

## 한약재 및 해조류 추출물에 의한 고등어 육종의 Histamine 생성 억제 효과

정슬아<sup>1</sup> · 김동현<sup>2</sup> · 김꽃봉우리<sup>3</sup> · 김현지<sup>1</sup> · 정다현<sup>1</sup> · 강보경<sup>1</sup> · 박시우<sup>1</sup> ·  
박원민<sup>1</sup> · 김보람<sup>1</sup> · 변명우<sup>4</sup> · 안동현<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>부경대학교 식품공학과/식품연구소, <sup>2</sup>(주)MSC 식품연구소

<sup>3</sup>부경대학교 수산과학연구소, <sup>4</sup>우송대학교 외식조리영양학부

### Inhibitory Effects of Histamine Production in Mackerel Muscle by Medicinal Herbs and Seaweed Extracts

Seul-A Jung<sup>1</sup>, Dong-Hyun Kim<sup>2</sup>, Koth-Bong-Woo-Ri Kim<sup>3</sup>, Hyun-Jee Kim<sup>1</sup>, Da-Hyun Jeong<sup>1</sup>,  
Bo-Kyong Kang<sup>1</sup>, Si-Woo Bark<sup>1</sup>, Won-Min Pak<sup>1</sup>, Bo-Ram Kim<sup>1</sup>,  
Myoung-Woo Byun<sup>4</sup>, and Dong-Hyun Ahn<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Food Science and Technology/Institute of Food Science, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

<sup>2</sup>Hydro Colloid Div., MSC Co., Ltd., Gyeongnam 626-280, Korea

<sup>3</sup>Institute of Fisheries Science, Pukyong National University, Busan 619-911, Korea

<sup>4</sup>Dept. of Culinary Nutrition, Woosong University, Daejeon 300-718, Korea

**ABSTRACT** This study was conducted in order to investigate the inhibitory effects of natural materials on histamine production in mackerel. Antimicrobial activities on *Photobacterium phosphoreum* of medicinal herbs and seaweeds were investigated using the paper disc assay and MIC (minimum inhibitory concentration) test. According to the results, *Sargassum sagamianum* and *Ecklonia cava* ethanol extracts exhibited antibacterial activity. In particular, *Sargassum sagamianum* ethanol extract showed excellent antibacterial activity at 0.015625 mg/mL by the MIC test. Anti-histamine release activities of natural materials were further investigated by examining their inhibitory effects on histidine decarboxylase (HDC) activity in the crude enzyme preparation from *Photobacterium phosphoreum*. The ethanol extracts of *Ecklonia cava* and *Eisenia bicyclis* exhibited the strongest HDC inhibitory activity, with 32% and 22%, at a concentration of 1 mg/mL, respectively. Therefore, natural materials may reduce histamine poisoning through decrease of histamine production in mackerel.

**Key words:** medicinal herb, seaweed, mackerel muscle, histidine decarboxylase

## 서 론

고등어(*Scomber japonicus*)는 경골어류 농어목 고등어과에 속하는 어류로써 우리나라 남해안 일대를 비롯하여 일본 전 연안, 태평양, 대서양 및 인도양 등 대부분의 대양에 서식하며 주로 열대 및 온대 해역에 분포하는 난류성 어종이다(1). 고등어는 정어리, 전갱이 및 꽂치와 함께 4대 등푸른생선으로써 지질함량이 높으며, 특히 EPA(eicosapentaenoic acid) 및 DHA(docosahexaenoic acid)와 같은 고도불포화지방산(polyunsaturated fatty acids, PUFA)이 풍부하여 고혈압, 심장질환 및 뇌활동 촉진 등에 효과가 있다(2). 뿐만 아니라 혈압강하 및 뇌졸중의 예방효과가 있는 taurine, 항산화력을 가지는 selenium 및 세포 분열과 복제에 관여하는 핵산 등이 다량 함유되어 있어 영양 및 기능적으로

매우 우수한 어류이다(3). 그러나 고등어는 선도저하가 매우 빨라 고도불포화지방산들이 산화되어 유지의 변색, 저급 carbonyl 화합물 등의 생성으로 불쾌취, 단백질 변성, 영양가 저하 및 오염된 미생물에 의해서 생성된 histamine에 의해 scombroid fish poisoning과 같은 식중독 등을 일으켜 품질에 나쁜 영향을 미쳐 다양한 가공제품을 생산하는데 어려움이 있어 냉동품, 통조림 및 염장품 등의 단순가공의 형태로 이용이 제한되고 있다(4,5). Scombroid fish poisoning은 선도가 저하되거나 부적절한 처리로 인하여 미생물에 의해 오염이 되었을 때 발생하며, 어류의 표면에 약 1%라도 미생물이 존재하게 되면 균은 매우 빠른 속도로 증식하게 되고 오염된 어류는 외관상 정상적인 상태에서도 독성을 나타내기 때문에 매우 위험하다. 고등어의 근육 내에는 비단백태 질소인 free histidine의 함량이 매우 높으며 이를 기질로 하여 미생물이 생산하는 효소에 의해 decarboxylation 과정을 거쳐 histamine으로 전환하게 된다(6). 이렇게 부패된 어류에서 미생물에 의해 생성된 histamine을 섭취하게 되면

Received 22 March 2013; Accepted 1 May 2013

\*Corresponding author.

