

## *Escherichia coli* 와 *Salmonella typhimurium* 의 생육억제에 미치는 식염과 Potassium Sorbate, Sodium Benzoate 의 병용효과

조남숙 · 양여영 · 최언호  
서울여자대학 식품과학과

### Combination Effects of Potassium Sorbate and Sodium Benzoate with sodium Chloride on the Growth Inhibition of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*

Nam-Sook Cho, Yeo-Young Yang and Eon-Ho Choi  
Department of Food Science, Seoul Woman's University, Seoul

#### Abstract

An experiment was performed to investigate the combined effect of preservatives and the synergistic effect of sodium chloride to them on the inhibition of bacterial growth. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* were cultured with or without shaking in liquid media (pH 6) of tryptone-glucose-yeast extract or tryptic soy broth which contained 0.1% potassium sorbate and/or 0.03% sodium benzoate, equivalent to half of the maximum permissible levels, respectively. The growth of *E. coli* was more inhibited with one or both of the two preservatives by shaking culture than by non-shaking culture. For *S. typhimurium* the single treatment of the preservatives did not show inhibitory effect whereas the combined treatment of them showed bacteriostatic effect in shaking culture and a prolongation of lag phase in non-shaking culture. Addition of 2% sodium chloride to either potassium sorbate or potassium sorbate plus sodium benzoate remarkably increased the growth inhibition of *E. coli* for non-shaking cultivation but no effect observed for shaking cultivation. *S. typhimurium* was more sensitive to the addition of sodium chloride than *E. coli* in both shaking and non-shaking culture to show lower viable cell counts than initial numbers.

#### 서 론

식품의 변패를 방지할 목적으로 그 원인이 되는 미생물을 사멸시키거나 증식을 억제시키기 위하여 사용되는 보존료는 식품의 제조, 가공 및 보존에 필수 불가결한 식품 첨가물로 인정되고 있다. 현재 식품 위생법에서 허용된 보존료에는 dehydroacetic acid 를 포함하여 13개 품목이 있으며 *p*-hydroxybenzoic acid 의 ester 류를 제외하면 모두 유기산이거나 그 염류인 산형 보존료로서 그 사용기준은 보존료의 독성과 식품의 섭취량, 사용빈도 등을 고려하여 식품별로 그 효력을 발휘하는 최소량을 첨가하도록 설정되어 있다.

식품 중의 유해 미생물을 완전히 억제하는 데에는 고농도의 보존료가 효과적이거나 식품의 풍미와 안전성, 실용성 면에서 볼 때에는 이와 반대로 낮은 농도일수록 유리하다. 이러한 이유 때문에 농도를 낮추어 수종의 보존료를 병용한다든가 또는 기존의 보존료에 보존료가 아닌 다른 화합물을 첨가하여 식품의 보존성을

높이려는 연구가 이루어져 왔다.<sup>(1-7)</sup> 본 연구도 이러한 목적 하에 시도되어 식품 위생 검사의 지표가 되는 *Escherichia coli* 와 *Salmonella typhimurium* 을 선택하고 이들의 생육 억제에 미치는 potassium sorbate 와 sodium benzoate 의 병용효과, 그리고 이들의 식염과의 상승효과를 조사하였기에 그 결과를 보고한다.

#### 재료 및 방법

##### 미생물, 배지 및 보존료

*Escherichia coli* KFCC 32591 IFO 3806 균주를 주식회사 일화로부터, *Salmonella typhimurium* 균주는 국립보건원으로부터 분양받아 계대배양한 후 전자는 TGY (1,000ml 수용액 중 tryptone 10g, glucose 2g, yeast extract 5g), 후자는 TSB (1,000ml 수용액 중 tryptic soy broth 30g)의 고체 또는 액체배지에 배양하여 실험하였다. 보존료로서는 일급 potassium sorbate 와 sodium benzoate 가 사용되었다.

