

## 인천연안 *Vibrio parahaemolyticus*의 분포 및 유산과 과산화수소 처리에 의한 항균효과

장재선<sup>†</sup>·조우균·이혜정·이제만\*·김혜영\*·김용희\*

가천의과학대학교 식품영양학과, \* 인천광역시 보건환경연구원

## Antimicrobial Effect of Lactic acid and Hydrogen Peroxide and Distribution of *Vibrio parahaemolyticus* from the Incheon Adjacent Sea

Jae-Seon Jang<sup>†</sup>·Woo-Kyoum Cho·Hye-Jeong Lee·Jea-Mann Lee\*·Hye-Yong Kim\*·Yong-Hee Kim\*

Dept. of Food & Nutrition, Gachon University of Medicine and Science

\* Health and Environment Research Institute, Incheon

### Abstract

This study was carried out to investigate the distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in the Incheon adjacent sea, and antimicrobial effect on growth of *Vibrio parahaemolyticus* in lactic acid and hydrogen peroxide and combination of lactic acid and hydrogen peroxide. The detected strains were compared geographical, months and sample types. The distribution of *Vibrio parahaemolyticus* was high at Ganghwa county with 66.1%(336 samples), on 7-9 months with 72.4%(386 samples) and from tireland with 75.0%(90 samples), respectively. The minimum inhibitory concentration (MIC) of lactic acid in *Vibrio parahaemolyticus* were 1250 ppm at pH 6.5 and 7.0, 625 ppm at pH 6.0, respectively. The minimum inhibitory concentration (MIC) of hydrogen peroxide in *Vibrio parahaemolyticus* were 25 ppm at pH 6.5 and 7.0, 12.5 ppm at pH 6.0, respectively. MICs of combined treatment of lactic acid and hydrogen peroxide in *Vibrio parahaemolyticus* were 625 ppm of lactic acid with 12.5 ppm of hydrogen peroxide. The correlations between MICs of lactic acid and hydrogen peroxide in *Vibrio parahaemolyticus* were obtained through the coefficient of determination( $R^2$ ).  $R^2$  value were 1.0000. The antimicrobial effect of lactic acid and hydrogen peroxide in *Vibrio parahaemolyticus* could be confirmed from the result of this experiment.

**Key words** : *Vibrio parahaemolyticus*, lactic acid, hydrogen peroxide, MIC

<sup>†</sup>Corresponding author E-mail : jsjang@gachon.ac.kr

## I. 서론

전 세계적으로 식품으로 인한 질병이나 위해가 일어나고 있는데 식품위생기술 및 의학의 발달에도 불구하고 위해를 방지하고 안전성을 확보하는 것은 식품위생상 가장 중요한 과제가 되고 있다<sup>1)</sup>.

*Vibrio parahaemolyticus*는 장염 비브리오 식중독을 일으키는 원인균으로써 해수에서 서식하는 세균으로 3-5% 농도의 식염에서도 잘 자라는데, 장염 비브리오 식중독의 주원인은 불충분하게 가열되었거나 익히지 않은 해산물, 적절하게 조리된 후에 오염된 해산물의 섭취로 인한 것으로 그 중에서도 특히 새우, 게, 굴과 바다가재 등이 주요 식품군에 속한다. 해산물을 날 것으로 즐겨 먹는 일본, 대만 등에서는 이것이 유행성 위장염의 주요 원인균이 되고 있다고 보고하고 있다<sup>2)</sup>. 병원성 비브리오균은 우리나라 연안에서 해수 및 어패류에서 빈번하게 검출되고 있고, 매년 여름철에는 이러한 세균에 의한 식중독 사고가 발생하고 있다<sup>3)</sup>. 2005년 우리나라 식중독 발생 건수에서 세균에 의한 식중독 중 장염 비브리오로 인한 식중독이 15.6%를 차지하였는데 그 중요한 원인식품은 어패류와 그 가공품이라고 보고하고 있다<sup>4)</sup>.

