J. Fd Hyg. Safety, 13(2), 112 - 120(1998)

E. coli O157:H7과 *Staphylococcus aureus*의 증식억제에 대한 키토산과 소르빈산의 상승효과에 관한 연구

조성범† · 이용욱 · 김정현
서울대학교 보건대학원

A Study on Synergistic Effect of Chitosan and Sorbic Acid on Growth Inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus*

Seong-Beom Cho†, Yong-Wook Lee and Jung-Hyon Kim
School of Public Health, Seoul National University, Seoul 110-799, Korea

ABSTRACT — This study was performed to investigate the synergistic effect of chitosan and sorbic acid as a new food preservative. So it was performed to investigate inhibitory effect on growh of *E. coli* O157:H7, gram negative pathogenic food borne disease bacteria and of *S. aureus*, gram positive food borne disease bacteria in chitosan, sorbic acid and combination of chitosan and sorbic acid. Minimun Inhibitory Concentration (MIC) of chitosan in *E. coli* O157:H7 was 500 ppm at pH 5.0, 250 ppm at pH 5.5, 500 ppm at pH 6.0, and 2000 ppm at pH 6.5, while in Staph. aureus 31.25 ppm at pH 5.0 and 62. 5 ppm at more than pH 5.5. also, MIC of sorbic acid in *E. coli* O157:H7 was 500 ppm at pH 5.0, 1500 ppm at pH 5.5, and 2000 ppm at more than pH 6.0, while in Staph. aureus 1500 ppm at pH 5.0 and more than 2000 ppm at more than pH 5.5. Due to the effect of pH in *E. coli* O157:H7, MIC of combined chitosan and sorbic acid was 500 ppm of chitosan with 500 ppm of sorbic acid at pH 6.5, but 250 ppm of chitosan with 31.3 ppm of sorbic acid at pH 5.0. In *Staph. aureus*, there was great effect of chitosan, but neither effect of pH nor sorbic acid. When *E. coli* O157:H7 were treated with 500 ppm of chitosan with 500 ppm of sorbic acid and 250 ppm of chitosan with 250 ppm of sorbic acid at pH 6.5, they were inhibited. But, they were increased at the initial concentration of bacteria at 1000 ppm of chitosan in 18 hours, at 500 ppm of chitosan in 36 hours. There was no effect of growth inhibition with sorbic acid but great effect with chitosan on *Staph. aureus*. The correlations between MICs of chitosan and sorbic acid in *E. coli* O157:H7 accoding to pH were higher than those in Staph. aureus. R values in *E. coli* O157:H7 were 0.95 ($p<0.01$), 0.99 ($p<0.01$), 0.97 ($p<0.01$), and 0.99 ($p<0.01$) at pH 6.5, 6.0, 5.5, and 5.0 respectively. The synergistic effect of chitosan and sorbic acid in *E. coli* O157:H7 could be confirmed from the result of this experiment. Therefore, it was expected that the food preservation would increase or maintain by using sorbic acid together with chitosan, natural food additive that did no harm to human body.

Key word □ *E. coli* O157:H7, *Staph. aureus*, chitosan, sorbic acid, MIC

최근 고도의 산업화 및 도시화와 더불어 여러 가지 환경 오염 인자에 의해 식품의 오염 가능성이 증가되고 있다. 또한 식품에 대한 방사선 조사, 새로운 가공기술 적용에 따른 유해물질 생성, 수입식품의 급증 등으로 식품의 안전성에 대한 우려가 증가하고 있을 뿐만 아니라 국민의 의식수준도 빠른 속도로 향상되어 좀 더 안전한 식품에 대한 욕구가 증가하고 있다.

현재 건강식품중의 하나인 키토산(chitosan)은 게, 새우 등의 갑각류의 외피나 곤충류의 표피, 곰팡이 및 효모 등의 세포벽에 널리 분포되어 있는 키틴(chitin)을 탈아세틸화하여 얻을 수 있으며, 셀룰로오스(cellulose) 다음으로 지구상에서 가장 풍부한 천연자원이다.[1] 우리나라의 경우 게 및 새우 등의 갑각류 어획량이 이미 연간 115,000톤 이상이 되며, 이들 외피가 모두 수산폐기물로 버려지고 있었으나 최

†Author to whom correspondence should be addressed.

근 키토산에 대한 활발한 연구가 진행됨에 따라 환경분야, 의약품, 화장품, 식품 등에서 그 목적에 맞게 적용하는 단계에 있다.[2,3] 이에 대한 연구는 Knorr[4,5]이 키토산의 유화성, 염색흡수능과 지질결합성 등을 연구하여 식품산업으로의 적용가능성을 보고했으며, Brine 등[6]은 과일 보존시 코팅제와 항진균제로 사용한 결과 품질과 안정성이 증가함을 확인했으며, Imeri와 Knorr[7]는 키토산을 사용하여 당근과 사과주스의 적정산도와 색도를 저하시켰음을 보고했다. Kendra와 Hadwiger[8]는 키토산 가수분해물이 식물병원성곰팡이인 Fusarium solani에 대하여 길항작용이 있음을 보고하였다.

또한 식품첨가물의 하나인 소르빈산은 1859년 Von Hofmann에 의해 처음 분리되었으며, 1930~1940년 사이에 Miller와 Gooding에 의해 항미생물 성질을 가진 물질이란 사실이 발견된 이후, Gooding에 의해 1945년 최초로 식품과 식품포장용 항진균제로서 특허를 획득하였다. 1940~1950년대 식품에 처음으로 이용되었으며, 그 후 세계적으로 식품과 기타 물질에 보존제로서 사용하게 되었다. 1970년대 이후 육제품에서 nitrosamine형성을 감소시키기 위하여 아질산염의 사용을 제한하면서 소르빈산 사용이 확대되었다.[9]