세균 현탁액의 조제

해당 사면배지에 계대배양한 각 세균을 동일한 액체 배지(pH 7) 100ml에 접종하여 37°C의 수조에서 하룻밤 진탕배양(160rev/min)한 후에 이 현탁액 1ml를 다시 이와 동일한 새 액체배지 100ml에 접종하고 2~3시간 진탕배양시켜 대수기의 영양세포(10<sup>4</sup>~10<sup>7</sup>cells/ml)를 얻었다.

pH

pH를 선정하기 위하여 4% NaOH와 10% HCl로써 pH를 3, 4, 5, 6, 7로 조정한 해당 액체배지 100ml에 상기 영양세포 현탁액을 1ml씩 접종하고 37°C의 수조에서 8시간 동안 진탕배양하면서 매 시간 배양액의 탁도를 조사하였다.

보존료와 식염의 단독 및 병용처리

보존료로서 potassium sorbate는 농도가 0, 0.05, 0.1, 0.2% 되게, sodium benzoate는 0, 0.015, 0.03, 0.06% 되게 액체배지 100ml에 단독 또는 혼합하여 용해하고 이에 식염을 0, 1, 2, 4, 8% 되게 첨가하여 pH를 6으로 조절하였다. 이 용액에 대수기의 세균 현탁액 1ml를 접종하여 37°C의 진탕수조에서 8시간 진탕배양, 또는 37°C에서 4일간 정치배양하고 배양기간 중의 생육 상태를 조사하기 위하여 660nm에서 탁도를 측정하거나 평판배양법에 의하여 생균수를 계수하였다.

결과 및 고찰

pH의 선정

*E. coli*와 *S. typhinurium*의 생육에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위하여 사용 배지의 pH를 3~7로 조절하고 37°C에서 진탕배양하면서 배양액의 탁도를 측정된 결과, *E. coli*는 pH가 낮아짐에 따라 생육이 현저하게 떨어져 pH 3과 4에서는 거의 증식되지 못하였고 pH 5와 6에서도 pH 7에 비하여 현저하게 증식 속도가 낮았으며 *S. typhinurium*도 pH 3과 4에서는 거의 생육하지 못하였고 pH 5와 6에서 유도기에 증식이 늦어졌으나 대수기에서는 증식 속도가 pH 7에서의 경우와 같았다. Laroco 등<sup>(9)</sup>은 *S. typhinurium* ATCC 7136을 pH 6.3에서, Restaino 등<sup>(7)</sup>은 salmonellae를 pH 5.5에서 배양하여 보존료의 저해효과를 조사하였으며 Clark 등<sup>(8)</sup>은 *S. typhinurium*에 대한 가열효과를 pH 6에서 조사한 바 있다.

Potassium sorbate와 sodium benzoate는 산형 보존료로서 pH가 낮으면 H<sup>+</sup>농도가 증가되어 비해리 분

자의 물분율이 높아지고 그 때문에 보존료의 항균효과가 증대된다. Potassium sorbate와 sodium benzoate는 pH가 중성 또는 비산성 식품에서도 효과적이고 또한 연구에 사용한 균주가 pH 6 부근에서 비교적 잘 생육하는데다가 일반 식품의 pH가 이에 가까우므로 이들의 억제효과에 미치는 보존료의 영향을 pH 6에서 조사하기로 하였다.

진탕배양시 보존료와 식염의 단독처리 효과

구미에서 육류나 가공류 등의 저장을 위하여 사용하던 nitrites가 발암성 물질인 nitrosamine을 생성함으로써 인하여 그 대체 보존료로 사용되어 오고 있는 sorbate<sup>(9)</sup>의 최고허용농도는 국내 식품 첨가물 규격 기준<sup>(10)</sup>에 의하면 식육, 경육, 어육연제품, 성계젓, 피이닛 버터 가공품 등의 식품에서 sorbic acid로 0.2%이고, 된장, 고추장, 춘장, 어개건제품, 팔랑곰류, 식초·소금 절임 등에서는 0.1%이다. 그리고 sodium benzoate의 최고허용농도는 청량 음료수(탄산수를 포함하는 것은 제외)와 간장 등의 식품에서 0.06%로 규제되고 있다.

