

유통 생식제품의 미생물 오염 분석

오윤지¹ · 박금덕² · 이인숙³ · 권상호⁴ · 정윤화^{1†}

¹단국대학교 식품영양학과, ²서흥캡슐, ³경기대학교 대체의학대학원, ⁴안동과학대학 식품계열

Analysis of Microbial Contamination in Commercial *Saengshik* Products

Yunji Oh¹, Geumduck Park², Insook Lee³, Sangho Kweon⁴ and Yoonhwa Jeong^{1†}

¹Dept. of Food Science and Nutrition, Dankook University, Yongin 448-701, Korea

²Suheung Capsule Co., Ltd., Seoul 130-845, Korea

³The Graduate School of Alternative Medicine, Kyonggi University, Suwon 443-760, Korea

⁴Dept. of Food Science, Andong Science College, Andong 760-709, Korea

Abstract

This study was performed to assess the presence of contaminated microorganisms of *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, and *Bacillus cereus* in the 112 commercial *Saengshik* products. *E. coli* was not detected in all the samples, but *C. perfringens* was detected in 11 products (9.8%). The number of the bacteria was less than 100 CFU/g, which was satisfactory to KFDA microbiological requirement. *B. cereus* was detected less than $10^2 \sim 10^3$ CFU/g in 7 products and $10^3 \sim 10^4$ CFU/g in 13 products out of 25 products. Those detected bacteria from tryptose sulphite cycloserine agar and mannitol egg yolk polymyxin agar showed the typical characteristics of Gram positive and contained lecithinase, which can decompose egg-yolks layers in the biochemical test. Therefore, much more attention must be applied to satisfy the *B. cereus* requirement for *Saengshik* products sold in the market.

Key words : *Saengshik*, *E. coli*, *C. perfringens*, *B. cereus*, contamination.

서 론

우리나라 식품공전(식품의약품안전청 2008a)에서는 생식(生食)류는 '동·식물성 원료를 주 원료로 하여 건조와 같은 가공처리하여 분말, 과립, 바, 페이스트, 젤상, 액상 등으로 제조한 것으로 이를 그대로 또는 물 등과 혼합하여 섭취할 수 있도록 한 것'이라고 정의되어 있다. Kim YJ(2006)은 소비자들이 생식 제품을 섭취하는 목적으로 체질 개선이 50%, 질병 치유식이 26%, 식사 대용식이 22%라고 보고하였다. Chang *et al*(2004)은 시판 생식의 제조 공정과 최종 제품에서 병원성 미생물을 분석한 결과, 최종 제품의 위해 미생물 검출률이 원료보다 높게 나타나 제조 공정 중 미생물 오염이 증가한다고 보고하였고, Chung & Han(2003)은 생식이 선식보다 위생적으로 더 안전할 것이라는 소비자 인식 조사 결과와는 달리 생식이 미생물 위해 정도가 더 높게 나타났다고 보고하였다. 생식 제품의 특성상 열처리를 하지 않기 때문에 위생적인 문제가 부각되면서 2005년 식품공전에 생식류에 대하여 수분은 8.0% 이하, 대장균(*Escherichia coli*)은 음성, 클로스트리디움 퍼프린젠스

(*Clostridium perfringens*)는 1g 당 100 CFU 이하, 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*)는 1g 당 1,000 CFU 이하로 규정하는 기준 규격이 신설되었다(식품의약품안전청 2005).

Kwak *et al*(2006)은 현미, 당근, 울무, 옥수수 등 53건의 원재료에 대한 미생물 오염 분석 결과, *C. perfringens*는 2건(3.8%), *B. cereus*는 13건(24.5%)에서 검출되었다고 보고하였다. Cho *et al*(2008)은 시판 생식의 위해 미생물 오염도 조사에서 *B. cereus*의 좀 더 위생적인 관리가 필요하다고 보고하였고, Chung and Han(2003)은 미생물 검사 결과 생식 제품에서 많은 대장균군이 검출되어 적절한 위생 관리 기준이 마련되어야 한다고 보고하였다.

본 연구에서는 시판 생식 제품들이 식품공전 기준 규격에 적합한지의 여부를 알아보기 위해 대장균(*Escherichia coli*), 클로스트리디움 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*), 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*) 등의 오염 미생물을 분석하였다.

