

## *Escherichia coli* 加熱處理에 의한 Sorbic Acid의 最少抑制濃度の變化

金 榮 振  
食 品 分 析 科

### Change of Minimum Inhibition Concentration of Sorbic Acid by Heating *Escherichia coli*

Young Jin, Kim  
Food Analysis Division

#### = Abstract =

In order to study of the effective use of sorbic acid at pH 6.5, correlation between minimum inhibition concentration (MIC) and cell concentration, motility test in the sorbic acid medium, change of MIC and preservative effect with temperature were investigated, using *Escherichia coli* ATCC 54172.

1. MIC of sorbic acid was decreased with decreasing cell concentration and the limited inhibition concentration was 1.25g/l. The inhibitory effect of sorbic acid was more predominant to *E. coli* cells grown deep in the agar bed than to those grown on the surface.
2. The inhibitory effect was due to the residual concentration of sorbic acid and the heated cell at 55°C was inhibited at a lower concentration than unheated cell. MIC of the heated cell at 55°C for 30 minutes with 2.00 g/l sorbic acid was lower by 0.25g/l than that of the same treated cell without sorbic acid treatment.
3. Treatment of 55°C for 30 minutes with 2.00g/l sorbic acid could preserve the medium containing *E. coli* for 14 days at room temperature.

#### 緒 論

食品의 保存에 있어 微生物에 의한 腐敗는 가장 重要한 問題이며, 이를 防止하기 위해 여러方法이 使用되고 있다.<sup>1)</sup> 그러나 食品品質의 損傷, 人體에 대한 毒性, 經濟性 및 2次汚染등 각각 長短點을 가지고 있어서, 아직 理想的인 保存方法은 알려져 있지 않다. 따라서 相互間의 長點을 인고, 短點을 補完하는 동시에 相乘效果를 얻기 위해 併用處理가 研究되고 있다.<sup>2-4)</sup> 특히 藥劑와 加熱의 併用處理는 비교적 低溫의 加熱處理와 低濃度の 藥劑를 併用함으로써 加熱에 의한 品質損傷과 藥劑에 의한 毒性을 緩和시키며 單獨處理한 것보다 더 강한 殺菌 및 防腐效果를 얻을 수 있다. 이러

한 加熱併用效果에 있어 藥劑의 有効性에 관하여 많은 報告가 있다.<sup>5-21)</sup>

微生物 細胞를 最大增殖溫度이상으로 加熱處理하면 增殖이 遲延되거나<sup>22)</sup> 榮養要求性이 增大되거나,<sup>23,14)</sup> 食鹽耐性이 低下되는 등 代謝機能에 障害가 나타나며,<sup>25)</sup> 加熱處理에 의해 DNA의 分解,<sup>27-29)</sup> 細胞膜 透過性의 變化,<sup>26,30,31)</sup> 酵素의 不活性,<sup>23,31,32)</sup> Mg의 流失,<sup>33)</sup> DNA의 絶斷등<sup>34)</sup> 加熱損傷을 일으킴이 報告되어 있다. 그러나 이 損傷은 不可逆의인 것은 아니며 紫外線이 照射된 細胞에서 損傷된 DNA가 다시 回復함과 같이<sup>35,36)</sup> 일반적으로 細胞는 物理的, 化學的 處理에 의한 損傷을 回復할 能力을 가지고 있어 加熱損傷된 경우에도 細胞의 條件과 環境이 적당하면 細胞의 構造와 機能이 回復되며, 이 回復은 集落形成能力과 동시에 나

타난다.<sup>26-30)</sup> 따라서 藥劑의 作用은 溫度가 上乘됨에 따라 增加되지만,<sup>25)</sup> 特定溫度이상에서는 微生物 細胞가 이러한 加熱損傷을 받으므로 藥劑의 作用은 더욱 增加될 것으로 推測되고 있으며, 最近 이 機構에 關係 廣泛히 연구되고 있다.<sup>37-42)</sup>

한편 많은 食品에 防腐劑로 使用되고 있는 sorbic acid는 비교적 抗菌範圍가 넓으나 *Lactobacillus*와 *Clostridium*에는 效果가 없다.<sup>25,43-46)</sup> 이러한 sorbic acid의 抗菌機構는 아직 確實하지 않으며,<sup>47)</sup> Melnick<sup>48)</sup> 등은 곰팡이에서 dehydrogenase system을 阻害한다고 報告하였고, York와 Vaughn<sup>49)</sup>은 *E. coli*에서 oxidative phosphorylation system을 阻害한다고 報告하였다. Ducl<sup>50,51)</sup>은 人體에 대해서는 비교적 毒性이 적고 LD<sub>50</sub>=10.50g/kg이라고 報告하였다. FAO와 WHO專門 委員會는 1日 12.5~25.0mg/kg을 조건부로 許用하고 있어,<sup>52)</sup> 世界 各國은 許用基準을 設定하고 있다. 美國은 GRAS品目<sup>43,44)</sup>으로 定하고 있고, 캐나다는 모든 食品에 0.1%까지 許用하고 있으며, 우리나라 食品衛生法<sup>53)</sup>에는 食肉, 鯨肉, 魚肉軟製品에 0.2%까지, 된장, 고추장, 어개진제품, 팔알급, 간장절임등에 0.1%까지 許容하고 있다. 이 중 食肉, 鯨肉, 魚肉軟製品은 대체로 中性에 가까운 것이며, 中性에 가까울수록 sorbic acid의 抗菌效果는 減少되며 일반 腐敗微生物의 年育 pH에 놓이게 된다.<sup>54,55)</sup> 脂質과 蛋白質이 많은 食品에서는 脂質이나 蛋白質과 일부 結合되어 抗菌效果는 減少되며, 食肉製品의 경우 pH를 酸性으로 낮추면 sorbic acid의 抗菌效果는 增加되지만, 반대로 保水性이 나빠지며, 魚肉軟製品은 彈力성이 나빠짐이 알려져 있다.<sup>55-58)</sup> 그러나 sorbic acid는 多量 食用되고 있으므로 許容量을 늘인다는 것은 食用衛生上 困難하므로 效果의 利用法이 要望되고 있다.<sup>59)</sup>

