

## 부패하는 두부로부터 미생물의 분리·동정 및 특성조사

주길재, 허상선, 최용희\*, 이인구\*\*  
경북대학교 농업과학기술연구소, \*경북대학교 식품공학과, \*\*농화학과

### Characterization and Identification of Bacteria from Putrefying Soybean Curd

Gil-Jae Joo, Sang-Sun Hur, Yong-Hee Choi\* and In-Koo Rhee\*\*

Institute of Agriculture Science and Technology, \*Dept. of Food Science and Technology,  
\*\*Dept. of Agricultural Chemistry, Kyungpook National University

#### Abstract

The isolates from putrefying soybean curd were identified as *Acinetobacter calcoaceticus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus* sp., *Cardiobacterium* sp., *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pantoea* sp., *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Xenorhabdus luminescens*, *Yersinia* sp.. The existence percentages of the bacteria from putrefying soybean curd at room temperature storage were *Bacillus cereus* J55 23.37%, *Xenorhabdus luminescens* J48 22.73%, *Acinetobacter calcoaceticus* J61 22.26%, *Klebsiella pneumoniae* J62 21.25%, *Salmonella typhimurium* J51 2.87%, *Pantoea* sp. J57 2.65%, *Bacillus* sp. J58 1.43%, *Cardiobacterium* sp. J54 1.26%, *Escherichia coli* J53 1.20%, *Staphylococcus aureus* J60 0.93%, *Yersinia* sp. J50 0.05%, respectively. Four out of eleven bacteria as *B. cereus* J55, *X. luminescens* J48, *Ac. calcoaceticus* J61, *Kl. pneumoniae* J62 putrefied soybean curd and those bacteria produce amylase or proteinase as a extracellular enzyme. But *S. typhimurium* J51, *Pantoea* sp. J57, *Bacillus* sp. J58, *Cardiobacterium* sp. J54, *E. coli* J53, *St. aureus* J60, *Yersinia* sp. J50 were not putrefied soybean curd. The isolates detected to resistant on various antimicrobial agents. The majority were resistant to aminocyclitol antibiotics as ampicillin, gentamicin, tobramycin and were susceptible to  $\beta$ -lactamine antibiotics as penicillin G, oxacillin, cephalothin, cefazolin, cefamandole.

**Key words** : Soybean curd, putrefying bacteria, antibiotics resistance

#### 서론

두부는 대두의 수용성 단백질을 추출 응고시킨 것으로 영양가와 소화율이 높으며(1) 가격이 저렴한 고단백 전통식품이지만 높은 수분함량 때문에 상온에서 보존성이 극히 불량하여 생산 즉시 공급되어 소비되는 식품이다. 양질의 고단백식품인 두부가 쉽게 변질이 된다는 것은 제조과정과 유통과정 및 판매과정 등의 조건이 불량한데 그 원인이 있으므로 실제 두부

제조업에서도 여름철에는 하루 2회씩 생산하여 공급하고 있는 실정이다. 이러한 두부의 유통기한은 4~10월에 24시간, 11~3월은 48시간, 0~10℃ 냉장에서는 3일을 권장(2)하고 있으며, 일본의 경우 보통 생균수가 g당 100,000 이하를 지도 기준(3)으로 삼고 있다(4).

두부의 변질을 보면 30℃에서 15~20시간 후 부패취가 나고(5, 6) 균수는 초기 10<sup>4</sup>에서 10<sup>7</sup>까지 증가(7)하며 온도가 낮아지면 균수의 증가가 크게 둔화(8, 7)되면서 shelf-life가 연장되는 현상을 나타내며(4), 주로 유통과정 중에 미생물에 의해 변질되는 것으로 보고(9)되고 있다.

두부 부패균으로는 호기성 gram 음성 구균인

Corresponding author : Gil-Jae Joo, Institute of Agric. Sci. and Technol., Kyungpook Natl. Univ. Taegu, 702-701, Korea

*Acinetobacter* 속(4, 9), 그람 음성 간균인 *Klebsiella* 속(4) 등이 보고되었으며, 이들 미생물들은 두부 부패 뿐만아니라 폐렴, 패혈증 등의 질병을 유발하는 병원 미생물로도 알려져 있다.