병원성 대장균(*E. coli*)중 EHEC(Enterohaemorrhagic *E. coli*)에 속하는 *E. coli* O157:H7은 Shiga-like 독소를 생성하고 출혈성 대장염, 용혈성요독증 증후군(HUS)를 일으킨다.[10] *E. coli* O157:H7은 1982년 미국의 오레곤주와 미시건주의 패스트푸드 체인점에서 덜 익힌 햄버거패티에서 최초로 발견되어 그 병원성이 보고된 이후 발병 및 실험조사가 진행되었으며[11] 이로 인한 식중독 발생이 세계적으로 문제시되고 있다. 1996년 6월부터 일본 오사카 지역에서의 *E. coli* O157:H7 감염자수는 1만명에 달했으며, 이중 11명의 사망자가 발생하였다. 우리나라에서도 1994년에 식중독환자에서 *E. coli* O157:H7을 분리한 바 있으며,[12] 1997년 9월에는 미국 네브라스카주산 냉동쇠고기에서 *E. coli* O157:H7이 검출되었으며[13] 주요 소비층이 어린이들인 패스트푸드와 냉동식품의 확대보급으로 인해 발병 가능성이 충분히 잠재되어 있으므로 이에 대한 철저한 대책이 필요한 실정이다.[14]

황색포도상구균(*Staph. aureus*)는 사람과 동물의 장관내, 피부, 점막 표면 등 자연계에 널리 분포하여 있으며, 식중독 이외에 화농성 염증, 표피박탈성 피부염, toxic shock syndrom 등의 원인이 된다. 이 균에 의한 식중독은 대표적인 독소형 식중독으로 그 단백 독소인 enterotoxin에는 현재 A, B, C(C1, C2), D 및 E형이 있다. 이들 독소는 어느 것이나 열에 강하며 균증식에 의하여 생산된 독소는 100°C 30분 정도 가열처리로는 거의 무독화되지 않고 섭취한 사람에서 급성(1~6시간, 평균 3시간) 위장장해를 일으킨다. 증상은 심한 구토를 시작으로 반수 이상에서 복통, 설사를 동반하나 발열은 보통 없는 것으로 보고하고 있다.[15]

Darmadji와 Izumimoto[16]는 육류에서 키토산이 부패세균을 억제한 결과 지질의 산화와 부패를 감소시켰으며, 저장기간동안 肉色을 포함한 여러 가지 관능적 특성을 향상시켰다고 보고하였다. 그러나 국내에서는 키토산이 주로 건강보조식품으로 사용될 뿐 식품보존제로서의 활용은 아직 연구단계에 있는 실정이다. 현재 식품보존제로 인정되고 있는 식품첨가물은 대부분 인체에 유해한 인공 화학합성품이다. 따라서 식품제조회사에서는 최근에 이들 인공 화학 보존제를 사용하지 않는 무방부식품을 생산함으로써 소비자들의 관심을 유도하고 있으나 이들 무방부식품들은 기존 보존제를 첨가한 식품들보다는 그 유효기간이 매우 짧아 구입후 빠른시간내에 냉장보관 상태에서 소비해야 한다.

따라서 본 연구은 키토산의 항균효과를 이용하여 합성화학보존제인 소르빈산과 단독 또는 병용처리함으로써 *E. coli* O157:H7과 *Staph. aureus*의 증식억제에 대한 상승효과와 새로운 식품보존제로서의 개발가능성을 연구하여 소비자에게 보다 안전한 식품을 제공함으로써 국민보건에 기여하고자 한다.

재료 및 방법

실험 균주

본 실험에 사용한 균주는 *E. coli* O157:H7은 ATCC 43894를, *Staphylococcus aureus*는 ATCC 25923을 사용하였다. 실험균주는 1% peptone, 37% glycerol에 진하게 부유시킨 다음 -70°C에 동결보존하면서 사용하였다.

키토산 및 소르빈산 실험용액의 조제

키토산(Sigma Chemical Co.) 1 g을 10% acetic acid 3 m*l*에 녹인 후 증류수를 가해 총 50 m*l*(2% 키토산 용액)로 만든 다음 0.1 M K_2HPO_4 로 pH를 5.0, 5.5, 6.0, 6.5로 조정하여 1% 키토산실험용액을 만들어 사용하였다(Fig. 1).[17]

소르빈산의 실험용액은 소르빈산칼륨(Junsei Chemical Co.)을 증류수에 녹여서 소르빈산으로서 2.0, 1.5, 1.0, 0.5, 0.25, 0.125 및 0.0625 g/kg으로 각각 조제하여 키토산 및 소르빈산용액을 121°C, 15분간 고압증기멸균한 후 냉장보관하여 사용하였다.

균주 배양 및 현탁액 조제

-70°C로 보관된 실험균주를 tryptic soy agar(Difco)에 35±1°C 24시간 3회 계대배양하여 순수배양되었음을 확인하였다. 이 중 전형적인 집락을 따서 멸균 생리식염수에 현탁시켜 McFarland Scale No. 0.5(1% BaCl 0.5 m*l*+1% H_2SO_4 99.5

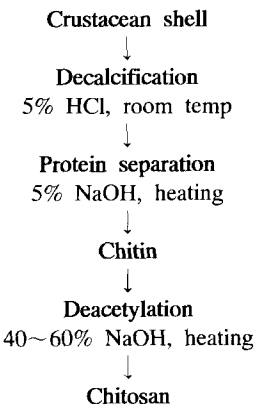

Fig. 1. Preparation procedure of chitosan.

m*l*:1.5×10^9 CFU/m*l*)에 맞춘 후 이를 100 m*l*에 희석한 액을 표준균액으로 사용하였다.[21]

실험균에 대한 키토산과 소르빈산의 최소발육억제농도 실험

키토산 및 소르빈산칼륨을 용매에 녹여 일정 농도로 조제한 후, 각 시험관에 Muller Hinton broth 1.6 m*l*를 분주하였다. 시험용액 1.6 m*l*를 제1시험관에 넣고 잘 혼합한 후 1.6 m*l*를 뽑아 제2시험관에 넣고 다시 혼합한 후 제3시험관으로 옮기고, 이렇게 제9시험관까지 하여 2배 단계 희석된 항균배지를 만들었으며, 이 때 마지막 제10번 시험관은 control로 하였다. 그 다음 Tryptic soy agar에 24시간 배양한 전형적인 집락을 백금루프로 따서 멸균 생리식염수에 적당히 희석한 시험균을 McFarland scale No. 0.5에 탁도를 맞추고, 이 배양액을 다시 100배 희석하여 시험하였다. 희석한 배양액을 0.2 m*l*씩 각 시험관에 접종하여 균 초기농도를 10^6 CFU/m*l*로 조정하였다. 시험관을 진탕배양기에 넣고 100 rpm으로 37°C 48시간 동안 진탕배양한 후 균의 증식 유무를 보고 세균이 증식하지 않은 항균제의 최저 발육억제 농도를 결정하였다.

