

# 부분동결시에 미생물의 생화학적 활성에 관한 연구

趙 永 濟

釜山水産大學 冷凍工學科

(1987년 2월 25일 수리)

## Biochemical Activity of Microorganism Stored by the Method of Partial Freezing

Young-Je CHO

Department of Refrigeration Engineering, National Fisheries University of Pusan

Nam-gu, Pusan, 608 Korea

(Received February 25, 1987)

In order to study the preservation effect of  $-3^{\circ}\text{C}$  partial freezing method, the growth and biochemical activity of microorganisms and the changes of K-value in mackerel press juice were investigated at  $0^{\circ}\text{C}$ ,  $-3^{\circ}\text{C}$  supercooling (liquid phase) and  $-3^{\circ}\text{C}$  freezing (solid phase).

The results obtained in this paper were follows:

- 1) The growth and biochemical activity of microorganisms were reduced at  $-3^{\circ}\text{C}$  supercooling than  $0^{\circ}\text{C}$  in spite of the small variation in temperature.
- 2) There were no growth and biochemical activity of microorganisms at  $-3^{\circ}\text{C}$  freezing (solid phase).
- 3) The difference in the K-value between  $-3^{\circ}\text{C}$  supercooling and  $-3^{\circ}\text{C}$  freezing was remarkable in spite of the same temperature.

### 緒 論

저온에 있어서 세균의 증식, 사멸 및 생화학적 활성에 대해서는 대부분의 미생물은  $-2\sim-7.5^{\circ}\text{C}$ 에서도 증식 가능하다는 보고가 있으며<sup>1)</sup>, Ingraham 등<sup>2)</sup>은  $-10^{\circ}\text{C}$ 가 세균의 증식 최저온도라고 설명하고 있다.

한편, 미생물을 동결시키면 휴면상태에 있거나 사멸하게 되며, Shewan<sup>3)</sup>이 대장균과 *Pseudomonas pyocyanea*의 현탁액을 빙점 이하의 각 온도에 보존하였을 때,  $-2^{\circ}\text{C}$  또는  $-1^{\circ}\text{C}$  보다도  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 보존한 것이 생존율이 높았다고 보고한 바와 같이 일반적으로 미생물은 빙결점 부근에서 가장 사멸되기 쉽다.

미생물의 빙결점 부근에서의 생화학적인 활성에 관한 보고로는 Hess<sup>4)</sup>는 어체표면에서 분리한 세균의 비동결 상태의 배지상에서 탄수화물 발효작용 및 단백질 분해능은  $-6.5^{\circ}\text{C}$ 에서는 확인되지 않았으나  $-3^{\circ}\text{C}$ 에서는 약간 확인이 되었다고 보고하고 있으며, Sasajima<sup>5)</sup>도 Wood 등의 개량배지에 *Vibrio*를 접종하여 진탕 배양했을 때  $-4^{\circ}\text{C}$ 에서 균의 증식은 관찰되었지만, TMAO (trimethylamine oxide) 환원

능은 확인할 수 없었고,  $-6^{\circ}\text{C}$ 에서는 균의 증식 및 TMAO 환원능 모두 관찰되지 않았다고 하였다.

이상과 같은 보고들은, 동일상에서의 온도의 영향을 조사하여 저온이 될수록 세균의 증식력 및 생화학적 활성이 저하한다고 설명을 하고 있으나, 동일 온도에서의 상변화(액상→고상)가 세균세포에 주는 영향에 대한 보고는 전혀 보이지 않으므로, 본 논문에서는 어육부패의 주역을 담당하고 있는 몇 종의 저온 세균을 공시균으로 하여 동일액상에서 근소한 온도차인  $0^{\circ}\text{C}$ 와  $-3^{\circ}\text{C}$  과냉각, 또 동온이상인  $-3^{\circ}\text{C}$  과냉각과  $-3^{\circ}\text{C}$  동결 환경하에서 세균세포의 증식, 사멸 및 생화학적 활성을, 배지로서는 고등어육액즙을 사용하여,  $-3^{\circ}\text{C}$  부분동결법의 보존효과에 대한 유효성을 미생물학적인 측면에서 해명하고자 한다.