따라서 본 연구에서는 두부의 저장성을 증대하기 위한 기초실험의 일환으로 먼저 두부 부패에 관여하는 미생물을 분리하여 동정하였으며, 두부의 부패가 진행됨에 따라 이들 미생물의 성장 및 효소생성과 항생제 내성 등의 특성을 조사하였기에 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 미생물의 분리 및 총균수 측정

시료로 사용한 두부는 제조직후의 신선한 것을 구입한 후 가로·세로·높이 3cm 되게 절단하고 살균된 증류수가 300ml 들어 있는 1ℓ 비이크에 절단한 두부를 10개씩 넣어 침지하여 알루미늄 호일 또는 wrap으로 덮은 후 37℃ 배양기에 넣어 0, 2, 4, 8, 10 일 동안 보관하여 그 침지액을 균원시료로 사용하였다. 상기 균원시료 침지액 1ml를 0.85% NaCl 용액으로 생균수 10<sup>3</sup>-10<sup>7</sup>배 까지 희석한 다음, Nutrient agar 배지 (NA), Luria Broth 배지 (LB) 및 Tryptic soy agar (TSBA, BBL #11768) 배지에 각각 0.1ml씩 도말하여 37℃로 2일간 배양하여 각각의 colony의 형태 및 색깔 등으로 분류하여 각기 다른 colony를 확보하고 현미경으로 형태상 순수성을 확인한 후 시험균주로 사용하였다.

총균수 측정은 상기방법에 따라 균원시료 0.1ml를 NA에 도말하고 배양하여 ml당 colony를 계수한 것과 총균수를 측정하는 kit인 3M사의 paper(3M Petrifilm™ plate)를 이용하여 계수한 것과 현미경하에서 hemacytometer로 계수한 것 등 3가지 계수의 평균 값으로 하였으며 호기성 세균만 계수하였다.

### 분리 균주들의 동정

분리균주의 동정을 위해 MIDI System (Microbial Co. Inc., Newark, Del.)을 이용하였다. 즉, 분리된 균주를 TSBA배지에 도말하여 28℃에서 24시간 배양하여 loop로 10mg정도를 떠서 test tube의 밑바닥에 옮긴 후 1번 시약 (sodium hydroxide 45g, methanol 150ml, dH<sub>2</sub>O 150ml)을 각각 1ml씩 첨가하고 잘 혼합하여 100℃에서 5분간 반응하고 다시 잘 섞은 후 100℃에서 25분간 반응시키고 2번 시약 (6N HCl 325ml, methanol 275ml)을 2ml 넣고 80℃에서 10분간 반응 후 3번 시약 (hexane 200ml, *t*-butyl methyl ether 200

ml)을 1.25ml 넣고 10분간 orbital shaker로 흔든 후 아래층 부분을 pasteur pipet으로 제거하고 남은 위층에 4번 시약 (sodium hydroxide 10.8g, dH<sub>2</sub>O 900ml)을 3ml 첨가하여 5분간 부드럽게 섞이도록 한 후 saturated NaCl을 몇방울 넣고 두층이 분리되면 상층액을 injection sample로 이용하였다. 또한 분리균주의 동정을 위하여 순수 분리한 균주를 상기 고체배지에 1 colony를 NA 배지에 접종하여 37℃에서 18시간 이상 배양하고 그 균락의 형태, 색깔 및 운동성을 현미경으로 관찰한 후 각각의 colony를 슬라이드에 도말하여 고정하고 그람염색하였으며, 기타 형태학적, 배양학적, 생리·생화학적 특성은 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology의 방법(10)에 준하여 실험한 후 분리균주를 동정하였다.

### 미생물에 의한 두부의 부패성 및 균의 생육도 측정

분리균주에 의해 두부의 부패가 진행되는지를 확인하기 위하여 가로·세로·높이 3cm 크기로 절단한 두부를 멸균수 500ml과 함께 비이크에 넣고 121℃에서 15분간 살균한 후 여기에 두부에서 순수분리한 각 균주들을 액체배지에서 배양한 배양액 1ml를 넣고 37℃에서 3일 이상 배양하면서 5명의 관능검사원으로 하여금 두부의 형태와 색깔 및 부패취 등을 조사하고 부패성을 확인하였다.

