J. Fd Hyg. Safety
Vol. 22, No. 4, pp. 317~322 (2007)

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

항균 필름과 저장 온도의 고등어 저장성 및 미생물학적 안전성에 대한 병행 효과

하지형 · 이유시 · 허선경 · 배동호[1] · 박상규[1] · 황선순[2] · 하상도*
중앙대학교 식품공학과, [1]건국대학교 생명과학과, [2]식품의약품안전청

Combined Effects of Antibacterial Film and Storage Temperature on Shelf-life and Microbiological Safety of Mackerel

Ji-Hyoung Ha, Yu-Si Lee, Sun-Kyung Heo, Dong-Ho Bae[1], Sang-Kyu Park[1], Sunsoon Hwang[2], and Sang-Do Ha*
Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University, Ansung 456-756, Korea
[1]Department of Bioscience and Biotechnology, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea
[2]Korea Food & Drug Administration, Korea
(Received November 10, 2007/Accepted December 15, 2007)

ABSTRACT – The purpose of this study was to investigate the antibacterial effect of films on shelf-life and microbiological safety of mackerel. Effects of antimicrobial films against total aerobic bacteria, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus* in mackerel were evaluated during storage of 5-14 days at 5°C, 10°C and 15°C. Antimicrobial films were developed with addition of a natural substance, wasabi extracts (*Wasabia japonica*). At 5°C storage, growth of total aerobic bacteria, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* were inhibited higher than at 10 and 15°C. Especially, the numbers of *V. parahaemolyticus* were decreased gradually at 5°C even in the control sample, and about 1 $\log_{10}$ cfu/g and 1.8 $\log_{10}$ cfu/g reductions were observed at 1 and 4 days, respectively. After 7 days, *V. parahaemolyticus* in all samples were not detected. There is a limit of a single treatment of antimicrobial film to prolong shelf-life of mackerel. The synergistic effect of antimicrobial film were shown by addition of 5°C refrigeration.

Key words: antimicrobial films, antimicrobial effects, wasabi extracts (*Wasabia japonica*), mackerel

웰빙 및 로하스(LOHAS, Lifestyle Of Health And Sustainability)를 중심으로 한 식품소비의 트렌드 변화가 찾아오면서 수산물에 대한 소비자들의 기호도가 크게 변하였고 신선한 수산물을 섭취하려는 욕구가 강해졌다[1]. 그러나 수산물은 수분이 많고 조직이 연하며 위해미생물이 부착되기 쉬울 뿐 아니라 취급 시 위생상의 문제점에 노출될 가능성이 매우 높다. 또한 수산물은 생존 중에는 근육이 무균상태이나 체표면, 점질물, 아가미, 소화관 등의 내부에 존재하는 세균들이 어획 후에 점막, 안구, 아가미 등의 저항력이 약한 곳으로부터 복강 내와 근육 내로 침입하고 운반, 처리, 취급 과정 중에 2차적 오염을 받게 된다[2,3]. 이와 같은 품질 저하를 억제하기 위해 최근에는 산화방지제 및 합성보존료를 첨가하는 화학적인 방법[4]과 질소, 탄산가스치환포장 또는 진공포장 등의 물리적 방법[5]이 많이 이용되고 있다. 그러나 화학적인 방법에 대한 소비자들의 거부반응이 높아지면서 화학 첨가물이 들어가지 않으면서 품질이 우수한 식품이 선호되기 시작했다. 물리적 방법 역시 수산물의 조직감이나 성상을 변형시키기 때문에 소비자들이 기피하는 경향이 있다.

