

두부 부패 미생물에 대한 여뀌 추출물의 항균활성과 저장성 연구

오 광 렬¹⁾ · 안 선 정^{2)¶} · 오 선 민³⁾

원광대학교 한의학전문대학원¹⁾ · 신한대학교 식품조리과학부^{2)¶} ·
경희대학교 동서의학대학원³⁾

A Study of Shelf-Life and Antimicrobial Activity on Putrefactive Microorganisms related to Soybean Curd of *Persicaria hydropiper* L. extracts

Kwang Yul Oh¹⁾ · Sun-Choung Ahn^{2)¶} · Sun Min Oh³⁾

Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University¹⁾
Food Science & Culinary Arts, Shin Han University^{2)¶}
East-West Medical Science, Kyung Hee University³⁾

Abstract

The objective of this study was to provide basic data that would help develop the natural preservatives that could replace them. This study examined antibacterial activity and preservative effects in soybean curd. When the concentration of *Persicaria hydropiper* L. was 1,000 ppm in the antibacterial activity by the paper disk law of three cultures(*Bacillus subtilis* KY-3, *Bacillus* sp. KY-7, *Bacillus methylotrophicus* KY-11) selected from 21 kinds of microorganism separated from tofu anaerobes, the clear zone (mm), which was similar to benzoic acid 0.1 M, the comparison group, was measured. The results were as follows. The result of impeding growth in liquid culture indicated considerable suppression of the growth of bacteria in the concentration of 800 ppm and 1,000 ppm respectively. In the measure of MIC, KY-3 and KY-7 were 0.06%, and KY-11 was 0.05%. For the changes in pH by concentration, three cultures and tofu anaerobes were not increased to $10^{5-6}/g$ in 1,000 ppm. In addition, in the search of total number was employed to find the preservative effects of tofu. Therefore, this study expect the *Persicaria hydropiper* L. extract on preservative effects of tofu, which can be easily exposed to food poisoning bacteria in the food safety as well as improving the possibility of natural alternative preservatives.

Key words: *Persicaria hydropiper* L., antibacterial activity, shelf-life, natural preservatives, putrefactive microorganisms

I. 서 론

최근 급격한 사회·경제적 발전과 더불어 인구의 증가와 환경적 오염에 의한 성인병 증가 등에 의해 건강의 예방과 관리를 위한 건강기능성 식

품에 대한 관심과 연구가 증가되고 있다(Choe JS 2003, Yoo KM 2015).

식품산업에서 식품가공시 식품의 부패나 변질은 물리 화학적 작용보다는 미생물에 의한 오염이 원인이어서, 전 세계적으로 식중독이나 전염병

¶: 안선정, food@shinhan.ac.kr, 경기도 의정부시 호암로 95, 신한대학교 식품조리과학부

등을 일으켜 인류 건강에 심각한 문제를 야기시켜 왔으며(Jung JH · Cho SH 2003), 식중독 원인 미생물이나 부패 세균의 증식을 억제하고, 기호성과 안전성 그리고 저장성을 확보할 수 있는 위생적인 방법이나 시스템의 개발을 위하여 다양한 연구들이 진행되고 있다(Yeon JH *et al* 2009).

이러한 연구들은 식품첨가물의 품질과 보존성 그리고 기호성 등을 향상시키는 획기적인 계기가 되었으나, 식품첨가물은 식품과 공존하는 기능적인 의의를 갖는 화학적 합성품으로 엄격한 의미에서는 식품 본래의 성분이 아닌 이물질(Han M Y · Ahn HS 1998)이며, 미량이라도 체내에 흡수되면 50~80%가 호흡기 및 배설기관을 통해 배출되고, 나머지는 잔류하는 것으로(Kim HC · Kim MR 2005) 장기간에 걸쳐 섭취한다면 인체 내에 축적될 뿐만 아니라, 중앙유전자를 활성화시키는 발암물질이라는 보고(Choi OK *et al* 2000)도 있어 소비자들의 인식이 매우 부정적이다(Oh DW *et al* 1998; Choi SH *et al* 2008).

소비자들은 합성 첨가물에 대한 안전성의 문제로 천연항균성을 가진 물질로 식품에 안전하게 사용하기를 희망하며, 천연물의 항균작용에 대한 연구는 다양한 식물이 유해 미생물에 대해 항균활성을 가지는 것으로 보고되고 있다.

식물류 중에는 생체리듬을 조절하고, 면역계를 활성화시키는 생리적 기능을 가진 다양한 종류의 식물들이 서식하고 있으며, 이들은 phytoalexin이라는 2차 대사물질을 생합성하여, 주로 곤충이나 동물의 섭식 또는 미생물의 공격에 대한 방어 수단으로 사용한다(Hwang JJ *et al* 2012). 이러한 생리활성 물질 중에 항균성을 지닌 식물유래 물질인 phenol과 flavonoid는 미생물의 대사 작용에 결합하여 성장을 억제시키고(Peres MT *et al* 1997), terpenoid와 phenolic은 미생물의 세포막을 파괴하는 기작을 가지고 있다는 보고(Lambert RJT *et al* 2001)가 있으며, coumarin과 alkaloid는 유전자 수준에서 미생물의 성장을 억제한다고 하였다(Hoult JRS · Paya M1996). 이와 같이 식물계에 널리

분포되어 있는 페놀성 화합물은 항산화 및 항균활성 기능의 생리활성을 나타내는 물질로 잘 알려져 있다(Kim MJ · Ryu MJ 2012).

여뀌는 마디풀과에 속하는 쌍떡잎식물로 원산지는 중국, 대만, 일본이며, 주로 북반구 온대 아열대지방에 분포하고, 우리나라 전역에 자생한다. 일본에서 잎을 향신료로 사용하고, 유럽에서는 황색의 염료 또는 열매를 후추 대용으로 이용되며, 한방에서는 수교(水膠), 택요(澤蓼), 천요(川蓼), 수홍화(水紅花), 홍요자초(洪蓼子草)라고 한다. 본초강목(本草綱目 1993)에서는 “여뀌는 맛이 맵고 성질이 따뜻하여 독이 없다”고 기술하고, 소염, 해독, 지갈, 이뇨 등에 효능이 있으며, 근육통, 류마티스, 신경통 등 민간요법으로 이용되었다 (Marples RR 1974, 한국약용식물연구회 2009).

여뀌는 quercetin, galloyl quercetin, galloylkaempferol 3-glucoside, kaempferol-3-glucoside 6-hydroxyapigenin, scutillarein 6-hydroxyluteolin, 6-hydroxyluteolin-7-O-β-D-glucopyranoside quercetion, 3-O-β-D-glucuronide 등의 flavonoids를 함유하고 있으며, 항산화 활성과 지혈작용, 지질과산화 억제작용 및 항균작용 등이 있는 것으로 보고되고 있다(Kim JE *et al* 2010, Zhoh CK *et al* 2002).

