



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

工學碩士 學位論文

천연물 및 초정수압 처리에 의한
고등어 내의 Histidine
Decarboxylase 저해 활성



2013年 2月

釜慶大學校 大學院

食 品 工 學 科

鄭 슬 아

工學碩士 學位論文

천연물 및 초정수압 처리에 의한
고등어 내의 Histidine
Decarboxylase 저해 활성

指導教授 安 東 賢

이 論文을 工學碩士 學位論文으로 提出함

2013年 2月

釜慶大學校 大學院

食 品 工 學 科

鄭 슬 아

鄭슬아의 工學碩士 學位論文으로 認准함

2013年 2月



주 심 수산학박사 조영제



위 원 공학박사 전병수



위 원 농학박사 안동현



목 차

Abstract	iv
----------------	----

서 론	1
-----------	---

재료 및 방법

1. 실험 재료

1-1. 시료	5
1-2. 시약	5
1-3. 시험균주	6

2. 천연물 및 초정수압 처리

2-1. 천연물 처리	
2-1-1. 시료 추출	6
2-1-2. 천연물 침지	7
2-2. 초정수압 처리	7

3. 고등어 내 histamine 생성 억제

3-1. 일반세균수 측정	7
3-2. Histamine 생성량 측정	8

3-3. pH 및 VBN 함량 측정	8
4. Histidine Decarboxylase 정제	
4-1. 조효소액 제조	9
4-2. Ammonium Sulfate 염석 및 투석	9
4-3. Chromatography	10
4-4. 단백질 농도 측정	11
5. Histidine Decarboxylase 활성화	
5-1. Histidine Decarboxylase 활성화 측정	11
5-2. 천연물에 의한 Histidine Decarboxylase 저해활성 측정	11
5-3. 초정수압(High Hydrostatic Pressure, HHP) 처리에 의한 Histidine Decarboxylase 저해활성 측정	12
6. 통계처리	13

결과 및 고찰

1. 고등어 내 histamine 생성 억제

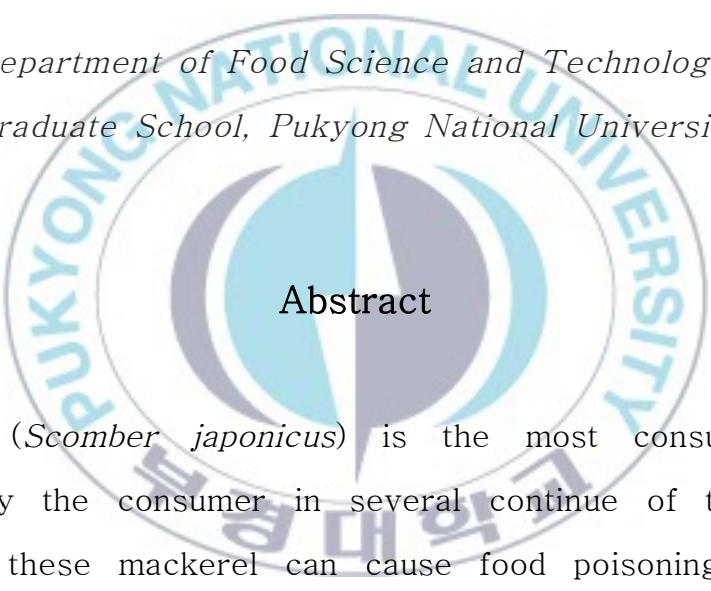
1-1. 천연물을 이용한 고등어육내의 Histamine 생성 억제	
1-1-1. 미생물 생육 억제 효과	16
1-1-2. 고등어 내 Histamine 생성 억제 효과	19
1-1-3. pH 변화	22

1-1-4. VBN 함량 변화	25
1-2. 초정수압 처리에 의한 고등어육내의 Histamine 생성 억제	
1-2-1. 미생물 생육 억제 효과	28
1-2-2. 고등어 내 Histamine 생성 억제 효과	31
1-2-3. pH 변화	34
1-2-4. VBN 함량 변화	36
2. Histidine decarboxylase 정제	39
3. Histidine Decarboxylase 저해활성	
3-1. 천연물에 의한 Histidine Decarboxylase 저해 활성	46
3-2. 초정수압 처리에 의한 Histidine Decarboxylase 저해 활성	52
요 약	55
참 고 문 헌	58

Inhibitory Activity of Histidine Decarboxylase in Mackerel by Natural Materials and High Hydrostatic Pressure Treatments

Seul-A Jung

*Department of Food Science and Technology,
Graduate School, Pukyong National University*



Abstract

Mackerel (*Scomber japonicus*) is the most consumed fish species by the consumer in several continue of the world. However, these mackerel can cause food poisoning such as Scombroid fish poisoning by histamine which generated through the process of distribution and preservation. Free histidine in mackerel muscle is transformed into the histamine by microorganisms producing histidine decarboxylase (HDC). Scombroid fish poisoning is one type of food poisoning with allergy-like symptoms and exhibits the toxicity when it ingested

to human body at large quantities. Therefore, to prevent food poisoning caused by the consumption of mackerel, main attention should be focused on the preservation and control of histamine. Thus, this study was performed to investigate the inhibitory effects of natural materials and high hydrostatic pressure treatment on histamine production in mackerel. At first, changes in viable cell counts, histamine contents, pH and VBN of mackerel fillet treated with ethanol extracts of *Ecklonia cava* (EC) and *Eisenia bicyclis* (EB) were measured at 4°C. As a result, viable cell counts were no difference between the untreated and treated sample. The mackerel fillet with added EC/EB extracts had reduced growth of viable cell counts by 2 log cycles after 10 days. Histamine contents of mackerels treated with EC and EB extracts were measured. The histamine contents were decreased by EC and EB extracts (115 and 96 ppm) compared to control at 5 days (384 ppm). The pH of mackerels treated with EC and EB extracts were no difference while pH of the control was increased during storage. Furthermore, VBN of mackerels treated with EC and EB extracts were significantly decreased compared to the control. Secondly, viable cell counts, histamine contents, pH and VBN of mackerel fillet treated with high hydrostatic pressure (2000, 3000 and 4000 bar) were measured at 4°C. The high hydrostatic

pressure(HHP) inhibited the growth of viable cell after 5 days over 3000 bar. Especially, the viable cells of mackerels treated with 4000 bar did not appear. Histamine contents of mackerels was significantly decreased by HHP. Furthermore, mackerels treated with HHP showed significantly lower VBN values as compared to the control and the pH was not affected by HHP during storage. These suggest that the adding natural materials extracts and HHP treatments to mackerel decreased histamine contents in mackerel muscle. To verify effects of natural materials and HHP treatments on histamine production, histidine decarboxylase produced by *Morganella morganii* was purified by ammonium sulfate with salting-out, dialysis, DEAE-sephadex, aminohexyl-sepharose and sephacryl S-300 HR column (specific activity : 250.81 U/mg).

E. cava and *E. bicyclis* ethanol extracts against purified HDC from *M. morganii* showed high inhibitory activity. Especially, dieckol separated from *E. bicyclis* ethanol extract showed high inhibitory activity with IC₅₀ value of 0.51 mg/mL. The purified HDC treated with HHP showed lower activity depending on increasing pressure. Therefore, *E. cava* and *E. bicyclis* ethanol extracts and HHP treatment may reduce scombroid fish poisoning by decreasing histamine production in mackerel.

서 론

고등어(*Scomber japonicus*)는 경골어류 농어목 고등어과에 속하며 등쪽 암청색, 중앙에서부터 배쪽은 은백색을 띠고 우리나라 남해안 일대를 비롯하여 동중국해, 일본 전 연안, 태평양, 대서양 및 인도양 등 대부분의 대양에 서식하며 주로 열대 및 온대 해역에 분포하는 난류성 외유성 어종이다(Lee, 2009a). 고등어는 정어리, 전갱이 및 꽂치와 함께 4대 등푸른 생선으로 그 중에서도 지질함량이 가장 높으며 특히, EPA(Eicosapentaenoic acid) 및 DHA(Docosahexaenoic acid)와 같은 고도불포화지방산(Polyunsaturated fatty acids, PUFA)이 풍부하여 동맥경화, 뇌혈전 및 심근경색 등에 효과가 있다(Garcia 1998). 또한, 혈압강하 및 뇌졸중의 예방효과가 있는 taurine, 필수 무기질로서 강한 항산화력을 가지는 selenium 및 세포 분열과 복제에 관여하는 핵산 등이 다량 함유하고 있어 영양 및 생리적 기능이 매우 우수한 어류이다(Kim et al., 2002). 그러나, 이러한 고등어는 선도저하가 매우 빨라 고도불포화지방산들이 쉽게 산화 분해되어 유지의 변색, 저급 carbonyl 화합물의 생성으로 인한 불쾌취, 유리지방산의 생성으로 인한 단백질 변성, 영양가의 저하 및 바람직하지 못한 유통·저장 과정에서 생성된 histamine에 의해 scombroid fish poisoning과 같은 식중독 등을 일으켜 품질에 나쁜 영향을 줌으로써 가공제품으로 이용하기

lor, 1986), *Klebsiella pneumoniae*(Lerke et al., 1978), *Hafnia alvei*(Omura et al., 1978) 및 *Vibrio alginolyticus*(Yoshinaga and

Frank, 1982) 등과 같은 부패세균에 의해 histamine이 생성된 것으로 보고되었으며 그 중에서도 특히, *Morganella morganii*와 *Klebsiella pneumoniae*가 가장 많은 양의 histamine을 생성하는 균으로 알려져 있다(Taylor, 1986).

어육이 완전히 부패된 단계에서 histamine의 함량은 histaminase의 작용에 의해 다시 분해가 되어 오히려 감소될 뿐만 아니라 그 시점에서 섭취하는 일은 거의 없으나, 초기 단계에서 생성된 histamine은 쉽게 분해되지 않고 축적되어 scombroid poisoning을 발병시켜 식중독을 유발한다. Histamine은 생리전달물질로서 인체 내에 널리 분포하고 있으며 조직 내에서는 단백질과 결합하여 비활성의 상태로 존재함으로써 알러지 반응을 일으키지 않는다(Hungerford, 2010; Maintz and Novak, 2007). 그러나 어육의 부패로 인해 미생물에 의해 생성된 histamine은 알레르기성 식중독의 주원인이며 다량으로 섭취 시 독성을 나타내는 것으로 알려져 있으며 주요 증상으로서 발진, 부종, 현기증, 두통 및 구역질 등을 일으키게 되며 알러지 증상과 같은 두드러기가 발생하게 된다(Shalaby, 1997). 따라서 histamine 생성의 원인물질인 부패세균 또는 부패세균이 생성하는 histidine decarboxylase을 제어하여 안전성을 확보하는 것이 매우 중요하다. Histidine decarboxylase은 열처리로 불활성화 시키는 것이 어렵기 때문에 근본적으로 해결하는 방법이 절실하다. 현재까지 histamine생성 억제에 관한 연구로는 spice를 첨가함으로써 histidine decarboxylase활성 및 biogenic amine형성 억제(Shakila et al., 1995; Wendakoon and Sakaguchi, 1995)에 관한 연구가 대부분이며 매우 미흡한 실정이다.

따라서 다양한 생리기능성을 가진 천연물이나 미생물 및 효소의 활성을 제어할 수 있는 물리적인 처리방법을 이용한 연구가 필요하다. 웰빙(well-being)과 로하스(LOHAS)문화로 건강에 대한 관심이 증가하게 되면서 천연 식품의 다양한 생리활성 작용에 대한 연구가 진행되고 있으며 그 중에서도 해양식물인 해조류는 오랜 기간 식용으로 사용되어 안전성이 입증되었을 뿐만 아니라 각종 미네랄과 비타민, 섬유소 및 alginic acid, laminaran 등 수용성 다당류 등이 풍부하게 함유되어 있어 다양한 생리활성을 가진다. 그 중에서도 감태(*Ecklonia cava*)와 대황(*Eisenia bicyclis*)은 항균(Lee, 2010), 항산화(Yoon et al., 2011; Li et al., 2009) 및 효소 저해 활성(Jung, 2011; Moon et al., 2011)등의 다양한 생리 기능성을 가지는 것으로 알려져 있어 새로운 기능성 소재로서 충분한 가치가 있다.

식품에 있어 물리적 처리 방법에는 열처리 공정과 비열처리 공정이 있는데 열처리 공정은 식품에 직접적인 열처리에 의해 품질 저하를 일으키기 때문에 식품의 품질에 영향을 미치지 않으면서 살균, 가공 및 조리가 가능한 초고압, 감마선, 초음파 및 초임계 이산화탄소 처리 등의 비가열처리 방법이 새로운 식품 가공 기술로서 각광받고 있다(Knorr, 1993). 그 중에서도 초고압 기술은 포장된 식품에 처리하므로 초고압 처리 후 미생물의 재감염 위험이 없는 장점을 가진 식품 살균기술로서(Bover-Cid et al., 2011), 살균기작으로는 비 공유결합이 변화되어 생체 세포막, amino acyl-tRNA, ribosome 및 mRNA의 결합등이 파괴되어 미생물을 사멸시키는 것으로 알려져 있으며(Park et al., 2007; Farkas and Hoover, 2001), 세포막 기능의 파괴는 세포막 단

백질의 변성으로 아미노산의 섭취가 저해되기 때문이며 미생물 세포내 구성분들이 유출되면서 세포막을 손상시키기 때문이다(Farkas and Hoover, 2001). 따라서, 초고압 기술은 단백질 구조변화 또는 단백질 변성을 유도하여 단백질이 침전되거나 용해되어 미생물, 세포내재 효소의 활성을 제어하는데 효과적이다(Hoover et al., 1989; San Martin MF et al., 2002). 초고압 기술은 부피가 줄어드는 방향으로 화학반응이 촉진되는데 결합이 파괴되면 부피가 증가하는 공유결합과 수소결합이 안정화된다. 따라서 초고압 처리기술은 저분자량 물질보다는 소수성결합 등의 고분자물질에 대해서 선택적으로 작용하므로 본연의 향, 맛 및 형태를 유지하면서 미생물을 살균하고 효소를 불활성화시키므로(Lee et al., 1996) 식품의 품질과 저장성 향상에 효과적이다. 따라서 본 연구에서는, 고등어 필렛에 천연물 침지와 초정수압 처리를 통하여 histamine 생성에 관여하는 부패 미생물의 생육 억제 및 미생물이 생산하는 histidine decarboxylase 저해활성을 확인하고 나아가, histamine 생성 미생물로부터 histidine decarboxylase를 정제하여 천연물과 초정수압처리의 효과를 증명하고 식품 산업에서의 응용가능성에 대해 살펴보았다.

