

시판 두부 제조 공정 중의 Microflora Profile 분석

이설희 · 박영서*

가천대학교 식품생물공학과

Analysis of Microflora Profile in the Manufacturing Process of Commercial Tofu

Sulhee Lee and Young-Seo Park*

Department of Food Science & Biotechnology, Gachon University

Abstract

Microflora profiles including total bacteria, psychrophiles, and spore-forming bacteria in manufacturing process steps of tofu were analyzed to elucidate the cause of microbial contamination. The viable cell numbers of total bacteria in soybean and packed tofu were 4.75 and 2.53 log CFU/g, respectively. The viable cell number of psychrophiles in soybean was calculated to 3.55 log CFU/g, and reduced to 0.78 log CFU/g by heating during the soymilk preparation step, and was not detected in the final product. The viable cell numbers of spore-forming bacteria, the major bacteria in soymilk, in soybean and packed tofu were 1.75 and 0.58 log CFU/g, respectively. Total twenty nine genus and seventy species of bacteria were isolated and identified in the manufacturing process of tofu, from soybean to final packed tofu. The major bacteria existed in the soybean, soymilk, forming belt, *sum-mul* plate, knife, packed tofu before sterilization, and packed tofu after sterilization were identified as *Bacillus* spp., *Lysinibacillus bronitolerans*, *Acinetobacter* spp., *Bacillus* spp., *Acinetobacter* spp., *Acinetobacter* spp., *Staphylococcus* spp., respectively.

Key words: tofu, spoilage bacteria, manufacturing process, microflora profile, food safety

서 론

두부는 대두와 물을 함께 마쇄하여 그에 함유된 염류와 단백질을 추출하여 얻은 두유액에 칼슘이나 마그네슘 등의 응고제를 가하여 단백질을 침전 및 응고시킨 젤을 탈수 및 성형한 식품(An, 2009; Wang et al., 2009)으로 우리나라뿐만 아니라 대만이나 일본, 인도네시아 등에서도 많이 섭취되고 있는 대표적인 대두 가공식품이다. 특히 두부는 경제 성장과 함께 소포장과 기능성을 높인 식사대용으로 많이 개발되어 있어 간편성과 기능성을 동시에 요구하는 현대인에 부합되는 식품(Kim, 2007)이다. 두부는 필수 아미노산 및 칼슘, 철분 등의 무기질의 함량이 높고(Jeong, 2009), 가격이 저렴한 고단백 식품(Miller et al., 1952)이나, pH와 수분 함량이 높아 부패가 쉬우며 쉽게 변질되어 경제적, 위생적으로 안전성이 떨어지고 있는 실정이다(Kang et al., 1998; Woo et al., 2007). Park & Yi(2003)는 현재 유통되

고 있는 90% 이상이 포장되지 않는 일반 두부(판 두부)이며, 10%만이 포장두부로 유통되고 있는데, 우리나라의 소규모업체에서 위생관념이 부족한 두부 제조 업체들의 업주나 직원들의 관리가 제대로 되고 있지 않음을 시사하였다.

두부의 저장성을 향상시키기 위해 진행된 연구로는 저온 살균(Lee et al., 1990), microwave 처리(Wu & Salukhe, 1997), 응고제를 달리한 방법(Chun et al., 1997; Jung et al., 2000; Lee et al., 2001; Lee et al., 2004), 보존료 첨가(Lee et al., 1992) 등이 수행되어 왔으나, 실제로 유통되고 있는 두부는 저장기간은 길어야 실온에서 1-2 일, 냉장에서는 3 일로 조리를 하지 않는 이상 저장성이 매우 낮은 실정이다(Chun et al., 1999). 두부는 주로 제조 공정 중의 미생물에 의한 오염뿐만 아니라 보존온도나 공기, 용수, 취급하는 사람 등의 2 차 오염이 두부의 저장성에 영향을 미친다고 알려져 있다(Kang, 1998). 즉, 가공조건과 설비, 작업도구 및 작업자의 위생적 관념, 포장재나 포장방법, 보관 및 유통온도 등에 따라 저장성뿐만 아니라 위생성까지 큰 영향을 받는다(Wang, 2009).

두부의 미생물을 동정한 연구도 활발히 진행되고 있는데, Joo et al.(1998)과 Shin et al.(1992)은 부패 두부에서 미생물을 분리 및 동정하였고, Kang et al.(1998)은 포장두부에

*Corresponding author: Young-Seo Park, Department of Food Science and Biotechnology, Gachon University, Seongnam 461-701, Korea
Tel: +82-31-750-5378; Fax: +82-31-750-5273

E-mail: ypark@gachon.ac.kr

Received July 26, 2012; revised August 27, 2012; accepted August 27, 2012

서 분리한 부패세균에 관하여 연구하였으며, Wang et al.(2009)은 포장두부의 가공공정에서 미생물 분석 및 안전성을 평가하였으나, 원료 콩에서부터 두유, 제조 line 및 가열 전과 가열 후 두부 등 전반적인 두부 제조 공정에서 미생물을 조사한 연구는 없는 실정이다. 이러한 연구들은 두부를 제조하는 영세업자부터 대기업에 이르기까지 자체적으로 체계적인 위생적 관리가 필요함을 시사하고 있는데, HACCP(Hazard Analysis and Critical Control Points: 위해요소중점관리기준) 시스템의 도입에 있어서 두부 제조 시 위해가 될 수 있는 요소 및 그에 따른 대책의 확립에 중요한 기초 자료로 활용될 수 있다(Park, 2003; Wang, 2009).

