

저농도의 Ethanol이 *Vibrio parahaemolyticus*의 증식과 생존에 미치는 영향

박찬성·카메론 해커니*

경산대학교 식품과학과, *버지니아텍 식품가공학과

Effect of Low Ethanol Concentrations on Growth and Survival of *Vibrio parahaemolyticus*

Chan-Sung Park and Cameron, R. Hackney*

Dept. of Food Science, Kyungsan University, Kyungsan, 712-240, Korea
*Dept. of Food Science and Technology, Virginia Polytechnic Institute and
State University, Blacksburg, VA 24060, U. S. A.

Abstract

The effect of low concentrations of ethanol(3~7%, v/v) in culture broth as an antibacterial agent against *Vibrio parahaemolyticus* was tested at -20, 5, 35, 45 and 50°C. Increasing concentrations of ethanol progressively inhibited initial growth of *V. parahaemolyticus* at 35°C. Growth occurred at 5°C ethanol, but only after a prolonged lag period. At 7% ethanol, the number of viable cells of *V. parahaemolyticus* declined during incubation. Culture broth containing 3~7% ethanol was inoculated with $10^6 \sim 10^7$ cells/ml of *V. parahaemolyticus* and incubated at low temperatures(5°C, -20°C) and high temperatures(45°C, 50°C). In the presence of 5 or 7% of ethanol, the viability in the cells incubated at high temperatures decreased rapidly. Rate of death increased with increasing concentration of ethanol.

I. 서 론

*Vibrio*는 호염성 세균으로서 해산물 섭취에 의해 발생하는 장염의 원인 세균이며¹⁻³⁾ 특히 생선이나 조개류를 날것으로 섭취할 때 *Vibrio*에 의한 식중독이 많이 발생하는 것으로 보고되고 있다^{2,4,5)}. 오염된 환경에서 생산된 해산물은 식중독세균의 검출율이 더욱 높으며^{3,6)} 적절히 조리되지 않은 해산물의 섭취에 대한 위험성이 높아지고 있다⁷⁾. 일본에서는 여름철 식중독의 약 70%가 생선이나 조개류의 섭취와 관련된 것으로 알려져 있으며 *Vibrio parahaemolyticus*가 그 주된 원인세균으로 보고되고 있다⁴⁾. 우리나라를 비롯한 세계의 많은 나라에서 바다의 진흙과 해산물에서 이 세균이 검출되고 있어 *Vibrio parahaemolyticus*에 의한 식중독 발생에 주의할 필요로 하고 있다⁸⁻¹⁰⁾.

식중독세균과 부패세균의 증식을 억제시켜 식품의 저장기간을 연장할 목적으로 많은 종류의 보존료가 식품가공시에 첨가물로 이용되고 있다^{11,12)}. 그러나 이들 식품첨가물에 대하여 많은 소비자들이 합성첨가물의 안전성 문제에 의문을 제기하고 있으며¹³⁾, 식품제조업자와 소비자 모두 항균작용을 가진 안전한 천연물의 사용을 갈망하고 있는 실정이다. 이러한 요구에 부응하여 각종 천연물질에 의한 항균작용^{14,15)}, 약초와 향신료¹⁶⁻¹⁸⁾ 및 ethanol¹⁹⁻²¹⁾에 의한 식중독세균의 증식 억제효과 등이

보고되고 있다. 본 연구는 천연물에 의한 효율적인 식중독세균의 제거방안을 모색하기 위하여 저농도의 ethanol에 의한 *Vibrio parahaemolyticus*의 억제효과를 이 세균의 최적온도(35°C)와 고온(45, 50°C) 및 저온(-20, 5°C)에서 검토하였다.

II. 재료 및 방법

1. 균주 및 전배양

균주는 환자로부터 분리된 *Vibrio parahaemolyticus* 10136(Kanagawa +, serotype O4:K8)을 D. Brown(Division of Microbiology, U.S. Food and Drug Administration, Cincinnati, Ohio)으로부터 제공받아 사용하였다. 증식과 생존실험을 위하여 stock culture 1 백금이를 액체배지 10 ml에 접종한 후 35°C에서 16~18시간 전배양한 균액을 실험에 사용하였다.

