

식염용액에서 휴지(休止)미생물 세포의 사멸

강영미 · 경규항 · 박세원* · 유양자* · 김연순**

세종대학교 식품공학과, *가정학과, **조선대학교 가정교육과

Death of Non-growing Microbial Cells in Saline

Young Mi Kang, Kyu Hang Kyung, Se Won Park*, Yang Ja Yoo* and Youn Soon Kim**

Department of Food Science and *Department of Home Economics, Sejong University

**Department of Home Economy Education, Chosun University

Abstract

Death of non-growing microorganisms in saline was studied to observe the inhibitory effect of NaCl in foods on the viability of microorganisms. When *Leuconostoc mesenteroides* LA10, *Staphylococcus aureus* B31 and *Escherichia coli* B34 were incubated in McIlvaine buffer with 0, 10, 20, 30% NaCl at 30°C, they survived best at pH 6, 5, 7, respectively. The survival of 5 lactic acid bacteria, 9 other bacteria and 2 yeasts was tested at pH 5, 6, 7 with 10% NaCl. Gram-positive bacteria survived in saline better than Gram-negative bacteria, and lactic acid bacteria and *S. aureus* survived better than other bacteria. The number of survivors decreased as concentrations of NaCl increased and as pH moved to acidic or alkaline side from the above-mentioned. When *L. mesenteroides* LA10 was incubated in saline with those materials which are known to protect microorganisms from the killing effect of NaCl, protective effect was not observed.

Key words: non-growing microorganisms, saline, viability

서 론

식염은 식품의 저장성을 향상시키기 위하여 사용되어 온 첨가제로서 식품의 풍미를 증진시키고 많은 발효식품에서 선택적인 미생물의 번식을 유도하여 젖산 발효가 잘 이루어지도록 하는 데, 식염의 미생물에 대한 번식저해 또는 사멸작용은 탈수작용, 불가역적인 원형질의 분리, 효소활성저해, Cl⁻ ion의 독작용, 산소 용해도 감소 및 CO₂에 대한 감수성을 높이기 때문인 것으로 알려져 있다⁽¹⁾.

미생물의 식염에 대한 사멸원인에 대한 자료를 보면 Elerk⁽²⁾는 staphylococci에 대한 손상효과가 일가와 이가염의 적당한 비율의 필요성 때문이라고 하였고, Laurell⁽³⁾은 생리적 식염수에서 세균의 사멸이 식염때문이 아니라 회석하는 동안에 Cu, Ag, Hg와 같은 중금속과의 접촉에 의한 물의 복합적인 독작용(oligodynamic toxic effect)에 기인한다고 하였으나 그의 가설을 지지할 만한 분석적인 자료는 제시하지

않았다. Sato 등⁽⁴⁾은 세포로부터 Mg ion의 손실과 관계있다고 하였으며 Christian 등⁽⁵⁾은 비호염성균의 내염성은 세포내 potassium을 축적하는 능력과 관계있으며 구균에 비해 간균의 내염성이 더 낮다고 하였다.

식염의 보존료로서의 작용은 potassium sorbate와 sodium benzoate와 함께 2%를 첨가하였을 때 *Escherichia coli*와 *Salmonella typhimurium*에 생육저해작용이 있음이 보고되었다⁽⁶⁾. Larocco와 Martin⁽⁷⁾은 *S. typhimurium*의 경우 0.3% potassium sorbate와 3% NaCl의 병용처리가 대조구에 비해 유도기가 12시간 연장되었고 생균수도 감소되었다고 보고하였다.

이렇게 식염에 관한 연구들은 대부분 특정배지에 식염을 첨가하여 균주의 생육저해를 연구한 것⁽⁸⁻¹⁵⁾으로서, 식염자체의 미생물사멸작용에 관한 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구는 식염의 농도와 이에 따른 번식하지 않는 미생물(non-growing microorganisms)의 사멸현상을 연구하고, 식염용액에서 미생물 세포의 보호작용에 관한 연구를 하여 식염이 중요한 발효식품 등에서 미생물 사멸에 관한 기초정보를 얻는 것을 목표로 하였다.

