



저작자표시-비영리 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 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
고등어육 중의 히스타민
생성 억제 효과



食 品 工 學 科

金 東 玄

工學碩士 學位論文

천연물 및 초정수압 처리에 의한
고등어육 중의 히스타민
생성 억제 효과

指導教授 安 東 賢

이 論文을 工學碩士 學位論文으로 提出함

2012年 8月

釜慶大學校 大學院

食 品 工 學 科

金 東 玄

金東玄의 工學碩士 學位論文으로 認准함

2012年 8月



주 심

수산학박사

조 영 제



위 원

공학박사

전 병 수



위 원

농학박사

안 동 현



목 차

Abstract	iv
서 론	1
재료 및 방법	10
1. 실험 재 료.....	10
1-1. 시료	10
1-2. 배지 및 시약	10
1-3. 시험균주	11
2. 시료 추출	11
2-1. 감태 및 대황 유래 Phlorotannin인 Dieckol 분리 및 정제	12
2-1-1. 액액 분배법에 의한 감태 및 대황 추출물의 분획	12
2-1-2. Silica gel column chromatography에 의한 감태 및 대황 ethyl acetate 추출물의 분획	12
2-1-3. HPLC에 의한 분리 · 정제	13
2-1-4. NMR에 의한 구조 분석	13

3. Histamine-Producing Bacteria 생육 저해활성	14
3-1. Disk Diffusion Method	14
3-2. Minimum Inhibitory Concentration(MIC)	14
4. Histidine Decarboxylase 저해활성	15
4-1. Histamine-Producing Bacteria의 최적 배양 시간 조건	15
4-2. 조효소액 제조	15
4-3. Histidine Decarboxylase 저해활성 측정	18
4-3-1. 천연물에 의한 Histidine Decarboxylase 저해활성 측정	18
4-3-2. 천연물에 의한 Histidine Decarboxylase 저해 양식	19
4-3-3. 초정수압(High Hydrostatic Pressure, HHP) 처리	19
5. 고등어육에서의 효과	19
5-1. 시료 전처리	19
5-2. 일반세균수 측정	21
5-3. 고등어육내의 Histamine 생성량 측정	21
6. 통계처리	22

결과 및 고찰..... 23

1. Histamine-Producing Bacteria 생육 저해활성	23
---	----

1-1. Disk Diffusion Method에 의한 항균활성	23
1-2. 천연물 에탄올 추출물의 최소생육억제(MIC)	26
2. Histidine Decarboxylase 저해활성	29
2-1. Histamine-Producing Bacteria의 최적 배양 시간 조건	29
2-2. 천연물에 의한 Histidine Decarboxylase 저해활성	32
2-3. 천연물에 의한 Histidine Decarboxylase 저해 양식	41
2-4. 초정수압 처리에 의한 Histidine Decarboxylase 저해활성	44
3. 고등어육에서의 효과	48
3-1. 항균 천연물을 이용한 고등어육 중의 Histamine 생성 억제.....	48
3-1-1. 미생물 생육 억제 효과	48
3-1-2. 고등어육 중의 Histamine 생성량 측정	52
3-2. 효소 저해 천연물을 이용한 고등어육 중의 Histamine 생성 억제	56
3-3. 초정수압 처리에 의한 고등어육내의 Histamine 생성 억제.....	61
3-3-1. 미생물 생육 억제 효과	61
3-3-2. 고등어육 중의 Histamine 생성량 측정	66
요 약	70

Inhibitory Effect of Natural Materials and High
Hydrostatic Pressure Treatments on Histamine
Production in Mackerel

Dong-Hyun Kim

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

Abstract

Histamine or scombroid fish poisoning is a type of food poisoning with symptoms and most common symptoms are an allergy-like form. Scombroid poisoning generally is one of the most frequently reported human illness associated with seafood because that results from eating fish belonging to the families *Scomberesocidae* and *Scombridae*, which typically include mackerel. The mackerel contains large amounts of free L-histidine in muscle tissue. The causative agent of scombroid