재료 및 방법

1. 실험재료

1-1. 시료

본 연구에 사용된 해조류로 감태(*Ecklonia cava*)와 대황(*Eisenia bicyclis*)은 경북 동해안에서 채취하여 담수로 깨끗이 수세하고 자연건조 후 동결 건조하여 분쇄기(Deasung atron, Seoul, Korea)로 분쇄한 후, -20℃에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

실험에 사용된 생고등어(*Scomber japonicas*)는 부산광역시 남구 대연동 소재의 메가마트에서 구입하여 실험에 사용하였다.

1-3. 시약

실험에 사용한 TSB(Trypticase Soy Broth) 배지는 Difco사의 제품을 사용하였다. 실험에 사용한 시약으로 L-histidine monohydrochloride monohydrate, pyridoxal-5'-phosphate, polyethylene glycol no. 300, potassium phosphate monobasic, polyethyleneimine, DEAE sephadex, Aminoethyl Sepharose, Sephacryl S-300는 Sigma사에서 구입하였다. Potassium phosphate dibasic, Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)는 Yakuri사, ammonium sulfate는 JUNSEI사에서 구입하였다. 또한

1,4-dithiothreitol (DTT)는 Boehringer Mannheim사에서 구입하였으며 투석막(M.W. 12-14,000)은 Spectrum Laboratories사의 것을 사용하였다.

1-4. 시험균주

실험에 사용된 균주는 가장 대표적인 histamine-producing bacteria로 *Morganella morganii* IFO 3848, ATCC 25830을 한국미생물보존센터(KCCM)에서 각각 분양 받아 실험에 사용하였다(Hungerford, 2010).

2. 천연물 및 초정수압 처리

2-1. 천연물 처리

2-1-1. 시료 추출

건조 분쇄된 시료에 물 또는 94% ethanol을 10배(w/v) 가하여 실온에서 24시간 교반하며 추출하였다. 추출 후 원심분리기(UNION 32R, Hanil Co., Korea)로 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액만 취하였다. 이 과정을 3회 반복하여 얻은 상층액을 모아 여과지(Advantec 5A, Toyo Roshi Kaisha Ltd., Tokyo, Japan)로 여과한 후 rotary evaporator(RE 200, Yamato Co., Japan)로 감압 농축하였다. 이 농축액을 37℃에서 건조시킨 후 -20℃에서 보관하며 일정농도로 희석하여 실험에 사용하였다. 또한 열수 추출은 시료에 물을 10배

(w/w) 가하여 80℃에서 8시간 교반하여 추출하였으며, 후처리 과정은 위와 동일하다.

2-1-2. 천연물 침지

생고등어의 머리와 내장을 제거하여 필렛의 형태로 제조하였다. 천연물의 농도 0.5% 침지액에 고등어를 4℃에서 2시간 침지시킨 후, 경사각을 주어 머리가 위로 가도록 하여 1시간동안 탈수시켰다. 이를 각각 진공 포장하여 4℃에서 5일 간격으로 25일 동안 저장하면서 실험을 진행하였다.

2-2. 초정수압 처리

생고등어의 머리와 내장을 제거하여 제조된 고등어 필렛을 각각 진공 포장하여 초정수압기(215L-600 ULTRA, AVURE Technologied Inc. WA, USA)의 processing chamber에 넣어 수온 약 18-24℃에서 2,000, 3,000 및 4000 bar로 정수압으로 각각 3분간 초정수압 처리한 후, 4℃에서 5일 간격으로 25일 동안 저장하면서 실험을 진행하였다.

3. 고등어내 Histamine 생성 억제

3-1. 일반세균수 측정

고등어 육을 각각 무균적으로 2 g 취한 후, 멸균 PBS(Phosphate

buffered saline, pH 7.4)를 10 배(w/v) 가하여 1000 rpm에서 1분간 균질화(Ace Homogenizer, AM-7, Nihonseiki, Japan) 한 다음 10배 희석법으로 희석하였다. 일반세균수는 시료 희석액을 PCA에 도말하여 37℃에서 24-48시간 배양한 후, 생성된 집락을 계수하여 측정하였다.

3-2. 고등어육 중의 Histamine 생성량 측정

어육 내 histamine 생성량 측정은 Kanki 등(2007)의 방법을 참고하였다. 분쇄한 고등어 육 1 g에 0.1 M EDTA (pH 8.0)를 24 mL 첨가하여 1분간 교반하고 100℃의 물에 20분간 정치시킨 후, 얼음물에 10분간 냉각시켰다. 이를 여과지로 여과한 다음, 여과액을 Histamine assay kit를 사용하여 UV/visible spectrophotometer로 470 nm에서 흡광도를 측정하여 histamine 함량을 정량하였다.

3-3. pH 및 VBN 함량 측정

pH 측정은 세절한 고등어 5 g에 증류수를 10배 가하여 균질기(Ace Homogenizer, AM-7, Nihonseiki, Japan)로 10,000 rpm에서 2분간 균질화 한 다음, pH meter(HM-30V, TOA, Kobe, Japan)로 측정하였다. VBN 측정은 식품공전상(Korean Food and Drug Administration, 2002)의 Conway법을 참고하였다. 세절한 고등어 10 g에 증류수를 5배 가하여 10분간 교반, 5분간 정치를 두 번 반복하여 30분간 침출하였다. 이를 여과한 후, 5% H₂SO₄로 pH 4.0으로 보정하고 100 mL로 정용하였다. Conway unit 내실에 처리한 시료 및 0.01 N H₂SO₄를, 외실에는 K₂CO₃ 포화용액을 각각 1 mL씩 첨가하고 혼합

하여 25℃에서 1시간 반응시킨 후, 내실에 brunswik 시약을 한 방울 첨가하고 0.01 N NaOH로 적정하였다.

4. Histidine Decarboxylase 정제

4-1. 조효소액 제조

Histamine-producing bacteria로부터 crude histidine decarboxylase를 추출하기 위해 Tansase 등(1984)의 방법을 참고하였다. *M. morganii* 균주를 10^5 - 10^6 CFU/mL 되도록 하여 0.5% L-histidine monohydrochloride monohydrate를 첨가한 TSB 배지에 접종하여 35℃에서 12시간 배양하였다. 균 배양액을 $12,000 \times g$ 로 30분간 원심분리하여 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 washing 한 후, -20℃에 보관하며 실험에 사용하였다. Washing한 wet cell을 1:4 비율의 buffer로 현탁 시킨 후, 초음파 처리(VCX 130, Sonics & Materials, USA)하여 cell를 파괴시킨 후, $12,000 \times g$ 에서 30분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 침전물은 다시 1:3 비율로 buffer를 가하여 한 번 더 초음파 처리하고 원심분리 한 상층액을 앞의 상층액과 혼합하여 $20,000 \times g$ 에서 30분간 다시 한 번 원심분리하였고 잔사는 폐기하였다.

4-2. Ammonium sulfate 염석 및 투석

조효소에 ammonium sulfate를 가하여 35%로 포화시킨 후 $12,000 \times g$ 에서 30분간 원심분리하여 불용성 침전물은 제거하고 상층액에 ammonium sulfate를 가하여 70%로 포화시켰다. 이를 $12,000 \times g$ 에서 30분간 원심분리하여 활성있는 침전물을 수집하였다. Ammonium sulfate 70% 포화 침전물을 buffer A로 용해시킨 후 투석막(M.W. 12-14,000)을 이용하여 4℃에서 40시간 동안 동일 buffer를 교체하면서 투석을 실시하였다.

4-3. Chromatography

DEAE-sephadex chromatography($\varnothing 1.7 \times 20.0$ cm)는 buffer A로 평형화 시켰으며 0-0.4 M NaCl을 농도구배로 단계적으로 분획하였다. 활성 있는 fraction을 모아 ultrafiltration cell을 이용하여 농축한 후, aminohexyl-sepharose chromatography를 실시하였다. Aminohexyl-sepharose chromatography($\varnothing 1.7 \times 20.0$ cm)은 buffer B(0.02 M potassium phosphate buffer(pH 5.8), 0.02 M succinate, 0.1 mM sodium EDTA, 0.005 mM pyridoxal phosphate, 0.02 mM dithiothreitol, 0.1%(v/v) polyethylene glycol no. 300)로 평형화 시킨 후 0-0.5 M NaCl을 농도구배로 단계적으로 분획하였다. 또한, 활성있는 fraction을 모아 ultrafiltration cell을 이용하여 농축한 후, sephacryl S-300 chromatography를 실시하였다. Sephacryl S-300 chromatography($\varnothing 1.7 \times 20.0$ cm)은 buffer B로 평형화 시킨 후 분획 및 용출하였다.

4-4. 단백질 농도 측정

Robert(1996)의 방법을 이용하여 bovine serum albumin(BSA)을 표준물질로 하여 280 nm에서 흡광도를 측정하여 얻은 검량곡선(Fig.1)을 이용하여 단백질 농도를 측정하였다.

5. Histidine Decarboxylase 활성

5-1. Histidine Decarboxylase 활성 측정

Histidine decarboxylase 활성 측정은 37℃에서 기질인 histidine이 histamine으로 방출되는 정도를 측정함으로써 확인하였다. Kanki 등(2007)과 Nitta 등(2009)을 참고하여 buffer A 1 mL과 초순수 0.1 mL을 test tube에 취하여 37℃에서 5분간 배양한 후, 조효소액(각 fraction) 0.1 mL을 가하여 다시 5분간 배양하였다. 200 mM L-histidine monohydrochloride monohydrate를 0.2 mL을 첨가한 후 37℃에서 15분간 반응시켜 histamine을 생성시켰다. 반응을 정지시키기 위하여 94-95℃에서 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(Sato et al., 2005).

5-2. 천연물에 의한 Histidine Decarboxylase 저해활성 측정

천연물에 의한 Histidine decarboxylase 저해활성은 위의 Histidine decarboxylase 활성 측정에서 초순수 대신 일정한 농도의 해조류 추출물과 조효소 대신 정제된 효소를 첨가하였다. 생성된 histamine을 Histamarine assay kit로 정량하여 아래의 식으로 계산하였다.

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

A : 시료를 첨가하지 않은 흡광도

B : 시료를 첨가한 흡광도

C : 효소를 첨가하지 않은 흡광도

5-3. 초정수압(High Hydrostatic Pressure, HHP) 처리에 의한 Histidine Decarboxylase 저해활성 측정

정제된 histidine decarboxylase를 초정수압기(215L-600 ULTRA, AVURE Technologies Inc. WA, USA)의 processing chamber에 넣어 수온 약 18-24℃에서 1,000, 2,000, 3,000 및 4000 bar의 정수압으로 각각 3분간 처리하여 위의 Histidine decarboxylase 활성 측정에서 조효소 대신 초정수압 처리된 효소를 첨가하였다. 생성된 histamine을 Histamarine assay kit로 정량하여 아래의 식으로 계산하였다.

$$\text{저해율(\%)} = 100 \times (1 - b/a)$$

a : 초정수압 처리하지 않은 흡광도

b : 초정수압 처리한 흡광도

6. 통계처리

실험결과에 대한 통계처리는 SAS software (Statistical analytical system V8.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)을 이용하여 분산 분석을 하였으며, 조사 항목들 간의 유의적 검정은 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test법에 따라 분석하였다.



Table 1. Operating conditions of ultrasonicator to obtain crude histidine decarboxylase from histamine-producing bacteria

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



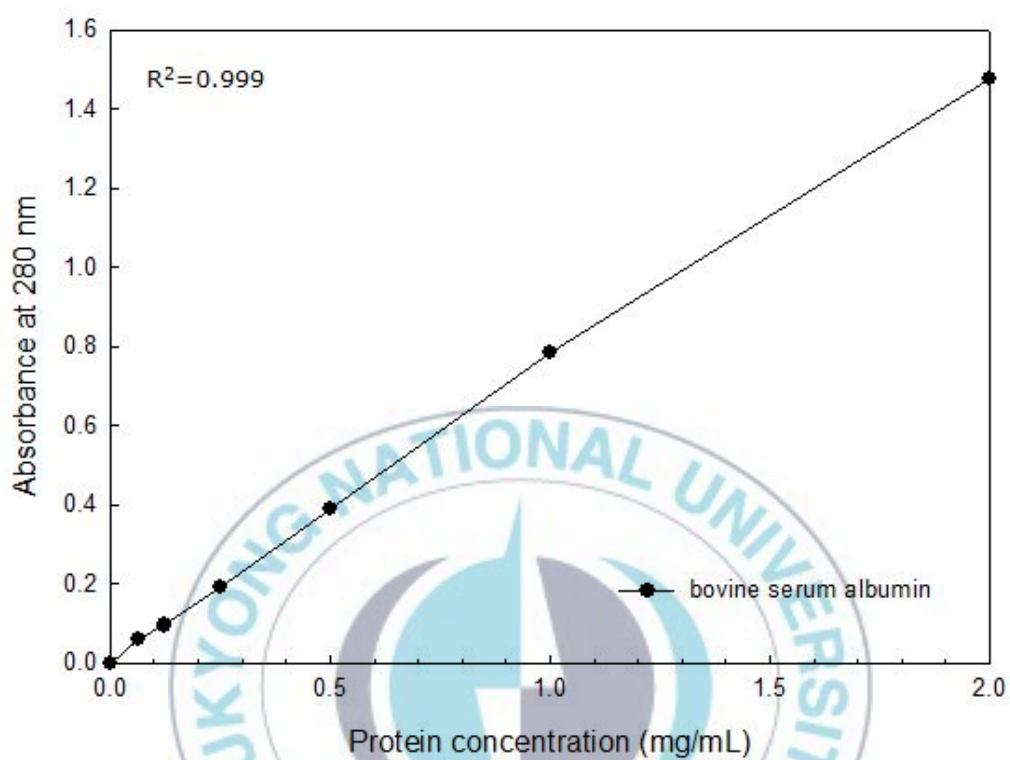


Fig. 1. Standard curve for determination of protein concentration.

