

## *Listeria monocytogenes* Scott A의 성장과 열저항성에 미치는 유기산의 영향

이신호<sup>†</sup> · 조현순 · 김순희

효성여자대학교 식품가공학과

### Effect of Organic Acids on Growth and Heat Resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A

Shin-Ho Lee<sup>†</sup>, Hyun-Soo Jo and Soon-Hee Kim

Dept. of Food Science and Technology, Hyosung Women's University, Hayang 713 - 702, Korea

#### Abstract

The effects of organic acids on growth and heat resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A were investigated. The growth of *L. monocytogenes* was inhibited in Tryptic Soy Broth (TSB) with 0.1 or 0.2% of acetic, tartaric, propionic, citric and lactic acid at 35°C, respectively. The growth of *L. monocytogenes* did not occur in TSB with 0.2% of acetic acid or propionic acid during 48h of incubation. The heat resistance of *L. monocytogenes* was affected by kind of organic acid, pH and heating substrate. *L. monocytogenes* showed more heat resistant in TSB with various organic acids than in 0.1M sodium phosphate with the same organic acids. Heat resistance decreased as pH of heating substrate decreased. Surface-adherent microcolony was more heat resistant than planktonic cell of *L. monocytogenes*. Propionic and lactic acids more affected on heat resistance of *L. monocytogenes* than acetic, tartaric and citric acids.

Key words : *Listeria monocytogenes*, heat resistance, organic acid

#### 서 론

*Listeria monocytogenes*는 자연계에 널리 분포하며 비위생적인 식품가공 시설에 의해 오염된 식품은 listeriosis의 원인이 되기도 한다. *L. monocytogenes*는 식품 가공 공장내의 표면에서 영양결핍 조건하에서 biofilm을 형성하여 항생제제와 소독제 등에 대한 내성과 열내성이 강하여<sup>1,2)</sup> 식품위생학적인 측면에서 중요시 되고 있다.

*L. monocytogenes*의 열저항성에 관한 연구는 가금육<sup>3)</sup>과 ground beef roast<sup>4)</sup>, 털지분유와 cottage cheese<sup>5,6)</sup> 그리고 pH의 효과<sup>7)</sup>에 관한 보고가 있다.

유기산과 그 ester 화합물은 자연계에 널리 존재하고 있으며 식품의 보존제 및 산미제로서 사용된다. *L. monocytogenes*는 TSB, cabbage juice와 cottage cheese에서 유기산에 의해 성장이 억제된다<sup>8,9)</sup>. Lactic과 acetic

acid를 사용하여 pH 5.0~5.1로 조절한 cold-pack cheese food에 *L. monocytogenes*를 접종하고 0.3% sodium propionate를 함유시켰을 때 유기산을 사용함으로써 sodium-propionate의 효과가 향상되었다는 보고가 있다<sup>10)</sup>.

본 연구는 acetic, tartaric, propionic, citric 그리고 lactic acid 등의 유기산을 사용하여 *L. monocytogenes* 성장과 열저항성에 미치는 영향을 검토하여 식품 및 식품 제조 환경에서 *L. monocytogenes*의 오염방지와 사멸을 위한 방법을 모색하고자 실시하였다.

#### 재료 및 방법

##### 사용 균주

미국 조지아대학 식품가공학과로부터 분양받은 *L. monocytogenes* Scott A를 Tryptic Soy Agar (TS A, Difco) slant에 접종하여 35°C에서 24시간 배양한 후 4°C에서 보관하면서 사용하였다.

<sup>†</sup>To whom all correspondence should be addressed

### 유기산 농도별 성장검사

Tryptic Soy Broth (TSB, Difco)에 유기산(acetic, tartaric, citric, propionic 및 lactic acid)을 0.1과 0.2%로 첨가하여 24시간 배양한 *L. monocytogenes*를 접종한 후 35°C에서 48시간 배양시킨면서 일정시간 간격으로 시료를 채취하여 600nm에서 O.D. (Shimadzu UV-120-02)를 측정하여 대조구와 성장을 비교 검토하였으며 배양 기간중 pH는 pH meter (Corning, ionanalyzer 150)를 사용하여 측정하였다.

