

과산화수소와 유산이 *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Enteritidis* 및 *Listeria monocytogenes*의 증식 억제에 미치는 영향

장재선 · 이미연* · 이제만* · 김용희*

가천길대학 보건행정과

*인천광역시 보건환경연구원

Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Enteritidis* and *Listeria monocytogenes* by Hydrogen Peroxide and Lactic acid

Jae-Seon Jang · Mi-Yeon Lee* · Jea-Mann Lee* · Yong-Hee Kim*

Dept. of Health Administration, Gacheon-Gil College, Incheon

* Health and Environment Research Institute, Incheon

Abstract

The inhibitory effect of the food processing agent on growth of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Enteritidis*, and *Listeria monocytogenes* was performed with hydrogen peroxide and lactic acid, and combination of hydrogen peroxide and lactic acid. The minimum inhibitory concentration (MIC) of hydrogen peroxide in *E. coli* O157:H7 was 100 ppm at pH 5.0, 6.0, 6.5 and 7.0, while in *Listeria monocytogenes* 25 ppm at pH 5.5, 6.0 and 50 ppm at pH 6.5, 75 ppm at pH 7.0. MIC of lactic acid in *E. coli* O157:H7 was 2500 ppm at pH 5.0, 6.0, 6.5 and 7.0. MIC of lactic acid in *S. Enteritidis* was 1250 ppm at pH 5.0, 2500 ppm at pH 5.5, 6.0, 6.5 and 7.0, while in *L. monocytogenes* 625 ppm at pH 5.5 and 125 ppm at pH 6.0, 6.5 and 7.0. MIC of combined hydrogen peroxide and lactic acid in *E. coli* O157:H7, *S. Enteritidis*, and *L. monocytogenes* was 75 ppm of hydrogen peroxide with 2500 ppm of lactic acid at pH 6.5. The correlations between MICs of hydrogen peroxide and lactic acid in *E. coli* O157:H7, *S. Enteritidis* and *L. monocytogenes* were obtained through the coefficient of determination(R^2). R^2 value were 0.9984, 0.9935 and 0.9283, respectively. The inhibitory effect of hydrogen peroxide and lactic acid in *E. coli* O157:H7, *S. Enteritidis* and *L. monocytogenes* could be confirmed from the result of this experiment. Therefore, it was expected that the food process would increase or maintain by using lactic acid together with hydrogen peroxide.

I. 서 론

최근 식물성 식품의 선호도가 급격히 증가하고

있는 추세로 식물성 식품은 가열과정 없이 바로 섭취되는 식품임을 고려할 때 원료 생산지의 오염이나 조리과정 중의 교차오염으로 인해 변질·부

폐되거나 병원균에 감염될 가능성도 있으므로 식품위생상 중요한 문제를 일으킬 수 있다¹⁾.

Escherichia coli O157:H7, *Salmonella* Enteritidis와 *Listeria monocytogenes*는 식품으로 인한 식중독원인균으로써 *Escherichia coli* O157:H7는 혈소판 감소성 자반증, 용혈성 요독증 후군, 출혈성 장염 등을 유발하고, verotoxin을 생산하며²⁾, *Salmonella*는 식품질환증, 장염, 장기의 패혈증을 동반한 국소성 병소 등을 일으키는 식중독 세균이다³⁾. 또한 *L. monocytogenes*는 그램 양성인 단간균으로 편모를 가지고 있어 운동성이 활발하여 사람과 동물에게 화농성 뇌막염, 패혈증, 유산 등 listeriosis를 유발시키는 치명적인 식중독 세균이다⁴⁾.

수입된 채소류에서는 *Salmonella*균은 103개 시료 중 23개에서 분리된 바 채소인 경우도 오염정도가 높았다고 보고되고 있다⁵⁾. 이는 채소류의 소비가 높다고 할 수 있다. 또한 조리되지 않은 채 먹는 채소류인 경우 대장균이 48% 검출되어, 환경 위생의 개선과 위생교육의 필요성이 요구되고 있다⁶⁾. Ercolani⁷⁾는 이탈리아의 소매점에서 구입한 상추에서 일반세균이 100g당 6.6×10^7 , 대장균이 5.9×10^4 , 장구균이 2.24×10^3 이 검출되었다고 보고하였으며, Monge 등⁸⁾은 코스타리카에서의 오이 샐러드를 조사한 결과 *L. monocytogenes*가 20% 분리되었다고 보고하였다. 주로 채소류는 열을 가지 않고 생식하는 경우가 많으므로 소비자의 안전성 확보가 중요한 문제로 제기되고 있는 실정이다.