대두에는 여러 기능성 성분들이 함유되어 있으며, 생리활성물질로 색소성분인 isoflavone 등이 있어 유방암, 난소암 등의 예방과 심장병, 골다공증, 동맥경화에 도움이 되고, 인지질은 고혈압을 예방하고, 레시틴은 뇌의 활성을 도와 치매를 예방, 올리고당과 식이섬유는 장속의 유익균인 비피더스균을 도와서 정장작용과 변비를 예방한다고 보고되고 있다(Kim MS *et al* 2012).

그러나 대두의 trypsin inhibitor가 전체 단백질의 6% 정도 포함되어 있으며, 적혈구의 응고를 촉진시키는 hemagglutinin도 3%가 있고, 기포성을 지닌 saponin도 존재해 단백질의 흡수를 방해하는데, 이들 물질들을 열처리에 의해 열변성을 유도하여 작용능력을 상실하게 해 대두 단백질의 영양가를 향상시키는 방안으로 제조된 것이 두부이

다(Ko KH *et al* 2013).

두부는 소화흡수율이나 영양학적으로 뛰어난 소화기능이 저조한 환자나 유아 및 노약자에게도 유용한 식품이나 80% 이상의 높은 수분함량과 pH가 약 6.0인 두부는 식품안전상 식품관련 식중독 미생물에 쉽게 노출될 수 있어(Bahk GS *et al* 2013) 식품 위해인자에 대한 철저한 관리가 요구되고 있다.

그러므로 두부와 같은 식품위해인자로부터 철저한 관리가 필요한 식품들의 천연보존제 및 생리활성물질의 기능성을 높이는 식품개발의 연구가 필요하며, 기존의 마늘, 강황, 자몽추출물 등(Park YJ *et al* 2003, Park KN *et al* 2007, Jung JH · Cho SH *et al* 2003)의 저장성 연구 외에 천연항균성을 가진 새로운 천연보존제와 생리활성물질로 식품에 적용한 연구는 전무한 실정이다.

이에 여뀌 추출물을 원료로 하여 천연보존제 및 천연물 항균 소재 개발을 위한 기초자료를 제시하고자 본 연구에서는 두부 부패 미생물에 대한 분리 및 동정을 하여 항균활성과 여뀌 추출물을 이용한 두부의 저장성에 관련된 미생물학적, 이화학적인 변화를 측정하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료 및 시료의 추출

본 실험에 사용한 여뀌전초(*Persicaria hydropiper* L.)는 서울 약령시장에서 2015년 6월에 구입하여 미세 분쇄하고, 50 mesh의 체에 거른 다음 폴리에틸렌 백에 넣어 보관하며 사용하였고, 실험용 포장 두부는 일반 마트에서 구입하여 냉장보관하며 사용하였다(제조사 P사). 여뀌의 생리활성 물질을 추출하기 위해 용매는 70% ethanol을 사용하였으며, 건조하여 미세 분쇄한 시료 50 g당 중량 대비 10배량의 용매를 혼합하여 상온에서 24시간 동안 교반 침출시켜 1차 추출하고, 다시 용매를 동일한 방법으로 2, 3차 추출한 후, 추출액 모두를 여과지(Whatman No. 2)로 여과하였다. 이

여액을 rotary vacuum evaporator(HS-2005-N, Hahn Shin Scientific co., Kyunggi, Korea)로 60℃ 수욕상에서 회전감압 농축하였으며, 얻은 점조성 추출물은 freeze drying(Ilshin Lab Co., Korea)하여 -70℃ deep freezer(WUF-500, Daihan Scientific, Gangwon, Korea)에 보관하며, 실험에 사용하였다(Jung JH · Cho SH 2003).

2. 일반성분 측정

여뀌 분말의 일반 성분은 AOAC 법에 준수하여 수분은 105℃ 상압 가열법, 조지방은 Soxhlet extraction method, 회분함량은 550℃ 회화법으로 분석하였으며, 탄수화물 함량은 시료 100 g 중에서 수분, 조단백, 지질, 조섬유소, 회분 함량을 감한 값으로 환산하였다. 단백질 함량은 질소 분석기(Vario Max C/N, Elementer Co. Ltd, Hanau, Germany)로 분석하였으며, 분석된 질소 함량에 단백질 계수 6.25를 곱해서 단백질함량으로 표기하였다.

3. 부패 미생물의 분리 및 선별

두부 부패 미생물의 분리는 Joo GT *et al*(1998)의 방법을 변형하여 실시하였으며, 일반 마트에서 쉽게 구입이 가능한 PET 용기에 물과 함께 침적되어 있는 P사의 포장두부(85×55×45 mm)를 사용하였다. 포장두부를 실온(25~30℃)에서 5일 정도 방치하면서 변패취, 기포 발생, 물의 탁도 변화 등의 관능검사를 통하여 부패시점을 정하고, 부패미생물의 분리원으로 하였다. 이미 두부 부패 미생물의 분리원으로 제조된 침지액 1 mL를 0.9% 멸균생리 식염수(NaCl)로, 생균수 10³~10⁵배가 되도록 희석한 다음 nutrient agar(NA)에 각각 0.1 mL씩 도말하여 37℃ incubator(IB-01, Jeio, Seoul, Korea)에서 24시간 배양한 후, 각각의 colony 형태 및 색깔 등으로 분류하여 서로 다른 colony를 확보하고, 현미경으로 형태상 순수성을 확인하여 시험균주로 사용하였다. 이 과정에서 분리된 21종의 균주를 대상으로 spore 염색을 실시하여 포

자 형성 유무를 확인하고, spore 형성 균 중 균락의 형태가 큰 순서로 3균주를 선별하였다.

4. 선별 미생물의 동정

부패 두부에서 분리 선별한 3균주들을 16S r-RNA gene을 이용하여 동정하기 위해 LB(Luria Bertani media) broth에 희석 접종 배양한 후, 염기서열 분석을 (주)S사에 의뢰하였다. 각 cell에서 genomic DNA를 추출한 후 16S rDNA gene을 증폭하기 위해 사용한 primer는 27F(5'-AGAGTTT-GATCMTGGCTCA-3')와 1492R(5'-TA-CGGYT-ACCTTGTTACGACTT-3')을 사용하였다. 분석된 염기서열에 이용한 분리 균주의 동정은 미국 NCBI(National Center for Biotechnology Information)에서 제공하는 BLAST를 이용하여 염기서열 상 등비율을 99% 이상으로 하였다.

5. 항균 활성 측정

1) Paper Disk 법에 의한 항균 활성

여뀌추출물(70% ethanol)의 항균활성 1차 측정 은 paper disk법(Davidson & Parish 1989)을 응용하였다. 1차적으로 분리된 21가지 두부 부패 미생물을 1백금이씩 취해 TSB(Tryptic Soy Broth, Difco)가 10 mL 들어 있는 시험관에 접종하여 30°C에서 24시간 배양하고, petri dish에 10 mL씩 nutrient agar를 분주하여 응고와 건조를 유도하며, 여기에 각 공시균주의 배양액 0.1 mL를 spreader로 균일하게 도말하였다. 그리고 멸균된 paper disk(8mm Advantec. Toyo Roshi Co., Japan)에 동결 건조한 여뀌 추출물을 용해하여 고형분 시료에 함량이 각각 40 μ L 되도록 흡수시켜, 균주가 도말된 plate 표면에 올려놓고 4°C에서 1시간 방치한 후 37°C에서 24시간 배양시켜 paper disk 주변에 생성된 생육저해환(incubator zone, mm)의 크기를 vernier caliper(Mitutoyo Co., Tokyo, Japan)로 측정하였다. 또한, 분리 동정되어 선별된 KY-3, KY-7, KY-11 등의 3균주를 농도별(200, 400,

800, 1,000 ppm)로 나누어 2차 측정하였으며, 대조군으로는 0.1M의 benzoic acid를 사용하였다.