### 열저항성 검사

*L. monocytogenes* Scott A를 TSB에 접종하여 35°C에서 24시간 배양시킨 후 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 이것을 유기산으로 pH 5.0, 6.0으로 조절한 TSB와 0.1M sodium phosphate dibasic ( $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ )을 유기산으로 pH 5.0, 6.0으로 조절한 후 각각 혼탁시켜 2ml gold band ampoule (Weatton Co., U.S.A.)에 분주하여 밀봉한 다음 65°C water bath에서 1분간 열처리한 후 즉시 냉각시켜 생균수를 측정하였다.

Adherent microcolony의 조제는 Lee와 Frank<sup>2)</sup>의 방법으로 세척한 stainless steel slide (type 304, finish NO. 4. 2 × 5cm)를 25ml의 TSB가 담긴 25 × 18mm 시험관에 넣어 가압멸균한 후 35°C에서 24시간 배양한 *L. monocytogenes* Scott A를 접종하여 21°C에서 2일간 배양한 후 slide를 멸균된 희석수로 세척하였다<sup>2)</sup>. 세척한 slide를 새로운 TSB가 든 시험관에 옮긴 후 다시 21°C에서 2일간 반복 배양법으로 총 8일간 배양하여 사용하였다<sup>2)</sup>. Adherent microcolony를 형성한 slide를 멸균 희석수로 세척한 후 유기산으로 pH 5.0으로 조절한 TSB 25ml가 담긴 시험관에 slide를 넣어 65°C의 water bath에서 1분간 열처리한 후 즉시 냉각시켜 생균수를 측정하였다. 생균수의 측정은 Lee와 Frank<sup>2)</sup>의 방법을 사용하여 0.

1% peptone-용액으로 적정 희석한 후 pour plate method로 Tryptic Soy Agar에 접종하여 35°C에서 48시간 배양한 후 형성된 colony수를 계측하여 비교 검토하였다.

### 결과 및 고찰

#### 유기산이 *Listeria monocytogenes* Scott A의 성장에 미치는 영향

Tryptic Soy Broth에 acetic, tartaric, propionic, citric 및 lactic acid를 0.1% 농도로 조절한 후 *L. monocytogenes*의 성장변화는 (Fig. 1) 배양 초기에서부터 배양 48시간 동안 유기산 첨가구는 모두 대조구에 비해 성장이 뚜렷한 성장억제 현상을 나타내었다. 정지기는 대조구, tartaric, lactic 그리고 citric acid는 12시간 후에, acetic acid와 propionic acid는 18시간 후에 시작되었으며 유기산 첨가에 따른 성장억제 효과는 산종류에 따라 다르게 나타났고, acetic acid와 propionic acid에서 성장억제효과가 가장 뚜렷하게 나타났으며 citric acid와 lactic acid의 억제효과는 비슷한 경향을 나타내었다. 이 결과는 Ahmad와 Marth<sup>3)</sup>의 35°C에서 0.1% 유기산으로 TSB를 산성화한 처리구의 정지기는 15~18시간후에 시작되었으며 acetic acid 첨가구가 citric acid와 lactic acid의 첨가구에 비해 성장억제효과가 높았다 고 보고한 결과와 유사한 경향을 나타내었다.

0.2%의 유기산으로 조절한 TSB에서 *L. monocytogenes* Scott A의 성장변화는 Fig. 2에 보는 바와 같이 O. D.의 가장 높은 수치는 대조구의 경우 1.07인 반면에 acetic acid와 propionic acid는 각각 0.01, 0.03을 나타내었으며 tartaric, citric 그리고 lactic acid는 각각 0.31, 0.50, 0.46을 나타내었다. 유기산의 농도가 증가함에 따라 성장억제효과는 더욱 뚜렷하게 나타났으며 0.2%의 acetic acid와 propionic acid의 존재하에서는 배양

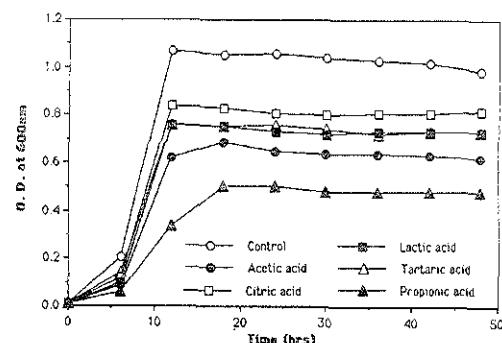


Fig. 1. Growth of *Listeria monocytogenes* Scott A in Tryptic Soy Broth with various 0.1% of organic acids at 35°C.

