

Bacillus subtilis 의 생육에 미치는 식염과 Potassium Sorbate, Sodium Benzoate 의 병용효과

양여영 · 윤정해 · 조남숙 · 최언호
서울여자대학 식품과학과

Combination Effects of Potassium Sorbate and Sodium Benzoate with Sodium Chloride on the Growth of *Bacillus subtilis*

Yeo-Young Yang, Jung-Hae Youn, Nam-Sook Cho and Eon-Ho Choi

Department of Food Science, Seoul Woman's University, Seoul

Abstract

In order to investigate the combined effect of potassium sorbate and sodium benzoate and the synergistic effect of sodium chloride on bacterial cell growth inhibition, *Bacillus subtilis* was cultured with or without shaking in tryptone-glucose-yeast extract broth containing 0.1% potassium sorbate and/or 0.03% sodium benzoate, which are equivalent to half of the maximum permissible levels, respectively. The combined treatment of the two preservatives did not show any synergistic effect of the growth inhibition of *B. subtilis*. Addition of 2% sodium chloride, however, showed remarkable synergistic effect on the growth inhibition of the bacterium by potassium sorbate.

서 론

식품의 유해 미생물을 억제하기 위하여 사용되는 보존료는 사용농도가 높을수록 효과적이나 식품의 풍미, 안전성 및 실용성을 고려하면 사용량을 낮추는 것이 바람직하다. 이를 위하여 수종의 보존료를 병용한다든가⁽¹⁾ 또는 기존의 보존료에 보존료가 아닌 다른 화합물을 첨가하여⁽²⁻⁶⁾ 식품의 보존성을 높이려는 연구가 수행되어 왔다. 그런데 미생물의 생육억제에 미치는 보존료의 효과는 미생물의 종류와 pH, 염류의 종류와 농도 등 여러 가지 배양조건에 따라서 달라지기 때문에 식품 위생상 문제가 되는 미생물을 실제 식품 가공 및 저장 조건하에서 개별적으로 각 보존료에 대하여 검토하여 볼 필요가 있다.

전보⁽⁷⁾에서는 그람음성의 무포자 세균인 *Escherichia coli* 와 *Salmonella typhimarium* 균주에 대하여 조사한 바 있기에 이번 연구에서는 그람양성의 호기성 유포자 세균종 자연계에 널리 분포되어 식품이나 일반 유기물을 분해시키는 *Bacillus subtilis* 에 관심을 갖고 이들의 생육

에 미치는 potassium sorbate 와 sodium benzoate 의 단독 혹은 병용처리효과 및 이 두 보존료에 대한 식염의 상승효과를 조사한 바 전보의 결과와 비교되기에 보고한다.

재료 및 실험방법

미생물과 보존료

Bacillus subtilis 168 (한국에너지 연구소 환경화학 연구실로부터 분양받음)을 계대배양한 후 실험 균주로 사용하였고 배지로 TGY (1,000ml 수용액중 tryptone 10g, glucose 2g, yeast extract 5g, pH 7.0 혹은 6.0)이 액체 또는 고체배지가 사용되었다. 식염과 보존료인 sodium benzoate, potassium sorbate 는 일급시약을 사용하였다.

세균 현탁액의 조제

TGY 사면배지에서 계대배양한 *B. subtilis* 를 동일

한 새 액체배지 (pH 7.0) 100ml에 접종하여 37°C에서 하룻밤 진탕배양 (160rev/min) 한 후에 현탁액 1ml를 다시 이와 동일한 새 액체배지 100ml에 접종하고 2~3 시간 진탕배양시켜 대수기의 영양세포 ($10^4 \sim 10^7$ cells/ml)를 얻었다.

배양액의 pH

pH를 선정하기 위하여 4% NaOH와 10% HCl을 써서 pH를 3~7로 조정된 해양 액체배지 100ml에 상기 *B. subtilis*의 영양세포 현탁액을 1ml씩 접종하고 37°C의 수조에서 8시간 동안 진탕배양하면서 매 시간 배양액의 탁도를 측정하였다.

