

Vibrio parahaemolyticus 에 대한 황금추출물의 항균활성

김영록 · 조성환*

경상남도 보건환경연구원
*경상대학교 식품공학과

Antimicrobial Activities of *Scutellariae Radix* Extract against *Vibrio parahaemolyticus*

Young-Rok Kim and Sung-Hwan Cho**

Gyeongsangnamdo Provincial Government Institute of Health & Environment, Changwon 641-825, Korea
*Dept. of Food Science and Technology, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

Abstract

To investigate the antimicrobial effects of *Scutellariae Radix* extract against *Vibrio parahaemolyticus* from food samples, *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from *Tapes philippinarum* were examined for their sensitivity to *Scutellariae Radix* extract. Total 66 *Vibrio parahaemolyticus* strains were isolated from *Tapes philippinarum* 72 samples (91.7%). The serotypes of isolated *Vibrio parahaemolyticus* were K-I group 7 strains (10.6%), K-IV group 5 strains (7.6%), K-II group 2 strains (3.0%), K-V group 2 strains (3.0%), K-VII group 2 strains (3.0%), K-VI group 1 strains (1.5%), K-VIII group 1 strains (1.5%) and antisera UT K-group 46 strains (69.7%) on antisera agglutination test, but K-III group and K-IX group strains were not found. The growth curves of isolates showed lag phase, logarithmic phase, stationary phase and death phase as typical sigmoid curve on the shellfish samples. After 6 hours, the group containing *Scutellariae Radix* extract differs from the control on shellfish samples in the growth inhibition curves, and *Vibrio parahaemolyticus* were inhibited in more than 1000 ppm *Scutellariae Radix* extract. The morphological changes were observed by transmission electron microscope and the microbial cells membrane was destroyed by *Scutellariae Radix* extract.

Key words: antimicrobial effects, *Scutellariae radix* extract, *Tapes philippinarum*

서 론

식품의 안전성과 관련하여 발생하는 세균성 식중독은 발생 규모가 대단위의 집단발생 사례가 많고 집단발병의 경우에는 큰 사회적 문제가 된다(1). 세균성 식중독 발생의 원인세균으로는 *Salmonella* spp., *Vibrio* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria* spp., *Escherichia coli* 등에 의해 많은 발병 사례들이 보고되고 있다(1,2). 특히 *Vibrio parahaemolyticus* (이하, *V. parahaemolyticus*) 균은 우리나라에서 하절기동안 집중적으로 발생되고 있으며, 연간 발생건수로도 *Salmonella* spp. 식중독 다음으로 많이 발생되고 있다(3). 이는 어패류를 생식하는 식습관과 조리시 불완전한 살균 및 식재료에 의한 교차오염에 의한 것으로 밝혀지고 있으며, 비슷한 식습관을 가진 일본에 있어서도 세균성 식중독 전체 발병건수의 거의 절반을 차지하고 있다(4).

장염을 유발하는 *V. parahaemolyticus* 균의 혈청형으로는 K-I group이 많이 보고되고 있으며(5,6), 환경가검물에서는 K-I group과 더불어 K-IV group의 분리율이 높다고 보고된

바 있다(7). *V. parahaemolyticus* 균에 의한 장염은 용혈독소와 관련되며(5), 용혈독소로는 내열성 용혈독소(TDH; thermostable direct hemolysin) 및 내열성 용혈독 유사독소(TRH; TDH-related hemolysin)가 알려져 있다(6,8,9). 장내 감염의 주증상은 설사, 구토, 복통 등의 장염증세를 보이며 대체로 경미하게 발병하여 치명적인 예가 드물기는 하지만, 간경변, 당뇨병 등 면역기능이 저하되거나 만성 질환을 가진 환자에서 주로 발생하는 혈관내 용혈은 치명적일 수가 있어 적절한 대책이 요구된다(10).

V. parahaemolyticus 균에 대한 천연항균제로써 grapefruit 종자추출물(7)과 마늘추출물(11) 등이 연구된 바 있다. 이에, 전보(12)에서 확인된 강한 항균력과 높은 추출수율을 보인 한약재인 황금을 전보(12)와 같은 방법으로 추출하여 *V. parahaemolyticus* 균에 대한 천연항균제로서의 적용가능성을 검토하였다.

