

# 輸出冷凍鮮魚의 低溫性大腸菌群 및 一般 microflora의 分布에 關한 研究

申 錫 雨\* · 金 又 俊\* · 姜 聖 求\*

## A STUDY ON DISTRIBUTION OF PSYCHROTROPHIC COLIFORMS AND GENERAL MICROFLORA OF FROZEN FISH FOR EXPORT

Suk U SHIN\*, Woo Jun KIM\* and Sung Koo KANG\*

Three kinds of samples, *Trachpenalus curiviostris*, *Astroconger myriaster* and *Cantherines modestus* which were pre-treated in a processing plant were frozen at -40°C in a contact freezer and stored for 32 days.

The numbers of general bacterium, coliforms and *E. coli* were measured at 8 day intervals during frozen storage and the isolated strains was classified. The results are as follows;

1. The numbers of coliforms and *E. coli* in the samples before freezing were much higher, than those during frozen storage and it tended to decrease.
2. General bacteria showed little change in number before and after being frozen. Among 97 strains of isolated coliforms, only 4 strains of *K. aerogenes* I and 4 strains of *K. cloacae* were classified and the rest was not determined.
3. Ninety percent of coliforms was found to be psychrotrophic coliforms, which were able to grow at 5°C within a week.
4. *Vibrio* and *Pseudomonas* were superior in number before freezing while *Flavobacterium cytophaga* and *Moraxella* were superior during frozen storage.

### 緒 言

一般的으로 食品의 糞便汚染指標細菌으로 大腸菌群이 利用되고 있지만 이 中에는 低溫性 大腸菌群이 있음이 밝혀졌고(Panes and Thomas, 1968), 申(1974)은 이 低溫性 大腸菌群의 衛生學的 意義가 問題되고 있다고 報告한바 있다.

이에 關한 것으로 Horie *et al.* (1974)은 下水에서 分離한 大腸菌群에 대하여 -20°C에서 生殘菌을 調査한 例가 있으며 Lyer and Pillai (1971)도 冷凍食品에 있어서 本菌의 衛生指標細菌으로서의 意義에 對해 論

한바 있으나 凍結貯藏日數에 따른 大腸菌群의 菌數變動 및 種別分布에 關한 資料는 많지 않다.

本實驗에서는 세가지 冷凍水産物에 對한 大腸菌群의 汚染度를 測定하고 이를 分離同定하여 衛生學的 意義와 細菌 Flora와의 關係를 調査하여 그 結果를 報告한다.

### 材料 및 方法

#### 1. 實驗材料

冷凍會社에서 前處理한 것을 凍結前後로 區分하여

\*麗水水産專門學校, Yeosu Fisheries Technical Junior College

꽃새우는 탈각한 그대로를, 봉장어, 쥐치는 細切하여 充分히 混合한 것을 紫外線燈으로 滅菌한 poly ethylene 봉투에 넣어 Contact freezer에서 -40°C로 凍結한 것을 32日間 貯藏하면서 8日 간격으로 測定했고 凍結魚는 5°C의 氷水로 解凍하여 試料로 使用했다.

2. 菌數測定과 菌株의 分離

試料 20g을 秤取하여 인산緩衝生理食鹽水 180ml을 加해 2分間 homogenize한 것을 原液으로 하여 이 原液 1ml에 稀釋水 9ml을 加해 以下 上法에 依해 段階 稀釋을 하였다.

生菌數 測定은 50% 海水寒天平板培地(Polypepton 5g, Meat extract 2.5g, Yeast extract 2.5g, Glucose 1g, Agar 15g, 증류수 500ml, 人工海水500ml, PH7.2) 를 利用하여 各段 0.1ml를 上記 培地에 固라지봉으로

塗抹 20°C에서 7日間 培養하여 算定하였고, 各平板으로 부터 集落形態別로 比率에 依해 10個의 集落을 釣 菌하여 菌株를 分離했다.

大腸菌群은 Clesoxycholate 培地에서 30°C, 24~48 시간 培養하여 赤色の 典型的 Colony로 菌數를 算定 했고 이중 10株를 釣菌하여 分離同定에 利用했다.

*E. coli*는 日本의 食品衛生法(1959)中의 規格規準에 記載된 *E. coli* 最確數 算定法에 따랐다.

