 30°C의 境遇는 8時間만에 10^7 cells/ml 以上으로 增殖하였다.

35°C의 境遇는 培養後 1時間부터 菌이 急激히 增殖하여 6時間 후에 10^7 cells/ml 以上이 되었고 그 후에는 菌數가 거의 변하지 않았다.

40°C의 境遇는 培養 1時間 以內에 急激히 增殖을 始作하여 5時間만에 7.5×10^6 cells/ml로 最高에 達한 뒤 서서히 減少하는 現象을 나타내었다.

45°C에서 55°C까지의 境遇는 溫度가 上昇함에 따라 菌의 增殖速度는 현저하게 減少하여 45°C의 境遇 最高 菌數는 10⁶ cells/ml이었으며 55°C의 境遇는 10⁴ cells/ml에 지나지 않았다. 暍죽에서 *B. cereus*菌을 배양시킨 結果 30°C의 境遇는 8時間, 35°C의 境遇는 6時間 培養으로 10⁷/ml 以上으로 增殖되었다는 報告⁽²⁾는 本 結果와 잘 一致하였다.

人工培地에서 本 菌을 培養한 結果 25°C에서는 16時間, 30°C에서는 12時間, 35°C에서는 17時間 培養후 10⁷/ml에 到達하였다⁽¹⁸⁾.

以上の 結果에서 *B. cereus*菌은 溫度와 營養조건이 適當하면 初期汚染濃度가 10³~10⁴cells/g 程度(各種 市販食品의 調理率 2~3時間의 菌數⁽¹⁸⁾)이면 여름철의 氣溫에서는 6~8時間 以內에 *B. cereus*菌이 10⁷ cells/ml 以上으로 增殖될 可能性이 있으므로 適切한 食品衛生 管理가 要望되며 이런 條件에서는 포도球菌의 enterotoxin도 食中毒 發症品이 生産되므로⁽⁹⁾ 더욱 注意가 要 望되고 있다.

各 溫度別로 求한 比增殖速度와 平均世代 時間을 Table 2에 나타내었다. 35°C의 境遇 比增殖速度가 2.21hr⁻¹, 平均世代時間은 0.32hr로 菌의 增殖이 가장 速았으며 다음이 30°C의 境遇로 各各 1.76hr⁻¹, 0.40hr 이었다.

Table 2. Specific growth rate and generation time of *Bacillus cereus* FB-1 in cooked rice homogenate at various temperature

Temperature (°C)	Specific growth rate (hr ⁻¹)	Generation time (hr)
10	0.21	2.88
15	0.42	1.64
20	0.82	1.84
25	1.25	0.56
30	1.76	0.40
35	2.21	0.32
40	1.84	0.38
45	1.42	0.49
50	0.90	0.77
55	0.47	1.46

저자등이 人工培地에서 同 菌株를 培養하여 求한 比增殖速度와 平均世代時間은 30°C의 境遇가 0.73hr⁻¹, 0.95hr이었으며 35°C의 境遇가 0.79hr⁻¹, 0.88hr이었 다⁽¹⁸⁾.

Sporulation medium에서 *Bacillus cereus*菌과 *B. cereus* sub. sp. *mycoides*菌을 培養한 結果 生育適溫과

그때의 比增殖速度는 各各 39°C와 2.5hr⁻¹, 33°C와 1.2hr⁻¹이었다고 報告⁽²¹⁾되었다. 따라서 같은 *B. cereus* 菌이라도 使用培地나 分離되는 食品에 따라서 溫度特 性은 약간의 差異가 있음을 알 수 있었다.

胞子の 耐熱性

*B. cereus*胞子の 加熱溫度에 따른 死滅曲線은 Fig.2 및 Fig. 3과 같았으며, 이때의 加熱溫度는 一般 澱粉 食品의 調理溫度 범위인 90~100°C 사이를 擇하였다.

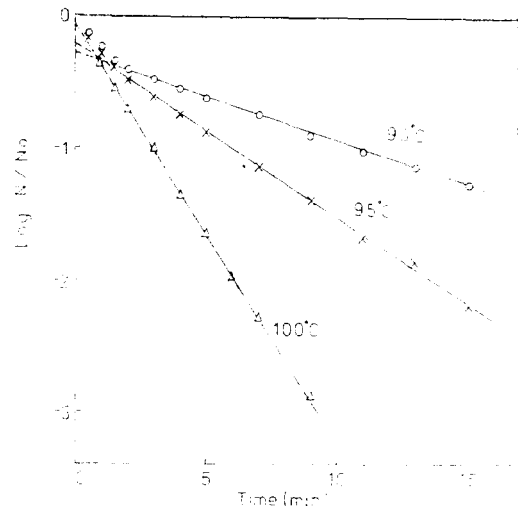


Fig. 2. Survival curves for *Bacillus cereus* FB-1 spores heated in phosphate buffer solution