이와 같은 소비자들의 기호도 변화로 인해 수산물의 보존을 위한 선도유지 기술이 꾸준히 연구되어 왔으며 최근 선도 유지를 위해 다양한 기능성 재료를 조합한 포장재가 개발되기 시작했다. 이러한 기능성 포장재는 1차적으로 식품 표면에서 발생하는 위해미생물의 생육 억제를 목적으로 항미생물 제제를 직접 포장필름에 첨가하여 식품의 표면과 접촉 또는 발산의 형태로 생육을 억제하는 방법이다. 최근에는 기존에 사용되어온 저온저장법을 바탕으로 이와 같은 생물학적 기술을 추가적으로 접목시킴으로써 두 가지 이상의 제어법을 복합하여 위해미생물을 제어하는 hurdle technology을 상용화하기 시작하였다. 이들 항균제는 화학

*Correspondence to: Sang-Do Ha, Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University, Ansung 456-756, Korea
Tel: 82-31-670-4831, Fax: 82-31-675-4853
E-mail: sangdoha@cau.ac.kr

적 처리법에 사용되는 살균소독제와 달리 식품첨가물로 허가되어 있는 합성품 또는 천연물로 한정되어 있다[6]. 따라서 항균포장은 소비자들이 느끼고 있는 화학물질에 대한 거부감을 없앨 수 있으며 식품 보존성 및 안전성에 큰 영향을 줄 수 있는 기술이다. 천연화합물을 포장 재료에 첨가하여 항균효과를 연구한 Hale 등[7]과 Weng 등[8]의 결과에 따르면 항진균성 항생물질인 imazalil을 LDPE(low density polyethylene) 필름에 첨가한 후 과일과 채소 및 치즈의 포장에 사용하여 곰팡이의 생육억제 효과를 입증한 보고가 있다. 또한 Halek 등[9]은 항진균제인 benomyl을 사용하여 효과를 확인하였고 Weng 등[10,11]은 유기산인 propionate, bezoate, sorbate를 사용하여 연구하였으며 Koichiro 등[12]은 와사비 추출물을 포장 재료에 사용한 연구 결과를 보고한 바 있다. 그러나 이러한 천연물질 및 항균소재들은 안전한 물질이기 때문에 사용 시 문제없으나 필름제조 시의 내열성, 식품 접촉시의 용해성 등 기능성 측면에서 해결해야 할 많은 문제가 있다. 더욱이 국내에서는 아직까지 와사비 추출물이 함유된 항균흡습필름이 상용화되어있지 않기 때문에 보다 활발한 연구가 필요한 실정이다.

본 연구는 고흡습성 필름에 고추냉이 추출물을 첨가하여 제작한 항균흡습필름의 항균력을 평가하기 위해 고등어 표면에 식품위해미생물을 접종하여 항균흡습필름으로 포장한 후 다양한 저장온도, 저장기간 및 항균필름의 코팅 횟수가 균의 성장 및 사멸에 미치는 영향을 평가하였다.

재료 및 방법

재료와 샘플링 방법

본 실험에 사용된 고등어는 2007년 3월 20일에서 4월 30일 사이에 경기도 안성시 농협 하나로 마트에서 구매한 생물이었다. 구매한 고등어를 멸균적으로 각각 25 g씩 정량한 후 대조구와 비교구로 나누어 포장, 저장하였다. 미생물학적 변화는 총호기성균과 *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* ATCC 19112, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 11965를 대상으로 실시하였고 총호기성균을 제외한 위해미생물의 균액 농도를 10^4~10^5 cfu/ml 로 조정하여 식품 표면에 점 접종 하였다. 각각의 시료를 5ºC, 10ºC, 15ºC 냉장고 및 저온 인큐베이터에 저장하였으며 5ºC에 저장된 시료는 14일, 10ºC, 15ºC에 저장된 시료는 5일 동안 미생물의 성장 및 사멸을 관찰하였다.

미생물 접종

병원성 미생물 접종은 균주를 Tryptic Soy Agar(Difco, USA)에 접종하여 37ºC에서 24시간 3회 계대배양한 후, 전형적인 집락을 Triptic Soy Broth(Difco)에 접종하여 37ºC에서 24시간 진탕배양하고 원심분리 하여 농축시켰다. 농축된 시험균을 멸균된 0.1% peptone water(Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) 일정량 균량으로 재부유시킨 다음 고등어 표면에 충분히 부착되도록 점 접종하였다.

항균 필름 소재

본 실험에서 사용한 항균물질은 십자화과에 속하는 숙근성 반음지 식물인 고추냉이(*Wasabia japonica*)에서 가수분해에 의해 생성되는 isothiocyanate 화합물로서 이 천연물질을 고흡습성 필름에 코팅하여 (주)뉴트라폴에서 제작하였다. 또한 흡습필름에 고추냉이 추출물의 코팅 횟수(1회, 2회, 3회)를 달리하여 추출물 농도에 따른 항균효과를 비교, 평가하였다.