### 實 驗 方 法

#### 1. 고등어 육액즙의 조제

소매점에서 구입한 신선한 고등어의 등육에서 보통육만 채집한 후 잘게 썰어, Fig.1에 나타낸 방법으로 육액즙을 추출하였다. 즉, 조직을 파괴하기 위

Dorsal muscle

- (1) mince for 2 mins.
- ↓ (2) grind for 4 mins. with 1/5 weight of 20-50 mesh sea sand
- (3) centrifuge at 6000G for 30 mins.

Supernatant

- ↓ (4) filter through a gauze

Filtrate

- ↓ (5) dilute with an equal vol. of cold 0.85 % NaCl sol'n. (150% artificial sea water for *Pseudomonas* III/IV-H type)
- (6) sterilize through 0.5 μm filter

Diluted muscle juice

Fig. 1. Preparation of the diluted muscle juice.

하여 1/5량의 20-50 mesh 해사와 같이 고등어육을 4분간 갈아서 원심분리(6,000 G×30분, 0°C) 후, 상등액을 4겹의 가제로서 여과하여 지방을 걸러 내고서 냉생리식염수(*Pseudomonas* III/N-H형의 경우는 150% Lyman 등의 인공해수)로써 2배로 희석 후, pore-size 0.5 μm millipore filter로서 여과 멸균하여 공시액즙으로 하였다.

2. 공 시 균

공시균으로는 어류의 부패에 주역을 담당하고 있는 5종의 저온세균을 선정하였으며, 이들 공시균의 성상은 Table 1에 나타난 바와 같다.

3. 균현탁액의 조제 및 저장

하기의 생균수 측정용 평판배지와 같은 조성의 사

면배지에 25°C, 14-16시간 배양한 이들 공시균을 고등어육액즙에 최초균수가 10<sup>6</sup>/ml 정도 되도록 접종한 후, 이 현탁액을 25°C, 0°C, -3°C 과냉각(액상), -3°C 동결(고상), -20°C의 각 온도에서 저장 후, 일정기간 마다 K 값, TMA-N 및 VBN 생성량 및 생균수 측정의 시료로 하였다. (단, K 값 측정시료는 공시균을 접종하지 않았다.) 또, -3°C과냉각구는 현탁액의 동결을 방지하기 위하여 미진탕 저장하였으며, -3°C동결 및 -20°C구에서는 현탁액을 5 ml 씩 시험관에 분주하여 냉장고(-20°C)에서 소정의 온도(-3°C 및 -20°C)까지 냉각한 것을 즉시 동온도에 조절되어 있는 냉장고에 옮겨서 저장하였다.

4. TMA-N 및 VBN의 정량

시료액 2 ml에 4% TCA 8 ml 를 넣고 원심분리(9,000 rpm×5분간)하여 얻은 상등액을 시료액으로 하여 Conway 미량확산법<sup>9)</sup>으로 정량하였다.

또, TMA-N 및 VBN 량은 액즙 1 ml 당의 mg/100 ml로 나타내었다.

5. 생균수 측정

하기 조성의 평판배지를 사용하여 표면도말법(25°C, 1-4일)에 의하여 생균수를 측정하였다.

또, *Pseudomonas* III/IV-H형의 경우에는 식염대신에 75%인공해수를 사용하였다.

생균수 측정용 평판배지의 조성

Polypeptone	10.0 g
Beef extract	5.0 g

Table 1. Characteristics of strains employed

Test strains Characteristics	<i>Pseudomonas</i>			<i>Moraxella</i>	F/C*
	I/II	III/IV-NH	III/IV-H		
Form	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod
Motility	+	+	+	-	-
Gram stain	-	-	-	-	-
Acid from glucose : aerobic	+	-	-	-	-
anaerobic	-	-	-	-	-
Cytochrome oxidase	+	+	+	+	/**
Catalase	+	+	+	+	/
Hydrogen sulfide production	-	+	-	-	/
Nitrate reduction	-	+	-	-	/
Casein hydrolysis	-	+	+	-	/
Growth in NaCl : 0%	+	+	-	+	/
7%	-	-	+	+	/
TMAO reduction	-	+	-	+	-
Penicillin sensitivity(3 IU/ml)	-	-	-	+	/

\* Flavobacterium/Cytophaga, \*\* Not tested.

