

연안 해역에서 분리한 *Vibrio parahaemolyticus*에 대한 유기산의 증식억제 효과

장재선 · 김용희* · 윤병준**†

가천의과대학교 식품영양학과, *인천광역시 보건환경연구원, **한국방송통신대학교 환경보건학과
(2009. 5. 1. 접수/2009. 5. 20. 수정/2009. 6. 5. 채택)

Antimicrobial Effect of Organic Acid and Distribution of *Vibrio parahaemolyticus* from the Incheon Adjacent Sea

Jae-Seon Jang · Yong-Hee Kim* · Byoung-Jun Yoon**†

Dept. of Food & Nutrition, Gachon University of Medicine and Science

*Health and Environment Research Institute, Incheon

**Dept. of Environmental Health, Korea National Open University

(Received May 1, 2009/Revised May 20, 2009/Accepted June 5, 2009)

ABSTRACT

This study was carried out to investigate the distribution of *V. parahaemolyticus* in Incheon adjacent sea, and antimicrobial effect on growth of *V. parahaemolyticus* in organic acid. The detected strains were compared for geography, months and sample types. *V. parahaemolyticus* was detected from 28.5 percent of 287 samples collected from Incheon area, and 34.7 percent of 91 samples collected in the months of July through September, and 24.7 percent of 279 shellfish samples respectively. The minimum inhibitory concentration(MIC) of organic acid in *V. parahaemolyticus* were 1,250 ppm at propionic acid, citric acid and acetic acid, 2,500 ppm at vanillic acid, respectively. MICs of combined treatment of acetic acid and vanillic acid, citric acid and vanillic acid, propionic acid and vanillic acid were 1,250 ppm. MICs of combined treatment of citric acid and acetic acid, propionic acid and acetic acid, propionic acid and citric acid was 12.5 ppm. The antimicrobial effect of organic acid in *V. parahaemolyticus* was confirmed from the result of this experiment.

Keywords: *V. parahaemolyticus*, organic acid, minimum inhibitory concentration

I. 서 론

최근 과학이 발달하고 공중위생이 진보됨에 따라 식품의 제조기술은 급속히 발전하여 기계화, 자동화 등이 이루어지게 되었고, 식품의 종류도 현저히 증가하여 생활하는 데는 대단히 편리해졌다. 그러나 식품 제조·가공·포장·보존·조리 등의 과정에서 개인이 소홀할 때 미생물의 침입증식과 화학물질에 의한 오염 때문에 식중독 사고의 발생기회가 많아짐에 따라 피해를 방지하고 안전성을 확보하는 것은 식품위생상 가장 중요한 과제가 되고 있다.¹⁾

장염 비브리오성 식중독을 일으키는 원인균으로

*Vibrio parahaemolyticus*는 일반적으로 직경이 0.5-0.8 μm , 길이는 1.4-2.6 μm 이며, 단편모를 가지고 운동성이 있는 그람 음성균으로 콤팩트형 이거나 간균으로 oxidase 양성, 포도당은 발효하나 가스를 생성하지 않는 특성을 가지고 있다.²⁾ 또한 염분을 필요로 하는 호염성 세균으로 적정 염분의 농도는 종에 따라 다양하며, 해수, 갯벌, 해양생물 등 해양환경에서 널리 서식하고 있다. 병원성 비브리오균은 장염 및 설사를 일으키며 해산물이나 어류의 생식, 식품의 가공 및 저장 중에 증식하여 식중독을 발생시킨다.⁴⁾ 2008년 식품의약품통계연보에 따르면 2007년 우리나라 식중독 발생 건수에서 장염 비브리오로 인한 식중독이 510건 중 33건으로 6.5%를 차지하였으며, 지역별로 부산, 전남, 경기도, 강원, 인천 순으로 발생하였으며, 장소별로 보면 식품접객업소가 전체 발생건수 중 56.7%로 발생하였다고 보고하고 있다.⁵⁾

†Corresponding author : Dept. of Environmental Health,
Korea National Open University
Tel: 82-2-3668-4741, Fax: 82-2-3668-4741
E-mail : bjyoon57@knou.ac.kr

식중독균에 대한 초산, 구연산, 젖산의 첨가에 따른 생육저해물질에 관한 많은 연구가 진행되어 있으며,⁷⁾ 과산화수소와 유산을 단독 및 병용 처리할 때, 안식향산나트륨, 소르빈산, 과산화수소 등이 식중독세균 증식억제효과가 있다고 보고^{8,10)}되고 있다.

