KOREAN J. FOOD SCI. ANI. RESOUR. Vol. 23. No. 4, pp. 327~332(2003)

ESL 생산공정에 따른 시유 유래 미생물의 분포 비교 연구

김웅률* · 정병문 · 유병희[1] · 정후길 · 강국희[1] · 전호남
매일유업㈜ 중앙연구소, [1]성균관대학교 생명공학부

Comparative Characterization of the Bacteria Isolated from Market Milk Treated with ESL and Conventional System

E. R. Kim*, B. M. Jung, B. H. Yu[1], H. K. Jung, K. H. Kang[1] and H. N. Chun
R&D Center, Maeil Dairy Industry Co., Ltd.
[1]*Faculty of Life Science and Technology, Sungkyunkwan University*

Abstract

This study was conducted to investigate the characteristics of strains which were isolated from market milk treated with ESL(extended shelf life) and conventional system, and to compare the microbiological quality of ESL milk with conventional milk. In order to characterize the isolated strains, purification, Gram staining, spore staining, catalase, oxidase, motility test, and identification by means of automatic identificator were performed. The results obtained are as follows: total 364 selected strains were analyzed in this study. Depending upon the isolated source, the number of strains from conventional milk was found to be higher than ESL-milk. By means of grouping of total strains, *Bacillus* ssp. and *Staphylococcus* ssp. showed to be predominant. But most of strains were distributed with various groups except *Lactobacillus* ssp. When the isolates were compared with milk process methods, *Enterococcus* ssp. was detected much on market milk treated with LTLT pasteurization. Also, *Pseudomonas* ssp. was detected much on conventional milk treated with UHT pasteurization. By comparison with genus groups depending upon storage temperature of market milk, the higher milk storage temperature increased, the most frequency detected *Bacillus* ssp. increased. Also, *Pseudomonas* ssp. was detected most frequently at 10℃ storage condition. Generally this genus derived from post-contamination during milk processing and related to the quality of market milk during chilled system. In conclusion, it was shown that ESL system reduced post-contamination during milk process, following the improvement of product quality and life cycle during the distribution of market milk.

Key words : ESL, extended shelf life, microbiological quality, strains identification

서 론

우유의 품질은 풍미, 미생물학적 품질, 외래물질의 혼입, 영양학적 품질 및 환경 오염물질의 유입 등과 같은 요인에 의해서 영향을 받는다(Harding, 1995). 이중에서 미생물학적 품질은 우유의 풍미와 안전성에 커다란 영향을 주기 때문에 상품성의 결정에 매우 중요하고, 우유의 저장 가능기간을 법적으로 결정하는 가장 중요한 인자이다(Lee 등, 2001). 또한 미생물학적 품질이 낮은 우유에는 식중독 세균이 분비한 독소가 함유될 수 있을 뿐만 아니라, 식중독 세균이 검출될 가능성이 높기 때문에 공중위생의 위해 요인이 된다(Choi, 2001).

살균 후의 오염이란 살균된 우유가 열교환기의 냉각부, 파이프, 완충탱크 및 충전기에 의한 원유의 혼입, 또는 부적절한 세척과 살균된 기계에 의해서 표면에 증식하는 세균의 혼입 및 포장라인의 대기환경에 존재하는 세균의 혼입 등에 의한 2차 오염을 말한다. 2차 오염에 의해서 유입된 미생물은 초기에는 매우 적게 존재하더라도 유통 중의 부적절한 냉장보존조건에 의해서 신속한 성장이 가능하기 때문에 우유의 부패 요인이 된다. 원유의 살균 및 포장 도중에 2차로 오염되

* **Corresponding author** : Eung-Ryool Kim, R&D Center, Maeil Dairy Industry Co., Ltd., 480 Gagok-ri, Jinwi-myun, Pyungtaek-si, Kyonggi-do 451-861, Korea. Tel: 82-31-660-9144, E-mail: eungryool@maeil.com

는 미생물 중에서는 *Pseudomonas* 계통의 세균이 제일 중요하며, 이러한 균종은 냉장 유통과정에서 일반세균 중에서 차지하는 비율이 상당히 높아져 우유의 보존성을 저하시키는 원인이 된다(Durr, 1975; LaGrange, 1961).