결과 및 고찰

1. 고등어 내 histamine 생성 억제

1-1. 천연물을 이용한 고등어육 내의 Histamine 생성 억제

1-1-1 미생물 생육 억제 효과

고등어에 다량 함유되어있는 histidine은 선도저하 또는 부적절한 처리 및 가공으로 인해 부패 미생물이 생육하게 되면 탈탄산 작용으로 histamine을 생성하게 된다(Lehane and Olley, 2000). 따라서 고등어 내 histamine의 생성은 부패세균이 생성하는 histidine decarboxylase라는 효소에 의한 것이므로 미생물을 생육을 억제하는 것이 가장 중요하다. 따라서 천연물 침지를 통해 고등어의 일반 생균수의 변화와 억제효과를 알아보았다. 감태 및 대황 천연물을 침지한 고등어를 4℃에서 5일 간격으로 25일간 저장하면서 일반 생균수를 측정하였다. 그 결과(Fig. 2), 0일차에는 무처리와 처리구 간의 차이가 없이 10^4 CFU/g의 균수를 나타내었으나, 시간이 지남에 따라 대황 및 감태 추출물을 침지한 처리구가 무처리와 비교시 생균수가 감소한 결과를 나타내었다. 저장 10일차에, 무처리는 10^6 CFU/g을 보였으나 대황 및 감태 침지 처리구는 각각 10^4 및 10^5 CFU/g을 보여 균의 성장이 억제되었다. 무처리와 처리구 모두, 시간이 지남에 따라 생균수는 지속적으로 증가하였으나 25일차 까지 대황 및 감태 침지 처리구는 무처리보다 약 2 log cycle 정도 가량 균이 억제되는 것을 확인할 수 있었고 대황보다

감태 침지 처리구가 좀 더 높은 항균활성을 보였다. Lee(2010)은 감태 에탄올 추출물이 *B. subtilis*, *S. aureus*, *L. innocua*, *C. perfringens*, *L. monocytogens*, *S. typhimurium*, *C. tropicalis* 등에 대해 강한 항균효과를 보인다고 하였으며 대황 역시, epiphytic bacteria(Sakami, 1995), *S. aureus* (Eom et al., 2011)등에 항균 활성을 나타내었다. 뿐만 아니라 다른 종류의 해조류인 모자반(Kim et al., 2011), 비틀대 모자반 추출물(Kim et al., 2011)을 첨가하여 제조한 빵이 저장기간에 따라 무처리와 비교시 생균수가 감소하는 유사한 결과를 보였다. 따라서 해조류 추출물이 고등어의 부패에 관여하는 미생물의 생육을 억제하는 것을 확인할 수 있었다.



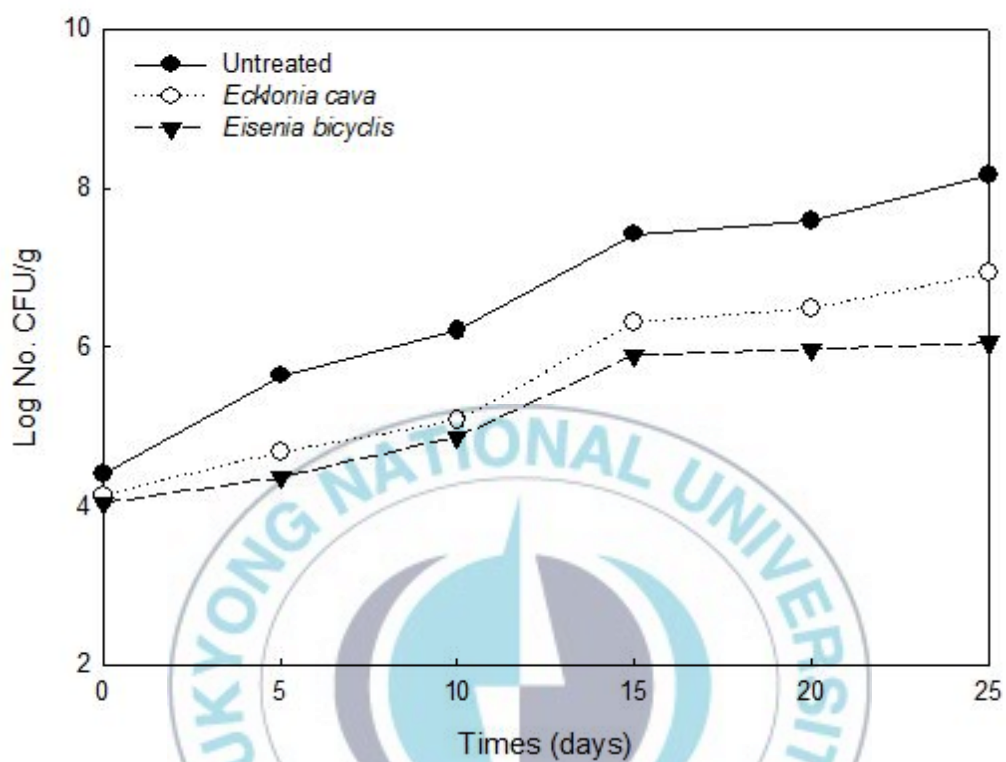


Fig. 2. Changes in viable cell counts of mackerel fillet treated with ethanol extracts of *Ecklonia cava* and *Eisenia bicyclis* at 4 °C.

1-1-2 고등어 내 Histamine 생성 억제 효과

고등어 내의 histamine 생성 억제는 미생물을 제어하거나 미생물에 의해 생성된 효소를 제어하는 방법이 있다. 천연물 침지에 의한 고등어 내의 histamine 생성 억제 효과를 측정하기 위하여 감태 및 대황 천연물을 침지한 고등어를 4℃에서 5일 간격으로 25일간 저장하면서 histamine의 함량을 측정하였다. 그 결과(Fig. 3), 무처리의 경우 histamine의 함량이 0일차에 70.12 ppm이었지만 감태 및 대황 침지 처리구는 각각 51.67 및 51.28 ppm을 나타내었다. 5일차에 무처리는 384.62 ppm, 감태 및 대황 침지 처리구는 115.83 및 96.41 ppm을 나타내어 histamine의 생성이 감소되는 것을 확인하였다. 뿐만 아니라 저장일차가 증가함에 따라, 10일차의 경우, 무처리는 1452.31 ppm, 감태 및 대황 침지 처리구는 각각 904.64 및 570.28 ppm을 나타내었으며 15일차에는 무처리, 감태 및 대황 침지 처리구가 3052.31, 2654.36, 820.51 ppm으로 histamine이 상당히 억제되었다. 그 후, 무처리는 지속적으로 높은 함량을 보여 저장 20일차에 무처리는 3509.74 ppm, 감태 및 대황 침지 처리구는 2510.77 및 2385.64 ppm의 histamine 생성량을 보였다. 이러한 결과를 통해 천연물 침지로 인해 초기단계에서 histamine의 함량이 감소되었을 뿐만 아니라 저장기간 동안에도 무처리보다 낮은 histamine 함량을 나타내었다. Scombroid poisoning을 일으키는 생선내의 histamine 수치는 200 ppm 이상일 때 발병하는 것으로 보고되고 있는데(FAD, 2011), 위의 결과에서 저장 5일차에 무처리의 경우 histamine의 함량이 200 ppm을 훨씬 넘는 수치를 보였으나 천연물 침지구는 200 ppm 이하로 상

당한 억제 효과를 보였다. 이러한 결과는 clove, cinnamon, cardamom, turmeric 및 pepper와 같은 향신료를 고등어에 처리하여 30℃에서 24시간 동안 저장하면서 biogenic amine의 생성 정도를 측정한 결과, histamine이 감소함을 보여 본 연구와 유사한 결과를 보였다. 이는 향신료에 존재하고 있는 phenolic 화합물들이 그 효과를 나타낸 것이라 보고하였으며(Shakila, 1996), 해조류 역시, 높은 phenolic 화합물을 함유하고 있는 것으로 알려져 있으며 이러한 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 사료되어진다 (Lee et al., 2009b; Deavile et al., 2007).

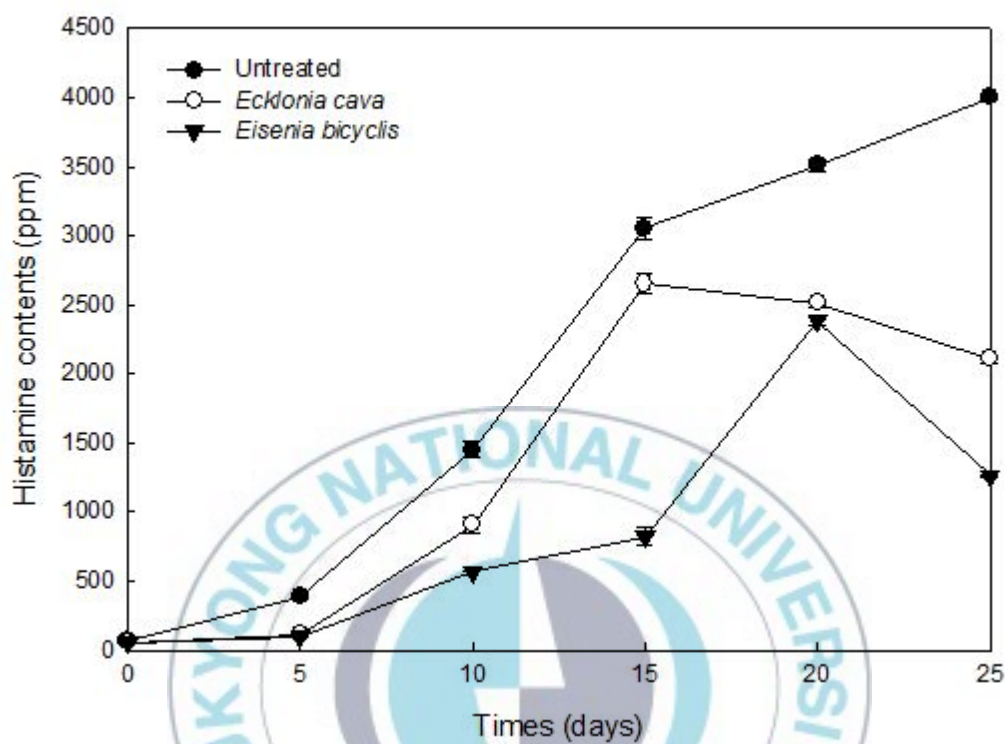


Fig. 3. Changes in histamine contents of mackerel fillet treated with ethanol extracts of *Ecklonia cava* and *Eisenia bicyclis* at 4°C.

1-1-3 pH 변화

pH는 식품의 품질 및 고유의 특성을 나타낼 뿐만 아니라 미생물의 생육조건에도 영향을 미치므로 식품에서 pH 측정은 매우 중요한 요소이다(Jin et al., 2006). 살아있는 어육의 일반적인 pH는 보통 7.2-7.4 정도이나 사후 해당과정이 진행됨에 따라 젖산의 생성으로 인해 pH가 저하되어 신선육의 pH는 5.5-6.5 정도의 약산성을 나타낸다. 그러나 선도가 저하하기 시작하면 혐기성 물질의 축적으로 근육의 pH가 다시 상승하므로 이러한 pH의 변화를 통해 선도를 판정할 수 있으며 (Amold et al., 1978) pH 6.5 이상은 식용이 곤란한 정도로 부패가 진행된 것으로 판단한다(Park YH et al., 1997). 이에 본 연구에서는 감태 및 대황 천연물을 침지한 고등어를 4℃에서 5일 간격으로 25일간 저장하면서 pH를 측정하였다. 그 결과(Fig. 3), 저장 초기 무처리와 천연물 침지 처리구의 pH는 6.01-6.10으로 실험구간의 유의적인 차이를 보이지 않았고 저장 10일차까지도 큰 변화가 없었다. 그 이후, 저장기간이 증가할수록 pH가 증가하였으며 저장 15일차에 무처리는 pH 6.66, 감태 및 대황 침지 처리구는 각각 pH 6.57, 6.21으로 무처리의 pH가 가장 높게 나타나 부패가 진행된 것으로 판단되었으며 감태 침지 처리구 역시 무처리보다 약간 낮기는 하지만 높은 pH를 보였다. 그러나 대황 침지 처리구의 경우 낮은 pH 수치를 보여 무처리에 비해 선도 저하가 느리게 진행된 것으로 사료된다. 저장 25일차에 무처리구는 pH 7.11으로 매우 높은 수치를 나타내었으나 감태 및 대황 침지 처리구는 각각 pH 6.44, 6.20을 나타내었다. 어육 중의 pH는 사후에 해당반응의 진행에 따라 생성되는 젖산과 상관관계가 높은데 선

도가 저하되면 암모니아, TMA, DMA, 기타 유기염기와 같은 염기성 물질의 축적으로 근육의 pH가 상승하게 되며 이러한 pH 값의 변화로 선도를 판정할 수 있다(Nam et al., 2011). 따라서, 천연물 침지 처리구가 저장기간이 증가함에 따라 무처리에 비해 pH가 크게 증가하지 않았고 이는 천연물 침지로 인해 고등어의 부패가 천천히 진행된 것으로 판단된다. 뿐만 아니라, 저장 0일차에 무처리와 천연물 침지 처리구 간의 큰 차이가 없는 것은 천연물 침지가 pH에 큰 영향을 미치지 않아 식품에 적용 시 문제가 되지 않을 것으로 사료되어진다.