3. 分離菌株의 性狀 및 同定試驗

細菌 Flora의 運動性, Catalase, Oxidase 試驗, Glucose分解, Penicilline感受性, Casein分解, 色素 生産등의 諸試驗은 Horie et al. (1972)의 記載에 따 랐고, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Flavobacterium-cytophaga*에 對해서는 Shewan(1971), *Moraxella*와 *Acinet-*

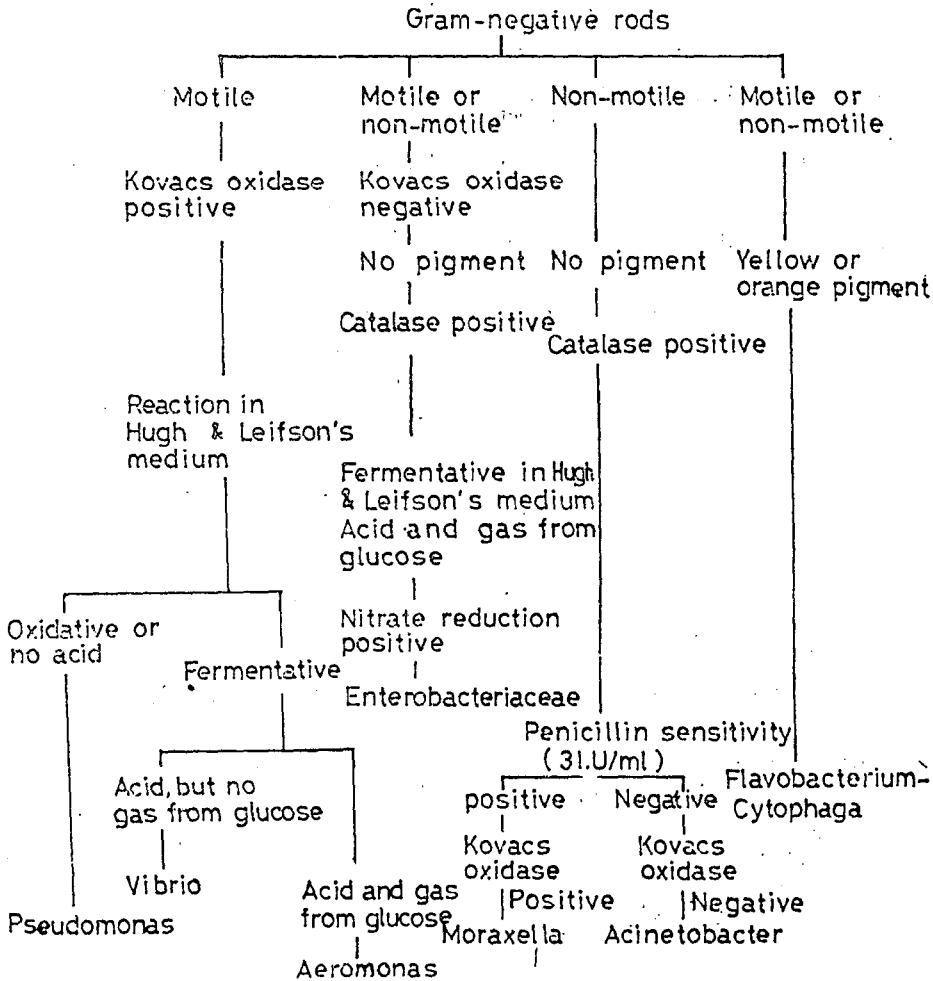


Fig. 1. A scheme for the identification of gram-negative rod bacteria.

*obacter*는 Baumann *et al.*(1968 a; b)의 方法을 基礎로 하여 Fig.1의 圖式에 依해 同定했다.

大腸菌群의 確認試驗 및 IMViC, Gellatin 액화 試驗은 Horie *et al.*(1972)의 方法에 따랐다.

#### 4. 分離菌株의 發育溫度

細菌 Flora는 上記 分離用容地를 基礎배지로 하여 鹽分要求性에 따라 食鹽 또는 人工海水를 첨가하여 鹽線塗沫해서 5°C는 10日間 外 各溫度는 24~48時間 培養해서 比較 觀察했다.

大腸菌群은 5°C는 Glucose Broth(Polypepton 10g, Meat extract 5g, Nacl 5g, Glucose 1.0g, DW.1000 ml, PH7.0)에서 10日間, 30°C, 37°C, 44°C는 Neut-

rient agar plate 에서 24時間 培養해서 觀察했다.