그리하여 본 연구에서는 인천연안 해역지역에서 *Vibrio parahaemolyticus*의 분포상태를 조사하고, 아울러 분리된 *V. parahaemolyticus*의 유기산별 단독 및 병용 처리함으로써 증식억제 효과를 연구함으로써 식중독 예방의 기초자료로 제공하고자 한다.

II. 연구 방법

1. 시료 채취

본 실험에서 *Vibrio parahaemolyticus*의 분포조사를 위한 시료의 채취는 2008년 인천지역, 강화군, 옹진군의 3개 지역을 선정하여 해수, 갯벌 및 어패류를 대상으로 장소별, 분기별로 각각 시료를 채취하여 시험하였다.

2. *Vibrio parahaemolyticus*균의 분리 동정

V. parahaemolyticus 분리를 위해 채취한 시료 중 해수는 연안 3개 지역에서 멸균병에 1 l를 채취하여 냉장상태로 실험실에 운반하여 Millipore filter system(pore size 0.45 mm)로 여과한 여과지를 3% NaCl alkaline peptone water(3% NaCl APW, pH 8.4) 100 ml에 넣고 35°C, 16-18시간 증균 배양하였으며, 어패류 및 갯벌은 멸균병에 100 g씩 채취하여 냉장상태로 실험실에 운반한 후 마쇄하여 해수의 시험방법과 같이 증균 배양하였다. 증균 배양시킨 배양액으로부터 백금선을 사용하여 TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose) Agar에 획선을 도말한 후 35°C, 18-24시간 배양한 다음 sucrose를 분해하지 않는 전형적인 녹색 집락을 선택하고, 감별배지인 KIA(Klingler Iron Agar)에 접종하여 35°C, 18-24시간 배양한 후 K/A(Alkaline Slant/Acid butt)성상과 Gas(-), H₂S(-)인 *Vibrio*속 균을 분리하였다. API 20E kit(analytical profile index, France)를 사용하여 생화학적 특성을 조사하고 아울러 K 항원 진단용혈청(Denka Seiken Co.)으로 slide 응집반응을 실시하여 생리식염수에 응집반응을 일으키는 것과 K항원 혈청에 응집되지 않는 것은 제외하여 최종 *V. parahaemolyticus*으로 동정하였다.

3. 유기산처리에 의한 항균실험

1) 실험 균주

본 실험에 사용한 균주는 인천연안 해역에서 분리한

*V. parahaemolyticus*를 사용하였다. 실험 균주는 1% peptone, 37% glycerol에 진하게 부유시킨 다음 -70°C에 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) 주 배양 및 현탁액 조제

-70°C로 보관된 실험 균주를 tryptic soy agar(Difco)에서 35±1°C에서 24시간 3회 계대 배양하여 순수 배양되었음을 확인하였다. 이 중 전형적인 집락을 따서 멸균 생리식염수에 현탁시켜 McFarland Scale No. 0.5(1% BaCl + H₂SO₄ 99.5 ml : 1.5×10⁸ CFU/ml)에 맞춘 후 이를 100 ml에 희석한 액을 표준균액으로 사용하였다.

4) 분리된 *V. parahaemolyticus*에 대한 유기산의 단독 및 병용처리시 최소발육억제농도

시험관내에 8개의 시험관을 배열하고 Muller Hinton broth를 제1시험관에는 1 ml을, 나머지 시험관에는 0.5 ml씩 분주하였다. 그 다음 3%로 희석한 유기산 용액 0.5 ml을 제1시험관에 가하여 잘 혼합(초기농도:1%)한 다음 0.5 ml을 뽑아서 제2시험관에 옮기고 잘 혼합한 0.5 ml를 제3시험관에 옮긴다. 이러한 조작을 제8시험관까지 하여 2배 계단 희석된 유기산을 함유한 배지에 100배 희석한 균액(1.5×10⁶ CFU/ml)을 0.5 ml씩 8개 시험관에 접종하였다. 37°C에서 48시간 동안 정치 배양한 다음 균의 증식(배지의 혼탁유무) 유무를 세균이 증식하지 않은 최저 발육억제농도를 결정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. *Vibrio parahaemolyticus*의 분포