수산식품인 바지락(*Tapes philippinarum*)으로부터 *V. parahaemolyticus* 균을 분리·동정한 후 분리균주들의 혈청형을 조사하고, *V. parahaemolyticus* 균의 대표적인 혈청형

*Corresponding author. E-mail: sunghcho@nongae.gsnu.ac.kr
Phone: 82-55-751-5478. Fax: 82-55-751-6113

인 K-I group과 K-IV group의 균주를 멸균시킨 바지락에 접종하여 식품에 있어서 황금추출물의 항균작용을 살펴보았으며, 아울러, 전자현미경을 이용하여 황금추출물 처리로 인한 *V. parahaemolyticus* 균의 세포형태 변화를 관찰하였다.

재료 및 방법

황금추출물의 조제

건조시킨 황금을 분쇄한 다음, 황금과 증류수를 1:5의 비율로 넣고 100°C water bath에서 3시간 동안 추출하여 1차 여과포를 이용하여 여과한 후, 10분 동안 5,000 rpm에서 원심분리하여 상등액을 얻었다. 상등액을 재차 여과시켜 얻은 액을 회전진공 증발기로 최초량의 약 1/10 부피로 농축한 후, 동결건조하여 황금추출물을 얻었다.

*V. parahaemolyticus*의 분리 및 동정

경남도내 연안의 고성, 통영, 거제, 사천, 남해, 하동지역에서 2000년 5월에서 10월까지 직접 채취한 바지락(*Tapes philippinarum*) 72건을 대상으로 식품공전에 준하여 *V. parahaemolyticus* 균을 분리·동정하였다. 증균배지는 3% NaCl을 가한 alkaline peptone water(APW, pH 8.9)를 사용하였고, 분리배지는 thiosulfate citrate bile sucrose(TCBS) 평판배지를 사용하였고, 분리된 균주는 Kligler's iron agar(KIA)와 Motility indole lysine medium(MIL)에서 K/A(alkaline slant, acid butt, H₂S음성, gas음성) 그리고 motility(+), lysine(+), oxidase(+)인 균주를 선별한 다음 API 20E kit를 이용하여 동정하였다.

V. parahaemolyticus 분리균주의 혈청형 검사

분리된 *V. parahaemolyticus* 균주의 혈청형을 알아보기 위하여 일본의 Denka-Seiken사의 serotype KI~KIX group의 항혈청(antisera)을 이용하여 슬라이드 응집법(slide agglutination)으로써 협막 항원인 serotype K-group의 혈청형을 분류하였다.

식품에 있어서 *V. parahaemolyticus*의 생육

식품에 있어서 분리균주의 생육특성을 조사하기 위하여 시판되는 바지락을 구입하여 121°C에서 15분간 증기멸균한 후, 동량의 멸균생리식염수를 넣고 균질화시킨 시료를 3개의 시험군으로 하여 *V. parahaemolyticus* K-I group과 K-IV group 및 표준균주인 *V. parahaemolyticus* ATCC 17802균주를 각각 접종한 다음, 이를 35°C에서 120시간 동안 배양하였다. 각각의 시험군에서 0, 3, 6, 24, 48, 72, 96, 120시간 배양한 시료 1 mL씩을 취한 다음 멸균생리식염수로써 10배수 단

계별 희석액 100 µL씩을 TCBS배지에 도말하여 35°C, 24시간 배양한 후에 colony를 count하여 균수변화를 측정하였다.

식품에 있어서 황금추출물의 항균작용

식품에 있어서 황금추출물의 항균작용을 알아보기 위하여 *V. parahaemolyticus* 균에 대한 황금추출물의 생육저해활성을 측정하였다. 시판되는 바지락을 구입하여 121°C에서 15분간 증기멸균한 후, 동량의 멸균생리식염수를 넣고 황금추출물을 0, 500, 1000, 5000 ppm(mg/kg)의 4개의 시험군으로 하여 균질기를 이용하여 균질화시킨 것을 시료로 사용하여 생육곡선 측정에서와 같은 방법으로 35°C에서 0, 3, 6, 24, 48시간 동안 배양하면서 균수변화를 측정하였다.