E-mail: dhahn@pknu.ac.kr, Phone: 82-51-629-5831

알레르기성 식중독의 원인이 되는 것이다. 현재까지 4°C보다 높은 온도에서 저장한 생선에서 *Escherichia coli*(7), *Morganella morgani*(8), *Klebsiella pneumoniae*(9) 및 *Hafnia alve*(10) 등과 같은 부패세균에 의해 histamine이 생성된 것으로 보고되었고 *Photobacterium*(P.) spp.와 *Vibrio* spp.는 주로 저온에서 histamine 생성에 관여한다고 하였으며, 그중에서도 *P. phosphoreum*이 저온에서 histamine 생성에 관여하는 것으로 알려져 있다(11). 따라서 histamine 생성의 원인물질인 부패세균 또는 부패세균이 생성하는 HDC(histidine decarboxylase)를 제어하여 안정성을 확보하는 것이 매우 중요하다. HDC는 열처리로 불활성화 시키는 것이 어렵기 때문에(6) 근본적으로 해결하는 방법이 절실하다. 현재까지 histamine 생성 억제에 관한 연구로는 spice를 첨가함으로써 HDC 활성 및 biogenic amine 형성을 억제하고(12,13) 고등어에 로즈마리 추출물(14), 녹차, 연잎(15) 및 한방재료(16)를 첨가하여 항산화, 항균 등의 효과에 의한 저장성과 품질을 증진시키는 연구가 진행되어 왔다. 따라서 식품의 품질에 영향을 미치지 않으면서 미생물 및 효소의 활성을 제어할 수 있는 다양한 생리기능성을 지닌 천연물에 대한 연구가 필요하다.

해양식물인 해조류는 각종 미네랄과 비타민 및 섬유소, 단백질 등이 풍부하게 함유되어 있을 뿐만 아니라 고압, 저온, 저산소, 고염 등의 독특한 환경 속에서 서식하기 때문에 육상생물과는 다른 대사계나 생체 방어계를 가지고 있으며, 항균(17,18) 및 효소저해활성(19-21) 등과 같은 다양한 생리활성을 갖는 물질들을 함유하고 있는 것으로 알려져 새로운 기능성 소재로서 충분한 가치가 있다.

또한 전통 생약을 이용한 연구도 활발히 진행되고 있는데 그중에서 오미자(*Schizandra chinensis*)는 목련과에 속하는 낙엽성 만성 목본식물로서 항균(22), 항산화(23) 등 다양한 생리기능성을 지니는 것으로 알려져 있다.

따라서 본 연구에서는 *P. phosphoreum*와 *P. phosphoreum* 유래 HDC에 대한 천연물의 항균 및 HDC 저해활성 효과를 확인하고 나아가, 이를 고등어 육에 직접 적용하여 효과를 증명하고 식품산업에서의 응용가능성에 대해 살펴 보았다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 연구에 사용된 한약재로 상백피(*Morus alba*)와 오미자(*Schizandra chinensis*)는 경남 양산의 한의원에서 건조된 국내산을 구입하였으며, 이를 분쇄기(Deasung atron, Seoul, Korea)로 분쇄한 후 -20°C에서 보관하여 실험에 사용하였다. 또한 해조류 중 감태(*Ecklonia cava*)와 대황(*Eisenia bicyclis*)은 경북 동해안에서 채취하였으며, 비틀대 모자반(*Sargassum sagamianum*) 및 지충이(*Sargassum thunbergii*)는 부산 인근 앞바다에서 채취하여 담수로 깨끗

이 수세하고 자연건조 후 동결 건조하여 분쇄기로 분쇄한 후, -20°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

실험에 사용된 고등어(*Scomber japonicus*)는 부산광역시 수영구 민락동 소재의 현대수산에서 활어로 구입하여 실험에 사용하였다.

### 시험균주

실험에 사용된 균주는 가장 대표적인 저온성 histamine-producing bacteria인 *P. phosphoreum* IFO 13896을 미생물자원센터(KCTC, Korea)에서 분양 받아 실험에 사용하였다.

### 시료추출

분말 상태의 시료에 10배량의 에탄올을 가하여 실온에서 24시간 동안 진탕 추출하였다. 추출물은 원심분리기(UNION 32R, Hanil Co., Incheon, Korea)로 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액만 취하였다. 잔사는 이와 동일한 방법으로 2회 반복 추출하였다. 이를 여과지(Advantec 5A, Toyo Roshi Kaisha, Tokyo, Japan)로 여과한 후 rotary evaporator(RE200, Yamato Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 감압 농축하고 37°C에서 건조하였다. 이를 -20°C에서 보관하며 실험에 사용하였다. 열수 추출은 시료에 10배량의 물을 가하여 80°C에서 8시간 교반하여 추출하였으며 후처리 과정은 위와 동일하다.

### Paper disc assay

높이가 4~5 mm인 MHA(Mueller-Hinton agar) 배지에 균액의 농도가 약  $10^5 \sim 10^6$  CFU/mL 가량 되도록 도말하고 지름이 6 mm인 멸균 disc를 고정시켜서 일정한 농도로 희석한 한약제 및 해조류 추출물을 20  $\mu$ L 흡수시켰다. 이를 실온에서 약 1시간 정도 확산시킨 후, 37°C incubator(DW-M I-250, Dongwon Science Co., Busan, Korea)에서 24시간 배양하였다. 항균력 측정은 형성된 clear zone의 크기로 판단하였다.

### Minimum inhibitory concentration(MIC)

멸균 후 완전히 굳지 않은 MHA 배지에 한약제 및 해조류 추출물을 농도별로 첨가하고 시험 균주의 농도가 약  $10^5 \sim 10^6$  CFU/mL 되도록 접종한 후 혼합하였다. 이를 평판에 분주하여 실온에서 굳히고, 37°C incubator(DW-M I-250, Dongwon Science Co.)에서 24시간 배양하였다. 배양 후 실체 현미경 상에서 균의 성장이 관찰되지 않은 평판의 농도를 최소저해농도로 하였다.