2008년 1년간 인천지역, 강화군, 옹진군의 3개 지역에서 채집한 해수 538건, 갯벌 498건, 어패류 1,128건에 대한 *V. parahaemolyticus*의 분포는 Fig. 1~3에 나타내었다. *V. parahaemolyticus*의 검체종류별 분포는 총 2,170건을 실험한 결과 해수에서 538건 중 76건(14.1%), 갯벌과 어패류는 각각 498건 중 83건(16.6%), 1,128건 중 279건(24.7%)이 검출 되었으며, 검체장소별

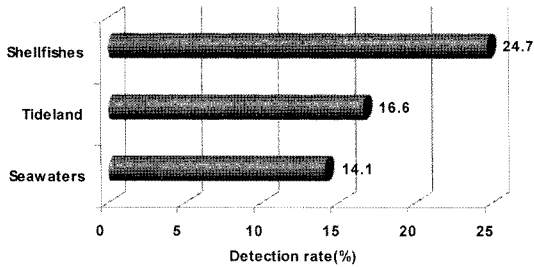


Fig. 1. Distribution of *V. parahaemolyticus* by sampling targets.

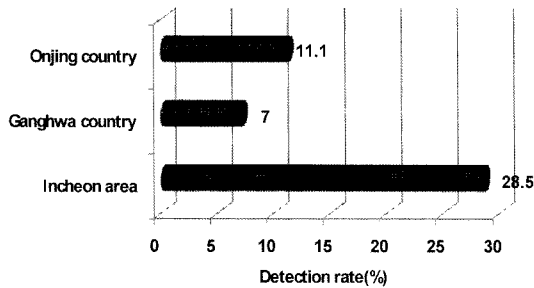


Fig. 2. Distribution of *V. parahaemolyticus* by sampling sites.

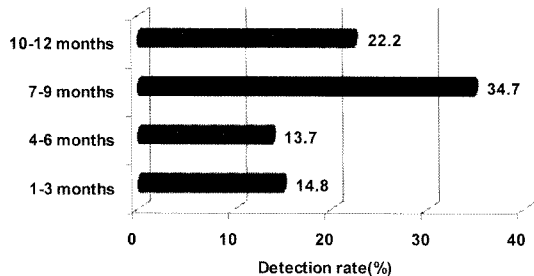


Fig. 3. Distribution of *V. parahaemolyticus* by sampling times.

분포를 살펴보면 인천지역에서 1,056건 중 287건 (28.9%), 강화군에서 1,096건 중 77건(7.0%), 옹진군에서 18건 중 2건(11.1%)이 검출되었으며, 분기별 분포현황을 살펴보면 1-3월에 383건 중 57건(14.8%), 4-6월에 580건 중 80건(13.7%), 7-9월에 262건 중 91건(34.7%), 10-12월에 945건 중 210건(22.2%)이 검출된

Table 1. MICs of organic acid in *Vibrio parahaemolyticus*

	Concentration of organic acid in <i>V. parahaemolyticus</i> (ppm)							
	10,000	5,000	2,500	1,250	625	312	156	78
Propionic acid	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++
Citric acid	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++
Acetic acid	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++
Vanillic acid	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++

+: growth, -: no growth.

바 인천지역에서 10-12월 중 어패류에서 가장 높은 검출율을 나타내고 있다. 강 등¹¹⁾과 장 등¹²⁾은 분리된 *Vibrio*균을 대상으로 분포상황을 조사한 결과월별로 7월에, 검체장소별 해수에서 가장 높은 분포율을 보고하고 있어 본 실험 결과와 유사한 경향을 나타냈다. 이는 장염비브리오균의 증식과 환경인자인 해수의 온도의 관련성이 시사되었다.