이러한 내냉성 미생물은 유통 중에 생장하여 제품의 풍미를 떨어뜨리거나, 부패를 일으킬 수 있다. 아울러 원유에 오염된 내냉성 미생물이 생성한 내열성 효소는 살균 처리에 의해서도 불활성화되지 않고 살균유에서 활력을 유지하면서 우유 성분을 분해하여 제품의 풍미와 품질을 저하시킬 수 있다.

만일 2차로 오염되는 *Pseudomonas* 균종의 오염을 완전히 차단할 수 있다면 우유의 냉장 유통기한을 상당히 연장할 수 있다는 증거가 제시되고 있다(Choi, 2001). 현재 원유에 이들 내냉성 미생물의 오염을 최소화하기 위해서 HACCP 체제에 대한 연구가 많이 이루어지고 있으며, 살균후 내냉성 미생물의 오염을 차단하기 위해서 무균포장 방법의 응용이 제시되고 있다.

ESL(Extended Shelf Life)이란 냉장유통 제품을 전통적인 살균법에 의한 제품보다 유통기한을 연장하는 체계를 말한다. 최근 ESL 기술에 대해서 전세계의 유업체가 관심을 가지게 되었으며, 미국과 캐나다에서 ESL 우유는 전통적으로 45~60일동안 냉장 유통되고 있다(Debra, 1999). 일본의 경우, 1994년에 PL법(제조물책임법)이 시행되고 1995년부터 HACCP 제도가 도입되면서 특히 PL법 대책의 일환으로서 HACCP 시스템을 도입하고 더욱 ESL화에 노력하였다(食品機械裝置, 1999). 우리나라에서도 2002년 7월 1일 PL법이 시행되었고, 국립수의과학검역원의 HACCP 적용업체 지정 등으로 우유에 대한 안전성이 요구되면서 매일유업㈜가 국내에서 처음으로 ESL우유를 생산하게 되었다.

ESL 처리 우유는 동일한 조건으로 열처리 과정을 거치는 것까지는 다른 우유와 동일하지만, 수유라인부터 충전에 이르기까지 세균의 오염 기회를 줄여 2차 오염원을 최소화하였다는 데에 그 차이가 있다. 이러한 2차 오염원을 최소화하므로서 미생물 오염에 의한 우유의 변질을 유통기한 중에 최소화할 수 있다는 것이다.

따라서 본 연구에서는 ESL 우유와 non-ESL 우유의 보존기간과 온도에 따른 제품수명을 조사하는 과정에서 순수분리하여 1차 예비 분류한 698 미생물 균주에 대해서 기초적인 특성 및 동정을 진행하여 균주의 균종별 분포를 확인함으로서 ESL우유와 기타 non-ESL우유의 균종 그룹별 차이점을 확인하는 데에 그 목적이 있다.

재료 및 방법

실험 설계(Fig. 1)

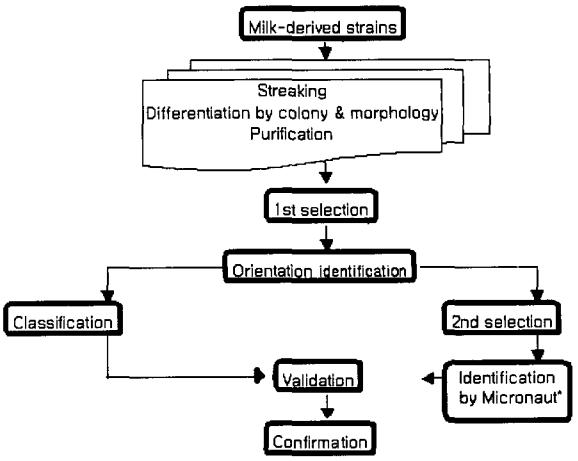

Fig. 1. Experimental design for classification of milk-derived strains. *Merlin, Germany.

실험 균주 및 순수분리

우유의 처리공정에 따른 보존온도 및 보존기간별 제품수명 비교 실험으로부터 순수분리된 전체 698 균주를 성균관대학교로부터 분양받아 기초동정 결과를 토대로 하여 1차적으로 372 균주를 집락 형태에 따라서 선별하였다. 이때 생존실험 결과, 2 균주는 사멸되었고 6 균주는 효모로 확인되어 최종적으로 364 균주로 실험을 진행하였다. 분리 균주의 생육배지로는 Nutrient agar를 사용하였으며, 35℃에서 48시간동안 배양하면서 단계별 실험에 이용하였다. 분리된 균주의 순수분리도를 확인하기 위해서 Nutrient agar(5% horse blood 함유)에 획선도말(streaking)하여 35℃에서 48시간동안 배양한 후에 형성된 집락의 단일화를 확인하였다. 또한 이러한 과정을 3회 반복하여 순수분리가 완전히 확인된 균주에 대해서 기초동정(orientation identification)을 진행하였다.