Robinson과 Hill<sup>60)</sup>은 各種 果實製品에 sodium sorbate를 첨가하고 49°C의 온화한 加熱處理로 貯藏期間이 延長되었음을 報告하였고, Lategan 및 Vaughn<sup>61)</sup>은 난백에 sorbic acid와 50~60°C의 加熱併用處理로서 *Salmonella typhimurium*의 D-value (Decimal reduction time)가 減少됨을 報告하였고, 芝崎 및 飯田<sup>62)</sup>은 *Candida utilis*에 대해 sorbic acid와 45~60°C의 加熱併用處理에 의해 D-value가 減少됨을 報告하였다. Arya등<sup>63)</sup>은 chapatis에 0.2%로 sorbic acid를 添加함으로써 6개월 이상 保存할 수 있었으며, 0.15%로 낮추고 90~95°C의 加熱處理를 함으로서 6개월간 保存할 수 있었음을 報告하였다. 또 土戶<sup>64,41)</sup> 등은 *Candida utilis*에 대해 sorbic acid의 加熱併用效果를 調査하여 sorbic acid는 加熱中에 細胞에 미치는 效果보다는 加熱후 加熱損傷

된 細胞의 回復을 阻害하는 效果가 더 크다고 報告하였다.

실제로 食品에 sorbic acid 添加量을 決定時 最少抑制濃度(MIC)를 調査할 필요가 있고, 微生物 種類에 따라 sorbic acid의 最少抑制濃度は 각각 다르다. 이 중 *E. coli*는 食品에 쉽게 汚染될뿐만 아니라 sorbic acid의 抗菌效果가 적어지는 중성부근에서 生育하며 다른 微生物에 비해 高濃度인 法定最高濃度 2,000 ppm(pH 6.0)에서 抑制된다. 또 Freese등<sup>64)</sup>은 octanoate에서 *E. coli*의 抑制濃度は *Bacillus subtilis*抑制濃度の 2배이고, linolate에서는 50배 이었으며 long chain지방산에서는 *E. coli*를 抑制할 수 없었음을 發見하였고 이런 상은 *B. subtilis*가 acetate만을 使用하나 통성혐기성인 *E. coli*는 long chain지방산을 매우 빨리 代謝시키며, *E. coli*를 포함한 Gram음성菌은 거대한 分子를 잘 흡수하지 않기 때문이라고 報告하였다. 또 人體의 細胞도 微生物 細胞와 같이 phospholipid bilayer를 포함하고 있어 食品防腐劑는 成長과 神經作用을 阻害시키며 유전적 손상을 일으킬 위험이 있다고 警告하였다.

따라서 本實驗은 sorbic acid에 비교적 강한 *E. coli*를 使用하여 抗菌效果가 낮은 pH 6.5에서 sorbic acid의 效果의 利用法을 研究하기 위해 菌數에 대한 最少抑制濃度の 變化, 運動性實驗(motility test), 그리고 加熱處理에 의한 最少抑制濃度の 變化를 調査 研究하였다.

## 實驗材料 및 方法

供試菌株 : *Escherichia coli* ATCC 54172를 使用하였다.

供試藥劑 : Sorbic acid(Ishisu pharmaceutical Co., Osaka, Japan) E.P製品을 absolute ethanol (Merck)에 녹여 여러濃度로 調製한 후 각각 Seitz filter로 無菌濾過하여 sorbic acid溶液으로 使用하였다.<sup>66)</sup> 培地의 最終 ethanol 濃度は 1.571% (v/v)이었다.

細菌懸탁액 : Nutrient agar (Difco)에 *E. coli*를 接種하여 37°C 24時間 培養한 후 細菌을 無菌生理的 食鹽水에 현탁시킨 다음, 4°C에서 一夜 放置시킨후, 生菌數를 약  $3 \times 10^{10}$  (O.D<sub>550</sub>=0.85~0.90)으로 보정후 使用하였다.

培地 : Nutrient agar를 nutrient broth (Difco)를 pH 6.5 인산완충용액 (0.1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)으로 만들어 使用하였다. 培地를 加壓滅菌후 nutrient agar는 凝固 직전인 50~60°C정도 되었을 때 sorbic acid 溶液을 無菌의으로 添加하였고, nutrient broth는 室溫으로

냉각된 후 sorbic acid 용액을 가하여 最終濃도가 0.00 g/l에서 法定最高濃度인 2.00g/l까지 0.25g/l씩 9단계 濃度별로 각각 調製하였다.

菌數에 대한 最少抑制濃度 : Nutrient broth에서 菌數에 대한 最少抑制濃度は 10단계 稀釋法(10-fold dilution method)에 준하여 實驗하였다.<sup>67)</sup> 즉 일정濃도로 調製된 nutrient broth를 滅菌시험관에 9ml씩, 한 濃도에 대해 10~20개씩 분주하였다. 다음 9ml의 無菌生理的食鹽水에 菌液 1ml를 가하고 완전히 진탕시킨 후 1ml를 제2의 無菌生理的食鹽水에 가하여 菌數를 10배, 10<sup>2</sup>배, 10<sup>3</sup>배……순으로 稀釋하였다. 稀釋系列로 부터 각각 1ml를 nutrient broth에 차례로 接種하여 菌數가 3×10<sup>9</sup>/ml, 3×10<sup>8</sup>/ml, 3×10<sup>7</sup>/ml……가 되도록 稀釋 調製하고, 다른 濃度에서도 이와같이 操作하였다. 다음 37°C에서 48時間 培養후 增殖度를 觀察하여 最少抑制濃度를 判定하였다.