2. 배지의 조제

전배양 및 본 배양을 위한 액체배지는 tryptic soy broth(TSB, Difco)(Bacto tryptone 17 g, Bacto soytone 3 g, Bacto dextrose 2.5 g, NaCl 5 g, K₂HPO₄ 2.5 g)에 1%의 식염을 첨가하여 121°C에서 15분간 멸균한 후에 ethanol(ethyl alcohol absolute)을 배지의 0, 3, 5, 7%(v/v)되게 첨가하였다. 생존수의 측정을 위한 고체배지는 tryptic

tic soy agar(TSA, Difco)(Bacto tryptone 15 g, Bacto soytone 5 g, NaCl 5 g, Bacto agar 15 g)에 1%의 식염을 첨가하여 121°C에서 15분간 멸균한 후 평판을 만들어 사용하였다. 생균수의 측정시 phosphate buffered saline (PBS)²²⁾에 1%의 식염을 첨가한 액을 균액의 희석액으로 사용하였다.

3. 증식 및 생존억제 실험

Ethanol을 포함한 액체배지 10 ml를 함유한 screw cap 시험관을 미리 각 실험온도에 보존하였으며 -20°C의 경우에는 시험관을 얼음에 채워 두었다가 세균을 접종하였다. 증식실험을 위하여 전배양 균액을 액체배지에 1 : 10,000으로 희석하여 실험초기의 세균수가 $10^4 \sim 10^5$ cells/ml가 되게 조정한 후 35°C의 incubator에, 고온과 저온에서의 생존저해 실험에서는 1 : 100으로 희석하여 실험초기의 세균수가 $10^6 \sim 10^7$ cells/ml가 되게 조정한 후 고온(45, 50°C)과 저온(-20, 5°C)의 incubator에 각각 보존하였다. 보존 균액은 일정한 시간간격으로 채취하여 생균수를 측정하였으며 -20°C의 경우에는 흐르는 수도물로 해동시킨 즉시 생균수를 측정하였다. 생균수의 측정은 세균의 배양액 또는 배양액의 희석액 0.1ml를 고체배지를 함유한 petri dish에 평판도말한 후 35°C에서 24시간 배양한 colony 수를 측정하여 배양액 ml당의 colony forming unit(CFU/ml)로 나타내었다.

III. 결과 및 고찰

1. Ethanol에 의한 증식억제

Fig. 1은 배지에 첨가한 ethanol농도에 따른 *V. parahaemolyticus*의 증식곡선이다. 배지에 첨가한 ethanol농도의 증가와 더불어 *V. parahaemolyticus*의 증식은 억제되었다. 3%의 ethanol농도에서는 증식저해효과가 크지 않았으며 전 저장기간동안 control에 비하여 약 1 log cycle 정도 낮은 생균수를 나타내었다. Ethanol 5%에서는 약 36시간의 유도기를 거친 후에 증식이 시작되었으나 7% ethanol 존재하에서는 저장초기부터 생균수가 계속 감소하여 12시간 후에는 사멸하였다. 이 결과는 Ballesteros 등²⁰⁾이 *S. aureus* ATCC 6538 P에 대한 ethanol의 항균작용 조사결과와 아주 비슷한 경향을 나타내었다. Shapero 등²¹⁾은 *S. aureus*에 대하여 수분활성(A_w)을 달리 하였을 때, ethanol에 의한 세균증식의 억제효과를 검토한 결과, 수분활성(A_w)이 0.90 이하일때는 4~5%/wt에서, A_w 0.88에서는 3%/wt의 ethanol 존재하에서도 증식이 억제되어 수분활성이 낮을수록 저농도의 ethanol에 의하여도 세균증식의 억제가 가능함을 보고하였다.

2. 저온에서 Ethanol에 의한 생존억제효과

*V. parahaemolyticus*를 5°C에 저장하였을 때 ethanol이 세균의 생존에 미치는 영향은 Fig. 2와 같다. 저장초기의 8일간 ethanol농도 차이에 따른 생존억제효과는 거의