본 연구에서는 두부의 제조 및 가공공정에 있어 일반세균, 저온세균, 포자형성세균 등의 microflora에 대한 정량 및 정성 분석을 통하여 두부 부패 미생물의 profile과 population을 조사함으로써 두부 중에 존재하는 부패 미생물의 종류와 오염 수준을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

사용 시료

본 연구에 사용된 시료는 국내 두부생산업체에서 생산되는 포장 두부 제조 공정 중에 사용된 원료 콩, 두유, 성형벨트, 슝물 plate, 절단용 칼날, 열탕 전 포장 두부, 열탕 후 포장 두부 등 총 7 개의 시료를 이용하였다.

각 제조 공정 별 미생물의 정량분석

미생물의 정량분석을 위하여 원료 콩, 열탕 전 포장 두부, 열탕 후 포장 두부의 경우에는 20 g, 두유의 경우에는 20 mL를 취하여 180 mL의 0.85%(w/v) NaCl 용액을 이용하여 균질화한 후 십진 희석하였으며, 성형벨트, 슝물 plate, 절단용 칼날의 경우에는 특정 지점을 선택하여 일정 면적(10×10 cm)을 1 mL의 0.85%(w/v) NaCl 용액으로 슝한 면봉으로 닦아내어 10 mL의 0.85%(w/v) NaCl 용액을 넣고 진탕하여 부착 세균의 현탁액을 조제한 후 십진 희석하였다. 각 희석액을 3M Petrifilm Aerobic Count Plate®에 loading하여 일반세균수, 저온세균수, 포자형성세균수를 측정하여 분석하였다. 일반세균은 35±1°C에서 24-48 시간, 저온세균은 10±1°C에서 72±3 시간, 포자형성세균은 85°C에서 15분간 가열한 후 35±1°C에서 48±3 시간 배양하였다. 배양 후 생성된 붉은 colony 수가 100-300 개인 희석 단계의 plate를 택하여 colony 수를 측정하고, 5 set의 반복 plate 중에서 최다 colony 수와 최소 colony 수를 제외한 3 set의 plate의 평균 colony 수에 희석배수를 곱하여 단위 무게 또는 부피당 생균수를 산출하였다(CFU/g, CFU/mL).

각 제조 공정 별 미생물의 정성분석

시료 중에 존재하는 일반세균, 저온세균, 포자형성세균의

정성분석은 RAPD-PCR(random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction) 분석과 16S rRNA 유전자 염기서열의 BLASTn database 분석을 통해 phylogenetic tree를 작성하여 수행하였다. 정량분석실험 시 3M Petrifilm Aerobic Count Plate에서 생육한 일반세균, 저온세균, 포자형성세균의 colony 중에서 무작위적으로 20 개의 colony를 각각 선정하여 각 분리균주의 RAPD-PCR 패턴을 분석하고, 이 중 RAPD-PCR 패턴이 상이한 10 균주를 선정하여 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석하여 동정하였다.

Genomic DNA의 분리

분리 균주의 RAPD-PCR 패턴 분석과 16S rRNA 유전자의 염기서열을 이용한 동정을 수행하기 위하여 AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit(Bioneer, Seoul, Korea)를 사용하여 제조사의 manual에 따라 균주로부터 genomic DNA를 분리한 후 template DNA로 사용하였다.

RAPD-PCR pattern 분석

RAPD-PCR을 위한 oligonucleotide random primer는 primer 239(5'-CTGAAGCGGA-3')를 사용하였다. RAPD-PCR은 AccuPower® PreMix(Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하여 최종 부피가 20 µL가 되도록 하였으며, My Cycler(BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA)로 반응시켰다. PCR 조건은 94°C에서 4 분, 1 cycle; 94°C에서 2 분, 39°C에서 2 분, 72°C에서 2 분, 2 cycle; 94°C에서 15 초, 39°C에서 15 초, 72°C에서 1 분, 35 cycle로 하였다.

16S rRNA 유전자 cloning

분리 균주의 16S rRNA의 유전자를 PCR에 의해 cloning 하기 위하여 27F(5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'), 1492R(5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3')을 primer로 사용하였다. PCR은 AccuPower® PreMix (Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하여 My Cycler(BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA)로 반응시켰으며, PCR 조건은 94°C에서 2 분, 1 cycle; 94°C에서 30 초, 60°C에서 1 분, 72°C에서 1 분, 35 cycle; 72°C에서 7분간 반응시켰다.

16S rRNA 유전자 염기서열 결정과 분석

PCR 산물의 염기서열 결정은 Macrogen사(Seoul, Korea)에 의뢰하여 Applied Biosystems사(Foster City, CA, USA)의 ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit를 사용하여 MJ Reserch사(Reno, NV, USA)의 PTC-225 Peltier Thermal Cycler와 ABI PRISM 3730 XL Analyzer를 이용하였다. 16S rRNA 유전자 염기서열의 homology 분석은 BLASTn online program(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)을 이용하였으며 표준균주들의 염기

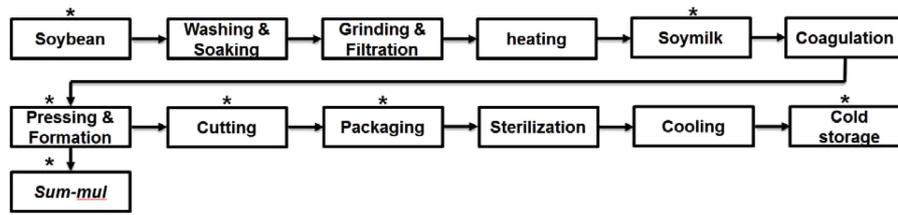


Fig. 1. Manufacturing process of commercial tofu. Sampling spots in this study were asterisked.

서열을 GenBank database(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)로부터 추출하여 분리 균주의 염기서열과 비교하였다. 16S rRNA 유전자 염기서열은 1,400 bp 내외의 길이를 지니도록 Bioedit program(Tom Hall Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 염기서열의 길이를 통일하고 Clustal X program(<http://www.clustal.org/clustal2/>)을 이용하여 alignment하였다. Phylogenetic tree는 정렬된 염기서열 set을 이용하여 MEGA5 program(Center for Evolutionary Functional Genomics, The Biodesign Institute, Tempe, AZ, USA)에 의해 작성하였다.