Potassium sorbate와 sodium benzoate가 *E. coli*, *S. typhinurium*의 생육에 미치는 효과를 조사하기 위하여 이들 보존료를 최고허용농도 범위 내에서 pH 6의 액체배지에 첨가하고 진탕배양한 결과는 Fig. 1, 2와 같다. 각 세균의 보존료에 대한 저항성은 보존료의 종류에 따라 현저하게 차이가 있었다. 즉 *E. coli*는 sodium benzoate인 경우 최고허용농도인 0.06%에서, potassium sorbate는 최고허용농도의 1/2량인 0.1%에서 정균현상을 나타내었으며 *S. typhinurium*은 0.2% potassium sorbate 처리에서만 정균현상을 나타내었다.

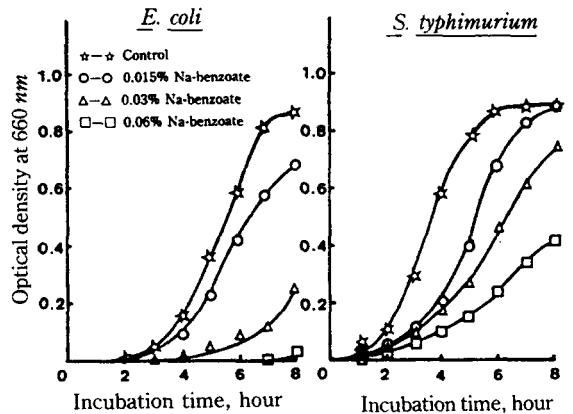


Fig. 1. Effect of sodium benzoate on the bacterial growth

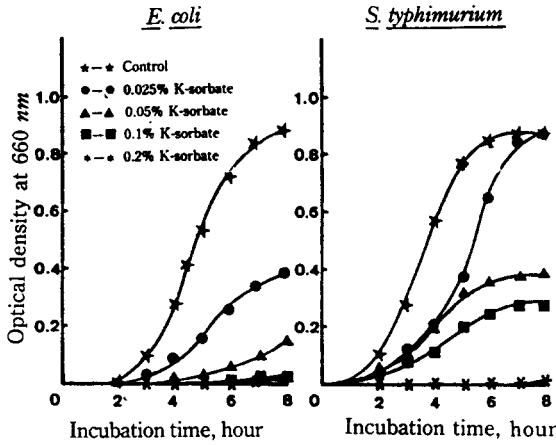


Fig. 2. Effect of potassium sorbate on the bacterial growth

한편 식염을 함유한 액체배지(pH 6)에 *E. coli*와 *S. typhimurium*을 전탕배양하면서 배양액의 탁도를 측정 한 결과, *E. coli*는 1%와 2% 식염 첨가로써 오히려 생육이 양호하였으며 *S. typhimurium*의 경우는 식염에 의한 저해효과가 뚜렷하여 1% 첨가로써 유도기가 연장되고 생육 속도가 감소되었으며 2% 이상의 농도에서는 증식 억제 혹은 사멸 현상을 보였다.

진탕배양시 보존료의 병용처리 및 식염의 상승효과

식품에는 여러 가지 미생물이 존재하고 보존료의 항균작용은 미생물의 종류와 식품의 상태에 따라 다를 수 있기 때문에 여러 가지 보존료를 병용하여, 또는 이들 보존료에 보존료가 아닌 제 3의 물질을 첨가하여 식품에 처리하면 단용하는 것보다 식품의 보존 효과가 우수하지 않을까 하여 potassium sorbate와 sodium benzoate 첨가량을 각각 최고허용농도의 1/2량인 0.1%, 0.03%, 식염의 경우는 미생물의 내염성의 기준 농도인 2%로 조정하고 이 두 보존료의 병용효과 및 식염의 상승효과를 조사한 바 Fig. 3, 4와 같은 결과가 나왔다. 진탕배양시 *E. coli*는 보존료의 단독 및 병용 처리구에서 0.03% sodium benzoate < 0.1% potassium sorbate < 0.03% sodium benzoate + 0.1% potassium sorbate의 순으로 생육이 크게 저해되어 8시간 후의 생균수는 대조구보다 각각 0.8, 1.2, 1.5, log cycle이 감소되었다. 식염 첨가는 단독처리구의 경우 대조구보다 증식이 양호하여 8시간 배양 생균수가 대조구에 비하여 높은 결과를 나타내었으며 보존료와 식염의 상승효과를 기대할 수 없었다.