연구 내용 및 방법

1. 실험 재료

2007년 1월부터 2008년 12월까지 생산된 9개 업체의 112

† Corresponding author : Yoonhwa Jeong, Tel : +82-31-8005-3176, Fax : +82-31-8005-4054, E-mail : yjeong@dankook.ac.kr

점의 생식제품(Table 1)을 각 업체에서 제공받아 사용하였다.

2. 오염 미생물 분석

식품공전의 생식류 규격 항목인 *E. coli*, *C. perfringens*, *B. cereus* 등의 미생물을 분석하였다(Fig. 1). 모든 시료는 Clean Bench(Hb-402, 한백과학, 한국)에서 무균적으로 처리하였고, Stomacher(Bagmixer400, Interscience, Korea)로 균질화하여 사용하였다. 미생물 분석 및 생화학적 특성 분석은 식품공전(2008b)에서 제시한 시험법에 따라 수행하였다.

Table 1. Number of commercial Saengshik product samples

| Manu- facturer | Number of samples | Manu- facturer | Number of samples |
|-------------------|----------------------|-------------------|----------------------|
| A | 22 | F | 10 |
| B | 26 | G | 14 |
| C | 10 | H | 10 |
| D | 2 | I | 6 |
| E | 12 | | |

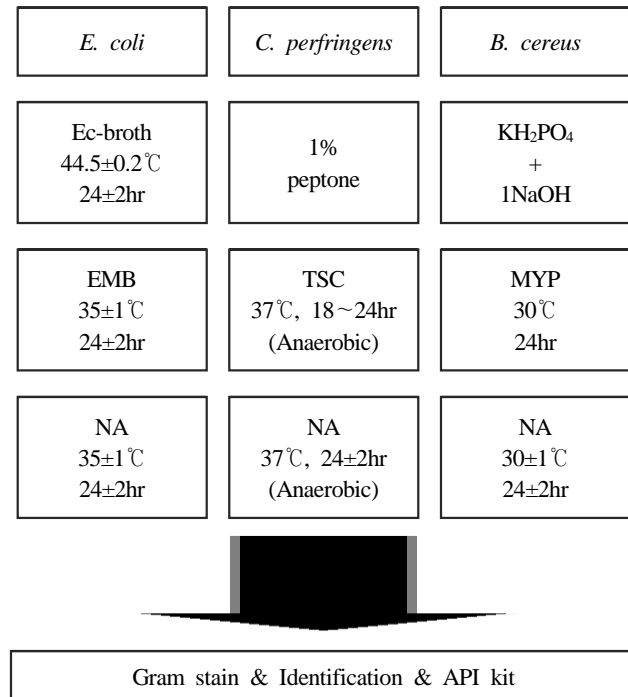


Fig. 1. Experimental procedure for isolation and identification of *E. coli*, *C. perfringens*, and *B. cereus* from commercial Saengshik products.

EMB: Eosin methylene blue agar, NA: Nutrient agar, TSC: Tryptose sulphite cycloserine agar, MYP : Mannitol egg yolk polymyxin agar.

1) 대장균(*Escherichia coli*)

검체 10 g을 취하여 멸균생리 식염수 225 mL와 혼합하여 시료로 사용하였다. 전처리된 한 검체를 3개의 EC broth(Difco, NJ, USA) 시험관에 접종하여 44.5±0.2℃, 24±2시간 동안 배양하였다.

2) 클로스트리디움 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*)

검체 25 g을 취하여 0.1% 펩톤 용액 225 mL와 혼합하여 시료로 사용하였다. 전처리된 검체를 tryptose sulphite cycloserine agar(TSC, Oxoid, England)와 잘 혼합하고 응고시킨 후, 35℃에서 20±2시간 동안 혐기 조건하에 배양하였다. 전형적인 검은색 집락 평판을 선별한 다음 집락수를 계수하였고, 생화학 테스트를 실시하였다. TSC에 검출된 균을 nutrient agar(NA, Difco, NJ, USA) 접종하고 37℃에서 18~24시간 혐기 배양을 하였다. NA agar에서 배양된 균을 이용하여 Gram 염색, API 20A kit(Biomerieux, France)를 사용하여 최종 동정하였다.