결과 및 고찰

각 제조 공정 별 미생물의 정량분석

현재 공장에서 제조되는 포장두부의 일반적인 제조 공정은 Fig. 1과 같으며, 이러한 두부의 제조과정 중에 존재하는 미생물 수를 측정하기 위하여 원료 콩, 두유, 성형벨트, 슝물 plate, 절단용 칼날, 열탕 전 포장 두부, 열탕 후 포장 두부에 존재하는 미생물에 대하여 일반세균, 저온세균, 포자형성세균으로 나누어 생균수를 정량하였다. 그 결과 Table 1에 나타낸 바와 같이 원료 콩에는 일반세균이 4.75 log CFU/g, 저온균이 3.55 log CFU/g, 포자형성세균이 1.75 log CFU/g의 수준으로 존재하여 원료 콩의 미생물 중 포자형성세균이 17.4% 존재하는 것으로 나타났다. 두유에는 일반세균이 1.18 log CFU/g, 저온세균이 0.78 log CFU/g, 포자형성세균이 0.95 log CFU/g의 수준으로 존재하여 원료 콩과 비교하였을 때 저온세균이 가장 많이 감소하였는데 이는 가열에 의한 살균효과로 판단된다. Wang et al.(2009)의 연구에서도 원료 대두의 총 생균수를 측정하였는데 평균 2.3×10^4 CFU/g이 검출되었고, 두유의 가열공정을 통한

결과 3.7×10^3 CFU/g로 1 log 수준으로 감소하였다고 보고된 바 있다.

한편 성형벨트, 슝물 plate, 절단용 칼날의 미생물 생균수를 보면, 일반세균의 경우 성형벨트에서는 4.27 log CFU/g, 슝물 plate에서는 4.52 log CFU/g, 절단용 칼날에서는 4.61 log CFU/g의 균수가 존재하여 일정한 수준을 유지하였다. 저온세균은 성형벨트에서는 3.32 log CFU/g, 슝물 plate에서는 2.13 log CFU/g, 절단용 칼날에서는 2.70 log CFU/g의 균수가 존재하여 일반세균에 비해서는 적은 수준으로 검출되었다. 포자형성세균의 경우에는 성형벨트에서는 세균이 검출되지 않았으나 슝물 plate에서는 2.35 log CFU/g, 절단용 칼날에서는 0.60 log CFU/g의 균수가 검출되었다.

일반세균과 저온세균의 경우 원료 콩을 처리하여 두유를 제조 시 가열에 의해 생균수가 상당한 수준으로 감소하였으나 제조 line에서 원료 콩 수준으로 다시 증가하였는데 이는 두유에서 두부로 가공하는 과정 중에 두유에 존재하는 세균이 증식하였거나, 또는 외부 오염에 의해 균수가 증가하는 것으로 판단된다. 포자형성세균의 경우에는 성형벨트에서는 검출되지 않았으나 슝물 plate에서는 원료 콩의 2 배에 상당하는 균수가 검출되어 슝물 plate의 공정 단계에서 외부로부터의 오염에 의해 포자형성세균이 혼입된 것으로 판단된다.

열탕 전 포장 두부에는 일반세균이 3.22 log CFU/g, 저온세균이 2.68 log CFU/g, 포자형성세균이 0.33 log CFU/g의 수준으로 존재하였고, 열탕 후 포장 두부에서는 일반세균이 2.53 log CFU/g, 포자형성세균이 0.58 log CFU/g의 수준으로 존재하였고 저온세균은 검출되지 않았다. Kim(2000)은 포장 두부를 75°C, 30 분 동안 가열하여 일반 세균의 밀도를 연구하였는데 제조 과정 중의 열처리 온도와 시간을 연장한다면 미생물의 밀도를 낮출 수 있어 저장성 향상 효과를

Table 1. Viable cell number of bacteria in samples from various processing steps.

(Unit: log CFU/g)

Bacteria	Soybean	Soymilk	Formation belt	Sum-mul plate	Cutter	Tofu before sterilization	Tofu after sterilization
Total bacteria	4.75±0.49	1.18	4.27	4.52	4.61±0.01	3.22±0.37	2.53±0.75
Psychrophilic bacteria	3.55±1.18	0.78	3.32	2.13	2.70	2.68±0.82	- ¹⁾
Spore-forming bacteria	1.75±0.04	0.95	-	2.35	0.60	0.33±0.29	0.58±0.14

Data are expressed as mean±SD.

¹⁾Not detected

볼 수 있다고 하였다.

열탕 전 포장 두부에는 절단용 칼날에 존재하였던 일반세균, 저온세균 및 포자형성세균이 이행되어 지속적으로 존재하는 것으로 판단되었고, 열탕 후 포장 두부에서는 가열에 의해 사멸하지 않고 생존한 일반세균 및 포자형성세균이 검출된 것으로 판단된다. 저온세균은 두부 완제품 제조 후 열탕 과정에 의해 완전히 제거되는 것으로 나타났다.