*S. typhimurium*은 0.03% sodium benzoate와 0.1% potassium sorbate의 병용처리로 생육이 현저하게

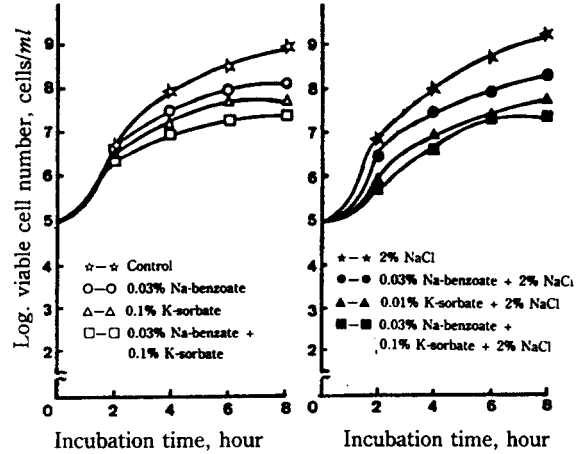


Fig. 3. Effect of the single or combined treatments of 0.1% potassium sorbate, 0.03% sodium benzoate and 2% sodium chloride on the growth of *E. coli* at 37°C with shaking

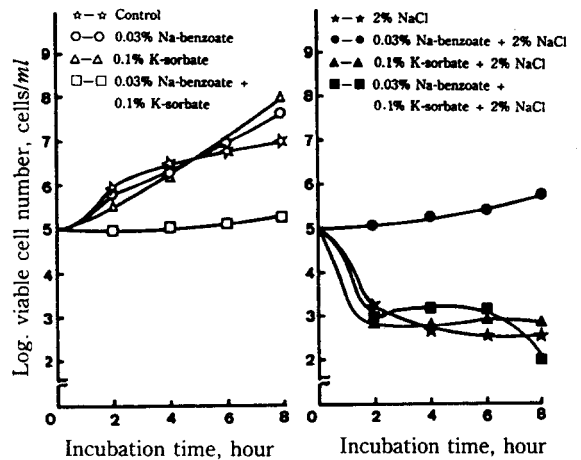


Fig. 4. Effect of the single or combined treatments of 0.1% potassium sorbate, 0.03% sodium benzoate and 2% sodium chloride on the growth of *S. typhimurium* at 37°C with shaking

억제된 정균효과를 나타내었다. 2% 식염 단독처리와 0.1% potassium sorbate와의 병용처리는 *S. typhimurium*의 생육을 현저하게 억제하여 배양 2시간 후부터 생균수가 초기보다 2 log cycle이나 감소되었다. 그러나 0.03% sodium benzoate와 2% 식염의 병용은 이와는 달리 생균수가 약간 증가하였다.

정치배양시 보존료의 병용처리 및 식염의 상승효과

제조 식품의 보존 및 유통 과정에 보다 유사한 조건

을 만들어 주기 위하여 0.1% potassium sorbate, 0.03% sodium benzoate 및 2% 식염을 단독 혹은 병용하여 조제한 액체배지에서 *E. coli* 및 *S. typhimurium* 을 4일간 정지배양하면서 그 생육 상태를 조사한 결과는 Fig. 5, 6과 같다. *E. coli* 의 경우, Fig. 5에서 보는 바와 같이 진탕배양에 비하여 전체적으로 생육 상태가 저조하였으며 0.1% potassium sorbate 단독처리구와 이에 0.03% sodium benzoate를 병용한 처리구