2) 액체배양(Liquid Culture)에서 생육저해 효과 측정

여뀌의 70% ethanol 추출물을 두부 부패 미생물로부터 선별된 3가지 균주(KY-3, KY-7, KY-11)에 적용하여 liquid culture에서 생육저해 효과를 측정하였다. 추출물 시료의 농도(w/v)가 각각 0 ppm, 200 ppm, 400 ppm, 800 ppm, 1,000 ppm이 되도록 조절된 액체 배지에 활성화된 배양액을 0.1 mL씩 접종한 후, 37°C에서 24시간 동안 배양하면서 2시간 간격으로 균의 생육정도를 측정하였다. 균의 생육정도는 UV/Visible 흡광도계(UV-1601, Shimadzu Co., Kyoto, Japan)를 이용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 시간에 따른 흡광도의 변화로 균의 생육정도를 나타내었다.

3) 최소저해농도(Minimum Inhibitory Concentration, MIC) 측정

최소저해농도는 액체배지희석법(broth dilution method)으로 측정하였다. 9.8 mL 액체배지에 농도별로 조제한 추출물을 0.1 mL 첨가한 후 optical density(O.D) 값이 0.3이 되도록 희석한 균액을 0.1 mL씩 접종하였다. 37°C에서 24시간 배양한 후 배양액의 O.D. 값을 600 nm에서 96 plate well (BD, New Jersey, USA)을 사용하여 microplate reader(SPECTRA MAX 340, Molecular Devices, California, USA)로 균의 생육억제효과를 측정하였으며, blank 실험은 각 세균 배양용 액체배지에 시료만 첨가하여 균증식이 나타나지 않은 농도를 MIC로 결정하였다.

6. 두부의 저장성 측정

1) 농도별 pH 안전성 측정

pH 측정은 포장두부 10 g에 멸균 증류수 50

mL를 혼합하여 stomacher(LB w400, TMC, Korea)로 마쇄한 현탁액을 여과지(Whatman No. 2)로 여과한 후 그 여액을 이용하였다. 여액 10 mL를 취하여 pH meter를 이용하여 직접 측정하였으며, 농도별(Control, 500 ppm, 1,000 ppm)과 시간별(0, 12, 24, 36, 48, 60, 72시간)로 pH의 변화를 나타내었다.

2) 농도별 총균수 측정

두부 부패미생물의 분리원으로 제조된 침지액을 준비된 포장두부(85×55×45 mm) 6개에 각각 10 μ L씩 첨가하고, 여기에 다시 여뀌 70% ethanol 추출물을 0 ppm, 200 ppm, 400 ppm, 800 ppm, 1,000 ppm씩 농도별로 주입하였으며, 0.1 M의 benzoic acid도 대조군으로 분류하여 제조하였다. 이와 같이 제조된 6개의 포장두부를 25°C 상온에 배양하면서, 저장기간(제조직후, 24, 48, 72시간)에 따라 채취한 각각의 두부 침지액 0.1 mL를 멸균된 0.9% NaCl 용액과 함께 10진법으로 희석하고, 표준 한천 배지에 도말하여 37°C incubator에서 24시간 배양한 후 형성된 colony를 계측하였고, 시료 mL당 colony forming units (CFU/mL)로 나타내었다.

7. 통계처리

본 연구의 자료는 SPSS(Statistical Package for Social Sciences, SPSS, Inc., Chicago, IL, USA, ver. 18.0)을 이용하여 평균과 표준편차를 구하였고, ANOVA 분석을 하였다. 시료간의 유의성 차이는 $p < 0.05$ 수준에서 검정을 실시하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 일반성분

여뀌(분말형태)의 일반성분은 <Table 1>과 같이 조수분 5.07%, 조단백 4.90%, 조지방 2.16%, 탄수화물 83.80%, 조회분 5.0%로 나타났다.

2. 선별된 부패 미생물의 동정

분리된 21종의 두부부패 미생물 중 성장이 양호하고, 분리원의 수가 많고 뚜렷하게 다른 KY-3, KY-7, KY-11의 3균주를 선별하여 동정한 결과는 <Table 2>에 나타내었다. 선별된 3균주 모두 gram 양성 균으로 포자를 형성하였다. 이렇게 선별된 3균주들을 동정하기 위하여 16S rRNA gene을 이용하였고, LB broth에 희석 접종 배양한 후 염기서열 분석을 (주)솔벤트에 의뢰하였다. 그 결과,

<Table 1> General composition of *Persicaria hydropiper* L. (mg/100 g, dry basis)

Variable	Moisture	Crude protein	Crude lipid	Carbo hydrate	Crude ash
<i>Persicaria hydropiper</i> L.	5.07±0.01 ¹⁾	4.90±0.02	2.16±0.01	83.80±0.17	5.0±0.02

¹⁾ Mean±SD(n=3).

<Table 2> Identification of selected strains isolated from soybean curd

Identification	Strain No.		
	KY-3	KY-7	KY-11
Shape	Rod	Rod	Rod
Gram staining	+	+	+
Spore staining	+	+	+
16s rRNA identification	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus methylotrophicus</i>

〈Table 3〉 Antimicrobial activity of *Persicaria hydropiper* L. ethanol extract against spoilage bacteria isolated from commercial soybean curd

Strains No.	Clear zone	Strains No.	Clear zone
KY-1	+ ¹⁾	KY-11	+
KY-2	- ²⁾	KY-12	+
KY-3	+	KY-13	+
KY-4	+	KY-14	+
KY-5	+	KY-15	+
KY-6	+	KY-16	+
KY-7	+	KY-17	+
KY-8	+	KY-18	-
KY-9	+	KY-19	-
KY-10	+	KY-20	-
		KY-21	-

¹⁾ +; Clear zone diameter : >10 mm.

²⁾ -; no activity.

KY-3는 *Bacillus subtilis*, KY-7은 *Bacillus* SP. 그리고 KY-11은 *Bacillus methylotrophicus*로 동정되었다.