pH 변화에 따른 실험균의 증식 양상 실험

키토산 및 소르빈산 단독 또는 병용처리한 시험액을 각각 pH 5.5 및 6.5로 제조한 Mueller hinton broth에서 37°C에서 72시간까지 균의 증식양상을 실험하였다. 실험배지에서의 생균수는 멸균 생리 식염수로 10배 단계 희석하고 각 단계 희석액 1 m*l*을 페트리디쉬 3매에 각각 접종하고 Nutrient agar(Difco)를 pouring method로 부어 혼합하여 평판 배양하였다. 이 평판을 35±1°C에서 48시간 배양한 후, 집락계수기(colony counter)로 집락수를 세어 3매의 평균치를 산출하였다.

키토산과 소르빈산의 최소발육억제농도와의 상관관계

각 pH 변화에 대한 최소발육억제농도를 구하기 위해 첨가한 소르빈산의 농도를 X축, 키토산의 농도를 Y축으로 하여 비선형회귀모형을 구하였다.[22] 이 때 얻어진 Y축의 값을 역수로 변환하여 X에 대한 1/Y의 값으로 직선의 회귀방정식을 구하였다. 통계처리는 Excel 7.0, Origin 3.0(Microsoft Co.)을 사용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

E. coli O157:H7 및 *Staphylococcus aureus*에 대한 키토산의 최소발육억제농도(MIC)

E. coli O157:H7에 대한 키토산의 최소발육억제농도는 pH 5.0에서의 MIC는 500 ppm이었으며, pH 5.5에서는 250 ppm, pH 6.0에서는 500 ppm, pH 6.5에서는 2000 ppm이었다(Table 1). *Staphylococcus aureus*에 대한 키토산의 최소발육억제농도는 62.5 ppm으로 pH의 영향을 받지 않았다(Table 2).

Darmadji와 Izumimoto[16]는 육류에 키토산과 균을 접종하여 배양한 후 흡광도를 측정한 결과 *Staph. aureus*가 *E. coli*보다 훨씬 적은 농도로 균 증식이 억제되었다고 보고하였고, Wang[23]도 5가지 대표적 식중독균 중에 *Staph. aureus*에 대한 억제효과가 가장 뛰어났으며, 다음 *Sal. typhimurium, E. coli, Y. enterocolitica*순으로 효과가 있으며, pH 6.5

Table 1. Minimum inhibitory concentration of chitosan in *E. coli* O157:H7

pH	Conc. of chitosan in *E. coli* O157:H7 (ppm)								
	7.8	15.6	31.3	62.5	125	250	500	1000	2000
5.0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	−	−	−
5.5	+++	+++	+++	+++	++	−	−	−	−
6.0	+++	+++	+++	+++	+++	++	−	−	−
6.5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	−

+++: excellent growth, ++: good growth, +: slight growth, −: no growth. Data complied from triplicate samples after incubation at 37°C for 48 hrs.

Table 2. Minimum inhibitory concentration of chitosan in *Staph. aureus*

pH	Conc. of chitosan in *Staph. aureus* (ppm)								
	7.8	15.6	31.3	62.5	125	250	500	1000	2000
5.0	+++	+++	+	−	−	−	−	−	−
5.5	+++	+++	++	−	−	−	−	−	−
6.0	+++	+++	++	−	−	−	−	−	−
6.5	+++	+++	+++	−	−	−	−	−	−

The symbols in this table were same as those of Table 2.

보다 pH 5.5에서 억제효과가 더 큰 것으로 보고하여 본 실험결과와 유사하였다. 장 등[17]은 각종 세균에 대한 키토산의 억제효과를 흡광도로 측정한 결과 *Staph. aureus*는 50 ppm에서 72시간 동안 흡광도가 0이었으며 *V. parahemolyticus*는 100 ppm, *Sal. typhimurium*은 2000 ppm, *Psedo. aeruginosa*는 100 ppm, *Micrococcus*는 50 ppm, *B. cereus*는 50 ppm에서 72시간 동안 흡광도가 0을 나타내 균종간의 억제효과가 크게 차이가 있음을 밝혔다.

E. coli O157:H7 및 *Staph. aureus*에 대한 소르빈산의 최소발육억제농도(MIC)

E. coli O157:H7에 대한 소르빈산의 최소발육억제농도는 pH 6.5 및 6.0에서는 소르빈산 최대허용한계량인 2000 ppm (2.0 g/kg)에서도 발육이 억제되지 않았으며, pH 5.5에서는 1500 ppm, pH 5.0에서는 500 ppm에서 억제되었다(Table 3).

*Staph. aureus*에 대한 소르빈산의 최소발육억제농도는 pH 5.5, 6.0 및 6.5에서는 식품의 최대허용기준인 2000 ppm에서 발육을 억제하지 못하였으며, pH 5.0에서는 1500 ppm에서 억제하였다. 즉, *Staph. aureus*의 경우는 키토산 단독투여와는 반대로 *E. coli* O157:H7보다 더 저항성이 있었다(Table 4).