Corresponding author: Kyu Hang Kyung, Department of Food Science, Sejong University, Kwangjin-ku, Seoul 143-747, Korea

재료 및 방법

사용균주 및 배양

본 실험에 사용된 균주는 세종대학교 식품미생물 실험실에 보관중인 *Leuconostoc mesenteroides* LA10과 LA183, *Lactobacillus plantarum* LA97, *L. brevis* LA 200, *Pediococcus pentosaceus* LA3, *Bacillus subtilis* BI7과 B96, *Listeria monocytogenes* B67과 B70, *Staphylococcus aureus* B31과 B33, *Enterobacter aerogenes* B146, *Escherichia coli* B34, *Salmonella typhimurium* B 38, *Hansenula mrakii* Y27, *Saccharomyces cerevisiae* Y6을 사용하였다.

젖산균과 세균은 tryptic soy agar (Difco Laboratories, Detroit, MI, U.S.A.), 효모는 YMPG [yeast extract (0.3%)-malt extract (0.3%)-peptone (0.5%)-glucose (1%)] 고체 배지에 30°C에서 48시간동안 배양한후 각각 젖산균은 Lactobacilli MRS broth (Difco Lab.)에, 세균은 tryptic soy broth (Difco Lab.)에, 효모는 YMPG 액체배지에 접종하여 30°C에서 24시간 정치배양시킨 종균을 1% 접종하였다.

완충용액과 식염용액의 제조

2배 희석한 McIlvaine buffer⁽¹⁾ (pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.2, 8.0), Smith buffer⁽¹⁾ (pH 4.4, 5.0, 6.0, 7.2, 8.0) 및 pHHydrion buffer (Micro Essential Lab., N.Y., U.S.A.: pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.2, 8.0)를 이용하여 0, 10, 20, 30% (W/V) NaCl (Merck Chem. Co., Darmstadt, Germany)용액을 제조하였다. 보호물질의 검색을 위해서는 10% 식염용액에 glycine betaine, cysteine, glutathione (Aldrich Chem. Co., Milwaukee, WI, U.S.A.), glucose (Duksan Pharmaceutical Co., Seoul), yeast extract, malt extract (Difco Lab.), magnesium acetate (Katayama Chem. Co., Osaka, Japan)를 각각 0.1% 첨가하여 121°C에서 15분간 살균하여 사용하였다.

종균의 접종 및 균수측정

활성화된 종균을 4000×g에서 무균적으로 1분간 원심분리(microcentrifuge 5415C, Eppendorf, Germany)하여 상등액은 버리고 0.87% 살균식염수로 2회 세척한 뒤 1%씩 접종한 다음 24시간동안 120 rpm에서 진탕하였다. 균수측정은 접종후 24시간에 배양액을 취하여 적절히 희석한 후 plate count agar (PCA; Difco Lab.)에 평판주거법으로 접종하고 30°C에서 48시간 배양한 후 나타난 집락수를 접종직후(0시간)의 미생물수에 대한 잔존미생물의 백분율로 계산하였다.

pH 측정

pH meter (Dongwoo Medical System, Model DP-215M)을 사용하여 pH를 측정하였다.

결과 및 고찰

접종방법과 식염용액에서의 미생물의 사멸현상

L. mesenteroides LA10을 10% 식염용액에 접종하여 24시간후의 생존율을 실험한 결과 접종방법의 차이에 따라 현저한 차이가 있었다(Table 1). 종균을 세척하여 접종하였을 때는 그 사멸의 정도가 매우 미미한 데 반해 세척하지 않고 접종하였을 때는 사멸정도가 컸다. 이에 두 접종방법에 따른 차이가 대사산물에 의한 pH의 감소때문일 것으로 추정하고 이를 확인하기 위해 10% 식염용액에 0.01%의 젖산을 첨가하여 24시간후에 균수를 측정된 결과 모두 사멸하여 생존균이 없었다. 이때 젖산 0.01%는 세척하지 않은 종균을 1% 접종하였을 때 첨가되는 젖산의 양으로 식염용액의 pH를 3.4~3.5가 되도록 하였다. 따라서 식염용액의 pH가 미생물의 사멸에 큰 영향을 미치는 인자인 것을 알게 되었으나 증류수로 제조한 식염용액은 증류수자체의 pH의 변동이 심하여 pH 조절에 어려운 점이 많았기 때문에 완충용액을 사용하게 되었고 완충물질의 영향을 최소화하기 위하여 2배 희석한 완충용액을 사용하여 pH를 일정하게 조정하는 방법을 채택하였다.