3) 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*)

검체 25 g을 취하여 인산 완충 희석액 225 mL와 혼합하여 시료로 사용하였다. 전처리된 검체를 mannitol egg yolk polymyxin agar(MYP, Merck, DARMSTADT Germany)에 0.2 mL 씩 취하여 유리봉을 사용하여 분산, 스며들게 하고 30℃에서 24시간 배양하였다. 전형적인 환이 있는 분홍색 집락 평판을 선별하여 집락수를 계수하였고, 생화학 테스트를 실시하였다. MYP에 검출된 균을 nutrient agar(NA, Difco, NJ, USA) 접종하여 30℃에서 24시간 배양하였고, NA agar에서 자란 균을 Gram 염색, API 20E, 50 CHB kit(Biomerieux, France)를 사용하여 최종 동정하였다.

3. 그람염색(Gram Stain)

세균의 세포를 slide glass 위에서 도말, 건조, 고정하여 crystal violet 용액으로 1분간 염색하고, 염색액을 물로 세척한 후 Logol solution으로 1분간 매염한 후, 다시 물로 5초간 세척하였다. 95% 알코올 용액으로 20초간 탈색, 세척한 후 safranin 액으로 20초 정도 염색한 후, 다시 세척하고 수분을 제거한 후 현미경으로 관찰하였다.

4. 생화학적 특성(Identification Characteristics)

Tryptose sulphite cycloserine agar와 mannitol egg yolk polymyxin agar에서 검출된 균을 각 확인 시험 방법에 따라 생화학 특성 시험을 실시하였다. Gifu anaerobic medium(GAM, Eiken, Tokyo, Japan)과 sulfate indole motility(SIM, Merck, Darmstadt, Germany)를 이용해 운동성의 유무를 확인하였고, 1% 가한 당 분해용 배지를 이용해 당의 분해 유무를 확인하

였다. Catalase test는 slide glass에 균을 도말하고 3% H₂O₂를 한 방울 떨어뜨린 후 기포의 생성 여부로 인해 catalase 생성능을 확인하였다. MYP agar에서 검출된 균은 peptone from casein 2.0%, yeast extract 1.0%, sodium chloride 0.5%, di-potassium hydrogen phosphate 0.2%, bromothymol blue 0.08%, agar-agar 2.5%를 함유한 배지에 glucose, lactose, inositol, raffinose, mannitol, maltose, ribose를 각각 1%가 되도록 첨가하여 30°C, 48시간 호기성 배양을 하였고, TSC agar에서 검출된 균은 GAM(Gifu anaerobic medium) 당 분해용 반유동 배지에 glucose, lactose, inositol, raffinose를 각각 1% 첨가하여 혐기 jar에 넣어 37°C에서 24~48시간 배양하여 당 분해 여부를 관찰하였다.

결과 및 고찰

1. 생식제품의 미생물 오염도

112점의 생식제품의 분석 결과 *E. coli*는 검출되지 않았으나, *C. perfringens*는 11제품(9.8%), *B. cereus*는 25제품(22.3%)에서 검출되었다(Table 2). *C. perfringens*는 10² CFU/g 이하로 검출되었으며, *B. cereus*는 100 CFU/g 이하는 5제품, 10²~10³ CFU/g은 7제품, 10³~10⁴ CFU/g은 13제품에서 검출되었다(Table 3). *B. cereus*는 자연계에 포자로서 널리 분포하며, 곡류, 야채 등에서 많이 검출되고 있다. *B. cereus*는 시판 생식의 규격인 10³ CFU/g을 13제품이 초과하였다. Notarmans & Batt(1998)는 *B. cereus*가 식중독을 일으킬 수 있는 균수는 최소한 10⁷ CFU/g 이상으로 보고하였으며, 본 연구의 결과로는, 사용된 생식제품은 *B. cereus*로 인한 식중독 유발 가능성은 낮은 것으로 판단되나, 일부 생식은 식품공전의 규격 기준은 충족시키지 못하였다.