2. Paper Disk법에 의한 항균 활성

분리한 두부 부패 미생물에 대한 여뀌 70% ethanol 추출물의 항균활성을 측정된 결과는 〈Table 3〉과 같다. 분리된 두부 부패 미생물 21균주 중 KY-2, KY-18, KY-19, KY-20, KY-21을 제외한 16균주에서는 10 mm 이상의 clear zone을 형성하여 강한 항균 활성을 나타내었다. 두부 부패 미생물에서 분리 선별하여 동정한 3균주 *Bacillus subtilis* KY-3, *Bacillus* SP. KY-7, *Bacillus methylotrophicus* KY-11에 대한 여뀌 70% ethanol 추출물의 paper disk diffusion에 의한 농도별 항균 측정 결과는 〈Table 4〉와 같다. 여뀌 추출물의 첨가가 200 ppm 농도에서는 3균주 모두 항균활성이 나타나지 않았으나, 800 ppm 농도에서는 *Bacillus subtilis* KY-3에서 12.0 mm, *Bacillus* SP. KY-7에서 11.0 mm, *Bacillus methylotrophicus* KY-11에선

10.0 mm 등의 크기로 clear zone이 형성되었다. 그러나 1,000 ppm 농도에서는 *Bacillus subtilis* KY-3가 15.0 mm, *Bacillus* SP. KY-7은 14.0 mm, *Bacillus methylotrophicus* KY-11이 15.0 mm로 나타나, 대조군과 유사한 경향을 보여 1,000 ppm 농도에서는 매우 뛰어난 항균 활성을 보였다. 이와 같은 결과는 단삼 추출물이 gram 양성균과 특히 *Bacillus subtilis*에서 가장 항균 활성이 뛰어났다고 보고한 연구(Mok JK *et al* 1995)와 일치하는 경향을 보였다. Kim KH *et al*(1999)은 질경이도 2,000 µg/mL 농도에서 단삼과 비슷한 결과를 얻었다는 보고가 있어 본 연구 결과와 유사하게 나타났다. 따라서 본 실험에서는 여뀌 추출물의 항균력을 농도별로 분석함으로써, 두부뿐만 아니라 각종 식품에 적용하기가 용이할 것으로 판단되며, 이상의 결과로 볼 때, 여뀌 추출물은 천연보존제로서의 활용 가능성이 있는 것으로 사료된다.

3. 최소저해농도(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)

〈Table 4〉 Antimicrobial activity of *Persicaria hydropiper* L. ethanol extract against *Bacillus* sp. isolated from soybean curd

Strains	Clear zone diameter (mm)				
	B	1	2	3	4
<i>Bacillus subtilis</i> KY-3	16	- ¹⁾	9	12	15
<i>Bacillus</i> sp. KY-7	16	-	-	11	14
<i>Bacillus smethylotrophicus</i> KY-11	16	-	9	10	15

B : 0.1M Benzoic acid.

1 : 200 ppm, 2 : 400 ppm, 3 : 800 ppm, 4 : 1,000 ppm.

¹⁾ -: no activity.

두부 부패 미생물에 대한 여뀌 70% ethanol 추출물의 최소저해농도(MIC) 측정 결과는 〈Table 5〉와 같다. 두부 부패 미생물인 *Bacillus subtilis* KY-3의 최소저해농도(MIC)는 0.06%로 측정되었으며, *Bacillus* SP. KY-7과 *Bacillus methylotrophicus* KY-11은 각각 0.05%에서 미생물이 더 이상 관찰되지 않아 낮은 농도에서도 높은 항균성을 보였다. Koh MS(2004)는 삼백초 ethanol 추출물이 *B. subtilis*에 대하여 최소저해농도(MIC)가 5 mg/mL로 나타났다고 하였으며, Park & Lim(2010)도 조릿대 잎 ethanol 추출물이 *B. subtilis*에 대하여 50 µL/disk가 최소저해농도(MIC)라고 하였다. Shin DH *et al*(1997)의 한약재 추출물들의 항균효과 검색에서 본 연구와 일치하는 경향을 보여, 여뀌 추출물의 항균효과도 gram 양성 계통에서 항균활성이 높을 것으로 유추할 수 있다.

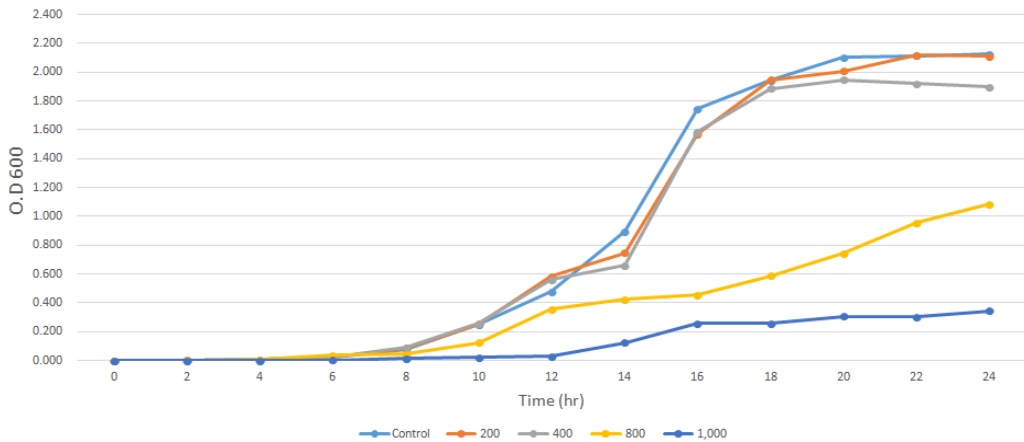
4. Liquid Culture에서 생육저해 효과

여뀌 추출물의 농도(w/v)를 달리한 liquid culture에서 선별된 두부 부패 미생물 중 3가지 균주

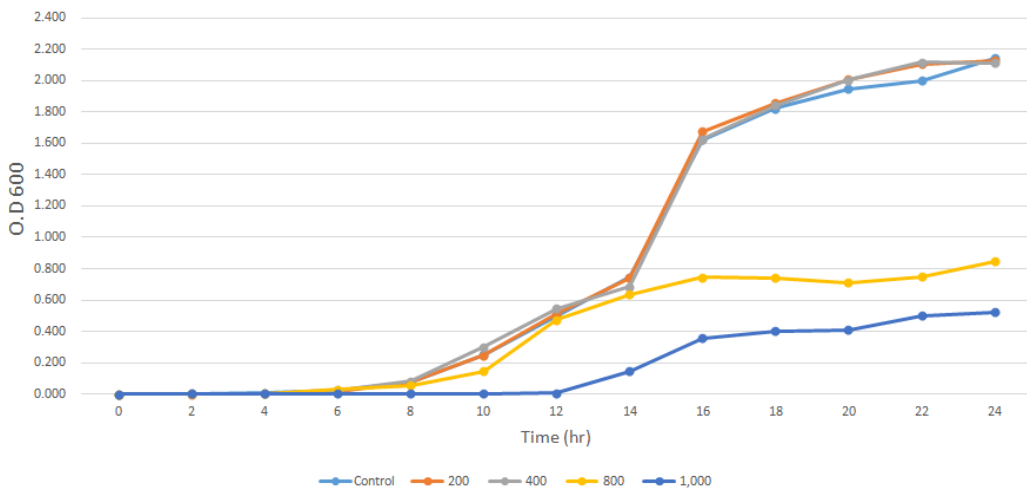
를 접종시킨 후, 37°C에서 24시간 동안 2시간 간격으로 균의 생육정도를 UV/visible 흡광광도계를 사용하여 생육저해 효과를 측정하였으며, 측정된 결과는 〈Fig. 1〉~〈Fig. 3〉과 같다. 〈Fig. 1〉에서 보는 gram 양성균인 *Bacillus subtilis* KY-3 경우에는 200 ppm과 400 ppm에서 생육저해가 배양 14시간 이후에는 거의 영향을 미치지 못하였고, 800 ppm에서 배양 16시간까지는 균의 성장억제력이 미세하게 지속되었으나, 18시간부터는 성장억제력이 둔화되는 형태를 보였다. 그러나 1,000 ppm에서는 배양 12시간까지 균의 생장이 완전히 억제되었고, 그 이후부터는 미세한 증식이 나타났다. 〈Fig. 2〉에서 보는 gram 양성균인 *Bacillus* SP. KY-7은 농도가 200 ppm과 400 ppm에서는 14시간 이후에 control과 같은 수준의 균 증식이 가파른 증가 추세로 나타났으나, 800 ppm에서는 배양 12시간을 지나면서 어느 정도의 성장 억제력을 보였고, 1,000 ppm에서 배양 12시간까지는 균의 성장억제가 완벽했으며, 그 이후로 완만하게 지속되었다. 〈Fig. 3〉에서 보는 gram 양성균인 *Baci-*