연구는 과산화수소와 유산의 단독 및 병용 처리함으로써 *E. coli* O157:H7, *S. Enteritidis*, *L. monocytogenes*의 증식 억제에 미치는 영향과 새로운 식품위생처리공정 개발 가능성을 연구하여 소비자에게 보다 안전한 식품을 제공함으로써 국민보건에 기여하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 균주

본 실험에 사용한 균주는 *E. coli* O157:H7은 ATCC 43894를, *S. Enteritidis*는 ATCC 13076를, *L. monocytogenes* ATCC 19119를 사용하였다.

실험 균주는 1% peptone, 37% glycerol에 진하게 부유시킨 다음 -70°C에 동결 보존하면서 사용하였다.

2. 과산화수소와 유산 실험용액의 조제

과산화수소의 실험용액은 100ppm, 75ppm, 50ppm, 25ppm, 12.5ppm, 6.25ppm, 3.13ppm, 1.56ppm으로 각각 조제하였으며, 유산의 실험용액은 2500ppm, 1250ppm, 625ppm, 312ppm, 156ppm, 78ppm, 39ppm, 19.5ppm으로 각각 조제한 후 냉장 보관하여 사용하였다.

3. 균주 배양 및 혼탁액 조제

-70°C로 보관된 실험 균주를 tryptic soy agar(Difco)에서 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 24시간 3회 계대 배양하여 순수 배양되었음을 확인하였다. 이 중 전형적인 집락을 따서 멸균 생리식염수에 혼탁시켜 McFarland Scale No. 0.5(1% BaCl + H₂SO₄ 99.5ml : 1.5×10^9 CFU/ml)에 맞춘 후 이를 100ml에 희석한 액을 표준 균액으로 사용하였다.

4. 실험균에 대한 과산화수소와 유산의 최소발육억제농도 실험

과산화수소와 유산을 일정 농도로 조제한 후 각 시험관에 Muller Hinton broth 1.6ml를 분주하였다. 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 0.2ml씩 각 시험관에 접종하여 균 초기농도를 10^6 CFU/ml로 조정하였다. 시험관을 진탕 배양기에 넣고 100rpm으로 37°C에서 48시간 동안 진탕 배양한 후 균의 증식 유무를 세균이 증식하지 않은 최저 발육억제농도를 결정하였다.

5. pH 변화에 따른 실험균의 증식 억제 실험

과산화수소와 유산의 단독 및 병용 처리한 시험액을 각각 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 및 7.0으로 제조한 Muller Hinton broth에서 37°C에서 72시간 까지

균의 증식 양상을 실험하였다.

III. 결과 및 고찰

1. *E. coli* O157:H7, *Salmonella Enteritidis* 및 *Listeria monocytogenes*에 대한 과산화수소와 유산의 최소발육억제농도(MIC)

E. coli O157:H7, *S. Enteritidis* 및 *L. monocytogenes*에 대한 과산화수소의 최소발육억제농도(MIC)에 관한 결과는 Table 1, 2, 3과 같다.

E. coli O157:H7에 대한 과산화수소의 최소발육억제농도는 pH 5.0, 6.0, 6.5 및 7.0에서 100 ppm이었으며, pH 5.5에서는 100ppm에서도 발육이 억제되지 않았다. *S. Enteritidis*에 대한 과산화수소의 최소발육억제농도는 75 ppm으로 pH의 영향을 받지 않았다. *L. monocytogenes*에 대한 과산화수소의 최소발육억제농도는 pH 5.5, 6.0에서 25 ppm이었으며, pH 6.5에서는 50 ppm, pH 7.0에서는 75 ppm이었다.