원료 콩과 두유에 존재하는 미생물의 정성분석

원료 콩에 존재하는 일반세균, 저온세균, 포자형성세균을 동정하기 위하여 3M Petrifilm Aerobic Count Plate®에서 생육한 colony를 일반세균, 저온세균, 포자형성세균별로 각 20 개씩 취하여 이로부터 genomic DNA를 분리하고 RAPD-PCR을 수행하여 pattern을 분석하였다(결과 미제시). RAPD-PCR pattern 분석에 의해 pattern이 상이한 10 개의 균주를 선정하여 이들 10 개 균주의 16S rRNA 유전자를 분리하여 염기서열을 결정함으로써 균주를 동정하였다. 그 결과 Table 2에 나타낸 바와 같이 일반세균은 *Bacillus thuringiensis*가 22%, *Pantoea septica*, *Pseudomonas oleovorans*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *Xanthomonas vasicola*, *Enterobacter cowanii*, *Pseudomonas argentinensis*가 각각 11% 분포되어 있었다. 저온세균은 *Pantoea septica*와 *Pseudomonas cichorii*가 각각 20%, *B. aryabhatai*, *Staphylococcus carprae*, *Staphylococcus succinus*, *Enterobacter cowanii*, *Stenotrophomonas aficae*, *Pantoea brenneri*가 각각 10% 분포되어 있었다. 포자형성세균은 *B. subtilis*가 33%, *B. anthracis*, *B. atrophaeus*, *B. aryabhatai*, *B. methylotrophicus*, *B. cereus*, *B. megaterium*이 각각 11% 분포되어 있었다.

일반세균은 대표적인 토양 미생물인 *Bacillus spp.*가 44%로 주종을 이루고 있었고 저온균에 속하는 *Pseudomonas spp.*도 22%를 차지하고 있었다. 저온세균에서는 대표적인 저온세균인 *Pseudomonas spp.*와 황색 색소를 생성하는 *Pantoea spp.*가 각각 20%, 30%를 차지하고 있었으며 인체 피부에서 많이 발견되는 *Staphylococcus spp.*도 20% 검출되었다. 포자형성세균에서는 대표적인 내생포자 형성균인 *Bacillus spp.*가 모두 검출되었는데, 이 중에는 식중독미생물인 *B. cereus*가 11% 존재하는 것을 확인하였다.

두유에 존재하는 일반세균은 *Lysinibacillus boronitolerans*가 57%, *Sporosarcina macmurdoensis*가 22%, *B. simplex*가 11%로 분포되어 있었다(Table 2). 저온세균은 *L. boronitolerans*만 존재하였으며, 포자형성세균은 *L. boronitolerans*가 88%, *B. subtilis*가 12%로 분포되어 있었다.

일반세균과 저온 세균 및 포자형성세균에서 검출된 균주들은 모두 포자를 형성하는 세균으로 두유제조 시 가열 과정에서 포자를 형성하지 않는 세균은 모두 가열에 의해 사멸되고 포자형성세균만 생존한 것으로 판단된다. 일반세균과 저온 세균 및 포자형성세균 시료를 모두 고려하면 *L.*

Table 2. Identification and occurrence of total bacteria, psychrophilic bacteria, and spore-forming bacteria from soybean and soymilk.

Bacteria	Identification	Occurrence rate (%)	
		Soybean	Soymilk
Total bacteria	<i>Bacillus megaterium</i>	11	¹⁾
	<i>Bacillus pumilus</i>	11	-
	<i>Bacillus simplex</i>	-	11
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	22	-
	<i>Enterobacter cowanii</i>	11	-
	<i>Lysinibacillus boronitolerans</i>	-	57
	<i>Pantoea septica</i>	11	-
	<i>Pseudomonas argentinensis</i>	11	-
	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	11	-
	<i>Sporosarcina macmurdoensis</i>	-	22
	<i>Xanthomonas vasicola</i>	11	-
Psychrophilic bacteria	<i>Bacillus aryabhatai</i>	10	-
	<i>Enterobacter cowanii</i>	10	-
	<i>Lysinibacillus boronitolerans</i>	-	100
	<i>Pantoea brenneri</i>	10	-
	<i>Pantoea septica</i>	20	-
	<i>Pseudomonas cichorii</i>	20	-
	<i>Staphylococcus carprae</i>	10	-
	<i>Staphylococcus succinus</i>	10	-
	<i>Stenotrophomonas aficae</i>	10	-
Spore-forming bacteria	<i>Bacillus anthracis</i>	11	-
	<i>Bacillus aryabhatai</i>	11	-
	<i>Bacillus atrophaeus</i>	11	-
	<i>Bacillus cereus</i>	11	-
	<i>Bacillus megaterium</i>	11	-
	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	11	-
	<i>Bacillus subtilis</i>	33	12
	<i>Lysinibacillus boronitolerans</i>	-	88

¹⁾Not detected

*boronitolerans*가 전체 세균의 81%를 차지하여 시료에 존재하는 세균의 대부분을 이루고 있었다. *L. boronitolerans*는 포자를 형성하고, Gram 양성 간균으로서 토양에서 분리된다(Iftikhar et al., 2007).

성형벨트, 슝물 plate와 절단용 칼날에 존재하는 미생물의 정성분석

성형벨트에 존재하는 미생물의 종류는 Table 3에 나타낸 바와 같이, 일반세균은 *Kurthia gibsonii*가 40%, *Acinetobacter baumannii*가 20%, *A. gernerii*, *Klebsiella ornithinolytica*, *Arthrobacter woluwensis*, *Pseudomonas otitidis* 각각 10% 분포되어 있었다. 저온세균은 *Enterobacter hormaechei*와 *A. johnsonii*, *A. baumannii*가 각각 20%, *Yokenella regensburgei*, *Enterobacter asburiae*, *Arthrobacter rhombi*, *Chryseobacterium joostei*가 각각 10% 분포되어 있었다. 포자형성세균은 검출되지 않았다.

일반세균 시료에서는 포자형성세균은 검출되지 않은 반면 포자를 형성하지 않는 세균과 *Pseudomonas otitidis* 등의 저온세균이 검출되었으며, 저온세균 시료에서도 포자형성세균은 검출되지 않았고 저온균인 *Chryseobacterium joostei*을 제외한 대부분의 세균은 중온균으로 알려진 세균들로 구성되어 있었다. 원료 콩이나 두유에 존재하였던 세균들은 성형벨트에서 전혀 검출되지 않았고 원료 콩이나 두유에서 검출되지 않았던 세균들이 새롭게 검출된 바, 이는 성형벨트에 외부로부터의 오염에 의해 혼입된 것으로 판단된다.