완충용액에 따라서 미생물의 사멸에 다른 영향을 미칠 수 있으므로 이를 비교하기 위하여 McIlvaine buffer, pHHydrion buffer와 Smith buffer로 제조된 10% 식염용액을 이용하여 시험한 결과(Fig. 1) 완충용액의 종류에 따라 미생물의 생존율에 차이가 없었으므로 여러 완충용액중 어느 하나를 사용하여도 문제가 없을 것으로 판단되어 이후의 실험에서 McIlvaine buffer를 사용하였다.

Table 1. Survival of *L. mesenteroides* LA10 in 10% NaCl¹⁾ with different inoculation methods²⁾

Solution	Inoculum	Survival (%)	pH after inoculation
10% NaCl	not washed	0.5	4.3
		3.7	4.5
10% NaCl	washed	65.4	6.7
		100	7.3
10% NaCl +0.01% lactic acid	washed	0	3.5
		0	3.4

¹⁾Unbuffered solution.

²⁾Average of duplicate experiments.

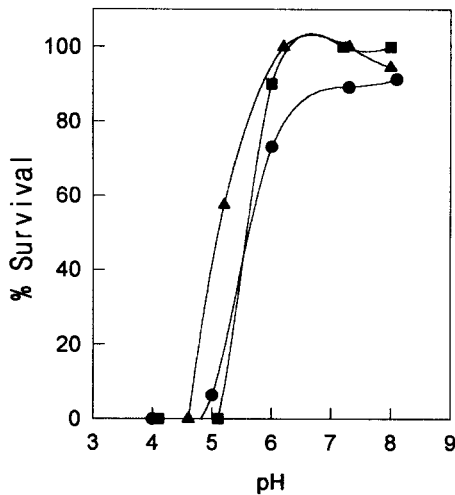


Fig. 1. Survival of *L. mesenteroides* LA10 at 30°C with 10% NaCl at different pH by using different buffer. ●—●: Mcllvaine buffer, ■—■: pHydrion buffer, ▲—▲: Smith buffer.

식염농도와 pH에 따른 사멸현상

L. mesenteroides LA10은 2배 희석한 Mcllvaine buffer로 제조한 0, 10, 20, 30% 식염용액에서 pH 6을 중심으로 pH 5~7 부근에서 가장 안정한 범위를 가졌다 (Fig. 2A). 위의 안정 pH 범위에서 식염농도를 0, 10, 20, 30%로 하였을 때 최대 생존율은 각각 73, 89, 63, 58%로서 식염농도가 상승함에 따라 생존율은 낮아졌다. *S. aureus* B31 (Fig. 2B)은 pH 7 부근에서 가장 안정한 범위를 가졌으며 0, 10, 20, 30% NaCl의 농도에

서의 생존율은 각각 90, 75, 55, 42%로서 식염농도가 증가함에 따라 *S. aureus*의 생존율은 감소되었다. *E. coli* B34 (Fig. 2C)의 가장 안정한 범위는 pH 5 부근이었으며 0, 10, 20, 30% 식염농도에서 생존율은 각각 100, 4.94, 1.02, 0.25%로서 *E. coli*도 역시 식염농도가 증가함에 따라 생존율이 감소하였고 생존숫자의 차이는 *L. mesenteroides*와 *S. aureus*에 비해 매우 적게 나타나서 위의 두 다른 세균에 비해 식염에 대한 내성이 낮은 것으로 판단된다.

10% 식염용액의 pH를 5, 6, 7로 조정하고 젖산균 5종과 일반세균 9종 및 효모 2종의 총 16종의 균주의 생존율을 비교실험해 본 결과(Table 2) 그람양성균이 그람음성균에 비해 식염내성정도가 대체로 높았으며 그람양성균 중에서도 젖산균이 식염에 대한 내성이 두드러지게 컸고 일반세균 중에서는 *S. aureus*가 큰 것으로 나타났다. 식염용액의 pH가 미생물의 사멸에 결정적인 영향을 미치고 있었으나 미생물에 따라 식염에 대한 내성이 강한 pH는 달랐는데 이는 각 미생물의 특성에 속하는 것으로 사료되는데 *L. mesenteroides* LA10과 *S. aureus* B33은 pH 6~7, *L. mesenteroides* LA183, *B. subtilis* B17과 *L. monocytogenes* B70은 pH 5~7 사이에 차이가 없이 안정한 편이었고 *L. plantarum* LA97과 *S. aureus* B31은 pH 7, *L. brevis* LA 200은 pH 6, *P. pentosaceus* LA3, *L. monocytogenes* B 67과 *H. mrakii* Y27은 pH 5일 때 생존율이 가장 높았다. *B. subtilis* B96, *E. aerogenes* B146, *S. typhimurium* B38 및 *S. cerevisiae* Y6은 모두 식염 10% 용액에서 잔존균수가 매우 적은 것으로 보아 식염내성이 약

