

유기산이 *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* 및 *Listeria monocytogenes*의 증식에 미치는 영향

장재선[†] · 이해정 · 오보영* · 이제만* · 고종명* · 김용희*
가천의과대학고 식품영양학과, *인천광역시 보건환경연구원
(2007. 10. 4. 접수/2007. 10. 20. 채택)

Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* by Organic Acid

Jae Seon Jang[†] · Hye Jeong Lee · Bo Young Oh* · Jea Mann Lee* ·
Jong Myeong Go* · Yong-Hee Kim*

Department of Food & Nutrition, Gachon University of Medicine and Science
*Health and Environment Research Institute, Incheon
(Received October 4, 2007/Accepted October 20, 2007)

ABSTRACT

The inhibitory effect of the food processing agent on growth of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Enteritidis, and *Listeria monocytogenes* was performed with organic acid, and combination of citric acid, acetic acid, propionic acid and vanillic acid. The minimum inhibitory concentration(MIC) of propionic acid was 5,000 ppm in *E. coli* O157:H7, 2,500 ppm in *Salmonella* Enteritidis and *Listeria monocytogenes*. MIC of citric acid was 10,000 ppm in *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* Enteritidis, 2,500 ppm in *Listeria monocytogenes*. MIC of acetic acid was 2,500 ppm, while in vanillic acid was 5,000 ppm in *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Enteritidis, and *Listeria monocytogenes*. MIC of combined organic acid in *E. coli* O157:H7 were 2,500 ppm in PC, 1,250 ppm in PA, PV, CA, CV and AV. MIC of combined organic acid in *Salmonella* Enteritidis were 2,500 ppm in PC, PA, PV, CA, and CV, 1,250 ppm in AV. MIC of combined organic acid in *Listeria monocytogenes* were 1,250 ppm in all treatment group. MIC of combined treatment of three organic acid in *E. coli* O157:H7, *S. Enteritidis* and *L. monocytogenes* were 1,250 ppm in PCA, PCV, PAV and CAV. The inhibitory effect of organic acid in *E. coli* O157:H7, *S. Enteritidis* and *L. monocytogenes* could be confirmed from the result of this experiment. Therefore, it was expected that the food process would increase or maintain by using organic acid.

Keywords: *E. coli* O157:H7, *S. Enteritidis*, *L. monocytogenes*, Organic acid, MIC

I. 서 론

식물성 식품은 가열과정 없이 바로 섭취되는 식품임을 고려할 때 원료 생산지의 오염이나 조리과정 중의 교차오염으로 인해 변질·부패되거나 병원균에 감염될 가능성도 있으므로 식품위생상 중요한 문제를 일으킬 수 있다.¹⁾

식품으로 인한 식중독원인균으로는 *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Enteritidis와 *Listeria monocy-*

togenes 등이 있는데 *E. coli* O157:H7는 출혈성 장염, 혈소판 감소성 자반증, 용혈성 요독증후군 등을 유발시키며 verotoxin을 생산하는 균으로 알려지고 있다.²⁾ *Salmonella*는 장염, 장기의 패혈증을 동반한 국소성병소 등을 일으키는 식중독 세균이며,³⁾ *L. monocytogenes*는 그람 양성인 단간균으로 사람과 동물에게 화농성 뇌막염, 패혈증, 유산 등 listeriosis를 유발시키는 치명적인 식중독 세균이다.⁴⁾

*Salmonella*균은 수입된 채소류 103개 시료 중 23개에서 분리된 바 채소인 경우도 오염정도가 높았다고 보고되고 있는데,⁵⁾ 또한 조리되지 않은 채 먹는 채소류인 경우 대장균이 48% 검출되어, 환경위생의 개선 및 식품위생교육의 필요성이 요구되고 있다.⁶⁾ 이탈리아의 소

[†]Corresponding author : Department of Food & Nutrition, Gachon University of Medicine and Science
Tel: 82-32-820-4223, Fax: 82-32-820-4230
E-mail : jsjang@gachon.ac.kr