### 조효소액 제조

Histamine-producing bacteria로부터 crude histidine decarboxylase를 추출하기 위해 Tanase 등(24)의 방법을 참고하였다. *P. phosphoreum* 균주를  $10^5 \sim 10^6$  CFU/mL 되

**Table 1.** Operating conditions of ultrasonicator to obtain crude HDC from histamine-producing bacteria

Instrument	VCX-130
Time	10 min
Pause	20 sec, 20 sec
Amplitude	55%

도록 하여 0.5% L-histidine monohydrochloride monohydrate를 첨가한 MB 배지에 접종하여 25°C에서 42시간 배양하였다. 균 배양액을 12,000×g로 30분간 원심분리 하여 균체를 수집하였다. 수집된 균체에 buffer A(0.1 M potassium phosphate buffer, 0.1 mM sodium EDTA, 0.01 mM pyridoxal phosphate, 0.02 mM dithiothreitol, 1% (v/v) polyethylene glycol no. 300, pH 6.5)로 washing한 후, -20°C에 보관하며 실험에 사용하였다. Washing한 wet cell을 1:4 비율의 buffer로 현탁 시킨 후, 초음파 처리(VCX 130, Sonics & Materials, Newtown, CT, USA)하여 cell을 파괴시킨 후(Table 1), 12,000×g에서 30분간 원심분리 하여 상층액을 취하였다. 침전물은 다시 1:3 비율로 buffer를 가하여 한 번 더 초음파 처리하고 원심분리 한 상층액을 앞의 상층액과 혼합하여 20,000×g에서 30분간 다시 한 번 원심분리 하였고 잔사는 폐기하였다. 원심분리 한 상층액을 앞의 상층액과 혼합하여 조효소로 실험에 사용하였다.

### 천연물에 의한 HDC 저해활성

HDC 저해 활성 측정은 37°C에서 기질인 histidine이 histamine으로 방출되는 정도를 측정함으로써 확인하였다. Kanki 등(25)을 참고하여 buffer A 1 mL와 일정한 농도의 천연물 추출물 0.1 mL를 test tube에 취하여 37°C에서 5분간 배양한 후, 조효소액 0.1 mL를 가하여 다시 5분간 배양하였다. 200 mM L-histidine monohydrochloride monohydrate를 0.2 mL를 첨가한 후 37°C에서 15분간 반응시켜 histamine을 생성시켰다. 반응을 정지시키기 위하여 94~95°C에서 5분간 반응시킨 후 얼음물에 급속 냉각하였다. 생성된 histamine 정량을 위하여 histamine assay kit (Kikkoman Co., Tokyo, Japan)를 사용하여 UV/visible spectrophotometer로 470 nm에서 흡광도를 측정하였다(26).

$$\text{저해율(\%)} = 100 \times [1 - (B - C) / A]$$

A: 시료를 첨가하지 않은 흡광도

B: 시료를 첨가한 흡광도

C: 효소를 첨가하지 않은 흡광도

### 고등어 육 전처리

고등어의 머리와 내장을 제거한 후, clean bench(DW-CB-511, Dongwon Science Co.) 내에서 화염 멸균시킨 칼을 이용하여 육만을 채취하였다.

Histamine-producing bacteria인 *P. phosphoreum*에 대한 항균효과를 지닌 천연물을 이용한 고등어육 내에서의

histamine 생성 억제 실험을 위해 고등어육 42.5 g을 채취하였으며, NaCl을 육 내에 최종농도가 2%가 되도록 첨가하고 homogenizer(AM-7, Nihonseiki, Tokyo, Japan)를 이용하여 1,000 rpm에서 30초간 균질화 한 후, 천연물을 다양한 최종농도를 정하여 첨가하였다. 10<sup>5</sup> CFU/mL(*P. phosphoreum*)를 1/10 희석하여 100 µL 첨가 후, 이를 다시 1,000 rpm으로 20초간 균질화 하였다. 처리한 육을 멸균된 petri-dish에 옮겨 담고 5±1°C에서 3, 120 및 240시간 저장하면서 실험을 진행하였다.

HDC에 대한 저해효과를 지닌 천연물을 이용한 고등어육의 histamine 생성 억제 실험을 위해 육 18.84 g에 위와 같은 방법으로 천연물 및 조효소 0.5 mL를 처리하여 3, 24, 72 및 120시간 저장하면서 실험을 진행하였다.

### 일반 생균수 측정

고등어 육을 무균적으로 2 g을 취한 후, 멸균 PBS(phosphate buffered saline, pH 7.4)를 10배 가하여 1,000 rpm에서 1분간 균질화(AM-7, Nihonseiki) 한 다음 10배 희석법으로 희석하였다. 일반생균수는 시료 희석액을 PCA (plate count agar)에 도말하여 37°C에서 24~48시간 배양한 후, 생성된 집락을 계수하여 측정하였다.

### 고등어육 중의 histamine 생성량 측정

어육 내 histamine 생성량 측정은 Kanki 등(25)의 방법을 참고하였다. 분쇄한 고등어 육 1 g에 0.1 M EDTA(pH 8.0)를 24 mL 첨가하여 1분간 교반하고 100°C의 물에 20분간 정지시킨 후, 얼음물에 10분간 냉각시켰다. 이를 여과지로 여과한 다음, 여과액을 histamine assay kit를 사용하여 UV/visible spectrophotometer로 470 nm에서 흡광도를 측정하여 histamine 함량을 정량하였다.