Agar	15.0 g
NaCl	5.0 g
(Artificial sea water 75%)	
Distilled water	1000 ml
pH	7.2

### 6. K 값의 측정

시료액 1 ml 를 과염소산액으로 단백질을 제거한 후에 원심분리(9,000 rpm×5분)하여 얻은 상등액을 시료액으로 하여, 內山 등<sup>7)</sup>이 고안한 크로마토그래피에 의한 간이법으로 측정하였다.

### 結果 및 考察

공시균 접종시료의 25°C 저장에서 TMA-N 및 VBN 생성과 생균수의 변화를 Fig.2에 나타내었다. 공시균의 증식은 *Pseudomonas* 3균주 전부 1일 후에 최고값에 도달하였지만, *Moraxella* 및 *Flavobacterium/Cytophaga*((이하, F/C)의 2균주는 약간 늦어져서 2일이 걸렸다. 또 VBN 및 TMA-N의 생성량은 공시균의 증식에 대응하는 경향이였다. 즉, VBN 생성량

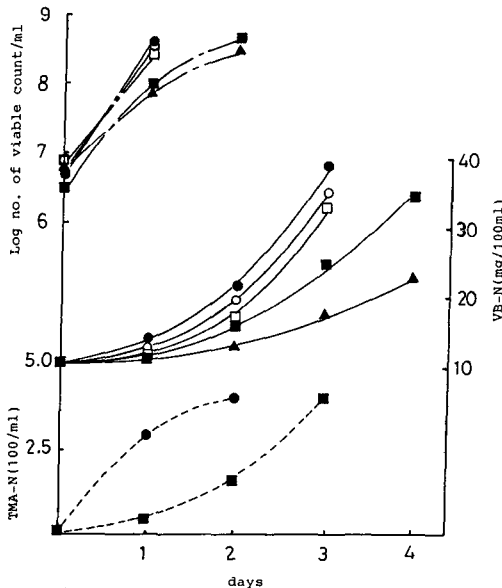


Fig. 2. Changes of viable cell count (---) and the amount of VBN (—) and TMA-N (···) in diluted mackerel juice by *Pseudomonas* I/II type(○), *Pseudomonas* III/IV-NH type (●), *Pseudomonas* III/IV-H type (□), *Moraxella* (■) and *Flavobacterium/Cytophaga* (▲) during storage at room temperature(25°C).

은 *Pseudomonas* 3균주 전부 2일후에 30 mg/100 ml 이상의 값을 나타내었지만, *Moraxella* 는 3일이 걸렸다. 0°C 저장구에서도 Fig.3에 나타난 바와 같이 공시균의 증식, VBN 및 TMA-N 생성량이 25°C 저장구보다 늦었지만 동일 경향을 나타내었다.

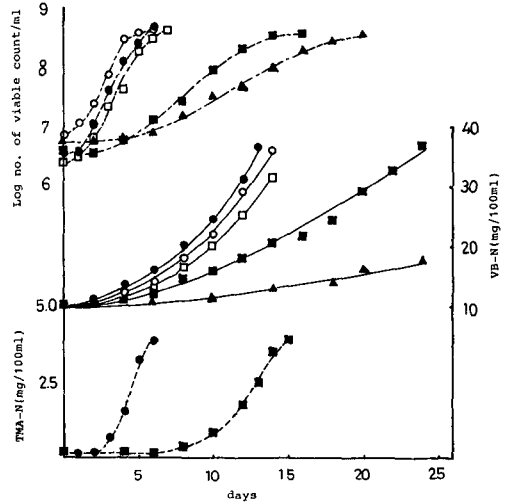


Fig. 3. Changes of viable cell count (---) and the amount of VBN (—) and TMA-N (···) in diluted mackerel juice by *Pseudomonas* I/II type(○), *Pseudomonas* III/IV-NH type (●), *Pseudomonas* III/IV-H type (□), *Moraxella* (■) and *Flavobacterium/Cytophaga* (▲) during storage at 0°C.

이상과 같이 25°C 및 0°C에서는 *Pseudomonas* III/IV-NH형 및 *Pseudomonas* I/II형이 강한 증식 및 부패활성을 나타내고 있으며, 이러한 결과는 이들 온도에서 앞의 2균주가 우세균임을 시사하는 것으로 Adams 등<sup>8)</sup>이 English sole의 fillet를 5°C에 저장한 경우, 우세균은 *Pseudomonas* 및 *Achromobacter* group이라는 보고와 Shaw 등<sup>11)</sup>이 대구육잡을 0.6°C에서 18일간 저장했을 때 *Pseudomonas* group이 강한 부패활성을 나타내었다는 보고와 일치하는 결과였다.