매점에서 구입한 상추에서 일반세균이 100 g당 6.6×10^7 , 대장균군이 5.9×10^4 , 장구균이 2.24×10^3 이 검출되었다고 보고하였으며,⁷⁾ 코스타리카에서의 오이 샐러드를 조사한 결과 *L. monocytogenes*가 20% 분리되었다고 보고하고 있다.⁸⁾

주로 채소류는 열을 가하지 않고 생식하는 경우가 많으므로 식품에서의 이들 식중독 미생물에 대한 연구가 진행되고 있으며,^{9,10)} 특히 유기산의 첨가에 따른 식중독세균의 억제 방안에 관한 많은 연구가 진행되고 있다.¹¹⁻¹³⁾

본 연구는 유기산의 단독 및 병용 처리함으로써 *E. coli* O157:H7, *S. Enteritidis*, *L. monocytogenes*의 증식 억제에 미치는 영향과 새로운 식품위생처리공정방안을 모색함으로써 소비자에게 보다 안전한 식품을 제공함으로써 국민보건에 기여하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 균주

본 실험에 사용한 균주는 *E. coli* O157:H7은 NCPP 11142를, *S. Enteritidis*는 NCPP 10744를, *L. monocytogenes* NCPP 10943를 사용하였다. 실험 균주는 1% peptone, 37% glycerol에 진하게 부유시킨 다음 -70°C 에 동결 보존하면서 사용하였다.

2. 유기산 실험용액의 조제

Citric acid, acetic acid, propionic acid, vanillic acid (4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid)는 Sigma Aldrich (USA)사에서 구입하였다. 모든 유기산을 멸균 Muller Hinton broth로 희석하여 3% 농도로 제조한 후 vanillic acid를 제외한 산을 0.45 μm membrane filter (Whatman)로 제균 여과하여 사용하였다.

3. 균주 배양 및 현탁액 조제

-70°C 로 보관된 실험 균주를 tryptic soy agar (Difco)에서 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 24시간 3회 계대 배양하여 순수 배양하였다. 이 중 전형적인 집락을 따서 멸균 생리식염수에 현탁시켜 McFarland Scale No. 0.5(1% $\text{BaCl} + \text{H}_2\text{SO}_4$ 99.5 ml : 1.5×10^9 CFU/ml)에 맞춘 후 이를 100 ml에 희석한 액을 표준 균액으로 사용하였다.

4. 실험균에 대한 유기산의 단독처리시 최소발육억제농도 실험

유기산을 일정 농도로 조제한 후 8개의 시험관을 배열하고 Muller Hinton broth를 제1시험관에는 1 ml을,

나머지 시험관에는 0.5 ml씩 분주하였다. 그 다음 3%로 희석한 유기산 용액 0.5 ml를 제1시험관에 가하여 잘 혼합(초기농도:1%)한 다음 0.5 ml를 뽑아서 제2시험관에 옮기고 잘 혼합한 0.5 ml를 제3시험관에 옮긴다. 이러한 조작을 제8시험관까지 하여 2배 계단 희석된 유기산을 함유한 배지에 100배 희석한 균액을 0.5 ml씩 8개 시험관에 접종하였다. 37°C 에서 48시간 동안 정지 배양한 다음 균의 증식(배지의 혼탁유무) 유무를 세균이 증식하지 않은 최저 발육억제농도를 결정하였다.

5. 실험균에 대한 유기산의 병용처리시 최소발육억제농도 실험

유기산의 병용 처리는 8개의 시험관에 Muller Hinton broth를 0.5 ml씩 분주한 후 제1시험관에 3%로 준비한 유기산을 각각 0.5 ml씩 가하여 2종류의 유기산이 각각 1%씩 배지에 포함되게 하였다. 3가지 유기산을 병용처리 했을 때의 방법은 제1시험관을 제외한 나머지 7개 시험관에 Muller Hinton broth를 0.5 ml씩 분주한 후 제1시험관에 3%로 준비한 유기산을 각각 0.5 ml씩 가하여 3종류의 유기산이 각각 1%씩 배지에 포함되게 하였다. 37°C 에서 48시간 동안 정지배양한 다음 균의 증식(배지의 혼탁유무) 유무를 세균이 증식하지 않은 최저 발육억제농도를 결정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. *E. coli* O157:H7, *S. Enteritidis* 및 *L. monocytogenes*에 대한 유기산별 최소발육억제농도(MIC)