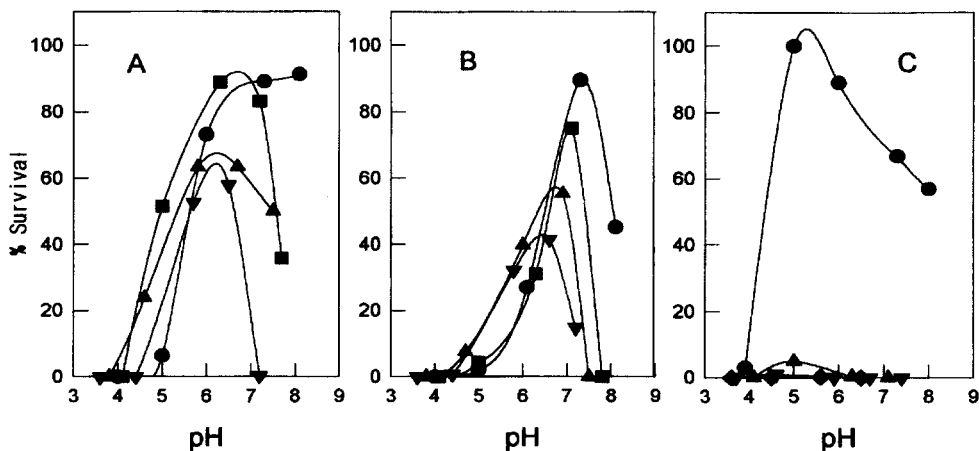


Fig. 2. Survival of bacteria at 30°C in Mcllvaine buffer with different amounts of NaCl at different pH. A: *L. mesenteroides* LA10, B: *S. aureus* B31, C: *E. coli* B34, ●—●: 0% NaCl, ■—■: 10% NaCl, ▲—▲: 20% NaCl, ▼—▼: 30% NaCl.

Table 2. Survival of microorganisms in McIlvaine buffer with 10% NaCl

Microorganisms		Survival (%)			
		pH 5	pH 6	pH 7	
Gram positive bacteria	Lactic acid bacteria	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	52.3	87.9	83.2
		<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	19.9	19.7	20.7
		<i>Lactobacillus plantarum</i>	42.3	71.3	92.7
		<i>Lactobacillus brevis</i>	30.1	92.9	11.9
		<i>Pediococcus pentosaceus</i>	97.6	10.4	19.3
	Other bacteria	<i>Bacillus subtilis</i>	61.4	59.9	44.8
		<i>Bacillus subtilis</i>	1.1	1.9	1.5
		<i>Listeria monocytogenes</i>	21.3	6.1	10.6
		<i>Listeria monocytogenes</i>	7.5	5.5	5.2
		<i>Staphylococcus aureus</i>	4.3	31.1	75.1
Gram negative bacteria	<i>Enterobacter aerogenes</i>	0.7	1.5	0	
	<i>Escherichia coli</i>	2.3	0.4	0	
	<i>Salmonella typhimurium</i>	1.7	1.5	1.5	
Yeasts	<i>Hansenula mrakii</i>	68.5	43.0	22.4	
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.9	0.1	0.1	

한 것으로 판단되었다.

Genigeogris와 Sadler⁽⁸⁾는 BHI broth에 2~16% 식염을 가하고 pH를 5.1~6.9로 맞추어 *S. aureus*의 생육여부를 실험하였을 때 pH 5.1일 때는 4% 이하의 식염용액에서만 성장하였으나 pH 6.9에서는 16% 식염용액에서도 성장하여 *S. aureus*의 성장이 식염농도 외에도 pH에 따라서 크게 영향받았다는 보고와 Conner 등⁽¹⁴⁾은 *L. monocytogenes*를 0~5% NaCl을 첨가한 양배추즙에 배양하였을 때 pH가 감소함에 따라 불활성화율은 증가하였다는 보고를 볼 때 식염을 첨가하였을 때 미생물의 사멸에 pH가 매우 중요한 영향인자임을 알 수 있었다.