고등어의 미생물 정량분석을 위한 시료 준비

식품공전[13]의 방법에 의해 25 g의 고등어와 멸균된 0.1% peptone water 225 mL를 멸균된 stomacher bag에 넣어 stomacher(Elmex SH-II M, Tokyo, Japan)로 1분간 균질화한 후 peptone water 0.1%를 이용하여 10배씩 연속 희석하였다. 단, *Vibrio parahaemolyticus* 변화 측정을 위한 모든 peptone water와 희석액은 염농도(NaCl)를 2%로 조정한 후 사용하였다.

미생물 정량 분석

총호기성균은 시료 1 mL가 분주된 petri-dish 위에 50ºC의 tryptic soy agar(TSA, Difco, Detroit, MI, USA)배지 15~20 mL를 부어(pour-plate technique) 잘 섞은 후 37ºC에서 24±1시간 배양하였다. 배양 후 standard plates count (SPC)에 의해 각각의 배지 위에 형성된 colony를 계수하여 colony-forming unit(CFU)/g으로 나타내었다. *E. coli* O157:H7의 항균흡습 필름 사용에 따른 저장온도, 기간별 변화추이시험에는 Eosin Methylene Blue agar(EMB, Difco)를 사용하였다. 시료 1 mL가 분주된 petri-dish 위에 50ºC의 EMB agar 15~20 mL를 부어(pour-plate technique) 잘 섞은 후 37ºC에서 24~36시간 배양 후 SPC에 의해 각각의 배지 위에 형성된 암녹색 colony를 계수하여 cfu/g으로 나타내었다. *Listeria monocytogenes*는 Palcam agar(Difco)를 사용하였다. palcam agar는 palcam base에 0.4% palcam selective supplement (SR0150E)를 첨가하여 제조하였다. 균수 측정은 각각의 배지 위에 형성된 검은색 환으로 둘러싸인 회색 colony를 계수하여 cfu/g으로 나타내었다. *Vibrio parahaemolyticus*는 Triosulfate Citrate Bile Salt Sucrose agar (TCBS, Difco)를 사용하였다. 37ºC의 인큐베이터에서 18~24시간 배양한 후 SPC에 의해 각각의 배지 위에 형성된 암녹색 colony를 계수하여 cfu/g으로 나타내었다. 단, *Vibrio parahaemolyticus* 변화 측정을 위한 모든 peptone water와 희석액은 염농도(NaCl)를 2%로 조정한 후 사용하였다.

통계처리

처리조건별 항균효과에 대한 값들 간의 비교는 Paird T-test를 통하여 통계적으로 검증을 실시하였다.

결과 및 고찰

총호기성균(Total aerobic bacteria)의 변화 분석

항균흡습필름에 의한 총호기성균의 성장 및 사멸 변화를 측정한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 고등어의 자연 오염된 총균수는 2.33 $\log_{10}$ cfu/g이었던 것이 5ºC 저장 7일째에 항균물질 무처리 필름 처리군은 7.98 $\log_{10}$ cfu/g, 항균물질 1회, 2회, 3회 코팅 필름 처리군은 각각 7.48, 7.24, 7,10 $\log_{10}$ cfu/g으로 증가하여 균수를 보임으로써 고추냉이 추출물의 항균효과가 나타났다. 10ºC 저장 5일째에는 각각 7.87, 7.54, 7.46, 7.41 $\log_{10}$ cfu/g을 나타내었고 15ºC 저장 2일째에는 각각 8.44, 8.08, 7.85, 7.74 $\log_{10}$ cfu/g 수준을 보였다. Brown[14]은 미생물수가 10^6 CFU/g 일때 부패단계이며 부패취를 발생하는 시기로 보고 있으나, 본 연구에서는 Egan 등[15]이 보고한 정의에 따라 10^7 CFU/g 수준을 초기부패 수준으로 나타냈다. 10^7 cfu/g 을 부패의 기준으로 볼 때 10ºC, 15ºC 보다 5ºC에서 우수한 항균효과를 보였으며, 5ºC에서는 7일 이내 저장이 적당하고 10ºC와 15ºC에서는 각각 4일과 2일 이내 저장이 적당한 것으로 판단된다. 이는 Chung 등[2]의 보고와 같이 저온저장이 고등어의 품질 유지에 큰 영향을 미치는 것으로 사료된다. 고등어에 대한 세 가지 농도별 항균효과는 10ºC, 15ºC에서는 항균효과의 차이가 없었으나 5ºC에서는 농도에 따른 유의적 차이를 나타냄으로써 항균효과를 보였으며 항균물질 농도가 높아질수록 항균효과가 우수하였다. 이는 저온저장과 항균물질의 두 가지 미생물 제어요소가 동시에 적용되어야 synergy 효과가 있다는 것을 보여주는 결과로 판단된다.