-3°C 과냉각에서의 균의 증식은 0°C에 비교하여 상당히 다른 결과를 나타내었다. 즉, *Pseudomonas* I/II형 및 *Pseudomonas* III/IV-H형이 최고값에 도달하기까지는 각각 18일과 20일이 걸렸지만, *Pseudomonas* III/IV-NH형은 더욱 늦어져서 24일 이후에 최고값에 도달하여, 0°C에서의 증식력에 비하여 큰 차이가 있었다.

또, *Moraxella*와 F/C는 증식이 전혀 관찰되지 않고, 점차로 감소하는 경향을 나타내었다.

VBN 생성량은 균의 증식과 동일 경향을 나타내어 *Pseudomonas* I/II형 및 *Pseudomonas* III/IV-H형은 각각 25일과 35일 후에 30 mg/100 ml의 값을 나타내었지만, *Pseudomonas* III/IV-NH형은 50일 후에도 25.5 mg/100 ml의 값에 머물렀고, *Moraxella*와 F/C에 의한 VBN 생성은 거의 관찰되지 않았으며, 이러한 결과는 생균수의 변화와 밀접한 관계가 있음을 시사하였다.

TMA-N 생성량도 *Pseudomonas* III/IV-NH형에서는 0°C보다 상당히 연장되어 34일 후에 최고값에 도달하였지만, *Moraxella*에 의한 TMA-N 생성은 관찰되지 않았다.

이상의 결과는 Fig. 4에 종합하여 나타내고 있는 바와 같으며, 0°C 부근의 저온영역에서의 근소한 온도차가 균의 증식 및 부패활성(VBN 및 TMA-N 생성)에 큰 영향을 미침을 시사하고 있으며, 이러한 결과는 Shaw 등의 고등어육액중에 *Pseudomonas* I/II형을 접종한 후, VBN 생성 실험에서 0°C 부근의 근소한 온도차가 세균의 부패활성에 큰 영향을 미친다는 보고와 일치하였다.

또, 0°C 이하의 온도에서 세균의 종류에 따라서는 온도 의존성에 큰 차이가 있음을 나타내고 있다. 즉,

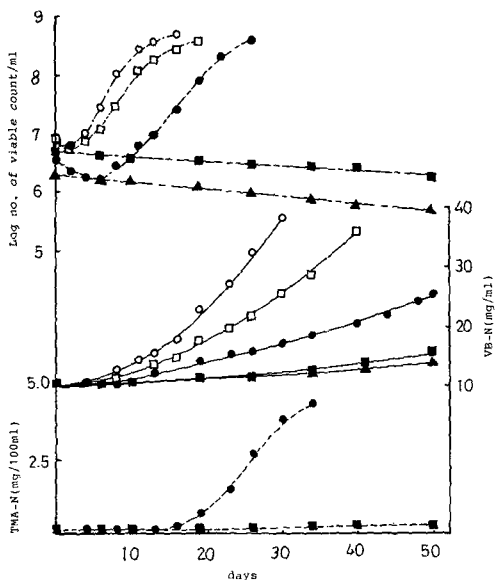


Fig. 4. Changes of viable cell count(---) and the amount of VBN (—) and TMA-N (···) in diluted mackerel juice by *Pseudomonas* I/II type (○), *Pseudomonas* III/IV-NH type (●), *Pseudomonas* III/IV-H type (□), *Moraxella* (■) and *Flavobacterium/Cytophaga* (▲) during storage at -3°C supercooling.

*Pseudomonas* I/II형은 0°C 및 -3°C 과냉각의 경우에서 증식 및 부패활성이 강하고 온도의 의존성이 낮아 -3°C의 환경에 우세균임을 나타내었으며, 한편 *Pseudomonas* III/IV-NH형의 증식력 및 부패활성은 -3°C 과냉각에서 현저히 저하하여, 저온에서의 온도변화에 대한 감수성이 높은 균임이 판명되었다.