Nutrient agar에서는 10단계 稀釋法과 Agar plate streak method로 하였다.<sup>44,68)</sup> 즉 9ml의 無菌生理的食鹽水에 菌液 1ml를 接種하고 완전히 진탕시킨 후 제 2의 無菌生理的食鹽水에 1ml를 넣고 이같은 操作을 되풀이 하여 菌稀釋系列을 만든 다음, 미리 petri dish에 여러 濃도로 調製된 nutrient agar위에 菌稀釋系列로 부터 각각 1백금이씩을 接種하였다. 다음 37°C에서 48時間 培養한 후 生育有無를 觀察하여 最少抑制濃度를 判定하였다.

Sorbic acid培地에서 *E. coli*의 運動性 : Motility test medium (Difco)을 pH 6.5 인산 완충용액으로 만든 다음, 시험관에 분주하여 加壓滅菌 후 50~60°C정도 되었을 때 sorbic acid용액을 가한 후, 완전히 冷却 되었을 때 *E. coli*를 穿刺하여 37°C에서 48時間 培養한 후 增殖度를 觀察하였다.

加熱處理 후 最少抑制濃度の 變化 : Sorbic acid가 0.00g/l 0.50g/l, 1.00g/l, 2.00g/l로 添加된 nutrient broth를 9ml씩 滅菌시험관에 넣은 후 미리 50°C, 55°C, 60°C의 恒溫槽(±0.5°C)에 넣어 평형에 도달시킨 후 菌液 1ml를 添加하고 加熱處理하면서, 10分 간격으로 1백금을 미리 여러 濃도로 調製된 nutrient agar에 接種하였다. 接種된 nutrient agar를 37°C에서 48時間 培養한 후 生育有無를 觀察하여 最少抑制濃度를 判定하였다.

加熱處理 후 保存效果 : 여러濃도로 調製된 nutrient broth 9ml에 菌液 1ml를 接種하여 50°C, 55°C, 60°C에서 1時間동안 10分 간격으로 加熱處理하여 37°C에서 48時間 培養한 후 增殖度를 觀察하였으며, 같은 操作으로 加熱處理하여 室溫(25~30°C)에서 保存하여 7日

후와 14日후의 增殖度를 觀察하였다.

## 結果 및 考察

菌數에 대한 最少抑制濃度 : Nutrient broth와 nutrient agar에서 *E. coli*의 菌數에 대한 最少抑制濃度를 調査한 結果는 Figure 1과 같다. nutrient broth에서 菌數와 sorbic acid의 最少抑制濃度간에는 高度의 相關을 보였으며 ( $r=0.9186$   $p<0.01$ ),  $Y=0.1076X+1.0396$  ( $Y$ : MIC  $X$ : log survivors per ml)의 式으로 나타낼 수 있었다. nutrient agar에서도 高度의 相關을 보였으며 ( $r=0.9556$   $p<0.01$ ),  $Y=0.1161X+0.7840$ 의 式으로 나타낼 수 있었다. 菌數가 增加됨에 따라 最少抑制濃度도 增加되고 있는 데 이는 Oka<sup>69-72)</sup>가 지적한 바와 같이 sorbic acid의 濃度は 培地와 微生物細胞間에 평형을 이루며 細胞內 固相(solid phase)와 結合하는 吸着量에 의해 抗菌效果가 決定된다는 事實을 뒷받침 하고 있다. 즉 微生物細胞量이 增加되면 細胞內 固相과 結合할 수 있는 sorbic acid는 減少되므로 抗菌效果를 나타내는 데 필요한 sorbic acid의 濃度は 增加되는 것으로 생각된다. 그리고 *E. coli*의 菌數가 少量으로 되어도 sorbic acid 1.25g/l이하의 濃度에서는 增殖을 抑制할 수 없었다. 즉 *E. coli*에 대한 sorbic acid의 臨界濃度(limited inhibition concentration)는 1.25g/l이었다. nutrient broth와 nutrient agar간에는 差異가 認定되지 않았다( $t=0.6097$   $p>0.05$ ).

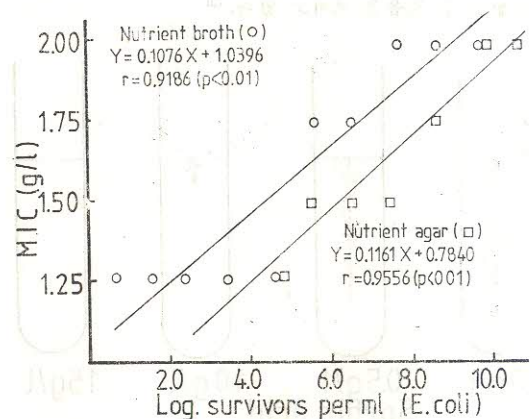


Fig. 1. Minimum inhibition concentration versus cell concentration.

*E. coli* was inoculated in nutrient broth and nutrient agar (pH 6.5) containing 0.00g/l~2.00g/l sorbic acid by 10-fold dilution method and agar streak method respectively, and incubated at 37°C for 48 hours. Then MIC was determined.

**Sorbic acid培地에서 *E. coli*의 運動性(motility test):**

通性嫌氣性菌인 *E. coli*에 대해 好氣的 狀態와 嫌氣的 狀態에서 sorbic acid에 의한 增殖抑制效果를 調査하기 위해 motility test media에 穿刺培養한 結果는 Figure 2와 같다. sorbic acid가 添加되지 않은 培地에서는 均 일한 增殖을 나타냈으나, 0.50g/l 添加된 培地에서는 酸素供給이 잘되는 表面일수록 잘자라며 酸素供給이 비교적 적은 深層部에서는 현저히 抑制되었고 1.00g/l 와 1.50g/l에서는 더욱 抑制되었다. 이 現象은 더욱 研究할 흥미있는 課題이며, 食品에 sorbic acid를 添加한 경우에도 *E. coli*와 같은 通性嫌氣性菌에 대해서는 好氣的 狀態보다는 嫌氣的 狀態에서 더욱 增殖을 抑制시킬 것으로 생각된다.