두부에서 분리균주의 생육도를 측정하기 위하여 상기 배양 상등액을 흡광도 600nm에서 측정하였다.

### 효소활성 측정

Proteinase 활성은 0.1M MES (2-[N-morpholino]-ethane-sulfonic acid) buffer (pH6.5) 50μl, 4mM CaCl<sub>2</sub> 8μl, 50 μM ZnCl 25μl, sterilized H<sub>2</sub>O 17μl에 효소액 150 μl를 넣어 잘 혼합한 후 45℃에서 6분 동안 prewarming하고 여기에 2% azocasein을 0.25ml 첨가하여 45℃에서 30분 동안 반응시킨후 7% perchloric acid를 넣고 반응을 정지시키고 5 krpm에서 5분간 원심분리하여 그 상등액에 10N NaOH 150μl를 첨가하여 중화시킨후 다시 14 krpm에서 20분간 원심분리하여 상등액을 A436nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성 단위는 A436nm에서 흡광도 수치로 나타내었다.

Amylase 활성은 1% soluble starch를 포함하는 DM 고체배지(0.5% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.3% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.01% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.05% Na-citrate · 3H<sub>2</sub>O, 1.5% agar)에 균을 접종하여 37℃에서 4일 동안 배양한 후 생성된 clear zone으로 효소 존재유무를 판정하였다.

### 항생제 내성조사

분리한 각종 균주들을 TSBA배지에 도말하여 각종 항생제가 함유되어 있는 paper disc를 plate당 5개씩 놓고 37°C에서 24~48시간 배양하여 clear zone으로 항생제 내성 유무를 판정하였다. 이때 사용한 항생제로는 bioMerieux Co.(France)의 Sensitive Discs와 Becton Dickinson Co.(U.S.A.)의 BBL™ Sensi-Disc™으로 amikacin (30µg), ampicillin (10µg), carbenicillin (100µg), cefamandole (30µg), cefazolin (30µg), cefoperazone (75µg), cefotaxime (30µg), cefotetan (30µg), ceftioxin (30µg), cephalothin (30µg), chloramphenicol (30µg), clindamycin (2µg), doxycycline (30µg), erythromycin (15µg), gentamicin (10µg), imipenem (10µg), kanamycin (30µg), moxalactam (30µg), minocycline (30µg), netilmicin (30µg), nitrofurantoin (300µg), norfloxacin (10µg), oxacillin (1µg), penicillin G (10 units), streptomycin (10µg), tetracycline (30µg), ticarcillin (75µg), tobramycin (10µg), trimethoprim / sulfamethoxazole (1.25/23.75µg), vancomycin (30µg) 등 30종을 사용하였다.

### 결과 및 고찰

#### 두부에서부터 총균수 계수 및 미생물의 분리

두부의 부패에 관여하는 미생물을 분리하기 위하여 시판두부를 37°C 배양기 넣고 0~10일 동안 보관하며 일정 간격으로 부패시킨 후 호기적 미생물의 총균수를 계수한 결과, 0일 균원시료 ml당  $0.8 \times 10^6$ 개의 colony가, 2일 균원시료 ml당  $1.2 \times 10^8$ 개의 colony가, 4일 배양기에 보관한 균원시료에서는 ml당  $2.1 \times 10^{10}$ 개의 colony가, 8일 배양기에 보관한 균원시료에서는 ml당  $3.4 \times 10^{12}$ 개의 colony가 각각 나타났다. 각 보관 기간별 분리한 미생물을 상기 고체배지에서 재분리하고 독립 colony를 확보하여 현미경으로 순수성을 확인한 후 형태, 색깔 및 배양 양상이 다른 균주를 선별하였다. 0 및 2일 배양기에 보관한 균원시료에서는 2개의 각각 다른 colony가, 4일에서는 5개, 8일과 10일에서는 11개의 각각 다른 colony가 나타났으므로 이들 총 18균주를 시험균주로 사용하였다.