E. coli O157:H7, *S. Enteritidis* 및 *L. monocytogenes*에 대한 과산화수소의 최소발육억제농도(MIC)에 관한 결과는 Table 4, 5, 6과 같다.

E. coli O157:H7에 대한 유산의 최소발육억제농도는 pH 5.0, 6.0, 6.5, 7.0에서 2500 ppm에서 발육이 억제되었으며, pH 5.5에서는 유산의 최대허용한 계량인 2500 ppm도 발육이 억제되지 않았다. *S. Enteritidis*에 대한 유산의 최소발육억제농도는 pH 5.0에서는 1250 ppm에서 발육이 억제되었으며, pH 5.5, 6.0, 6.5, 7.0에서는 2500ppm에서 발육이 억제되었다. *L. monocytogenes*에 대한 유산의 최소발육억제농도는 pH 5.5에서 625 ppm이었으며, pH 6.0, 6.5, 7.0에서 125 ppm이었다.

Venkitanaryanan 등⁹⁾은 사과, 오렌지, 토마토를 대상으로 유산과 과산화수소 혼합용액에서 40°C에서 15분간 처리할 때 균 증식이 억제되었다고 보고하였고, Lin 등¹⁰⁾도 식중독균인 *E. coli* O157:H7, *S. Enteritidis*에 대한 억제효과가 뛰어났으며, 다음 *L. monocytogenes*순으로 효과가 있었다고 보고한 바 있다. 이에 본 실험 결과와 유사한 경향을 나타내었다.

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

pH	Concentration of hydrogen peroxide in <i>E. coli</i> O157:H7(ppm)							
	100	75	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56
5.0	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
5.5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
6.0	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
6.5	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
7.0	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

+: growth, -: no growth.

Table 2. Minimum inhibitory concentration of hydrogen peroxide in *Salmonella Enteritidis*

pH	Concentration of hydrogen peroxide in <i>Salmonella Enteritidis</i> (ppm)							
	100	75	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56
5.0	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++
5.5	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++
6.0	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++
6.5	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++
7.0	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++

+: growth, -: no growth.

Table 3. Minimum inhibitory concentration of hydrogen peroxide in *Listeria monocytogenes*

pH	Concentration of hydrogen peroxide in <i>Listeria monocytogenes</i> (ppm)							
	100	75	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56
5.0	-	-	-	-	-	-	-	-
5.5	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++
6.0	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++
6.5	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++
7.0	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++

+: growth, -: no growth.

Table 4. Minimum inhibitory concentration of lactic acid in *E. coli* O157:H7

pH	Concentration of lactic acid in <i>E. coli</i> O157:H7(ppm)							
	2500	1250	625	312	156	78	39	19.5
5.0	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
5.5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
6.0	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
6.5	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
7.0	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

+: growth, -: no growth.

Table 5. Minimum inhibitory concentration of lactic acid in *Salmonella* Enteritidis

pH	Concentration of Lactic acid in <i>Salmonella</i> Enteritidis (ppm)							
	2500	1250	625	312	156	78	39	19.5
5.0	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++
5.5	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
6.0	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
6.5	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
7.0	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

+: growth, -: no growth.

Table 6. Minimum inhibitory concentration of lactic acid in *Listeria monocytogenes*

pH	Conc. of lactic acid in <i>Listeria monocytogenes</i> (ppm)							
	2500	1250	625	312	156	78	39	19.5
5.0	-	-	-	-	-	-	-	-
5.5	-	-	-	+	+	+	+	+
6.0	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++
6.5	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++
7.0	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++

+: growth, -: no growth.

2. 과산화수소와 유산의 병용처리시 최소발육억제농도

E. coli O157:H7, *S. Enteritidis* 및 *L. monocytogenes*에 대한 과산화수소와 유산의 병용처리

시 최소발육억제농도(MIC)에 관한 결과는 Table 7, 8 및 9와 같다. pH 6.5에서 과산화수소의 농도 0~75ppm 및 유산의 농도 0~2500ppm에서 다양한 변화를 나타내었다.

E. coli O157:H7에 대하여 과산화수소의 농도 75 ppm에서는 유산을 첨가하지 않아도 모두 발육 억제 되었으며, 과산화수소 50ppm에서는 유산 625ppm을 첨가하였을 때, 과산화수소 25 ppm에서는 유산 1250 ppm 첨가하였을 때, 과산화수소 12.5 ppm에서는 2500 ppm 첨가하였을 때 억제되었다.