### 통계처리

실험 결과에 대한 통계처리는 SAS software(Statistical Analytical System V8.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용하여 분산분석을 하였으며, 조사 항목들 간의 유의적 검정은  $P < 0.05$  수준에서 Duncan's multiple range test법에 따라 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### *P. phosphoreum*에 대한 항균활성

고등어에 다량 함유되어 있는 histidine은 선도저하 또는 부적절한 처리 및 가공으로 인해 부패 미생물이 생육하게 되면 탈탄산 작용으로 histamine을 생성하게 된다(6). 따라서 고등어 내 histamine의 생성은 부패세균이 생성하는 HDC라는 효소에 의한 것이므로 미생물의 생육을 억제하는 것이 가장 중요하다. 따라서 *P. phosphoreum*에 대한 천연물의 항균활성 정도를 확인하기 위하여 오미자 열수 추출

**Table 2.** Antimicrobial activity of various natural materials extracts against *P. phosphoreum*

	<i>P. phosphoreum</i>	
	10%	5%
<i>S. chinensis</i> HWE	+++	+
<i>S. chinensis</i> WE	++	+
<i>S. sagamianum</i> EE	++	+
<i>E. cava</i> EE	++	+
<i>S. thunbergii</i> EE	-	-
Negative control	-	-

Growth inhibition size of clearzone: -, not detected; +, smaller than 1.5 mm; ++, 1.5~3 mm; +++, 3~5 mm; +++++, larger than 5 mm.

HWE, hot water extract; WE, water extract; EE, ethanol extract. Negative control: Water, ethanol.

및 물 추출, 비틀대 모자반, 감태 및 지층이를 에탄올로 추출한 후, paper disc법을 이용하여 생육억제 활성을 측정하였다. 그 결과(Table 2), 오미자 열수 추출물 및 물 추출물, 비틀대 모자반과 감태 에탄올 추출이 10% 및 5%에서 항균 활성을 나타내었다. 오미자의 경우 fumaric acid, citric acid, malic acid 및 itaconic acid 등의 유기산이 많이 함유되어 있어 이로 인한 pH의 저하에 따른 항균효과가 있는 것으로 알려져 있으며(27), 뿐만 아니라 오미자의 정유성분인 terpineol과 citronellol이 *Escherichia coli*, *Staphylococcus(S.) aureus* 등에 대해 높은 항균활성을 나타내는 것으로 보고되어(28) 오미자가 가지는 유기산과 정유성분에 의해 *P. phosphoreum*에 대해 항균활성을 나타낸 것으로 사료되어진다. 감태의 경우 식품 부패 및 식중독에 관여하는 여러 미생물에 대해 뛰어난 항균활성을 보였다는 연구결과와 유사하였으며(18,29), 감태에는 다양한 phlorotannin이 함유되어 있어 여러 생리기능성을 나타내는 것으로 알려져 있는데 Choi 등(30)은 감태에서 분리한 eckol이 *S. aureus*와 *Salmonella* spp.에 대해 항균활성을 가진다고 보고하였다. 또한 Horie 등(31)은 비틀대 모자반에서 항균활성을 지니는 quinone 대사물질인 sargaquinoic acid 유도체를 분리해냈다. 따라서 이러한 해조류 중의 화합물들이 *P. phosphoreum*에 대해 항균활성을 나타낸 것으로 사료되어진다.

Paper disc assay 실험 결과, *P. phosphoreum*에 대해 높은 감수성을 보인 오미자 열수 추출물, 비틀대 모자반 및 감태 에탄올 추출물에 대한 MIC test를 실시하였다. 그 결과(Table 3), 비틀대 모자반 에탄올 추출물이 0.015625 mg/mL의 매우 낮은 농도에서 균의 생육을 억제하였으며 감태 에탄올 추출물 역시 0.125 mg/mL의 낮은 농도에서 생육을 억제하였다. 오미자 열수 추출물은 1 mg/mL로 비교적 높은 농도에서 *P. phosphoreum*의 생육을 억제하였다. Wenda-koon과 Sakaguchi(12)는 또 다른 강력한 histamine 생성균인 *Enterobacter aerogenes*에 대하여 clove가 histamine 생성을 억제하는 것을 확인하였으며, 이는 clove의 essential oil에 의한 것으로 essential oil의 phenolic 화합물이 미생물의 세포막에 영향을 주는 것으로 보고하였다.

**Table 3.** Minimum inhibitory concentration (MIC) of various natural materials extracts against *P. phosphoreum*

	MIC (mg/mL)
	<i>P. phosphoreum</i>
<i>S. sagamianum</i> EE	0.015625
<i>E. cava</i> EE	0.125
<i>S. chinensis</i> HWE	1

EE, ethanol extract; HWE, hot water extract.

해조류 역시 높은 phenolic 화합물을 함유하고 있는 것으로 알려져 있으며 이에 의해 항균활성이 나타난 것으로 사료되어진다.

### HDC 저해활성

Histamine 생성을 억제하는 방법에는 미생물을 제어하거나 미생물에 의해 생성된 효소를 제어하는 방법이 있다. *P. phosphoreum*으로부터 얻은 crude HDC를 얻은 후, 해조류 및 한약재 추출물에 의한 HDC 저해활성을 측정하였다. 그 결과(Table 4), 해조류 추출물에 의한 HDC 저해효과는 감태 및 대황 추출물이 1 mg/mL 농도에서 각각 31.75% 및 25.08%로 가장 높은 저해활성을 나타내었으며 한약재 추출물에 의한 HDC 저해효과는 오미자 에탄올 추출물이 1 mg/mL 농도에서 13.37%의 저해활성을 나타내었으며, 다음으로 오미자 열수 추출물이 8.47%의 저해효과를 나타내었다. 감태와 대황의 경우 lipase(32,33),  $\alpha$ -glucosidase(34,35),  $\alpha$ -amylase(33,35) 및 tyrosinase(36) 등의 다른 효소에서 저해활성을 보이는 것으로 알려져 있으며 해조류에는 tannin과 같은 polyphenol의 함량이 높다고 하였다(37). Wijesinghe 등(38)의 연구에 의하면, 감태 에탄올 추출물에 높은 TPC(total phenolic compounds) 함량을 나타내었고 대황 에탄올 추출물에도 TPC의 함량이 높다고 보고되었다(39). 이러한 해조류의 phenolic 화합물들은 단백질과 착물을 이루는 친화력이 뛰어난 것으로 알려져 있어 이 물질의 hydroxyl group과 효소의 결합부위가 수소 및 이온결합을 통해 효소와 강한 복합체를 형성함으로써 효소들과 비선택적 침전반응을 통하여 효소의 활성을 저해한 것으로 사료되

