

과일 주스에서 분리 *Alicyclobacillus*의 열 저항성

오 세 종*

전남대학교 동물자원학부

Heat Resistance of *Alicyclobacillus* isolated from Fruit Juices

Sejong Oh*

Division of Animal Science, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea

*Corresponding author: soh@chonnam.ac.kr

ABSTRACT

Heat resistant bacteria should be controlled by the food industry because they can spoil products. *Alicyclobacillus*, in particular, can survive acidic conditions. Also, this bacteria has high heat-resistance that allows them to survive in the hot-filling process of juice production. The purpose of this study was to investigate the heat resistance of *Alicyclobacillus* JNU1, JNU2, and JNU3 strains that were isolated from fruit juice. Heat resistance and D value among the three strains showed various results due to the difference of initial number of bacteria in each strain. While JNU3 and JNU1 showed similar results, the heat resistance and D value of JNU2 was the highest amongst the three strains. This result may help reduce the spoilage of commercial pasteurized fruit juice because the juice industry can inhibit the growth of heat resistant bacteria such as *Alicyclobacillus*.

Additional key words: Heat resistance, Fruit juice, Spoilage, *Alicyclobacillus*

서 론

식품 제조 공정 중 살균 공정은 가장 중요한 공정 중의 하나로서 식품의 안정성과 저장성을 향상시키기 위하여 보편적으로 사용된다. 살균 공정에 따라 영양소 파괴, 이화학적 및 관능적 특성의 변화 등이 유발되기 때문에 살균 온도와 살균 시간은 많은 예비실험을 통하여 결정된다. 일반적으로 식품 중에 존재하는 부패성 미생물이나 병원성 미생물은 pH를 4 이하로 조정하거나 온도를 85~95℃ 정도 까지 상승시킴으로써 이들 세포가 불활성화 된다.

그러나 Splittstoesser 등 (1994)은 pH 3.7 이하에서 85~95℃의 온도로 살균하는 공정에서도 내생 포자를 형성하여 사멸하지 않고 식품 안에서 생존할 수 있는 미생물이 존재한다고 보고하였다.

*Alicyclobacillus*는 토양에 존재하는 세균으로 1984년 살균된 사과 주스의 부패균으로 최초로 보고되었다. *Alicyclobacillus*로 명명되기 전에는 포자형성 박테리아의 새로운 형태 종류로 내산성인 *Bacillus* 종으로 확인되어 *Bacillus acidoterrestris*라고 명명되었다. 그 후 세포막의 지방산 성분으로 주로 ω-allyclic 지방산을 가지고 있어 *Alicycloba-*

*cillus*라고 재분류되었다(Deinhard 등, 1987; Witsotzkey 등, 1992; Splittstoesser 등, 1992; Yamazaki 등, 1996).

*Alicyclobacillus*는 운동성의 포자형성 간균이며 호기성이고 종속영양생물이며, 25~60℃, pH 2.5~6.0 범위에서 자라는 특징이 있다. 또한 *Alicyclobacillus*는 0.6~6.0 μm의 다양한 크기이며 20~50℃ 또는 60℃에서 선택배지에 배양을 하면 자라는 고온성균으로 세포의 모양은 *Bacillus circulans*의 특징처럼 가느다랗고 길며, 포자는 팽창되어 부풀어진 모양이다(Splittstoesser 등, 1994; Eiroa 등, 1999).

*Alicyclobacillus*는 90℃에서 D value가 15~16분에서 23분이고, 95℃에서 D value가 2.4~2.8분 정도로 알려져 있는데, 이는 86~96℃에서 2분간 처리하는 hot-filling process의 경우 이 미생물이 사멸하지 않고 생존할 수도 있음을 의미한다(Splittstoesser 등, 1997)

과일 주스나 과일이 첨가된 음료는 제품의 pH가 상대적으로 낮기 때문에 열 처리를 하지 않은 신선한 상태나 고온 처리가 아닌 살균 처리를 한 상태에서 제조된다. 또한 냉장 저장을 하지 않는 과일 주스의 경우에는 유통기한이 길어 저장 중 *Alicyclobacillus*가 자라게 되어 off-flavor로 인한 제품의 품질에 나쁜 영향을 준다, 이와 같은 결과로 사과, 복숭아, 포도 및 배 주스 등을 생산하는 공장에 많은 피해를 끼친다.