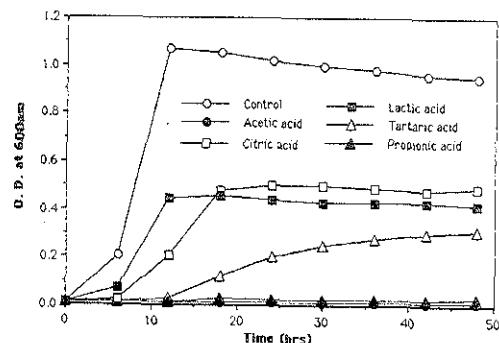


Fig. 2. Growth of *Listeria monocytogenes* Scott A in Tryptic Soy Broth with various 0.2% of organic acids at 35°C.

48시간 동안 거의 성장이 일어나지 않는 경향을 나타내었다. 유기산은 용해성이 높고 특성이 낮아 식품보존제 또는 산화제로서 가장 많이 사용되고 있으며 유기산의 항균작용은 산의 종류<sup>11,12)</sup>, 식품의 pH와 유기산의 해리도에 따라 다르게 나타난다<sup>12)</sup>.

TSB에서 0.1%, 0.2% 유기산의 존재하에서 *L. monocytogenes* Scott A의 성장에 따른 pH의 변화는 유기산 0.1%인 경우 대수적 증식기 말기인 배양 12시간째 대조구인 경우 5.03을 나타내었으나 propionic acid가 5.57인 반면 그의 유기산 첨가구의 pH는 4.60 내지 4.88의 범위를 나타내었다. 0.2% 유기산에서는 배양 48시간째 대조구의 pH는 5.17인 반면에 tartaric, citric 및 lactic acid는 각각 4.34, 4.42, 4.37을 나타내었으며 acetic acid와 propionic acid는 4.91, 5.32를 나타내어 Sorrells 등<sup>13)</sup>이 온도에 관계없이 성장억제하는 최대 pH는 citric acid는 4.4이하 lactic acid는 4.4~4.6 범위이며 acetic acid는 4.8~5.0이었다는 보고와 Conner 등<sup>14)</sup>의 cabbage juice를 pH 5.6으로 조정하여 *L. monocytogenes* 10<sup>6</sup>cfu/ml 접종하여 배양한 결과 pH 4.8의 범위에서 생존하였다는 보고와 유사한 경향을 나타내었다. 식품내에서 유기산의 항균작용은 수분활성도, pH, 식품구성성분과 지방함량에 영향을 받는다. *L. monocytogenes*의 성장억제 효과가 가장 높은 것으로 나타난 acetic acid와 propionic acid의 pH는 4.87~5.36 범위였으며 이것은 이들 유기산이 포화지방산으로써 pKa값이 다른 유기산에 비해 높아 전리되지 않은 산으로 존재하여 친유성이 강해 *L. monocytogenes*의 세포막을 쉽게 통과한 후 세포내에서 전리되어 세포내 pH를 낮게 유지시켜 사멸효과를 높이는 것<sup>15)</sup>으로 판단되며 식품내에 pH를 각각 유기산의 비해리산을 많이 포함하-

는 범위에서 식품보존제나 산화제로서 첨가한다면 부패미생물 또는 병원성 미생물의 성장억제 및 사멸효과를 증진시킬 것으로 판단되었다.

#### 유기산이 *Listeria monocytogenes* Scott A의 열저항성에 미치는 영향

*L. monocytogenes* Scott A의 열저항성에 미치는 유기산의 효과를 검토하기 위하여 각종 유기산을 사용하여 pH 5.0과 6.0으로 조정하여 65°C에서 1분간 열처리하여 열저항성을 비교검토한 결과 pH 5.0(Fig. 3)에서 propionic acid와 lactic acid의 log reduction은 각각 4.33, 4.63으로 열처리효과가 가장 증진되는 것으로 나타났으며 pH 6.0(Fig. 4)에서는 2.69, 2.76을 나타내어 pH에 따라 *L. monocytogenes* Scott A의 사멸효과는 다르게 나타났으며 pH가 낮아짐에 따라 열저항성이 감소하는 경향을 나타내었다. TSB를 acetic, tartaric, propionic, citric 및 lactic acid로 pH 5.0과 6.0으로 조절하여 65°C에서 1분간 처리한 후 열저항성을 비교한 결과 pH 5.0(Fig. 5)에서 유기산의 종류에 따라 열처리효과는 다르게 나타났으며 lactic acid 처리구의 log reduction은 2.16, propionic acid에서는 2.09를 나타내어 열처리효과가 가장 높은 것으로 나타났으며 acetic, tartaric 그리고 lactic acid의 log reduction은 각각 1.19, 0.81, 0.96을 나타내었다. pH 6.0(Fig. 6)에서는 pH 5.0의 경우보다 열저항성은 다소 높은 경향을 보였으나 유기산 종류에 따른 열저항성은 pH 5.0에서 유사한 경향을 나타내어 propionic acid와 lactic acid의 경우 열처리 후 log reduction은 각각 1.27과 1.32이었다. 유기산에 의한 *L. monocytogenes* Scott A의 열처리에 의한 사멸효과는 pH가 낮을수록 높은 경향이 관찰되었으며