**Table 4.** Inhibitory activity of various natural materials against crude HDC from *P. phosphoreum* (Unit: %)

	<i>P. phosphoreum</i>
<i>E. cava</i> EE	31.75±2.39 <sup>a1)</sup>
<i>E. bicyclis</i> EE	25.08±1.79 <sup>b</sup>
<i>S. sagamianum</i> EE	4.91±2.82 <sup>d</sup>
<i>S. thunbergii</i> EE	8.1±0.72 <sup>cd</sup>
<i>M. alba</i> EE	5.80±1.88 <sup>d</sup>
<i>S. chinensis</i> EE	13.37±1.02 <sup>c</sup>
<i>S. chinensis</i> HWE	8.47±1.77 <sup>cd</sup>

Concentration: 1 mg/mL.

<sup>1)</sup>Means in the same column (a-d) bearing different superscripts in samples are significantly different by Duncan's multiple range test ( $P<0.05$ ).

EE, ethanol extract; HWE, hot water extract.

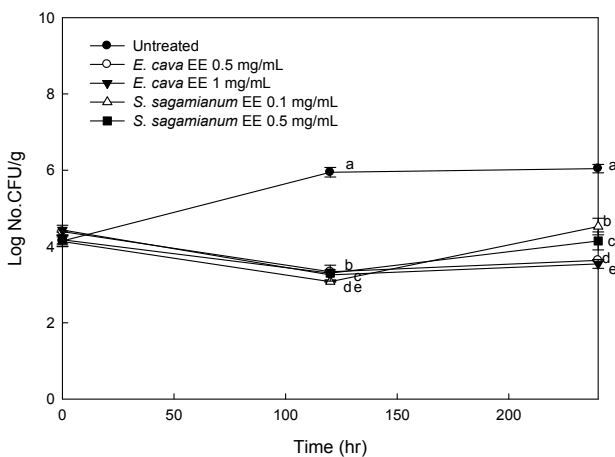
어진다(40).

**항균 천연물에 의한 고등어육 중의 일반 생균수 변화**

*P. phosphoreum*에 대해 항균효과를 보인 천연 추출물을 고등어 육에 첨가함으로써 실제로 고등어 육중에서의 *P. phosphoreum*의 생육을 억제하는지에 대해 알아보았다. 고등어 육에 *P. phosphoreum*를 접종하고 감태 에탄올 추출물을 0.5 및 1 mg/mL, 비틀대 모자반 에탄올 추출물을 0.1 및 0.5 mg/mL 첨가하여 5±1°C에서 저장하며 생균수를 측정하였다. 그 결과(Fig. 1), 저장 0일차에는 무처리와 천연물 첨가 처리구 간의 큰 차이를 보이지 않았으나 저장일차가 증가함에 따라 무처리구의 생균수는 5일 및 10일차에 각각 10<sup>5</sup> 및 10<sup>6</sup> CFU/mL로 점차 증가하였으며, 감태 및 비틀대 모자반 에탄올 추출물을 첨가한 처리구에는 10일차에 각각 10<sup>3</sup> 및 10<sup>4</sup> CFU/mL로 균의 성장이 억제되어 천연물 첨가구가 약 2 log cycle 정도 가량 균이 억제되는 것을 확인할 수 있었다. Lee(41)는 감태 에탄올 추출물이 *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *Listeria innocua*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, *Candida tropicalis* 등에 대해 강한 항균효과를 보인다고 하였으며 비틀대 모자반 추출물을 첨가하여 제조한 빵이 저장기간에 따라 무처리와 비교 시 생균수가 감소하는 결과를 보여 본 연구와 유사한 결과를 보였다(42). 해조류 추출물을 실제로 고등어 육에 적용하여도 항균효과를 보였으며 따라서 감태와 비틀대 모자반 추출물이 고등어의 부패에 관여하는 미생물의 생육을 억제하는 것을 확인할 수 있었다.

**항균 천연물에 의한 고등어육 중의 histamine 생성량 변화**

고등어 내의 histamine 생성 억제는 미생물을 제어하거나 미생물에 의해 생성된 효소를 제어하는 방법이 있다. 해조류 추출물의 *P. phosphoreum*에 대한 항균 효과에 의해

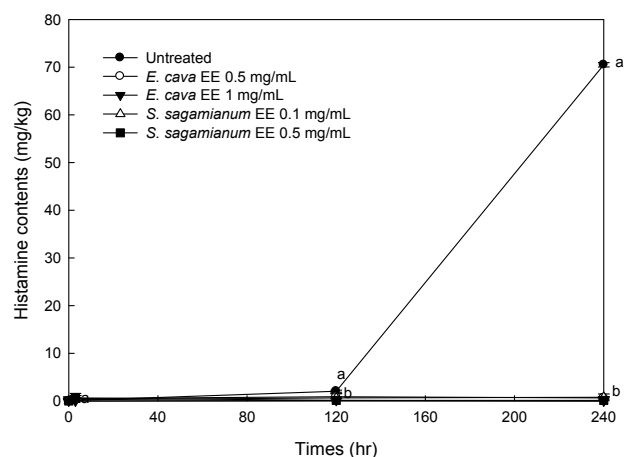


**Fig. 1.** Changes in viable cell counts of mackerel muscle incubated with *P. phosphoreum* treated with *E. cava* and *S. sagamianum* extracts at 5±1°C. Means bearing different superscripts (a-e) among samples are significantly different by Duncan's multiple range test ( $P<0.05$ ).