**加熱處理에 의한 最少抑制濃度の 變化:** *E. coli*에 대해 加熱處理후 最少抑制濃도와 加熱併用處理후 最少抑制濃도를 調査한 結果는 Table 1,2 및 Figure 3과 같다.

**室溫에서의 處理:** Sorbic acid가 添加되지 않은 nutrient broth에 露出된 菌은 最少抑制濃도가 모두 2.00g/l로 나타났으며, 0.50g/l, 1.00g/l, 1.50g/l, 2.00g/l에 露出되었던 菌도 모두 最少抑制濃도는 2.00g/l이었다. 특히 2.00g/l에 60분간 露出되었던 菌도 그보다 低濃度인 培地에 接種되면 모두 增殖하였고, 2.00g/l의 培地에서만 增殖이 抑制되었다.

따라서 食品에 있어 增殖抑制濃도에 露出되어 있는 菌이라도 物理的, 化學的 變化로 殘留濃도가 減少되면 增殖할 수 있음을 보이고 있다.<sup>73)</sup>

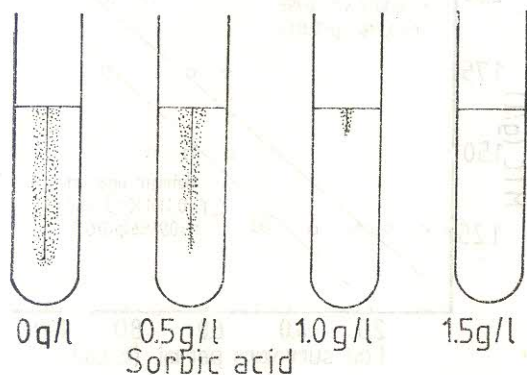


Fig. 2. Motility test of *E. coli* in sorbic acid media at pH 6.5.

*E. coli* was inoculated in motility test media (pH 6.5) containing 0.00, 0.50, 1.00, and 1.50g/l sorbic acid by stabbing at the center of the media and incubated at 37°C for 48 hours.

**50°C의 加熱處理:** 50°C의 加熱處理를 한 경우는 室溫에서 處理한 것과 같은 變化를 나타내었다. Russel와 Harris<sup>31)</sup>는 *E. coli*를 50°C로 30分 加熱處理하여 pentose와 UV(260nm) absorbing material이 流出됨을 報告하였으며, 加藤와 芝崎<sup>74)</sup>는 *E. coli*에 대해 각종 지방산과 지방산 ester을 添加한 후 50°C에서 5分간 加熱處理에 의해 현저한 死滅이 일어났음을 報告하였다. 芝崎 및 飯田<sup>82)</sup>은 *Candida utilis*에 대해 pH 4.0에서 50°C로 加熱處理하여 현저하게 死滅이 촉진되었다고 報告하였다. 그러나 本實驗의 경우 最少抑制濃度の 變化는 나타나지 않았다.

**55°C의 加熱處理:** Sorbic acid를 添加하지 않고 55°C로 加熱處理를 하면, 加熱時間이 길어짐에 따라 最少抑制濃도는 減少되었다. 즉 加熱處理를 하지 않은 것은 最少抑制濃도가 2.00g/l이었으나, 10~30分 加熱處理에 의해 1.50g/l, 60分 加熱處理에 의해 1.25g/l로 낮아졌다. sorbic acid가 0.50g/l, 1.00g/l, 1.50g/l, 2.00g/l 함유된 培地에서 55°C의 加熱處理후 最少抑制濃도도 모두 加熱處理時間이 길어짐에 따라 最少抑制

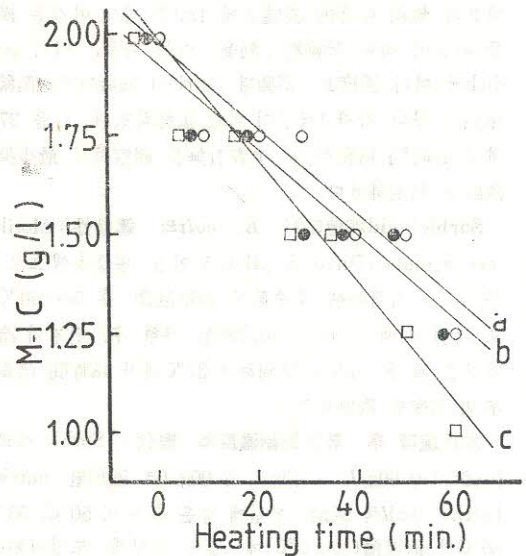


Fig. 3. MIC after heating with sorbic acid at 55°C. Experimental procedures were the same as those of Table 2.

- a) 0.00g/l, 0.50g/l, 1.00 g/l sorbic acid(○)  
 $Y = -0.0107X + 1.9643$   
 $r = -0.9487$  ( $p < 0.01$ )
- b) 1.50g/l sorbic acid(●)  
 $Y = -0.0107X + 1.9285$   
 $r = -0.9487$  ( $p < 0.01$ )
- c) 2.00g/l sorbic acid(□)  
 $Y = -0.0152X + 1.9910$   
 $r = -0.9751$  ( $p < 0.01$ )

**Table 1.** MIC after Treatment with Sorbic acid at Room Temperature and after Heating with Sorbic Acid at 50°C

Conc.	Time(min)						
	0*	10	20	30	40	50	60
0.00 (g/l)	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
0.50 (g/l)	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
1.00 (g/l)	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
1.50 (g/l)	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
2.00 (g/l)	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00

0\*: no heating (control)

*E. coli* was suspended in the nutrient broth (pH 6.5) containing 0.00, 0.50, 1.00, 1.50, and 2.00 g/l sorbic acid. Control tubes were not treated and sample tubes treated at room temperature and 50°C for the time interval as indicated. Nutrient agar media (pH 6.5) with various concentration of sorbic acid were inoculated with one loopful of cell suspensions, and then incubated at 37°C for 48 hours. MIC was determined.