*S. Enteritidis*에 대하여 과산화수소의 농도 75 ppm에서는 유산을 첨가하지 않아도 모두 발육 억제 되었으며, 과산화수소의 농도 50 ppm에서는 유산 1250 ppm을 첨가하였을 때, 과산화수소 25 ppm에서는 유산 2500 ppm 첨가하였을 때 억제되었다.

*L. monocytogenes*에 대하여 과산화수소의 농도 75 ppm에서는 유산을 첨가하지 않아도 모두 발육 억제 되었으며, 과산화수소의 농도 50 ppm에서는 유산 156 ppm을 첨가하였을 때, 과산화수소 25 ppm에서는 유산 312 ppm 첨가하였을 때 억제되었다.

식중독균에 대한 생육저해물질에 대한 많은 연구가 진행되어 초산, 구연산, 젤산의 첨가에 따른 생육 저해 효과를 발표하였고, sodium benzoate, sorbic acid, hydrogen peroxide 등 일반적으로 세균을 저해한다고 보고하여¹¹⁾ 본 실험 결과 과산화수소와 유산이 식중독세균 증식 억제에 효과가 있는 것은 판명되었다.

Table 7. Minimum inhibitory concentration of combined hydrogen peroxide and lactic acid in *E. coli* O157:H7

H ₂ O ₂ (ppm)	Conc. of lactic acid(ppm)					
	0	156	312	625	1250	2500
0	+++	+++	+++	+++	+++	+++
12.5	+++	+++	+++	+++	+++	-
25	+++	+++	+++	+++	-	-
50	+++	+++	+++	-	-	-
75	-	-	-	-	-	-

+: growth, -: no growth.

Table 8. Minimum inhibitory concentration of combined hydrogen peroxide and lactic acid in *Salmonella Enteritidis*

Conc. of H ₂ O ₂ (ppm)	Conc. of lactic acid(ppm)					
	0	156	312	625	1250	2500
0	+++	+++	+++	+++	+++	-
12.5	+++	+++	+++	+++	+++	-
25	+++	+++	+++	+++	+++	-
50	+++	+++	+++	+++	-	-
75	-	-	-	-	-	-

+: growth, -: no growth.

Table 9. Minimum inhibitory concentration of combined hydrogen peroxide and lactic acid in *Listeria monocytogenes*

Conc. of H ₂ O ₂ (ppm)	Conc. of lactic acid(ppm)					
	0	156	312	625	1250	2500
0	+++	++	-	-	-	-
12.5	++	++	-	-	-	-
25	++	++	-	-	-	-
50	++	-	-	-	-	-
75	-	-	-	-	-	-

+: growth, -: no growth.

3. 과산화수소와 유산의 병용처리시 최소발육억제농도와의 상관관계

과산화수소와 유산 병용 처리시 최소발육억제농도와의 상관관계를 구하기 위해 첨가한 유산의 농도를 X축, 과산화수소의 농도를 Y축으로 하여 비선형회귀모형을 구하였다 이 때 얻어진 Y 변수의 값을 역수 변환하여 직선의 회귀방정식을 구한 결과는 Fig. 1, 2, 3과 같다. *E. coli* O157:H7에 대한 최소발육억제농도에 필요한 과산화수소와 유산의 첨가량의 결정계수값은 $R^2=0.9984$, *S. Enteritidis*에 대한 최소발육억제농도에 필요한 과산화수소와 유산의 첨가량의 결정계수값은 $R^2=0.9935$, *L. monocytogenes*에 대한 최소발육억제농도에 필요한 과산화수소와 유산의 첨가량의 결정계수값은 $R^2=0.9283$ 으로 높은 상관관계를 나타내었으며, 상승효과가 확인되었다.