#### 균주들의 동정

분리균주 18종 (J46~J63)의 동정을 위하여 MIDI System으로 동정한 결과 Table 1에서와 같이 J56, J61, J63은 *Acinetobacter calcoaceticus*(similarity; 0.877, 0.759, 0.794), J49, J55, J59는 *Bacillus cereus*(0.876, 0.685, 0.801), J58은 *Bacillus sp.*(0.368), J54는 *Cardiobacterium*

sp.(0.374), J46, J53은 *Escherichia coli*(0.785, 0.769), J52, J62는 *Klebsiella pneumoniae*(0.865, 0.786), J57은 *Pantoea sp.*(0.428), J51은 *Salmonella typhimurium*(0.688), J60은 *Staphylococcus aureus*(0.824), J47과 J48은 *Xenorhabdus luminescens*(0.776, 0.799), J50은 *Yersinia sp.*(0.332) 등 총 11종의 각기 다른 균으로 각각 동정되었다.

Table 1. Identification of isolated strains by MIDI system

Isolates (No.)	Identity determined by MIDI system	Similarity
J56, J61, J63	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	0.877, 0.759, 0.794
J52, J62	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.865, 0.786
J45, J55, J59	<i>Bacillus cereus</i>	0.876, 0.685, 0.801
J50	<i>Yersinia sp.</i> <sup>a</sup>	0.332
J47, J48	<i>Xenorhabdus luminescens</i>	0.776, 0.799
J46, J53	<i>Escherichia coli</i>	0.785, 0.769
J51	<i>Salmonella typhimurium</i>	0.688
J60	<i>Staphylococcus aureus</i>	0.824
J58	<i>Bacillus sp.</i> <sup>a</sup>	0.368
J54	<i>Cardiobacterium sp.</i> <sup>a</sup>	0.374
J57	<i>Pantoea sp.</i> <sup>a</sup>	0.428

<sup>a</sup>The isolate could not be identified because of poor matches with profiles in the MIDI library.

그러나 분리주 J58, J54, J57, J50은 MIDI system에서 유사도(similarity)가 0.5이하로 낮게 나타나 *Bacillus sp.* J58, *Cardiobacterium sp.* J54, *Pantoea sp.* J57, *Yersinia sp.* J50으로 각각 명명하였다. 또한 상기 MIDI system에서 동정된 11종의 형태학적, 배양학적, 생리·생화학적 특성을 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology의 방법에 준하여 실험한 결과는 Table 2와 같다. 11균주들의 생리·생화학적 특성을 조사하여 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology에서 조사한 결과, 대부분의 균주들은 MIDI system에서의 결과와 거의 일치하였으나 *Cardiobacterium sp.* J54는 catalase 생산 및 lactose 이용 등에서 차이를 나타내었으나 *Cardiobacterium hominis*와 유사하였으며, *Yersinia sp.* J50은 glycerol, fructose, glucose 이용 등에서 차이를 나타내었으나 *Yersinia pseudotuberculosis*와 유사하거나 근연균으로 판정되었다. 그러나 *Pantoea sp.* J57은 당이용성에서 실험에 이용한 당중에서 lactose를 제외한 모든당을 이용하는 등 *Pantoea* 속과 대부분이 일치하였으나 indole 생산, MR test, H<sub>2</sub>S 생성능 등에서 차이를 나타내었다.