poisoning is histamine that is produced from free histidine due to the action of bacterial histidine decarboxylase (HDC). Therefore, this study was performed to investigate the inhibitory effects of natural materials and high hydrostatic pressure treatment on histamine production in mackerel. First, antimicrobial activity on histamine-producing bacteria that are mesophilic bacteria *Morganella morganii* and psychrotrophic bacteria *Photobacterium phosphoreum* of medicinal herbs and seaweeds were investigated by disk diffusion method and MIC test. The results of antimicrobial test, *S. chinensis* hot water and ethanol extracts and *E. cava* ethanol extract were shown the antibacterial activity against *M. morganii* and *S. chinensis* hot water and ethanol extract, *S. sagamianum* and *E. cava* ethanol extracts were shown the antibacterial activity against *P. phosphoreum* by disk diffusion method at a level of 5 mg/mL. As a result of measuring the MIC in extracts of these natural materials against *M. morganii* and *P. phosphoreum*, respectively, *S. chinensis* hot water and *E. cava* ethanol extracts were exhibited the antimicrobial activity at 2 mg/mL against *M. morganii*. *S. sagamianum* ethanol extract was shown the most excellent antibacterial activity at 0.015625 mg/mL followed by *E. cava* ethanol and *S. chinensis* hot water extracts at 0.125 and 1 mg/mL against *P. phosphoreum*, respectively. To verify

inhibitory activity of natural materials against crude HDC from *M. morganii* and *P. phosphoreum* L-histidine monohydrochloride monohydrate was used as substrate. The inhibitory activity of *S. sagamianum* ethanol extract among natural materials extracts against crude HDC from *M. morganii* showed the most highest inhibitory activity with 81.10% followed by *E. cava* and *E. bicyclis* ethanol extract with 33.79 and 19.82% at 1 mg/mL, respectively and *E. cava* ethanol extract was exhibited the most highest inhibitory activity against crude HDC from *P. phosphoreum* with 31.75% followed by *E. bicyclis* ethanol extract with 25.08% at 1 mg/mL. To obtain phlorotannin, dieckol, *E. cava* and *E. bicyclis* ethanol extract were isolated using liquid-liquid extraction, silica gel column chromatography and HPLC. Dieckol showed higher inhibitory activity than ethanol extract with 68.24% at 1 mg/mL and an IC_{50} value of 0.61 mg/mL. Another test was performed for inhibition effect on HHP against HDC. The crude HDC treated with HHP showed lower activity than the untreated that depending on increasing pressure. In addition, these were applied to mackerel and their inhibitory effect on histamine production was also examined. The histamine content in mackerel muscle treated with natural materials extracts and HHP decreased as compared to the untreated mackerel.

서론

21세기 경제 성장에 발맞추어 소비자들의 소득 수준이 향상됨에 따라 식품을 단지 생명을 유지하기 위한 에너지원이 아니라, 삶을 풍요롭게 즐길 수 있는 수단으로써 건강을 중요시 하는 웰빙 식품이 주목을 받고 있다. 그 중 수산물은 육상생물과 달리 저온, 고압, 저산소 등과 같은 특이한 환경조건에 적응하기 위해 독특한 2차 대사산물을 합성하여 생리기능성분 및 영양성분이 풍부하게 함유되어있다(Fenical, 1983; Valfre et al., 2003). 이에 수산물에 대한 소비자의 수요가 증가함에 따라 수산물 가공품 생산량이 2001년 1,546 천 톤에서 2010년 약 1,815 천 톤으로 꾸준히 증가하고 있다(MIFAFF, 2011).

고등어(*Scomber japonicas*)는 경골어류 농어목 고등어과에 속하며, 체형은 반추형으로 등부분과 측편은 청흑색, 배쪽은 은백색인 난류성 회유성 어종으로 전갱이, 정어리, 꽂치와 함께 4대 등푸른 생선으로 불린다(NFRDI, 2011). 고등어는 우리나라 연근해 어업의 주요 어종으로 특히, 남해안에 많이 분포하며 식탁에 흔히 먹을 수 있는 식품으로 가식부 중 단백질이 약 20.2%로 높고 지질 함량이 약 10.4%로 다른 어종에 비하여 월등히 높으며, 특히 EPA(eicosapentaenoic acid) 및 DHA(docosahexaenoic acid)와 같은 n-3 지방산인 다가불포화지방산(polyenes)의 비율이 약 36.1%로 풍부하여(NFRDI, 2009) 고혈압, 심장질환, 혈전증 등의 성인병 예방효과 및 뇌활동 촉진, 치매 예방 등의 효과가 있다(Wildman, 2001). 또한, 비타민 B₂, D 및 E가 풍부하여

피로회복 및 항산화 작용을 지니고 있으며, histidine, lysine, glutamic acid 등의 정미 아미노산이 많이 함유되어 기호적으로도 뛰어난 어종이다(NFRDI, 2009).