2. 분리된 *V. parahaemolyticus*에 대한 유기산별 단독처리시 최소발육억제농도

인천연안에서 분리된 *V. parahaemolyticus*에 대한 유기산별 최소발육억제농도(MIC)에 관한 결과는 Table 1과 같다. *V. parahaemolyticus*에 대한 유기산의 최소발육억제농도는 프로피온산, 구연산, 아세트산에서 각각 1,250 ppm, 바닐린산에서는 2,500 ppm에서 발육이 억제된 것으로 나타났다.

0.1 M 빙초산과 유산 함유배지에서 60분간 배양 후 생균수가 급격히 감소를 나타내어, 유기산의 농도가 높아질수록 사멸되는 정도가 증가 된다고 보고¹³⁾한 바 있어 본 실험 결과 유기산인 propionic acid, citric acid, acetic acid, vanillic acid가 식중독 세균 증식 억제에 효과가 있는 것은 판명되었다. 초산과 유산은 대표적인 유기산으로서 과실류에 다량 함유되어 있는데 특히 귤이나 레몬 등에서는 0.1내지 0.3 M 정도 포함되어 있다. 따라서 식중독의 원인식품이 되는 어패류에 귤이나 레몬 등을 곁들여 먹을 시 pH 저하에 따른 본 균의 사멸에 상당한 영향을 줄 것으로 사료된다.

3. 분리된 *V. parahaemolyticus*에 대한 유기산별 병용처리시 최소발육억제농도

*V. parahaemolyticus*에 대한 유기산별 병용처리시 최소발육억제농도(MIC)에 관한 결과는 Fig. 4, 5와 같다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 *V. parahaemolyticus*에 대하여 아세트산과 바닐린산, 구연산과 바닐린산, 프로피온산과 바닐린산을 병용처리한 최소발육억제농도는 1,250 ppm이었으며, 구연산과 아세트산, 프로피온산과 아세트

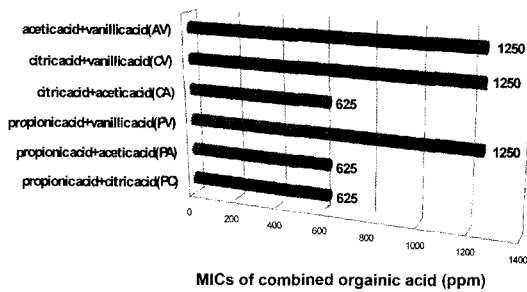


Fig. 4. MICs of *V. parahaemolyticus* by two different organic acid.

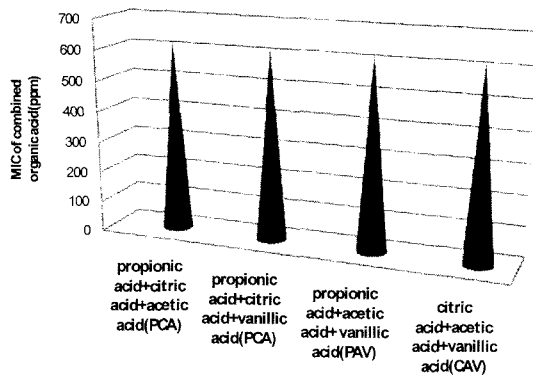


Fig. 5. MICs of *V. parahaemolyticus* by three different organic acid.

산, 프로피온산과 구연산을 병용처리한 최소발육억제농도는 625 ppm에서 발육이 억제되었다.

또한 3가지 유기산별 병용처리한 *V. parahaemolyticus*에 대한 최소발육억제농도(MIC)에 관한 결과 모든 균에서 625 ppm 첨가할 때 모두 억제되었다.

Lin 등¹⁴⁾과 장 등¹⁵⁾도 식중독균에 대한 유기산의 병용처리가 증식억제 효과가 있다고 보고한 바 본 실험 결과 유기산이 *V. parahaemolyticus* 증식 억제에 효과가 있는 것과 유사한 경향을 나타내었다.

IV. 결 론

본 연구에서는 식중독 예방의 일환으로 인천연안 지역에서 *V. parahaemolyticus*의 분포상태를 조사하고, 유기산의 단독 및 병용 처리함으로써 증식 억제효과를 실험한 결과는 다음과 같았다.