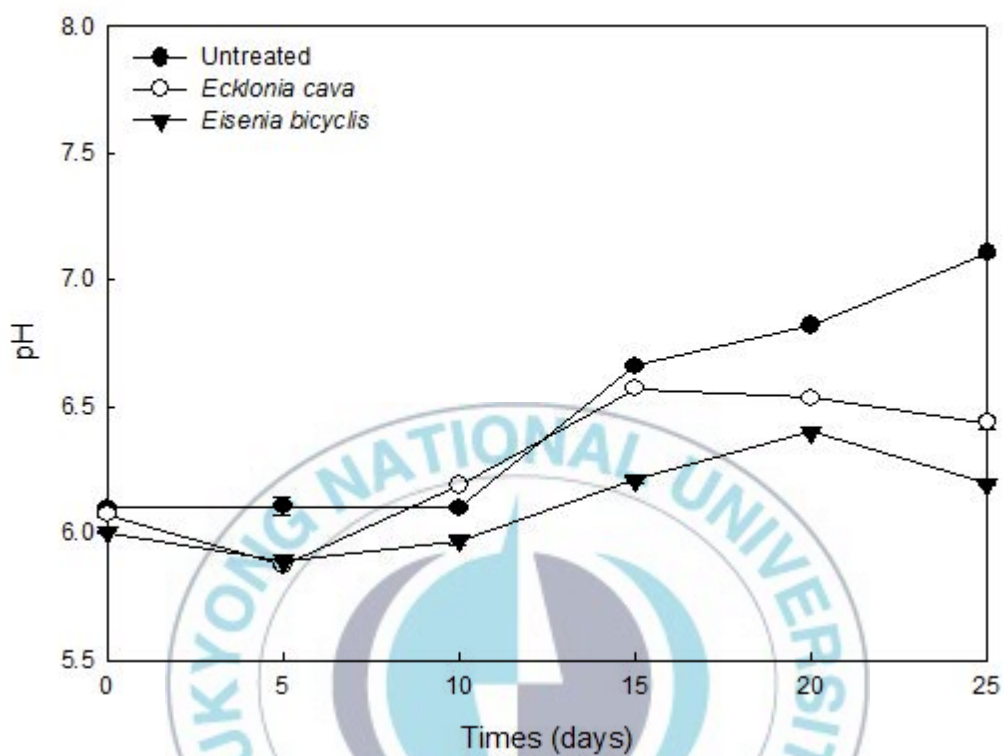
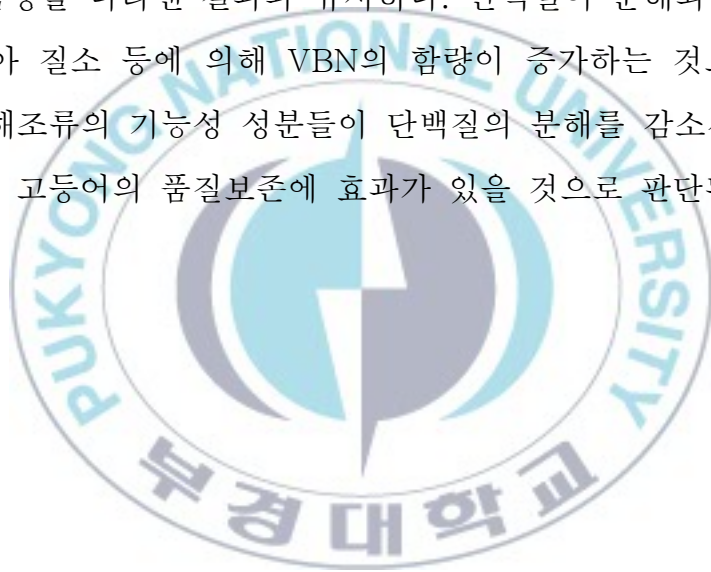


Fig. 4. Changes in pH of mackerel fillet treated with ethanol extracts of *Ecklonia cava* and *Eisenia bicyclis* at 4°C.

1-1-4 VBN 함량 변화

어패류는 어획 후 선도가 저하되면 어육 내 인지질 등의 지질 산화, 어육 중에 존재하는 환원계 효소 또는 미생물에 의해 TMAO(trimethylamineoxide)가 환원되어 생성되는 TMA(trimethylamine) 등의 저급 염기성 물질이 생성되고 세균의 증식에 의해 단백질이 분해되면서 생성되는 암모니아 질소 등에 의해 휘발성 염기질소(VBN)의 함량이 증가하게 된다(Song HN et al., 2005). 일반적으로 신선한 어패류의 육에는 VBN이 미량으로 함유되어 있으나 시간이 경과하여 선도가 저하됨에 따라 증가하는 것으로 보고되어 VBN 측정은 어패류의 선도판정법으로 널리 이용되고 있다(Song HN et al., 2005). 따라서 본 연구에서는, VBN 측정을 통해 천연물을 침지한 고등어가 선도에 미치는 영향에 대해서 알아보았다. 그 결과(Fig. 4), 저장 초기에 무처리구와 천연물 침지 처리구 모두, 18 mg/100 g으로 큰 차이가 없었으며 저장 5일차에 무처리구는 28 mg/100 g의 VBN함량을 나타내었고 감태 및 대항 침지 처리구는 21-22 mg/100 g을 나타내어 무처리에 비해 유의적으로 감소하였다. 저장 10일차에, 모든 처리구에서 VBN 함량이 크게 증가하였고 특히, 무처리구가 50 mg/100 g로 가장 크게 증가하였고 감태 및 대항 침지 처리구는 각각 42, 41 mg/100 g의 함량을 나타내어 무처리에 비해 유의적으로 감소하였다. 일반적으로 VBN의 함량이 5-10 mg/100 g은 극히 신선한 어육, 15-25 mg/100 g은 보통 선도의 어육, 30-40 mg/100 g은 부패 초기의 어육, 50 mg/100 g 이상인 경우 부패 정도가 심한 어육으로 판정한다(Song HN et al., 2005). 따라서 무처리구

의 경우, 저장 5일차에 이미 부패 초기 단계를 나타내었고 저장 10일차에는 상당한 부패가 진행된 것으로 사료된다. 그러나, 감태 및 대황 침지 처리구는 저장 10일차에 부패 초기 단계를 보여 천연물 침지가 고등어의 급격한 부패를 다소 지연시켜 선도 유지에도 효과를 보인 것으로 사료된다. 이러한 결과는 각종 한방 추출물(Shin SR., 2006)과 녹차 및 연잎 열수추출물(Nam et al., 2011)을 고등어에 침지하여 저장하면서 VBN의 함량을 측정한 결과, 대조구와 비교시 유의적으로 낮은 VBN 함량을 나타낸 결과와 유사하다. 단백질이 분해되면서 생성되는 암모니아 질소 등에 의해 VBN의 함량이 증가하는 것으로 알려져 있으므로 해조류의 기능성 성분들이 단백질의 분해를 감소시킨 것으로 사료되어져 고등어의 품질보존에 효과가 있을 것으로 판단된다.



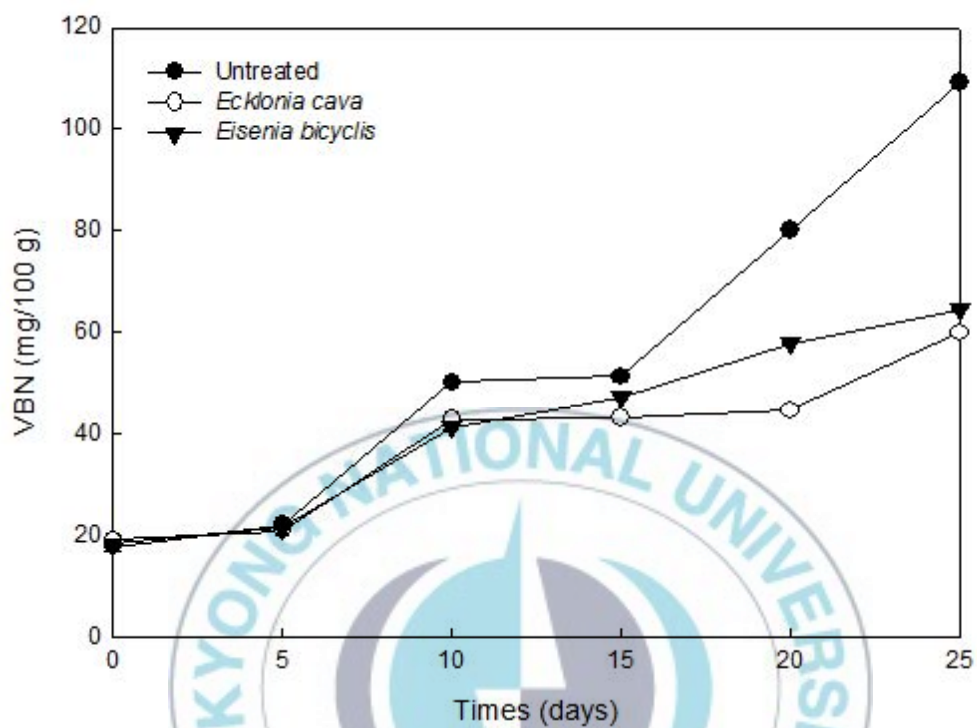


Fig. 5. Changes in VBN of mackerel fillet treated with ethanol extracts of *Ecklonia cava* and *Eisenia bicyclis* at 4°C.

1-2. 초정수압 처리에 의한 고등어육 내의 Histamine 생성 억제

1-2-1 미생물 생육 억제 효과

초정수압 처리는 병원성 및 부패 미생물의 비공유 결합과 소수성 결합에 영향을 주어 세포막을 붕괴시키고 단백질의 변성을 초래하여 미생물의 사멸을 유발한다(Bover-Cid et al., 2011). 뿐만 아니라 비가열처리 기술로서 식품에 적용 시 영양소의 파괴를 최소화하며 안전하고 고품질의 식품을 얻을 수 있는 신기술이다(Paak et al., 2010). 포장된 식품에 처리하므로 미생물의 재감염 위험이 없는 식품 살균 기술로서 이미 국제식품규격위원회(Codex Alimentarius, 2007)와 미국 식품의약국(US FDA, 2008)의 승인을 받았다(Bover-Cid et al., 2011). 이에 고등어 필렛을 제조하여 진공포장한 후, 2000, 3000 및 4000 bar로 초정수압 처리하여 일반생균수의 변화와 억제효과에 대해 살펴 보았다. 그 결과(Fig. 4), 0일차에 무처리와 2000 bar에서는 10^3 CFU/g의 균수를 보였으나 3000 bar에서는 10^1 CFU/g, 4000 bar에서는 균이 나타나지 않아 압력이 높아질수록 균이 저해하는 효과를 보였다. 저장일차가 증가하면서 무처리와 2000 bar는 큰 차이 없이 지속적으로 균이 증가하였고, 저장 5일차에 3000 bar는 10^4 CFU/g의 균수를 보여 무처리 및 2000 bar의 10^6 CFU/g보다 성장이 억제되었으며 4000 bar의 경우 균이 생성되지 않아 사멸의 효과를 보였다. 10일차 이후에는 무처리, 2000 bar 및 3000 bar가 10^6 CFU/g 이상으로 큰 차이 없이 생균수가 증가하였으나 4000 bar의 경우 10일차에 10^3 CFU/g, 15일차에 10^5 CFU/g으로 나타나 저장기간에도 초정수압

처리에 의하여 무처리 보다 2-3 log cycle 정도 균이 감소함을 확인하였다. 이러한 결과는 조미 오징어에 400 MPa에서 초정수압처리 후 저장 기간동안 미생물의 수가 대조군에 비교하여 저장 초기 2.77 log의 감소를 보인 결과와 유사하며(Gou et al., 2011) Park(2006)등은 생굴에 350 MPa 초정수압 처리 후 저장기간 동안 균수의 증가가 크지 않아 저장 7일차까지 약 10^3 CFU/mL 이하를 유지하였다고 보고하였다. 따라서 3000 bar이상의 초정수압 처리 시, 저장 초기 균수가 감소하였고 4000 bar의 경우 균이 멸균되는 효과를 확인하였다. 이러한 결과는 초정수압 처리로 인해 세포막 구조의 손상을 유도하여 정상적인 생육을 어렵게 하여 미생물의 수를 감소시킨 것으로 사료된다(Bull et al., 2005; Stephens, 2005).



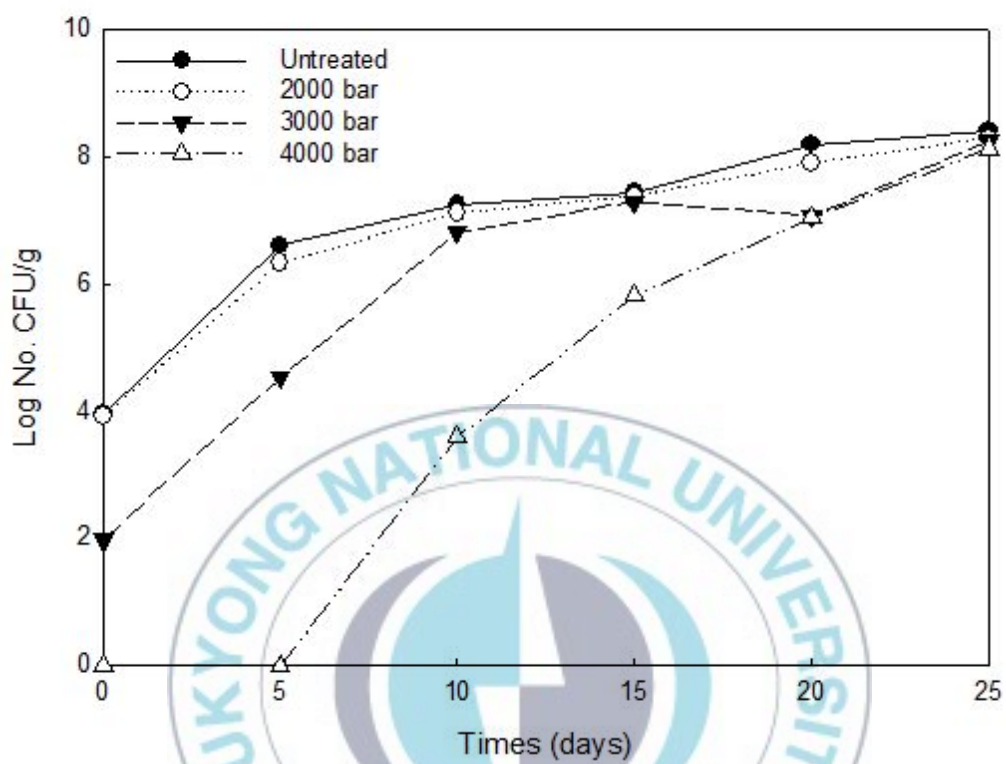


Fig. 6. Changes in viable cell counts of mackerel fillet treated with high hydrostatic pressure at 4°C.