소르빈산은 현재 우리나라 식품첨가물공전에 따르면 식육연제품의 경우에 2.0 g/kg(2000 ppm)으로 제한되고 있으므로,[24] 본 연구에서는 각 pH별로 최고 2.0 g/kg에서 1.5, 1.0, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.00313 g/kg으로 2배단계씩 희석하고 각 배지에 첨가하여 실험하였다. 소르빈산은 젖산균이나 호기성 포자형성균에는 효력이 없으나 그 외 세균이나 곰팡이 및 효모에 고르게 작용하며, *E. coli*에 대해서 pH 5.5~6.5 범위에서 효과가 있으나 미생물의 오염도가 큰 식품에 대해서는 보존효과를 나타내지 않을 뿐 아니라 경우에 따라서는 오히려 미생물의 영양물질로 이용되어 부패나 변패를 촉진하는 역할을 한다고 알려져 있다.[25] 유와 김[26]은 *E. coli*에 대해서는 소르빈산칼륨 100 ppm 이상에서 흡광도의 차이를 약간 나타내었다고 보고했으며, 김[27]은 pH 6.5에서 *E. coli*에 대한 소르빈산의 최소발육억제농도는 초기균량과 관계없이 1250 ppm이었다고 보고하여 본 실험의 2000 ppm 투여시에도 균 증식이 억제되지 않아 차이가 있었는데 이는 실험균주의 차이에 의한 것으로 생각된다.

Table 3. Minimum inhibitory concentration of sorbic acid in *E. coli* O157:H7

pH	Conc. of sorbic acid in *E. coli* O157:H7 (ppm)								
	15.6	31.3	62.5	125	250	500	1000	1500	2000
5.0	+++	+++	+++	+++	+++	−	−	−	−
5.5	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	−	−
6.0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
6.5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++++	++++	++

The symbols in this table were same as those of Table 2.

Table 4. Minimum inhibitory concentration of sorbic acid in *Staph.* aureus

pH	Conc. of sorbic acid in *Staph. aureus* (ppm)								
	15.6	31.3	62.5	125	250	500	1000	1500	2000
5.0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	−	−
5.5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
6.0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
6.5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

The symbols in this table were same as those of Table 2.

E. coli O157:H7 및 *Staph. aureus*에 대한 키토산과 소르빈산의 병용 처리시의 최소발육억제농도(MIC)

E. coli O157:H7에 대하여 pH 6.5에서 키토산의 농도 0~2000 ppm 및 소르빈산 농도 0~2000 ppm에서 다양한 변화를 나타내었다. 키토산 1000 및 2000 ppm에서는 소르빈산을 250 ppm 첨가하였을 때 억제되었으며, 키토산 250 및 500 ppm에서는 500 ppm이었으며, 키토산 125 ppm에서는 1000 ppm 그리고 62.5 ppm에서는 1500 ppm이었다(Table 5). pH 6.0에서는 키토산 500 ppm 이상에서는 소르빈산을 첨가하지 않아도 증식하지 않았으며, 키토산 250 ppm에서는 소르빈산을 250 ppm 병용처리할 때 억제되었으며, 125 ppm에서는 500 ppm, 62.5 ppm에서는 1000 ppm, 31.3 ppm에서는 2000 ppm을 병용처리하였을 때 억제되었다(Table 6).

pH 5.5에서는 키토산 농도 250 ppm 이상에서는 소르빈산을 첨가하지 않아도 모두 발육억제되었으며, 125 ppm에서는 소르빈산을 125 ppm첨가하였을 때 발육억제되었으며, 62.5 ppm에서는 250 ppm, 31.3 ppm에서는 1000 ppm 그리고 15.6 ppm에서는 1500 ppm이었다. 또한 키토산을 첨가하지 않았을 때에는 소르빈산 농도 1500 ppm에서 발

Table 5. Minimum inhibitory concentration of combined chitosan and sorbic acid in *E. coli* O157:H7 at pH 6.5

Conc. of chitosan (ppm)	Conc. of sorbic acid (ppm)						
	0	125	250	500	1000	1500	2000
0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
62.5	+++	+++	+++	+++	++	−	−
125	+++	+++	+++	+++	−	−	−
250	+++	+++	+++	−	−	−	−
500	+++	+++	++	−	−	−	−
1000	+	+	−	−	−	−	−
2000	−	−	−	−	−	−	−

The symbols in this table were same as those of Table 2.

Table 6. Minimum inhibitory concentration of combined chitosan and sorbic acid in *E. coli* O157:H7 at pH 6.0

Conc. of chitosan (ppm)	Conc. of sorbic acid (ppm)						
	0	125	250	500	1000	1500	2000
0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
31.3	+++	+++	+++	+++	+++	++	–
62.5	+++	+++	+++	++	–	–	–
125	+++	+++	++	–	–	–	–
250	++	+	–	–	–	–	–
500	–	–	–	–	–	–	–
1000	–	–	–	–	–	–	–

The symbols in this table were the same as those of Table 2.

Table 7. Minimum inhibitory concentration of combined chitosan and sorbic acid in *E. coli* O157:H7 at pH 5.5

Conc. of chitosan (ppm)	Conc. of sorbic acid (ppm)						
	0	125	250	500	1000	1500	2000
0	+++	+++	+++	++	++	–	–
15.6	+++	+++	+++	++	++	–	–
31.3	+++	+++	+++	++	–	–	–
62.5	+++	++	–	++	–	–	–
125	+++	–	–	–	–	–	–
250	++	–	–	–	–	–	–
500	–	–	–	–	–	–	–

The symbols in this table were same as those of Table 2.

육억제되었다(Table 7). 김 등[28]은 37°C 배양시 *E. coli* O 157:H7 균주가 pH 6.0 이하에서 benzoate와 sorbate의 첨가 효과가 나타났으며 특히 2.0 g/l(2000 ppm) 소르빈산 첨가 시 균주의 증식을 완전히 저해시켰음을 보고하여 본 실험 결과와 유사했다. pH 5.0에서 *E. coli* O157:H7은 키토산 농도 500 ppm 이상에서는 소르빈산을 첨가하지 않아도 모두 발육이 억제되었으며, 250 ppm에서는 31.3 ppm에서 억제되었으며, 125 ppm에서는 62.5 ppm, 62.5 ppm에서는 125 ppm, 313 ppm에서는 500 ppm이었으며, 15.6 ppm에서는 1000 ppm이었다. 또한 키토산을 첨가하지 않았을 때 소르빈산 농도 1000 ppm에서 발육이 억제되었다(Table 8).