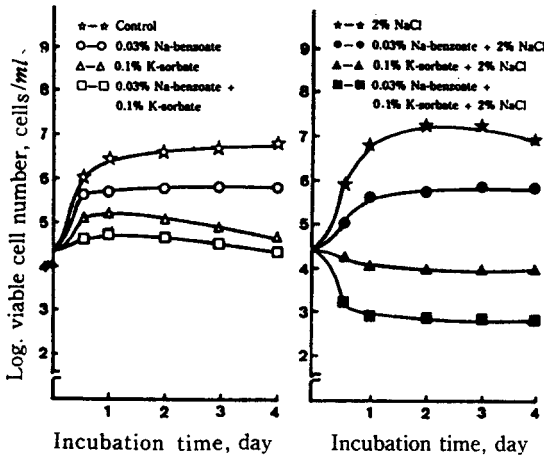


Fig. 5. Effect of the single or combined treatments of 0.1% potassium sorbate, 0.05% sodium benzoate and 2% sodium chloride on the growth of *E. coli* at 37°C without shaking

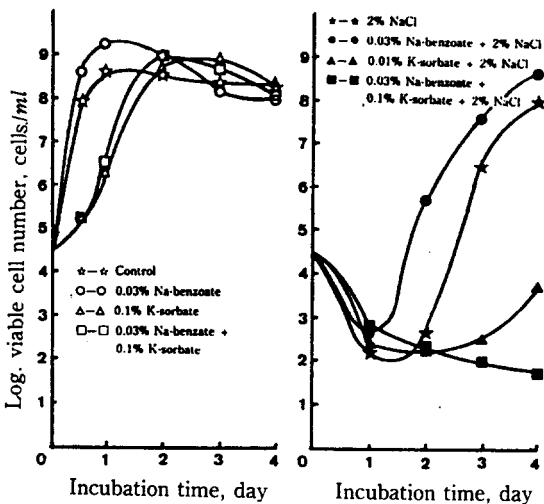


Fig. 6. Effect of the single or combined treatments of 0.1% potassium sorbate, 0.03% sodium benzoate and 2% sodium chloride on the growth of *S. typhimurium* at 37°C without shaking

에서는 배양 초기에 생균수의 증가가 대조구에 비하여 완만하였고 배양 말기에 가서는 오히려 감소하여 초기와 거의 유사하였다. 이에 식염의 첨가는 배양 1일에 생균수를 현저하게 감소시켰으며 그 후에도 낮은 값을 유지시켜 식염의 첨가는 *E. coli* 의 생육 억제에 있어서 상승작용이 있음을 알 수 있었다.

*S. typhimurium* 은 Fig. 6에서 보는 바와 같이 0.03% sodium benzoate 가 첨가된 배지에서는 2일까지 대조구에 비하여 우세한 생육을 보였으며 0.1% potassium sorbate 처리구에서는 생육 속도가 초기에 늦은 것으로 나타났으나 모든 처리구에서 4일 후의 세균수는 거의 같았다. 2% 식염의 첨가는 진탕배양에서와 같이 *S. typhimurium* 의 생육을 현저히 저해하였다. 2% 식염 단독처리구에서도 생육이 현저하게 억제되어 배양 2일에는 생균수가 3 log cycle 이상 감소하였으며 그 후 급속히 증가하여 4일경에는 식염을 첨가하지 않은 대조구와 비교할 때 생균수에 별 차이가 없었던 것이 진탕배양과는 상이하였다. 이와 같은 경향은 0.03% sodium benzoate 에 2% 식염을 첨가한 경우에도 나타났다. 식염의 상승효과는 0.1% potassium sorbate 의 단독처리구와 0.03% sodium benzoate 와 0.1% potassium sorbate 의 병용처리구에서 가장 현저하게 나타나 후자의 경우에는 세균수가 계속 감소하여 4일 후에는  $10^2$  cells/ml 도 미치지 못하였다.

이상과 같이 진탕배양 혹은 정지배양으로 배양 조건을 달리하여 0.03% sodium benzoate, 0.1% potassium sorbate 및 2% 식염이 *E. coli* 와 *S. typhimurium* 의 생육에 미치는 단독 혹은 병용처리효과를 생균수로써 조사하였는데, 이 두 세균은 배양 조건에 영향을 많이 받아, *E. coli* 는 호기적 조건을 조성해 주는 진탕배양시 생육이 더 활발하였고 *S. typhimurium* 은 오히려 더 저해를 받아 정지배양시 생육 상태가 더 양호하였다. 따라서 식품의 상태와 유사한 조건인 정지배양시 모든 실험구는 *E. coli* 에 더욱 효과적이었고 *S. typhimurium* 은 0.1% potassium sorbate 와 2% 식염의 병용처리 및 여기에 0.03% sodium chloride 를 첨가한 구에서만 생육이 억제되었다.