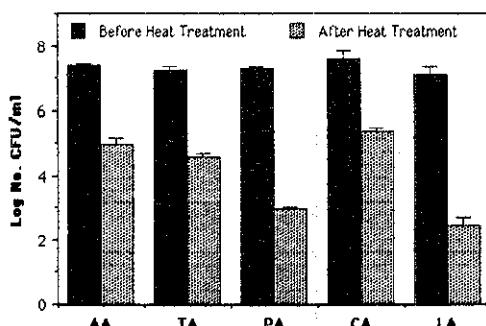


Fig. 3. Heat resistance of planktonic *Listeria monocytogenes* Scott A in 0.1M Sodium Phosphate (pH 5) with various organic acids after heat treatment for 1min at 65°C.

\* AA : Acetic acid      TA : Tartaric acid  
PA : Propionic acid      CA : Citric acid  
LA : Lactic acid

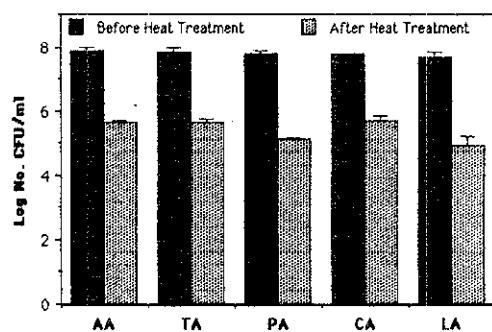


Fig. 4. Heat resistance of planktonic *Listeria monocytogenes* Scott A in 0.1M Sodium Phosphate (pH 6) with various organic acids after heat treatment for 1min at 65°C.

\* Abbreviations are the same as in Fig. 3.

유기산의 형태에 따라 뚜렷한 차이를 나타내었다. 또한 TSB내에서 보다는 phosphate buffer에서 유기산의 열처리효과가 높은 것으로 보아 식품의 영양성분 조성은 유기산에 의한 항균효과 및 열처리효과에 영향을 미칠 것으로 사료되었다.

#### 유기산이 adherent microcolony의 열저항성에 미치는 영향

유기산을 첨가하여 pH 5.0으로 조정한 TSB를 열처리기질로 사용하여 *L. monocytogenes* Scott A의 adherent microcolony가 형성된 stainless steel slide를 65°C에서 1분간 처리하여 열저항성을 검토한 결과(Fig. 7) propionic acid 처리구의 log reduction은 1.21, acetic, tartaric, citric 및 lactic acid는 각각 0.72, 0.43, 0.47, 0.93이었다. 특히 adherent microcolony의 경우는 tartaric acid와 lactic acid가 열처리 효과가 높은 경향을 나타내었다. *L. monocytogenes* Scott A의 adherent microcolony는 영양세포(planktonic cell)에 비해 열저항

성이 강한 것으로 나타났으며 biofilm을 형성한 세포는 열에 내성이 강한 것으로 보고한 Lee와 Frank<sup>1,2)</sup>의 보고와 유사한 경향을 나타내었다. 이것은 *L. monocytogenes* Scott A가 adherent microcolony 형성 시 lipoteichoic acid의 축적<sup>14,15)</sup>에 의해 항균물질의 침투를 막는 것으로 판단되었다.