고등어의 생산량은 2001년 2,665,124 M/T에서 10년이 지난 2011년에 3,255,929 M/T으로 증가하였다. 이는 국내 어종에서 참치, 멸치에 이어 가장 많이 잡히는 어종으로(Fishery Production Survey, 2011), 이렇게 생산된 고등어는 선도저하가 매우 빨라 신선한 상태로 식탁에 오르기가 어렵고, 대부분 조림이나 구이로 이용되어 왔으며, 원형동결을 하는 냉동품과 통조림, 염장품 등과 같은 가공품의 형태로 많이 이용된다.

고등어는 훌륭한 단백질원 식품이지만, 근육 내에 비단백태 질소가 다량 함유 되어 있는데, 특히 free histidine 함량이 단백질 중 약 47%로 가장 많은 비율을 차지하고 있다(Park, 2009). 근육 내에 존재한 free histidine은 미생물이 분비하는 효소에 의해 탈탄산 작용을 일으켜 histamine으로 전환된다(Lehane and Olley, 2000). Histamine은 인체 내에서 mast cell, enterochromaffin-like cell 및 neuron에서 분비되어져 널리 분포되어 있으며, 생리작용 및 신경전달물질로서의 역할을 한다(Hungerford, 2010). 그러나 미생물에 의해 부패된 어류에서 생성된 histamine은 소비자가 섭취했을 때 scombroid poisoning을 일으키는 가장 직접적인 원인물질로 여겨지고 있다.

Scombroid poisoning 또는 histamine fish poisoning은 "Scombroid"라는 용어에서부터 유래되었으며, 이 생선들의 특징은 근육 내에 histidine 함량이 매우 높아 부적절한 생선의 취급에 의해 미

생물이 증식하여 histidine이 그 유래 효소의 기질로 작용해서 탈탄산 작용에 의해 histamine이 생성된다(Lehane and Olley, 2000). Food and Drug Administration(FDA)에서 scombroid poisoning과 관련된 어종으로 Table 1과 같이 지정하고 있다(FDA, 2011). 어류를 어획하고 난후, 부적절한 처리과정에 의해 미생물에 노출되어 오염이 되는데, 살아있는 어류 표면에 약 1%의 미생물이 존재할지라도 histamine을 생성하는 균은 매우 빠른 속도로 증식하게 된다. Taylor 등(1978)은 4℃보다 더 높은 온도에서 저장한 생선에서 장내 미생물 특히 *Morganella morganii*, *Klebsiell pneumoniae* 중, *Hafnia alvei* 중들이 가장 많은 histamine을 생성하는 균이라고 보고하였다. 또한 Niven 등(1981)은 histamine 생성 균으로 *Vibrio* spp.을 동정하였으며, Frank 등(1985)은 부패하는 가다랑어와 mahi-mahi에서 histamine 생성 균으로 *V. alginolyticus*를 분리해냈다. 그리고 따뜻한 온도에서 *V. harvei*, *V. fisheri* 및 *Photobacterium leiognathi*가 histamine을 생성하는 균으로 알려져 있으며(Ramesh and Venugopalan, 1986), 다른 *Photobacterium* spp. 과 *Vibrio* spp. 은 주로 저온에서 histamine 생성에 관여한다고 보고하였으며, 그 중 *Photobacterium phosphoreum*이 저온에서 histamine 생성에 관여하는 것으로 보고되었다(Kanki et al., 2004).

위와 같이 histamine이 생성되는 식품에는 생선이외에 와인, 치즈, 발효식품 등 다양하게 존재한다. 그러나 와인, 치즈, 발효식품 등은 lactic acid bacteria와 같이 gram-positive bacteria에 의해 histamine이 생성되지만, 생선제품은 gram-negative bacteria에 의한

Table 1. Market and scientific names of fish most commonly involved in scombroid fish poisoning