Sorbate 의 미생물 저해효과는 균주 및 배양 조건에 따라 현저하게 차이가 있는 것으로 보고되고 있다. Catalase 양성 균주인 *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Torulaspora rosei* 를 저해하는데 필요한 sorbic acid 의 농도는 간침출 배지에서 0.12%, glucose 액체 배지에서 0.07%이고, *Lactobacillus plantarum*, *Clostridium butyricum* 은 이 농도에서도 생육이 가능하였다.<sup>(11)</sup> 또 pH 6.0의 TSB에서 배양된 *Pseudomonas fluorescens* 와 *Pseudomonas putrefaciens* 를 억제하는데 필요한

potassium sorbate의 농도는 0.2%,<sup>(14)</sup> pH 5.2의 skim milk에 존재하는 *Pseudomonas fragi*<sup>(15)</sup>와 27°C에서 저장한 염지하지 않은 돼지고기 소시지의 salmonellae의 경우<sup>(16)</sup>는 0.1%, 그리고 pH 6.2인 계와 넙치류의 균질물을 35°C에서 저장하였을 때 생기는 *Vibrio parahaemolyticus*의 경우는 0.05~0.10%인 것으로 보고되었다.<sup>(14)</sup> 또한 소시지<sup>(16)</sup>와 베이컨<sup>(17)</sup>의 *S. aureus*와 구워져 진공포장한 칠면조 고기 중의 salmonellae와 *E. coli*를 저해하기 위해서는 0.10~0.26%의 potassium sorbate가 필요하다고 보고하였으며 같은 제품에 대하여 Robach 등<sup>(18)</sup>은 저장 온도와 제품의 처리에 따라서 0.12% 혹은 0.26%의 sorbic acid가 호냉균의 생육을 억제하는데 효과가 있었음을 보고하였다.

본 실험에서도 potassium sorbate 및 sodium benzoate의 효과는 두 균주 및 배양 조건에 따라 현저한 차이를 나타내어 진탕배양시 0.03% sodium benzoate와 0.1% potassium sorbate는 *E. coli*에 대하여 생육을 어느정도 저해하는 효과가 있었으나 *S. typhimurium*에 대하여는 오히려 생육을 촉진하는 효과를 나타내었다. 그러나 정치배양에서는 0.1% potassium sorbate도 *S. typhimurium*의 초기 증식속도를 억제하는 효과를 나타내었다.

Sorbic acid의 효과는 식염의 항균작용에 의하여 식염 첨가시 뚜렷이 증가한다는 보고가 있다.<sup>(16)</sup> 최근 Robach와 Stateler<sup>(2)</sup>는 pH 6.0에서 2% 식염과 0.2~0.3% potassium sorbate의 병용처리가 배지상에서 *S. aureus*의 생육을 저해하는데 상승효과가 있음을 보고하였고, Larocco 등<sup>(3)</sup>은 *S. typhimurium*을 22°C 혹은 37°C에서 pH 6.3의 TSB에서 정치배양할 때 0.3% potassium sorbate와 3% 식염의 병용처리가 가장 좋은 상승효과를 나타내어 유도기가 대조구에 비하여 12시간 연장되었으며, 2일 후의 생균수는 3 log cycle이 감소되었다고 보고하였다.