N, Number of spores survived; N₀, initial number of spores

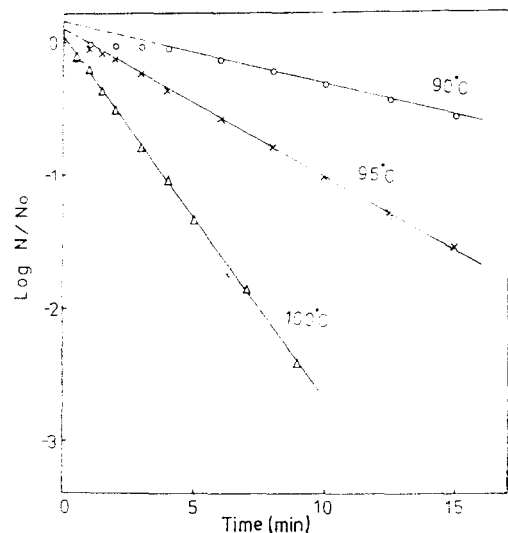


Fig. 3. Survival curves for *Bacillus cereus* FB-2 spores heated in phosphate buffer solution

N, number of spores survived; N₀, initial number of spores

Fig. 2와 3에서 보면 加熱溫度가上昇함에 따라 試驗 菌株의 死滅率은 急激히 增加하였으나 加熱初期에는 菌株에 따라 死滅曲線의 形態는 다르게 나타났다. 死滅曲線의 形態는 Fig. 2의 境遇에는 加熱初期에 孢子數가 急激히 減少하여 死滅曲線이 凹型을 나타내었다가 그 후 直線을 나타내었으며(以下 I型), Fig. 3의 경우에는 加熱初期에 서서히 減少하여 凸型으로 되었다가 그 후 直線을 나타내었다(以下 II型).

Clostridium botulinum 孢子의 耐熱性을 인산완충액 희석수에서 試驗한 結果 死滅曲線의 形態는 菌種에 따라 I型, II型 그리고 死滅曲線全體가 凹型인 것으로 分類되었다고 報告된 바 있다^(22,23).

死滅曲線이 I型은 II型보다 加熱初期에 孢子의 耐熱性이 弱하므로 만약 같은 D값을 갖는 菌株이더라도

孢子의 耐熱性은 II型을 나타내는 菌株가 強하다는 것을 쉽게 알 수 있다. 이러한 差異를 區別하기 爲하여 死滅曲線에서 直線部分의 延長이 縱軸과 만나는 點의 生殘率로 부터 다음과 같이 切片定數 (Intercept ratio, 以下 IR)⁽²⁴⁾를 求하였다.

$$IR = \log \frac{Y_0}{N_0}$$

여기서 N_0 : 培養液中 最初의 孢子數

Y_0 : 直線의 延長線으로 extrapol하여 구한 最初의 孢子數

따라서 死滅曲線이 I型이면 IR값은 負數, II型이면 正數가 된다. 위의 식에서 求한 試驗孢子의 IR값과 Fig. 2와 3에서 求한 D값과 Z값을 Table 3에 나타내었다.

Table 3. Intercept ratio, D and Z-value for *Bacillus cereus* spores heated in phosphate buffer solution (pH 7.0)

Strain	Initial No. of spores (cells/ml)	Heating temp. (°C)	Intercept ratio (log R*)	D-value (min)	Z-value (°C)
FB-1	1.4×10^7	90	-0.08	18.0	13.0
		95	-0.22	7.4	
		100	-0.31	3.1	
EB-2	1.2×10^7	90	+0.16	23.5	12.5
		95	-0.09	9.2	
		100	-0.04	3.7	

*Zero time intercept of the regression line

最初 孢子數를 10^7 cells/ml 程度로 調節하여 耐熱性을 實驗한 結果 FB-1 菌株의 IR값은 90°C, 95°C, 100°C의 境遇에 各各 -0.08, -0.22, -0.31이었으며 FB-2 菌株는 0.16, 0.09, 0.04이었다.

D값을 比較해 보면 FB-1 菌株는 $D_{90^\circ C}$, $D_{95^\circ C}$, $D_{100^\circ C}$ 가 各各 18.0분, 7.4분, 3.1분이었고 FB-2 菌株는 23.5분, 9.2분, 3.7분이었다. Z값은 FB-1 菌株가 13.0°C, FB-2 菌株가 12.5°C이었다.

以上の 結果에서 食中毒과 直接 關聯있는 FB-1 菌株의 孢子 耐熱性은 食中毒과 直接 關聯이 없는 FB-2 菌株보다 弱하였다.

要 約

밥에서 直接 分離한 *Bacillus cereus* 菌株중에서 食中毒과 直接 關聯이 있는 溶血性 陽性과 澱粉液化能 陰性的 性質을 가진 菌株와 食中毒과 直接 關聯이 없으나 市販食品에서 分布度가 높은 菌株의 30g과 인산완충액 180 ml를 혼합하여 균질화한 액에서의 增殖

速度와 pH 7.1의 인산완충액, 희석수에서의 耐熱性을 實驗한 結果를 要約하면 다음과 같다.