Market names	Scientific names
Alewife or River Herring	<i>Alosa pseudobarengus</i>
Amberjack or Yollowtall	<i>Seriola</i> spp.
Anchovy	<i>Ancboa</i> spp., <i>Ancboviella</i> spp., <i>Cetengraulis mysticetus</i> , <i>Engraulis</i> spp., <i>Stolepborus</i> spp.
Bluefish	<i>Pomatomus saltatrix</i>
Bonito	<i>Cybiosarda elegans</i> , <i>Gymnosarda unicolor</i> , <i>Sarda</i> spp.
Escolar or Oilfish	<i>Lepidocybium flavobrunneum</i> , <i>Ruvettus pretiosus</i>
Gemfish	<i>Lepidocybium flavobrunneum</i>
Herring	<i>Etrumeus teres</i> , <i>Harengula tbrissina</i> , <i>Ilisba</i> spp., <i>Opisthopterus tardoore</i> , <i>Pellona ditcbela</i> , <i>Alosa</i> spp.
Horse Mackerel or Scad	<i>Trachurus trachurus</i>
Jack	<i>Caranx</i> spp., <i>C. ignobilis</i> , <i>C. melampygu</i> , <i>C. latus</i> , <i>C. lugubris</i> , <i>C. ruber</i> , <i>Carangides bartbolomaei</i> , <i>Oligoplites saurus</i> , <i>Selene</i> spp., <i>Seriola rivoliana</i> , <i>Urapsis secunda</i>
Jack or Blue Runner	<i>Caranx crysos</i>
Jack or Crevalle	<i>Alectis indicus</i>
Jack or Rainbow Runner	<i>Elagatis bipinnulata</i>
Jack or Roosterfish	<i>Nematistius pectoralis</i>
Kahawai	<i>Arripis</i> spp.

	<i>Gasterocbisma melampus, Grammatorcynus</i>
Mackerel	spp. <i>Rastrelliger kanagurta, Scomber scombrus</i>
Mackerel, Chub	<i>Scomber</i> spp.
Mackerel, Jack	<i>Trachurus</i> spp.
Mackerel, Spanish	<i>Scomberomorus</i> spp.
Mackerel,	
Narrow-barred Spanish	<i>Scomberomorus commerson</i>
Mackerel, Spanish or	
King	<i>Scomberomorus cavalla</i>
Mahi-Mahi	<i>Coryphaena</i> spp.
Marun	<i>Makaira</i> spp., <i>Tetrapturus</i> spp.
Menhaden	<i>Brevoortia</i> spp., <i>Etmidium maculatum</i>
Pilchard or Sardine	<i>Sardina pilchardus, Sardinops</i> spp.
Sailfish	<i>Istiophorus platypterus</i>
Sardine	<i>Harengula</i> spp., <i>Sardinella</i> spp.
Saury	<i>Cololabis saira, Scomberesox saurus</i>
Scad	<i>Trachurus</i> spp.
Scad or Horse	
Mackerel	<i>Trachurus trachurus</i>
Shad	<i>Alosa</i> spp.
Shad, Gizzard	<i>Dorosoma</i> spp., <i>Nematalosa vlaminghi</i>
Shad, Hilsa	<i>Tenualosa ilisba</i>
Spearfish	<i>Terapturus</i> spp.
Sprat or Bristling	<i>Sprattus</i> spp.
Trevally	<i>Caranx</i> spp.
	<i>Allothunnus fallai, Auxis</i> spp., <i>Euthynnus</i>
	spp., <i>Katsuwonus pelamis, Thunnus</i>
Tuna	<i>tonggol, Thunnus alalunga, Thunnus</i>
	<i>albacares, Thunnus atlanticus, Thunnus</i>
	<i>maccoyii, Thunnus obesus, Thunnus</i>
	<i>thynnus</i>
Wahoo	<i>Acanthocybium solandri</i>
Yellow Tail or	
Amberjack	<i>Seriola lalandi</i>

* FDA. 2011. Fish and fishery products Hazards and controls guidance.

것으로 차이가 있다. Gram-positive 또는 gram-negative bacteria는 모두 HDC를 생성해 내지만, gram-positive bacteria 유래 HDC는 보결분자단으로 pyruvoyl group을 필요로 하고, gram-negative bacteria 유래 HDC는 cofactor로서 pyridoxal-5'-phosphate를 필요로 한다는 것이 가장 큰 차이점이다(Hungerford, 2010).