Fig. 5에 -3°C 동결에서의 생균수 및 VBN 생성량을 나타내었다. *Pseudomonas* III/IV-NH형의 사멸이 현저하고, 다른 3균주도 약간의 사멸이 관찰되었다. 또, 공시균의 증식 및 VBN 생성도 전혀 관찰되지 않았다.

이와 같은 결과는 동결에 따른 액상에서 고상으로의 상변화가 균의 증식의 억제에 영향을 미쳐서 부패활성의 저하를 가져온 것으로, 부분동결의 유효성의 큰 요인이 되리라 생각된다.

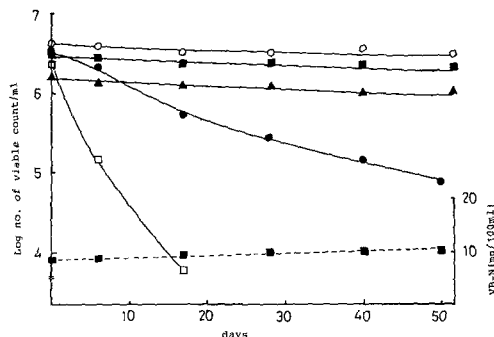


Fig. 5. Changes of Viable cell count (—) and the amount of VBN (···) in diluted mackerel juice by *Pseudomonas* I/II type (○), *Pseudomonas* III/IV-NH type (●), *Pseudomonas* III/IV-H type (□), *Moraxella* (■) and *Flavobacterium/Cytophaga* (▲) during storage at -3°C freezing.

-20°C(Fig. 6)에서는 균의 증식 및 부패활성이 전혀 관찰되지 않았다.

신선도의 지표인 K값의 변화는 Fig. 7에 나타내었다. 즉, 25°C에서는 1일 후에 80% 이상으로 증가하였으며, 0°C에서는 8일 후에 초기 부패단계인 60% 이상의 값을 나타내었으나, 0°C와 동일 액상이면서 3°C의 근소한 온도차인 -3°C 과냉각에서는 K값의 증가가 상당히 억제되어 약 15일 후에 60% 값에 도달하였다.

이와 같은 결과는 0°C 부근에서는 근소한 온도차가 K값의 상승에 큰 영향을 미침을 시사하는 결과이며, -3°C 과냉각(액상)과 동온이상인 -3°C 동결(고상)에서는 K값의 증가가 현저히 억제되어 27일 후에 60% 이상의 값에 도달하였다.

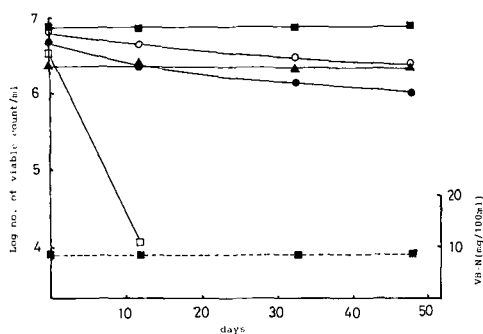


Fig. 6. Changes of viable cell count (—) and the amount of VBN (···) in diluted mackerel juice by *Pseudomonas* I/II type (○), *Pseudomonas* III/IV-NH type (●), *Pseudomonas* III/IV-H type (□), *Moraxella* (■) and *Flavobacterium/Cytophaga* (▲) during storage at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

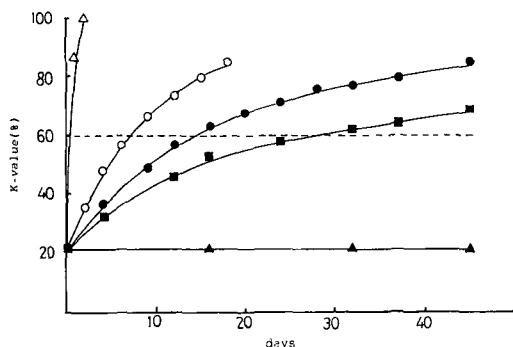


Fig. 7. Changes of K-value of diluted mackerel juice during storage at  $25^{\circ}\text{C}$  (Δ),  $0^{\circ}\text{C}$  (○),  $-3^{\circ}\text{C}$  supercooling (●),  $-3^{\circ}\text{C}$  freezing (■) and  $-20^{\circ}\text{C}$  (▲).