本 試驗에서는 Panes and Thomas(1968)의 方法에 따라 5°C에서 5~6日 以內에 發育可能한 것을 低溫性大腸菌群으로 判定했다.

### 結果 및 考察

#### 1. 生菌數

前處理한 試料 및 凍結貯藏期間에 따른 大腸菌群, *E. coli*, 一般細菌數를 測定하여 Table 1과 같은 結果를 얻었다.

꽃새우, 봉장어, 쥐치에 있어서 *E. coli*는 (1.8~2.4

Table 1. Bacterial counts of each sample before and after freezing

Sample	Group	Before freezing	Date of frozen storage			
			8	16	24	32
<i>Trachpenalus curiviostris</i>	<i>E. coli</i> /100g	4.5	2.0	2.0	2.3	0
	Coliforms/1g	9.0×10 <sup>3</sup>	1.0×10 <sup>10</sup>	2.0×10 <sup>10</sup>	2.0×10 <sup>10</sup>	1.0×10 <sup>10</sup>
	Bacterial count/1g	1.4×10 <sup>8</sup>	1.0×10 <sup>8</sup>	7.5×10 <sup>5</sup>	7.0×10 <sup>5</sup>	6.5×10 <sup>5</sup>
<i>Astroconger myriaster</i>	<i>E. coli</i> /100g	2.3×10	7.8	8.0	7.8	3.0
	Coliforms/1g	2.4×10 <sup>4</sup>	6.0×10 <sup>2</sup>	4.9×10 <sup>2</sup>	3.4×10 <sup>2</sup>	2.5×10 <sup>2</sup>
	Bacterial count/1g	4.5×10 <sup>8</sup>	1.4×10 <sup>8</sup>	2.2×10 <sup>8</sup>	2.1×10 <sup>8</sup>	1.5×10 <sup>8</sup>
<i>Cantherines modestus</i>	<i>E. coli</i> /100g	2.4×10 <sup>3</sup>	4.6×10	4.9×10	3.3×10	1.3×10
	Coliforms/1g	3.7×10 <sup>4</sup>	3.0×10 <sup>3</sup>	1.7×10 <sup>3</sup>	8.1×10 <sup>2</sup>	3.4×10 <sup>2</sup>
	Bacterial count/1g	9.6×10 <sup>8</sup>	4.0×10 <sup>8</sup>	6.7×10 <sup>8</sup>	8.4×10 <sup>8</sup>	4.3×10 <sup>8</sup>

×10<sup>2</sup>/100g으로 貯藏 8日間은 前處理한 試料에 比해 다소 減少하였으되 貯藏 24日까지는 별 變動이 없었으나 그후 부터는 다시 減少하는 傾向을 보였다.

大腸菌群은 1.0×10~3.7×10<sup>4</sup>/g으로 쥐치에 있어서는 貯藏期間이 經過함에 따라 菌數는 減少하였고 봉장어, 꽃새우에 있어서는 前處理한 試料에 比해 貯藏 8日間은 급격히 減少하였으나 그후 부터는 큰 增減이 없었다.

凍結貯藏中の 一般細菌變化는 3試料 모두 6.5×10<sup>6</sup>~9.6×10<sup>8</sup>/g으로 큰 變動은 볼 수 없었으나 꽃새우에 있어서는 貯藏日數가 經過됨에 따라 減少하는 傾向을 나타내었다. 이와 같은 現象은 Silverman *et al.*(1963)이 -40°C에서 凍結한 대구, 농어등의 filler에서 測定한 것과 一般細菌數는 큰 차가 없었으나 大腸菌群數

에 있어서 本試料에서는 生殘菌이 현저하게 높은 것을 알 수 있었다. 이는 市販魚를 原料로 使用한데다 前處理의 不注意에서 온 結果로 推定된다.