초산, 구연산, 젖산의 첨가에 따른 식중독균에 대한 생육저해물질에 관한 많은 연구가 진행되어 있으며<sup>5)</sup>, sodium benzoate, sorbic acid, hydrogen peroxide 등 일반적으로 세균을 저해한다고 보고<sup>6-8)</sup> 있고, 장등<sup>9)</sup>은 식중독균에 대한 과산화수소와 유산을 단독 및 병용 처리할 때 균 증식 억제효과가 있다고 보고하고 있다.

그리하여 본 연구에서는 *Vibrio parahaemolyticus*에 의한 식중독 예방의 일환으로 인천연안 지역에서 *Vibrio parahaemolyticus*의 분포상태를 조사하고, 아울러 유산과 과산화수소의 단독 및 병용 처리함으로써 *Vibrio parahaemolyticus*의

증식 억제효과를 연구하여 소비자에게 보다 안전한 식품을 제공함으로써 국민보건에 기여하고자 한다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시료 채취

본 실험에서 *Vibrio parahaemolyticus*의 분포조사를 위한 시료의 채취는 2005년 인천지역, 강화군, 옹진군의 3개 지역을 선정하여 해수, 갯벌 및 어패류를 대상으로 장소별, 분기별로 각각 시료를 채취하여 시험하였다.

### 2. *Vibrio parahaemolyticus* 균의 분리·동정

*Vibrio parahaemolyticus* 분리를 위해 채취한 시료 중 해수는 연안 3개 지역에서 멸균병에 1L를 채취하여 냉장상태로 실험실에 운반하여 Millipore filter system(pore size 0.45mm)로 여과한 여과지를 3% NaCl alkaline peptone water(3% NaCl APW, pH 8.4) 100ml에 넣고 35°C, 16-18시간 증균 배양하였으며, 어패류 및 갯벌은 멸균병에 100g씩 채취하여 냉장상태로 실험실에 운반한 후 마쇄하여 해수의 시험방법과 같이 증균 배양하였다. 증균 배양 시킨 배양액으로부터 백금선을 사용하여 TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose) Agar에 획선을 도말한 후 35°C, 18-24시간 배양한 다음 sucrose를 분해하지 않는 전형적인 녹색 집락을 선택하고, 감별배지인 KIA(Klingler Iron Agar)에 접종하여 35°C, 18-24시간 배양한 후 K/A(Alkaline Slant/Acid butt)성상과 Gas(-), H<sub>2</sub>S(-)인 *Vibrio*속 균을 분리하였다. API 20E kit(analytical profile index, France)를 사용하여 생화학적 특성을 조사하고 아울러 K항원진단용혈청(Denka Seiken Co.)으로 slide 응집반응을 실시하여 생리식염수에 응집반응을 일으키는 것과 K항원 혈청에 응집

되지 않는 것은 제외하여 최종 *Vibrio parahaemolyticus*으로 동정하였다.

### 3. 유산과 과산화수소 처리에 의한 항균실험

#### 3.1 실험 균주

본 실험에 사용한 균주는 인천연안에서 분리한 *Vibrio parahaemolyticus*를 사용하였다. 실험 균주는 1% peptone, 37% glycerol에 진하게 부유시킨 다음 -70°C에 동결 보존하면서 사용하였다.

#### 3.2 유산과 과산화수소 실험용액의 조제

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

#### 3.3 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 + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 99.5ml : 1.5×10<sup>9</sup> CFU/ml)에 맞춘 후 이를 100ml에 희석한 액을 표준 균액으로 사용하였다.

#### 3.4 실험균에 대한 과산화수소와 유산의 최소발육억제농도 실험

유산과 과산화수소를 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<sup>6</sup> CFU/ml로

조정하였다. 시험관을 진탕 배양기에 넣고 100rpm으로 37°C에서 48시간 동안 진탕 배양한 후 균의 증식 유무를 세균이 증식하지 않은 최저 발육억제농도를 결정하였다.