이와 같이  $-3^{\circ}\text{C}$  동일온도이면서 액상에서 고상으로의 상변화가 K 값 증가의 억제에 큰 영향을 미치는 결과는  $-3^{\circ}\text{C}$  부분동결시에 K 값의 증가가 현저히 억제되는 주요 원인으로 생각되며, 상의 변화가 효소활성 및 세균의 증식과 부패활성을 억제하는 것으로, 부분동결의 유효성의 큰 요인이 되리라 생각된다.

### 요 약

부분동결의 유효성을 미생물학적인 측면에서 해명하고자 저온에서 부패의 주역을 담당하고 있는 몇종의 저온세균을 공시균으로 하여서 고등어육액즙에 대한 부패활성을 동일액상이면서 빙점부근에서의 근소한 온도차( $0^{\circ}\text{C}$ 와  $-3^{\circ}\text{C}$  과냉각) 및  $-3^{\circ}\text{C}$  동일 온

도에서 상변화(액상-고상)를 중심으로 균의 증식, 사멸, 부패활성 및 K 값의 변화를 검토한 결과는 다음과 같다.

(1)  $25^{\circ}\text{C}$  및  $0^{\circ}\text{C}$  저장에서는 공시균 전부 강한 증식력 및 부패활성을 나타내었으나, 동일액상이면서  $0^{\circ}\text{C}$ 와 근소한 온도차인  $-3^{\circ}\text{C}$  과냉각에서는 공시균 중 *Pseudomonas* III/IV-NH 형의 증식력 및 부패활성이 현저히 억제되었으며, *Moraxella* 및 F/C도 실험기간을 통하여 점차 감소하는 경향을 나타내었고, 부패활성은 전혀 관찰되지 않았다.

(2)  $-3^{\circ}\text{C}$  과냉각(액상)과 동일온도이면서 고상인  $-3^{\circ}\text{C}$  동결에서는 전공시균의 증식 및 부패활성이 전혀 관찰되지 않았으며, 저장기간을 통하여 생균수가 감소하는 경향을 나타내었다.

(3) 동일액상이면서  $0^{\circ}\text{C}$ 와 근소한 온도차인  $-3^{\circ}\text{C}$  과냉각에서 K 값의 증가가 억제되었으며, 더욱  $-3^{\circ}\text{C}$ 의 동온이상인  $-3^{\circ}\text{C}$  동결(고상)에서는 상의 변화로 인하여 K 값의 증가가 현저히 억제되었다.

이상의 결과로부터,  $0^{\circ}\text{C}$ 와의 근소한 온도차 및 액상에서 고상으로의 상의 변화에 의한 효소활성의 저하(K 값) 및 저온세균의 증식과 부패활성의 억제가 부분동결의 유효성의 큰 요인이 되리라 추측된다.

### 謝 辭

본 연구는 1985년도 한국과학재단의 연구비지원에 의하여 수행되었음을 밝히며 감사의 바입니다.

### 文 獻

1. 加藤 博. 1969. 低溫度における微生物の増殖と死滅. 日本誌 35(8), 775-783.
2. Ingraham, J. L. and J. L. Stokes. 1969. Psychrophilic bacteria. Bacteriol. Rev. 23, 97-108.
3. Shewan, J.M. 1953. Proc. Symp. cured and Frozen Fish Technol.
4. Hess, E. 1934. Cultural characteristics of marine bacteria in relation of low temperatures and freezing. Contr. Can. Biol. Fish. 8, 461-474.
5. Sasajima, M. 1974. The growth or viability of trimethylamineoxide reducing psychrotrophic

- bacteria and their activity at subzerotemperatures. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 40(6), 625—630.
6. 山形 誠. 1974. 水産生物學・食品學實驗書(齊藤恒行ら編). 恒星社厚生閣. 281—286.
7. 内山均. 1974. *ibid.* 恒星社厚生閣. 269—274.
8. Adams, R., L. Farber and P. Lerke. 1964. Bacteriology of spoilage of fish muscle II. Incidence of spoilers during spoilage. Appl. Microbiol. 12, 277—279.
9. Shaw. B. G. and J. M. Shewan. 1968. Psychrophilic spoilage bacteria of fish. J. Appl. Bact. 31, 89—96.
8. Adams, R., L. Farber and P. Lerke. 1964.