식염용액에서의 보호물질의 효과

Yeast extract⁽¹⁷⁾, betaine^(18,19), magnesium acetate^(4,20), proline^(21,22) 등은 식염의 저해작용으로부터 미생물을 보호한다고 알려져 있다. 본 연구에서는 yeast extract, malt extract와 포도당을 각각 0.1% 첨가하여 제조한 10% 식염용액에서의 생존율과 대조군의 생존율을 비교하였을 때(Fig. 3) 어느것에서도 실험미생물(*L. mesenteroides* LA10, *E. coli* B34와 *S. aureus* B31)에 대한 보호효과가 관찰되지 않았다(*E. coli*와 *S. aureus*의 결과는 나타내지 않았음). 이와 같은 결과는 미생물의 식염에 대한 내성을 증진시켜 주는 물질들은 미생물의 식염내성을 주는 성분이 함유되어 있기 때문이 아니라 증류수로 제조된 식염수의 pH는 아주 적은 양의 물질에 의해서 민감하게 변화되는 데, 위의 물질을 첨가하였을 때 완충작용이 없는 식염용액의 pH의 상승

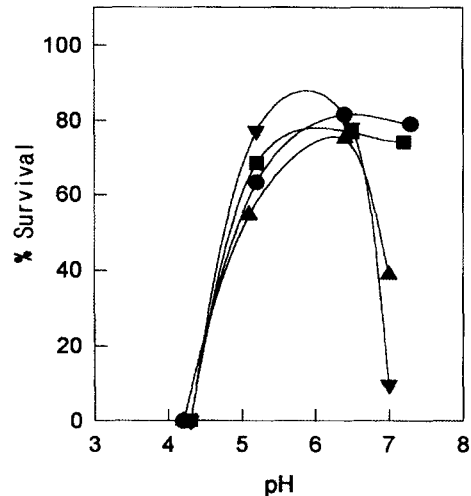


Fig. 3. The effects of different materials at pH 4-7 in Mallvaine buffer with 10% NaCl on *L. mesenteroides* LA10. ●—●: 10% NaCl control, ■—■: 0.1% yeast extract, ▲—▲: 0.1% malt extract, ▼—▼: 0.1% glucose.

으로 인해 미생물의 생존율에 영향을 미쳤던 것으로 판단된다. 실제로 yeast extract, betaine, magnesium acetate, proline은 각각 pH 5.6이던 10% 식염용액의 pH를 5.88, 5.73, 6.33 및 5.85로 높여주는 효과가 있었다(결과는 따로 나타내지 않았음).

이상의 결과로 보아 순수한 식염의 미생물사멸현상을 연구하기 위해서는 여러가지 환경요인에 의한 영향을 최대한 배제해야 하는데 이를 위해서는 더욱 다각적인 면에서의 검토가 필요하다고 사료된다.

요 약

식염용액에서 휴지미생물(non-growing microorganisms)의 사멸현상과 식염용액에서 미생물의 보호작용이 있다고 알려진 물질의 작용을 시험하였다. *L. mesenteroides* LA10, *S. aureus* B31와 *E. coli* B34를 완충용액으로 제조한 0, 10, 20, 30%의 식염용액에서 배양하였을 때 각각 pH 6, 7, 5 부근에서 가장 높은 생존율을 나타내었고, 이 pH로부터 산성 또는 염기성쪽으로 변화시키거나 식염농도가 증가할 수록 생존율이 감소하였다. 젖산균 5종과 일반세균 9종 및 효모 2종의 균주를 pH 5, 6, 7로 조절한 10% 식염용액에서 실험해 본 결과 식염에 내성이 강한 pH는 미생물마다 달라 이는 균주의 특성에 속하는 것으로 사료되며 그람양성균이 그람음성균에 비해 식염내성이 높았으며 그람양성균 중에서도 젖산균이 식염에 대한 내성이 두드러지게 컸고 일반세균에서는 *S. aureus*가 큰 것으로 나타났다. 식염농도의 영향은 물론 pH가 식염용액에서 미생물의 사멸에 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다. 식염의 미생물 생육저해작용으로부터 미생물을 보호한다고 알려진 물질들의 보호작용은 관찰되지 않았다.