2. 생식 제조사별 위해 미생물 검출 정도

A업체 22제품 중 *B. cereus*와 *C. perfringens*는 각각 6제품(27.2%)에서 검출되었고, B업체 26제품 중 *B. cereus* 6제품(23%)과 *C. perfringens* 4제품(15%)에서 검출되었다(Table 4). C업체는 10제품 중 *B. cereus* 8제품(80%)으로 9개 업체

Table 2. The prevalence of forborne pathogens in commercial Saengshik products

| Bacteria | Number of detected samples | Detection rate(%) |
|-----------------------|----------------------------|-------------------|
| <i>E. coli</i> | 0 | 0.0 |
| <i>C. perfringens</i> | 11/112 | 9.8 |
| <i>B. cereus</i> | 25/112 | 22.3 |

Table 3. Viable counts of *E. coli*, *B. cereus* and *C. perfringens* in commercial Saengshik products

| Count (CFU/g) | Bacteria | | |
|----------------------------------|----------------------------|-----------------------|------------------|
| | Number of detected samples | | |
| | <i>E. coli</i> | <i>C. perfringens</i> | <i>B. cereus</i> |
| < 100 | - | 11 | 5 |
| 10 ² ~10 ³ | - | 0 | 7 |
| 10 ³ ~10 ⁴ | - | 0 | 13 |

중 가장 높은 검출을 보였고, *C. perfringens*는 1제품(10%)에서만 검출되었다. D, H, I업체 생식 제품에서는 *B. cereus*와 *C. perfringens*가 검출되지 않았으며, E, F, G업체에서는 *B. cereus*만 검출되었으며, 각각 12건 중 1건(8.3%), 10건 중 2건(20%), 14건 중 2건(14.3%)에서 검출되었다.

3. 그람염색

TSC agar와 MYP agar에서 검출된 균을 NA agar에 옮겨 각각 35°C에서 혐기적 배양을 하고, 30°C에서 호기적 배양을 한 후 그람염색을 하였다. 현미경(Nsb-50t, Samwon, Korea)을 이용해 그람양성, 간균으로 확인되었다(Fig. 2). MYP agar에서 NA agar로 옮긴 균은 회백색의 거친 조면형을 보였는데, Kang(2007)의 연구에서도 영양한천배지에서 증식된 *B. anthracis*(sterne 34-F2, Pasteur No.2, ATCC 14185, ATCC 14186) 집락과 *B. cereus*는 모두 회백색의 거친 조면형을 나타내었고, 그람염색에서 양성을 보였으며, 전형적인 간균의

Table 4. Viable counts of *B. cereus* and *C. perfringens* in commercial Saengshik products by manufacturers

| Bacteria | Test | Manufacturer | | | | | | | | |
|-----------------------|------|------------------------------------|-------|-------|------|--------|-------|---------|------|------|
| | | No. of detection/detection rate(%) | | | | | | | | |
| | | A | B | C | D | E | F | G | H | I |
| Total samples | | 22 | 26 | 10 | 2 | 12 | 10 | 14 | 10 | 6 |
| <i>B. cereus</i> | | 6(27.2) | 4(15) | 1(10) | 0(-) | 0(-) | 0(-) | 0(-) | 0(-) | 0(-) |
| <i>C. perfringens</i> | | 6(27.2) | 6(23) | 8(80) | 0(-) | 1(8.3) | 2(20) | 2(14.3) | 0(-) | 0(-) |



Fig. 2. Gram stain on tryptose sulphite cycloserine agar and mannitol egg yolk polymyxin agar.

A: *Clostridium perfringens* - Gram positive

B: *Bacillus cereus* - Gram positive

형태를 나타내었다고 보고되었다.

4. 생화학적 특성 확인 시험

TSC agar와 MYP agar에서 검출된 균을 생화학적 특성 시험을 실시하였다(Table 5 and 6). TSC agar에서 검출된 균은 GAM 배지에 접종하고, MYP agar에서 검출된 균은 SIM 배지에 균을 접종하여, 각각 30℃와 35℃에서 24시간 배양하여 운동성(motility)을 확인하였다(Fig. 3). TSC agar에서 검출된 균은 motility 음성을 보였고, MYP에서 검출된 균은 양성을 보였다. 그리고 Kovac's solution 시약을 사용한 indole 생성에서는 모두 음성이었다. Hwang(2008)의 연구에서도 다양한 식품에서 분리된 351개 *B. cereus*의 motility를 시험한 결과 81%가 양성, 19%가 음성으로 확인되었다고 보고되었다. TSC agar에서 검출된 균은 catalase 음성을 보였고, MYP agar에서 검출된 균은 catalase 양성을 보였다. Citrate 배지를 사용하여 TSC

Table 5. Biochemical characteristics of the isolated microorganisms from commercial Saengshik products on TSC Agar

| Characteristic reaction | Result | Reaction | Result |
|-------------------------|-----------------|----------|-----------------|
| IND | - ¹⁾ | RAF | + ²⁾ |
| MAL | + | GEL | + |
| MAN | - | INO | + |
| GLU | + | SOR | + |
| LAC | + | CAT | - |
| MOT | - | URE | - |

¹⁾ (-) negative.