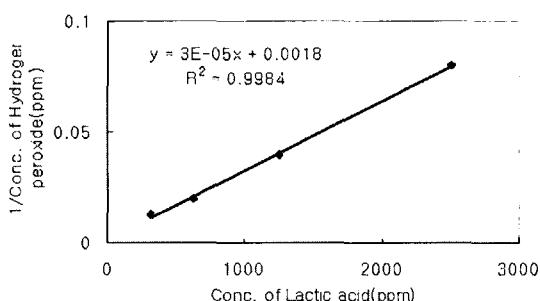


Fig. 1. Correlation between hydrogen peroxide and lactic acid in *E. coli* O157:H7.

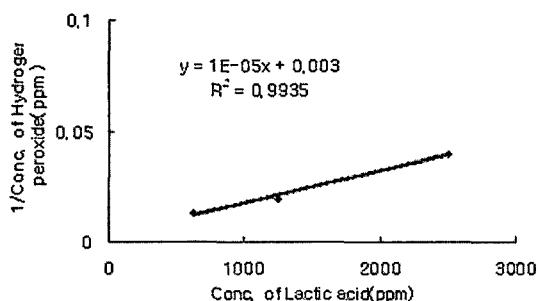


Fig. 2. Correlation between hydrogen peroxide and lactic acid in *Salmonella Enteritidis*.

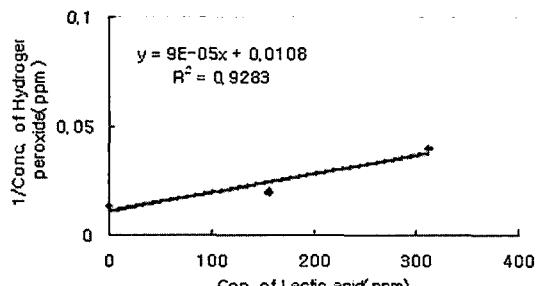


Fig. 3. Correlation between hydrogen peroxide and lactic acid in *Listeria monocytogenes*.

IV. 결 론

최근 산업의 발달로 인한 식품의 안전성에 대한 국민의 우려가 증가되고 있으며 특히 식품을 미생물의 증식으로부터 안전하게 보존하기 위한 식품처리공정의 개발이 요구되고 있다. 과산화수소와 유산을 사용하여 그램음성 병원성 식중독 원인균인 *E. coli* O157:H7, *S. Enteritidis*과 대표적 그램양성식중독 원인균인 *L. monocytogenes*의 증식

억제에 미치는 영향에 대해 실험한 결과는 다음과 같았다.

1. *E. coli* O157:H7에 대한 과산화수소의 최소발육 억제농도는 pH 5.0, 6.0, 6.5, 7.0에서 100 ppm이었으며, pH 5.5에서는 100 ppm에서도 발육이 억제되지 않았다. *S. Enteritidis*에 대한 과산화수소의 최소발육억제농도는 75 ppm으로 pH의 영향을 받지 않았다. *L. monocytogenes*에 대한 과산화수소의 최소발육억제농도는 pH 5.5, 6.0에서 25 ppm이었으며, pH 6.5에서는 50 ppm, pH 7.0에서는 75 ppm이었다.
2. *E. coli* O157:H7에 대한 유산의 최소발육억제농도는 pH 5.0, 6.0, 6.5, 7.0에서 2500 ppm으로 발육이 억제되었으며, pH 5.5에서는 유산의 최대 허용한계량인 2500 ppm도 발육이 억제되지 않았다. *S. Enteritidis*에 대한 유산의 최소발육억제농도는 pH 5.0에서는 1250 ppm에서 발육이 억제되었으며, pH 5.5, 6.0, 6.5, 7.0에서는 2500ppm에서 발육이 억제되었다. *L. monocytogenes*에 대한 유산의 최소발육억제농도는 pH 5.5에서 625 ppm이었으며, pH 6.0, 6.5, 7.0에서는 125 ppm이었다.
3. *E. coli* O157:H7에 대하여 과산화수소의 농도 75 ppm에서는 유산을 첨가하지 않아도 모두 발육 억제 되었으며, 과산화수소 50ppm에서는 유산 625ppm을 첨가하였을 때, 과산화수소 25 ppm에서는 유산 1250 ppm 첨가하였을 때, 과산화수소 12.5 ppm에서는 2500 ppm 첨가하였을 때 억제되었다. *S. Enteritidis*에 대하여 과산화수소의 농도 75 ppm에서는 유산을 첨가하지 않아도 모두 발육 억제 되었으며, 과산화수소의 농도 50 ppm에서는 유산 1250 ppm을 첨가하였을 때, 과산화수소 25 ppm에서는 유산 2500 ppm 첨가하였을 때 억제되었다. *L. monocytogenes*에 대하여 과산화수소의 농도 75 ppm에서는 유산을 첨가하지 않아도 모두 발육 억제 되었으며, 과산화수소의 농도 50 ppm에서는 유산 156 ppm을 첨가하였을 때, 과산화수소 25 ppm에서는 유산 312 ppm 첨가하였을 때 억제되었다.
4. 과산화수소와 유산 병용 처리시 최소발육억제농