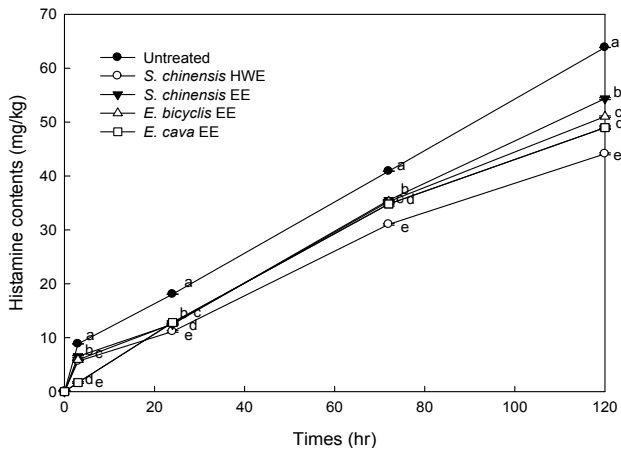
고등어육 내의 histamine 생성 억제 효과를 확인하기 위해서 감태 에탄올 추출물을 0.5 및 1 mg/mL, 비틀대 모자반 에탄올 추출물을 0.1 및 0.5 mg/mL 첨가하여 5±1°C에서 저장하며 histamine의 함량을 측정하였다. 그 결과(Fig. 2), 저장 초기에는 큰 차이를 보이지 않았으나 저장일차가 증가함에 따라 무처리의 histamine 함량은 크게 증가하여 저장 10일차에 histamine 함량이 72 mg/kg으로 증가하였지만 감태 및 비틀대 모자반 에탄올 추출물을 첨가한 처리구에서는 histamine의 함량이 1 mg/kg 이하로 거의 생성되지 않았다. Wendakoon과 Sakaguchi(12)는 histamine 생성균인 *Enterobacter aerogenes*가 유도기 후에 amine이 생성되고 정지기 동안 amine이 최대 생성된다고 보고하였으며, Kanki 등(11)은 sardine homogenate에 *P. phosphoreum*을 접종하였을 때, 대수 증식기에 histamine이 급격하게 증가하였으며 정지기에 histamine 함량이 최대가 되는 것으로 보고하여 본 연구와 유사한 결과를 나타내었다. 이는 앞선 생균수의 결과와 견주어 보면 해조류 추출물로 인하여 생균수가 감소하였고, 그로 인해 *P. phosphoreum*가 생성하는 HDC가 적게 생성되었기 때문에 histamine의 함량이 감소한 것으로 사료되어진다.

**효소 저해 천연물에 의한 고등어육 중의 histamine 생성량 변화**

*P. phosphoreum*로부터 얻은 HDC에 대해 histamine 생성 억제를 보인 천연물 추출물을 고등어 육에 첨가함으로써 실제로 고등어 육중에서의 histamine 생성을 억제하는 지에 대해 알아보았다. 고등어 육에 *P. phosphoreum* 유래 HDC를 접종하고 감태, 대황, 오미자 에탄올 및 열수 추출물을 최종 농도가 5 mg/mL이 되도록 첨가한 후, 5±1°C에서 저장하며 histamine 생성량을 측정하였다. 그 결과(Fig. 3), 무처리가 저장 초기에서부터 저장일차가 증가하여도 천연



**Fig. 2.** Changes in histamine contents of mackerel muscle incubated with *P. phosphoreum* treated with *E. cava* and *S. sagamianum* extracts at 5±1°C. Means bearing different superscripts (a,b) among samples are significantly different by Duncan's multiple range test ( $P<0.05$ ).



**Fig. 3.** Changes in histamine contents of mackerel muscle incubated with crude HDC from *P. phosphoreum* treated with natural materials extracts at  $5\pm 1^\circ\text{C}$ . Means bearing different superscripts (a-e) among samples are significantly different by Duncan's multiple range test ( $P<0.05$ ). Concentration: 5 mg/mL.

물 첨가 처리구보다 전체적으로 높은 histamine 생성량을 나타내었으며 특히, 저장 5일차에 무처리의 경우, 63 mg/kg의 histamine을 생성하였으나 오미자 열수 추출물은 44 mg/kg의 histamine 생성량을 보여 가장 크게 억제함을 확인하였다. 그 다음으로 감태, 대황 및 오미자 에탄올 추출물이 각각 48.87, 51.02 및 54.36 mg/kg의 histamine을 생성하였다. 이러한 결과는 clove, cinnamon, cardamom, turmeric 및 pepper와 같은 향신료를 고등어에 처리하여 저장하면서 biogenic amine의 생성 정도를 측정된 결과, histamine이 감소함을 보인 연구와 유사한 결과를 보였다(13). 이는 향신료에 있는 phenolic 화합물들이 그 효과를 나타낸 것이라 하였으며 해조류 역시 높은 phenolic 화합물을 함유하고 있다(39,40). 따라서 천연물 추출물들이 *P. phosphoreum* 유래 HDC의 작용을 억제하여 histamine 생성이 감소하는 것을 확인하였다.

