

*Staphylococcus aureus*와 *Bacillus cereus*에 대한 유산과 과산화수소의 증식억제 효과

장재선[†] · 고종명* · 김용희*

가천길대학 보건행정과, *인천광역시 보건환경연구원

Inhibitory Effect of *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* by Lactic Acid and Hydrogen Peroxide

Jae Seon Jang[†] · Jong Myeong Go* · Yong Hee Kim*

Department of Health Administration, Gachongil College, Incheon

*Health and Environment Research Institute, Incheon

(Received March 1, 2005; Accepted April 1, 2005)

ABSTRACT

This study was performed to investigate inhibitory effect on growth of *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* in lactic acid, hydrogen peroxide and combination of lactic acid and hydrogen peroxide. The minimum inhibitory concentration (MIC) of lactic acid in *Staphylococcus aureus* were 2500 ppm at pH 7.0, 1250 ppm at pH 5.5, 6.0 and 6.5, while in *Bacillus cereus* 625 ppm at pH 5.5 and 6.0, 1250 ppm at pH 6.5 and 7.0, respectively. MICs of hydrogen peroxide in *Staphylococcus aureus* were 50 ppm at pH 6.0, 75 ppm at pH 6.5 and 7.0, while in *Bacillus cereus* was 75 ppm at pH 5.0, 5.5 and 6.0, respectively. MICs of combined treatment of lactic acid and hydrogen peroxide in *Staphylococcus aureus* were 1250 ppm of lactic acid with 25 ppm of hydrogen peroxide and 625 ppm of lactic acid with 50 ppm of hydrogen peroxide. When *Bacillus cereus* were with 1250 ppm of lactic acid with 50 ppm of hydrogen peroxide and 625 ppm of lactic acid with 75 ppm of hydrogen peroxide at 6.5. The correlations between MICs of lactic acid and hydrogen peroxide in *S. aureus* and *B. cereus* obtained through the coefficient of determination (R^2). R^2 value were 0.9934 and 0.9986, respectively. The inhibitory effect of lactic acid and hydrogen peroxide in *S. aureus* and *B. cereus* could be confirmed from the result of this experiment.

Keywords: *S. aureus*, *B. cereus*, lactic acid, hydrogen peroxide, MIC

I. 서 론

식품위생기술 및 의학의 발달에도 불구하고 전 세계적으로 식품으로 인한 질병이나 위해가 일어나고 있으며, 이러한 위해를 방지하고, 안전성을 확보하는 것은 식품위생상 가장 중요한 과제가 되고 있다.¹⁾

식품으로 인한 식중독원인균으로 포도상구균은 사람과 동물의 장관 및 피부 등에 분포하며, 식중독 이외에 화농성 염증, 표피박탈성 피부염 등의 원인이 된다. 이 균이 생산하는 대표적인 독소형으로 단백질독소인 장관독소(enterotoxin)는 열에 강하여 100°C에서 30분 정도

가열처리로는 거의 무독화되지 않고 섭취한 사람에서 급성위장장애를 일으킨다.²⁾ 또한 *Bacillus cereus*는 일반적으로 당근, 오이, 샐러드 등의 부패에 관여하는 식중독으로 섭취 후 어지러움, 위경련, 설사, 구토 등을 유발한다.³⁾

Martin과 Beelman⁴⁾은 재배된 지 얼마 안된 버섯을 환기 되지 않게 포장했을 경우 1~2일 내에 포도상구균이 증식되어 독소가 생성되어 식중독을 유발시킬 수 있는 균량에 도달할 수 있다고 보고 하였고, 이 등⁵⁾은 시판 식물성 식품에서의 오염지표 세균 분포를 조사한 결과 서류(감자, 고구마 등)에서 내열성세균 $3.3 \times 10^4/g$, 포도상구균 $2.7 \times 10^5/g$, 채소류에서 내열성세균 $7.6 \times 10^6/g$, 포도상구균 $1.1 \times 10^7/g$, 버섯류와 견과류에서는 내열성세균이 $1.6 \times 10^5/g$, $4.0 \times 10^2/g$ 으로 각각 검출되었다고 보고하였다. 식품의 안전성 확보에서 주로 채소류

[†]Corresponding author : Department of Health Administration, Gachongil College
Tel: 82-32-820-4223, Fax: 82-32-820-4220
E-mail : jsjang@gcg.ac.kr

는 열을 가하지 않고 생식하는 경우가 많으므로 식품에서의 이들 식중독 미생물에 대한 억제방안에 관한 많은 연구가 진행되고 있으며,^{6,7)} 특히 산의 첨가에 따른 세균을 저해한다고 연구 보고가 발표되고 있다.⁸⁾

본 연구는 *S. aureus*와 *B. cereus*에 대한 유산과 과산화수소의 단독 및 병용 처리함으로써 증식억제 효과와 새로운 식품위생처리공정 개발가능성을 연구하여 소비자에게 보다 안전한 식품을 제공함으로써 국민보건에 기여하고자 한다.