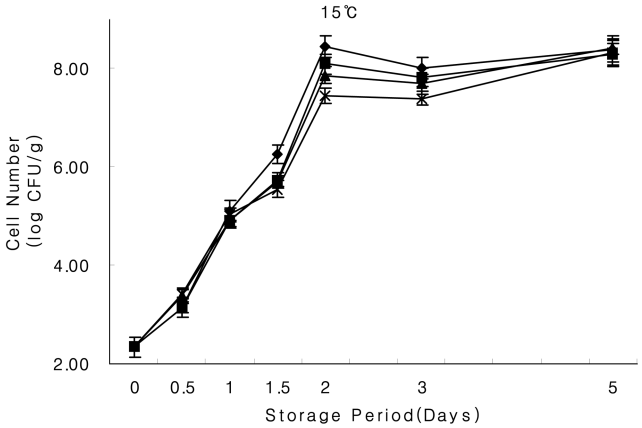

Fig. 1. Changes of cell number of total aerobic bacteria in mackerel. ◆: Untreated film, ■: Antibacterial film (once coating), ▲: Antibacterial film (twice coating), ×: Antibacterial film (three times coating).

E. coli O157:H7의 변화 분석

항균흡습필름에 의한 *E. coli* O157:H7의 성장 및 사멸 변화를 측정한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. *E. coli* O157:H7를 접종한 고등어의 초기 균수는 3.91 log cfu/g 였다. 5ºC 저장 7일째에 항균물질 무처리 필름 처리군은 7.16 $\log_{10}$ cfu/g까지 증가한 반면 1회, 2회, 3회 코팅 필름 처리군은 각각 6.81, 6.68, 6.01 $\log_{10}$ cfu/g로 나타나 항균물질을 처리하였을 때 0.35~1.15 $\log_{10}$ cfu/g 수준의 항균효과를 보여주었다. 1저장온도가 *E. coli*의 성장에 큰 영향을 미치는 것으로 확인하였다. 고등어에 대한 세 가지