기초 동정

기초 동정을 위한 항목으로는 Gram staining, spore staining, catalase, oxidase와 motility test를 진행하였다. Gram staining은 slide glass에 멸균식염수 1방울을 떨어뜨린 후 여기에 집락을 도말 건조하여 염색한 후 현미경으로 검경하여 균상과 Gram 양성 및 음성을 판정하였다. Spore staining은 slide glass에 집락을 도말하여 뜨거운 스팀에 10분 동안 방치한 후, 상기의 Gram staining 방법과 동일하게 처리한 후 현미경으로 검경하여 포자형성 양성 및 음성을 판정하였다. Catalase test는 slide glass에 ID color catalase(bioMerieux, France) 시약 1방울을 떨어뜨린 후, 백금이로 집락의 일부를 넣었을 때 거품이 발생되면 양성으로, 무반응시에는 음성으로 판정하였다. Oxidase test는 slide glass 위에 filter paper 1조각을 올려 놓고, 그 위에 oxidase 시약(bioMerieux, France)을 1방울 떨어뜨린다. 그 다음 colony를 백금이로 따서 묻힌 후 1~2분내에 짙은 보라색

으로 변하면 양성으로 판정한다. Motility test는 M medium (BioMerieux, France) 시험관의 2/3 지점까지 일정하게 균체를 백금이로 찌른 것을 각 균주당 2개씩 실험을 진행하여 22~25℃와 35~37℃에서 각각 1시험관씩 24~48시간동안 배양한다. 배양 후 균체 성장선이 보이면 양성으로 판정하였다.

균주 분류 및 동정

순수 분리되어 기초동정까지 완료된 균주에 대한 그룹화는 집락 형태, 균상, 기초동정 결과를 토대로 하였으며, group 선정 기준표는 Table 1과 같았다. 기초 동정 특성에 따른 균주 분류에 의해서 선정된 8개 group, 24개 sub-group 균주 중에서 무작위 추출한 전체 54 균주에 대해서 자동화 미생물동정기인 Micronaut(Merlin, Germany)을 이용하여 동정을 진행하였다.

결과 및 고찰

우유 분리 미생물의 분류

전체 698 균주의 미생물 중에서 분리원, 집락 형태, 균상을 기준으로 하여 364 균주를 1차 선발하였으며, 이것에 대해서 2차적으로 집락의 형태, 균상 및 기초동정을 통해서 8개 그룹으로 분류한 결과는 Fig. 2에 나타냈다. 전체 기초 동정된 미생물 균종의 분포를 보면 *Bacillus* 계통을 의미하는 group A와 *Staphylococcus* 계통을 의미하는 group D가 가장 많은 분포를 가지는 것으로 밝혀졌다. 또한 그 다음으로 group B와 group F의 균종 분포가 높은 것으로 나타났는데, group B는 Gram 양성의 무포자 간균을 의미하며, group C를 제외한 대부분이 다양하게 분포하는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 분리원으로 이용된 시유의 보존온도와 기간이 다양하였기 때문에 2차 오염 및 잔존 미생물이 모두 검출된 것으로 사료된다.

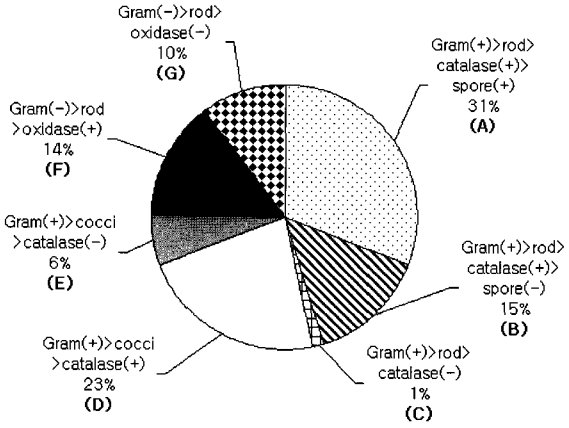

Fig. 2. Classification of milk-derived strains depending upon grouping.
(A) *Bacillus* ssp. (B) *Actinomyces* ssp.
(C) Lactic acid bacteria (D) *Staphylococcus* ssp.
(E) *Enterococcus* ssp. (F) *Pseudomonas* ssp.
(G) Coliform bacteria