도와의 상관관계를 구하기 위해 첨가한 유산의 농도를 X축, 과산화수소의 농도를 Y축으로 하여 비선형회귀모형을 구하였다 이 때 얻어진 Y 변수의 값을 역수 변환하여 직선의 회귀방정식을 구한 결과는 다음과 같다. *E. coli* O157:H7에 대한 최소발육억제농도에 필요한 과산화수소와 유산의 첨가량의 결정계수값은 $R^2=0.9984$, *S. Enteritidis*에 대한 최소발육억제농도에 필요한 과산화수소와 유산의 첨가량의 결정계수값은 $R^2=0.9935$, *L. monocytogenes*에 대한 최소발육억제농도에 필요한 과산화수소와 유산의 첨가량의 결정계수값은 $R^2=0.9283$ 으로 높은 상관관계를 나타내었으며, 상승효과가 확인되었다.

참고문헌

1. 이용욱, 박석기 : 시판 식물성 식품의 오염지표 세균의 분포 및 저장온도, 기간별 오염지표 세균의 변화, 한국식품위생안전성학회지, 14(1), 1-8, 1999.
2. N. V. Padhye and M. P. Doyle : *Escherichia coli* O157:H7 : Epidemiology, Pathogenesis, and Methods for Detection in Food. *J. Food Protection*, 55:555-565, 1992.
3. F. E. El-Gazzar and E. H. Marth : Salmonellae, Salmonellosis, and Dairy Foods : A Review. *J. Dairy Sci.*, 75:2327-2342, 1992.
4. E. M. Mikolajcik : Listeriosis-A food hazard about which we know little. *J. Cult. Dairy Prod.*, 21(4):28, 1986.
5. S. K. Tamminga, R. R. Beumer, and E. H. Kampelmacher : The Hygienic Quality of Vegetables Grown in or Imported into the Netherlands : a tentative survey, *J. Hyg*, 80:143-154, 1978.
6. L. Frezza, E. Tredici, F. Cananzi and A. Mauro : Incidence of Fecal Contamination in the Samples of Gicens and Vegetables Usually Eaten Uncooked, *Ann Sclavo*, 19:466-450, 1977.
7. G. L. Ercolani : Bacteriological Quality

- Assessment of Fresh Marketed Lettuce and Fennel, *Appl. Environ. Microbiol.*, 31:847-853, 1976.
8. R. Monge and M. L. Arias : Presence of Various Pathogenic Microorganisms in Fresh Vegetables in Costa Rica, *Arch Latinoam. Nutri.*, 46:292-294, 1996.
9. K. S. Venkitanarayanan, C. M. Lin, H. Bailey and M. P. Doyle : Inactivation of *E. coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* on Apples, Oranges, and Tomatoes by Lactic acid with Hydrogen Peroxide, *J. of Food Protection*, 65(1):100-105, 2002.
10. C. M. Lin, S. S. Moon, M. P. Doyle and K. H. Mcwatters : Inactivation of *E. coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis* Serotype Enteritidis, *Listeria monocytogenes* on Lettuce by Hydrogen Peroxide and Lactic acid and Hydrogen Peroxide with Mild Heat, *J. of Food Protection*, 65(8):1215-1220, 2002.
11. M. A. El-Shenawy and E. H. Marth : Inhibition and Inactivation of *Listeria monocytogenes* by sorbic acid. *J. of Food Protection*, 51:842, 1988..