#### 3.5 pH 변화에 따른 실험균의 증식 양상 실험

유산과 과산화수소의 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. *Vibrio parahaemolyticus*의 분포

2005년 1년간 인천지역, 강화군, 옹진군의 3개 지점에서 채집한 해수 300건, 갯벌 120건, 어패류 1,112건에 대한 *Vibrio parahaemolyticus*의 분포는 Table 1, 2, 3과 같은데 *Vibrio parahaemolyticus*의 검출종류별 분포는 총 1,532건을 실험한 결과 해수에서 300건 중 181건(60.3%), 갯벌과 어패류는 각각 120건 중 90건(75.0%), 1,112건 중 568건(51.1%)이 검출되었으며, 검체장소별 분포를 살펴보면 인천지역에서 979건 중 483건(49.3%), 강화군 508건 중 336건(66.1%), 옹진군 45건 중 20건(44.4%)이 검출되었으며, 분기별로 *Vibrio parahaemolyticus*의 분포현황을 살펴보면 1-3월에 200건 중 25건(12.5%), 4-6월에 429건 중 176건(41.0%), 7-9월에 533건 중 386건(72.4%), 10-12월에 370건 중 252건(68.1%)이 검출된 바 특히 7-9월에 가장 높은 검출율을 나타내고 있다. 강등<sup>10)</sup>은 분리균을 대상으로 지역별, 월별, 검체별 분포상황을 조사한 결과 월별은 7월, 검체별로는 해수에서 가장 높은 분포율을 나타내고 있어 이에 본 실험 결과와 유사한 경향을 나타내었다.

Table 1. Distribution of *Vibrio parahaemolyticus* by sampling type

	Seawaters	Tideland	Shellfishes
No. of sample	300	120	1,112
No. of detected	181	90	568
Detection Rate(%)	60.3	75.0	51.1

Table 2. Distribution of *Vibrio parahaemolyticus* by sampling station

	Incheon area	Ganghwa county	Ongjin county
No. of sample	979	508	45
No. of detected	483	336	20
Detection Rate(%)	49.3	66.1	44.4

Table 3. Distribution of *Vibrio parahaemolyticus* by sampling periods

	1-3 months	4-6 months	7-9 months	10-12 months
No. of sample	200	429	533	370
No. of detected	25	176	386	252
Detection Rate(%)	12.5	41.0	72.4	68.1

## 2. *Vibrio parahaemolyticus*에 대한 유산과 과산화수소의 최소발육억제농도

*Vibrio parahaemolyticus*에 대한 유산의 최소발육억제농도(MIC)에 관한 결과는 Table 4과 같은데 *Vibrio parahaemolyticus*에 대한 유산의 최소발육억제농도는 pH 6.5 및 7.0에서 1250 ppm에서 발육이 억제되었으며, pH 6.0에서는 유산의 최소허용한계량인 625ppm에서도 발육이 억제되지 않았다. pH 5.0, 5.5에서는 모든 실험군에서 발육이 억제된 것으로 나타났다.

*Vibrio parahaemolyticus*에 대한 과산화수소의 최소발육억제농도(MIC)에 관한 결과는 Table 5와 같다. *Vibrio parahaemolyticus*에 대한 과산화수소의 최소발육억제농도는 pH 6.5, 7.0에서 25 ppm에서 발육이 억제되었으며, pH 6.0에서는 과산화수

소의 최대허용한계량인 12.5 ppm도 발육이 억제되지 않았다. pH 5.0, 5.5에서는 모든 실험군에서 발육이 억제된 것으로 나타났다.

김 등<sup>11)</sup>은 0.1M 빙초산과 유산 함유배지에서 60분간 배양 후 생균수가 급격히 감소를 나타내어, 유기산의 농도가 높아질수록 사멸되는 정도가 증가 된다고 보고한 바 있어 본 실험 결과 유산과 과산화수소가 식중독 세균 증식 억제에 효과가 있는 것은 판명되었다. 초산과 유산은 대표적인 유기산으로서 과실류에 다량 함유되어 있는데 특히 귤이나 레몬 등에서는 0.1내지 0.3M 정도 포함되어 있다. 따라서 식중독의 원인 식품이 되는 어패류에 귤이나 레몬 등을 곁들여 먹을 시 pH 저하에 따른 본 균의 사멸에 상당한 영향을 줄 것으로 사료된다.