진탕배양시 보존료의 단독 및 병용처리

Potassium sorbate는 0, 0.05, 0.1, 0.2% 되게, sodium benzoate는 0, 0.015, 0.03, 0.06% 되게 액체배지 100ml에 단독으로 또는 혼합하여 용해하고 pH를 6.0으로 조절한 후에 대수기의 세균 현탁액 1ml를 접종하여 37°C의 진탕수조에서 8시간 진탕배양하면서 매 시간별로 배양액의 탁도를 측정하거나 평판배양법에 의하여 생균수를 계수하였다.

진탕배양시 식염의 단독처리 및 보존료의 병용처리

식염의 농도가 각각 0, 1, 2, 4, 8%인 액체배지 (pH 6.0) 100ml에 대수기의 세균 현탁액 1ml를 접종하여 37°C에서 진탕배양하고 배양중 탁도를 측정하여 각 식염 농도에 대한 *B. subtilis*의 생육 상태를 조사하였다. 이중 2% 식염 농도를 선택하여 potassium sorbate 또는 sodium benzoate가 단독 또는 혼합하여 용해되어 있는 100ml의 액체배지에 첨가하고 동일한 방법으로 배양중의 탁도 및 생균수를 측정하였다. pH와 식염의 농도에 따른 *B. Subtilis*의 생육조사는 pH와 식염농도를 선정하는 것이 주목적이었으므로 편의상 배양액을 희석하지 않고 탁도(OD)를 측정하였다.

정지배양

여러 가지 농도의 potassium sorbate, sodium benzoate, 식염을 단독 혹은 혼합하여 용해한 액체배지 50ml를 100ml 삼각 flask에 넣고 대수기의 세균 현탁액 0.5ml (2×10^4 cell/ml)를 접종하여 37°C incubator에서 4일간 정지배양하고 배양중의 탁도와 생균수를 측정하였다.

결과 및 고찰

pH와 식염 농도의 선정

*B. Subtilis*의 생육에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위하여 pH 3부터 7까지 단계별로 조절하여 37°C에서 진탕배양하면서 배양중의 탁도를 측정된 결과는 그림 1에서 보는 바와 같이 pH 3과 4에서는 거의 생육하지 못하였고 pH 5에서는 유도기의 증식은 늦었으나 대수기에서는 pH 7에서의 경우와 같았고 pH 6에서는 pH 7과 별 차이가 없었다.

Potassium sorbate와 sodium benzoate는 산형 보존료로서 pH가 낮으면 H^+ 농도가 증가되어 비해리 분자의 물분율이 높아져 세균의 세포막을 통과하는 양이 많아지므로 그 때문에 보존료의 항균효과가 증가되나 이 두 보존료는 pH가 중성 또는 비산성 식품에서도 효과적이고 (그림 2 참조) 또 본 연구에 사용한 균주가 pH 6 부근에서 잘 생육하며 일반 식품의 pH가 이에 가까우므로 *B. Subtilis*의 생육억제에 미치는 보존료의 영향을 pH 6.0에서 조사하기로 하였다.

0~8% 식염을 함유한 액체배지 (pH 6.0)에 *B. Subtilis*를 접종하고 37°C에서 진탕배양하면서 배양액의 탁도를 측정된 결과는 그림 1과 같다. 1% 식염 처리구는 무처리구보다 오히려 세균의 증식이 양호하였으나 내염성 기준 농도인 2%에서는 유도기가 연장되다가 배양 5시간 부터는 급속히 증식하였고 4% 이상에서는 증식 현

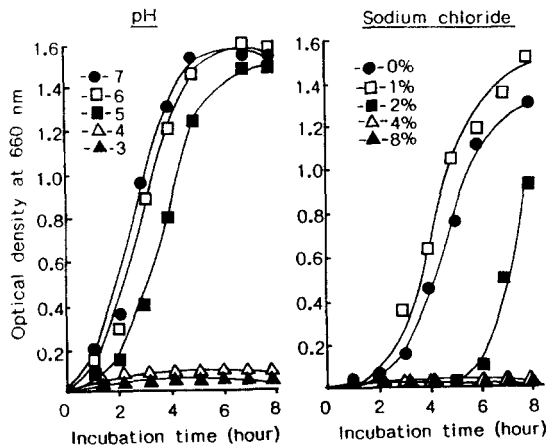


Fig. 1. Effect of pH and sodium chloride on the growth of *Bacillus subtilis*

상을 나타내지 않았다. 그러므로 위의 결과와 식품의 맛을 고려하여 보존료와의 상승효과를 조사하기 위한 식염의 농도를 2%로 결정하였다.