#### 두부 부패성 및 미생물의 존재빈도

분리균에 의해 두부의 부패가 진행되는지를 확인

Table 2. Characteristics of isolated strains from putrefying sobean curd

Characteristics	J61	J55	J58	J54	J53	J62	J57	J51	J60	J48	J50
Morphological charact.											
Form	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Cocci	Rod	Rod
Size	1.0- 3.6 $\mu$ m	0.8- 3.9 $\mu$ m	0.5- 4.2 $\mu$ m	0.5- 4.3 $\mu$ m	1.1- 6.0 $\mu$ m	0.6- 4 $\mu$ m	0.7- 3.5 $\mu$ m	0.7- 5.5 $\mu$ m	1.0 $\mu$ m	1.5- 5.0 $\mu$ m	0.5- 3.5 $\mu$ m
Gram stain	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
Physiological charact.											
Catalase	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
Citrate utilization	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
Gelatin liquefaction	-	+	-	-	-	-	-	-	-	±	-
Indole production	-	-	-	+	+	+	±	+	-	±	-
Methyl red test	-	-	-	+	+	+	±	+	+	+	+
Hydrogen sulfide test	-	+	+	+	-	+	±	+	+	+	-
Nitrate reduction	-	-	±	-	+	+	-	-	+	+	+
OF test	none	none	none	fer	fer	fer	fer	fer	fer	oxi	none
Oxidase	-	-	±	+	-	+	+	+	-	-	-
Urease test	-	±	±	-	-	+	-	+	+	-	+
Carbon assimilation											
Glycerol	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
Inositol	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-
Starch	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Dextrin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±
Fructose	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Lactose	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sucrose	-	+	+	+	±	+	+	-	+	-	-
Xylose	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+

+: positive, -: negative, ±; intermetate, fer; fermentation, oxi; oxidation.

Table 3. Characterization and distribution of bacteria in putrefying soybean curd

Microorganisms	Growth <sup>a</sup> (OD 600nm)	Proteinase activity <sup>b</sup> (units)	Amylase activity <sup>c</sup>	Septicity <sup>d</sup>	Distribution of bacteria in putrefying soybean curd (%)
<i>Bacillus cereus</i> J55	2.438	0.469	+++	++++	23.37
<i>Xenorhabdus luminescens</i> J48	2.041	0.757	++	+++	22.73
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> J61	1.227	0.214	+++	+++	22.26
<i>Klebsiella pneumoniae</i> J62	1.008	0.285	++	+++	21.25
<i>Salmonella typhimurium</i> J51	0.535	0.095	+	-	2.87
<i>Pantoea sp.</i> J57	0.305	0.054	+	-	2.65
<i>Bacillus sp.</i> J58	0.231	0.035	+	-	1.43
<i>Cardiobacterium sp.</i> J54	0.115	0.027	-	-	1.26
<i>Escherichia coli</i> J53	0.108	0.041	+	-	1.20
<i>Staphylococcus aureus</i> J60	0.101	0.002	+	-	0.93
<i>Yersinia sp.</i> J50	0.097	0.001	+	-	0.05

<sup>a</sup>Cell growth was OD value. Each bacteria were grown in sterile water containing soybean curd at 37°C for 3 days in 500ml beaker.

<sup>b</sup>Proteinase activity was determined by azocasein stain method.

<sup>c</sup>Amylase activity was determined by an agar diffusion on DM medium containing 1% starch.

<sup>d</sup>Septicity of soybean curd, +; positive, -; negative.

<sup>e</sup>Cells were grown in a sterile water containing soybean curd at room temperature for 3days in 500ml beaker. A 0.1ml 10 times dilution aliquot of the turbid suspension was transferred to a fresh NA and LB media and incubated as before, then distribution of bacteria in putrefying soybean curd was counted.

한 결과, Table 3에서와 같이 *B. cereus* J55, *X. luminescens* J48, *Ac. calcoaceticus* J61, *Kl. pneumoniae* J62 등 4 종류의 미생물은 심한 부패취를 낼 뿐만아니라 3cm<sup>3</sup>의 두부형체를 거의 해체하는 특성을 나타내었고

또한 생육도도 다른 7종의 균주에 비해 높았다. 그러나 *S. typhimurium* J51, *Pantoea sp.* J57, *Bacillus sp.* J58, *Cardiobacterium sp.* J54, *E. coli* J53, *St. aureus* J60, *Yersinia sp.* J50 등은 부패취도 나지 않았으며

생육도 역시 낮게 나타나 두부 부패에 관여하는 미생물이 아닌 것으로 나타났다.