숙물 plate에서의 미생물의 종류는 Table 3에 나타난 바와 같이 일반세균은 *Klebsiella pneumoniae*가 30%, *A. baumannii*가 20%, *Brachymonas denitrificans*, *Staphylococcus epidermidis*, *B. amyloliquefaciens*, *Kurthia gibsonii*, *Kocuria kristinae*가 각각 10% 분포되어 있었다. 저온세균은 *Kurthia gibsonii*, *Klebsiella pneumoniae*, *A. baumannii*, *Exiguobacterium indicum*가 각각 20%, *Cronobacter sakazakii*가 10% 분포되어 있었다. 포자형성세균은 *B. coagulans*가 40%, *B. amyloliquefaciens*가 20%, *B. methylotrophicus*, *Staphylococcus hominis*, *B. megaterium*, *Staphylococcus epidermidis*가 각각 10% 분포되어 있었다.

일반세균 시료에서는 이전 단계에서는 발견되지 않았던 *Klebsiella pneumoniae*가 30% 존재하는 것으로 나타났는데 이는 숙물 plate 공정 상에서 외부로부터 오염에 의해 혼입된 것으로 판단된다. Joo et al.(1998)은 *Klebsiella pneumoniae*가 호흡기 계통의 감염증의 원인균으로 폐렴증이나 수막염 등을 일으키는 세균이라 보고하였다. 또한 성형벨트에서 검출되었던 *A. baumannii*도 본 단계에서 지속적으로 검출되어 성형벨트부터 계속 이행된 균주로 판단된다. 白(1985)은 *Acinetobacter* 속은 점질물을 생성하는 호기성의 Gram 음성 구균으로서 두부 변패의 주된 원인균이라 보고하였으며, Garnacho-Montero et al.(2003)에 따르면 *A. baumannii*는 다양한 환경에서 생존가능하며, 폐렴의 원인균으로 거의 모든 항생제에 내성을 보일 수 있어 그로 인한 사망률이 50-70%에 이른다고 보고하였다. 또한 인체의 피부에 많이 존재하는 *Staphylococcus epidermidis*가 10% 수준으로 검출되었는데 이는 본 공정 중에 작업자의 손 등으로부터 오염되었을 가능성이 있다. 저온세균 시료에서는 저온세균인 *Exiguobacterium indicum*을 제외한 대부분의 균주가 중온균으로 알려진 균주로 구성되어 있었으며 식중독 미생물인 *Cronobacter sakazakii*도 10% 존재하는 것으로 나타났다. 포자형성세균 시료에서는 검출된 세균의 80%가 *Bacillus* spp.로 구성되어 있었지만 무포자 세균인 *Staphylococcus* spp.도 20% 존재하였다. 성형벨트에서는 검출되지 않았던 *Bacillus* spp.가 검출되었고, 특히 인체의 피부에 상존하는 *Staphylococcus* spp.가 검출되었다는 것은 숙물 plate 공정 과정에 작업자 또는 주변 환경으로부터 시료가 오염되었기

Table 3. Identification and occurrence of total bacteria, psychrophilic bacteria, and spore-forming bacteria from formation belt, sum-mul plate, and cutter.

Bacteria	Identification	Occurrence rate (%)		
		Formation belt	Sum-mul plate	Cutter
Total bacteria	<i>Acinetobacter baumannii</i>	20	20	56
	<i>Acinetobacter gernerii</i>	10	- ¹⁾	11
	<i>Acinetobacter soli</i>	-	-	11
	<i>Arthrobacter woluwensis</i>	10	-	-
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	-	10	11
	<i>Brachymonas denitrificans</i>	-	10	-
	<i>Chryseobacterium joostei</i>	-	-	11
	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	10	-	-
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	30	-
	<i>Kocuria kristinae</i>	-	10	-
	<i>Kurthia gibsonii</i>	40	10	-
	<i>Pseudomonas otitidis</i>	10	-	-
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	10	-
	Psychrophilic bacteria	<i>Acinetobacter baumannii</i>	20	20
<i>Acinetobacter bourethii</i>		-	-	10
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>		-	-	10
<i>Acinetobacter johnsonii</i>		20	-	10
<i>Acinetobacter junii</i>		-	10	-
<i>Acinetobacter venetianus</i>		-	-	10
<i>Arthrobacter rhombi</i>		10	-	-
<i>Chryseobacterium joostei</i>		10	-	-
<i>Cronobacter mytjensii</i>		-	-	20
<i>Cronobacter sakazakii</i>		-	10	-
<i>Enterobacter asburiae</i>		10	-	-
<i>Enterobacter hormaechei</i>		20	-	-
<i>Exiguobacterium indicum</i>		-	20	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		-	20	-
<i>Kurthia gibsonii</i>	-	20	10	
<i>Yokenella regensburgei</i>	10	-	-	
Spore-forming bacteria	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	-	-	40
	<i>Acinetobacter venetianus</i>	-	-	20
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	-	20	-
	<i>Bacillus coagulans</i>	-	40	-
	<i>Bacillus megaterium</i>	-	10	-
	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	-	10	-
	<i>Cronobacter mytjensii</i>	-	-	20
	<i>Kurthia gibsonii</i>	-	-	20
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	10	-
	<i>Staphylococcus hominis</i>	-	10	-

¹⁾Not detected

때문으로 판단된다. Wang et al.(2009)은 두부의 전반적인 위생성 향상을 위해서 가공공정에서 사용되는 설비나 작업자 등의 세척 및 소독이 강화되어야 한다고 판단하였으며, 두부류에 대한 HACCP을 적용하는 연구를 한 Park & Lee (2003)은 두부 상자에서 *Pseudomonas putida*, *Cronobacter sakazaki* 등이 검출되어 제조시설보다 개인위생의 불량으로 인

한 위험이 더 클 것이라고 보고하였다.