Potassium sorbate 와 sodium benzoate 의 단독 처리 효과

국내 식품 첨물 규격 기준⁽⁸⁾에 의하면 potassium sorbate 의 최고허용농도는 식품에 따라 0.1 혹은 0.2% 이고 sodium benzoate 는 0.06%로 규제하고 있다. 이 두 보존료가 *B. Subtilis* 의 생육에 미치는 효과를 조사하기 위하여 이들을 최고허용농도 범위내에서 pH 6.0 의 액체배지에 첨가하고 진탕배양한 결과는 그림 2와 같다. *B. Subtilis* 는 보존료의 농도가 높아짐에 따라 생육이 둔화되기는 하였으나 *Escherichia coli* 와 *Salmonella typhimurium* 의 경우⁽⁷⁾와는 달리 최고 허용농도에서도 활발한 증식을 나타내었다.

Sorbate 를 식품에 첨가하여 그 보존성을 연구한 결과들은 많이 보고되고 있으며 benzoate 의 보존작용도 Cruess 등⁽⁹⁾, Goshorn 등⁽¹⁰⁾, Poe 등⁽¹¹⁾을 포함하여 수편이 보고되어 있다. Sorbic acid 의 미생물에 따른 선택적 저해 효과는 Phillips 등⁽¹²⁾에 의해 처음으로 보고된 이후 Emard 등⁽¹³⁾, Hansen 등⁽¹⁴⁾에 의하여 연구되어 catalase 양성균주 및 gram 음성세균은 sorbic acid 에 의하여 선택적 저해효과가 있었으나 *Clostridium sporogenes* 나 *C. botulinumd* 등의 유포자 혐기성 세균은 이에 내성이 있었다고 보고하였고, York 등^(15,16)도 이와 같은 결과를 보고하였다.

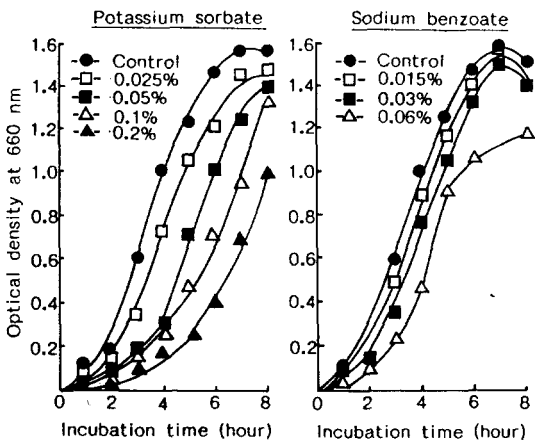


Fig.2. Effect of potassium sorbate and sodium benzoate on the growth of *Bacillus subtilis*

진탕배양시 보존료의 병용처리효과 및 식염의 상승 효과

Potassium sorbate 와 sodium benzoate 를 최고허용농도의 1/2량인 0.1%, 0.03%를 각각 사용하고 식염은 2%를 사용하여 이 두 보존료의 병용효과 및 그 상승효과를 진탕배양하면서 생균수를 측정하여 조사한 결과는 그림 3과 같다.

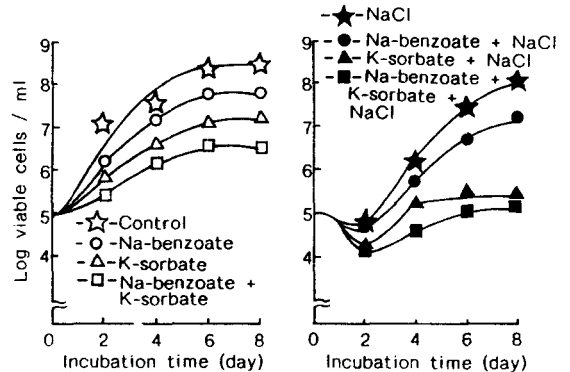


Fig.3. Effect of the single or combined treatments of 0.1% potassium sorbate, 0.03% sodium benzoate and 2% sodium chloride on the growth of *Bacillus subtilis* at 37°C with shaking