**Table 2.** MIC after Heating with Sorbic Acid at 55°C and 60°C

Conc.	55°C to min.							60°C to min.						
	0*	10	20	30	40	50	60	0*	10	20	30	40	50	60
0.00 (g/l)	2.00	1.75	1.75	1.75	1.50	1.50	1.25	2.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.50 (g/l)	2.00	1.75	1.75	1.75	1.50	1.50	1.25	2.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1.50 (g/l)	2.00	1.75	1.75	1.75	1.50	1.50	1.25	2.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1.50 (g/l)	2.00	1.75	1.75	1.75	1.50	1.50	1.25	2.00	0.75	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2.00 (g/l)	2.00	1.75	1.75	1.75	1.50	1.50	1.00	2.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Statistical Analysis Treated concentration: F=3.0563(p<0.05)

Treated concentration: F=1.1734; NS

0.00 0.50 1.00 1.50 2.00

Treated time: F=63.3338 (p<0.01)

Treated time: F=105.2100 (p<0.01)

0 10 20 30 40 50 60

0 10 20 30 40 50 60

0\*: no heating (control)

*E. coli* was suspended in the nutrient broth (pH 6.5) containing 0.00, 0.50, 1.00, 1.50, and 2.00 g/l sorbic acid. Sample tubes were treated at 55°C and 60°C for the time interval as indicated. Nutrient agar media (pH 6.5) with various concentration of sorbic acid were inoculated with one loopful of cell suspensions, and then incubated at 37°C for 48 hours. MIC was determined.

濃度は低下되었다(F=63.3338 p<0.01). 그리고 10~30분간, 40~50분간의加熱處理는 差異가 認定되지 않았으며, 無處理와 10~30分處理, 40~50分處理, 60分處理한 것은 相互간에 差異가 認定되었다(p<0.01). 즉 加熱處理가 進行될수록 增殖抑制에 필요한 sorbic acid濃度は 減少되었다.

다음 sorbic acid와 加熱併用處理를 보면, 2.00g/l에서 加熱併用處理한 것은 0.00g/l에서 加熱併用處理한 것보다 最少抑制濃度は 현저히 減少되었다. 즉 加熱併用處理할 때 sorbic acid의 濃도가 增加되면 最少抑制濃度は 低下되었다(F=3.0564 p<0.05). Sorbic acid가

添加되지 않고 加熱處理한 것과 1.50g/l로 添加하고 加熱併用處理한 것은 差異가 認定되지 않았으나, sorbic acid가 0.00g/l~1.00g/l로 添加되고 加熱併用處理한 것과 2.00g/l로 添加하고 加熱併用處理한 것은 差異가 認定되었다(p<0.05).

芝崎와 飯田<sup>2)</sup>은 *Candida utilis*에 대해 pH4.0에서 sorbic acid와 55°C의 加熱併用處理를 하는 경우 0.1~0.2%에서는 큰 差異가 없다고 報告했으며, Lategan과 Vaughn<sup>6)</sup>은 pH 5.5에서 *Salmonella typhimurium*에 대해 1000ppm으로 添加하여 50~58°C의 加熱併用處理에 의해 D-value가 減少되었다고 報告하였으나 本實驗

의 경우 sorbic acid가 0.00g/l~1.00g/l로 添加되고 加熱併用處理했을 때는 差異가 없고 2.00g/l에서 加熱併用處理했을 때는 最少抑制濃度가 低下되었다.

60°C의 加熱處理 : 60°C로 加熱處理하면 55°C의 加熱處理보다도 加熱處理時間이 길어짐에 따라 最少抑制濃度는 더욱 현저하게 減少되었다(F=105.2100 p<0.01). 그러나 sorbic acid와의 加熱併用效果는 認定되지 않았다(F=1.1734 p<0.05). Sorbic acid 0.00g/l~1.50g/l와 60°C의 加熱併用處理로 20분만에 모두 死滅되었고, 2.00g/l와 加熱併用處理로 10분만에 모두 死滅되었다. 55°C로 加熱處理할 때보다 最少抑制濃度가 더욱 현저하게 低下되는 것은 溫度가 上昇됨으로써 加熱損傷이 속히 진행되는 것으로 생각된다.

Sorbic acid와 加熱併用處理후 增殖度 : Sorbic acid와 加熱併用處理후 增殖度는 表 3, 4와 같다. 50°C로

Table 3. Growth of *E. coli* after Heating with Sorbic Acid

Conc.	50°C to min						55°C to min								
	0*	10	20	30	40	50	60	0*	10	20	30	40	50	60	
1.00(g/l)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1
1.25(g/l)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
1.50(g/l)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
1.75(g/l)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
2.00(g/l)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

0\*, no heating (control); 2, moderately heavy growth; 1, light growth; 0, no growth.

*E. coli* was inoculated in nutrient broth (pH 6.5) containing 1.00, 1.25, 1.50, 1.75, and 2.00g/l sorbic acid. The cell suspensions were treated at 50°C and 55°C for the time interval as indicated, and then incubated at 37°C for 48 hours.

Table 5. Growth of *E. coli* after 7 days at Room Temperature after Heating with Sorbic Acid.

Conc.	50°C to min.						55°C to min.						60°C to min									
	0*	10	20	30	40	50	60	0*	10	20	30	40	50	60	0*	10	20	30	40	50	60	
1.00(g/l)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0
1.25(g/l)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
1.50(g/l)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
1.75(g/l)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
2.00(g/l)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

0\*, no heating (control): 0, no growth; 1, light growth; 2, moderately heavy growth; 3, heavy growth. *E. coli* was inoculated in the nutrient broth (pH6.5) containing 1.00, 1.25, 1.75, and 2.00g/l sorbic acid. The cell suspensions were treated at 50°C, 55°C 60°C, for the time interval as indicated, and then preserved at room temperature.