1-2-2 고등어 내 Histamine 생성 억제 효과

조정수압 처리에 의한 고등어육 중의 histamine 생성 억제 효과를 알아보기 위하여 고등어 필렛을 제조하여 진공포장한 후, 2000, 3000 및 4000 bar로 조정수압 처리하여 histamine 생성 억제효과에 대해 살펴보았다. 그 결과(Fig. 5), 저장 5일차에 무처리의 경우 175.64 ppm을 나타내었으나 조정수압 처리구는 histamine이 4 ppm이하로 거의 생성되지 않았다. 무처리는 저장 10일차에 histamine의 함량이 급격하게 증가하여 3013.33 ppm의 함량을 보였으나 조정수압 2000 bar 처리구에서는 73.21 ppm, 3000 및 4000 bar 처리구 각각 6.15 및 2.18 ppm으로 거의 히스타민이 생성되지 않았다. 15일차의 경우 무처리는 2814.36 ppm으로 히스타민 함량이 꾸준히 높게 유지되었고 2000 bar는 1592.82 ppm으로 증가하였지만, 3000 및 4000 bar는 저장 20일차 까지 histamine이 거의 생성되지 않았다. 그 후, 저장 25일차에 3000 bar는 750 ppm을 나타내었지만 4000 bar에서는 histamine이 생성되지 않았다. 이러한 결과를 생균수의 결과와 비교하면, 3000 및 4000 bar 의 경우 생균수를 저장기간이 지남에 따라 증가하는 경향을 보였으나 histamine은 생성되지 않아 미생물이 생산한 histidine decarboxylase 효소가 조정수압 처리에 의해 단백질의 구조가 변하면서 효소의 활성 부위가 영향을 받아 기질과의 결합이 불가능해져서 효소의 활성을 잃은 것으로 사료되어진다(San Martin MF, 2002). 단백질의 구조는 가역적 또는 비가역적인 변화를 유발하는 것으로 알려져 있으나 일반적으로 300 Mpa 이상 가압시 효소의 활성 회복 가능성이 희박하다고 보고되어진다(Jianyong et al., 2011). 따라

서 초정수압 처리가 histidine decarboxylase의 활성을 저해함으로써
고등어 내의 histamine의 생성을 억제한 것으로 사료된다.



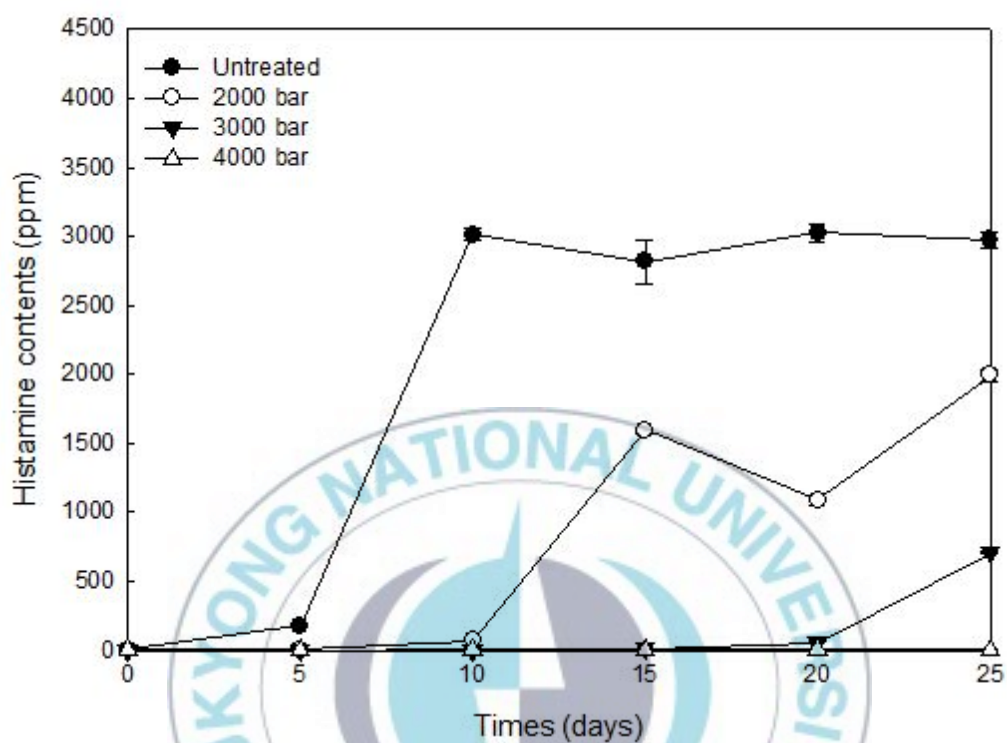


Fig. 7. Changes in histamine contents of mackerel fillet treated with high hydrostatic pressure at 4°C.

1-2-3 pH 변화

초정수압 처리에 의한 고등어육 중의 pH 변화를 알아보기 위하여 2000, 3000 및 4000 bar의 조건으로 초정수압 처리한 고등어를 4℃에서 5일 간격으로 25일간 저장하면서 pH를 측정하였다. 그 결과 (Fig. 7), 저장 초기 무처리의 경우 pH 5.98을 나타내었고 초정수압 처리구는 pH 6.03-6.19의 값을 보여 초고압 처리로 인하여 pH가 약간 증가한 경향을 보였다. 저장 15일차 까지 무처리구와 처리구 모두 큰 변화를 보이지 않았다. 저장 20일차에 무처리구의 경우 pH가 6.43으로 급격하게 상승하였으나 초정수압 처리구는 pH 6.08-6.17로 pH가 유지되었다. 저장 25일차에 무처리구는 pH가 6.62까지 높아졌으나 초정수압 2000, 3000 bar 처리구는 pH 6.27-6.28로 약간 증가하였고 4000 bar는 pH 6.04로 pH가 유지되었다. 결과적으로 무처리구의 경우, 시간이 지남에 따라 pH가 증가하였으나 초정수압 처리구는 pH가 큰 변화 없이 유지함을 확인하였다. 이러한 결과는 생굴에 초고압을 처리한 후 저장 기간동안 pH의 변화를 측정한 결과, 대조구에 비해 저장 중 pH 변화가 거의 없어 본 연구와 유사한 결과를 나타내었다(Park et al., 2006). pH는 전도가 저하되면 어육 중에 존재하는 효소 또는 미생물에 의해 생성되는 염기성 물질의 축적으로 근육의 pH가 상승하게 되는데(Nam et al., 2011) 앞선 초고압 처리에 의한 생균수와 histamine억제 결과를 미뤄볼 때 초고압 처리에 의해 미생물과 효소가 감소함에 따라 염기성 물질의 축적이 비교적 적어 pH가 유지된 것으로 사료되어진다.

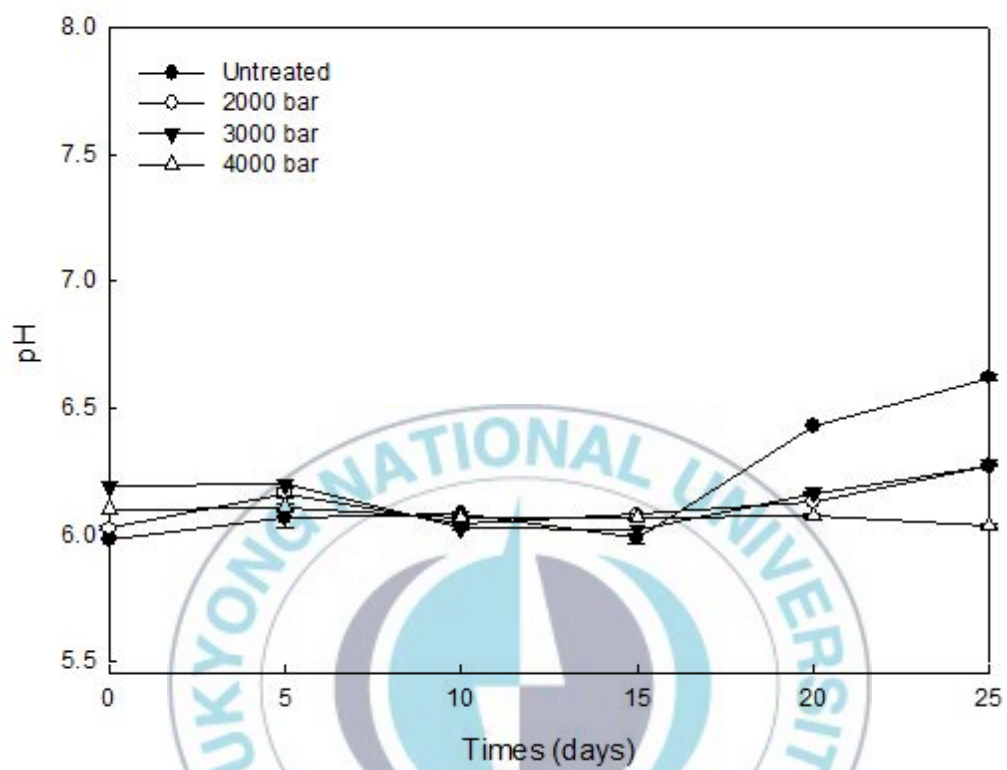


Fig. 8. Changes in pH of mackerel fillet treated with high hydrostatic pressure at 4°C.

1-2-4 VBN 함량 변화

초정수압 처리에 의한 고등어육 중의 VBN 함량 변화를 알아보기 위하여 2000, 3000 및 4000 bar의 조건으로 초정수압 처리한 고등어를 4℃에서 5일 간격으로 25일간 저장하면서 VBN 함량을 측정하였다. 그 결과(Fig. 7), 저장 초기에 무처리구는 21 mg/100 g의 함량을 보였고 2000, 3000 및 4000 bar 처리구는 각각 19, 18 및 17 mg/100 g의 VBN 함량을 나타내어 처리압력이 높아짐에 따라 그 함량이 감소한 것을 확인하였다. 무처리의 경우, 저장 5일차에 VBN 함량이 40 mg/100 g으로 급격하게 증가하였으나 초정수압 처리구에서는 20-23 mg/100 g으로 낮은 VBN 함량을 보였다. 저장기간이 증가함에 따라 무처리구는 지속적으로 VBN 함량이 증가하여 저장 20일차에 60 mg/100 g의 함량을 보였으나 초정수압 처리구는 31-38 mg/100 g로 무처리구와 비교시 낮은 함량을 보였다. 일반적으로 VBN의 함량이 5-10 은 극히 신선한 어육, 15-25 mg/100 g은 보통 선도의 어육, 30-40 mg/100 g은 부패 초기의 어육, 50 mg/100 g 이상인 경우 부패 정도가 심한 어육으로 판정하므로(Song HN et al., 2005), 무처리의 경우 저장 20일차에 심각한 부패가 진행이 되었으나 초정수압 처리구는 부패 초기 단계인 것으로 사료되어진다. 이러한 결과는 고추장굴비에 초고압 처리한 후 저장 기간동안 VBN 함량의 변화를 측정한 결과, 대조구에 비해 낮은 VBN 함량을 보인 결과와 비슷하다(Kang et al., 2011). VBN 함량은 세균의 증식에 의해 단백질이 분해되면서 증가하게 되는데(Song HN et al., 2005), Kruk 등(2011)은 닭가슴살 필렛에 초고압을 처리한 후 4℃에서 저장하면서 생균수를

측정한 결과, 처리압력이 높아질수록 균이 감소하거나 사멸하였으며 VBN의 결과 또한, 생균수의 감소와 비례하여 감소하는 결과를 보였고 이는 미생물 수의 감소에 인한 단백질 분해가 감소하였기 때문이라고 보고하였다. 본 연구결과에서도 초정수압 처리로 인하여 생균수가 감소한 앞선 결과를 통해 미생물의 살균효과와 단백질의 구조 변화로 인하여 VBN의 함량이 감소한 것으로 사료되어진다(Hoover et al., 1989).