#### 2. 大腸菌群 分離菌株의 群別

IMViC 試驗; 44°C의 發育 및 Gelatin액화에 依해 이들 菌株를 Table 2에 表示한 것과 같이 1~17群으로 群別했다. 이중에서 1群 即 IMViC ---+로, 44°C 陽性, Gelatin 液化陰性의 것이 過半數 以上을 占했고, *Coli-aerogenes* Subcommittee(1956)에 依해 規定된 菌種은 分離菌株 97菌株 가운데 IMViC---+, 44°C 陰性, Gelatin液化 陽性인 *K. aerogenes* I과 Gelatine 陰性인 *K. cloacae*로 이들 菌株들은 꽃새우에서 1菌株를 除外하고는 쥐치에서 前者, 後者, 各

Table 2. Grouping of the psychrotrophic coliforms isolated from each sample

Group	Indol	M. R	V. P	Citrate	44°C	Gelatin	<i>Trachpenalus curivistis</i>	<i>Astroconger myriaster</i>	<i>Cantherines modestus</i>	Total
I	-	-	-	+	+	-	5	30	25	60
II	-	-	+	-	-	-		3	1	4
III	-	+	-	+	+	-		5		5
IV	-	-	+	-	-	+		1	4	5
V	+	-	-	+	+	-		1		1
VI	-	-	+	+	-	-	1		3	4
VII	-	+	-	-	+	-		1	1	1
VIII	+	+	-	+	+	-			1	1
IX	-	-	+	+	+	-			1	1
X	-	-	-	-	+	-		2	1	3
XI	-	-	-	+	-	-		1		1
XII	+	-	-	-	+	-			2	2
XIII	-	-	-	+	+	+		1		1
XIV	+	-	+	+	+	-		1		1
XV	-	-	+	+	-	+			4	4
XVI	-	+	+	+	-	-	1			1
XVII	-	-	-	+	-	+			1	1
Total							7	45	44	96

3. 4菌株로 貯藏 24日째인 後期에 出現하였다.

Horie *et al.* (1972)이 山岳地의 土壤, 하천의 泥土, 물등으로 부터 分離한 72菌株 가운데 *K. cloacae*가 45菌株, *K. aerogenes* [이 7菌株, *C. freundii* [이 13菌株있고 그 외는 非同定菌이었으며 이들 大部分은 低溫性 大腸菌群으로 住宅地等의 土壤試料에서는 檢出率이 낮고 人畜의 往來가 거이 없는 山岳地에 廣範圍하게 分布되어 있다는 點과 本 冷凍試料에 있어서는 少數의

*K. aerogenes* [ , *K. cloacae*를 除外하고는 거이 非同定菌이라는 點 등으로 보아 이들 大腸菌群은 糞便에 依한 汚染이라기 보다는 自然界에 널리 分布하는 低溫性 大腸菌群으로 推定되며 冷凍食品의 細菌學的 品質을 調査하는데 있어서 糞便汚染指標細菌으로 大腸菌을 利用하는에는 再論의 餘지가 없으나 低溫性 大腸菌群으로 冷凍食品의 指標細菌으로 삼는 것에 關해서는 앞으로 더욱 상세한 研究가 要望된다.

Table 3. Distribution of organisms isolated from each sample before and after freezing

Sample	Bacterial group	※ control	Date of the frozen storage				Total
			8	16	24	32	
<i>Trachpenalus curivistis</i>	Gram-negative rods	<i>Vibrio</i>	3		1		4
		<i>Pseudomonas</i>	2	3	1		6
		<i>Moraxella</i>		3		1	4
		<i>Acinetobacter</i>		1	2		3
		<i>Flavobacterium-cytophaga</i>	4	3	2	4	13
		Not determined			1	2	3
	Gram-positive rods	1	1	1		3	
	Gram-positive cocci	3	2		1	6	
	Numbers of testing strain	9	9	8	8	8	42

輸出冷凍鮮魚의 低溫性大腸菌群-및 一般 microflora의 分布

Astroconger myriaster	Gram-negative rods	<i>Vibrio</i>	4	2		1	7	
		<i>Pseudomonas</i>	1	3		1	5	
		<i>Moraxella</i>		1	2	4	3	10
		<i>Acinetobacter</i>			1			1
		<i>Flavobacterium-cytophaga</i>	1	3	6	2	4	16
		<i>Enterobacteriaceae</i>	1	1				2
		Not determined	1		1	1	1	4
	Gram-positive rods	1					1	
Numbers of testing strain		9	10	10	7	10	46	
Cantherines modestus	Gram-negative rods	<i>Vibrio</i>	2			1	3	
		<i>Pseudomonas</i>	3	1	3			7
		<i>Moraxella</i>	4	1	4	4	3	16
		<i>Acinetobacter</i>		1				1
		<i>Flavobacterium-cytophaga</i>	1	1	1		5	8
		<i>Enterobacteriaceae</i>			2			2
	Not determined			1		1	2	
Numbers of testing strain		10	7	8	5	9	39	

※ Before freezing

### 3. 細菌 Flora의 同定

前處理한 試料 및 凍結貯藏期間中에 있어서 分離同定한 細菌 Flora의 變動에 對해 Table 3에 表示하였다.