절단용 칼날에 존재하는 미생물을 분석한 결과 Table 3과 같이 일반세균은 *A. baumannii*가 55%, *Chryseobacterium joostei*, *Acinetobacter* sp., *B. amyloliquefaciens*, *A. soli*가 각각 11% 분포되어 있었다. 저온세균은 *A. baumannii*가 30%, *Cronobacter mytjensis*가 20%, *A. calcoaceticus*, *A. johnsonii*, *A. bouretii*, *A. venetianus*, *Kurthia gibsonii*가 10% 분포되어 있었다. 포자형성세균은 *A. johnsonii*가 40%, *A. venetianus*, *Kurthia gibsonii*, *Cronobacter mytjensis*가 각각 20% 분포되어 있었다.

일반세균, 저온세균, 포자형성세균 시료를 모두 합하여 고려할 경우 *Acinetobacter* spp.가 전체 세균의 69%를 차지하여 주 균주로 확인되었으며 특히 *A. baumannii*는 일반세균 시료에서 56%, 저온세균 시료에서 30%를 차지하였는데 이는 성형벨트와 슝물 plate에 존재하던 균주가 절단용 칼날로 계속 이행된 것으로 판단된다. 그 외에 *Kurthia gibsonii*와 *B. amyloliquefaciens*도 슝물 plate에서 이행된 균주로 판단된다. 포자형성세균시료에서 검출된 세균들은 모두 포자를 형성하지 않는 세균으로 확인되었는데 이는 포자를 형성하지는 않지만 내열성을 지닌 균주이기 때문으로 사료된다.

열탕 전과 열탕 후 포장 두부에 존재하는 미생물의 종류

두부 제조 후 포장과정을 거친 다음 열탕으로 살균하기 전의 두부에 존재하는 미생물의 종류는 Table 4에 나타낸 바와 같이 일반세균은 *Pseudomonas alcaligenes*가 23%, *Cronobacter mytjensis*, *Dermaococcus abyssi*, *A. gernerii*, *A. baumannii*, *Staphylococcus pettenkoferi*, *Pseudomonas hibiscicola*, *Exiguobacterium indicum*이 각각 11% 분포되어 있었다. 저온세균은 *A. johnsonii*와 *Lactococcus lactis*가 각각 20%, *Arthrobacter woluwensis*, *Exiguobacterium acetylicum*, *A. tandoii*, *A. calcoaceticus*, *Microbacterium dextranolyticum*, *Brevundimonas lenta*가 각각 10% 분포되어 있었다. 포자형성세균은 *Micrococcus yunnanensis*가 40%, *Staphylococcus warneri*가 20%, *Acidovorax temperans*, *Staphylococcus epidermidis*, *Deinococcus xibeiensis*, *Micrococcus luteus*가 각각 10% 분포되어 있었다.

일반세균 시료에는 저온성 세균인 *Pseudomonas* spp.가 33% 존재하였고 성형벨트와 슝물 plate 및 절단용 칼날에서 검출되었던 *A. baumannii*가 검출되어 본 균주는 성형벨트에서 오염되었던 균주가 계속 이행된 것으로 판단된다. 저온세균 시료에서는 저온세균인 *Exiguobacterium acetylicum*과 *Brevundimonas lenta*가 각각 10%씩 검출되었고 *Acinetobacter* spp.가 40% 검출되었으며 유산균인 *Lactococcus lactis*도 새롭게 검출되었다. *Lactococcus lactis*와 *Microbacterium dextranolyticum* 등은 이전 단계에서는 검출되지 않았던 균주로 외부 오염에 의해 혼입된 것으로 판단된다. 포자형성

Table 4. Identification and occurrence of total bacteria, psychrophilic bacteria, and spore-forming bacteria from tofu before and after sterilization.

Bacteria	Identification	Occurrence rate (%)	
		Before sterilization	After sterilization
Total bacteria	<i>Acinetobacter baumannii</i>	11	1 ¹⁾
	<i>Acinetobacter gernerii</i>	11	-
	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	-	40
	<i>Cronobacter mytjensis</i>	11	-
	<i>Delftia tsuruhatensis</i>	-	10
	<i>Dermaococcus abyssi</i>	11	-
	<i>Exiguobacterium indicum</i>	11	-
	<i>Paenibacillus borealis</i>	-	10
	<i>Paenibacillus lautus</i>	-	10
	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	23	-
	<i>Pseudomonas hibiscicola</i>	11	-
Psychrophilic bacteria	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	-	10
	<i>Staphylococcus pettenkoferi</i>	11	-
	<i>Staphylococcus warneri</i>	-	20
	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	10	-
	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	20	-
	<i>Acinetobacter tandoii</i>	10	-
	<i>Arthrobacter woluwensis</i>	10	-
	<i>Brevundimonas lenta</i>	10	-
	<i>Exiguobacterium acetylicum</i>	10	-
	<i>Lactococcus lactis</i>	20	-
	<i>Microbacterium dextranolyticum</i>	10	-
Spore-forming bacteria	<i>Acidovorax temperans</i>	10	-
	<i>Deinococcus xibeiensis</i>	10	-
	<i>Enhydrobacter aerosaccus</i>	-	14
	<i>Micrococcus luteus</i>	10	-
	<i>Micrococcus yunnanensis</i>	40	-
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10	14
	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	-	29
<i>Staphylococcus warneri</i>	20	43	

¹⁾Not detected

세균 시료에서는 인체 피부에서 많이 발견되는 *Micrococcus* spp.와 *Staphylococcus* spp.가 각각 50%와 30% 존재하여 작업자로부터 오염된 것으로 추측된다. 포자형성세균 시료에서 발견된 세균들은 포자를 형성하지 않는 세균들로서 내열성을 지니기 때문에 검출되는 것으로 판단된다.