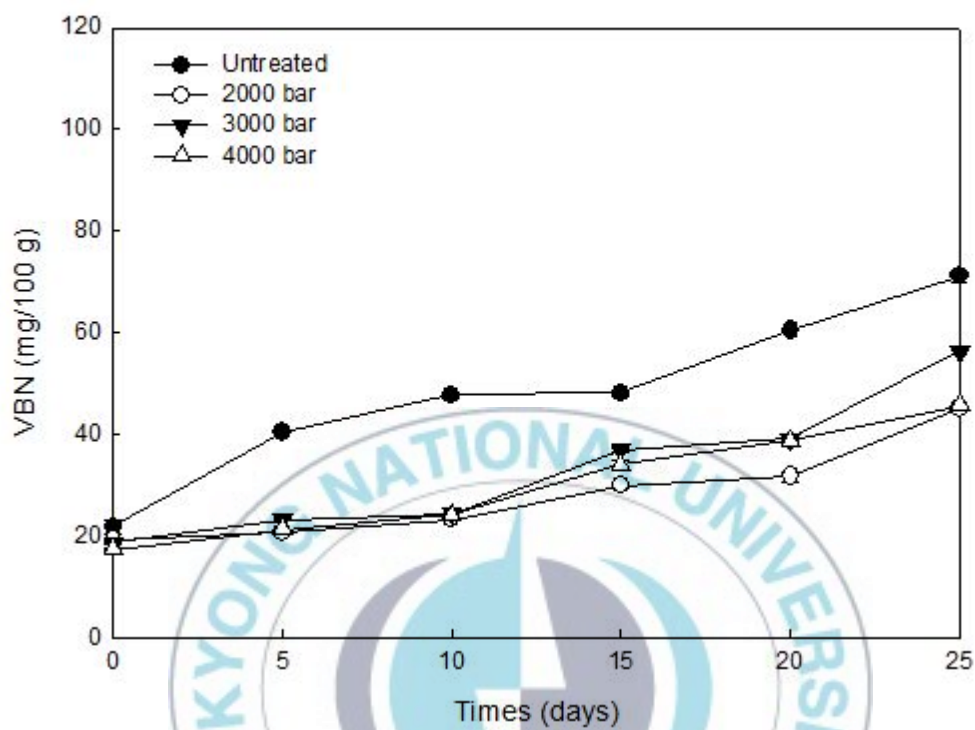


Fig. 9. Changes in VBN of mackerel fillet treated with high hydrostatic pressure at 4°C.

2. Histidine Decarboxylase 정제

*Morganella morganii*로부터 얻은 균체를 초음파 처리하여 조효소를 얻은 후 polyethylenimine을 최종농도가 0.002%가 되도록 첨가하여 30분간 교반한 후, 원심분리(23,500×g, 90 min, 4℃)하여 침전물을 제거하였다. 상층액은 35 및 70% 포화 ammonium sulfate 용액으로 염석을 실시하였다. 먼저, 35% 포화 ammonium sulfate 용액으로 염석을 한 후, 원심분리(12,000×g, 30 min, 4℃)하였으며 상층액은 70% 포화 ammonium sulfate 용액으로 염석한 후, 원심분리(12,000×g, 30 min, 4℃)하여 침전물을 얻었다. 이를 4℃에서 40시간동안 buffer C(0.05 mM potassium phosphate, 0.05 mM succinate, 0.1 mM EDTA, 0.01 mM pyridoxal phosphate, 0.02 mM dithiothreitol, 0.5%(v/v) polyethylene glycol no. 300)로 투석(M.W.12,000-14,000)을 진행하였다. 투석한 용액의 histamine 함량을 측정한 결과(Fig. 10), 70% 포화 ammonium sulfate 염석 침전물의 histamine 함량이 높게 측정됨을 확인하였다. 투석한 용액을 buffer A로 평행화시킨 DEAE-sephadex chromatography(Ø1.7 × 20.0 cm)로 용출 및 분획하였으며 NaCl 농도를 0-0.4 M로 단계적으로 분획하였다. 그 결과(Fig. 11), 총 165개의 fraction을 얻었으며 0.1 M NaCl 농도에서 fraction 52, 53번이 높은 HDC 효소활성을 보였다. DEAE-sephadex에서 얻은 활성 분획을 ultrafiltration cell을 이용하여 농축한 후, buffer B로 평행화시킨 aminohexyl-sepharose chromatography(Ø1.7 × 20.0 cm)로 용출하였으며 0-0.5 M NaCl을 농도구배로 단계적으로 분획하였다. 그 결과(Fig. 12), 총 160개의

fraction을 얻었으며 0.15 M NaCl 농도에서 fraction 61, 62번이 높은 HDC 효소활성을 보였다. Aminoethyl-sepharose 분획에서 얻은 활성 분획을 ultrafiltration cell을 이용하여 농축한 후, buffer B로 평행화시킨 sephacryl S-300 HR chromatography($\varnothing 1.7 \times 20.0$ cm)을 이용하여 용출 및 분획하였다(Fig. 13). Sephacryl S-300 HR 까지 정제한 HDC 효소는 specific activity가 250.81 U/mg, 수율이 0.98%임을 확인하였다(Table 2).



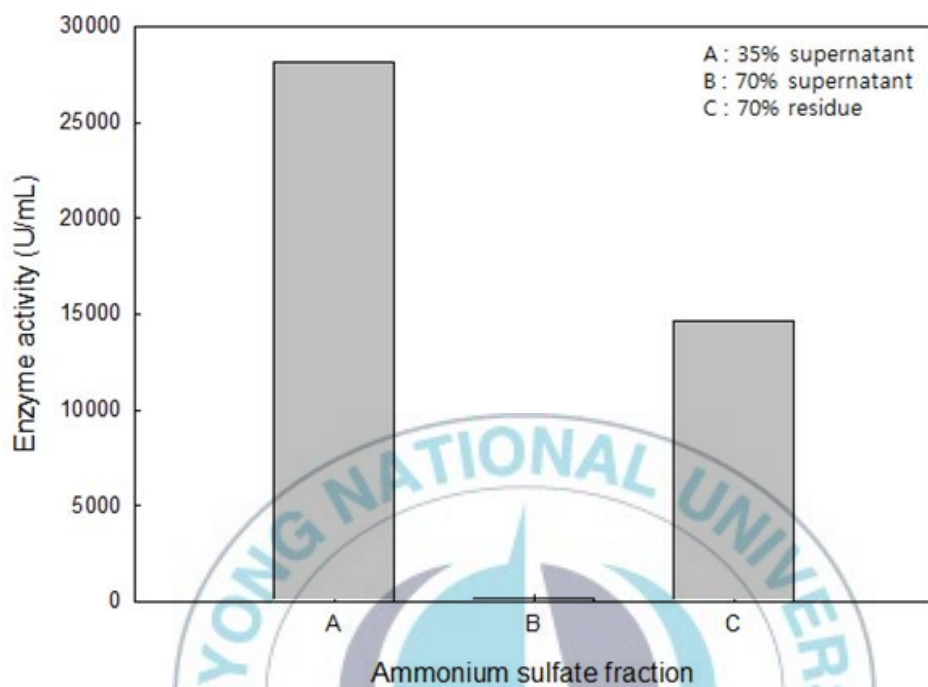


Fig. 10. Histidine decarboxylase activity of ammonium sulfate salting out fraction.

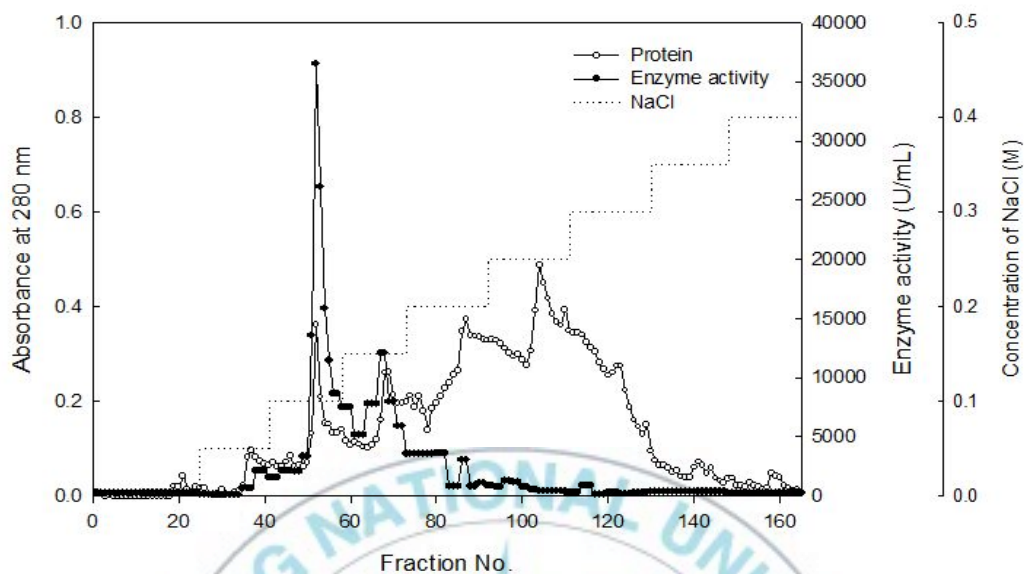


Fig. 11. DEAE sephadex chromatography of the saturated ammonium sulfate solution in the range of 70%. The enzyme was eluted with gradient of 0-0.4 M NaCl in reaction buffer(100 mM potassium phosphate, 0.1 mM EDTA, 0.01 mM PLP, 0.02 mM DTT, 5% polyethylenglykol, pH 6.5). The flow rate and fraction volume was 1.25 mL/min and 1.2 mL, respectively.

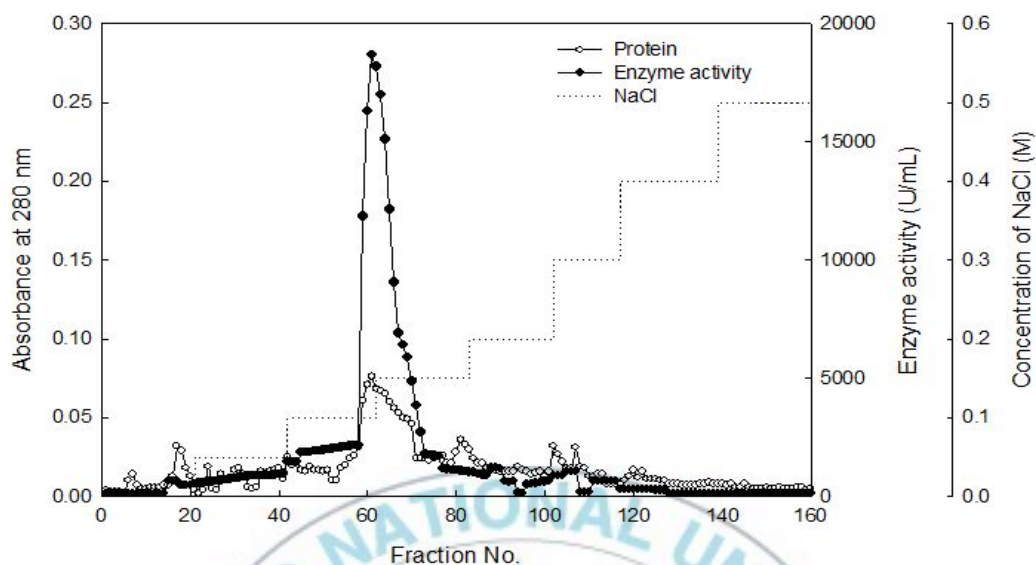


Fig. 12. Amino-hexyl sepharose chromatography of purified fractions by DEAE sephadex active fractions. The enzyme was eluted with gradient of 0–0.5 M NaCl in reaction buffer(20 mM potassium phosphate, 20 mM succinate, 0.1 mM EDTA, 0.005 mM PLP, 0.02 mM DTT, 1% polyethylenglykol, pH 5.8). The flow rate and fraction volume was 0.64 mL/min and 0.63 mL, respectively.

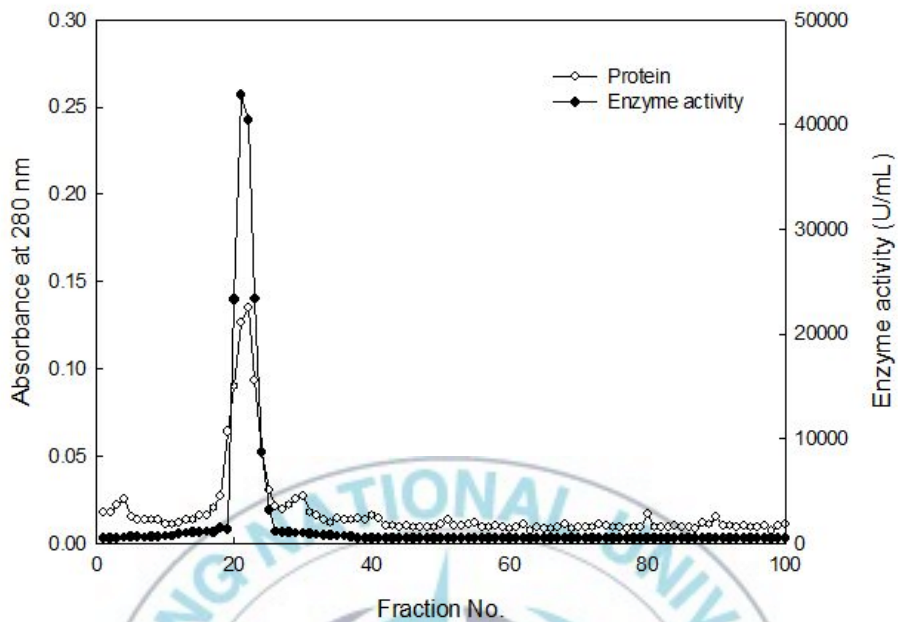


Fig. 13. Sephacryl S-300 HR chromatography of purified fractions by amino-hexyl sepharose active fractions. The enzyme was eluted with reaction buffer(20 mM potassium phosphate, 20 mM succinate, 0.1 mM EDTA, 0.005 mM PLP, 0.02 mM DTT, 1% polyethylenglykol, pH 5.8). The flow rate and fraction volumn was 0.56 mL/min and 0.63 mL, respectively.

Table 2. Purification of histidine decarboxylase from *Morganella morganii*

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude enzyme	12799.03	40495.68	3.16	100.00	1.00
Polyethylenimine treatment	2780.40	40225.52	14.47	99.33	4.57
Ammonium Sulfate Fractionation	1583.99	28140.95	17.77	69.49	5.62
DEAE sephadex	797.70	14673.56	18.39	36.23	5.81
Amino-hexyl sepharose	10.26	681.44	66.42	1.68	20.99
Sephacryl S-300	1.59	398.85	250.81	0.98	79.27

3. Histidine Decarboxylase 저해활성

천연물 및 초정수압 처리에 의한 효과를 증명하기 위하여 정제된 histidine decarboxylase에 대한 저해활성을 측정하였다.