황금추출물에 의한 *V. parahaemolyticus*의 세포형태 변화

황금추출물의 처리로 인한 *V. parahaemolyticus*의 세포형태 변화를 알아보기 위해 대수성장기의 균체세포들에 대하여 황금추출물 1000 ppm의 농도로 처리한 것과, 처리하지 않은 것을 대조구로 이용하였다. 처리전후의 세포구조는 Park 등(13)의 방법에 따라 조직표본을 제작하여 투과전자현미경(TEM: Transmission electron microscope, Hitachi H-600)으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

*V. parahaemolyticus*의 분리현황

경남연안에서 채취된 바지락으로부터 분리된 *V. parahaemolyticus* 균주는 72건의 가검물중 66건이 양성을 나타냄으로써 91.7%의 높은 분리율을 보였다. 이는 Kang 등(7)이 조사한 *V. parahaemolyticus* 균의 오염실태에서보다 훨씬 높은 분리율을 나타내었다.

혈청형

분리된 *V. parahaemolyticus* 66균주를 슬라이드 응집법(slide agglutination)으로 혈청형을 확인한 결과는 Table 1에 나타내었다. 분리된 *V. parahaemolyticus* 66균주 중에서 혈청형을 결정할 수 없는 UT(untypeable) K-group이 46균주로서 69.7%였으며, 확인된 혈청형중에서는 serotype K-I group이 7균주로서 10.6%의 검출율을 나타내었고, K-IV group 5균주(7.6%), K-II, V, VII group이 각각 2균주(3.0%)이었으며, K-VI, VIII group 1균주(1.5%)의 순으로 분리되었고, K-III와 IX group 혈청형은 검출되지 않았다. 이는 Kang 등(7)이 조사한 *V. parahaemolyticus* 균의 오염실태와 비슷한 양상을 나타내었으며, *V. parahaemolyticus* 균의 대표적인

Table 1. Serotypes of *V. parahaemolyticus* isolated from *Tapes philippinarum*

Sample	Number of isolates	Number of serotype K-Group									
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	UT
<i>Tapes philippinarum</i>	66	7	2	-	5	2	1	2	1	-	46

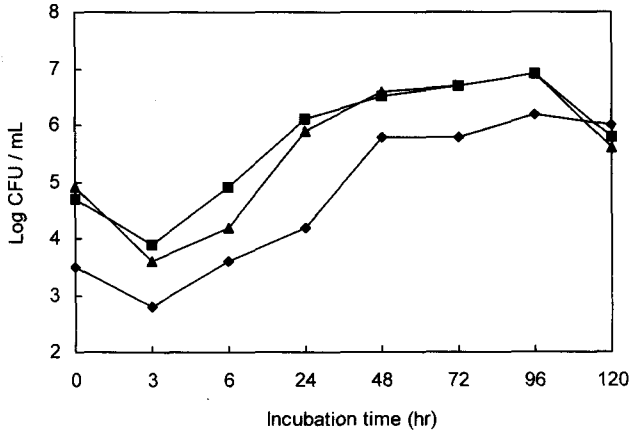


Fig. 1. Growth curve of *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, K-I & K-IV group on the shellfishes.
◆: *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, ■: *V. parahaemolyticus* serotype K-I, ▲: *V. parahaemolyticus* serotype K-IV.

혈청형인 K-I group과 K-IV group의 균주들 중에서 각각 1균주를 선택하여 실험에 사용하였다.

식품에 있어서 *V. parahaemolyticus*의 생육

식품에 있어서 분리균주의 생육관계를 조사하기 위하여 시판되는 바지락을 시료로 하여, *V. parahaemolyticus* K-I 균과 K-IV 균 및 표준균주인 *V. parahaemolyticus* 균 ATCC 17802 균주를 접종한 다음 35°C에서 120시간 동안 배양하면서 얻은 *V. parahaemolyticus*의 생육곡선은 Fig. 1에 나타내었다. 접종초기 3시간까지 균수의 감소를 볼 수 있는데 이는 새로운 영양환경에 적응을 위한 유도기의 형태로 추론되며, *V. parahaemolyticus* K-I균과 K-IV균 및 표준균주인 *V. parahaemolyticus* 균 ATCC 17802 모두가 유도기, 대수기, 정지기, 사멸기를 거치는 전형적인 S자 모양의 생육 곡선을 나타내고 있음을 볼 수 있다.