열탕 후 두부는 포장공정을 마친 후 냉장한 시료로서 열탕 전 두부의 가열살균에 의해 저장성을 증가시킨 시료이다. Table 4에 나타낸 바와 같이 일반세균은 *A. lwoffii*가 40%, *Staphylococcus warneri*가 20%, *Pseudomonas oryzihabitans*, *Delftia tsuruhatensis*, *Paenibacillus lautus*, *Paenibacillus borealis* 각각 10% 분포되어 있었다. 포자형성세균은 *Staphylococcus warneri*가 43%, *Staphylococcus pasteurii*가 29%, *Staphylococcus epidermidis*, *Enhydrobacter aerosaccus*

가 각각 14% 분포되어 있었다.

일반세균은 *Delftia tsuruhatensis*와 *Paenibacillus lautus* 등 이전 공정에서는 검출되지 않았던 세균이 검출되었는데 열탕 전 두부에서 검출되지 않은 이유는 열탕 전 두부에 매우 낮은 수준으로 존재하여 검출되지 않았다가 저장 중 증식한 것으로 사료된다. 포자형성세균 시료에서는 열탕 전 두부에서 검출되었던 *Staphylococcus* spp.가 검출되어 열처리에 의해 사멸하지 않고 생존한 것으로 판단된다. 포자형성세균 시료에서는 대부분의 세균이 포자형성을 하지 않는 *Staphylococcus* spp.로 확인되었는데 내열성을 지니고 있어 열탕에 의해 사멸하지 않고 생존한 것으로 판단된다. Kang et al.(1998)의 연구에서는 *Enterobacter amnigenus*와 *Flavobacterium indologenes*를 포장두부에서 분리하여 동정하여 본 연구결과와는 다른 균주가 동정되었으며, Wang et al.(2009)은 단순포장두부의 생균수 부적합율은 68.0%, 포장가열두부의 부적합율은 13.0%로 동정된 균주 이외에도 많은 부패세균이 생존하고 있을 것이라 평가하였다.

이상의 결과를 종합할 때 포장 두부의 제조 과정 중 원료 콩으로부터 포장 두부의 저장 기간 중 총 29 속 70 종의 세균이 분리 동정되었다. 포자형성세균은 원료 콩에서 60% 비율로 존재한 후 두유에서는 100% 존재하는 것으로 나타났으며, 이는 가열에 의해 포자를 형성하지 않는 세균은 사멸하고 포자형성세균만 생존하였기 때문으로 판단된다. 슛물 plate, 열탕 전 두부 시료에서는 포자형성세균이 40% 이하 수준으로 존재하다가 열탕 후 저장 두부에서는 60%의 비율로 존재하는 것으로 나타났으며, 이는 가열에 의해 포자를 형성하지 않는 세균이 상당수 사멸함에 따라 내열성인 포자형성세균의 상대적인 분포도가 높아진 것으로 판단된다.

포자형성균인 *Bacillus* spp.는 원료 콩에 존재하는 주 세균으로 50% 이상의 점유율을 나타내었으며, 두유에서도 7% 정도의 점유율을 나타내어 포자형성에 따른 내열성으로 두유 제조과정에서의 가열에 생존하는 것으로 확인되었다. 또한 포자형성균인 *Dermacoccus abyssi*, *Paenibacillus* spp., *Lysinibacillus* spp.와 *Sporosarcina* spp.는 가공 공정 중에 혼입된 후 두부 가열 공정 중에 사멸하지 않고 생존하는 것으로 확인되었다.

무포자형성균인 *Acinetobacter* spp.는 원료 콩이나 두유에서는 검출되지 않다가 성형벨트 이후 오염되어 혼입된 후 제조 공정 중에 다양한 종이 혼입되어 완제품까지 계속 이행되는 것으로 나타났으며, 특히 *A. lwoffii*는 두부 포장 단계에서 오염된 후 포장두부의 가열에 의해 사멸하지 않고 제품에 생존하는 것으로 확인되어 이 균주에 대한 제어 연구가 필요한 것으로 확인되었다. 한편 *Delftia tsuruhatensis*와 *Enhydrobacter aerosaccus* 두부 포장 단계 또는 그 이전 공정에서 오염된 후 포장두부의 가열에 의해 사멸하지 않고

저장 중 증식하여 제품에 생존하는 것으로 확인되었으며, *Exiguobacterium* spp.는 슛물 plate 공정에서 오염된 후 가열에 의해 사멸하지 않고 완제품까지 이행되는 것으로 나타났다.

Pseudomonas spp. 중에서 *P. argentinensis*, *P. cichorii*, *P. oleovorans*는 원료 콩에 총 14% 수준으로 존재하다가 두유 제조 시 가열에 의해 사멸되는 것으로 나타난 반면, *P. oryzihabitans*는 두부 포장 시 혼입된 후 두부 완제품 제조 후 가열에 의해서도 완전히 사멸되지 않는 것으로 확인되었으며, *Staphylococcus* spp.는 가열 후 두부에서 저장 중 증식하여 저장 두부에 존재하는 세균의 50% 이상을 차지하고 있어 본 균주의 생육억제 방안을 강구하여야 할 것이다. *Staphylococcus* spp. 중에서 *S. carprae*를 제외한 모든 균주들이 제조 공정 중 혼입되어 작업자의 손 등으로부터 오염된 것으로 여겨지며, 특히 *S. epidermidis*, *S. pasteurii*, *S. warneri* 등은 포장 두부의 가열에 의해서도 사멸하지 않기에 이에 대한 제어연구가 필요하다.

Arthrobacter spp., *Brachymonas denitrificans*, *Brevundimonas lenta*, *Chryseobacterium joostei*, *Cronobacter* spp., *Deinococcus xibeiensis*, *Klebsiella* spp., *Kocuria kristinae*, *Kurthia gibsonii*, *Lactococcus lactis*, *Microbacterium dextranolyticum*, *Micrococcus* spp., *Yokenella regensburgi* 등은 원료 콩이나 두유 등에는 존재하지 않았지만 성형벨트나 절단용 칼날 등과 같은 제조 line 상에서 오염되어 두부에 혼입된 후 가열에 의해 사멸하는 균주로 확인되었다.