II. 연구방법

1. 실험 균주

본 실험에 사용한 균주로는 *S. aureus*는 ATCC 25923, *B. cereus*는 ATCC 14579를 사용하였다. 실험 균주는 1% peptone, 37% glycerol에 진하게 부유시킨 다음 -70°C에 동결 보존하면서 사용하였다.

2. 유산과 과산화수소의 실험용액의 조제

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

3. 균주 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 : 1.5×10⁹ CFU/ml)에 맞춘 후 이를 100 ml에 희석한 액을 표준 균액으로 사용하였다.

4. 실험균에 대한 유산과 과산화수소의 최소발육억제농도 실험

유산과 과산화수소를 일정 농도로 조제한 후 각 시험관에 Muller Hinton broth(Difco) 1.6 ml를 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 0.2 ml씩 각 시험관에 접종하여 균 초기농도를 10⁶ CFU/ml로 조정하였다. 시험관을 진탕 배양기에 넣고 100 rpm으로 37°C에서 48시간 동안 진탕 배양한 후 균의 증식 유무를 세균이 증식하지 않은 최저 발육억제농도를 결정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 유산과 과산화수소의 단독처리시 최소발육억제농도(MIC)

*S. aureus*에 대한 유산의 최소발육억제농도에 관한 결과는 Table 1과 같은데 pH 7.0에서 2500 ppm에서 발육이 억제되었으며, pH 5.5, 6.0, 6.5에서는 유산의 최대허용한계량인 1250 ppm에서도 발육이 억제되지 않았다. *B. cereus*에 대한 유산의 최소발육억제농도에 관한 결과는 Table 2와 같은데 pH 5.5, 6.0에서는 625 ppm에서 발육이 억제되었으며, pH 6.5, 7.0에서는 1250 ppm에서 발육이 억제되었다. pH 5.0에서는 모든 실험균에서 발육이 억제된 것으로 나타났다.

*S. aureus*와 *B. cereus*에 대한 과산화수소의 최소발육억제농도에 관한 결과는 Table 3, 4와 같다. *S. aureus*의 경우 pH 6.0에서는 50 ppm이었으며, pH 6.5 및 7.0에서 75 ppm이었으며, pH 5.0 및 5.5에서는 과산화수소의 농도 실험군에서 발육이 억제되었다. *B. cereus*의 경우 pH 5.0, 5.5, 6.0에서 75 ppm이었으며, pH 6.5, 7.0에서는 100 ppm에서도 억제되지 않았다.

Table 1. Minimum inhibitory concentration of lactic acid in *Staphylococcus aureus*

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

+: growth, -: no growth.

Table 2. Minimum inhibitory concentration of lactic acid in *Bacillus cereus*

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

+: growth, -: no growth.

Table 3. Minimum inhibitory concentration of hydrogen peroxide in *Staphylococcus aureus*

pH	Concentration of hydrogen peroxide in <i>Staphylococcus aureus</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 hydrogen peroxide in *Bacillus cereus*

pH	Concentration of hydrogen peroxide in <i>Bacillus cereus</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.

Venkitanaryanan 등⁹⁾은 사과, 오렌지, 토마토를 대상으로 *E. coli* O157:H7, *S. Enteritidis*, *L. monocytogenes* 이 유산과 과산화수소 혼합용액에서 40°C에서 15분간 처리할 때 균 증식이 억제되었다고 보고하였고, Lin 등¹⁰⁾과 장 등¹¹⁾도 식중독균인 *E. coli* O157:H7, *S. Enteritidis*, and *L. monocytogenes*을 대상으로 유산과 과산화수소를 단독 및 병용 처리시 증식 억제효과가 있었다고 보고한 바 있다. 이에 본 실험 결과 *S. aureus* 와 *B. cereus*도 유산과 과산화수소의 처리로 발육억제 효과가 있는 것으로 판명되었다.

2. 유산과 과산화수소의 병용처리시 최소발육억제농도

*S. aureus*와 *B. cereus*에 대한 유산과 과산화수소의 병용처리시 최소발육억제농도(MIC)에 관한 결과는 Table 5와 6과 같다. pH 6.5에서 유산의 농도 0~2500

Table 5. Minimum inhibitory concentration of combined lactic acid and hydrogen peroxide in *Staphylococcus aureus*

Conc. of H ₂ O ₂ (ppm)	Conc. of lactic acid (ppm)					
	0	156	312	625	1250	2500
0	+++	+++	+++	+++	-	-
12.5	+++	+++	+++	+++	-	-
25	+++	+++	+++	+++	-	-
50	+++	+++	+++	-	-	-
75	-	-	-	-	-	-
100	-	-	-	-	-	-

+: growth, -: no growth.

ppm과 과산화수소의 농도 0~100 ppm에서 다양한 변화를 나타내었다.