²⁾ (+) positive.

IND=indole, MAL=maltose, MAN=mannitol, GLU=glucose, LAC=lactose, MOT=motility, RAF=raffinose, GEL=gelatin, INO=inositol, SOR=sorbitol, CAT=catalase, URE=urea.

agar, MYP agar에서 검출된 균이 citrate 음성으로 확인되었고, egg-yolk lecithinase test에서는 진한 하얀색 환이 균 주변에 생기므로 egg-yolk의 지질을 분해할 수 있는 lecithinase를 가지고 있는 것으로 확인되었다(Fig. 4). Glucose 당 분해에서는 TSC agar와 MYP agar에서 검출된 균 모두 양성을 보였고, raffinose 당 분해에서는 TSC agar에서 검출된 균은 양성을 보였으며, MYP agar에서 검출된 균은 음성을 보였다. 식품공전에서는 *C. perfringens*의 확인 시험 단계에서 glucose, lactose, inositol과 raffinose를 분해하며 운동성이 없는 집락을 양성으로 판정하고 있다(식품의약품안전청, 2008b). Kim(2008)의 연구에서는 식품에서 분리한 *B. cereus* 257균주를 대상으로 glucose, maltose, ribose에 대한 생식제품의 생화학적 성상을 살펴본 결과, 총 269 균주가 glucose, maltose를 모두 분해하였고, 90% 이상의 균주가 ribose를 분해하였다고 보고되었으며, 본 연구의 MYP agar에서 분리한 당 분해 실험과 유사한 결과를 보여주었다. Kang(2007)과 Seki *et al* (1978)은 생화학 테스트나 PCR 등 한 가지 방법만으로는

Table 6. Biochemical characteristics of the isolated microorganism from commercial Saengshik samples products on MYP agar

| Reaction | Result | Reaction | Result |
|----------|-----------------|----------|-----------------|
| LAC | - ¹⁾ | CAT | + ²⁾ |
| RIB | + | MAN | - |
| GLU | + | CIT | - |
| INO | - | RAF | - |
| MAL | + | FRU | + |
| SOR | + | GEL | + |

¹⁾ (-) negative.

²⁾ (+) positive.

LAC=lactose, RIB=ribose, GLU=glucose, INO=inositol, MAL=maltose, SOR=sorbitol, CAT=catalase, MAN=mannitol, CIT=trisodium citrate, RAF=raffinose, FRU=fructose, GEL= gelatin.



Fig. 3. Motility test on tryptose sulphite cycloserine agar and mannitol egg yolk polymyxin agar.

A: *C. perfringens* - Motility(negative)

B: *B. cereus* - Motility(positive)



Fig. 4. Lecithinase activity on tryptose sulphite cycloserine agar and mannitol egg yolk polymyxin agar.

A: CPA(*Clostridium perfringens* agar).

B: MYP(Mannitol egg yolk polymyxin agar).

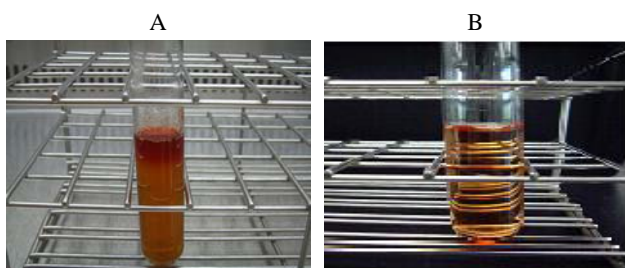


Fig. 5. Raffinose reaction on tryptose sulphite cycloserine agar and mannitol egg yolk polymyxin agar.

A: Gifu anaerobic medium test raffinose(positive).

B: Carbohydrate fermentation test raffinose(negative).