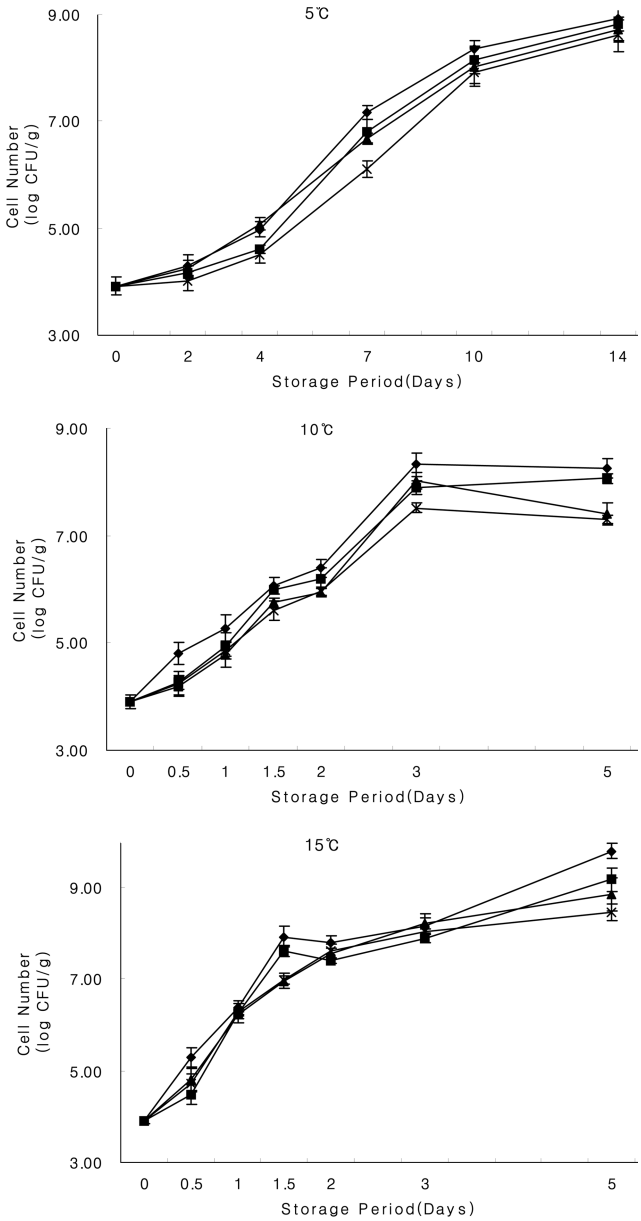

Fig. 2. Changes of cell number of *Escherichia coli* O157:H7 in mackerel. ◆: Untreated film, ■: Antibacterial film (once coating), ▲: Antibacterial film (twice coating), ×: Antibacterial film (three times coating).

농도별 항균효과는 10ºC, 15ºC에서는 항균효과의 차이가 없었으나 5ºC에서는 농도별 항균효과를 나타냈으며 항균물질 농도가 높아질수록 항균효과가 우수하였다. Ono 등[16]은 고추냉이에서 추출된 6-methylsulphinylhexyl isothiocyanate가 *E. coli* O157:H7에 대하여 생육 저해작용을 하는 것으로 보고하였으며 본 연구 결과와 일치하였다. 또한 Park 등[17]은 고추냉이 추출물을 처리하지 않은 대조구에서는 3시간 이후 급격한 *E. coli* 증식 현상이 관찰되었으나 고추냉이 추출물을 처리한 실험구에서는 6시간까지 균 증식이 억제되었다고 보고하였으며 추출물 성분인 isothiocyanate 화합물 함량이 높은 경우에는 24시간까지 균의 증식이 전혀 이뤄지지 않았다고 보고하였다. 본 연구에서도 항균필름 무처리군과 3회 코팅 처리군이 5ºC, 10ºC에서 각각 1.15(7일), 0.51(2.5일) $\log_{10}$ cfu/g 유의적 차이를 보이면서 항균효과를 보였다.

*L. monocytogenes*의 변화 분석

항균흡습필름에 의한 *L. monocytogenes*의 성장 및 사멸 변화를 측정한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. *L. monocytogenes*를 접종한 고등어의 초기 균수는 3.13 $\log_{10}$ cfu/g였다. 5ºC, 10ºC, 15ºC에서 우수한 항균효과를 보였으며 5ºC 저장에서는 *L. monocytogenes* 증식 속도가 느려 저장기간 14일째에도 7 $\log_{10}$ cfu/g 수준이었다. 5ºC에서는 14일, 10ºC에서는 3일, 15ºC에서는 1.5일 이내에서만 항균필름의 효과가 있었다. 고등어에 대한 세 가지 농도별 항균효과는 5ºC, 10ºC, 15ºC에서 모두 항균효과를 나타냈으며 항균물질 농도가 높아질수록 항균효과가 우수하였다. 이는 Park 등[17]이 보고한 *L. monocytogenes*에 대한 고추냉이 추출물의 항균활성 측정 결과와 유사한 경향을 보임으로써 고추냉이 추출물질이 *L. monocytogenes*에 탁월한 효과를 나타냄을 확인하였다.