두부 부패과정 중에 미생물의 종류 및 함량을 조사한 결과 Table 4과 같이 *B. cereus* J55 23.37%, *X. luminescens* J48 22.73%, *A. calcoaceticus* J61 22.26%, *Kl. pneumoniae* J62 21.25%, *S. typhimurium* J51 2.87%, *Pantoea* sp. J57 2.65%, *Bacillus* sp. J58 1.43%, *Cardiobacterium* sp. J54 1.26%, *E. coli* J53 1.20%, *St. aureus* J60 0.93%, *Yersinia* sp. J50 0.05%로 존재하였다.

두부의 부패에 관여하는 미생물에 관한 연구로 白 등(9)은 점물질을 생성하며 두부변패의 주된 원인균이 호기성 gram 음성 구균인 *Acinetobacter* 속이라고 보고 하였으며, 신 등(4)은 시판 두부를 20~25℃에

방치하여 부패를 유발시킨후 이 부패두부로부터 주요 관여 미생물 3균주를 순수분리, 부패성을 확인한 후 동정한 결과 *Acinetobacter calcoaceticus* var. *anitrat*와 *Klebsiella pneumoniae* subgroup *pneumoniae*로 확인 되었으며 나머지 한 균주는 *Acinetobacter calcoaceticus* var. *anitrat*와 동일한 특성을 보유하며 점액성을 지닌 균주로 확인되었다고 보고하였다. 그러나 본 연구 결과에서는 *Ac. calcoaceticus* 및 *Kl. pneumoniae* 뿐만아니라 *B. cereus* 및 *X. luminescens*가 두부에서 더 심한 부패를 유발하였다. 또한 *B. cereus*의 경우 세균수가 1일 배양시 ml당  $2.1 \times 10^7$ 개로 나타났으며 심한 부패취를 유발하였다. 이러한 결과는 세균수가  $10^7$  cells/g에 달할 때에 부패가 시작된다는 송 등(5)의 보

Table 4. Antibiotics resistance of isolated strains from putrefying sobean curd

Antibiotics(Conc.)	Ac	Bc	Bs	Cs	Ec	Kp	Ps	St	Sa	Xl	Ys
Amikacin(30μg)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ampicillin(10μg)	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-
Carbenicillin (100μg)	-	-	-	-	-	-	+	-	±	-	-
Cefamandole(30μg)	+	±	-	+	-	-	+	+	-	±	-
Cefazolin(30μg)	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-
Cefoperazone(75μg)	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	±
Cefotaxime(30μg)	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-
Cefotetan(30μg)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cefoxitin(30μg)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cephalothin(30μg)	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-
Chloramphenicol(30μg)	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-
Clindamycin(2μg)	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+
Doxycycline(30μg)	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-
Erythromycin(15μg)	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Gentamicin(10μg)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Imipenem(10μg)	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-
Kanamycin(30μg)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Moxalactam(30μg)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Minocycline(30μg)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Netilmicin(30μg)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrofurantoin(300μg)	+	-	-	±	-	-	+	+	-	-	-
Norfloxacin(10μg)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxacillin(1μg)	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
Penicillin G(10 units)	+	±	-	+	+	+	+	+	-	-	+
Streptomycin(10μg)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Tetracycline(30μg)	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-
Ticarcillin(75μg)	-	±	-	-	-	-	+	-	±	-	+
Tobramycin(10μg)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trimethoprim/sulfamethoxazole(1.25/23.75μg)	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+
Yancomycin(30μg)	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+

Ac; *Acinetobacter calcoaceticus* J61, Bc; *Bacillus cereus* J55, Bs; *Bacillus* sp. J58, Cs; *Cardiobacterium* sp. J54, Ec; *Escherichia coli* J53, Kp; *Klebsiella pneumoniae* J62, Ps; *Pantoea* sp. J57, St; *Salmonella typhimurium* J51, Sa; *Staphylococcus aureus* J60, Xl; *Xenorhabdus luminescens* J48, Ys; *Yersinia* sp. J50.

-; susceptible, +; resistant, ±; intermediate.

고와, 30°C 저장시 6시간 후부터 경미한 부패취를 내고 9~12시간 이후 부패취가 난다는 이 등(7), 신 등(4)의 결과와 거의 유사하였다.