Table 6. Minimum inhibitory concentration of combined lactic acid and hydrogen peroxide in *Bacillus cereus*

Conc. of H ₂ O ₂ (ppm)	Conc. of lactic acid (ppm)					
	0	156	312	625	1250	2500
0	+++	+++	+++	+++	-	-
12.5	+++	+++	+++	+++	-	-
25	+++	+++	+++	+++	-	-
50	+++	+++	+++	+++	-	-
75	+++	+++	+++	-	-	-
100	-	-	-	-	-	-

+: growth, -: no growth.

*S. aureus*에 대하여 과산화수소의 농도 75 ppm과 100 ppm에서는 유산을 첨가하지 않아도 모두 발육 억제 되었으며, 과산화수소 50 ppm과 유산 625 ppm을 첨가하였을 때, 과산화수소 25 ppm과 12.5 ppm에서는 유산 1250 ppm 첨가하였을 때 억제되었다. *B. cereus*에 대하여 과산화수소의 농도 100 ppm에서는 유산을 첨가하지 않아도 모두 발육 억제 되었으며, 과산화수소의 농도 75 ppm과 유산 625 ppm을 첨가하였을 때, 과산화수소 50 ppm 이하에서는 유산 1250 ppm 첨가하였을 때 모두 억제되었다.

식중독균에 대한 생육저해물질에 대한 많은 연구가 진행되어 초산, 구연산, 젖산의 첨가에 따른 생육 저해 효과를 발표하였고,¹²⁾ sodium benzoate, sorbic acid, hydrogen peroxide 등 일반적으로 세균을 저해한다고 보고하여¹³⁻¹⁵⁾ 본 실험 결과 과산화수소와 유산이 식중독세균 증식 억제에 효과가 있는 것은 판명되었다.

3. 유산과 과산화수소의 병용처리시 최소발육억제농도와의 상관관계

유산과 과산화수소 병용 처리시 최소발육억제농도와 의 상관관계를 구하기 위해 첨가한 유산의 농도를 X

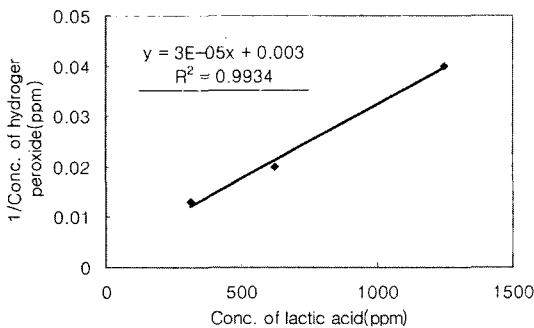


Fig. 1. Correlation between lactic acid and hydrogen peroxide in *Staphylococcus aureus*.

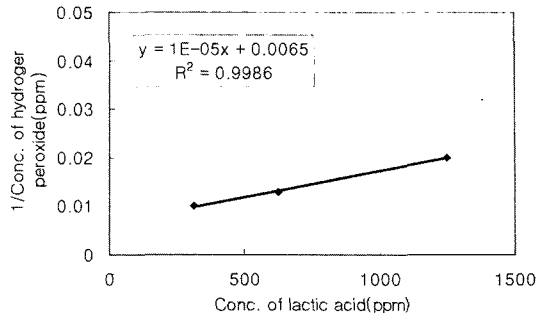


Fig. 2. Correlation between lactic acid and hydrogen peroxide in *Bacillus cereus*.

축, 과산화수소의 농도를 Y축으로 하여 비선형회귀모형을 구하였다 이 때 얻어진 Y 변수의 값을 역수 변환하여 직선의 회귀방정식을 구한 결과는 Fig. 1, 2와 같다. *S. aureus*에 대한 최소발육억제농도에 필요한 유산과 과산화수소 첨가량의 결정계수값은 R²=0.9934, *B. cereus*에 대한 최소발육억제농도에 필요한 유산과 과산화수소 첨가량의 결정계수값은 R²=0.9986으로 높은 상관관계를 나타내었으며, 상승효과가 확인되었다.

IV. 결 론

유산과 과산화수소를 단독 또는 병용 처리하여 그람 양성 식중독 원인균인 *S. aureus*와 *B. cereus*의 증식 억제효과에 대해 실험한 결과는 다음과 같았다.

1. 유산에 대한 *Staphylococcus aureus*의 최소발육억제농도는 pH 7.0에서 2500 ppm에서 발육이 억제되었으며, pH 5.5, 6.0, 6.5에서는 유산의 최대허용한계량인 1250 ppm도 발육이 억제되지 않았다. *B. cereus*의 최소발육억제농도는 pH 5.5, 6.0에서는 625 ppm에서 발육이 억제되었으며, pH 6.5, 7.0에서는 1250 ppm에서 발육이 억제되었다.