*V. parahaemolyticus*의 변화

항균흡습필름에 의한 *V. parahaemolyticus*의 성장 및 사멸 변화를 측정한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. *V. parahaemolyticus*를 접종한 고등어의 초기균수는 2.12 $\log_{10}$ cfu/g였다. 10ºC, 15ºC와 달리 저온저장 5ºC에서는 온도에 민감한 반응을 보이면서 균이 감소하였고 7일 후에는 검출한계 아래로 모두 사멸하였다. Yano 등[18]의 보고서에 따르면 *V. parahaemolyticus*가 5ºC에서 24시간 이내에 약 1.5 $\log_{10}$ cfu/g 감소한다는 연구 결과를 보고한 바 있으며 본 연구도 이와 유사한 결과를 보였다. 10ºC, 15ºC에서는 균의 증식 속도가 느릴 뿐, 균의 억제효과는 없었으며 14일에도 각각 4.5 $\log_{10}$ cfu/g, 6 $\log_{10}$ cfu/g였다. 5ºC에서는 균이 사멸되었으며, 10ºC, 15ºC에서는 다른 위해미생물들과 달리 5일까지도 항균 필름의 효과가 있었다. 10^5 cfu/g 정도 성장하는데, 10ºC에서는 약 7일, 15ºC에서는 3일 정도

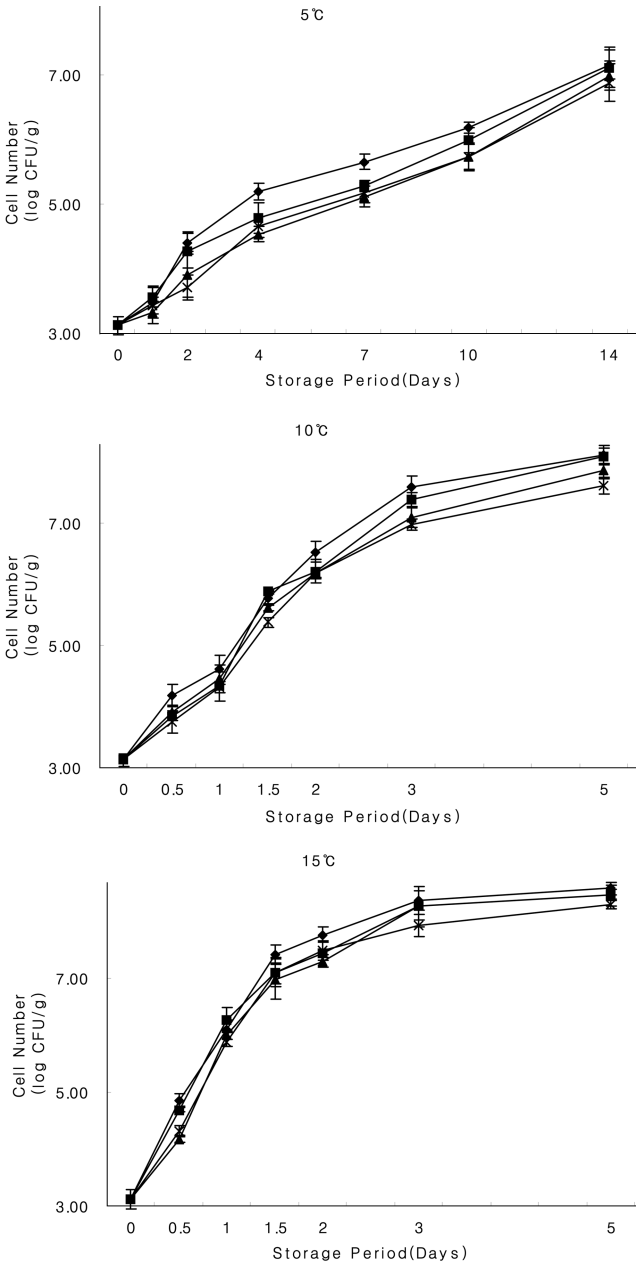

Fig. 3. Changes of cell number of *Listeria monocytogenes* in mackerel. ◆: Untreated film, ■: Antibacterial film (once coating), ▲ : Antibacterial film (twice coating), ×: Antibacterial film (three times coating).