〈Table 5〉 The minimum inhibitory concentration(MIC) of *Persicaria hydropiper* L. ethanol extract against *Bacillus* sp. isolated from commercial soybean curd

Strains	MIC (%)
<i>Bacillus subtilis</i> KY-3	0.06
<i>Bacillus</i> sp.	
<i>Bacillus</i> sp. KY-7	0.05
<i>Bacillus methylotrophicus</i> KY-11	0.05



<Fig. 1> Growth curve of *Bacillus subtilis* KY-3 isolated from commercial soybean curd in LB broth with various concentrations of *Persicaria hydropiper* L. ethanol extract during incubation for 24 hours at 37°C.



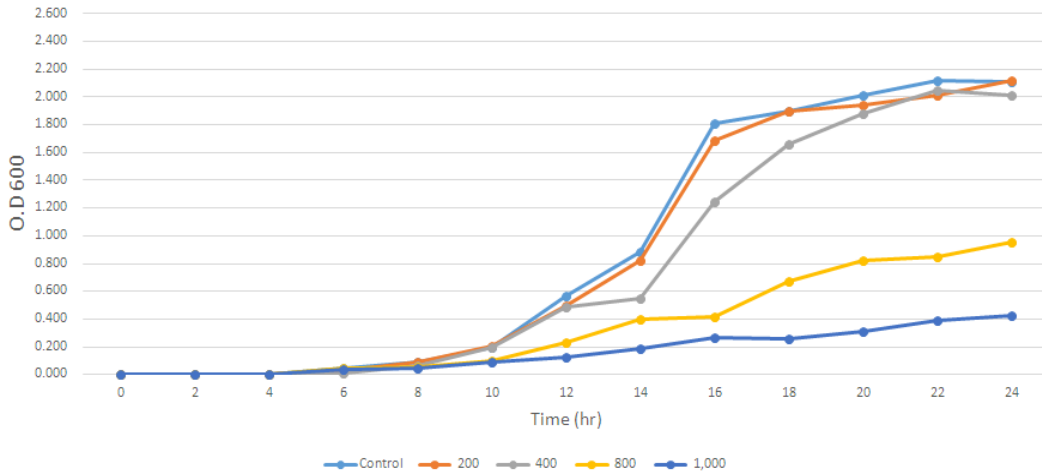
<Fig. 2> Growth curve of *Bacillus* sp. KY-7 isolated from commercial soybean curd in LB broth with various concentrations of *Persicaria hydropiper* L. ethanol extract during incubation for 24 hours at 37°C.

illus methylotrophicus KY-11은 400 ppm에서 *Bacillus subtilis* KY-3과 *Bacillus* SP. KY-7보다 배양 12~20시간 사이에 약간의 생장억제가 나타나는 특징을 보였으나, 800 ppm, 1,000 ppm에서는 두 균주와 비교하여 유의적인 차이는 없었다 ($p < 0.05$). 따라서 본 연구결과, 두부부패 미생물에서 선별된 3가지 균주는 배양 8시간 전에는 어떤 농도에서도 균의 증식이 전혀 없었음을 알 수 있

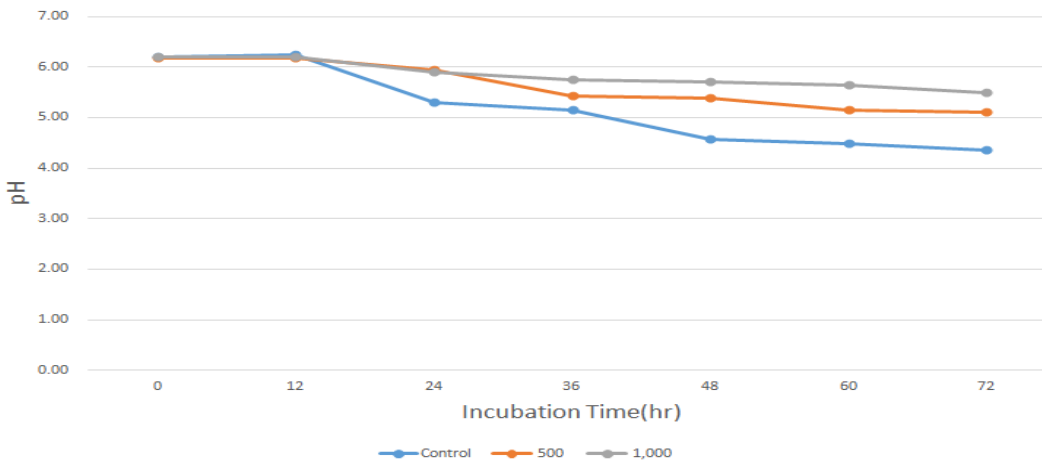
었으며, 다만 1,000 ppm 농도에서는 매우 높은 생육저해 효과가 있는 것으로 나타나 paper disk 법에 의한 항균활성 2차 측정과도 결과가 유사하였는데, 이는 여뀌에 함유된 다양한 항균성 물질에서 기인한 것으로 판단된다(Kim JE *et al* 2010).

5. 두부 저장성 측정

1) 두부의 농도별 pH 변화



<Fig. 3> Growth curve of *Bacillus methylotrophicus*. KY-11 isolated from commercial soybean curd in LB broth with various concentrations of *Persicaria hydropiper* L. ethanol extract during incubation for 24 hours at 37°C.