식품에 있어서 황금추출물의 항균작용

식품에 있어서 황금추출물의 항균작용을 알아보기 위하여 시판되는 바지락에 황금추출물을 0, 500, 1000, 5000 ppm(mg/kg)의 농도가 되도록 첨가한 각각 4개의 시험군에 *V. parahaemolyticus* K-I균과 K-IV 균 및 표준균주인 *V. parahaemolyticus* 균 ATCC 17802 균주를 접종한 다음 35°C에서 48시간 동안 배양하면서 얻은 *V. parahaemolyticus*의 균수변화는 Fig. 2, 3, 4에 나타내었다. *V. parahaemolyticus* K-I균과 K-IV균 및 표준균주인 *V. parahaemolyticus* 균 ATCC 17802 균주 모두가 유도기를 거친 다음인 6시간이 경과된 후 황금추출물의 농도에 따라 시험균주의 균수 차이를 볼 수 있었다. 황금추출물 1,000 ppm 농도에서 생육이 억제되는 것을 확인할 수 있었고, 5,000 ppm 이상의 농도에서는 생육이 크게 저해되는 것을 볼 수 있었다. 황금추출물에 대한 감수성에 있어서는 표준균주인 *V. parahaemolyticus* 균 ATCC 17802 균주가 자연 가검물에서 분리한 *V. parahaemolyticus* K-I균과 K-IV균 균주들에 비해 감수성이 높은 것을 확인할 수 있었다.

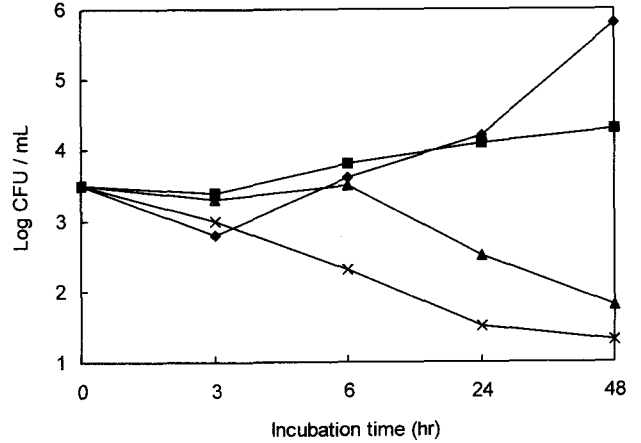


Fig. 2. Growth inhibition of *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 inoculated into the shellfishes containing *Scutellariae Radix* extract.
◆: 0 ppm (control), ■: 500 ppm, ▲: 1,000 ppm, ×: 5,000 ppm.

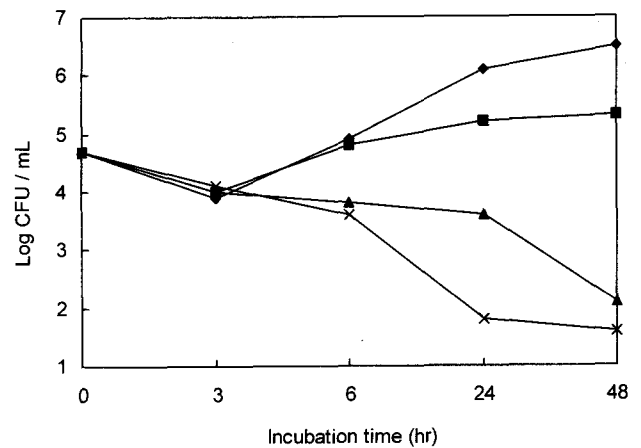


Fig. 3. Growth inhibition of *V. parahaemolyticus* K-I group inoculated into the shellfishes containing *Scutellariae Radix* extract.
◆: 0 ppm (control), ■: 500 ppm, ▲: 1,000 ppm, ×: 5,000 ppm.