*Staph. aureus*는 pH 6.5에서 키토산과 소르빈산을 병용처리시 *E. coli* O157:H7과는 달리 키토산의 농도가 31.3 ppm 이하에서는 소르빈산 2000 ppm에서도 억제되지 않았고, 키토산 농도 62.5 ppm 이상에서는 소르빈산을 첨가하지 않았을 때에도 발육이 억제되어 소르빈산의 농도보다는 키토산의 농도에 영향을 받았다(Table 9). pH 6.0에서 *Staph. aureus*는 pH에 관계없이 키토산 농도 62.5 ppm 이상에서는 소르빈산을 첨가하지 않아도 모두 억제되었으며, 31.3

Table 8. Minimum inhibitory concentration of combined chitosan and sorbic acid in *E. coli* O157:H7 at pH 5.0

Conc. of chitosan (ppm)	Conc. of sorbic acid (ppm)								
	0	31.3	62.5	125	250	500	1000	1500	2000
0	+++	+++	+++	+++	+++	–	–	–	–
15.6	+++	+++	+++	+++	+++	–	–	–	–
31.3	+++	+++	+++	+++	+	–	–	–	–
62.5	+++	++	++	–	–	–	–	–	–
125	+++	++	–	–	–	–	–	–	–
250	+++	–	–	–	–	–	–	–	–
500	–	–	–	–	–	–	–	–	–
1000	–	–	–	–	–	–	–	–	–
2000	–	–	–	–	–	–	–	–	–

The symbols in this table were same as those of Table 2.

ppm 이하에서는 소르빈산을 최대량으로 첨가하여도 억제되지 않았다(Table 10). pH 5.5에서는 키토산 농도 62.5 ppm 이상에서는 소르빈산을 첨가하지 않아도 모두 발육이 억제되었으며, 31.3 ppm에서는 소르빈산을 2000 ppm을 첨가하였을 때 발육이 억제되었다. 15.6 ppm 이하에서는 소

Table 9. Minimum inhibitory concentration of combined chitosan and sorbic acid in *Staph. aureus* at pH 6.5

Conc. of chitosan (ppm)	Conc. of sorbic acid (ppm)						
	0	125	250	500	1000	1500	2000
0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
15.6	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
31.3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
62.5	–	–	–	–	–	–	–
125	–	–	–	–	–	–	–
250	–	–	–	–	–	–	–
500	–	–	–	–	–	–	–

The symbols in this table were same as those of Table 2.

Table 10. Minimum inhibitory concentration of combined chitosan and sorbic acid in *Staph. aureus* at pH 6.0

Conc. of chitosan (ppm)	Conc. of sorbic acid (ppm)						
	0	125	250	500	1000	1500	2000
0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
15.6	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
31.3	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
62.5	–	–	–	–	–	–	–
125	–	–	–	–	–	–	–
250	–	–	–	–	–	–	–
500	–	–	–	–	–	–	–

The symbols in this table were same as those of Table 2.

Table 11. Minimum inhibitory concentration of combined chitosan and sorbic acid in *Staph. aureus* at pH 5.5

Conc. of chitosan (ppm)	Conc. of sorbic acid (ppm)						
	0	125	250	500	1000	1500	2000
0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
3.9	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
7.8	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
15.6	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
31.3	++	++	++	++	++	+	−
62.5	−	−	−	−	−	−	−
125	−	−	−	−	−	−	−

The symbols in this table were same as those of Table 2.

Table 12. Minimum inhibitory concentration of combined chitosan and sorbic acid in *Staph. aureus* at pH 5.0

Conc. of chitosan (ppm)	Conc. of sorbic acid (ppm)						
	0	125	250	500	1000	1500	2000
0	+++	+++	+++	+++	+++	−	−
3.9	+++	+++	+++	+++	+++	−	−
7.8	+++	+++	+++	+++	+++	−	−
15.6	+++	+++	+++	+++	++	−	−
31.3	++	++	+	+	−	−	−
62.5	−	−	−	−	−	−	−
125	−	−	−	−	−	−	−

The symbols in this table were same as those of Table 2.

르빈산을 최대허용농도인 2000 ppm을 첨가하여도 발육이 억제되지 않았다(Table 11). pH 5,0에서 *Staph. aureus*는 키토산농도 62.5 ppm 이상에서는 소르빈산을 첨가하지 않아도 모두 발육이 억제되었으며, 31.3 ppm에서는 1000 ppm에서 억제되었다.

키토산 및 소르빈산 병용처리시 세균의 시간별 증식양상

균이 잘 증식할 수 있는 pH 6.5, 37°C의 조건하에서의 접종한 균의 초기농도는 10^6 CFU/m*l* 수준이었으며, 키토산 1000 ppm과 500 ppm 단독으로만 첨가한 배지에서는 초기에 균 증식이 억제되다가 18시간 이후부터는 초기균농도보다 증식하였다. 그리고 소르빈산 최대허용한계량인 2000 ppm을 첨가한 배지에서도 24시간까지는 균증식이 억제되었다가 그 이후부터 계속 증식하였다. 그러나 키토산과 소르빈산를 병용처리한 군에서는 전부 배양 3시간안에 균증식이 억제되었거나 사멸하였다. 실제로 소르빈산 최대허용량의 거의 1/10의 양인 250 ppm과 키토산 250 ppm을 병용한 군이 소르빈산 2000 ppm 단독이나 키토산 1000 ppm, 500 ppm 단독으로 사용한 군보다 훨씬 더 효과가 있었다

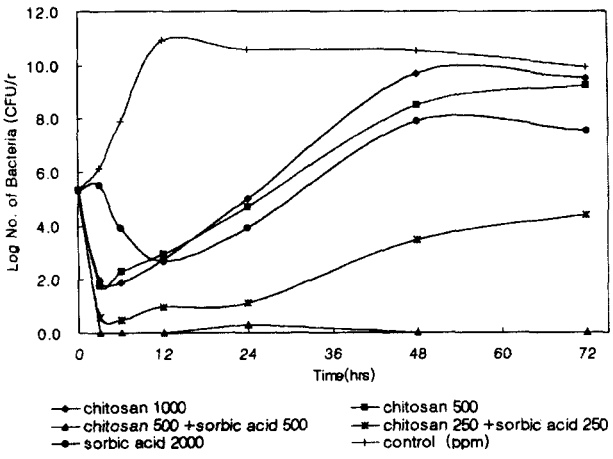

Fig. 2. Inhibitory effect of chitosan and sorbic acid on growth of *Eschierichia coli* O157:H7 at pH 6.5.