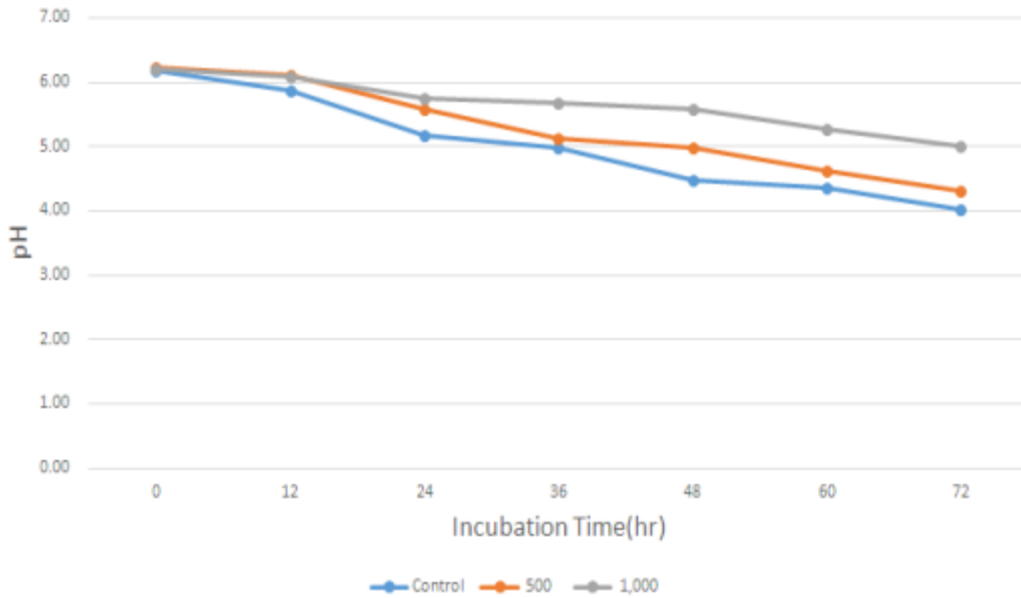


<Fig. 4> Effect of *Persicaria hydropiper* L. ethanol extract on pH changes of artificially contaminated soybean curd with *Bacillus subtilis* KY-3 during storage for 72 hours at 25°C.

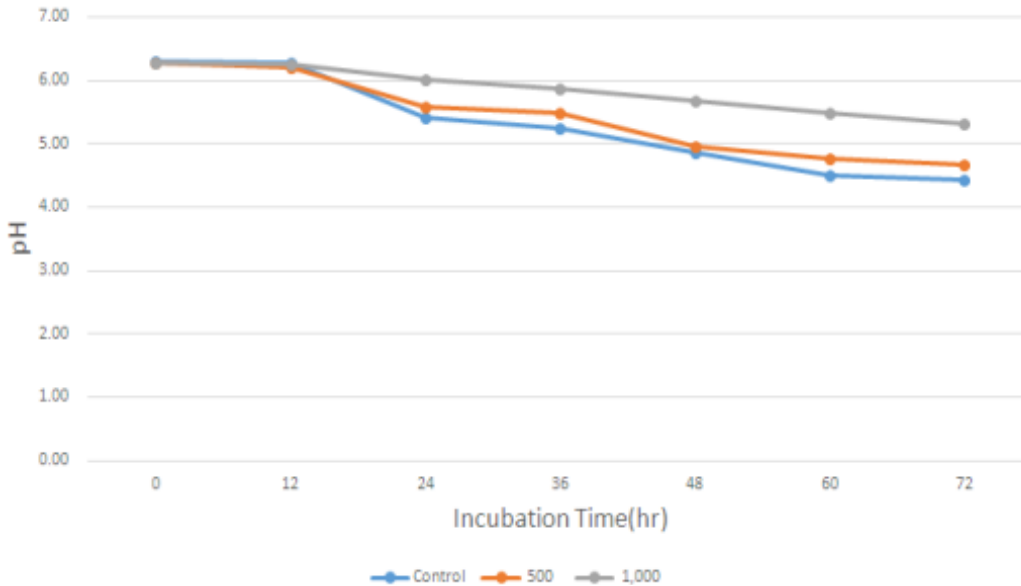
<Fig. 4>~<Fig. 6>은 *Bacillus subtilis* KY-3, *Bacillus* SP. KY-7, *Bacillus methylotrophicus* KY-11 등을 오염시킨 두부를 25°C에서 72시간 동안 pH 변화를 나타낸 결과이다. *B. subtilis* KY-3를 접종한 대조군 두부의 pH는 저장 12시간까지는 거의 변화가 감지되지 않았으나, 저장 24시간부터는 급격한 변화가 일어났다. 따라서 저장 72시간이 경과한 후에는 대조군의 pH가 4.32일 때,

여뀌 추출물을 500 ppm 첨가한 첨가군은 5.21, 1,000 ppm 첨가군에서는 5.63으로 나타났으나, 유의한 차이는 없는 것으로 나타났다($p < 0.05$).

Bacillus SP. KY-7는 대조군의 pH가 저장 12시간부터 변화가 각각 4.36, 5.02로 나타났다. *B. methylotrophicus* KY-11은 저장 72시간 경과 후 대조군의 pH가 5.48이고, 첨가군의 pH가 각각 4.72, 5.36으로 측정되었다.



<Fig. 5> Effect of *Persicaria hydropiper* L. ethanol extract on pH changes of artificially contaminated soybean curd with *Bacillus* sp. KY-7 during storage for 72 hours at 25°C.



<Fig. 6> Effect of *Persicaria hydropiper* L. ethanol extract on pH changes of artificially contaminated soybean curd with *Bacillus methylotrophicus* KY-11 during storage for 72 hours at 25°C.

Park YJ *et al*(2003)은 마늘을 첨가한 두부를 15 °C에서 9일간 저장하는 동안 pH 변화 추이를 검색한 결과, 저장 4일째 대조군의 pH는 5.10이고, 첨가군은 각각 5.50과 5.70을 나타내어 마늘 첨가

에 따른 두부의 pH 변화가 지연되었다는 보고를 하였다. 또한, Park KN *et al* (2007)은 강황을 첨가한 두부의 저장 중 pH 변화를 측정 한 결과, 저장 2일째 대조군의 pH가 5.20일 때, 첨가군의 pH는

각각 5.74, 5.76으로 다소 높게 나타났다고 보고하여 본 실험과 비슷한 양상을 보였다. 본 실험 결과 동정한 3군주 모두 48시간까지는 여뀌 추출물이 1,000 ppm 농도일 때 두부에서 별다른 변화가 없는 것으로 나타났으며, 특히 *Bacillus subtilis* KY-3은 72시간 경과 후에도 같은 양상을 띠어, *Bacillus subtilis*에 대하여 여뀌 70% ethanol 추출물에 높은 항균활성은 물론 두부 저장성에 영향을 미치는 것으로 생각된다.

2) 농도별 미생물의 변화

두부 부패 미생물을 인위적으로 오염시켜, 제조한 6개의 포장두부에 각각 여뀌의 70% ethanol 추출물을 0 ppm, 200 ppm, 400 ppm, 800 ppm 1,000 ppm 씩의 농도로 주입하여 0, 24, 48, 72시간 동안 25℃ 상온에 보관하면서 살펴본 미생물의 변화는 <Fig. 7>과 같다.