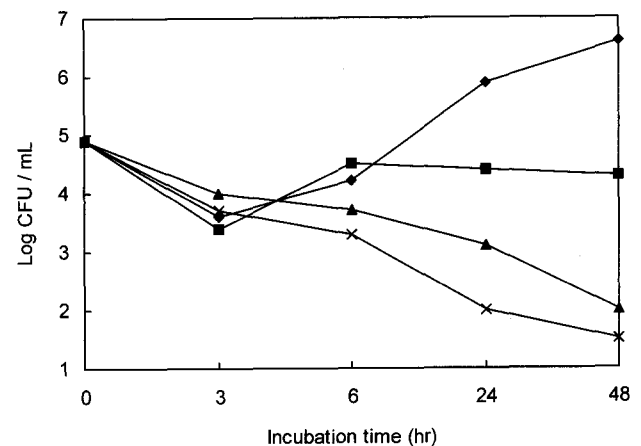


Fig. 4. Growth inhibition of *V. parahaemolyticus* K-IV group inoculated into the shellfishes containing *Scutellariae Radix* extract.
◆: 0 ppm (control), ■: 500 ppm, ▲: 1,000 ppm, ×: 5,000 ppm.

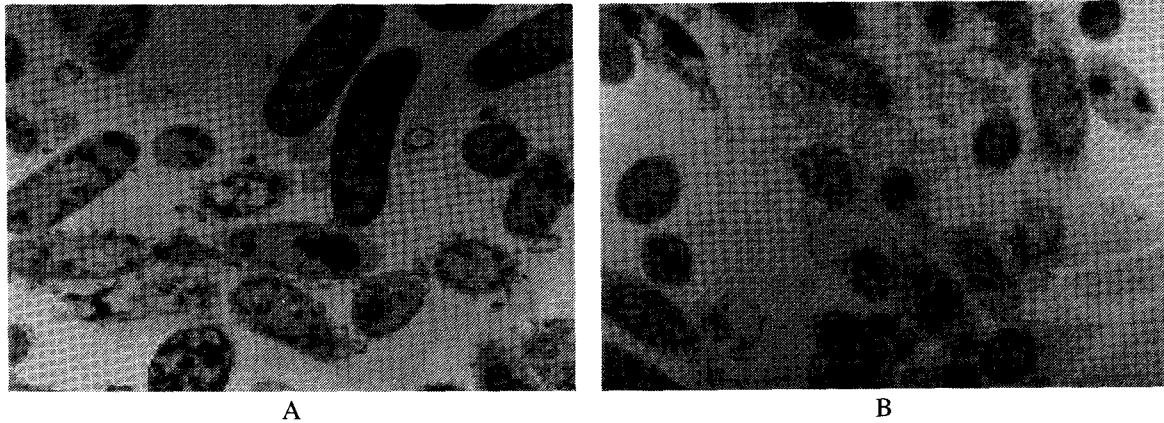


Fig. 5. Transmission electron micrographs of *V. parahaemolyticus*. Cells not-treated (A: control) and cells treated with *Scutellariae Radix* extract (B: 1,000 ppm) (magnification: $\times 25,000$).

황금추출물에 의한 *V. parahaemolyticus*의 세포형태 변화

황금추출물의 처리로 인한 *V. parahaemolyticus*의 세포들과 대조구 세포들을 전자현미경으로 관찰한 결과는 Fig. 5와 같은데, 투과전자현미경(TEM) 상에서 황금추출물 처리구 균주들의 세포내용물들이 용출되어진 것을 볼 수 있는데, 이는 황금추출물 처리로 인한 세포막 기능의 파괴로 인한 것으로 추정되어진다.