(Fig. 2).

pH 6.5, 37°C의 조건하에서의 Control군에 비해 소르빈산 2000 ppm 단독으로 첨가한 균에서의 증식과정에서는 별 차이가 없는 반면, 키토산 100 ppm, 50 ppm 단독처리군과 소르빈산과의 병용처리군에서는 증식이 억제되었거나 사멸되었다(Fig. 3). 한편, 키토산과 소르빈산의 효과가 좋은 pH 5.5, 37°C의 조건하에서 소르빈산 500 ppm 단독 첨가시에는 초기에는 균증식이 억제되었다가 24시간 이후부터 계속 증식하여 48시간 이후에는 control과 비슷한 수준으로 증식하였다(Fig. 4). 그러나 키토산 500 ppm, 250 ppm 단독첨가시와 병용처리시 모두 3시간 이내에 균증식이 억제되었거나 사멸되었다.

*Staph. aureus*의 시간별 증식양상은 Control군에 비해 소르빈산 2000 ppm 단독으로 첨가한 균에서는 초기균농도에

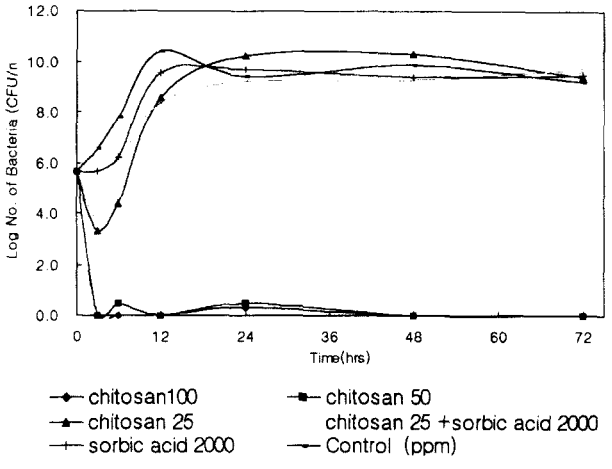

Fig. 3. Inhibitory effect of chitosan and sorbic acid on growth of *Staphylococcus aureus at pH 6.5.*

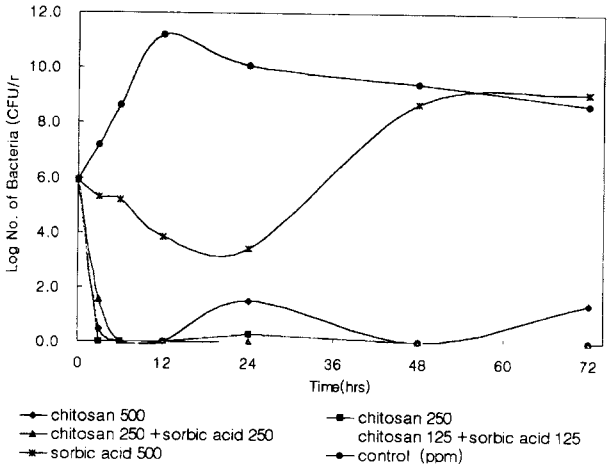

Fig. 4. Inhibitory effect of chitosan and sorbic acid on growth of *Escherichia* O157:H7 at pH 5.5.

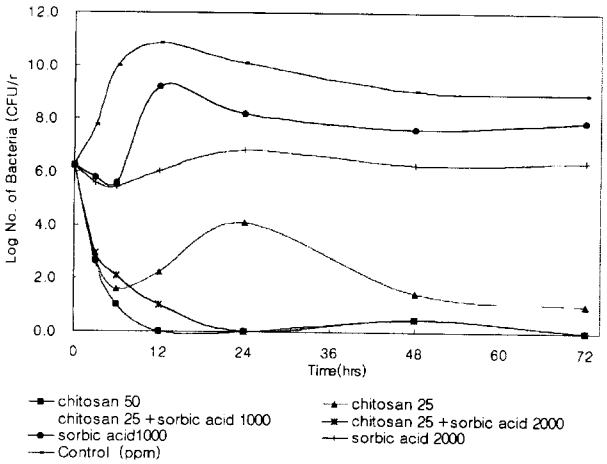

Fig. 5. Inhibitory effect of chitosan and sorbic acid on growth of *Staphylococcus aureus* at pH 5.5.

서 더 이상 증식이 되지 않았으며, 소르빈산 1000 ppm에서는 6시간까지는 균증식이 억제 되었다가 그 이후부터 control과비슷하게 증식되었다. 반면, 키토산 100 ppm, 50 ppm 단독처리군에서는 균증식이 사멸되었으며, 키토산 25 ppm 단독처리군은 억제되었다. 소르빈산과의 병용처리군에서는 키토산 25 ppm과 소르빈산 2000 ppm에서 균증식이 사멸되었다(Fig. 5).

최근 식품의 풍미와 안전성, 실용적인 면에서 소르빈산과 다른 식품첨가제를 병용처리함으로써 보다 낮은 농도로 식품의 보존성을 높히려는 연구가 진행되어왔다. Tsai와 Chou[29]는 *E. coli* O157:H7을 37°C에서 배양할 때 소르빈산칼륨 2.0 g/l (2000 ppm) 농도에도 억제효과가 없었다고 보고했으며, 본 실험결과에서도 pH 6.0 이상에서 효과가 없었다. Lahellec 등[30]은 *S. aureus* 증식이 pH 5.0에서 1% 소르빈산 농도로 억제되었으며 BHA, BHT, PG를 소르빈산과 병용처리시 pH 7보다 pH 5에서 훨씬 살균효과가 있었음을 보고하였다. Robach와 Stateler[31]는 *S. aureus*에 대해서 소르빈산칼륨단독과 NaCl, TBHQ, BHA, EDTA와의 병용처리효과를 연구한 결과 소르빈산칼륨을 NaCl, TBHQ, PG 및 EDTA와 병용처리하였을 때 상승억제효과가 있음을 보고하였다. Morad 등[32]은 BHA와 소르빈산칼륨의 단독 및 병용처리시의 효과를 조사한 결과 BHA와 소르빈산칼륨의 병용처리가 단독처리보다 그람음성균에 대해 억제효과가 있으며 *Sal. typhimurium*도 효과적으로 억제할 수 있었다고 보고하였다.