EL-Shenawy와 Marth<sup>16)</sup>의 tryptose broth를 acetic, tartric, lactic 그리고 citric acid로 pH 5.6과 5.0으로 산성화하여 35°C에서 *L. monocytogenes* Scott A를 배양시킨 결과 pH 5.6에서는 산 종류별 차이는 없었으나 pH 5.0에서 acetic acid 처리구가 lag phase가 연장되었다는 보고가 있으며 또한 Conner 등<sup>16)</sup>은 0.06% yeast extract를 첨가한 TSB에서 *L. monocytogenes*를 억제하는 pH의 범위는 propionic acid인 경우 5.0, acetic acid와 lactic acid는 4.5, citric acid와 hydrochloric acid는 4.0으로 보고한 바 있다. 즉 유기산의 독성효과는 유기산의 비해리된 분자의 작용에 의한 것이며 유기산의 형태에 따라 미생물에 대한 독성은 달라진다<sup>16)</sup>. 유기산의 항균적작용은 pH와 해리정도와 관련되며 비해리된 유기산은 세균의 세포막에 빨리 용해되므로 해리된 형태보다 더욱 미생물 사멸효과가 증진된다. 유기산에 의한 활성 메카니즘은 미생물의 세포막의 투과성을 방해하는 것과 관련되어 전자전달계로부터 기질전달과 산화적인산화의 방해에 기인하며 유기산의 음이온은 세포벽의 대사에 의해 H<sup>+</sup>의 방출과 함께 세포내부가 산성화되므로<sup>17)</sup> 미생물의 성장억제와 사멸의 주요 원인이 된다<sup>18)</sup>. 주로 유기산은 다른 보존제와 호환성이 있고 복합사용은 상승작용이 있어 항균적물질로서 효과를 높일 수 있는 것으로 판단되므로 식품 및 식품제조 환경에서 유기산으로 적정 pH를 조정하여 식품 및 식품제조 환경에서 열처리효과를 상승시킬 수 있을 것으로

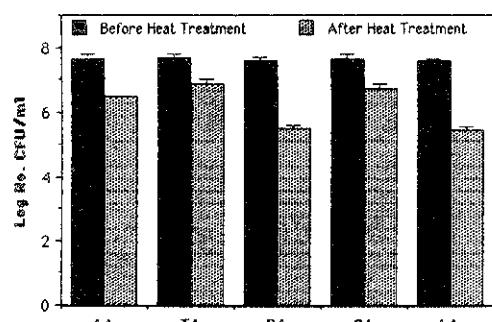


Fig. 5. Heat resistance of planktonic *Listeria monocytogenes* Scott A in Tryptic Soy Broth (pH 5) with various organic acids after heat treatment for 1min at 65°C.  
\* Abbreviations are the same as in Fig. 3.

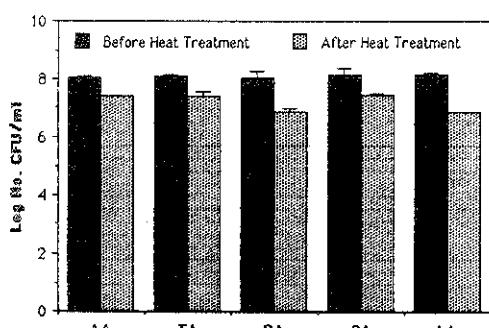


Fig. 6. Heat resistance of planktonic *Listeria monocytogenes* Scott A in Tryptic Soy Broth (pH 6) with various organic acids after heat treatment for 1min at 65°C.  
\* Abbreviations are the same as in Fig. 3.

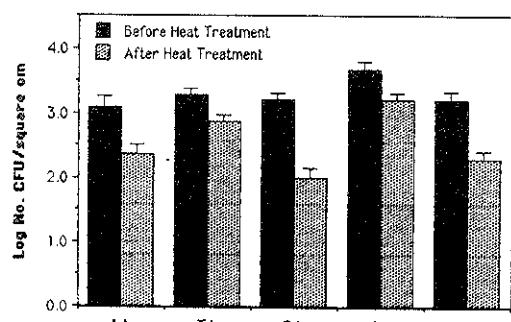


Fig. 7. Heat resistance of Surface-adherent *Listeria monocytogenes* Scott A in Tryptic Soy Broth (pH 5) with various organic acids after heat treatment for 1min at 65°C.  
\* Abbreviations are the same as in Fig. 3.

판단되었다.