E. coli O157:H7, *S. Enteritidis* 및 *L. monocytogenes*에 대한 유기산의 종류별 최소발육억제농도(MIC)에 관한 결과는 Table 1, 2, 3과 같다.

E. coli O157:H7에 대한 유기산별 최소발육억제농도는 프로피온산과 바닐린산에서는 5,000 ppm에서 발육이 억제되었으며, 구연산에서는 10,000 ppm, 아세트산에서는 2,500 ppm에서 발육이 억제되었다. *S. Enteritidis*에 대한 유기산별 최소발육억제농도는 프로피온산과 아세트산에서는 2,500 ppm에서 발육이 억제되었으며, 구연산에서는 10,000 ppm, 바닐린산에서는 5,000 ppm에서 발육이 억제되었다. *L. monocytogenes*에 대한 유기산별 최소발육억제농도는 프로피온산, 아세트산, 구연산에서 2,500 ppm에서 발육이 억제되었으며, 바닐린산에서는 5,000 ppm에서 발육이 억제되었다.

Venkitanaryanan 등¹⁴⁾은 사과, 오렌지, 토마토를 대상으로 유산과 과산화수소 혼합용액에서 40°C 에서 15분간 처리할 때 균 증식이 억제되었다고 보고하였고, Lin

Table 1. MICs of organic acid in *E. coli* O157:H7

	Concentration of Organic acid in <i>E. coli</i> O157:H7(ppm)						
	5000	2500	1250	625	312	156	78
Propionic acid	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Citric acid	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Acetic acid	-	-	+++	+++	+++	+++	+++
Vanillic acid	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++

+: growth, -: no growth.

Table 2. MICs of organic acid in *Salmonella* Enteritidis

	Concentration of Organic acid in <i>Salmonella</i> Enteritidis(ppm)						
	5000	2500	1250	625	312	156	78
Propionic acid	-	-	+++	+++	+++	+++	+++
Citric acid	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Acetic acid	-	-	+++	+++	+++	+++	+++
Vanillic acid	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++

+: growth, -: no growth.

Table 3. MICs of organic acid in *Listeria monocytogenes*

	Concentration of Organic acid in <i>Listeria monocytogenes</i> (ppm)						
	5000	2500	1250	625	312	156	78
Propionic acid	-	-	+++	+++	+++	+++	+++
Citric acid	-	-	+++	+++	+++	+++	+++
Acetic acid	-	-	+++	+++	+++	+++	+++
Vanillic acid	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++

+: growth, -: no growth.

등¹⁴⁾과 장 등¹⁵⁾도 식중독균인 *E. coli* O157:H7, *S. Enteritidis*의 증식 억제에 미치는 영향에 대해 실험한 결과 유산에 대한 *E. coli* O157:H7의 최소발육억제농도는 pH 6.5에서 2500 ppm이었으며, *S. Enteritidis*는 pH 5.0에서는 1250 ppm에서 발육이 억제되었으며 *L. monocytogenes*의 최소발육억제농도는 pH 6.5에서 125 ppm로 나타났다. 이에 본 실험 결과 *E. coli* O157:H7, *S. Enteritidis* 및 *L. monocytogenes*도 유기산인 citric acid, acetic acid, propionic acid, vanillic acid 처리로 식중독 세균의 증식억제 효과가 있는 것으로 판명되었다.