키토산과 소르빈산 병용처리시 최소발육억제농도와의 상관관계

각 pH변화에 대한 최소발육억제농도(MIC)를 구하기 위해 첨가한 소르빈산의 농도를 X축, 키토산의 농도를 Y축으로 하여 비선형회귀모형을 구하였다. 이 때 얻어진 Y변수의 값을 역수변환하여 직선의 회귀방정식을 구하였다. *E. coli* O157:H7에 대한 최소발육억제농도에 필요한 키토산과 소르빈산의 첨가량과의 상관관계는 pH 6.5에서는 R=0.95 ($p<0.01$), pH 6.0에서는 R=0.99($p<0.01$), pH 5.5에서는 R=0.97($p<0.01$), 그리고 pH 5.0에서는 R=0.99($p<0.01$)로 높은 상관관계를 나타내었으며 상승효과가 확인되었다. 그러나 *Staph. aureus*의 경우에서는 상관관계가 거의 없었다(Fig. 6).

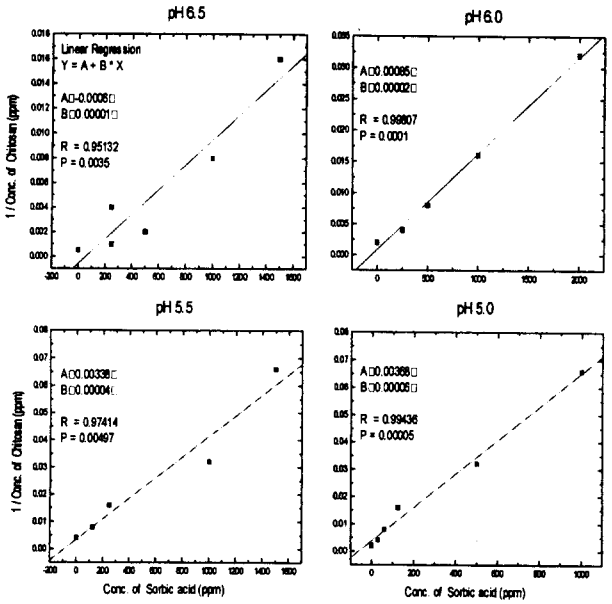

Fig. 6. Correlation between chitosan and sorbic acid in *E. coli* O157:H7 according to pH.

국문초록

최근 산업의 발달로 인한 식품의 안전성에 대한 국민의 우려가 증가되고 있으며 특히 식품을 미생물의 증식으로부터 안전하게 보존하기 위한 천연식품보존제의 개발이 요구되고 있다. 지구상에 풍부한 천연자원인 키토산과 합성화학보존제인 소르빈산을 사용하여 그람음성 병원성 식중독 원인균인 *E. coli* O157:H7과 대표적 그람양성 식중독 원인균인 Staph. aureus에 대해 실험한 결과는 다음과 같았다. *E. coli* O157:H7에 대한 키토산의 최소발육억제농도는 pH 5.0에서 500 ppm, pH 5.5에서 250 ppm, pH 6.0에서 500 ppm, 그리고 pH 6.5에서 2000 ppm이었으며, *Staph. aureus*에 대한 키토산의 최소발육억제농도는 pH 5.0에서 31.3 ppm이었으며, pH 5.5 이상에서는 62.5 ppm이었다. 소르빈산의 최소발육억제농도는 pH 5.0에서 500 ppm, pH 5.5에서 1500 ppm, 그리고 pH 6.0 이상에서는 2000 ppm이상이었다. Staph. aureus에 대한 소르빈산의 최소발육억제농도는 pH 5.0에서 1500 ppm 이었으며, pH 5.5 이상에서는 2000 ppm 이상이었다. *E. coli* O157:H7에 대한 키토산과 소르빈산의 병용처리효과는 pH에 크게 영향을 받아 pH 6.5에서는 키토산농도 500 ppm과 소르빈산 500 ppm 농도에 발육이 억제되었으나 pH 5.0에서는 키토산농도 250 ppm과 소르빈산 31.3 ppm에 억제되었다. 한편, *Staph. aureus*에서는 pH에 대한 영향이 별로 없었으며, 키토산의 영향을 크게 받으나 소르빈산의 영향은 거의 없었다. pH 6.5, 37°C의 조건하에서 *E. coli* O157:H7은 키토산 500 ppm 및 소르빈산 500 ppm 처리와 키토산 250 ppm 및 소르빈산 250 ppm 병용처리군에서 모두 증식이 억제되었으나 키토산과 소르빈산 단독처리군에서는 배양시간이 증가함에 따라 균의 증식이 계속되었다. *Staph. aureus*는 소르빈산에 영향을 받지않았으며 병용효과보다는 키토산에 대한 영향이 컸다. pH 5.5, 37°C의 조건하에서 *E. coli* O157:H7은 키토산 500 ppm, 250 ppm 단독첨가시와 병용처리시 모두 3시간 이내에 균증식이 억제되었다. *Staph. aureus*의 경우는 키토산 50 ppm 단독처리군과 키토산 25 ppm과 소르빈산 2000 ppm 병용처리군에서 균증식이 사멸되었다. *E. coli* O157:H7에 대한 키토산과 소르빈산병용처리시 MIC와의 상관관계는 pH 6.5에서 $R=0.95(p<0.01)$, pH 6.0에서 $R=0.99(p<0.01)$, pH 5.5에서 $R=0.97(p<0.01)$, 그리고 pH 5.0에서 $R=0.99(p<0.01)$로 높은 상관관계를 나타내었다. *Staph. aureus*에 대해서는 소르빈산의 병용처리에 의한 효과는 거의 없었다. 이상의 결과로 종합하면 pH 변화에 따른 키토산과 소르빈산 단독 및 병용처리로 인한 상승효과를 확인할 수 있었으며 이 결과 천연식품인 키토산을 병용함으로써 인체에 영향이 있는 합성화학보존제인 소르빈산의 양을 감소시킬 수 있었으며, 또한 식품의 보존성을 더 증가 또는 유지시킬수 있을 것으로 기대되었다.