1. 연안 해역에서 분리된 *V. parahaemolyticus*의 검체종류별 분포는 총 2,170건을 실험한 결과 검체별 어패류에서 1,128건 중 279건(24.7%), 검체장소별 인천지역에서 1,056건 중 287건(28.9%), 분기별 7-9월에 262

건 중 91건(34.7%)으로 가장 높게 나타났다.

2. 유기산별 최소발육억제농도는 프로피온산, 구연산, 아세트산에서 각각 1,250 ppm, 바닐린산에서는 2,500 ppm에서 발육이 억제된 것으로 나타났다.

3. *V. parahaemolyticus*에 대하여 아세트산과 바닐린산, 구연산과 바닐린산, 프로피온산과 바닐린산을 병용처리한 최소발육억제농도는 1,250 ppm이었으며, 구연산과 아세트산, 프로피온산과 아세트산, 프로피온산과 구연산을 병용처리한 최소발육억제농도는 625 ppm에서 발육이 억제되었다. 또한 3가지 유기산별 병용처리한 *V. parahaemolyticus*에 대한 최소발육억제농도(MIC)에 관한 결과 모든 균에서 625 ppm 첨가할 때 모두 억제되었다.

참고문헌

1. Lee, H. G., Lee, S. H., Ryu, Y. G., Jang, J. S. : Food Sanitation, Daihak Publishing Company, 2005.
2. Chiou, A., Chen, S. K. : Foodborne illness in Taiwan. *Food Austria*, **43**, 70-71, 1990.
3. Krieg, N. R., Holt, J. G. : Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore, William & Wilkins, 1984.
4. Martinez, M. E., Morinigo, M. A., Castro, D., Balbona, M. C., Munoz, M. A., Borrego, J. J. : Relationship between indicators of fecal pollution in shellfish-growing water and occurrence of human pathogenic microorganism in shellfish. *Journal of Food Protection*, **55**, 609-614, 1992.
5. Korean Food & Drug Administration : Food & Drug Statistical Yearbook, 2008.
6. Hamad, N., Marth, E. H. : Behavior of *Listeria monocytogenes* at 7, 13, 25 and 35°C in tryptose broth acidified with acetic, citric or lactic acid. *Journal of Food Protection*, **52**, 688-693, 1989.
7. Dominguez, L., Garayazabal, J. F., Ferri, E. R., Vazquez, J. A., Gomezluca, E., Ambrosio, C., Suarez, G. : Viability of *Listeria monocytogenes* in milk treated with hydrogen peroxide. *Journal of Food Protection*, **50**, 636-640, 1987.
8. Vuyst, L. D., Vandamme, E. J. : Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. In *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*. Chapman & Hall Inc., New York, 91-142, 1994.
9. Rubin, H. E., Nerad, T., Vaughan, F. : Lactate acid inhibition of *Salmonella typhimurium* in yogurt. *Journal Dairy Science*, **65**, 197-203, 1982.
10. Jang, J. S., Lee, M. Y., Oh, B. Y., Lee, J. M., Go, J. M., Kim, Y. H. : Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* by organic acid. *Korean Journal of Environment Health*, **33**(5), 403-407, 2007.
11. Gang, D. H., Jeon, S. S., Jung, D. H., Jo, S. H. :

- Antimicrobial effect of grapefruit seed extract on *Vibrio parahaemolyticus* isolated from the southern adjacent sea of Korea. *Journal of Food Hygiene Safety*, **9**(3), 141-149, 1994.
12. Jang, J. S., Cho, W. K., Lee, H. J., Lee, J. M., Kim, H. Y., Kim, Y. H. : Antimicrobial effect of lactic acid and hydrogen peroxide and distribution of *Vibrio parahaemolyticus* from the Incheon adjacent sea. *Korean Journal Sanitation*, **21**(4), 11-18, 2006.
 13. Kim., S. C., Kim, D. H., Park, S. O. : Resistance of *Vibrio parahaemolyticus*. *Korean Journal of Preventive Medicine*, **21**, 183-194, 1988.
 14. Lin, C. M., Moon, S. S., Doyle, M. P., Mcwatters, 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. Jang, J. S., Go, J. M., Kim, Y. H. : Inhibitory effect of *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* by lactic acid and hydrogen peroxide. *Korean Journal. Environment Health*, **31**(2), 115-119, 2005.