#### Proteinase 및 amylase의 생산

두부에는 85% 정도의 수분을 제외하고 단백질이 6%로 가장 많이 존재하며 그 다음 지질으로 3.5%, 탄수화물이 1.9%, 회분이 0.6% 그외 각종 미네랄이 0.2% 정도로 구성되어 있다. 그러므로 두부 부패미생물이 두부에서 생육하기 위해서는 proteinase 및 amylase 등의 효소를 생산할 것이다. 따라서 두부에서 분리 동정한 11종의 미생물을 이용하여 이들 효소 중 proteinase 및 amylase 생산능을 조사하였다. Proteinase의 활성을 조사하기 위하여 500ml 삼각플라스크에 시판두부 5조각과 증류수 100ml를 넣고 면전하여 살균한 후 분리균주를 각각 1 colony 접종하고 37°C에서 50 strokes/min으로 3일간 배양하고 그 배양상등액을 조효소로 사용하여 proteinase의 활성을 조사하였다. 그 결과 table 3에서와 같이 proteinase의 활성은 *B. cereus* J55, *X. luminescens* J48, *Ac. calcoaceticus* J61, *Kl. pneumoniae* J62 등 4 종류의 미생물은 비교적 높은 효소활성을 가지고 있었으나 그의 균주에서는 아주 낮은 수치를 나타내었다. 또한 amylase 활성은 DM 배지에 starch를 첨가하여 배양한 후 생성된 clear zone의 생성유무로 판정한 결과, *B. cereus* J55, *X. luminescens* J48, *Ac. calcoaceticus* J61, *Kl. pneumoniae* J62 등 4 종류의 미생물은 뚜렷한 zone을 나타내어 amylase를 생성하는 균주임을 확인하였으나 그의 균주들은 아주 적은 zone을 생성하여 starch를 분해하기는 하나 amylase 활성이 아주 적은 균주로 생각되며 *Cardiobacterium* sp. J54는 zone을 전혀 생성하지 않았다. 따라서 두부의 부패에 관여하는 미생물은 proteinase나 amylase를 분비하는 것으로 확인되었다.

#### 두부에서 분리한 각종 식중독 및 병원성 미생물의 항생제 내성조사

두부에서 분리·동정한 11종 중 몇가지 미생물의 특성을 살펴보면 먼저 *B. cereus*는 식중독의 원인균으로 g당  $10^8$  芽胞數를 함유하는 식품에서도 식중독을 유발하지 않는 경우가 있으나 대체적으로는 芽胞를 형성할 때 enterotoxin을 방출하여 복통과 설사를 일으키며, *X. luminescens*는 곤충의 발광균으로 임상에는 병관계가 없는 균이며, *A. calcoaceticus*는 폐렴, 폐혈증, 수막염, 요로감염을 일으키는 병원균이며, *Kl. pneumoniae*는 호흡기 계통의 감염증의 원인균으로 폐

렴, 수막염, 폐혈증, 폐농양 등을 일으키는 병원균이며, *S. typhimurium*는 식중독균으로 구역질, 구토, 설사, 두통 및 발열 등으로 일으키는 식중독균이며, *St. aureus*는 식중독균이며 화농성 질환을 일으키는 병원균으로 잘 알려져 있다(11). 또한 *Yersinia* 속은 장내세균이며 통성혐기성 간균으로서 급성위장질환과 패혈증, 다발성관절염 등 여르시니아증(Yersiniosis)을 일으키는 병원균이다(12). 이처럼 대부분의 분리·동정한 세균들이 식중독이나 병원성을 나타내고 있으므로 본 연구에서는 두부에서 분리·동정한 11종의 미생물들의 각종 항생제 내성을 조사하였다. 그 결과 Table 4와 같이 대부분의 균주들이 amicacin, gentamicin, tobramycin 등 aminoside계 항생물질에 대해서는 높은 감수성을 나타내는 반면 penicillin G, oxacillin, cephalothin, cefazolin, cefamandole 등  $\beta$ -lactamine계 항생제에 대해서 높은 내성을 가지고 있었다. 일반적으로 *B. cereus*, *S. typhimurium*, *E. coli*, *St. aureus* 등의 미생물의 항생제 내성조사가 잘 알려져 있으며 실제 병원에서 임상에 사용하고 있으나 그의 균주들의 항생제 이용성에 관한 연구는 아직 미비한 상태이다. 그러므로 부패두부의 식이에 의한 식중독은 aminoside계 항생제를 이용하면 효과적일 것이다.