참고문헌

1. Austin, P.R., Brine, C.J. and Castle, J.E.: Chitin, New facets of research. *Science,* **212**(15), 749-753 (1981).
2. Muzzarelli, R., Tarsi, R., Filippini, O., Giovanetti, E., Biagin, G. and Varaldo, P.E.: Antimicrobial properties of N-carboxybutyl chitosan. *Antimicro. Agents and Chemother,* **34**(10), 2019-2023 (1990).
3. 오준현, 조홍연, 양한철: Chitosan에 의한 광합성세균 처리 두부공업폐수의 균체 응집효과. 한국산업미생물학회지, **23**(6), 763-769 (1995).
4. Knorr, D.: Functional properties of chitin and chitosan. *J. Food Sci.,* **47**, 593-595 (1982).
5. Knorr, D.: Use of Chitinous Polymers in Food. Food Tech., pp. 85-97 (1984).
6. Brine, C.J., Sandford, P.A. and Zikakis, J.P.: Advances in chitin and chitosan. Elsevier Applied Science, London and New York, pp. 440-452 (1992).
7. Imeri, A. G. and Knorr, D.: Effects of chitosan on yield and compositional data of carrot and apple juice. *J. Food Sci.,* **53**(6), 1707-1708 (1988).
8. Kendra, D.F. and Hadwiger, L.A.: Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to Fusarium solani and elicits pisatin formation in Pisum sativum. *Exp. Mycol.,* **8**, 276 (1984).
9. 송재철, 양한철: 식품첨가물학. 세문사, pp. 97-117, 1997.
10. Michael, P. D. and Vikas, V. P.: Escherichia coli In Food borne bacterial pathogenes. Marcel Dekker, New York, pp. 235-281 (1989).
11. Riley, L.W., Remis, R.S., Helgrerson, S.D., McGee, H.B., Wells, J. G., Davis, B.R., Herbert, R.J., Olcott, E.S., Johnson, L.M., Hargrett, N.T., Blake, P.A. and Cohen, M.L.: Hemorrhagic colitis associated with a rare Escherichia coli Serotype. *N. Engl. J. Med.,* **308**, 681-685 (1983).

12. 국립보건원: 감염병발생정보. **5**, 2-3 (1994).
13. 국립동물검역소: 동물검역월보. **63**, 2 (1997).
14. 고주언, 홍종해: 도체표면의 분변오염과 Verotoxin생성 *Escerichia coli* O157:H7 분리에 관한 연구. 한국식품위생안전성학회지, **12**(1), 78-82 (1997).
15. 日本藥學會編: 衛生試驗法 註解. p.188, 東京, 金原出版株式會社, 1995.
16. Darmadji, P. and Izumimoto, M.: Effect of chitosan in meat preservation. *Meat Science,* **38**, 243-254 (1994).
17. 장동석, 조학래, 구효영, 최위경: 게 가공폐기물을 이용한 식품보존료의 개발에 관한 연구. 한국수산학회지, **22**, 70-78 (1989).
18. 손유미, 김광옥, 전동원, 경규항: Chitosan과 다른 보존제 첨가에 따른 김치의 저장성 향상. 한국식품과학회지, **28**(5), 888-896 (1996).
19. 이경혜, 이영춘: 발효빵에 첨가한 carboxymethyl chitosan이 품질에 미치는 영향. 한국식품과학회지, **29**, 96-100 (1997).
20. 이용욱, 박석기: 식품위생미생물 시험법. 신광출판사, pp. 122-124 (1997).
21. Sonnenwirth, A.C. and Jarett, L.: Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis. Vol. 2, 8th ed., Mosby Co., p.1363 (1980).
22. 이승욱: 통계학의 이해. 자유아카데미, pp. 261-305 (1994).
23. Wang G.H.: Inhibition and inactivation of five species of foodborne pathogens by chitosan. *J. Food Prot.,* **55**(11), 916-919 (1992).
24. 보건복지부: 식품첨가물공전. pp. 225-227 (1996).
25. 문범수: 식품첨가물. 수학사, 서울, pp. 68-91 (1988).
26. 유익종, 김용수: *Escherichia* KFRI 174에 대한 천연 및 합성보존료의 항균 특성. 한국식품과학회지, **15**(2), 127-131 (1995).
27. 김영진: *Escherichia coli* 가열처리에 의한 sorbic acid의 최소억제농도의 변화. 고려대학교 식품공학과 석사학위논문, 1978.
28. 김덕진, 권오진, 변명우: *Escherichia coli* O157:H7의 제어를 위한 benzoate, sorbate 및 pH의 병용처리 효과. 한국식품위생안전성학회지, **12**(3), 200-204 (1997).
29. Tsai, S.H. and Chou, C.C.: Injury, inhibition and inactivation of *Escherichia coil* O157:H7 by potassium sorbate and sodium nitrite as affected by pH and temperature. *J. Sci. Food Agric.,* **71**, 10-12 (1996).
30. Lahellec, C., Fung, D.Y.C. and Cunninggham, F.E.: Growth effect of sorbate and selected antioxidants on toxigenic strains of *Staphylococcus aureus. J. Food Prot.,* **44**(7), 531-534 (1981).
31. Robach, M.C. and Stateler, C.L.: Inhibition of *Staphylococcus aureus* by potassium sorbate in combination with sodium chloride, tertiary butylhydroquinone, butylated hydroxanisole or ethylenediamine tetraacetic acid. *J. Food Prot.,* **43**(3), 208-211 (1980).
32. Morad, M.M., Branen, A.L. and Brekke, C.J.: Antimicrobial activity of butylated hydroxyanisole and potassium sorbate against natural microflora in raw turkey meat and salmonella typhimurium in cooked turkey meat. *J. Food Prot.,* **45**(11), 1038-1040 (1982).