소요되었다. 고등어에 대한 세 가지 농도별 항균효과는 5ºC, 10ºC, 15ºC에서 모두 항균효과의 차이를 보였으며 특히, 3회 코팅 처리한 필름이 항균물질 무처리 필름과 유의적 차이를 보이면서 우수한 항균효과를 나타내었다.

요 약

본 연구는 고흡습성 필름에 고추냉이 추출물을 첨가하여 제작한 항균흡습필름의 고등어 중 존재하는 식품위해

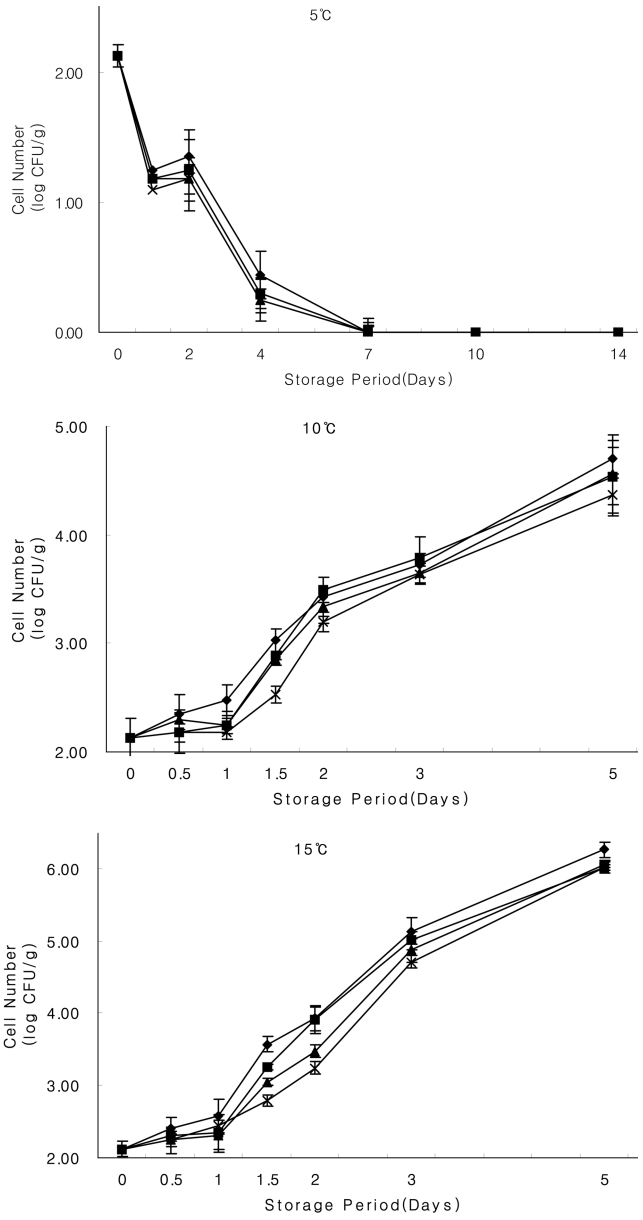

Fig. 4. Changes of cell number of *Vibrio parahaemolyticus* in mackerel. ◆: Untreated film, ■: Antibacterial film (once coating), ▲: Antibacterial film (twice coating), ×: Antibacterial film (three times coating).

미생물에 대한 살균효과를 확인하고자 하였다. 총호기성균 및 식품위해미생물인, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*를 점 접종하여 항균흡습필름으로 포장한 후 저장온도, 기간별 및 항균 필름의 코팅 횟수가 균의 성장 및 사멸에 미치는 영향을 관찰하였다. 5ºC에서 총균수, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*의 성장 억제 효과는 10ºC, 15ºC에서 보다 우수하였다. 특히 *Vibrio parahaemolyticus*는 5ºC에서 저온에 민감한 반응을 보이면서 모든 시료에서 1일, 4일 후 각각 약 1 $\log_{10}$ cfu/g, 1.80 $\log_{10}$ cfu/g 정도 감소하다가 7일 후에는 검출한계 아래로 모두 사멸하였다. 고추냉이 추출 물질이 함유된 흡습필름은 10ºC, 15ºC에서 보다 5ºC에서 우수한 항균효과를 보였다. 세 가지 농도별 항균효과는 5ºC에서 두드러진 농도별 항균효과 차이를 보였으며 코팅 횟수가 늘어날수록 항균효과가 컸다. 이는 항균필름, 한 가지로만은 저장기간 향상에 한계가 있고 냉장저장이라는 hurdle을 동시에 적용하여 항미생물 synergy 효과를 보인다는 증거가 된다.