2. 과산화수소에 대한 *S. aureus*의 최소발육억제농도는 pH 6.0에서는 50 ppm이었으며, pH 6.5, 7.0에서 75 ppm이었으며, pH 5.0 및 5.5에서는 과산화수소의 농도에 영향을 받지 않았다. *B. cereus*의 최소발육억제농도는 pH 5.0, 5.5, 6.0에서 75 ppm이었으며, pH 6.5, 7.0에서는 100 ppm에서도 억제되지 않았다.

3. *S. aureus*에 대하여 과산화수소의 농도 75, 100 ppm에서는 유산을 첨가하지 않아도 모두 발육 억제 되었으며, 과산화수소 50 ppm에서는 유산 625 ppm을 첨가하였을 때, 과산화수소 25, 12.5 ppm에서는 유산 1250 ppm 첨가하였을 때 억제되었다. *B. cereus*에 대하여 과산화수소의 농도 100 ppm에서는 유산을 첨가

하지 않아도 모두 발육 억제 되었으며, 과산화수소의 농도 75 ppm에서는 유산 625 ppm을 첨가하였을 때, 과산화수소 50 ppm 이하에서 유산 1250 ppm 첨가하였을 때 모두 억제되었다.

4. 유산과 과산화수소 병용 처리시 최소발육억제농도와의 상관관계를 구한 결과 *S. aureus*에 대한 최소발육억제농도에 필요한 유산과 과산화수소 첨가량의 결정계수값은 $R^2=0.9934$, *B. cereus*에 대한 최소발육억제농도에 필요한 유산과 과산화수소 첨가량의 결정계수값은 $R^2=0.9986$ 으로 나타났다.

참고문헌

- 김종규 : 포장마차 음식의 위생실태 조사연구. 한국환경위생학회지, **27**(4), 107-114, 2001.
- 유영균, 이신호, 이한기, 전세열 : 식품위생학, 대학서림, 2002.
- 황철성, 박형기, 유제형, 한석현, 문윤희 : 축산제조학, 선진문화사, 2000.
- Martin, S. T. and Beelman, R. B. : Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* in fresh packed mushrooms. *J. Food Protection*, **59**, 819-826, 1996.
- 이용욱, 박석기 : 시판 식물성 식품의 오염지표세균의 분포 및 저장온도, 기간별 오염지표 세균의 변화. 한국식품위생안전성학회지, **14**(1), 1-8, 1999.
- 마혜영, 최종학, 이종삼 : *E. coli*의 인지질 및 지방산 대사, 여러 금속화합물의 효과에 관하여. 한국환경위생학회지, **22**(2), 114-123, 1996.
- 이소연, 윤효숙, 최원창, 이종삼 : *E. coli*와 *B. subtilis*의 당지질 생합성과 지방산 조성에 미치는 금속화합물의 효과. 한국환경위생학회지, **23**(2), 12-23, 1997.
- Dahiya, R. S. and Speck, M. L. : Hydrogen peroxide formation by lactobacilla and its effect on *Staphylococcus aureus*. *J. Dairy Sci.*, **51**, 1568-1572, 1968.
- Venkitanarayanan, K. S., Lin, C. M., Bailey, H. and Doyle, M. P. : Inactivation of *E. coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* on apples, oranges, and tomatoes by lactic acid with hydrogen peroxide. *J. Food Protection*, **65**(1), 100-105, 2002.
- Lin, C. M., Moon, S. S., Doyle, M. P. and Mcwaters, 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. *J. Food Protection*, **65**(8), 1215-1220, 2002.
- 장재선, 이미연, 이제만, 김용희 : 과산화수소와 유산이 *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Enteritidis 및 *Listeria monocytogenes*의 증식 억제에 미치는 영향. 대한위생학회지, **19**(4), 69-75, 2004.
- Hamad, N. and Marth, E. H. : Behavior of *Listeria monocytogenes* at 7, 13, 25 and 35°C in tryptose broth acidified with acetic, citric or lactic acid. *J. Food Protection*, **52**, 688-693, 1989.
- Dominguez, L., Garayazabal, J. F., Ferri, E. R., Vazquez, J. A., GomezLucia, E., Ambrosio, C. and Suarez, G. : Viability of *Listeria monocytogenes* in milk treated with hydrogen peroxide. *J. Food Protection*, **50**, 636-640, 1987.
- De Vuyst, L. and Vandamme, E. J. : Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. In *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*. Chapman & Hall Inc., New York, 91-142, 1994.
- Rubin, H. E., Nerad, T. and Vaughan, F. : Lactate acid inhibition of *Salmonella typhimurium* in yogurt. *J. Dairy Sci.*, **65**, 197-203, 1982.