회사별 우유 유래 미생물 균종의 분포

기초 분류된 미생물의 회사별 유래를 조사한 결과는 Table 2에 나타냈다. 1차 분리균주에 대한 회사별 분리 빈도는 ESL 우유 < b우유 < a우유 < c우유 < d우유의 순으로 나타났으며, 우유 품질과 역의 관계를 가지는 것으로 나타났다. 모든 UHT 살균유의 경우에 group E가 매우 낮은 반면에, LTLT 살균유에서는 특이적으로 group E의 미생물 분포가 높게 나타났다. 여기에서 group E는 주로 내열성이 강한 *Enterococcus* 계통이다. 또한 동일한 UHT 살균조건으로 열처리하는 우유

Table 1. Standard for grouping of the isolated strains

Group	Characteristics	Genus
A	Gram(+)>rod>catalase(+)>spore(+)	*Bacillus, Paenibacillus*
B	Gram(+)>rod>catalase(+)>spore(-)	*Listeria, Actinomyces, Brevibacterium, Corynebacterium*
C	Gram(+)>rod>catalase(-)	*Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus*
D	Gram(+)>cocci>catalase(+)	*Staphylococcus, Micrococcus*
E	Gram(+)>cocci>catalase(-)	*Aerococcus, Enterococcus, Lactococcus, Streptococcus*
F	Gram(-)>rod>oxidase(+)	*Acinetobacter, Aeromonas, Alcaligenes, Bordetella, Flavobacterium, Moraxella, Pseudomonas, Pasteurella, Vibrio, Campylobacter, Helicobacter*
G	Gram(-)>rod>oxidase(-)	*Escherichia, Enterobacter, Citrobacter, Salmonella, Shigella, Serratia, Proteus, Klebsiella, Yersinia* etc.
H	Gram(-)>cocci	*Neisseria, Haemophilus*

(cf) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(9th ed.).

Table 2. Classification of milk-derived strains depending upon the isolated source

Group	Total 364 strains	ESL 28	a 79	b 69	c 88	d 100
A	112	7	26	25	28	26
B	53	6	16	10	8	13
C	5	0	0	2	2	1
D	82	8	7	11	26	30
E	22	1	1	1	1	18
F	52	2	20	15	12	3
G	38	4	9	5	11	9

ESL: extended shelf life milk.
a, b, c: Conventional milk treated with UHT.
d: Conventional milk treated with LTLT.

제품의 경우에도 group F에서 ESL 우유와 기타 일반 시유의 분포 차이가 크게 나타났다. ESL 우유의 경우에는 group F가 전체의 7%에 불과하지만, 기타 non-ESL 우유의 경우에는 13~15%로 매우 높은 분포를 가지고 있다. 이러한 현상은 2차 오염의 주된 미생물이 Gram 음성 간균인 저온성 세균이라는 Choi(1999)의 보고와 일치하는 것으로 사료되었다.

보존온도별 우유 유래 미생물의 균종 분류

보존온도에 따른 우유 유래 미생물의 균종 분류는 Fig. 3에 나타냈다. *Bacillus* 계통인 group A의 경우는 우유의 보존온도가 높을수록 검출 빈도가 높은 것으로 나타났는데, 이러한 결과는 10℃에서 15일간 보존시에도 포자형성균이 검출되지 않았다는 Kwon 등(1998)의 보고와는 일치하지 않는 것으로 나타났다. *Pseudomonas*와 같은 내냉성 계통인 group F는 10℃에서 가장 높게 검출되다가 보존온도가 높아질수록 그 검출 빈도가 낮아지는 현상을 보였다. 또한 group B는 *Listeria* 또는 *Actinomyces* 계통으로서 보존온도가 높아질수록 그 검출 빈도가 낮아지는 것을 확인할 수 있었다.