감사의 말씀

본 연구는 2006년도 보건복지부 바이오산업화기술개발 지원에 의하여 이루어진 것임(A060596).

참고문헌

1. 해양수산부,「2006년도 수산업 연차보고서」, 2006. 9.
2. Chung, Y.G., Swon, O.J., Son, D.H.: Changes in the microflora and freshness of mackerel during storage at low temperature. 資源問題硏究, **15**, (1996).
3. Ehira, S., Fujii, T.: changes in bacterial count for sardine during partially frozen storage(short paper). *Bull Japan Soc. Sci. Fish*, **46**, 419-1426 (1980).
4. 馬相朝, 金東勳: 인스타트 라면의 안전성에 대한 탈산소제의 효과. 韓國食品科學會誌, **12**, 229 (1980).
5. Ishikawa, S. Nakamura, K. Fusii, T.: The modified atmosphere storage of fish products-I. Preervative effect on salted-dried horse mackerel. Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab., **59**, 110 (1983).
6. Kim, H.S., Seong, L.S., Yu, T.S.: Antimicrobial activity and food strage of LDPE ceramic film containing antimicrobial agents. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **15**, 600-604 (2000).
7. Hale, P.W., Miller, W. R., Smoor, J.J.: Evaluation of a heat-shrinkable copolymer film coated with imazalil for decay control of Florida Grapefruit. *Tropical Science*, **26**, 67-71 (1986).
8. Weng, Y.M., Hotchkiss, J.H.: Inhibition of surface molds on cheese by polyethylene film contaning the antimycotic imazalil. *Journal of Food Protection*, **9**, 29-37 (1992).
9. Halek, G.W., Granf, A.: Fungal inhibition by a fungicide coupled to an inomeric film. *Journal of Food Safety*, **9**, 215-222 (1989).
10. Weng, Y.M.: Devalopment and application of food packaging films containing antimicrobial agents. Ph. D. Dissertation, Comell University, Ithaca, NY (1992).
11. Weng, Y.M., Hotchkiss, J.H.: Anhydrides as antimycotic agents added to polyethylene films for food packaging. *Packaging Technology and Science*, **6**, 123-128 (1993).
12. Koichiro, Y.: Maintenance of freshness by antimicrobial packaging material using a component of horseradish. *Food and Science*, **35**, 102-107 (1993).
13. KFDA. Food code. Korea Food and Drug Administration,

Seoul, Korea (2006).
14. Brown, M.H. and Baird-parker, A.C.: The microbiological examination of meat. In *Meat Microbiology*, 3rd ed. (Brown M. ed.) Applied Science Publishers Ltd, London, England, pp 423-520 (1982).
15. Egan, A.F., Grau, F.H.: Environmental conditions and the role of Brochothrix themosphacta in the spoilage of fresh and processed meat. In *Psychrotroph Microorgani는 in Spoilage and Pathogenicity.* (Roberts, T.A., Hobbs, G., Christian, J.H.B., Skovgaad, N. eds.) Academic Press, New York, USA, pp. 211 (1981).
16. Ono, H., Tesaki, S., Tanabe, S., Watanabe, M.: 6-Methylsulphinylhexyl isothiocyanate and its homologues as food-originated compounds with antibacterial activity against *Escherichis coli* and *Staphylococcus aureus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem*., **62**, 363-365 (1998).
17. Park, Y.Y., Cho, M.S., Park, S., Lee, Y.D., Jeong, B.R., Chung, J.B.: Sinigrin contents in different tissues of wasabi and antimicrobial activity of their water extracts. *Korean J. Hort. Sci. Technol*. **24**, 480-487 (2006).
18. Yano, Y., Satomi, M., Oikawa, H.: Antimicrobial effect of spices and herbs on *Vibrio parahaemolyticus. Int. J. Food Microbiol*., **111**, 6-11 (2006).