3-1. 천연물에 의한 Histidine Decarboxylase 저해 활성

고등어 내의 histidine은 오염된 미생물이 생산하는 histidine decarboxylase에 의하여 탈탄산작용을 거쳐 histamine을 생성하게 된다. Histamine을 생성하는 미생물로는 장내세균인 *Morganella morganii*가 가장 대표적인 것으로 알려져 있다. 따라서, *Morganella morganii* 유래 정제된 histidine decarboxylase에 대한 천연물의 저해활성을 측정하였다. Kim(2012)은 *Morganella morganii* 유래 crude histidine decarboxylase에 대해 감태(*Ecklonia cava*) 및 대황(*Eisenia bicyclis*)이 높은 저해활성을 보인다고 하여 이를 인용하여 감태 및 대황 추출물에 대한 histidine decarboxylase의 저해활성을 측정하였다. 감태 에탄올 추출물에 대한 HDC 저해활성을 측정한 결과 (Table 3), 1 mg/mL에서 44.02%의 높은 저해율을 보였고 이를 액/액분배하여 얻은 ethyl acetate fraction과 silica-gel column chromatography를 실시하여 얻은 ethyl acetate 6 fraction에서는 각각 49.12% 및 53.02%의 저해활성을 나타내어 분리가 진행될수록 HDC 저해효과가 증진됨을 확인하였다. 또한 대황 에탄올 추출물에 대한 HDC 저해활성을 측정한 결과 (Table 4), 1 mg/mL에서 26.55%의 저해율을 나타내었으며 이를 액/액분배하여 얻은 ethyl acetate

fraction과 silica-gel column chromatography를 실시하여 얻은 ethyl acetate 2 fraction에서는 각각 47.54% 및 50.97%의 저해활성을 나타내어 높은 HDC 저해활성을 나타내었다. Kim 등(2012)은 감태 에탄올 추출물로부터 분리한 ethyl acetate 분획이 에탄올 보다 높은 lipase 저해활성을 나타내었고 이를 silica-gel column chromatography를 실시한 결과, crude ethyl acetate 분획 보다 높은 활성을 나타내어 본 연구와 유사한 결과를 나타냈다. 또한, Moon (2011)등 대황 ethyl acetate 분획이 에탄올 보다 높은 protein tyrosine phosphatase 1B와 α -glucosidase 저해활성을 가진다고 하였으며 이는 대황이 가지는 phlorotannin 유래 물질인 것으로 밝혀졌다. 해조류의 ethyl acetate 분획은 tannin과 같은 polyphenol의 함량이 높다고 하였으며 이는 효소단백질과 강하게 결합하여 효소의 활성을 저해한다고 보고하였다(Bitou et al., 1999). 이에 대황 ethyl acetate 2 fraction을 최종적으로 HPLC(high performance liquid chromatography)에서 분리한 dieckol, pyrido[3,4-d]pyrimidine 7i 및 fucofuroeckol이 1 mg/mL에서 각각 72.47%, 47.29% 및 40.91%의 저해활성을 나타내었으며 그 중에서도 dieckol이 IC_{50} 값이 0.51 mg/mL으로 가장 높은 저해활성을 나타내었다(Table 5). Dieckol은 대표적인 phlorotannin 화합물로서 phloroglucinol을 기본구성단위로 하는 폴리페놀 화합물이며 항산화(Nakamura et al., 1996), 항바이러스(Ahn et al., 2004) 및 tyrosinase 저해활성(Kim et al., 2004) 등 다양한 기능성을 나타내는 것으로 알려져있다. Polyphenol 화합물은 단백질과 착물을 이루는 친화력이 뛰어난 것으로 알려져 있어 이 물질

의 hydroxyl group과 HDC효소의 결합부위가 수소 및 이온결합을 통해 강한 복합체를 형성함으로써 효소들과 비선택적 침전반응을 통하여 효소의 활성을 저해한 것으로 사료되어진다(Deavile et al., 2007, Lee et al., 2009).



Table 3. Inhibitory activity of *Ecklonia cava* extracts against histidine decarboxylase from *Morganella morganii*

Sample	Inhibitory activity (%)
EtOH extract	44.02±0.89 ^{c2)}
Ethyl acetate fraction	49.12±0.18 ^b
EA 6 ¹⁾	53.02±0.80 ^a

* Concentration : 1 mg/mL

¹⁾ Ethyl acetate 6 fraction separated from silica gel chromatography.

²⁾ Means in the same row(a-d) bearing different superscript in samples are significantly different by Duncan's multiple range test ($p<0.05$).



Table 4. Inhibitory activity of *Eisenia bicyclis* extracts against histidine decarboxylase from *Morganella morganii*

Sample	Inhibitory activity (%)
EtOH extract	26.55±0.73 ^{d5)}
Ethyl acetate fraction	47.54±1.01 ^b
EA 2 ¹⁾	50.97±1.01 ^b
EA 2 - 5 fraction ²⁾	72.47±1.96 ^a
EA 2 - 7 fraction ³⁾	47.29±0.98 ^b
EA 2 - 8 fraction ⁴⁾	45.33±0.54 ^c

* Concentration : 1 mg/mL

¹⁾ Ethyl acetate 2 fraction separated from silica gel chromatography.

²⁾ Dieckol

³⁾ Pyrido[3,4-d]pyrimidine 7i

⁴⁾ Fucofuroeckol

⁵⁾ Means in the same row(a-d) bearing different superscript in samples are significantly different by Duncan's multiple range test ($p<0.05$).

Table 5. Inhibitory activity of dieckol separated from *Eisenia bicyclis* extracts against histidine decarboxylase from *Morganella morganii*

	Inhibitory activity (%)		IC ₅₀ (mg/mL)
	1 mg/mL	0.5 mg/mL	
Dieckol	72.47±1.96 ^{a1)}	48.55±0.75 ^b	0.51±0.01

¹⁾ Means in the same row(a-d) bearing different superscript in samples are significantly different by Duncan's multiple range test ($p<0.05$).



3-2. 초정수압 처리에 의한 Histidine Decarboxylase 저해 활성

초정수압 가공기술은 액체 또는 고체 식품을 100-900 MPa의 정수압을 이용하여 압력매체로 물이나 기름 같은 용액의 압력을 순간적으로 균일하게 전달하여 처리하는 기술이다. 식품가공에서 열처리와 압력처리는 모두 소화성을 향상시키는데 열처리는 화학적 변화가 많이 일어나는데 반하여 압력 처리 중의 하나인 초정수압 처리는 화학적으로 큰 변화를 일으키지 않아 식품 내 주요 성분은 유지하면서 미생물 및 효소의 불활성화에 매우 뛰어난 효과를 가지고 있어 식품산업에서 고품질의 제품생산을 위한 목적으로 그 중요성이 부각되고 있다 (Rastogi et al., 2007, Park et al., 2010). 이에 고등어 육중의 histidine을 histamine으로 전환시켜 알레르기성 식중독을 유발하는데 관여하는 histidine decarboxylase을 생산하는 미생물인 *M. morganii* 유래 HDC를 정제하여 초정수압 처리에 의한 저해활성을 측정하였다. HDC에 대해서 초정수압을 1000, 2000, 3000 및 4000 bar로 처리한 결과(Table 6), 각각 12.79, 22.66, 34.34 및 52.82%의 저해활성을 보여 처리 압력이 높아질수록 HDC에 대한 저해율이 유의적으로 증가하였으며 특히, 4000 bar에서 가장 높은 저해활성을 보였다. Jianyong 등(2011)은 버섯의 갈변화를 일으키는 polyphenol oxidase의 활성을 저해시키기 위하여 초정수압을 처리한 결과, 효소의 활성이 감소하였으며 처리 압력이 높아질수록 높은 저해효과를 보였으며 딸기의 풍미와 색에 관여하는 중요한 효소인 β -glucosidase, peroxidase 및 polyphenol oxidase에 대해 초정수압을 처리한 결과 역시, 처리 압력이 높아짐에 따라 저해활성이 높게 나타나 본 연구와 유사한 결과

를 보였다(Alberto et al., 2004). 초정수압은 비공유결합인 이온결합과 수소결합 등을 파괴하는 것으로 알려져 있는데 단백질의 경우, 비공유결합으로 전체 구조를 이루고 있기 때문에 초정수압 처리에 의하여 단백질의 구조적인 변화를 일으킨다. 효소의 경우 활성 부위의 구조가 생물학적인 활성을 나타내는데 이 부위가 변성을 일으켜 단백질이 침전되거나 용해되어 효소의 활성을 저해하는 것으로 알려져 있다(Rastogi et al., 2007). 따라서 HDC 역시, 초정수압 처리로 인하여 효소 활성부위의 구조적인 변화로 인해 활성이 감소한 것으로 사료된다.



Table 6. Inhibitory activity against histidine decarboxylase from *Morganella morganii* treated with high hydrostatic pressure

	Inhibitory activity (%)			
	1000 bar	2000 bar	3000 bar	4000 bar
<i>M. morganii</i>	12.79±0.94 ^{d1)}	22.66±0.62 ^c	34.34±0.71 ^b	52.82±0.42 ^a

1) Means in the same row(a-d) bearing different superscript in samples are significantly different by Duncan's multiple range test ($p<0.05$).



요 약

1. 천연물 및 초정수압 처리에 의한 고등어 내 Histamine 생성 억제 효과

1-1. 천연물 침지에 의한 고등어육 내의 histamine 생성 억제 효과를 보기 위하여 대황, 감태 추출물을 침지한 고등어 필렛을 4℃에서 25일간 저장하면서 생균수와 histamine 생성량, pH 및 VBN 함량 변화를 측정하였다. 그 결과, 생균수의 경우, 대황 및 감태 침지 처리구가 무처리보다 약 2 log cycle 정도 균이 억제되는 것을 확인할 수 있었고 histamine 생성량은 5일차에 감태 및 대황 침지 처리구가 115.83 및 96.41 ppm을 나타내어 무처리구의 384.62 ppm에 비해 초기 단계에서 histamine의 생성이 감소되는 것을 확인하였다. 감태 및 대황 침지 처리구는 낮은 pH 변화를 보였고 VBN의 함량이 감소하였다.

1-2. 초정수압 처리에 의한 고등어육 내의 histamine 생성 억제 효과를 보기 위하여 고등어 필렛에 2000, 3000 및 4000 bar 초정수압 처리 후 4℃에서 25일간 저장하면서 생균수와 histamine 생성량을 측정하였다. 그 결과, 생균수의 경우, 3000 bar 처리구에서는 저장 5일차에 무처리와 비교 시 2-3 log cycle 정도 균이 감소하였고 4000 bar의 경우 균이 생성되지 않아 사멸 효과를 보였다. 초정수압 처리구는 저장기간에 따라 pH가 유지되었고 VBN 함량이 감소하였

다.

2. *Morganella morganii*로부터 Histidine Decarboxylase 정제

*Morganella morganii*로부터 histidine decarboxylase를 정제하기 위하여 균체를 얻은 후, 초음파 처리하여 조효소액을 얻었다. 이를 35-70%로 포화 ammonium sulfate로 염석을 실시한 후 투석막 (M.W.10,000-12,000)을 이용하여 투석을 행하였다. 투석한 용액을 DEAE-sephadex chromatography을 실시하여 0.1 M NaCl 농도에서 활성 분획을 획득하였고 이를 Aminohexy-sepharose 분획을 실시하여 0.15 M NaCl 농도에서 활성 분획을 분리하였다. 이 분획을 sephacryl S-300 HR을 실시하여 histamine 생성 활성이 가장 높은 분획을 획득하였다.

3. 정제된 Histidine Decarboxylase에 대한 천연물 및 초정수압 처리 효과

3-1. 천연물에 의한 histidine decarboxylase 저해활성

감태 에탄올 추출물, ethyl acetate fraction 및 ethyl acetate 6 fraction에 대한 *M. morganii* 유래 정제된 HDC의 저해활성을 측정한 결과, 1 mg/mL에서 각각 44.02, 49.12 및 53.02%의 높은 저해활성을 나타내었다. 또한, 대황 에탄올 추출물로부터 분리한 dieckol, pyrido[3,4-d]pyrimidine 7i 및 fucofuroeckol이 1 mg/mL에서 각각 72.47%, 47.29% 및 40.91%의 저해활성을 나타내었으며 그 중에서도 dieckol이 IC₅₀ 값이 0.51 mg/mL으로 가장 높

은 저해활성을 나타내었다.

3-2. 초정수압 처리에 의한 histidine decarboxylase 저해활성

초정수압 처리에 의한 *M. morganii* 유래 정제된 HDC의 저해활성을 측정한 결과, 1000, 2000, 3000 및 4000 bar의 조건에서 각각 12.79, 22.66, 34.34 및 52.82%의 저해활성을 보여 처리 압력이 높아질수록 HDC의 저해율 유의적으로 증가하였으며 특히, 4000 bar에서 가장 높은 저해활성을 보였다.



참고 문헌

Ahn MJ, Yoon KD, Min SY, Lee JS, Kim JH, Kim TG, Kim SH, Kim NK, Huh H, Kim JW. 2004. Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase and protease by phlorotannins from the brown alga *Ecklonia cava*. Biol. Pharm. Bull. 27, 544-547.

Alberto GP, Winai S, Paul K, Ioannis Z. 2004. The effects of high hydrostatic pressure on β -glucosidase, peroxidase and polyphenol oxidase in red raspberry (*Rubus idaeus*) and strawberry (*Fragaria*×*ananassa*). Food Chemistry 88, 7-10.

Arnold H, Brown D. 1978. Histamine toxicity from fish products. Advan Food Res 24, 113-154.

Bitou N, Ninomiya M, Tsujita T, Okuda H. 1999. Screening of inhibitors from marine algae. Lipids 34, 441-445.