감사의 글

본 연구는 조선대학교 1997학년도 교내연구비지원(김연순)에 의해 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

문 헌

- Frazier, W.C. and Westhoff, D.C.: Food microbiology (fourth ed.). McGraw-Hill Book Co., New York, p.151. U.S.A. (1988)
- Elerk, S.D.: *Staphylococcus pyogenes*, E. & S. Livingstone Ltd., London, p.415 (1959)
- Laurell, A. : The effect of physiological salt solution on *Staphylococcus pyogenes aureus*. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Suppl.*, **16**, 204-218 (1933)
- Sato, T. Izaki, K. and Takahashi, H.: Recovery of cells of *Escherichia coli* from injury induced by sodium chloride. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **18**, 307-317 (1972)
- Christian, J.H.B. and Waltho, J.A.: The sodium and potassium content of non-halophilic bacteria in relation to salt tolerance. *J. Gen. Microbiol.*, **25**, 97-102 (1961)
- Cho, N.S., Yang, Y.Y. and Choi, E.H.: Combination effect of potassium sorbate and sodium benzoate with sodium chloride on the growth of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **18**, 249-254 (1986)
- Larocco, K.A. and Martin, S.E.: Effect of potassium sorbate alone and in combination with sodium chloride on the growth of *Salmonella typhimurium* 7136. *J. Food Sci.*, **46**, 568-573 (1981)
- Genigeogris, C. and Sadler, W.W.: Effect of sodium chloride and pH on enterotoxin B production. *J. Bacteriol.*, **92**(5), 1383-1387 (1966)
- Conner, D.E.: Temperature and NaCl affect growth and survival of *Escherichia coli* 0157:H7 in poultry-based and laboratory media. *J. Food Sci.*, **57**(2), 532-533 (1992)
- Chapman, G.H.: The significance of sodium chloride in studies of staphylococci. *J. Bacteriol.*, **50**, 201-203 (1945)
- Conner, D.E., Scott, V.N. and Bernard, D.T.: Growth, inhibition, and survival *Listeria monocytogenes* as affected by acidic conditions. *J. Food Prot.*, **53**(8), 652-655 (1990)
- Glass, K.A., Loeffelholz, J.M., Ford, J.P. and Doyle, M.P.: Fate of *Escherichia coli* 0157:H7 as affected by pH or sodium chloride and in fermented, dry sausage. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2513-2516 (1992)
- Smith, R.B. : Influence of pH and NaCl on the growth of yeasts isolated from high acid food products. *J. Food Sci.*, **42**(6), 1552-1553 (1977)
- Conner, D.E., Brackett, R.E. and Beuchat, L.R.: Effect of temperature, sodium chloride, and pH on the growth of *Listeria monocytogenes* in the cabbage juice. *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**(1), 59-63 (1986)
- McDonald, L.C., Fleming, H.P. and Daeschel, M.A.: Acidification effects on microbial populations during initiation of cucumber fermentation. *J. Food Sci.*, **56**(5), 1353-1356 (1991)
- Perrin, D.D. and Dempsey, B.: *Buffers for pH and metal ion control*. Halsted Press (1974)
- Ibrahim, S.A. and Bezkorovainy, A.: Growth-promoting factors for *Bifidobacterium longum*. *J. Food Sci.*, **59**(1), 189-191 (1994)
- Hutkins, R.W., Ellefson, W.L. and Kashket, E.R.: Betaine transport imparts osmotolerance on a strain of *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**(10), 2275-2281 (1987)
- Roth, W.G., Leckie, M.P. and Dietzler, D.N.: Restoration of colony-forming activity in osmotically stressed *Escherichia coli* by betaine. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**(12), 3142-3146 (1988)
- Sato, T., Suzuki, Y., Izaki, K. and Takahashi, H.: Some features of saline-sensitive phenomenon in *Escherichia coli*-protection and recovery by magnesium ion. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **17**, 371-382 (1971)
- Grothe, S., Krogsrud, R.L., McClellan, D.J., Milner, J.L. and Wood, J.M.: Proline transport and osmotic stress response in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, **166**(1), 253-259 (1986)
- Kashket, E.R.: Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiol. Review*, **46**, 233-244 (1987)