2. *E. coli* O157:H7, *S. Enteritidis* 및 *L. monocytogenes*에 대한 유기산별 병용처리시 최소발육억제농도(MIC)

E. coli O157:H7, *S. Enteritidis* 및 *L. monocytogenes*에 대한 유기산의 종류별 병용처리시 최소발육억제농도(MIC)에 관한 결과는 Fig. 4~7과 같다.

E. coli O157:H7에 대하여 프로핀산과 구연산을 병용 처리한 최소발육억제농도는 2,500 ppm이었으며, 프로핀산과 아세트산, 프로핀산과 바닐린산, 구연산과 아세트산, 구연산과 바닐린산, 아세트산과 바닐린산을 1,250

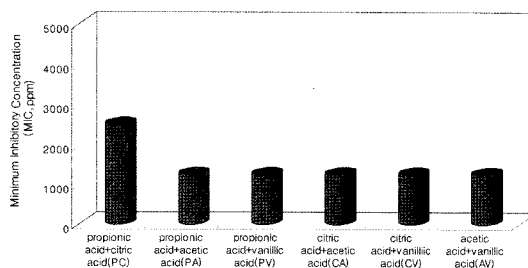


Fig. 1. Minimum inhibitory concentration of combined organic acid in *E. coli* O157:H7.

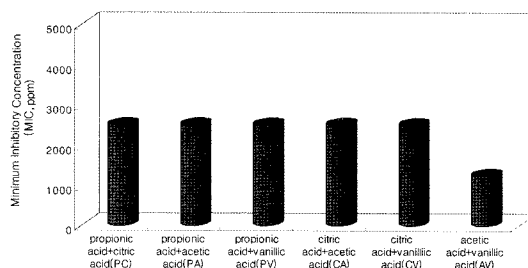


Fig. 2. Minimum inhibitory concentration of combined organic acid in *S. Enteritidis*.

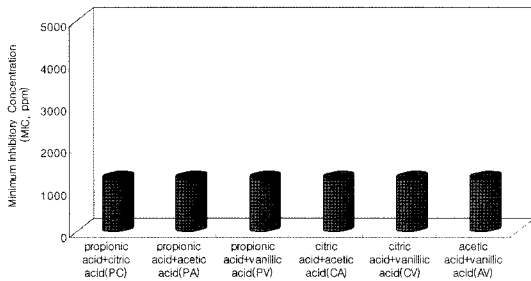


Fig. 3. Minimum inhibitory concentration of combined organic acid in *L. monocytogenes*.

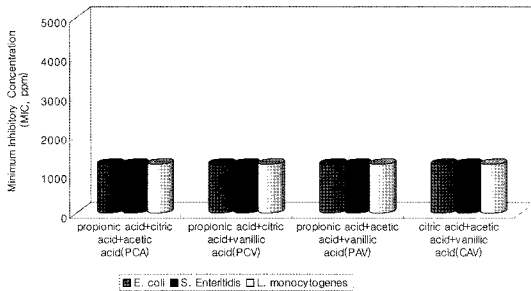


Fig. 4. Minimum inhibitory concentration of combined organic acid in *E. coli* O157:H7, *S. Enteritidis* and *L. monocytogenes*.

ppm 처리한 모든 균에서 억제되었다.

*S. Enteritidis*에 대하여 프로핀산과 구연산, 프로핀산과 아세트산, 프로핀산과 바닐린산, 구연산과 아세트산, 구연산과 바닐린산 병용처리한 최소발육억제농도는 2,500 ppm이었으며, 아세트산과 바닐린산은 1,250 ppm 첨가하였을 때 억제되었다.

*L. monocytogenes*에 대하여 프로핀산과 구연산, 프로핀산과 아세트산, 프로핀산과 바닐린산, 구연산과 아세트산, 구연산과 바닐린산, 아세트산과 바닐린산 병용처리한 모든 균에서 1,250 ppm을 첨가하였을 때 억제되었다.

또한 3가지 유기산 종류별 병용 처리한 결과는 *E. coli* O157:H7, *S. Enteritidis* 및 *L. monocytogenes*에 대한 최소발육억제농도(MIC)에 관한 결과 모든 균에서 1,250 ppm 첨가할 때 모두 억제되었다.