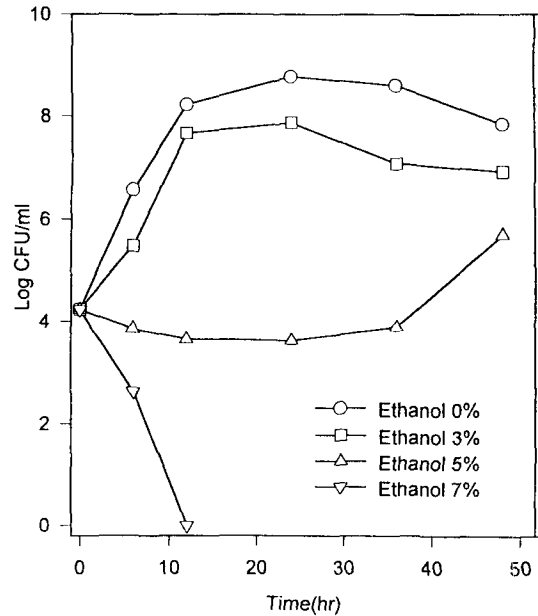


Fig. 1. Effect of ethanol on growth of *Vibrio parahaemolyticus* incubated at 35°C.

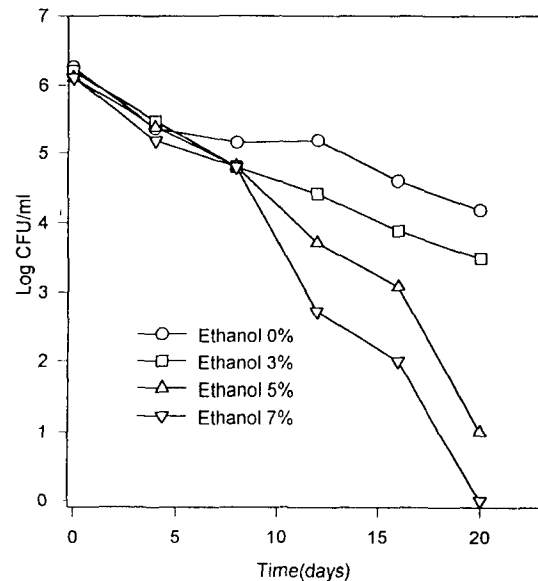


Fig. 2. Effect of ethanol on the survival of *Vibrio parahaemolyticus* incubated at 5°C.

관찰할 수 없었으나 저장 8일 이후부터 ethanol 농도가 증가할수록 생존억제효과도 증가하였다. 저장 16일 이후에는 ethanol 농도 5% 이상의 경우, control과 3% ethanol에 비하여 현저한 생균수의 차이를 나타내었으며 20일간의 전 저장기간동안 control은 2.08 log cycle의 생균수가 감소하였으나 5% ethanol에서는 5.11, 7%에

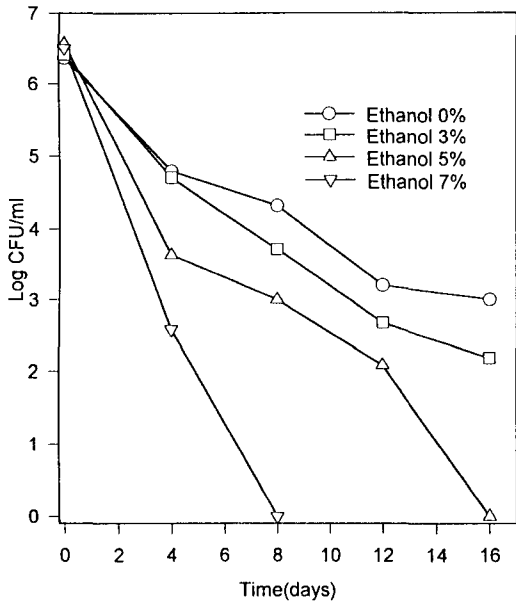


Fig. 3. Effect of ethanol on survival of *Vibrio parahaemolyticus* incubated at -20°C .

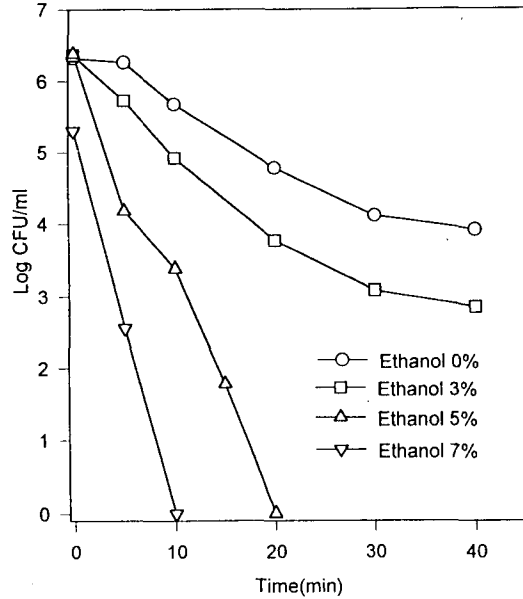


Fig. 4. Effect of ethanol on the survival of *Vibrio parahaemolyticus* incubated at 45°C .