Table 4. Minimum inhibitory concentration of lactic acid in *Vibrio parahaemolyticus*

pH	Concentration of lactic acid in <i>Vibrio parahaemolyticus</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 5. Minimum inhibitory concentration of hydrogen peroxide in *Vibrio parahaemolyticus*

pH	Concentration of hydrogen peroxide in <i>Vibrio parahaemolyticus</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.

### 3. 유산과 과산화수소의 병용 처리시 최소 발육억제농도

*Vibrio parahaemolyticus*에 대한 유산과 과산화수소의 병용 처리시 최소발육억제농도(MIC)에 관한 결과는 Table 6과 같다. pH 6.5에서 유산의 농도 0-2500ppm 및 과산화수소의 농도 0-75ppm에서 다양한 변화를 나타내었다.

*Vibrio parahaemolyticus*에 대하여 과

산화수소의 농도 25 ppm 이상에서는 유산을 첨가하지 않아도 모두 발육 억제 되었으며, 과산화수소의 농도 12.5 ppm이하에서는 유산 625 ppm을 첨가하였을 때 억제 되었다. Lin 등<sup>12)</sup> 과 장 등<sup>13)</sup>도 식중독균에 대한 과산화수소와 유산의 병용처리가 식중독균의 증식억제 효과가 있었다고 보고한 바 있어 이에 본 실험 결과와 유사한 경향을 나타내었다.

Table 6. Minimum inhibitory concentration of combined lactic acid and hydrogen peroxide in *Vibrio parahaemolyticus*

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

+ : growth, - : no growth.

4. 유산과 과산화수소의 병용 처리시 최소발육억제농도와외 상관관계

유산과 과산화수소 병용 처리시 최소발육억제농도와외 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. 1과 같다. *Vibrio parahaemolyticus*에 대한 최소발육억제농도에 필요한 유산과 과산화수소의 첨가량의 결정계수값은 R<sup>2</sup>=1.000으로 높은 상관관계를 나타내었다. 장 등<sup>9, 13)</sup>은 식중독균인 *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Enteritidis, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*에 대한 최소발육억제농도에 필요한 유산과 과산화수소의 첨가량의 결정계수값을 구한 결과 각각 0.9984, 0.9935, 0.9283, 0.9934, 0.9986 있었다고 보고한 바 있어 이에 본 실험 결과와 유사한 경향을 나타내어 식중독균의 발육억제에 유산과 과산화수소의 병용처리가 상승효과를 나타내는 것으로 확인되었다.

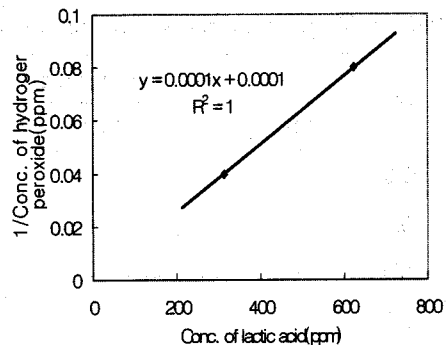


Fig. 1. Correlation between lactic acid and hydrogen peroxide in *Vibrio parahaemolyticus*

IV. 결론

본 연구에서는 *Vibrio parahaemolyticus*에 의한 식중독 예방의 일환으로 인천연안 지역에서 *Vibrio parahaemolyticus*의 분포 상태를 조사하고, 유산과 과산화수소의 단독 및 병용 처리함으로써 *Vibrio parahaemolyticus*의 증식 억제효과를 실험한 결과는 다음과 같았다.

1. 검체종류별 *Vibrio parahaemolyticus*의 분포현황은 해수에 181건(60.3%), 갯벌과 어패류는 각각 90건(75.0%),

568(51.1%)의 검출을 하였으며, 검체장소별 *Vibrio parahaemolyticus*의 분포를 살펴보면 인천지역에서 483건(49.3%), 강화군 336건(66.1%), 옹진군 20건(44.4%)이 검출되었으며, 분기별로 *Vibrio parahaemolyticus*의 분포현황을 살펴보면 1-3월에 25건(12.5%), 4-6월에 176건(41.0%), 7-9월에 386건(72.4%), 10-12월에 252건(68.1%)으로 나타났다.