천연물의 추출물 첨가로 인한 품질의 변화에 대한 연구로는 로즈마리 추출물을 첨가한 고등어의 물성과 색도를 측정된 결과, 첨가량에 따라 경도가 더 좋아지고 명도가 밝아지는 결과를 보였으며 관능평가에서도 무처리와 비교 시 높은 점수를 나타내었다(14). 또한 한방재료를 첨가한 고등어에서도 대조군과 비교 시 물성은 큰 차이를 보이지 않았으며 관능평가에서는 더 높은 점수를 얻어 이러한 추출물 첨가로 인하여 고등어의 다른 품질에 큰 영향을 주지 않으며 오히려 기호성을 높이는 것으로 나타나 본 연구에서도 해조류 추출물의 첨가로 인하여 고등어의 다른 품질에 큰 영향을 미치지 않을 것으로 사료되며 추후 품질평가에 대한 연구가 진행되어야 할 것이다(16).

## 요 약

한약재 및 해조류 추출물에 대한 *Photobacterium phos-*

*phoreum*의 항균력을 측정된 결과, 오미자 열수 및 에탄올 추출물과 감태 및 비틀대 모자반 에탄올 추출물이 항균력을 나타내었으며 비틀대 모자반과 감태 에탄올 추출물이 각각 0.015625 mg/mL, 0.125 mg/mL의 최소저해농도를 나타내었다. *P. phosphoreum* 유래 HDC의 저해 효과를 측정된 결과, 감태와 대황 에탄올 추출물이 1 mg/mL에서 각각 32%, 25%의 높은 저해활성을 나타내었다. *P. phosphoreum*에 대해 항균력과 HDC 저해 효과를 나타낸 천연물을 고등어육에 첨가한 후 균주를 접종하여 생균수 및 histamine 생성량을 측정된 결과, 저장일차가 증가함에 따라 처리구에서 균수가 크게 감소하였다. Histamine의 함량도 다소 감소하였지만 주로 항균활성에 의해 histamine이 저해된 것으로 나타났다.

## 감사의 글

이 논문은 2012년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No. 2012R1A6A1028677).

## REFERENCES

- Lee HN. 2009. Catch and oceanographic characteristics for large purse seine fisheries. *MS Thesis*. Pukyong National University, Busan, Korea.
- Garcia DJ. 1998. Omega-3 long-chain PUFA nutraceuticals. *Food Technol* 52: 44-49.
- Kim JS, Yeum DM, Kang HG, Kim IS, Kong CS, Lee TG, Heu TG. 2002. *Fundamentals and applications for canned foods*. Hyoil Publishing Co., Seoul, Korea. p 32-36.
- Lingnert H, Eriksson CE. 1980. Antioxidative maillard reaction products. I. Products from sugars and free amino acids. *J Food Process Preserv* 4: 161-172.
- Sin SY, Jang MS, Kwon MA, Seo HJ. 2004. Processing of functional mackerel fillet and quality changes during storage. *Korean J Food Preserv* 4: 22-27.
- Lehane L, Olley J. 2000. Histamine fish poisoning revisited. *Int J Food Microbiol* 58: 1-37.
- Derencik M. 1970. Formation of histamine during bacterial decarboxylation of histidine in the flesh of some marine fishes. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 14: 52-60.
- Taylor SL. 1986. Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects. *Crit Rev Toxicol* 17: 91-128.
- Lerke PA, Werner SB, Taylor SL, Guthertz LS. 1978. Scombroid poisoning. Report of an outbreak. *West J Med* 129: 381-386.
- Omura Y, Price RJ, Olcott HS. 1978. Histamine-forming bacteria isolated from spoiled skipjack tuna and jack mackerel. *J Food Sci* 43: 1779-1781.
- Kanki M, Yoda T, Ishibashi M, Tsukamoto T. 2004. *Photobacterium phosphoreum* caused a histamine fish poisoning incident. *Int J Food Microbiol* 92: 79-87.
- Wendakoon CN, Sakaguchi M. 1993. Combined effect of sodium chloride and clove on growth and biogenic amine formation of *Enterobacter aerogenes* in mackerel muscle extract. *J Food Protect* 56: 410-413.
- Shakila RJ, Vasundhara TS, Rao DV. 1996. Inhibitory effect