食中毒 關聯 菌株는 5°C와 60°C에서는 거의 增殖하지 않았고 25°C와 35°C 사이에서는 溫度의 上昇에 따라 菌의 增殖은 活發하여져 初期菌 3.0×10^3 cells/ml 일 때 25°C의 境遇는 培養後 12時間, 30°C의 境遇는 8時間, 35°C의 境遇는 6時間만에 食中毒 發症量인 10^7 cells/ml에 到達하였다. 40°C 以上에서는 菌의 增殖은 그리 活發하지 못하여 25時間 이상 배양하여도 最高菌量은 10^{4-6} cell/ml를 超過하지 못하였다. 한편 比增殖速度와 平均 世代時間은 各各 30°C에서는 $1.76hr^{-1}$, 0.40hr이었고 35°C에서는 $2.21hr^{-1}$, 0.32hr이었다.

食中毒 關聯 菌株의 耐熱性을 實驗한 結果 加熱初期에 孢子는 急激히 死滅하였고 D값은 $D_{90^\circ C}=18.0$ min, $D_{95^\circ C}=7.4$ min, $D_{100^\circ C}=3.1$ min이었다. 食中毒 非關聯 菌株는 加熱初期에 孢子는 서서히 死滅하였고 $D_{90^\circ C}=23.5$ min, $D_{95^\circ C}=9.2$ min, $D_{100^\circ C}=3.7$ min으로서 食中毒 關聯 菌株에 比하여 耐熱性은 強한 편이었다.

文 獻

1. Buchanan, R. E. and N. E. Gibbons: *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8th ed. The williams and wilkins, p.530 (1974)
2. 藤原 喜久夫: 食品衛生研究, **30**(2), 27 (1980)
3. 藤原 喜久夫: 食品衛生研究, **27**(6), 71 (1977)
4. 品川邦汎, 國田信治, 佐佐木寧, 岡本見: 食衛誌, **20**(6), 431 (1979)
5. 寺山武, 新垣正夫, 山田登夫, 潮田弘, 五十嵐英夫, 坂井千三, 善養寺活: 食衛誌. **19**(1), 98 (1978)
6. Goepfert, J. M., Spira, W. M. and Kim. H. U.: *J. Milk Food Technol.*, **35**, 213 (1972)
7. 赤木正育, 深井猛, 片山修, 原原久芳: 食品衛生研究, **30**(8), 31 (1980)
8. Kim, H. U. and Goepfert, J. M.: *Appl. Microbiol.*, **22**(4), 581 (1971)
9. Kim, H. U. and Goepfert, J. M.: *J. Milk Food Technol.*, **34**, 12 (1971)
10. Mossel, D. A., Koopman, M. J. and Jonreriouis, E.: *Appl. Microbiol.*, **15**(3), 650 (1976)
11. 安川章, 岡田陽一, 宮本三郎, 吉村陽, 福島猛, 種村昌城, 山本博昭, 川村脩一, 伊藤謙朗: 食衛誌, **20**(3), 186 (1979)
12. Hauge, S.: *J. Appl. Bacteriol.*, **18**, 591(1955)
13. 山形縣衛生部 環境衛生課: 食品衛生研究, **26**(2), 22 (1976)
14. 東島弘明: 食品衛生研究, **30**(8), 60 (1980)
15. Ezepechuck, Yu. V. and Fluor, F. S.: *J. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol.*, **7**, 124 (1971)
16. Gorina, L. G., Fluor, F. S. Olovnikov, A. M. and Ezepechuck, Yu. V.: *Appl. Microbiol.*, **29**(2), 201 (1975)
17. Bradshaw, J. D., Peeler, J. T. and Twedt, R. M. *Appl. Microbiol.*, **30**(6), 943 (1975)
18. Lee, M. S. and Chang, D. S.: *Bull. Korean Fish. Soc.*, **13**(4), 163 (1980)
19. A. P. H. A.: *Recommended procedures dor the bacteridogical examination of sea water and shellfish*, 3rd ed., Am. Pub. Health Assoc., Inc., New York, p.17 (1970)
20. Stumbo, C. R.: *Thermobacteriology in food processing*, 2nd ed., Academic Press. Inc., p.93 (1973)
21. Warth, A. D.: *J. Bacteriol.*, **134**(3), 699 (1978)
22. 松田典彦, 駒木勝, 松繩桂子: 食衛誌, **21**(5), 398 (1980)
23. 松田典彦, 駒木勝: 食衛誌, **21**(5), 390 (1980)
24. 松田典彦, 駒木勝, 松繩桂子, 食衛誌, **22**(2), 125 (1981)