식중독균에 대한 생육저해물질에 대한 많은 연구가 진행되어 초산, 구연산, 젖산의 첨가에 따른 생육 저해 효과를 발표하였고,¹⁶⁾ sodium benzoate, sorbic acid, hydrogen peroxide, vanillic acid, cetylpyridinium chloride, monocaprylin 등이 식중독 세균을 저해한다고 보고하여¹⁷⁻²⁰⁾ 본 실험에서 유기산을 처리시 식중독 세균의 증식 억제에 효과가 있다는 결과와 같게 판명되었다.

IV. 결 론

최근 산업의 발달로 인한 식품의 안전성에 대한 국민의 우려가 증가되고 있으며 특히 식품을 미생물의 증식으로부터 안전하게 보존하기 위한 식품처리공정의 개발이 요구되고 있다. 유기산을 이용한 식람음성 병원성 식중독 원인균인 *E. coli* O157:H7, *S. Enteritidis*과 대표적 식람음성식중독 원인균인 *L. monocytogenes*의 증식에 미치는 영향에 대해 실험한 결과는 다음과 같았다.

1. *E. coli* O157:H7에 대한 유기산별 최소발육억제농도는 프로핀산과 바닐린산에서 5,000 ppm에서 발육이 억제되었으며, 구연산에서는 10,000 ppm, 아세트산에서는 2,500 ppm에서 발육이 억제되었다. *S. Enteritidis*에 대한 유기산별 최소발육억제농도는 프로핀산과 아세트산에서 2,500 ppm에서 발육이 억제되었으며, 구연산에서는 10,000 ppm, 바닐린산에서는 5,000 ppm에서 발육이 억제되었다. *L. monocytogenes*에 대한 유기산별 최소발육억제농도는 프로핀산, 아세트산, 구연산에서 2,500 ppm에서 발육이 억제되었으며, 바닐린산에서는 5,000 ppm에서 발육이 억제되었다.

2. *E. coli* O157:H7에 대하여 프로핀산과 구연산을 병용처리한 최소발육억제농도는 2,500 ppm이었으며, 프로핀산과 아세트산, 프로핀산과 바닐린산, 구연산과 아세트산, 구연산과 바닐린산, 아세트산과 바닐린산을 1,250 ppm 처리한 모든 균에서 억제되었다. *S. Enteritidis*에 대하여 프로핀산과 구연산, 프로핀산과 아세트산, 프로핀산과 바닐린산, 구연산과 아세트산, 구연산과 바닐린산 병용처리한 최소발육억제농도는 2,500 ppm이었으며, 아세트산과 바닐린산은 1,250 ppm 첨가하였을 때 억제되었다. *L. monocytogenes*에 대하여 프로핀산과 구연산, 프로핀산과 아세트산, 프로핀산과 바닐린산, 구연산과 아세트산, 구연산과 바닐린산, 아세트산과 바닐린산 병용처리한 모든 균에서 1,250 ppm을 첨가하였을 때 억제되었다.

3. 유기산 3가지 종류별 병용 처리한 결과는 *E. coli* O157:H7, *S. Enteritidis* 및 *L. monocytogenes*에 대한 최소발육억제농도(MIC)에 관한 결과 모두 1,250 ppm 첨가할 때 모두 억제되었다.

참고문헌

- 이용욱, 박석기 : 시판 식품성 식품의 오염지표세균의 분포 및 저장온도, 기간별 오염지표 세균의 변화. 한국식품위생안전성학회지, 14(1), 1-8, 1999.