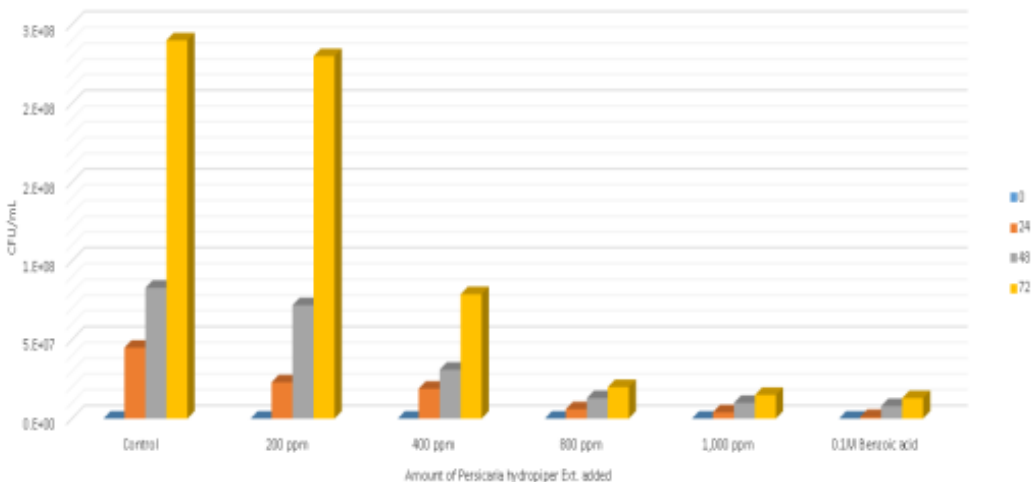
제조 직후 대조군은 0.6×10^2 CFU/mL로 나타났으며, 나머지 첨가군도 비슷한 양상을 띠었다. 그러나 2일이 경과한 후에는 대조군의 총 균수가 4.5×10^7 CFU/mL이었으며, 여뀌 추출물을 200 ppm, 400 ppm 첨가한 첨가군에서는 48시간 경과 후 각각 7.2×10^7 , 3.1×10^7 CFU/mL로 나타난 반면, 800 ppm에서는 1.3×10^7 CFU/mL, 1,000 ppm에서

는 1.0×10^7 CFU/mL로 나타나 미생물의 증식이 억제되는 것으로 나타났다. 1,000 ppm 첨가군과 benzoic acid 0.1 M 대조군은 72시간 후에도 비슷한 항균활성을 보여주었다. Jung JH·Cho SH (2003)은 두부의 세균 증식이 항균성을 가지고 있는 녹차, 라벤더, 로즈마리 등의 허브 첨가에 의해서 억제되어 저장성이 증가된다는 보고를 하였고, Park YJ *et al*(2003)은 두부에 마늘을 첨가한 결과, 4일이 경과한 후 일반두부의 총 균수는 2.34×10^7 CFU/g이었으나, 마늘을 5% 첨가한 두부는 7.80×10^6 CFU/g, 10% 첨가한 두부는 3.64×10^6 CFU /g이었다고 하였다.

이와 같은 결과로 볼 때 여뀌 추출물의 함량이 800 ppm부터 미생물의 성장이 억제되는 현상과 유사한 결과를 나타냈으며, 기후변화에 관련하여 식품부패미생물에 민감한 저온식품인 두부의 저장성을 연장시키는 효과가 있는 것으로 사료된다.

IV. 요약 및 결론

본 연구는 여뀌 추출물을 원료로 하여 천연보존제 및 천연물 항균 소재 개발을 위한 기초자료를 제시하고자 두부 부패 미생물에 대한 분리 및 동정을 하여 항균활성과 여뀌 추출물을 이용한



<Fig. 7> Effect of *Persicaria hydropiper* L. ethanol extract on the total bacteria count in soybean curd during storage for 72 hours at 25℃.

두부의 저장성에 관련된 미생물학적, 이화학적인 변화를 측정하였으며, 연구 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 두부에서 분리한 부패미생물 KY-3, KY-7, KY-11의 3균주를 선별하여 동정한 결과, KY-3은 *Bacillus subtilis*로, KY-7은 *Bacillus* SP.로, KY-11은 *Bacillus methylotrophicus*로 동정되었다.
2. 동정된 3균주의 농도별 항균활성을 알아보기 위하여 Paper disk법에 의한 측정을 실시하였으며, 대조군의 benzoic acid 0.1 M에서는 3균주 모두 clear zone이 16.0 mm로 나타났지만 1,000 ppm 농도에서 KY-3가 15.0 mm를, KY-7이 14.0 mm, KY-11은 15.0 mm로 측정되어 대조군과 비슷한 양상을 보여, 항균활성이 높다는 것을 인지할 수 있었다. 또한, 액체배양에서 생육저해효과는 선별된 3균주(KY-3, KY-7, KY-11) 모두 400 ppm에서는 14시간 경과 후 급속한 균주의 생장이 나타났으나, 1,000 ppm에서는 지속적인 성장억제가 나타났다.
3. 최소저해농도(MIC) 측정결과, KY-3는 0.06%, KY-7 0.05%, KY-11 0.05%로 낮은 농도에서도 성장 억제 효과를 나타내었다.
4. 농도별 pH는 12시간까지는 3균주 모두가 감지되지 않았으나, 24시간 이후 대조군에서 급격히 감소하는 현상을 보였고, 1,000 ppm 농도에서는 저장 48시간 경과 시까지 *B. subtilis* (KY-3) 5.82, *B. SP.* (KY-7) 5.68, *B. methylotrophicus* (KY-11) 5.76으로 두부 부패 균주가 $10^{5-6}/g$ 정도까지 증가하지 않았다.
5. 여뀌의 70% ethanol 추출물을 0, 200, 400, 800, 1,000 ppm씩의 농도로 첨가한 실험용 포장두부 6개를 제조하여 0, 24, 48, 72시간 동안 25°C 실온에 보관하면서 농도별 미생물의 변화를 살펴보았다. 그 결과, 첨가군은 저장 3일부터 대조군과 차이를 보여 여뀌 추

출물의 첨가로 미생물의 증식이 억제되는 것을 알 수 있었으며, 특히 여뀌 70% ethanol 추출물의 1,000 ppm 첨가시 benzoic acid 0.1 M과 첨가군과 비슷한 경향을 보였다.

위의 연구결과에 따라서 여뀌 70% ethanol 추출물은 항균활성이 전반적으로 높게 나타나고 있어, 온도 변화에 관련하여 식품 안전상 식중독 미생물에 쉽게 노출될 수 있는 저온 식품인 두부의 보존효과를 향상시킬 수 있는 것으로 나타나, 천연 대체 보존제로서 식품에 적용 가능성이 높을 것으로 사료되며, 천연대체보존료로서 식품에 적용이 가능할 것으로 판단된다. 향후 식품에 적용할 수 있는 확대연구가 필요하며, 천연 대체보존제 등으로 식품산업에 사용되어 발전할 수 있을 것으로 기대된다.