요 약

식품 가물로부터 분리·동정된 *V. parahaemolyticus*에 대하여 황금추출물의 항균력을 검토하였다. 바지락 72건 가검물 중에서 66건(91.7%)이 양성으로서 높은 검출율을 보였다. 슬라이드 응집법으로 혈청형을 확인한 결과 분리된 *V. parahaemolyticus* 66균주 중에서 혈청형을 결정할 수 없는 UT(untypeable) K-group이 46균주로서 69.7%였으며, 확인된 혈청형중에서는 serotype K-I group이 7균주로서 10.6%의 검출율을 나타내었고, K-IV group 5균주(7.6%), K-II, V, VII group이 각각 2균주(3.0%)이었으며, K-VI, VIII group 1균주(1.5%)의 순으로 분리되었고, K-III와 IX group 혈청형은 검출되지 않았다. 식품에 있어서 생육관계를 조사하기 위하여 시판되는 바지락을 시료로 분리균주들을 각각 접종한 다음 35°C에서 120시간 동안 배양하여 얻은 생육곡선에서 *V. parahaemolyticus* 균주들 모두가 유도기, 대수기, 정지기, 사멸기를 거치는 전형적인 S자 모양의 생육곡선을 보였다. 식품에 대한 황금추출물의 항균작용을 알아보기 위하여 시판되는 바지락을 시료로 하여 증기멸균한 후, 동량의 멸균생리 식염수를 넣고 황금추출물의 농도가 0, 500, 1000, 5000 ppm (mg/kg)이 되도록 균질화시킨 시료에 분리균주들을 각각 접종한 다음, 35°C에서 48시간 동안 배양하여 얻은 생육저해곡선에서 *V. parahaemolyticus* 균주들 모두가 유도기를 거친 다음인 6시간이 경과된 후 황금추출물의 농도에 따라 시험균

주의 균수 차이를 보였고, 식품중의 *Vibrio parahaemolyticus*에 있어서 생육이 억제되는 황금추출물 유효저해농도는 1000 ppm이었다. 세포형태변화를 관찰하기 위한 투과형전자현미경(TEM) 상에서 황금추출물 처리로 인한 *V. parahaemolyticus* 균주들의 세포막기능의 파괴로 세포내용물들이 용출된 것을 볼 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 2001년 산학협동재단 학술연구비 지원에 의하여 수행된 결과의 일부이며, 이에 깊이 감사드립니다.

문 헌

1. Peter MM. 1996. Bacterocins for control of *Listeria* spp. in food. *J Food Prot Supplement*: 54-63.
2. Ishi E. 1992. Current topics of bacterial food-borne and water-borne diseases. *Seikatsu Eisei* 36: 197-207.
3. 식품의약품안전청. 1998. 음식물 매개질환 예방 및 관리지침. p 29-31.
4. 工藤泰雄, 大橋 誠. 1990. 腸炎ビブリオ 第三集. 近代出版. p 26-36.
5. Wong HC, Lu KT, Pan TM, Lee CL, Shin DYC. 1996. Sub-species typing of *Vibrio parahaemolyticus* by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 34: 1535-1539.
6. Suthienkul O, Ishibashi M, Iida T, Nettip N, Supavej S, Eampokalap B, Makino M, Honda T. 1995. Urease production correlates with possession of the *trh* gene in *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated in Thailand. *J Infectious Diseases* 172: 1405-1408.
7. Kang DH, Chun SS, Chung DH, Cho SH. 1994. Antimicrobial effects of grapefruit seed extract on *Vibrio parahaemolyticus* isolated from Southern Adjacent Sea of Korea. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 1086-1093.
8. Honda T, Iida T. 1993. The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of the thermostable direct haemolysin and related haemolysin. *Rev Med Microbiol* 4: 106-113.
9. Shirai T, Ni YX, Miwatani T. 1988. Purification and characterization of a hemolysin produced by clinical isolate of

- kanagawa phenomenon-negative *Vibrio parahaemolyticus* and related to the thermostable direct haemolysin. *Infect Immun* 56: 961-965.
10. Zide N, Davis J, Ehrenkranz NJ. 1974. Fulminating *Vibrio parahaemolyticus* septicemia. *Arch Intern Med* 133: 479-481.
 11. Sato A, Terao M, Ishibashi M. 1993. Antibacterial effects of garlic extract on *Vibrio parahaemolyticus* in fish meat. *Food Hyg Soc* 34: 63-67.
 12. Cho SH, Kim YR. 2001. Antimicrobial characteristics of *Scutellariae Radix* extract. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 964-968.
 13. Park WP, Cho SH, Lee, DS. 1998. Effects of grapefruit seed extract and ascorbic acid on the spoilage microorganisms and keeping quality of soybean sprouts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 1086-1093.

(2002년 2월 22일 접수; 2002년 6월 1일 채택)