서는 6.11 log cycle이 감소하여 5% 이상의 ethanol 존재하에서는 control에 비하여 약 2.5~3배 빠른 속도로 생존수가 감소하였다.

-20°C 에 저장한 *V. parahaemolyticus*의 ethanol 농도에 따른 생존수의 변화는 Fig. 3과 같다. -20°C 에서 *V. parahaemolyticus*는 저장초기부터 ethanol 농도에 따른 생존억제효과에 큰 차이를 나타내었으며 control에서 16일간의 저장기간동안 생존수는 3.36 log cycle 감소하였으나 ethanol 7%에서는 저장 8일, 5%에서는 저장 16일 만에 각각 사멸하였다. 이와같이 동결저장에서 ethanol에 의한 효율적인 항균효과는 Takano 등²³⁾이 laurate와 그 유도체 및 여러가지 화합물을 액체배지에 첨가하여 Gram 양성균과 Gram 음성균을 동결저장 하였을 때 이들 화합물이 우수한 항균효과를 나타낸 것과 같은 효과로 생각된다.

이러한 결과로 볼 때 이 세균이 저온에 대하여 예민하기 때문에 냉장(5°C)과 동결저장(-20°C)은 *V. parahaemolyticus*의 제거를 위한 효율적 방안으로 생각된다. 여러 연구자들의 실험결과^{24,25)}에서도 본 실험의 결과와 마찬가지로 이 세균이 저온에 대하여 예민한 점으로 미루어 볼 때 겨울철에는 이 세균이 해산물에서 거의 검출되지 않음^{4,8,26)}은 당연한 결과로 판단된다. 한편, 저온저장에서 저농도의 ethanol 첨가는 식중독세균의 제거효과를 증대시킬 수 있는 효율적인 방법이 될 것으로 예상된다.

3. 고온에서 Ethanol에 의한 생존억제효과

*V. parahaemolyticus*를 45°C 에 저장하였을 때 etha-

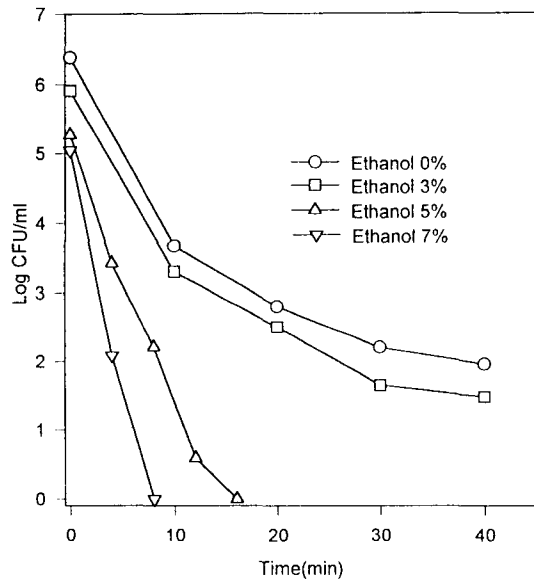


Fig. 5. Effect of ethanol on the survival of *Vibrio parahaemolyticus* incubated at 50°C .

nol이 세균의 생존에 미치는 영향은 Fig. 4와 같다. Ethanol 7%에서의 생존수는 저장직후에 타 농도의 생존수에 비하여 1 log cycle 정도 낮은 값을 나타내었다. 45°C 에서 40분간 저장하였을 때 control의 생존수는 2.41 log cycle 감소하였는데 *Vibrio*와 같은 중온균의 생육 최고온도²⁷⁾인 45°C 에서 이와 같이 큰 생존수의 감소를 나타낸 결과로

미루어 볼 때 본 실험에 사용한 균주는 열에 대한 내성이 대단히 약한 특성을 가진 것으로 추정된다. Ethanol 3%에서는 control의 생균수에 비하여 1 log cycle 정도 낮은 값을 나타내었으나 ethanol 5%와 7%에서는 저장 초기부터 생균수가 급격히 감소되어 각각 저장 20분과 10분 후에 사멸하였다.