- of spices on in vitro histamine production and histidine decarboxylase activity of *Morganella morganii* and on the biogenic amine formation in mackerel stored at 30 degrees C. *Z Lebensm Unters Forsch* 203: 71-76.
14. Ju HW. 2011. Quality evaluation of marinade mackerel with rosemary extract. *Korean J Culinary Res* 17: 221-230.
  15. Nam KH, Jang MS, Lee DS, Yoon HD, Park HY. 2011. Effect of green tea and lotus leaf boiled water extracts treatment on quality characteristics in salted mackerel during storage. *Korean J Food Preserv* 18: 643-650.
  16. Hong JY, Nam HS, Huh SM, Shin SR. 2005. Changes on the rheology of salted mackerel by treatment of Korean herbal extracts and methods of storage. *Korean J Food Preserv* 12: 578-582.
  17. Kuda T, Kunii T, Goto H, Suzuki T, Yano T. 2007. Varieties of antioxidant and antibacterial properties of *Ecklonia stolonifera* and *Ecklonia kurome* products harvested and processed in the Noto peninsula, Japan. *Food Chem* 103: 900-905.
  18. Lee SY. 2010. Identification and mechanism of action of antimicrobial substance from brown algae. *PhD Dissertation*. Pukyong National University, Busan, Korea.
  19. Jung JY, Kim KBWR, Lee CJ, Kwak JH, Kim MJ, Kim DH, Sunwoo C, Kim TW, Ahn DH. 2011. Inhibitory effect of *Ecklonia cava* extracts against lipase activity and stability effect of temperature and pH on their activity. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 969-974.
  20. Kim JA, Lee JM, Shin DB, Lee NH. 2004. The antioxidant activity and tyrosinase inhibitory activity of phloro-tannins in *Ecklonia cava*. *Food Sci Biotechnol* 13: 476-480.
  21. Moon HE, Islam N, Ahn BR, Chowdhury SS, Sohn HS, Jung HA, Choi JS. 2011. Protein tyrosine phosphatase 1B and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory phlorotannins from edible brown algae, *Ecklonia stolonifera* and *Eisenia bicyclis*. *Biosci Biotechnol Biochem* 75: 1472-1480.
  22. Chung KH, Lee SH, Lee YC, Kim JT. 2001. Antimicrobial activity of omija (*Schizandra chinensis*) extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 127-132.
  23. Jung GT, Ju IO, Choi JS, Hong JS. 2000. The antioxidative, antimicrobial and nitrite scavenging effects of *Schizandra chinensis* RUPRECHT (omija) seed. *Korean J Food Sci Technol* 32: 928-935.
  24. Tanase S, Guirard BM, Snell EE. 1985. Purification and properties of a pyridoxal 5'-phosphate-dependent histidine decarboxylase form *Morganella morganii* AM-15. *J Biol Chem* 260: 6738-6746.
  25. Kanki M, Yoda T, Tsukamoto T, Baba E. 2007. Histidine decarboxylase and their role in accumulation of histamine in tuna and dried saury. *Appl Environ Microbiol* 73: 1467-1473.
  26. Sato T, Horiuchi T, Nishimura I. 2005. Simple and rapid determination of histamine in food using a new histamine dehydrogenase from *Rhizobium* sp. *Anal Biochem* 346: 320-326.
  27. Lee JY, Min YK, Kim HY. 2001. Isolation of antimicrobial substance from *Schizandra chinensis* Baillon and antimicrobial effect. *Korean J Food Sci Technol* 33: 389-394.
  28. Lee SH, Lee YC, Yoon SK. 2003. Isolation of the antimicrobial compounds from omija (*Schizandra chinensis*) extract. *Korean J Food Sci Technol* 35: 483-487.
  29. Ryu JW. 2009. Study on antibacterial activities of eckol isolated from the *Ecklonia cava*. *MS Thesis*. Wonkwang University, Iksan, Korea.
  30. Choi JG, Kang OH, Brice OO, Lee YS, Chae HS, Oh YC, Sohn DH, Park H, Choi HG, Kim SG, Shin DW, Kwon DY. 2010. Antibacterial activity of *Ecklonia cava* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. *Foodborne Pathog Dis* 7: 435-441.
  31. Horie S, Tsutsumi S, Takada Y, Kimura J. 2008. Antibacterial quinone metabolites from the brown alga, *Sargassum sagamianum*. *Bull Chem Soc Jpn* 81: 1125-1130.
  32. Jung JY, Kim KBWR, Lee CJ, Kwak JH, Kim MJ, Kim DH, Sunwoo C, Kim TW, Ahn DH. 2011. Inhibitory effect of *Ecklonia cava* extracts against lipase activity and stability effect of temperature and pH on their activity. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 969-974.
  33. Eom SH, Lee MS, Lee EW, Kim YM, Kim TH. 2012. Pancreatic lipase inhibitory activity of phlorotannins isolated from *Eisenia bicyclis*. *Phytother Res* 27: 148-151.
  34. Eom SH, Lee SH, Yoon NY, Jung WK, Jeon YJ, Kim SK, Lee MS, Kim YM. 2011.  $\alpha$ -Glucosidase- and  $\alpha$ -amylase-inhibitory activity of phlorotannins from *Eisenia bicyclis*. *J Sci Food Agric* 92: 2084-2090.
  35. Lee SH, Li Y, Karadeniz F, Kim MM, Kim SK. 2009.  $\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitory activities of phloroglucinal derivatives from edible marine brown alga, *Ecklonia cava*. *J Sci Food Agric* 89: 1552-1558.
  36. Kang SM, Heo SJ, Kim KN, Lee SH, Yang HM, Kim AD, Jeon JY. 2012. Molecular docking studies of a phlorotannin, dieckol isolated from *Ecklonia cava* with tyrosinase inhibitory activity. *Bioorg Med Chem* 20: 311-316.
  37. Bitou N, Ninomiya M, Tsujita T, Okuda H. 1999. Screening of lipase inhibitors from marine algae. *Lipids* 34: 441-445.
  38. Wijesinghe WAJP, Ko SC, Jeon YJ. 2011. Effect of phlorotannins isolated from *Ecklonia cava* on angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity. *Nutr Res Pract* 5: 93-100.
  39. Kwon TH, Kim TW, Kim CG, Park NH. 2013. Antioxidant activity of various solvent fractions from edible brown alga, *Eisenia bicyclis* and its active compounds. *J Food Sci* 78: C679-684.
  40. Deaville ER, Green RJ, Mueller-Harvey I, Willoughby I, Frazier RA. 2007. Hydrolyzable tannin structures influence relative globular and random coil protein binding strengths. *J Agric Food Chem* 55: 4554-4561.
  41. Lee SY. 2006. Antimicrobial activity of seaweeds extract for food spoilage and food poisoning microorganism. *MS Thesis*. Pukyong National University, Busan, Korea.
  42. Kim MJ, Kim KBWR, Lee CJ, Kwak JH, Kim DH, Sunwoo C, Jung SA, Kang JY, Kim HJ, Choi JS, Choi HD, Ahn DH. 2011. Effect of *Sargassum sagamianum* extract on shelf-life and improved quality of morning bread. *Korean J Food Sci Technol* 43: 723-728.