따라서 본 연구에서는 과일 주스의 부패균으로 알려진 *Alicyclobacillus*를 시판 중인 과일 주스에서 분리하여, 열처리에 대한 저항성을 평가하고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. *Alicyclobacillus*의 분리

본 실험에 사용된 *Alicyclobacillus*를 과일 주스에서 분리하기 위하여 과일 주스 100 mL를 Whatman 0.45 μM sterile membrane filter를 이용하여 여과한 다음 filter에 남은 과일 주스의 잔여물을 filter와 함께 각각 potato-dextrose agar에 10% Tartaric acid를 넣어 pH 3.7로 제조한 배지에 증충하여 45℃에서 약 5일간 배양하여 집락을 선별하였

다. 증균용 배지로는 Yeast Extract 0.25 %, Peptone 0.5 %, Glucose 0.1%, Tween80 0.1%, Agar 1.5%를 첨가하여 제조한 배지에 10% CaCl₂ 0.5%를 넣고 멸균된 10% Tartaric acid를 넣어 pH 4.0으로 조정하여 사용하였다.

2. *Alicyclobacillus* 동정

얻어진 집락을 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology에 따라 호기성, 그람 염색, KOH test, 포자 염색을 통한 내포 형성 유무 등을 조사하였으며 API 50 CHB carbohydrate test kit (Bio Merieux, France)를 이용하여 당 발효성을 조사하였고, 최종적으로 Vitek2 compact(Lab equipment bioMerieux, USA)를 이용하여 확인하였다.

3. 열 저항성 확인

전남대학교 동물자원학부 미생물공학 실험실에 보관되어 있는 *Alicyclobacillus* JNU1과 JNU2 균주와 과일 주스에서 분리하여 동정한 균을 PDA 액체배지 10 mL에 접종하여 45℃ 배양기에서 배양한 후 멸균된 튜브에 넣고 3,000 rpm에서 15분간 원심 분리하였다. 분리된 세포를 멸균 생리 식염수에 넣어 현탁시키고 70℃, 80℃, 및 90℃ 열처리를 한 다음 생균수를 평가하여 열저항성을 계산하였다.

결과 및 고찰

본 실험에 사용된 균은 전남대학교 동물자원학부 미생물공학 실험실에서 과일 주스에서 분리 보관 중인 미생물 3종에 대하여 Gram 염색, KOH test, 포자 형성 유무 등을 확인하였으며, 이들 미생물을 동정한 결과 전부 *Alicyclobacillus*로 동정되었다.

Fig. 1은 *Alicyclobacillus* JNU1 균주에 대하여 70℃, 80℃ 및 90℃에서 열저항성을 평가한 결과를 나타낸 것이다. 열처리 후 약 4~5 log CFU 감소를 보였으며, 열처리 시간이 1~2분 이후부터는 더 이상 사멸하지 않고 일정하게 유지되는 것으로 나타났다. *Alicyclobacillus* JNU1 균주는 열처리 온도에서 일정한 시간이 지나면 포자를 형성하는 것으로 판단되며, 전형적인 *Alicyclobacillus*의 특징을

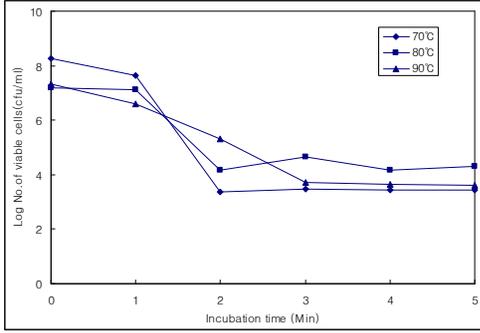


Fig. 1. Thermal resistance of *Alicyclobacillus* JNU1 at heating temperature of 70°C, 80°C, 90°C.

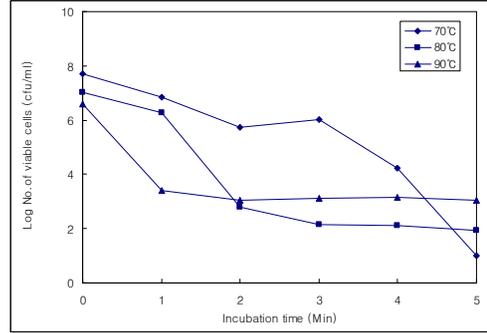


Fig. 3. Thermal resistance of *Alicyclobacillus* JNU3 isolated from fruit juice at heating temperature of 70°C, 80°C, 90°C.

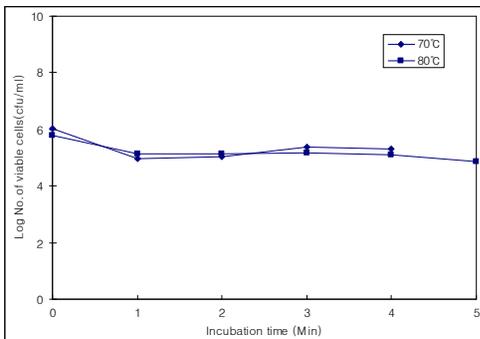


Fig. 2. Thermal resistance of *Alicyclobacillus* JNU2 at heating temperature of 70°C, 80°C.