B. cereus group의 구분이 어렵다고 보고하였다. 이는 식품공전 (2008b) 8. 미생물 시험법의 *B. cereus* 확인 시험으로 제시되어 있는 생화학 테스트만으로는 *B. cereus*를 최종 동정할 수 있는 것과 배치되어 보다 심도있는 논의가 필요하다고 사료된다.

요 약

시판되는 112점의 생식제품에서 대장균(*Escherichia coli*), 클로스트리디움 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*), 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*) 등의 오염 미생물을 분석하여 식품공전 기준·규격에 적합한지를 알아보았다. *E. coli*는 모든 생식제품에서 검출되지 않았다. *C. perfringens*는 11제품(9.8%)에서 검출되었고 10^2 CFU/g으로 기준·규격에 적합하였다. *B. cereus*는 25제품(23.3%)에서 검출되었고, 5제품에서 10^2 CFU/g 이하, 7제품에서 $10^2 \sim 10^3$ CFU/g, 13제품에서 $10^3 \sim 10^4$ CFU/g으로 검출되었다. 이 분리 세균은 전형적인 특성을 보이고 있었는데 TSC agar, MYP agar에서 검출된 균은 그람 양성 및 간균이었으며, 생화학 테스트 결과 egg-yolk의 지질을 분해할 수 있는 lecithinase를 가지고 있는 것으로 확인되었다. 그러므로 유통되고 있는 생식 제품의 일부는 식품공전의 기준 규격을 초과하는 *B. cereus*가 검출되어 보다 더 철저

한 세균 제어 관리가 필요하다고 사료된다.

문 헌

- 식품의약품안전청 (2005) 식품공전. 20-19 생식류.
 식품의약품안전청 (2008a) 식품공전. 29-15. 생식류.
 식품의약품안전청 (2008b) 식품공전. 제 10. 일반시험법.
 Chang TE, Moon SY, Lee KW, Park JM, Han JS, Song OJ, Shin S (2004) Microflora of manufacturing process and final products of *Saengshik*. *Kor J Soc Food Sci Technol* 36: 501-506.
 Cho JI, Park YC, Ko SI, Cheung CY, Lee SM, Cho SY, Lee KH, Lim CJ, Kim OH (2008) Investigation of pathogenic microorganism from *Saengsik*-classes. *Kor J Food Hyg Safety* 23: 257-263.
 Chung SS, Han YS (2003) Consumer's recognition, nutrient composition and safety evaluation of commercial *Sunsik* and *Saengsik*. *Kor J Food Culture* 18: 235-243.
 Hwang JY (2008) Biochemical characteristics and enterotoxin gene distribution of food-borne *Bacillus cereus*. *MS Thesis* Kyungwon University, Seongnam. p 107-108.
 Kang SH (2007) Usefulness of bacteriological and biochemical tests within *Bacillus cereus* group. *MS Thesis* Chung-Ang University, Seoul. p 42-51.
 Kim HZ, Kim YA, Lee DX, Paix HD (2003) Isolation and identification of pathogenic bacteria from spinach. *Kor J Soc Food Sci Technol* 35: 97-102.
 Kim JY (2006) Survey of consumer recognition about the custom-made eating uncooked food-The five elements constitution eating uncooked food. *MS Thesis* Kyonggi University, Seoul. p 44-45.
 Kim MG (2008) Characterization of *Bacillus cereus* isolated from foods and food safety control. *Ph D Dissertation* Pusan National University, Pusan. p 123-125.
 Kwak HS, Whang IK, Park JS, Kim MG, Lee KY, Gho YH, Bae YY, Moon SY, Byun JS, Kwon KS, Woo GJ (2006) Quantitative evaluation of foodborne pathogenic bacteria in commercial *Sangshik*. *J food Hyg Safety* 21: 41-46.
 Notarmans S, Batt C (1998) A risk assessment approach for foodborne *Bacillus cereus* and its toxin. *J Appl microbiol Symp* 84: 51S-61S.
 Seki T, Chung C, Mikami H, Oshima Y (1978) Deoxyribonucleic acid homology and taxonomy of the genus *Bacillus*. *Int J Syst Bacteriol* 28: 182-189.
 (2009년 10월 10일 접수, 2009년 10월 26일 채택)