50°C에 저장한 *V. parahaemolyticus*의 생균수의 변화는 Fig. 5와 같다. Ethanol농도의 증가에 따른 생균수의 변화는 저장직후부터 상당한 차이를 나타내어 ethanol 5% 이상의 농도에서 저장직후의 생균수는 control에 비하여 1~1.3 log cycle 낮은 값을 나타내었다. 40분간의 전 저장기간 동안, control의 생균수는 저장 초기에 비해 4.43 log cycle 감소하였으며 ethanol 3%의 경우에는 control의 생균수보다 약 0.5 log cycle 낮은 값으로서 두 ethanol 농도간에는 생균수의 차이가 크지 않았다. 그러나 ethanol 5%와 7%에서는 생균수가 저장초기부터 급격히 감소하여 저장 16분과 8분에 각각 사멸하였다.

Fig. 4와 5의 결과에서 control의 생균수의 변화를 비교하여보면 *V. parahaemolyticus*를 50°C에 40분간 저장한 경우의 생균수 감소는 같은 기간동안 45°C에 저장한 경우에 비해 약 1.9배 높은 사멸율을 나타내었다. 이와 같이 *V. parahaemolyticus*가 고온에서 빠른 속도로 사멸하는 것은 Vanderzant 등²⁵⁾이 새우 homogenate에 *V. parahaemolyticus*를 2×10^6 cells/ml로 접종하여 100°C에서 1분간 가열하였을 때 모두 사멸하였다고 보고한 것과 아주 비슷한 결과로 생각되며 본 실험에 사용했던 *V. parahaemolyticus*는 열에 대하여 대단히 약한 세균임을 다시 한번 확인할 수 있었다. 본 실험의 결과로 볼 때 식품에 함유된 *V. parahaemolyticus*는 적절한 가열조리에 의해 쉽게 사멸될 수 있을 것으로 판단된다.

본 실험에서 사용한 저농도의 ethanol은 저온저장에 비하여 고온에서 더욱 현저한 생균수의 감소효과를 나타내었으며 ethanol과 같은 항균제의 첨가는 보다 더 낮은 가열 온도와 더욱 짧은 가열시간내에 식품의 품질을 저하시키지 않고 세균을 제거시킬 수 있는 효율적 방법이 될 수 있을 것으로 기대된다.

IV. 요 약

액체배지에 첨가한 저농도의 ethanol(3~7%, v/v)이 *Vibrio parahaemolyticus*의 증식과 생존에 미치는 항균 작용 효과를 -20, 5, 35, 45, 50°C에서 조사하였다. 35°C에서의 *V. parahaemolyticus*의 증식은 ethanol농도의 증가와 더불어 저해되었으며, 5% ethanol의 존재하에서는 긴 유도기를 거친 후에 증식이 시작되었으나 ethanol 7%에서는 생균수는 계속 감소하여 사멸하였다. 3~7%의 ethanol을 함유한 액체배지에 $10^6 \sim 10^7$ cells/ml의 *V. parahaemolyticus*를 접종하여 저온(5°C, -20°C)과 고온(45°C, 50°C)에 저장하였을 때 고온에 저장한 *V. parahaemolyticus*의 생균수는 급격히 감소하였으며 ethanol농도가

증가할 수록 세균의 사멸율은 증가하였다.

감사의 글

본 연구는 1993년도 한국학술진흥재단의 자유공모(지방대학육성)과제 연구비에 의하여 수행된 연구결과의 일부이며, 연구비를 지원하여 준 학술진흥재단에 깊은 감사를 드립니다.