凍結處理前은 各試料에서 分離한 28菌株中 *Vibrio*, *Pseudomonas*가 53%, *Flavobacterium-cytophaga*, *Moraxella*가 21%였고, 凍結處理後에 있어서는 貯藏期間中 各試料에서 分離한 99菌株中 *Vibrio*, *Pseudomonas*가 19%, *Flavobacterium-cytophaga*, *Moraxella*가 75%

로 나타났다. 이상의 結果로 보아 凍結處理前은 *Vibrio*, *Pseudomonas*가, 貯藏後는 *Vibrio*, *Pseudomonas*는 減少한 대신 *Flavobacterium-cytophaga*, *Moraxella*가 優勢한 것을 알 수 있었다.

Horie et al. (1972)이 新鮮魚의 micro flora를 調査한 成績에 依하면 *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Moraxella*가 많이 分布되어 있다고 報告하였으며, Okuzumi et al. (1974)은 凍結魚에서 優勢菌으로 *Moraxella*, *Flavobac-*

Table 4. The growth of psychrotropic coliforms isolated at 5.37 and 44°C

Sample	No of strains	Growth at 5°C within		37°C		44°C	
		1~6days	7~10days	+	-	+	-
<i>Trachpenalus curivistis</i>	7	7	0	7	0	5	2
<i>Astroconger myriaster</i>	45	39	6	44	1	40	5
<i>Cantherines modestus</i>	44	40	4	44	0	31	13
Total	96	86	10	95	1	76	20

*erium-cytophaga*를 分離한 것과 本成績과는 類似한 傾向을 보였다.

4. 分離苗의 發育溫度

大腸菌群의 各 菌株은 5°C, 37°C, 44°C에서 發育 試驗을 行한 結果는 Table 4와 같다.

試驗菌 97株中 5°C에서는 약 90%인 87株가 1週日

以內에 發育可能하여 分離菌株의 거의 大部分이 低溫 性 大腸菌群이었다.

細菌 Flora의 發育溫度에 따른 分離菌株의 群別 및 Genus別 發育溫度에 對한 結果를 Table 5와 6에 表示했다.

5°C의 增殖에 依한 低溫細菌과 中溫細菌으로 區分

Table 5. Grouping of the organisms isolated from each sample according to the range of growth temperature

Group	Growth temperature						<i>Trachpenalus curivistis</i>	<i>Astroconger myriaster</i>	<i>Cantherines modestus</i>	Total
	5°C	20°C	25°C	30°C	35°C	40°C				
1	+	+	+	+	+	+	10	19	17	46
2	+	+	+	+	+	-	11	3	14	28
3	+	+	+	+	-	-			1	1
4	-	+	+	+	+	+	13	20	6	39
5	-	-	-	-	+	+		1		1
6	-	+	+	+	+	-	8	3	3	14
7	-	+	+	+	-	-	1	2		3
Total							43	48	41	132

Table 6. The numbers of strain according to growth temperature of each bacterial group

Bacterial group	Grouping according to the range of growth temperature.							Total	
	1	2	3	4	5	6	7		
Gram-negative rods	<i>Vibrio</i>	12(9)	1		1				14(9)
	<i>Pseudomonas</i>	7(1)	5(4)		3(1)		3		18(6)
	<i>Moraxella</i>	13(1)	14(2)	1(1)	2				30(4)
	<i>Acinetobacter</i>	2			2		1		5
	<i>Flavobacterium-cytophaga</i>	3	4(1)		23(1)	1	5	1	37(2)
	<i>Enterobacteriaceae</i>	3(1)			1				4(1)
	Not determined		3		6(1)				9(1)
Gram-positive rods		1(1)		1(1)		2		4(2)	
Gram-positive cocci	4(2)	1(1)		1				6(3)	
Total	44(14)	29(9)	1(1)	40(4)	1	11	1	127(28)	

Numbers in parenthesis indicate numbers of strain before freezing.