2. Padhye, N. V. and Doyle, M. P. : *Escherichia coli* O157:H7 : Epidemiology, pathogenesis, and methods for detection in food. *Journal of Food Protection*, **55**, 555-565, 1992.
3. El-Gazzar, F. E. and Marth, E. H. : Salmonellae, salmonellosis, and dairy foods : A review. *Journal of Dairy Science*, **75**, 2327-2342, 1992.
4. Mikolajcik, E. M. : Listeriosis-A food hazard about which we know little. *Journal of Culture Dairy Product*, **21**(4), 28-32, 1986.
5. Tamminga, S. K., Beumer, R. R. and Kampelmacher, E. H. : The hygienic quality of vegetables grown in or imported into the netherlands : A tentative survey. *Journal of Hygiene*, **80**, 143-154, 1978.
6. Frezza, L., Tredici, E., Cananzi, F. and Mauro, A. : Incidence of fecal contamination in the samples of gicens and vegetables usually eaten uncooked. *Annals Sclavocollanamografica*, **19**, 466-450, 1977.
7. Ercolani, G. L. : Bacteriological quality assessment of fresh marketed lettuce and fennel. *Apply Environmental Microbiololy*, **31**, 847-853, 1976.
8. Monge, R. and Arias, M. L. : Presence of various pathogenic microorgani in fresh vegetables in cista rica. *Archivos Latinoamericanos de Nutrition*, **46**, 292-294, 1996.
9. 마혜영, 최중학, 이종삼 : *E. coli*의 인지질 및 지방산 대사, 여러 금속화합물의 효과에 관하여. 한국환경위생학회지, **22**(2), 114-123, 1996.
10. 이소연, 윤효숙, 최원창, 이종삼 : *E. coli*와 *B. subtilis*의 당지질 생합성과 지방산 조성에 미치는 금속화합물의 효과. 한국환경위생학회지, **23**(2), 12-23, 1997.
11. Venkitanarayanan, K. S., Lin, C. M., Bailey, H. and Doyle, M. P. : Inactivation of *E. coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* on apples, oranges, and tomatoes by lactic acid with hydrogen peroxide. *Journal of Food Protection*, **65**(1), 100-105, 2002.
12. Gaysinsky, S., Michael, D. P., Bruce, B. D. and Weisis, J. : Growth inhibition of *E. coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* by carvacrol and eugenol encapsulated in surfactant micelles. *Journal of Food Protection*, **68**(10), 2567-2570, 2005.
13. Arvizu-Medrano, S. M. and Escartin, E. F. : Effect of acid shock with hydrochloric, citric, and lactic acids on the survival and growth of *Salmonella Typhi* and *Salmonella typhimurium* in acidified media. *Journal of Food Protection*, **68**(10), 2047-2053, 2005.
14. Lin, C. M., Moon, S. S., Doyle, M. P. and Mcwaters, K. H. : Inactivation of *E. coli* O157:H7, *Salmonella enteritica* serotype enteritidis, *Listeria monocytogenes* on lettuce by hydrogen peroxide and lactic acid and hydrogen peroxide with mild heat. *Journal of Food Protection*, **65**(8), 1215-1220, 2002.
15. 장재선, 이미연, 이제만, 김용희 : 과산화수소와 유산이 *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Enteritidis 및 *Listeria monocytogenes*의 증식 억제에 미치는 영향. 대한위생학회지, **19**(4), 69-75, 2004.
16. 장재선, 고종명, 김용희 : *Staphylococcus aureus*와 *Bacillus cereus*에 대한 유산과 과산화수소의 증식억제 효과. 한국환경보전학회지, **31**(2), 115-119, 2005.
17. Arroyo, F. N., Duran Quintana, M. C. : Microbial evolution during storage of seasoned olives prepared with organic acids with potassium sorbate, sodium benzoate and ozone used as preservatives. *Journal of Food Protection*, **69**(6), 1354-1364, 2006.
18. Moon, K. D., Delaquis, P., Toivonen, P., Bach, S., Stanich, K. and Harris, L. : Destruction of *E. coli* O157:H7 by vanillic acid in unpasteurized juice from six apple cultivars. *Journal of Food Protection*, **69**(3), 542-547, 2006.
19. Singh, M., Gill, V. S., Thippareddi, H., Phebus, R. K., Marsden, J. L., Herald, T. J. and Nutsch, A. L. : Antimicrobial activith of cetylpyridinium chloride against *Listeria monocytogenes* on frankfrters and subsequent effect on quality attributes. *Journal of Food Protection*, **68**(9), 1823-1830, 2005.
20. Manoj Kumar Mohan Nair, Hanem Aborelezz, Thomas hoagland and kumar venkitanarayanan : Antibacterial effect and monacapyrlyin on *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice. *Journal of Food Protection*, **68**(9), 1895-1899, 2005.