참고문헌

1. Abott, S.L., Powers, C., Kaysner, C.A., Takeda, Y., Ishibashi, M., Joseph, S.W. and Janda, J.M., Emergence of a restricted bioserovar of *Vibrio parahaemolyticus* as the predominant cause of *Vibrio*-associated gastroenteritis on the west coast of the United States and Mexico. *J. Clin. Microbiol.*, 27: 2891 (1989).
2. Blake, P., Merson, M., Weaver, R., Hollis, D. and Heublein, P., Disease caused by a marine *Vibrio*. Clinical characteristics and epidemiology. *New Engl. J. Med.*, 300: 1 (1979).
3. Hackney, C.R. and Dicharry, A., Seafood-borne bacterial pathogens of marine origin. *Food Technol.*, 42: 104 (1988).
4. Zen-Yozi, H., Sakai, S., Terayama, T., Kudo, Y., Ito, T., Benoki, M. and Nagasaki, M., Epidemiology, enteropathogenicity, and classification of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Infect. Dis.*, 115: 436 (1965).
5. Blake, P., Diseases of humans (other than cholera) caused by *Vibrios*. *Ann. Rev. Microbiol.*, 34: 341 (1980).
6. Martinez-Manzanares, E., Moringo, M.A., Castro, D., Balebona, M.C., Munoz, M.A., and Borrego, J.J., Relationship between indicators of fecal pollution in shellfish-growing water and the occurrence of human pathogenic microorganisms in shellfish. *J. Food Protect.*, 55: 609 (1992).
7. Liston, J., Microbial hazards of seafood consumption. *Food Technol.*, 44: 104 (1990).
8. Chun, D., Chung, J.K., Seol, S.Y., and Tak, R., *Vibrio parahaemolyticus* in the Republic of Korea. *Am. J. Trop. Med. and Hyg.*, 23: 1125 (1974).
9. Sakazaki, R., Pivnick, H., Jarvis, G., Goddard, M., Asakawa, Y., Barrow, G., Beuchat, L., Colwell, R., Gleeson, T., Gray, R., Nakanish, H., Sakai, S., Stavric, S., Takizawa, K., Tamura, K., Twedt, R., Vanderzant, C. and West, P., ICMSF methods studies. XVI. Comparison of salt polymyxin broth with glucose salt teepol broth for enumerating *Vibrio parahaemolyticus* in naturally contaminated samples. *J. Food Protect.*, 49: 773 (1986).
10. Vanderzant, C. and Thompson, C.A., Microbial flora and level of *Vibrio parahaemolyticus* of oyster (*Crassostrea virginica*), water and sediment from Galveston Bay. *J. Milk Food Technol.*, 36: 447 (1973).
11. Robach, M.C., Use of preservatives to control microorganisms in food. *Food Technol.*, 34: 81 (1980).
12. Giese, J., Antimicrobials: Assuring food safety. *Food Technol.*, 48: 102 (1994).

13. Brewer, M.S., Sprouls, G.K. and Russon, C., Consumer attitudes toward food safety issues. *J. Food Safety*, **6**: 29 (1983).
14. Shibasaki, I., Food preservation with nontraditional antimicrobial agents. *J. Food Safety*, **4**: 35 (1982).
15. Beuchat, L.R. and Golden, D.A., Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technol.*, **43**: 134 (1989).
16. Zaika, L.L., Spices and herbs: Their antimicrobial activity and its determination. *J. Food Safety*, **9**: 97 (1988).
17. Beuchat, L.R., Sensivity of *Vibrio parahaemolyticus* to spices and organic acids. *J. Food Sci.*, **41**: 899 (1976).
18. Shelef, L.A., Antimicrobial effects of spices. *J. Food Safety*, **6**: 29 (1983).
19. Ingram, L.O., Effects of alcohols on microorganisms. *Adv. Microbiol. Phys.*, **25**: 253 (1984).
20. Ballesteros, S.A., Chirife, J., and Bozzini, J.P., Antibacterial effects and cell morphological changes in *Staphylococcus aureus* subjected to low ethanol concentrations. *J. Food Sci.*, **58**: 435 (1992).
21. Shapero, M., Nelson, D.A. and Labuza, T.P., Ethanol inhibition of *Staphylococcus aureus* at limited water activity. *J. Food Sci.*, **43**: 1467 (1978).
22. U.S. Food and Drug Administration, *Bacteriological analytical manual*, 7th ed., Association of Official Analytical Chemists. Arlington, VA, p. 523 (1992).
23. Takano, M., Simbol, A.B., Yasin, M. and Shibasaki, I., Bactericidal effect of freezing with chemical agents. *J. Food Sci.*, **44**: 112 (1979).
24. Matches, J.R., Liston, J., and Daneault, L.P., Survival of *Vibrio parahaemolyticus* in fish homogenate during storage at low temperatures. *Appl. Microbiol.*, **21**: 951 (1971).
25. Vanderzant, C. and Nickelson, R., Survival of *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp tissue under various environmental conditions. *Appl. Microbiol.*, **23**: 34 (1972).
26. Kaneko, T. and Colwell, R.R., Ecology of of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. *J. Bacteriol.*, **113**: 24 (1973).
27. Lee, J.S., What seafood processors should know about *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Milk Food Technol.*, **36**: 405 (1973).