우유 제조업체별로 검출된 보존온도에 따른 분리균주의 분포를 볼 때, ESL 우유는 모든 보존온도에서 전반적으로 낮은 분리균주수를 보였으며, a우유와 b우유는 보존온도가 높아질수록 분리균주수가 높게 나타났다. 또한 c우유와 d우유는 모든 온도에서 분리균주수가 높게 나타났다(Table 3). c우유와 d우유의 이러한 현상은 제품내 잔존 및 2차 오염균이 많이 존재하기 때문인 것으로 판단된다. 이것은 시유의 잔존 미생물이나 2차 오염 미생물의 정도에 따라서 유통 중 품질에 많은 차이가 나는 것을 간접적으로 나타내는 것으로서, McMeekin과 Ross(1996)의 주장과 같았다.

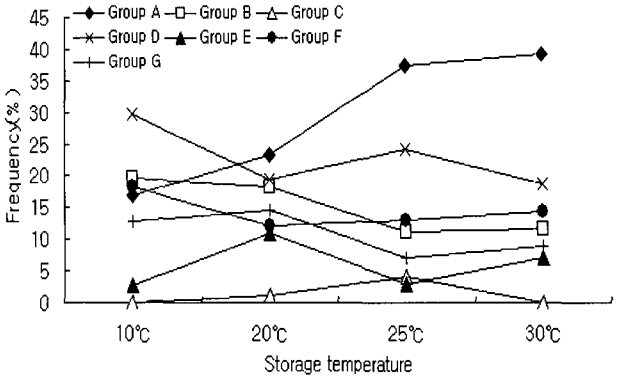

Fig. 3. Grouping of milk-derived strains depending upon milk storage temperature.
(A) *Bacillus* ssp. (B) *Actinomyces* ssp.
(C) Lactic acid bacteria (D) *Staphylococcus* ssp.
(E) *Enterococcus* ssp. (F) *Pseudomonas* ssp.
(G) Coliform bacteria

Table 3. Grouping of milk-derived strains depending upon the isolated source and milk storage temperature

	10℃	20℃	25℃	30℃	Total
ESL	6	2	8	12	28
a	15	14	20	30	79
b	5	21	21	22	69
c	24	16	24	24	88
d	21	29	26	24	100
Total	71	82	99	112	364

ESL: extended shelf life milk.
a, b, c: Conventional milk treated with UHT.
d: Conventional milk treated with LTLT.

미생물 동정기를 이용한 균주 분류 확인

전체 364 균주를 8개 group, 24개 sub-group으로 분류하였으며, 24개 sub-group에서 무작위로 추출한 54 균주에 대해서 미생물 동정기(Micronaut, Germany)로 본 동정을 진행하였다. 이때 얻어진 결과는 Table 4에 나타냈다. 동정 결과, 54 균주 중에서 4 균주만이 정상적인 group에 속하지 않는 것으로 밝혀졌으며, 이러한 결과를 토대로 다시금 기초동정 결과를 재수정하였다. 따라서 집락 형태와 균상에 의한 1차적 분류 후, 기초동정을 통하여 각각의 group A~H까지 분류하는 것은 그 정확도가 약 90% 이상인 것으로 밝혀졌다. 이러한 동정결과로 볼 때, ESL 우유와 일반 시유의 차이는 특이적 균종에 대한 오염방지 시스템이 아니라, 2차 오염을 비롯한 전반적인 우유 가공상의 미생물적 오염원의 최소화 차이인 것으로 확인되었다.

Table 4. Identification of milk-derived strains

Group	Source(strains)					Identification
	ESL	a	b	c	d	
A	7	26	25	28	26	*Bacillus* ssp. *Paenibacilllus macerans, Brevibacillus laterosporus*
B	6	16	10	8	13	*Listeria seeligeri, Corynebacterium matruchotii, Actinomyces dentocariosa, Aureobacterium* ssp., *Arthrobacter* ssp.
C	0	0	2	2	1	*Lactobacillus* ssp.
D	8	7	11	26	30	*Dermacococcus nishinomiyaensis, Micrococcus luterus, Staphylococcus* ssp.
E	1	1	1	1	18	*Enterococcus* ssp., *Streptococcus constellatus*
F	2	20	15	12	3	*Agrobacterium tumefaciens, Pseudomonas* ssp. *Alcaligenes denitrificans, Pasteurella multocida*
G	4	9	5	11	9	*Acinetobacter iwoffii, Citrobacter freundii, Klebsiella pneumoniae, Pantoea agglomerans, Serratia plymuthica*
Total	28	79	69	88	100	