한글 초록

본 연구는 여뀌 추출물을 원료로 하여 천연보존제 및 천연물 항균 소재 개발을 위한 기초자료를 제시하고자 두부 부패 미생물에 대한 분리 및 동정을 하여 항균활성과 여뀌 추출물을 이용한 두부의 저장성에 관련된 변화를 측정하였으며, 연구 결과는 다음과 같다. 두부 부패 미생물에서 분리된 21종의 미생물 중 선별 동정된 3균주(*Bacillus subtilis* KY-3, *Bacillus* sp. KY-7, *Bacillus methylotrophicus* KY-11)는 paper disk 법에 의한 항균활성 측정에서 여뀌 추출물의 농도가 1,000 ppm일 때, 대조군인 benzoic acid 0.1 M과 유사한 clear zone (mm)이 형성되었으며, liquid culture에서 생육저해 효과 결과는 각각 800 ppm과 1,000 ppm 농도에서 균의 생장이 상당히 억제되었다. MIC 측정에서는 KY-3와 KY-7이 0.06%, KY-11이 0.05%로 나타났고, 농도별 pH 변화는 1,000 ppm 농도에서 3균주 모두 두부 부패 균주가 $10^{5-6}/g$ 까지 증가하지 않았다. 또한, 두부의 보존 효과를 알아보기 위하여 실험한 총 균수 검색에서는 여뀌 추출물군이 미생물의 증식이 억제되는

것을 알 수 있었다. 결론적으로 여뀌추출물은 식품안전상, 식중독 미생물에 쉽게 노출될 수 있는 두부의 저장 효과를 향상시킬 수 있을 것으로 사료되며, 천연대체보존료로서 식품에 적용이 가능할 것으로 판단된다.

주제어: 여뀌, 항균활성, 저장성, 천연보존제, 부패미생물

참고문헌

- 한국약용식물학연구회(2009). 약용식물. 서울. p. 151.
- Bahk GJ, Ha SD, Oh DH (2013). Ranking determination of foods and foodborne pathogens for impact of climate change on microbiological food safety. *J Fd Hyg Safety* 28:36-40.
- Choe JS, Chun HK, Hwang DY, Nam HJ (2003). Consumer perception of food related hazards and correlates of degree of concerns about food. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34:66-74.
- Choi OK, Noh YC, Hwang SY (2000). Antimicrobial activity of grapefruit seed extracts and polysine mixture against food-borne pathogens. *Korean J Dietary Culture* 15:1-7.
- Choi SH, Lee JY, Park EY, Won J, Hong KH (2008). Assessment of estimated daily intakes of preservatives in the Korean population. *Korean J Food Sci Technol* 40:503-509.
- Han MY, Ahn MS (1998). A study on purchase action of processed foods and the recognition for food additives of urban housewives. *Korean J Dietary Culture* 13:119-121.
- Hoult JRS, Paya, M (1996). Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. *Gen Pharmacol* 27:713-722.
- Hwang JT, Park YS, Kim YS, Kim JC, Lim CH (2012). Isolation and identification of antifungal compounds from *Reynoutria elliptica*. *CNU J of Agric Sci* 39(4):583-589.
- Joo GT, Hur SS, Choi YH, Rhee IK (1998). Characterization and identification of bacteria from putrefying soybean curd. *Korean J Postharvest Sci Technol* 5:292-298.
- Jung JH, Cho SH (2003). Effect of steeping treatment in the natural antimicrobial agent solution on the quality control of processed tofu. *Korea J Food preserve* 10:41-46
- Kim HC, Kim MR (2005). Consumer attitudes towards food additives. *J East Asian Soc Dietary Life* 15:126-135.
- Kim HS, Kim MJ, Lee MS, Lee GS, Kim AJ (2012). Quality characteristics of *Nokdu mook* using *Yangha*(*Zingiber mioga* R.) powder. *Korean J Food & Nutr* 25:521-528.
- Kim JE, Kim EH, Park SN (2010). Antibacterial activity of *Persicaria hydropiper* L. extracts and its application for cosmetic material. *Kor J Microbiol Biotechnol* 38:12-115.
- Kim JE, Kim EH, Park SN (2010). Component analysis of *Persicaria hydropiper* L. extracts. *J Soc Cosmet Sci Korea* 36:89-92.
- Kim KH, Oh ST, Jung HO, Han YS (1999). Shelf-life extension of noodle and rice cake by the addition of plantain. *Korean J Sol Food Sci* 15:28-32.
- Kim MJ, Ryu MJ (2012). Inhibition of melanogenesis and anti UV properties *Reynoutria elliptica*. *Korean J Aesthet Cosmetol* 10:961-968.
- Ko KH, Moon SH, Yoo YT, Kim IC (2013). Characteristics of soybean curds manufactured by various bitterns. *Korean J Food Preserv* 20: 37-44.
- Koh MS (2004). Antimicrobial activity of *Saururus*

- chinensis* Baill extract. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33:1098-1105.
- Lambert RJW, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas GJEA (2001). Study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol *J Appl Microbiol* 91:453-562.
- Marples RR (1974). The microflora of the face and acne lesions. *J Invest Dermatol* 62:326-331.
- Mok JK, Kim YM, Kim SH, Chang DS (1995). Antimicrobial property of the ethanol extract from *Salvia miltiorrhiza*. *J Fd Hyg Safety* 10: 23-28.
- Oh DW, Han SS, Park BK (1998). Antimicrobial activities of natural medical herb on the food spoilage or foodborne disease microorganism. *Korean J Food Sci Technol* 30:957-963.
- Park KN, Park LY, Kim DG, Park GS, Lee SH (2007). Effect of turmeric(*Curcuma aromatica* Salab.) on shelf-life of tofu. *Korean J Food Presev* 14:136-141.
- Park YJ, Nam YL, Jeon BR, Oh NS, In MJ (2003). Effects of garlic addition on quality and storage characteristics of soybean curd(Tofu). *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 46:329-332.
- Park YO, Lim HS (2010). Antimicrobial activity of Bamboo(*sasaborealis*) leaves fraction extracts against food poisoning bacteria. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32:1745-1752.
- Peres MT, Monache FD, Cruz AB, Pizzolatti MG, Yunes RA (1997). Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon(Euphorbiaceae). *J Ethnopharmacol* 56: 223-226.
- Shin DH, Kim MS, Han JS (1997). Antimicrobial effect of ethanol extracts from some medicinal herbs and their fractionates against food-born bacteria. *Korea J Food Sci Technol* 29:808-816.
- Yeon JH, Lee JY, Lee HS, Ha SD, Park CS, Woo MJ, Lee SH, Kim JS, Lee C (2009). Evaluation of the natural antimicrobials against yeasts in functional beverages to control quality loss. *J Fd Hyg Safety* 23:273-276.
- Yoo KM (2015). A opinion on the growth & revitalization of health fuction food market. *Food Industry and Nutrition* 20(1):4-7.
- Zhoh CK, Kim BN, Hong SH, Han CG (2002). The antimicrobial effects of natural aromas for substitution of parabens. *J Soc cosmetics Scientist Korea* 28:166-18.

2016년 03월 04일 접수
 2016년 03월 13일 1차 논문수정
 2016년 03월 28일 2차 논문수정
 2016년 04월 14일 논문 게재확정