## 요 약

유기산(acetic, tartaric, propionic, citric 그리고 lactic acid)에 의한 *L. monocytogenes* Scott A의 성장과 열저항성에 미치는 영향을 검토한 결과 각 유기산 0.1%를 첨가한 경우 배양 48시간 동안 대조구에 비해 뚜렷한 성장억제현상이 관찰되었으며, 배양중 pH는 대수적 증식 말기인 12시간째 대조구 5.17, propionic acid첨가구 5.57인 반면 그외 유기산 첨가구의 pH는 4.60~4.88였다. 0.2%의 유기산을 첨가한 경우 acetic acid 또는 propionic acid 첨가구에서는 배양 48시간 동안 성장이 거의 일어나지 않았다. 각 유기산으로 pH 5.0과 6.0으로 조절한 TSB를 기질로 사용하여 65°C에서 1분간 처리하여 열저항성을 비교한 결과 pH 5.0에서는 유기산의 종류에 따라 열처리 효과는 상이하였으며, citric acid 또는 propionic acid 처리구의 log reduction이 각각 1.56, 1.79로 열처리 효과가 가장 높았으며 pH 6.0에서 열처리효과는 유사한 경향을 나타내었다. 각 유기산을 사용하여 pH 5.0과 6.0으로 조절한 0.1M sodium phosphate를 열처리 기질로 사용한 경우 pH 5.0에서 propionic acid처리구와 lactic acid의 처리구의 열처리효과가 가장 높았다. TSB에 유기산을 첨가하여 pH 5.0으로 조절한 후 65°C에서 adherent microlony의 열저항성을 검토한 결과 propionic acid처리구의 log reduction은 1.21을 나타내어 열처리효과가 가장 높은 것으로 관찰되었으며, adherent microcolony는 planktonic cell에 비해 강한 열저항성을 나타내었다.

## 문 헌

- Frank, J. F. and Koffi, R. A. : Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* in associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. *J. Food Prot.*, **53**, 550 (1990)
- Lee, S. H. and Frank, J. F. : Inactivation of surface-adherent *Listeria monocytogenes* by hypochlorite and heat. *J. Food Prot.*, **54**, 1 (1991)
- Carpenter, S. L. and Harrison, M. A. : Survival of *Listeria monocytogenes* in processed poultry. *J. Food Sci.*, **54**, 556 (1989)

- Schoeni, J. L., Brunner, K. and Doyle, M. P. : Rates of thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in beef and fermented beaker sausage. *J. Food Prot.*, **54**, 34 (1991)
- Doyle, M. P., Meske, L. M. and Marth, E. H. : Survival of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and storage of nonfat dry milk. *J. Food Prot.*, **48**, 740 (1985)
- Ryser, E. T., Marth, E. H. and Doyle, M. P. : Survival of *Listeria monocytogenes* during manufacture and storage of cottage cheese. *J. Food Prot.*, **48**, 746 (1985)
- 이신호, 조현준 : *Listeria monocytogenes*의 열저항성에 미치는 pH와 nisin의 효과. 산업미생물학회지, **21**, 200 (1993)
- Conner, D. E., Brackett, R. E. and Beuchat, L. R. : Effect of temperature, sodium chloride, and pH on growth of *Listeria monocytogenes* in cabbage juice. *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**, 59 (1896)
- Ahmad, N. and Marth, E. H. : Behavior of *Listeria monocytogenes* at 7, 13, 21 and 35°C in tryptose broth acidified with acetic, citric or lactic acid. *J. Food Prot.*, **52**, 688 (1989)
- Ryser, E. T. and Marth, E. H. : Survival of *Listeria monocytogenes* in coldpack cheese food during refrigerated storage. *J. Food Prot.*, **51**, 615 (1988)
- EL-Shenawy, M. A. and Marth, E. H. : Behavior of *Listeria monocytogenes* in the presence of sodium propionate together with food acids. *J. Food Prot.*, **53**, 652 (1992)
- EL-Shenawy, M. A. and Marth, E. H. : Inhibition or inactivation of *Listeria monocytogenes* by sodium benzoate together with some organic acids. *J. Food Prot.*, **52**, 771 (1989)
- Sorrells, K. M., Enigl, D. C. and Hatfield, J. R. : Effect of pH, acidulant, time, and temperature on the growth and survival of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.*, **52**, 571 (1989)
- 김병홍 : 미생물 생리학. 아카데미서적, 서울, p.49 (1988)
- Hammond, S. M., Lambert, P. A. and Rycroft, A. N. : Walls of gram-positive bacteria. In "The Bacterial cell surface" Kapitan Szabo Publ., Washington, D. C., p. 29 (1981)
- Conner, D. E., Scott, V. N. and Bernard, D. T. : Growth, inhibition, and survival of *Listeria monocytogenes* as affected by acidic conditions. *J. Food Prot.*, **53**, 652 (1990)
- Freese, E., Shey, C. W. and Galliers, E. : Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. *Nature*, **241**, 321 (1973)

(1993년 12월 14일 접수)