ESL : extended shelf life milk.
a, b, c : Conventional milk treated with UHT.
d : Conventional milk treated with LTLT.
(A) *Bacillus* ssp. (B) *Actinomyces* ssp. (C) Lactic acid bacteria (D) *Staphylococcus* ssp.
(E) *Enterococcus* ssp. (F) *Pseudomonas* ssp. (G) Coliform bacteria

요 약

본 연구는 ESL 우유와 시중 4개 회사의 일반 시유 제품의 보존 검사에서 분리되어 1차적으로 선별된 364 균주에 대해서 균주 분류를 통하여 우유의 저장온도와 기간 중의 우유내 우세균을 확인하고 ESL 우유와 기타 일반 시유의 미생물 균종별 분포를 비교하였으며, 그 결과는 다음과 같다. 먼저 364 균주의 분리원에 따른 분류에서는 ESL 우유가 가장 낮은 검출 균주수를 나타냈다. 전체 분리된 미생물 균주의 분포를 보면, *Bacillus* 계통과 *Staphylococcus* 계통이 주로 많이 검출되었으며, *Lactobacillus* 계통을 제외하고는 매우 다양한 분포를 가지는 것으로 나타났다. 우유 가공처리법에 따른 분리균종을 비교해 보면, LTLT 살균유의 경우에는 내열성이 강한 *Enterococcus* 계통의 균종이 특이적으로 많이 검출되었으며, UHT 살균유 중에서 ESL 우유에 비해서 기타 일반 시유에서는 *Pseudomonas* 계통의 저온성 미생물 균종이 많이 검출되었다. 보존온도별 균종 분포를 보면, *Bacillus* 계통은 보존온도가 높을수록 검출빈도가 높았으며, *Pseudomonas*와 같은 저온성 계통은 10℃에서 가장 높은 빈도로 검출되었다. 기초동정결과와 동정기를 이용한 동정 결과를 비교한 결과, 기초 동정법에 의한 균종의 분류 정확도가 매우 높은 것으로 확인되었다. 결론적으로 ESL우유와 일반우유의 미생물 균종 분포를 비교해 볼 때, 살균후 포장과정에서 2차적으로 오염될 확률이 높은 *Pseudomonas* 계통에서 커다란 차이를 보였으며, 이러한 *Pseudomonas* 계통의 미생물은 냉장 유통에서도 품질에 영향을 미치는 것으로 확인되었다. 따라서 ESL 우유가 유통중 제품의 품질 향상과 수명 연장이 되는 것은 미생물 오염도가 낮기 때문인 것으로 확인되었다.

참고문헌

1. Choi, S. H. (2001) Microbiological quality and detection method of post-pasteurization contamination of milk. *J. Korean Dairy Technol. Sci.* **19**, 116-124.
2. Debra, K. H. (1999) Extended shelf-life milks in North America : a perspective. *Int. J. Dairy Technol.* **52**, 95- 101.
3. Durr, R. (1975) Development of psychrotrophic bacteria in refrigerated raw milk. At French Dairy Farms. *Dairy Sci. Abst.* **31**, 7195.
4. Lee, S. W. and Wangbo, S. H. (2001) Changes on the quality of market milk on the storage conditions. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* **21**, 156-162.
5. Harding, F. (1995) Milk quality. Blackie Academic and Professionals, London, pp. 127-150.
6. Kwon, S. H., Ahn, J. J., and Kwak, H. S. (1998) Quality changes in various heat-treated market milks during storage.

Korean Dairy Technol. **16**, 90-97.

7. LaGrange, W. S. and Nelson, F. E. (1961) Identification of psychrotrophic bacteria of raw milk in bulk tank. *J. Dairy Sci.* **44**, 1440-1445.
8. McMeekin, T. A. and Ross, T. (1996) Shelf life prediction : status and future possibilities. *Int. J. Food Microbiol.* **33**, 65-83.
9. Murray, R. G. E., Brenner, D. J., Bryant, M. P., Holt, J. G., Krieg, N. R., Moulder, J. W., Pfennig, N., Sneath, P. H. A., Staley, J. T. and Williams, S. T. (1989) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 9th Ed., Williams and Wilkins Publishers. Baltimore, MD.
10. 秦 義典 (1999) 特集-充塡包裝技術-ケ-ブルトップ充塡機のESL技術. *食品機械裝置* **36**, 81-88.
11. 최석호 (1999) 고품질 우유의 생산기술 개발. 최종연구보고서. 농림부.

(2003. 9. 22. 접수 ; 2003. 12. 17. 채택)