Table 4. Growth of *E. coli* after Heating with Sorbic Acid

Conc.	60°C to min.						
	0*	10	20	30	40	50	60
0.00(g/l)	3	3	0	0	0	0	0
0.25(g/l)	3	2	0	0	0	0	0
0.50(g/l)	3	1	0	0	0	0	0
0.75(g/l)	2	1	0	0	0	0	0
1.00(g/l)	2	0	0	0	0	0	0
1.25(g/l)	1	0	0	0	0	0	0
1.50(g/l)	1	0	0	0	0	0	0
1.75(g/l)	1	0	0	0	0	0	0
2.00(g/l)	0	0	0	0	0	0	0

0\*, no heating (control); 3, heavy growth; 2, moderately heavy growth; 1, light growth; 0, no growth.

*E. coli* was inoculated in nutrient broth (pH 6.5) containing 0.00~2.00g/l sorbic acid. Cell suspensions were treated at 60°C for the time interval as indicated, and then were incubated at 37°C for 48 hours.

加熱併用處理했을 때는 加熱處理時間이 길어짐에도 增殖度는 變化되지 않았다. 55°C로 加熱併用處理했을 때는 加熱處理時間이 길어질수록 最少抑制濃度는 低下되었다. 1.25g/l로 55°C 40분간 加熱處理로 增殖이 나타나지 않았고, 1.50g/l로 55°C 30분간, 1.75g/l로 55°C 20분간 加熱處理로 增殖이 나타나지 않았다. 1.00g/l~1.75g/l로 60°C 10분 加熱處理하면 增殖이 나타나지 않았다.

Sorbic acid와 加熱併用處理후 保存效果 : Sorbic acid 1.00g/l~2.00g/l로 각 溫度로 加熱併用處理후 室溫에

Table 6. Growth of *E. coli* after 14 Days at Room Temperature Heating with Sorbic Acid.

Conc.	50°C to min.							55°C to min.							60°C to min.						
	0*	10	20	30	40	50	60	0*	10	20	30	40	50	60	0*	10	20	30	40	50	60
1.00(g/l)	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2	2	3	1	0	0	0	0	0
1.25(g/l)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
1.50(g/l)	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	2	0	0	0	0	0	0
1.75(g/l)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
2.00(g/l)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0

0\*, no heating (control): 0, no growth; 1, light growth; 2, moderately heavy growth; 3, heavy growth.

*E. coli* was inoculated in the nutrient broth (pH 6.5) containing 1.00, 1.25, 1.50, 1.75, and 2.00g/l sorbic acid. The cell suspensions were treated at 50°C, 55°C, 60°C for the time interval as indicated, and then preserved at room temperature.

보존한 결과는 Table 5, 6과 같다. 7일간 보존하는 데는 1.25g/l로 55°C 40분간으로, 1.50g/l로 55°C 30분간으로, 1.75g/l로 55°C 20분간으로加熱併用處理로可能하였으며, 2.00g/l에서는加熱處理가 필요하지 않았다. 그러나 14일간 보존하는 데에는 1.50g/l로 55°C 60분간으로, 1.75g/l로 55°C 40분간으로, 2.00g/l로는 55°C 30분간의加熱併用處理로可能하였다.

그러므로 완전한 死滅에 이르지 않는 55°C로加熱處理를 하면加熱處理를 하지 않은 *E. coli*의 增殖을抑制하는 데 필요한 sorbic acid의 濃度보다도 더 낮은 濃度에서 增殖을抑制할 수 있었으며, 加熱處理時間이 길어질수록 增殖을抑制하는 데 필요한 sorbic acid濃度는減少되었다.

### 結 論

Sorbic acid의 抗菌效果가 낮은 pH6.5에서 效果的인 使用法을 研究하기 위해, sorbic acid에 비교적 강한 *E. coli*를 使用하여 菌數에 대한 最少抑制濃度의 變化和 sorbic acid培地에서 運動性實驗, 그리고 加熱處理에 의한 最少抑制濃度의 變化 및 保存效果를 調査하였다.

1. *E. coli*의 菌數가 減少됨에 따라 最少抑制濃度는 減少되지만 菌數가 少量으로 減少되어도 最少抑制濃度는 1.25g/l이하로 低下되지 않았다. 그리고 *E. coli*는 sorbic acid培地 表面보다 深層部에서 더욱 增殖이 抑制되었다.

2. *E. coli*에 대한 sorbic acid의 抑制效果는 殘留濃度에 起因된 것이며, 55°C에서 加熱處理를 받은 菌은 加熱處理를 받지 않은 菌보다 더 낮은 濃度에서 增殖이 抑制되었다. sorbic acid 2.00g/l로 55°C 30분간 加熱併用處理된 것은 sorbic acid 없이 55°C 30분간 加熱

處理된 것보다 最少抑制濃度는 0.25g/l 더 低下되었다.

3. 2.00g/l의 sorbic acid와 55°C로 30분간 加熱併用處理를 한 것은 室溫에서 14일간 保存할 수 있었다.

### 參 考 文 獻

1. Frazier, W.C.: Food Microbiology, McGraw-Hill, New York, pp.73-159, (1967).
2. 芝崎勲: 食品殺菌技術と今後の課題, 食品と科學, 15:94, (1973).
3. 篠山茂行: 食品の加熱殺菌と包裝による 保全, 食品と科學, 15:107, (1978).
4. 芝崎勲: 防腐, 殺菌方法の選擇について, 醸工, 44:564, (1966).
5. McConnell, J.E., Collier, C.P.: Gases Sterilize containers. *Food Engineering*, 34:96, (1962).
6. Heinemann, B., Voris, L., and Stumbo, C.R.: Use of nisin in processing food products. *Food Technol.*, 19:592, (1965).
7. York, G.K.: Effect of pimarin on the resistance of *Saccharomyces cerevisiae* to heat, freezing, and ultraviolet irradiation. *Appl. Microbiol.*, 14:451, (1966).
8. Garibaldi, J.A.: Acetic acid as a means of lowering the heat resistance of *Salmonella* in yolk products. *Food Technol.*, 22:1031, (1968).
9. Duncan, C.L., and Foster, E.M.: Role of curing agents in the preservation of shelf-stable canned meat product. *Appl. Microbiol.*, 16:401, (1968).
10. Garibaldi, J.A., Ijichi, K., and Bayne, H.G.: Effect of pH and chelating agents on the heat resistance and viability of *Salmonella typhimur-*