나타내고 있는 것으로 확인되었다. *Alicyclobacillus* JNU2 균주는 *Alicyclobacillus* JNU1 균주보다 열 저항이 높은 것으로 나타났는데, 80°C 열처리에서 5분까지 약 1 log CFU 정도만 감소하였다(Fig. 2).

Fig. 3은 *Alicyclobacillus* JNU3 균주에 대한 열 저항성을 평가한 것으로 열처리 1분까지는 저항성이 높게 나타났지만, 2분 이상의 열처리시에는 급격하게 사멸하는 것으로 나타났다. *Alicyclobacillus* JNU3는 0~2분 사이에 사멸하는 속도가 빨랐으나, 3~4분 사이에 조금 더 완만하게 그 속도가 감소하였고, 열처리 4분 이후에는 *Alicyclobacillus* JNU1 과 같이 포자를 형성하여 그 이상의 사멸이 나타나지 않고 일정한 수준을 유지하였다.

Pontius 등(1998)과 Eiroa 등(1999)은 *Alicyclobacillus*의 세포가 과일 주스에 존재하는 다른 미생물 즉, 유산균이나 효모보다 더 강한 열처리가 요구된다고 하였는데, 그 이유는 이들보다 높은 열

저항성 포자를 형성하기 때문이라고 보고하였다.

Table 1은 *Alicyclobacillus* 3균주에 대하여 70°C, 80°C 및 90°C에서 열 저항성을 측정하고, 그에 따른 회귀식을 구한 다음에 D value를 계산한 것이다. *Alicyclobacillus* JNU1은 70°C에서 D value가 1.9분, 80°C는 2.1분, 90°C에서 1.9분으로 각각 계산되었고, *Alicyclobacillus* JNU2는 70°C에서 D value가 4.7분, 80°C는 6.5분으로 조사되었다. *Alicyclobacillus* JNU3의 D value는 70°C에서 2.3분, 80°C는 1.4분, 90°C에서 0.1분으로 각각 계산되었다. Komitopoulou 등(1999)은 pH가 3.51인 사과 주스에서 *A. acidoterrestris*의 D value는 90°C에서 7.4분, 5°C에서는 2.3분이라고 보고하였다.

Table 1. Comparison of D value of *Alicyclobacillus* strains isolated from fruit juice at heating temperature of 70°C, 80°C, 90°C

Strain	T(°C)	D value
JNU1	70	1.3
	80	2.1
	90	1.9
JNU2	70	4.7
	80	6.5
JNU3	70	2.3
	80	1.4
	90	0.1

Table 2. Comparison of KOH test, Gram staining, spore formation of *Alicyclobacillus* strains isolated from fruit juice

Strains	KOH test	Gram staining	Spore
JNU1	-	+	+
JNU2	-	+	+
JNU3	-	+	+

또한 Splittstoesser 등(1994)의 연구보고에 의하면 pH 3.50인 사과 주스에서 *A. acidoterrestris*의 D value가 90℃에서 23분, 95℃에서 2.8분이었다고 보고하였다.

Table 2와 Fig. 4는 *Alicyclobacillus* 3균주에 대한 형태학적 특징을 조사한 것이다. 실험 결과, 다른 내열성 bacilli와 유사한 특성을 지닌 것으로 확인되었으며, 이들 균주에 대한 정확한 동정은 추후 16s rDNA 분석을 통하여 밝혀져야 할 것이다.

요 약

실험에서 과일 주스의 부패균으로 알려진 *Alicyclobacillus*와 판매 중인 과일 주스에서 분리된 균의 열에 대한 저항성을 알아보고, 각기 다른 온도에서 *Alicyclobacillus*의 열저항성을 조사하고자 실시하였다. 과일 주스에서 분리된 균을 Bergey's manual of Systematic Bacteriology에 따라 호기성, 그람 염색, KOH test, 포자형성 유무를 관찰하여 최종 3종을 선발하였다. 선발된 3종의 포자형성 미생물에 대하여 70℃, 80℃, 90℃에서 열 처리를 한 후에 균 수를 측정하여 열 저항성을 평가하였

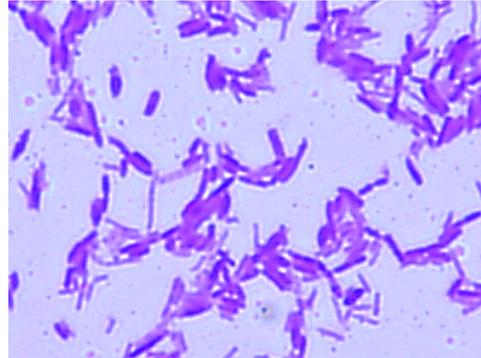


Fig. 5. Cell morphology of *Alicyclobacillus* JNU2.