#### 요 약

부패하는 두부에서부터 각종 미생물 18종을 분리하여 동정한 결과, *B. cereus*, *X. luminescens*, *A. calcoaceticus*, *Kl. pneumoniae*, *S. typhimurium*, *Pantoea* sp., *Bacillus* sp., *Cardiobacterium* sp., *E. coli*, *St. aureus*, *Yersinia* sp. 등 11종의 각기 다른 미생물로 나타났다. 실온에서 두부의 부패 과정중 이들 미생물의 존재 함량은 *B. cereus* J55 23.37%, *X. luminescens* J48 22.73%, *A. calcoaceticus* J61 22.26%, *Kl. pneumoniae* J62 21.25%, *S. typhimurium* J51 2.87%, *Pantoea* sp. J57 2.65%, *Bacillus* sp. J58 1.43%, *Cardiobacterium* sp. J54 1.26%, *E. coli* J53 1.20%, *St. aureus* J60 0.93%, *Yersinia* sp. J50 0.05%로 존재하였다. 이들 미생물을 각각 두부에 접종하여 두부 부패성을 조사한 결과, *B. cereus* J55, *X. luminescens* J48, *Ac. calcoaceticus* J61, *Kl. pneumoniae* J62 등 4 종류의 균주는 두부 부패를 진행시켰으며 심한 변패취를 내었고 액즙이 혼탁하여 미생물의 증식을 인지할 수 있었으며 또한 proteinase의 활성 및 amylase의 활성이 비교적 높게 나타났다. 그러나 나머지 7균주는 두부 부패에 큰 영향을 나타내지 않았다. 11종의 미생물에 대하여 각종

항생제 내성을 조사한 결과, amicacin, gentamicin, tobramycin 등 aminoglycoside계 항생물질에 대해서는 높은 감수성을 나타내는 반면, penicillin G, oxacillin, cephalothin, cefazolin, cefamandole 등  $\beta$ -lactamine계 항생제에 대해서 높은 내성을 가지고 있었다.

### 참고문헌

1. Miller, C.D., Denning, H. and Bauer, A. (1952) Relation of nutrients in commercially prepared soybean curd. Food Res., 17, 261
2. 보건사회부 (1990) 식품공전, 182
3. 河瑞俊治, 辻薦 (1983) 食品工場における微生物制御, 建帛社, 427
4. 신동화, 김문숙, 배경숙, 고영희 (1992) 두부 부패에 관여하는 주요 미생물 동정, Korean J. Food Sci. Technol., 24(1), 29
5. 송석훈, 장건형 (1964) 두부에 관한 연구(제2보). 두부의 shelf life 연장에 관한 연구. 기술연구소 보고(제3집), 육군기술연구소, 5
6. 송석훈, 장건형 (1965) 두부에 관한 연구(제2보). 두부의 shelf life 연장에 관한 연구. 기술연구소 보고(제4집), 육군기술연구소, 21
7. 이명환, 이해원 (1984) 두부의 물성 및 보존에 관한 연구, 서울여자대학 논문집, 13, 437
8. 北村廣志, 左左木裕 (1991) 素材豆腐の開発は應用, 食品と開發, 26(2), 24
9. 白川武志 (1985) 豆腐の黏性變敗について. 日本食品工業學會誌, 31, 1
10. Williams and Wilkins (1974) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (8th ed.)
11. 金承坤, 金臣武, 金永權, 李建燮, 吳興佰, 鄭璟錫, 鄭泰華 (1993) 診斷病原微生物學, 高麗醫學社
12. 임수영, 윤석권, 윤성식, 김찬민 (1998) *Yersinia enterocolitica*의 특성 및 예방. 식품과학과 산업, 31(3), 68

---

(1998년 7월 23일 접수)