- ium* TM-1 and *Salmonella senftenberg* 775W in egg white. *Appl. Microbiol.*, 18:318, (1968).
11. King, A.D. Jr., Michener, H.D., and Ito, K.A.: Control of *Byssoschlamys* and related heat-resistant fungi in grape products, *Appl. Microbiol.*, 18:166, (1969).
  12. Kzdzinski, L.N., Howard, G.L., and Stumbo, C.R.: Thermochemical factors influencing the death kinetics of spores of *Clostridium botulinum* 62A. *J. Food Sci.*, 34:561, (1969).
  13. Kosikowski, F.V., and Fox, P.E.: Low heat, hydrogen peroxide, and bacto-fugation treatments of milk to control coliforms in cheddar cheese. *J. Dairy Sci.*, 51:1018, (1968).
  14. Cheng, M.K.C., and Levin, R.E.: Chemical destruction of *Aspergillus niger* conidiospores. *J. Food Sci.*, 35:62, (1970).
  15. Sierea, G., and Boucher, R.M.G.: Ultrasonic synergistic effects in liquid-phase chemical sterilization. *Appl. Microbiol.*, 22:166, (1971).
  16. Trujillo, R., and David, T.J.: Sporostatic and sporocidal properties of aqueous formaldehyde. *Appl. Microbiol.*, 23:612, (1972).
  17. Kohl, W.F.: Pasteurizing egg white. *Food Technol.*, 25:1176 (1971).
  18. Han, Y.W., Schuyten, H.A., and Callihan, C.D.: Combined effect of heat and alkali in sterilizing sugarcane bagasse. *J. Food Sci.*, 36:335, (1971)
  19. Toledo, R.T., Escher, R.E., and Ayres, J.C.: Sporocidal properties of hydrogen peroxide against food spoilage organisms. *Appl. Microbiol.*, 26:592, (1973).
  20. Splittstoesser, D.R., Lien, L.L., Wilkison, M., and Stamer, J.R.: Influence of wine composition on the heat resistance of potential spoilage organisms. *Appl. Microbiol.*, 30:369, (1975).
  21. 池田潤平, 算浦久兵衛, 照井堯造: 熱処理による残存胞子の發育遅延現象・醸工, 36:525, (1958)
  22. Kaufman, O.W., Harmon, L.G., Pailthorp, O.C., and Pflug, I.J.: Effect of heat treatment on the growth of surviving cells. *J. Bacteriol.*, 78:834, (1959).
  23. Ron, E.Z., and Davis, B.D.: Growth rate of *Escherichia coli* at elevated temperature limitation by methionine. *J. Bacteriol.*, 107:391, (1971).
  24. Heater, C.D., and Vanderzant, W.C.: Effect of the plating medium on the survival of heat-treated cells of *Pseudomonas fluorescens*. *Food Res.*, 22:164 (1957).
  25. Herson, A.C., and Hulland, E.D.: Canned food, J. & Churchill, London, pp.42-43, pp.140-142, (1969).
  26. Iandolo, J.J., and Ordal, Z.J.: Repair of thermal injury of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, 91:134, (1966).
  27. Clark, C.W., and Ordal, Z.J.: Thermal injury and recovery of *Salmonella typhimurium* and its effect on enumeration procedures. *Appl. Microbiol.*, 18:332, (1969).
  28. Sogin, S.J., and Ordal, Z.J.: Regeneration of ribosomes and ribosomal ribonucleic acid and during repair of thermal injury to *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, 94:1082, (1969).
  29. Silva, M.T., and Sousa, J.C.F.: Ultrastructural alterations induced by moist heat in *Bacillus cereus*. *Appl. Microbiol.*, 24:463, (1972).
  30. Miller, L.L., and Ordal, Z.J.: Thermal injury and recovery of *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol.*, 24:878, (1973).
  31. Russell, A.D., and Harris, D.: Damage to *Escherichia coli* on exposure to moist heat. *Appl. Microbiol.*, 16:1394, (1968).
  32. Tombins, R.I., Pierson, M.D., and Ordal, Z.J.: Effect of thermal injury on the TCA cycle enzymes of *Staphylococcus aureus* MF31 and *Salmonella typhimurium* 7136. *Can. J. Microbiol.*, 17:759, (1971).
  33. Hurst, A., Hughes, D.L., and Shah, B.G.: Relationship between loss of magnesium and loss of salt tolerance after sublethal heating *Staphylococcus aureus*. *Can. J. Microbiol.*, 20:1153, (1974).
  34. Gomez, R.F., and Sinskey, A.J.: Deoxyribonucleic acid and Breaks in heated *Salmonella typhimurium* LT-2 after exposure to nutritionally Complex media. *J. Bacteriol.*, 115:522, (1973).
  35. 鈴木堅之: 遺傳子および染色體の修復と細胞の回復. 蛋白質・核酸・酵素, 19:567, (1974).
  36. 鈴木堅之: 大腸菌における DNA損傷修復. 蛋白質, 核酸・酵素, 19:571, (1974).