B. Subtilis 의 생육은 보존료의 단독 및 병용처리구에서 0.03% sodium benzoate < 0.1% potassium sorbate < 0.03% sodium benzoate + 0.1% potassium sorbate 처리구의 순으로 저해되어 8시간 후의 생균수는 대조구보다 각각 0.7, 1.3, 1.9 log cycle 이 감소되었다. 이들 처리구에 식염을 첨가하였더니 2시간 후에 생균수가 초기보다 현저하게 감소하였으며 그 후 단독 처리구 및 sodium benzoate 의 식염 첨가구에서는 이 현상이 회복되어 증식이 활발하여졌으나 potassium sorbate 와 potassium sorbate 및 sodium benzoate 의 병용처리구에 식염을 첨가하였을 때에는 약간만 회복되었을뿐 초기 세균농도를 초과하지 않는 정균현상을 나타내었다. 다시 말해서 potassium sorbate 의 보존작용은 식염의 첨가로써 *S. typhimurium*⁽⁷⁾에서와 같이 상승작용을 나타내었다.

점치배양시 보존료의 병용처리효과 및 식염의 상승 효과

실제 식품과 유사한 조건을 만들어 주기 위하여 0.1% potassium sorbate, 0.03% sodium benzoate 및 2%

sodium chloride를 단독 혹은 혼합하여 조제한 액체배지에 *B. subtilis*의 대수기의 세포를 접종하고 37°C에서 4일간 정치배양하면서 그 생육 상태를 조사한 결과는 그림 4와 같다.

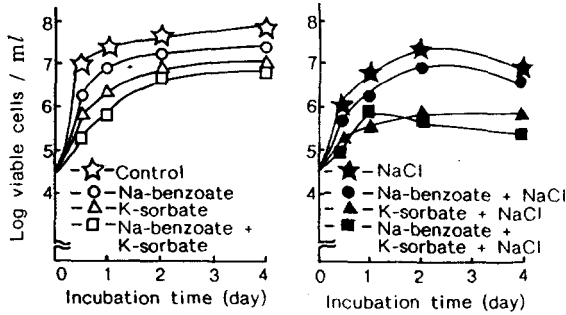


Fig.4. Effect of the single or combined treatments of 0.1% potassium sorbate, 0.03% sodium benzoate and 2% sodium chloride on the growth of *Bacillus subtilis* at 37°C without shaking

보존료의 단독 및 병용처리시 대조구에 비하여 약간의 증식 저하현상을 나타내었으며 이에 식염을 첨가하였을 때에는 진탕배양에서와 같이 potassium sorbate 처리구에서만 상승효과가 있었고 sodium benzoate 처리구에서는 상승효과가 없었다.

Gooding 등⁽¹⁷⁾은 sorbic acid의 항균효과가 식염과 sucrose의 첨가에 의해 뚜렷하게 증가한다고 하였으며, Costilow⁽¹⁹⁾ 등은 오이지의 바람직하지 못한 효모의 성장을 억제하는데 있어서, 또한 Rao⁽⁶⁾ 등은 인디안 식품의 곰팡이와 세균을 억제하는데 있어서 sorbate에 대한 식염의 상승효과를 보고하였고, Robach 등⁽⁵⁾, Larocco 등⁽⁴⁾도 *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* 7136 균주에 대한 동일한 결과를 보고하였다. 한편 식염의 sodium benzoate에 대한 상승작용에 대하여는 Beuchat⁽¹¹⁾가 효모를 가열살균하면서 실험한 결과가 보고되어 있다.

*B. Subtilis*의 생육억제에 미치는 이들 보존료의 병용 효과 및 식의 상승효과를 전보⁽⁷⁾의 *E. coli*, *S. typhimurium* 균주와 비교할 때 사용된 농도 조건에서는 보존료, 균주 및 배양 조건에 따라 차이가 있었다. 전체적으로 세균 억제를 위해서는 potassium sorbate가 sodium benzoate보다 효과적이었으며 이들의 병용효과는 *E. coli*의 정치배양과 *S. typhimurium*의 정치 및 진탕배양에서와는 달리 *B. subtilis*의 배양에서는 나

타나지 않았다. 식염첨가에 의한 상승효과는 potassium sorbate 구에서만 *E. coli*는 정치배양에서, *S. typhimurium*은 진탕 및 정치배양에서 현저하게 나타났었는데 *B. subtilis*의 경우는 위의 두 균주에 비하여 효과가 낮았으나 진탕 및 정치배양의 두 조건에 별 차이가 상승효과를 나타내었다.