요 약

두부의 주요 가공과정 중의 일반세균, 저온세균, 포자형성세균의 microflora에 대한 정량 및 정성 분석을 통하여 가공 공정 별 미생물 오염 원인을 규명하고자 하였다. 일반세균은 원료 콩에 4.75 log CFU/g 존재하였으나 두유제조 공정에서 가열에 의해 3.55 log CFU/g으로 감소하였고 가열 후 포장두부에서는 2.53 log CFU/g 존재하였다. 저온세균은 원료 콩에 3.55 log CFU/g 존재하였으나 두유제조 공정에서 가열에 의해 0.78 log CFU/g으로 감소하였고 포장 두부의 가열에 의해 사멸되어 완제품에는 검출되지 않았다. 포자형성세균은 원료 콩에 1.75 log CFU/g 존재하였고 제조 공정 중 외부 오염에 의해 혼입된 후 완제품 저장 시 0.58 log CFU/g 수준으로 검출되었다. 두부의 제조과정 중 원료 콩으로부터 최종 제품까지 총 29 속 70 종의 세균이 분리 동정되었다. 원료 콩, 두유, 성형벨트, 슛물 plate, 절단용 칼날, 열탕 전 포장 두부, 열탕 후 포장 두부에 존재하는 주요 미생물은 각각 *Bacillus* spp., *Lysinibacillus bronitoleran*, *Acinetobacter* spp., *Bacillus* spp., *Acinetobacter* spp., *Acinetobacter* spp., *Staphylococcus* spp.로 확인되었다.

감사의 글

이 논문은 2012년도 가천대학교 교내연구비 지원에 의한 결과임.

참고문헌

- An SH. 2009. Preparation of soybean (tofu) mixed with powdered chungkukjang and culinary characteristics. MS thesis, University of Catholic, Daegu, Korea.
- Chun KH, Kim BY, Hahn YT. 1999. Extension of tofu shelf-life with water soluble degraded chitosan as a coagulant. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 28: 161-166.
- Chun KH, Kim BY, Son TI, Hahn YT. 1997. The extension of tofu shelf-life with water soluble degraded chitosan as immersion solution. Korean J. Food Sci. Technol. 29: 476-481.
- Garnacho-Montero J, Ortiz-Leyba C, Jimenez-Jimenez FJ, Barreiro-Almodovar AE, Garcia-Garmendia JL, Bernabeu-Wittel IM. 2003. Treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia (VAP) with intravenous colistin: a comparison with imipenem-susceptible VAP. Clin. Infect Dis. 36: 1111-1118.
- Iftikhar A, Akira Y, Atsushi Y, Toru F. 2007. Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57: 1117-1125.
- Jeong TS. 2009. Effect of starter molds and dressing mixtures on the fermentation and quality characteristics of fermented tofu. MS thesis, University of Catholic, Daegu, Korea.
- Joo GJ, Hur SS, Choi YH, Rhee IK. 1998. Characterization and identification of bacteria from putrefying soybean curd. Korean J. Postharvest Sci. Technol. 5: 292-298.
- Jung GT, Ju JO, Choi JS, Hong FS. 2000. Preparation and shelf-life of soy bean curd coagulated by fruit juice of *Schizandra chinensis ruprecht* (omija) and *Prunus mume* (maesil). Korean J. Food Sci. Technol. 32: 1087-1092.
- Kang SH, Lee YW, Oh WT. 1998. A study on characteristics of spoilage bacteria isolated from packed tofu. J. Fd. Hyg. Safety 13: 383-387.
- Kim KS. 2007. Functional ingredient compositions of soybean curds (tofu) made with black soybeans (*huktae*) and white soybeans (*baktae*). Korean J. Food Nutr. 20: 158-163.
- Lee KS, Baek SH, Shin YS, Choun SH, Kim DH. 1992. Effects of preservatives on storage of tofu. Bulletins Wondae 26: 133-144.
- Lee KS, Kim DH, Baek SH, Choun SH. 1990. Effects of coagulants and soaking solutions of tofu (soybean curd) on extending its shelf-life. Korean J. Food Sci. Technol. 22: 116-122.
- Lee KS, No HK, Mayers SP. 2001. Effect of chitosan as a coagulant on shelf-life of tofu prepared in commercial-scale. Food Sci. Biotechnol. 10: 529-533.
- Lee MY, Kim SD. 2004. Shelf-life and characteristics of tofu coagulated by calcium lactate. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 33: 412-419.
- Miller CD, Denning H, Bauer A. 1952. Retention of nutrients in commercially prepared soybean curd. Food Res. 17: 261-267.
- Park WH, Yi SH. 2003. The application of HACCP system to soybean curd and its effectiveness. J. Fd. Hyg. Safety 18: 202-210.
- Shin DH, Kim MS, Bae KS, Kho YH. 1992. Identification of putrefactive bacteria related to soybean curd. Korean J. Food Sci. Technol. 24: 29-30.
- Wang SN, Choi SW, Hur NY, Baik MY, Lee HS, Kim CN. 2009. Microbial analysis and safety evaluation in the process of packaged tofus. J. Life Sci. 4: 486-491.
- Woo IT, Park LY, Park GS, Lee SH. 2007. Effect of *Scutellaria baicalensis georgi* on shelf life of tofu. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 36: 458-463.
- Wu MT, Salukhe DK. 1997. Extending shelf-life of fresh soybean curds in-package microwave treatments. J. Food Sci. 42: 1448-1450.
- 白用武志. 1985. 豆腐の粘性敗について. 日本食品工業學會誌. 32: 1-7.