해서 보면 低溫性은 1, 2群에, 中溫性은 4, 6群에 많았다.

Genus別 發育溫度域은 *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Moraxella*는 1, 2群에 *Flavobacterium-cytophaga*는 4群에 많고 이들 菌株中 凍結處理前의 細菌群은 1, 2, 3群 즉 5°C에서 增殖 가능한 菌들이었다.

要 約

冷凍水産物 加工 工場에서 前處理한 꽃새우, 붕장어, 쥐치를 凍結處理前과 Contact freezer에서 -30°C~

-40°C로 急速凍結한 것으로 區分하여 凍結한 것은 32日間 貯藏하면서 8일 간격으로 一般細菌, 大腸菌群 *E. coli* 菌數測定을 하는 한편 分離菌株을 同定하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 試料中の 一般細菌, 大腸菌群 및 *E. coli*의 分布 범위는 各各  $6.5 \times 10^5 \sim 9.6 \times 10^6/g$ ,  $10 \times 10 \sim 3.7 \times 10^4/g$ ,  $1.8 \sim 2.4 \times 10^2/100g$ 으로 大腸菌群, *E. coli*는 貯藏期間이 經過함에 따라 減少하는 傾向을 보였으나 一般細菌數는 凍結處理前後 별 變動이 보이지 않았다.

2. 大腸菌群 97菌株을 分離하여 *K. aerogenes* I 4株, *K. cloacae* 4株만을 同定했고 그 외는 모두 非同定菌이었다.

3. 大腸菌群의 약 90%가 5°C에서 1週日 以內에 發育 가능한 低溫性 大腸菌群이었다.

4. 凍結處理前의 一般細菌 Flora는 *Vibrio*, *Pseudomonas*가, 凍結處理後는 *Flavobacterium-cytophaga*, *Moraxella*가 優勢하였다.

5. 凍結魚에 있어서 優勢한 *Flavobacterium-cytophaga*는 5°C에서 10日 以內에 發育하지 않은 菌株가 約 80%를 占하였고, *Moraxella*는 5°C에서 全菌株가 發育 可能하였다. (本 研究는 1976年度 文敎部 學術研究 助成費에 依한 것임)

## 參 考 文 獻

Baumann, P., M. Doucloroff and R. Y. stanier (1968): Study of the *Moraxella* Group. I. Genus *Moraxella* and the *Neisseria catarrhalis* Group. J. Bacteriol., 95, 58—73.

Baumann, P., M. Doudoroff and R. Y Stanier (1968): A study of the *Moraxella* Group. II oxidative-negative Species (Genus *Acinetobacter*) J. Bacteriol., 95, 1520—1541.

Horie, S., T. Arak and K. Saheki (1972): Some

observation on the distribution of Psychrotrophic Coli-aerogenes Bacteria in the Mountain Area. 食衛誌, 13, 405—409.

Horie, S., M. Okuzmi, M. Kimura, M. Akahori and M. Kawamae (1972): Studies on Psychrotrophic spoilage Bacteria of chilled sea fish. I. Bacterial Flora in the spoilage of Raw Fish. 食衛誌, 13, 410—417.

Horie, S., M. Yamagata, H. Inoue and T. Izumi (1974): Comparative evaluation on the determination of Coliforms and Enterococci in Frozen Sea Food Products. 食衛誌, 15, 110—115.

Lyer chaudhuri and Pillai (1971): 冷凍之び製品의 細菌學的 研究. J. Food Sci., 12, 76—81.

Okusumi, M., S. Horie, K. Imai and K. Matsubara (1974): Bacterial Flora of Frozen Fish. 食衛誌, 15, 22—29.

Panes, J. J. and S. B. Thomas (1968): Psychrotrophic Coli-aerogenes Bacteria in Refrigerated Milk. J. appl. Bact., 31, 420—425.

Silverman, G. J., N. S. Davis and J. T. R. Nickerson (1963): Certain microbial Indices of flozen uncooked fish fillets. J. Food Sci, 29, 331—336,

Shewan, I. M, (1971): The microbiology of fish and fishery products—a progress report. J. appl. Bact., 34, 299—315.

申錫雨 (1974): 生食 및 加工用물에 있어서 低溫性 大腸菌群의 分布. 麗水專誌, 8, 69—74

厚生省編 (1959): 食品衛生檢査指針(1).