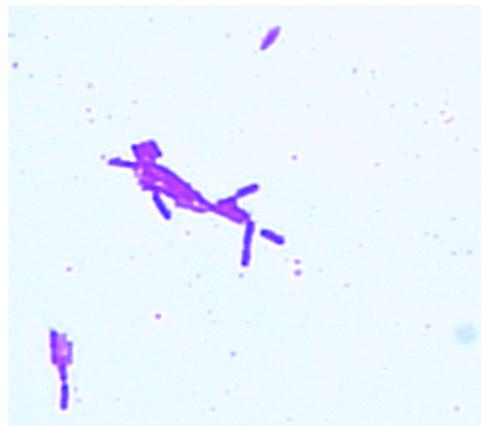


Fig. 6. Cell morphology of *Alicyclobacillus* JNU3.

다. *Alicyclobacillus* JNU2가 가장 열 저항성이 높았고, *Alicyclobacillus* JNU1과 JNU3 균주는 유사한 열저항성을 보였다. 그러나 일정 시간이 지나면 세 균주 모두 포자를 형성하여 균주의 사멸이 더 이상 일어나지 않는 tailing이 일어나는 것을 확인 할

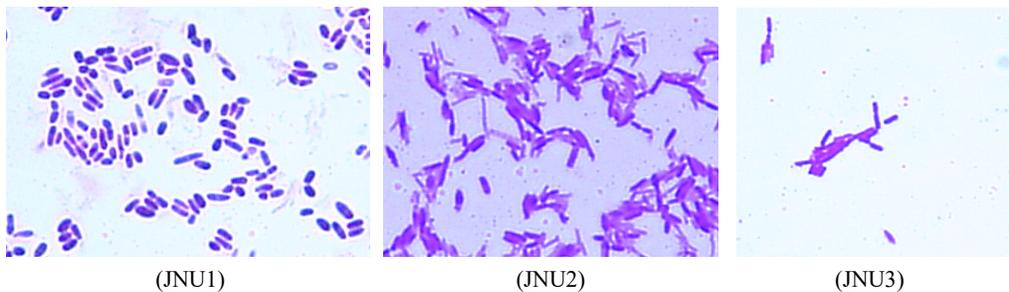


Fig. 4. Cell morphological characteristics of *Alicyclobacillus* strains isolated from fruit juice.

수 있었다.

참고문헌

1. Deinhard, G., Blanz, P., Poralla, K., and Altan, E. (1987) *Bacillus acidoterrestris* sp. Nov., a new thermotolerant acidophile isolated from different soils. System. Appl. Microbiol. 10: 47-53.
2. Eiroa, M. N. U., Junquera, V. C. A., and Schmidt, F. L. (1999) *Alicyclobacillus* in orange juice: occurrence and heat resistance of spore. Journal of Food Protection 62: 883-886.
3. Filipa M. Silva, Paul Gibbs, Margarida C. Vieira, and Cristina L. M. Silva. (1999) Thermal inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores under different temperature, soluble solids and pH conditions for the design of fruit processes. International Journal of Food Microbiology. 51:95-103.
4. Komitopoulou, E., Boziaris, I. S., Davies, E. A., Delves-Broughton, J., and Adams, M. R. (1999) *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices and its control by nisin. International J. Food Sci. Technol. 34:81-85.
5. Komitopoulou, E., Boziaris, I. S., Davies, E. A., Delves-Broughton, J., and Adams, M. R. (1999) *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices and its control by nisin. International Journal of Food Science and Technology. 34: 81-85.
6. Pontius, A. J., Rushing, J. E., and Foegeding, P. M. (1998) Heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores as affected by various pH values and organic acids. J. Food Protect. 61:41-46.
7. Splittstoesser, D. F., Churey J. J., and Lee, C. Y. (1994) Growth characteristics of aciduric spore forming bacilli isolated from fruit juices. J. Food Protect. 57:1080-1083.
8. Splittstoesser, D. F., Lee, C. Y., and Churey, J. J. (1997) Control of *Alicyclobacillus* in the juice industry. Dairy, Food and Environmental Sanitation. 18:585-587.
9. Splittstoesser, D. F., Churey, J. J., and Lee, C. Y. (1994) Growth characteristics of aciduric spore forming bacilli isolated from fruit juice. Journal of Food Protection. 57: 585-587.
10. Thompson, P. J. (1981) Thermophilic organisms involved in food spoilage: Aciduric flat-sour spore forming aerobes. J. Food Protect. 44:154-156.
11. Wisotzkey, J. D., Jurtschuk Jr, P., Fox, G. E., Deinhard, G., and Poralla, K. (1992) Comparative sequence analyses on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a New Genus, *Alicyclobacillus* gen. nov. International Journal of Systematic Bacteriology. 263-269.
12. Yamazaki, K., Teduka, H., and Shinano, H. (1996) Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from acidic beverages. Biosci. Biotech. Biochem., 60:543-545.