37. 土戸哲明：微生物の加熱損傷に對する薬劑の併用効果。醸工，55:144，(1977)。
38. Tsuchido, T., Ozawa, O., and Shibasaki, I.: Growth inhibition on heated cells of *Escherichia coli* by tylosin. *J. Ferment. Technol.*, 53:363, (1975).
39. Tsuchido, T., Kadda, K., and Shibasaki, I.L.: Enhancement of sporicidal activity of an amphoteretic surfactant by heating. *J. Ferment. Technol.*, 53:862, (1975).
40. 土戸哲明・中川良勝，岡崎光雄，芝崎勲：微生物の加熱損傷に對する薬劑 併用効果について(第二報) *Candida utilis* の加熱損傷とその回復・醸工，50:39，(1972)。
41. 土戸哲明・岡崎光雄，芝崎勲：微生物の 加熱損傷に對する 薬劑の併用効果の機構・醸工，50:341，(1972)。
42. 天羽軒夫：細菌胞子の耐熱性に對する影響物質。醸工，36:521，(1958)。
43. Furia, T.E.: Handbook of food additives. Chemical Rubber Co., Cleveland, pp.114-185, (1972)。
44. 霜三雄，福住榮一：食品防腐劑の知識と使方，信貴書院，東京，pp.74-89, 93-128, (1965)。
45. Emard, L.O., and Vaughn, R.H.: Selectivity of sorbic acid medium for the catalase negative Lactic acid bacteria and *Clostridia*. *J. Bacteriol.*, 63:387, (1952)。
46. Bull, T.A., Etchells, J.L., and Borg, A.F.: Influence of sorbic acid on the growth of certain species of bacteria, yeast, and filamentous fungi. *J. Bacteriol.*, 77:573, (1958)。
47. Wyss, O.: Microbial inhibition by food additives. *Adv. Food Res.*, 1:373, (1948)。
48. Melnick, D., Luckmann, F.H., and Gooding, C.M.: Sorbic acid as a fungistatic agents for food. VI. Metabolic degradation of sorbic acid in chees by molds and the mechanism of mold inhibition. *Food Res.*, 19:44, (1954)。
49. York, G.K., and Vaughn, R.H.: Mechanisms in the inhibition of microorganisms by sorbic acid, *J. Bacteriol.*, 88:411, (1964)。
50. Deuel, H.J. Jr., Alfin-Slater, R., Well, C.S., and Smith, H.F. Jr.: Sorbic acid as a fungistatic agent for foods. I. Harmlessness of sorbic acid as a dietary component. *Food Res.*, 19:1, (1954)。
51. Deuel, H.J., Calber, C.E., Anisfeld, L., McKeehan, H., and Blunden, H.D.: Sorbic acid as a fungistatic agent for foods. II. Metabolism of unsaturated fatty acids with emphasis on sorbic acid. *Food Res.*, 19:13, (1954)。
52. 谷村 顯雄：食品添加物の分析(1)，講談社，東京，p.19，(1970)。
53. 保社部：食品規格基準，食品工業協會，서울，pp.260-263，(1974)。
54. Beneke, E.S.: Sorbic acid as fungistatic agent at different pH levels for molds isolated from strawberries and tomatoes. *Food Technol.*, 9:480, (1955)。
55. 櫻井芳人，劑藤道雄，東秀雄，鈴木明治：総合食料工業，恒星社厚生閣，東京，pp.686-687, 783-791, 1077-1110, (1975)。
56. 松田敏生，金山龍男：ソルビン酸の有効的 利用法，食品と科學，春季増刊，1-7，(1975)。
57. 和田俊：魚肉ソビジのソルビン酸による 保存効果の再検討，食衛誌，17:95，(1976)。
58. 成三慶，金昌是：Disodium dihydrogen pyrophosphate에 의한 pork sausage의 pH調節이 防腐劑의 保存効果에 미치는 影響。韓畜誌，12:163, (1970)。
59. 櫻井芳人，齊藤道雄，東秀雄：食料工業，厚生閣，東京，pp.651-668, (1970)。
60. Robinson, J.F., and Hills, C.H.: Preservation of fruit products by sodium sorbate and mild heat. *Food Technol.*, 13:251, (1959)。
61. Lategan, P.M., and Vaughn, R.H.: The influence of chemical additives on the heat resistance of *Salmonella typhimurium* in liquid white egg. *J. Food Sci.*, 29:339, (1964)。
62. 芝崎勲，飯田卑月：酵母の加熱損傷に對するソルビン酸の効果について。日食工誌，15:447, (1968)。
63. Arya, S.S., Vidyassagar, K., and Parihar, D.B.: Preservation of chapatis. *Lebensm-Wiss Technol.*, 10:208, (1977)。
64. Freese, E., and Sheu, C.J.: Function of lipophilic acid as antimicrobial food additives. *Nature* 241:321, (1973)。
65. 芝崎勲：食品の大腸菌汚染防止，食品と科學，11:116, (1971)。
66. 樋口亮一，上田修：ソルビン酸用法上の新知見，食衛誌，6:455, (1965)。
67. Harrigan, W.F., and MaCance, M.E.: Laboratory

- methods in food and dairy microbiology. Academic press, London, pp.34-35, (1976).
68. 京都大：食品工学実験書(下)，養賢堂，東京，p.5, p.15, pp.472-473, (1970).
  69. Oka, S.: Studies on transfer of antiseptics to microbes and their toxic effect. Part I. Accumulation of acid antiseptics in yeast cells. *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, 24:59, (1960).
  70. Oka, S.: Studies on transfer of antiseptics to microbes and their toxic effect. Part II. Relation between adsorption of acid antiseptics on yeast cell and their toxic effect. *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, 24:338, (1960).
  71. Oka, S.: Studies on transfer of antiseptics and their toxic effect. Part III. Adsorption of ester of acid antiseptics on yeast cell and their toxic effect. *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, 24:516, (1960).
  72. Oka, S.: Studies on transfer of antiseptics to microbes and their toxic effect. Part VI. Toxic effect and adsorption of phenol and ester of acid antiseptics on bacterial cell. *Agr. Biol. Chem.*, 26:515, (1962).
  73. 藤井清次，細具祐太良：保存料・殺菌料の消長，*New Food Industry* 17:48, (1976).
  74. 加藤 信行，芝崎勲：脂肪酸 およびそのエスラルの *Escherichia coli* および *Pseudomonas aeruginosa* に對する加熱併用効果. *醸工*, 53:802, (1975).