Bover-Cid S, Belletti N, Garriga M, Aymerich T. 2011. Model for *Listeria monocytogenes* inactivation on dry-cured ham by high hydrostatic pressure processing. Food Microbiol 28, 804-809.

Bull MK, Hayman MM, Stewart CM, Szabo EA, Knabel SJ. 2005. Effect of prior growth temperature, type of enrichment medium, and temperature and time of storage on recovery

Cleland WW. 1967. Enzyme Kinetics. Annual Review of Biochemistry 36, 77-112.

Deavile ER, Green RJ, Muller-Harvey I, Willoughby I, Frazier RA. 2007. Hydrolyzable tannin structures influence relative globular and random coil protein binding strengths. J Agr Sci Food Chem 55, 4554-4561.

Eom SH, Park JH, Yu DU, Choi JI, Choi JD, Lee MS, Kim YM. 2011. Antimicrobial activity of brown alga *Eisenia bicyclis* against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Fish Aquat Sci 14, 215-256.

Farkas, D.F and D.G. Hoover. 2001. High pressure processing. J. Food Sci 65, 46-64.

FDA. 2011. Potential species-related and process-related hazards. In: Fish and fishery products hazards and controls guidance. 4rd ed.. Department of Health and Human Services,

Public Health Service, Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutr., Office of Seafood, Washington, DC.

Freencik M. 1970. Formulation of histamine during bacterial decarboxylation of histidine in the fish of some marine fishes. J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol 14, 52-60.

Garcia DJ. 1998. Omega-3 long-chain PUFA nutraceuticals. Food Technol 52, 44-49.

Gou JG, Zou Y, Choi GP, Park YB, Ahn JH. 2011. Effect of High Pressure Processing on the Shelf Life of Seasoned Squid. J Korean Soc Food Sci Nutr 40, 1136-1140.

Hoover DG, Metrick C, Papineau AM, Farkas DF, Knorr D. 1989. Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms. Food technology 43, 99-107.

Hungerford JM. 2010. Scombroid poisoning: A review. Toxicon 56, 231-243.

Jianyong Yi, Bin Jiang, Zhong Zhang, Xiaojun Liao, Yan Zhang,

and Xiaosong Hu. 2011. Effect of Ultrahigh Hydrostatic Pressure on the Activity and Structure of Mushroom (*Agaricusbisporus*) Polyphenoloxidase. Agricultural and food chemical 60, 593-599.

Jin SK, Kim IS, Hah KH, Park KH, Kim IJ, Lee JR. 2006. Changes of pH, acidity, protease activity and microorganism on sauces using a korean traditional seasoning during cold storage. Korean J Food Sci Ani Resour 26, 159-165.

Kang SG, Park NH, Ko DO, Li JL, Kim BS, Park YK. 2011. Effects of High Hydrostatic Pressure and Gamma Irradiation on Quality and Microbiological Changes of *Kochujang-Gulbi*. Korean J Food Preserv 18, 1-6.

Kim DH. 2012. Inhibitory effect of natural materials and high hydrostatic pressure treatments on histamine production in mackerel. Pukyong National University, Busan, Korea.

Kim JS, Yeum DM, Kang HG, Kim IS, Kong CS, Lee TG, Heu TG. 2002. Fundamentals and applications for canned foods. Hyoil Publsihing Co., Seoul, p 32-36.

Kim KBWR, Jung JY, Cho JY, Ahn 오. 2012. Lipase inhibitory

activity of ethyl acetate fraction from *Ecklonia cava* extracts. Biotechnol. Bioprocess Eng. 17, 739-745.

Kim MJ, Kim KBWR, Lee CJ, Kwak JH, Kim DH, Sunwoo C, Jung SA, Kang JY, Kim HY, Choi JY, Ahn DH. 2011. Effect of *Sargassum fulvellum* extracts on shelf-life and quality improvement of bread. J Korean Soc Food Sci Nutr 40, 867-874.

Kim MJ, Song EJ, Kim KBWR, Lee CJ, Jung JY, Kwak JH, Choi MK, Kim DH, Sunwoo C, Choi JY, Ahn DH. 2011. Effect of *Sargassum sagamianum* extract on shelf-life and improved quality of moring bread. Korean J Food Sci Technol 43, 723-728.

Kim JA, Lee JM, Shin DB, Lee NH. 2004. The antioxidant activity and tyrosinase inhibitory of phlorotannin in *Ecklonia cava*. Food Sci. Biotechnol. 13, 476-480.

Knorr D. 1933. Effects of high-hydrostatic-pressure processes on food safety and quality. Food technology 47, 158-161.

Korean Food and Drug Administration. 2002. Official Book for

Food. Seoul, Korea. 221-222.

Kruk ZA, Yun HJ, Rutley DL, Lee EJ, Kim YJ, Jo C. 2011. The effect of high pressure on microbial population, meat quality and sensory characteristics of chicken breast fillet. Food Control 22, 6-12.

Lee CY, TW Kim, CK Sung. 1996. Studies on the souring of *Hansan Sogokju*(Korean traditional rice wine). Kor. J. Food Sci. Technol 28, 117-121.

Lee HN. 2009a. Catch and oceanographic characteristics for large purse seine fisheries. Korea. Pukyong National University.

Lee SH, Li Y, Karadeniz F, Kim MM, Kim SK. 2009b. α -Glucosidase and α -amylase inhibitory activities of phloroglucinal derivatives from edible marine brown alga, *Ecklonia cava*. J Sci Food Agric 89,1552-1558.

Lee SY. 2010. Identification and mechanism of action of antimicrobial substance from brown algae. Pukyong National University, Busan, Korea.

Lehane L, Olley J. 2000. Histamine fish poisoning revisited. International Journal of Food Microbiology 58, 1-37.

Lerke PA, Werner SB, Taylor L, Guthertz LS. 1978. Scombroid poisoning. Report of an outbreak. West J Med 129, 381-386.

Li Y, Qian ZJ, Ryu BM, Lee SH, Kim MM, Kim SK. 2009. Chemical components and its antioxidant properties in vitro: an edible marine brown alga, *Ecklonia cava*. Bioorgan Med Chem 17, 1963-1973.

Jung JY. 2011. Lipase inhibitory activity of *Ecklonia cava* extracts. Pukyong National University, Busan, Korea.

Lingnert H, Eriksson CE. 1980. Antioxidative maillard reaction products. I. Products from sugars and free amino acids. J Food Proc Preserv 4, 161-172.

Mackie IM, Pirie L, Yamanaka H. 1997. Biogenic amine composition of the gonads herring(*Clupea harengus*), mackerel(*Scomber scombrus*) and scallop(*Pecten maximus*) in foods. Food Chemistry 103, 1475-1486.

Maintz L, Novak N. 2007. Histamine and histamine intolerance. The American Journal of Clinical Nutrition 85, 1185-1196.

Moon HE, Islam MN, Ahn BR, Chowdhury SS, Sohn HS, Jung HA, Choi JS. 2011. Protein tyrosine phosphatase 1B and α -glucosidase inhibitory phlorotannins from edible brown algae, *Ecklonia stolonifera* and *Eisenia bicyclis*. Biosci Biotechnol Biochem 75, 1472-1480.

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.

Nakamura T, Nagayama K, Uchida K, Tanaka R. 1996. Antioxidant activity of phlorotannins isolated from the brown alga *Eisenia bicyclis*. Fisheries Sci. 62, 923-926.

Omura V, Orice RJ, Olcott HS. 1978. Histamine forming bacteria isolated from spoiled skipjack mackerel. J Food Sci 43, 1779-1787.

Park HJ, Kim KY, Han GJ, Jeong HS. 2007. Quality of jujube

wine with high hydrostatic pressure and freezing treatment. J Korean Soc Food Sci Nutr 36, 1351-1491.

Park J, Na S, Lee Y. 2010. Present and future of nonthermal food processing technology. Food Sci. Ind 75, 1-20.

Park SJ, Park DS, Lee SB, He X, Ahn JH, Yoon WB, Lee HY. 2011. Enhancement of antioxidant activities of *Codonopsis lanceolata* and fermented *Codonopsis lanceolata* by ultra high pressure extraction. J Korean Soc Food Sci Nutr 39, 1898-1902.

Park YH, Jang DS, Kim ST. 1997. Processing and using of fishery science. Hyungseol Press, Seoul, Korea. p 73.

Park WJ, Jwa MK, Hyun SH, Lim S, Song DJ. 2006. Microbial and quality changes during storage of raw oyster treated with high hydrostatic pressure. J Korean Soc Food Sci Nutr 35, 1449-1455.

Rastogi NK, Raghavarao KSMS, Balasubramaniam VM, Niranjan K, Knorr D. 2007. Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. Cri Rev Food Sci Nitr 47, 69-112.

Sakami T. 1995. Effects of algal excreted matters on epiphytic bacteria on the brown alga, *Eisenia bicyclis*. Bulletin of National Research Institute of Aquaculture. 28, 39-90.

San Martin MF, Barbose-Canovas GV, Swanson BG. 2002. Food Processing by high hydrostatic pressure. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 46, 627-645.

Shakila RS, Vasundhara TS, Vijaya Rao D. 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°C. Z Lebensm Unters For 203, 71-76.

Shalaby AR. 1997. Significance of biogenic amines to food safety and human health. Food Chemistry 82, 347-352.

Shin SR, Hong JY, Nam HS, Huh SM, Kim KS. 2006. Chemical changes of salted mackerel by Korean herbal extracts treatment and storage methods. Korean J Food Preserv 13, 18-23.

Sin SY, Jang MS, Kwon MA, Seo HJ. 2004. Processing of

functional mackerel fillet and quality changes during storage. Korean J Food Preserv 4, 161-172.

Song HN, Lee DG, Han SW, Yoon HK, Hwang IK. 2005. Quality changes of salted and semi-dried mackerel fillets by UV treatment during refrigerated storage. Korean J Food Cookery Sci 21, 662-668.

Stephens PJ. 2005. Recovery of stressed bacteria. Culture 26, 5-8.

Taylor SL. 1986. Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects. Crit Rev Toxicol 17, 91-128.

Wendakoon CN, Sakaguchi M. 1995. Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active component in spices. Journal of Food Protection 58, 280-283.

Yoon NY, Lee SH, Wijesekara, Kim SK. 2011. *In Vitro* and Intracellular Antioxidant Activities of Brown Alga *Eisenia bicyclis*. Fish Aquat Sci 14, 179-185.

Yoshinaga DH, Frank HA. 1982. Histamine-producing bacteria in

decomposing skipjack tuna. Apple Environ. Microbial 44,
447-452.



감사의 글

2년간의 석사과정을 마치고 논문이 완성될 수 있도록 도와주신 분들께 모두 감사드립니다. 먼저, 지난 4년간 다사다난했던 실험실 생활동안 부족한 저에게 항상 따뜻한 웃음으로 대해주시고 아낌없는 가르침과 끝까지 포기하지 않고 할 수 있도록 지도해주신 안동현 교수님께 진심으로 감사드립니다. 제 논문을 심사해주신 조영제 교수님과 전병수 교수님께도 감사드리며 학부, 대학원 생활동안 많은 가르침을 주신 김선봉 교수님, 양지영 교수님, 이양봉 교수님, 김영목 교수님께도 감사의 마음을 전합니다.

4년 동안 함께 생활한 가족 같은 식품자원개발실 선후배님들에게도 감사드립니다. 실험과 학문적인 부분뿐만 아니라 생활에서도 항상 조언을 아끼지 않았던 꽃봉언니, 엄마같이 챙겨줬던 민지언니, 너무 고마운 영원한 내 사수(師授) 금동선배와 늘 힘이 되어준 찬이선배에게 감사의 마음을 전합니다. 서로 의지하면서 웃고 울었던 하나뿐인 동기 현지와 부족한 선배이지만 믿고 따라 와주는 너무 예쁘고 고마운 후배들 다현, 보경, 시우, 원민, 보람이언니, 자은, 홍민, 나경, 지훈, 지혜, 난영이에게도 고마움과 앞으로도 항상 최선을 다하는 자랑스러운 식품자원개발실원이 되었으면 하는 바람을 전합니다.

함께 있으면 무서울 게 하나도 없는 오랜 벗인 은주, 지혜, 보미, 강나, 이소, 기령이, 지연이, 최씨, 결이, 원휘, 은지, 명래와 항상 응원해주는 소중한 내 친구 영은이, 혜인이, 주현이, 상희, 미미, 아미, 정은이와 20살에 만난 가장 큰 행운인 주희, 유미, 아름이 그리고 항상 든든하고 예뻐해주는 준하오빠, 형훈이오빠, 정욱이오빠, 우종이오빠, 힘들 때마다 용기줬던 보경이언니에게도 감사의 마음을 전합니다.

항상 내 의사를 존중해주면서 공부에 전념할 수 있도록 도와주고 가장 큰 힘이 되어준 늘 한결같은 동은이오빠, 늦은 밤 항상 마중 나오면서 동생 챙겨준 하나뿐인 우리오빠, 매일같이 예쁜말 사랑해를 외쳐주시는 나의 가장 든든한 지원군인 우리아빠와 힘들 때면 내 어린 투정 다 받아주시며 언제나 내 편에서 나보다 더 마음 고생하면서 위로해준 우리엄마, 가족들이 있었기에 이 논문을 완성할 수 있었고 너무 감사하고 사랑하는 마음으로 대학원 생활의 마지막 결실의 기쁨을 받칩니다.

지난 대학원 시절을 되돌아보면 기쁜 일, 슬픈 일 그리고 힘든 일도 많이 있었지만 하나하나 배우고 노력하면서 극복해나갔던, 제가 한 단계 더 성숙할 수 있었던 정말 소중한 시간들이었습니다. 석사과정을 마무리하며 2년간의 배움을 밑거름으로 이제 부터는 다시 새로운 시작과 도전을 위해 노력하고 발전하는 사람이 되도록 노력하겠습니다. 많은 도움과 관심, 사랑을 주셨던 모든 분들께 다시 한 번 감사드립니다.