2. *Vibrio parahaemolyticus*에 대한 유산의 최소발육억제농도는 pH 6.5 및 7.0에서 1250 ppm에서 발육이 억제되었으며, pH 6.0에서는 유산의 최소허용한계량인 625ppm에서도 발육이 억제되지 않았다. pH5.0, 5.5에서는 모든 실험군에서 발육이 억제된 것으로 나타났다. *Vibrio parahaemolyticus*에 대한 과산화수소의 최소발육억제농도는 pH 6.5, 7.0에서 25 ppm에서 발육이 억제되었으며, pH 6.0에서는 과산화수소의 최대허용한계량인 12.5 ppm도 발육이 억제되지 않았다. pH5.0, 5.5에서는 모든 실험군에서 발육이 억제된 것으로 나타났다.
3. *Vibrio parahaemolyticus*에 대한 유산과 과산화수소의 병용 처리시 최소발육억제농도(MIC)에 관한 결과 과산화수소의 농도 25 ppm 이상에서는 유산을 첨가하지 않아도 모두 발육 억제 되었으며, 과산화수소의 농도 12.5 ppm이하에서는 유산 625 ppm을 첨가하였을 때 억제되었다.
4. 유산과 과산화수소 병용 처리시 최소발육억제농도와 상관계수를 구한 결과, *Vibrio parahaemolyticus*에 대한 최소발육억제농도에 필요한 유산과 과산화수소의 첨가량의 결정계수값은  $R^2=1.000$ 으로 높은 상관계수를 나타내었으며, 상승

효과가 확인되었다.

## 참고문헌

1. 이한기, 이신호, 유영균, 장재선 : 식품 위생학, 대학서림, 2005.
2. A. Chiou, and S. K. Chen : Foodborne illness in Taiwan, *Food Aust.*, 43:70-71, 1990.
3. H. C. Yang, S. S. Hong, K. H. Kim, S. H. Chi and H. J. Chung : Distribution of *Vibrio vulnificus* in Chonnam coastal area, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 27: 70-74, 1999.
4. 보건복지부, 보건복지통계연보, 2006.
5. N. Hamad, and E. H. Marth : 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.
6. L. Dominguez, J. F. Garayazabal, E. R. Ferri, J. A. Vazquez, E. Gomezluca, C. Ambrosio, and G. Suarez : Viability of *Listeria monocytogenes* in milk treated with hydrogen peroxide. *J. Food Protection*, 50:636-640, 1987.
7. L. De Vuyst and E. J. Vandamme : Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. In *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*. Chapman & Hall Inc., New York, 91-142, 1994.
8. H. E. Rubin, T. Nerad and F. Vaughan : Lactate acid inhibition of *Salmonella typhimurium* in yogurt. *J. Dairy Sci.* 65, 197-203, 1982.
9. 장재선, 이미연, 이계만, 김용희 : 과산화수소와 유산이 *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Enteritidis 및 *Listeria monocytogenes*의 증식 억제에 미치는 영향, 대한위생학회지 19(4), 69-75, 2004.

10. 강동훈, 전상수, 정덕화, 조성환 : 남해안연안에 분포되어 있는 *Vibrio parahaemolyticus*의 성장 및 Grapefruit Seed Extract 처리에 의한 항균효과, *J. food Hyg. Safety* 9(3), 141-149, 1994.
11. 김상철, 김두희, 박순우 : *Vibrio parahaemolyticus*의 환경인자에 대한 저항성, *Korean J. of Preventive Medicine*, 21:183-194, 1988.
12. C. M. Lin, S. S. Moon, M. P. Doyle and K. H. Mcwatters : 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. of Food Protection*, 65(8):1215-1220, 2002.
13. 장재선, 고종명, 김용희 : *Staphylococcus aureus*와 *Bacillus cereus*에 대한 유산과 과산화수소의 증식 억제에 미치는 영향, *한국환경보전학회지*, 31(2), 115-119, 2005.