본 실험에서도 0.1% potassium sorbate, 0.03% sodium benzoate에 2% 식염의 첨가는 진탕배양한 *E. coli*와 *S. typhimurium*의 생육에 저해 상승효과를 보였으며 정치배양시에는 *S. typhimurium*에만 효과가 있었다. 이것은 2% 식염은 *E. coli*의 생육을 오히려 더 촉진하고 또 *E. coli*는 호기적 조건으로 생육에 유리한 조건이 주어졌기 때문이라고 생각된다. 또한 이 두 보존료는 단독으로 처리할 때보다도 병용함으로써 보다 항균효과가 좋았고 이 두 보존료를 병용처리하였을 때 2% 식염은 모든 실험구에서 이 두 보존료에 대하여 상승효과를 나타내었다. 그러나 보존료의 미생물 저해에 관한 많은 연구 결과는 배지상에서의 실제 식

품 첨가시에 상당한 차이가 있는 것으로 밝혀졌기 때문에 실제 식품에 대한 추가 연구가 필요하다고 생각된다.

## 요 약

*Escherichia coli*와 *Salmonella typhimurium*의 생육을 억제하기 위하여 TGY, TSB (pH 6)의 액체배지에 potassium sorbate와 sodium benzoate를 각각 최고 허용농도의 1/2량인 0.1%, 0.03%로 처리하고 식염을 내염성 기준 농도인 2%로 첨가하여 보존료의 단독 및 병용효과와 식염과의 상승효과를 진탕 및 정치배양 조건에서 조사하였다.

*E. coli*는 진탕배양보다 정치배양하였을 때 보존료의 단독 혹은 병용효과가 더 컸으며 *S. typhimurium*은 보존료를 단독처리하였을 때에는 억제효과를 보이지 않았으나 병용처리의 경우에 진탕배양에서는 정균효과를 현저하게 나타내었고 정치배양에서는 유도기를 연장시켰다.

식염의 첨가는 *E. coli*의 경우, 진탕배양에서는 거의 효과를 나타내지 않았으나 정치배양시에는 potassium sorbate 단독처리구 및 potassium sorbate + sodium benzoate 병용처리구에서 항균작용을 현저히 증가시켰다. 식염의 상승효과는 *S. typhimurium*의 경우에 더욱 현저하였는데 진탕 및 정치배양시에 두 보존료와 식염의 혼합구에서 배양 중의 세균수는 오히려 초기 농도보다 점점 감소되는 결과를 나타내었다.

## 문 헌

1. Rao, G.K., Malathi, M.A. and Vijayarahavan, P.K.: *Food Technol.*, **20**, 94 (1966)
2. Robach, M.C. and Stateler, C.L.: *J. Food Prot.*, **43**, 208 (1980)
3. Larocco, K.A. and Martin, S.E.: *J. Food Sci.*, **46**, 568 (1981)
4. Furia: Handbook of Food Additives, 2nd ed., CRC Press, p. 120 (1972)
5. Beuchat, L.R.: *J. Food Sci.*, 46:771-777 (1981)
6. Davidson, P.M., Brekke, C.J. and Branen, A.L.: *J. Food Sci.*, **46**, 314 (1981)
7. Restaino, L., Komatsu, K.K. and Syracuse, M.J.: *J. Food Sci.*, **47**, 134 (1982)
8. Clark, C.W. and Ordal, Z.J.: *Appl. Microbiol.*, **18**, 332 (1969)
9. Robach, M.C. and Sofos, J.N.: *J. Food Prot.*, **45**, 374

- (1982)
10. 문범수 : 식품첨가물, 수확사, p.414(1983)
11. Emard, L.O. and Vaughn, R.H.: *J. Bacteriol.*, **63**, 487 (1952)
12. Robach, M.C.: *J. Food Sci.*, **43**, 1886 (1978)
13. Robach, M.C.: *J. Food Prot.*, **42**, 312 (1979)
14. Robach, M.C. and Hickey, C.S.: *J. Food Prot.*, **41**, 699 (1978)
15. Moustafa, H.H. and Collins, E.B.: *J. Dairy Sci.*, **52**, 335 (1969)
16. Tompkin, R.B., Christiansen, L.N., Shapatis, A.B. and Bolin, H.: *Appl. Microbiol.*, **28**, 262 (1974)
17. Pierson, M.D., Smoot, L.A. and Stern, N.J.: *J. Food Prot.*, **42**, 302 (1979)
18. Robach, M.C., To, E.C., Meydav, S. and Cook, C.F.: *J. Food Sci.*, **45**, 638 (1980)
- 
- (1986년 2월 21일 접수)