배지상의 실험에서는 sorbic acid가 *C. botulinum*의 생육을 저해하기 보다는 오히려 선택적 인자의 역할을 하지만^(13~16), Tompkin 등⁽¹⁹⁾, Ivey 등^(20,21)의 식품에서의 실험에서는 이 세균의 생육이 억제된다고 보고하여 보존료의 항미생물 효과는 배지상에서의 실험을 거친 후에 실제로 식품내 적용하는 것이 바람직하리라 생각되어 계속적인 연구가 필요하다고 생각된다.

요 약

*Bacillus subtilis*의 생육 억제에 미치는 보존료의 병용효과 및 식염과의 상승효과를 조사하기 위하여 tryptone glucose-yeast extract 액체배지에 potassium sorbate와 sodium benzoate를 각각 최고허용농도의 1/2인 0.1%, 0.03%로 처리하고 이에 미생물의 내염성 기준도인 2% 식염을 첨가하여 진탕배양(4시간) 또는 정치배양(4일)하면서 생육 상태를 조사한 결과, 두 보존료의 상승효과가 정치 및 진탕배양에서 모두 나타나지 않았으나 potassium sorbate와 식염의 병용처리구에서는 상승효과가 현저하게 나타났다.

문 헌

1. Beuchat, L.R.: *J. Food Sci.*, **46**,771 (1981)
2. Restaino, L., Komatsu, K.K. and Syracuse, M.J.: *J. Food Sci.*, **47**, 134 (1982)
3. Davidson, P.M., Brekke, C. J. and Branen, A.L.: *J. Food Sci.*, **46**,314 (1981)
4. Larocco, K.A. and Martin, S.E.: *J. Food Sci.*, **46**,568 (1981)
5. Robach, M.C. and Stateler, C.L.: *J. Food Prot.*, **43**, 208 (1980)
6. Rao, G.K., Malathi, M.A. and Vijayaharan, P.K.: *Food Technol.*, **20**, 94 (1966)
7. 조남숙, 양여영, 최연호 : 한국식품과학회지, **18**, 249 (1986)

8. 문법수 : 식품첨가물, 수확사, p. 14 (1983)
 9. Cruess, W.V.: *Ind. Eng. Chem.*, **24**, 648 (1932)
 10. Goshorn, R.H., ED F. Degering and P.A. Tetrault: *Ind, Eng. Chem.*, **30**, 646 (1938)
 11. Poe, C.F. and Field, J.T.: *J. Fruit Products*, **27**, 112 (1947)
 12. Phillips, G.F. and Mundt, J.O.: *Food Technol.*, **4**, 291 (1950)
 13. Emard, L.O. and Vaughn, R.H.: *J. Bacteriol.*, **63**, 487 (1952)
 14. Hansen, J.D. and Appleman, M.D.: *Food Res.*, **20**, 92 (1955)
 15. York, G.K. and Vaughn, R.H.: *J. Bacteriol.*, **68**,739 (1954)
 16. York, G.K. and Vaughn, R.H.: *Food Res.*, **20**, 60 (1955)
 17. Gooding, C. M. and Melnick, D.: *Food Res.*, **20**, 639 (1955)
 18. Costilow, R.N., Ferguson, W.E. and Ray, S.: *Appl. Microbiol.*, **3**, 341 (1955)
 19. Tompkin, R.B., Christiansen, L.N., Shaparis, A.B. and Bolin, H.: *Appi. Microbiol.*, **28**, 262 (1974)
 20. Ivey, F.J., Shaver, K.J., Christiansen, L.N. and Tompkin, R.B.: *J. Food Prot.*, **41**, 621 (1978)
 21. Ivey, F.J. and Robach, M.C.: *J. Food Sci.*, **43**, 1782 (1978)
-
- (1987년 5월 11일 접수)