Pyridoxal-5'-phosphate(PLP)는 각종 효소, 특히 amino acid 또는 amine 반응에 cofactor로서 작용하며, pyridoxal이 pyridoxal 인산화 효소에 의해 인산화되어 활성형이 된 것으로, pyridoxal은 비타민 B₆의 작용을 갖는 천연물질인 pyridoxine을 산화하여 얻어지는 aldehyde이다. 이를 cofactor로 가지는 HDC의 작용기작은 기질인 histidine이 존재하지 않을 때, PLP가 lysine 잔기의 ϵ -amino group과 PLP의 aldehyde group을 형성하는 imine 결합에 의해 Schiff's base 형태로 존재한다(Internal aldimine). Histidine이 존재할 경우, histidine이 효소의 촉매부위에 결합하면 transaldimination이 일어나서 cofactor가 기질의 α -amino group에 결합되어진다(External aldimine). 그리고 나서 비가역적인 decarboxylation이 일어나게 되며 (PLP-product intermediate), 다른 PLP 중간체에 의해 새로운 transaldimination 반응이 일어나 다시 internal aldimine이 생성되어 histamine이 생성되어진다(Hayashi, 1995; Moya-Garcia et al., 2005). 또한 HDC에 의한 histamine의 생성은 bacteria의 생육이 저해되었을 때에도 증가한다는 연구결과가 보고되어 HDC가 scombroid poisoning에 독립적인 요인으로 작용이 될 수 있다(Kanki et al., 2007).

한편, 생선의 근육 내에 내재적인 HDC가 존재하지만, 이의 작용은 bacteria 유래 HDC와 비교했을 때 상당히 미비하여 scombroid poisoning을 일으키기에 역부족이다(Lehane and Olley, 2000). 또한 순수한 histamine을 섭취하였을 때 보다 bacteria 유래 HDC에 의해 부패된 생선에서 생성된 histamine을 섭취하였을 때 scombroid poisoning이 더욱 독성이 강하다고 보고되고 있으며(Taylor, 1986), 생선이 사후에 단백질이 분해되어 histidine이 추가적으로 생성되는 것 보다 histamine으로의 전환이 더욱 빨리 일어남으로서 관능적으로 부패된 형상이 없음에도 불구하고, histamine 농도가 높아져 scombroid poisoning을 발병시킨다. 이렇게 부패된 생선에서 생성된 histamine을 섭취하면 통상적으로 10분에서 1시간 내에 scombroid poisoning이 발병하게 되는데, 후추 맛이나 금속 맛이 나며, 공통적인 증상으로 입이 저리거나 침 넘기기가 어렵고, 갈증을 느끼게 된다. 또한 두통, 설사, 구토, 복통이 수반되며, 알러지 증상과 같은 홍조와 두드러기 등이 발생하게 된다(Hungerford, 2010). 이는 대개 24시간 내에 회복되지만 사람에 따라 며칠 동안 증상이 지속되는 경우가 있다. 대부분의 경우 질병을 유발하는 생선내의 histamine 수치가 200 ppm 또는 종종 500 ppm 이상일 때 발병하는 것으로 보고되고 있으며, FDA는 어육내의 histamine의 수치는 어종 및 수확시기 등에 따라 변동성이 크므로, histamine 허용수치를 생선의 가식부내에 50 ppm으로 기준을 정하고 있는데, 생선의 한 부분에 50 ppm이 발견된다면, 다른 부위에 500 ppm이 초과할 가능성이 있기 때문이다(FDA, 2011).

Histamine 생성에 관련된 어종을 섭취 시, histamine 생성을 억제하

기 위해 가열조리에 의해서 bacteria 및 효소를 불활성화 시키는 방법이 권고되고 있지만, 한번 생성된 histamine은 열에 안정하여 없어지지 않기 때문에 histamine 생성 억제에 의해 scombroid poisoning을 근본적으로 예방하는 기술이 필요하다. 따라서 histamine 생성을 근본적으로 억제하기 위한 방법으로 histamine을 생성하는 bacteria에 대한 항균작용 및 그 유래 HDC의 작용을 저해하는 연구가 절실한 실정이다. Histamine 및 biogenic amine 생성을 억제하는 최근 연구로는 histamine을 분해하는 미생물을 탐색(Mah and Hwang, 2009; Leuschner et al., 1998; Dapkevicius et al., 2000)과 histamine 생성 균에 대한 항신료의 항균작용(Mah et al., 2009; Wendakoon and Sakaguchi, 1993) 및 HDC 저해효과(Shakila et al., 1996; Wendakoon and Sakaguchi, 1994) 등의 연구가 보고되어있지만, 다양한 천연물 및 물리적인 공정에 의한 histamine 생성 억제 연구는 미비한 실정이다.

오늘날 연구동향은 소비자들의 인식에 의해 합성물질보다 안전하게 바로 섭취할 수 있는 천연물의 생리활성물질을 탐색하는 연구가 많이 이루어지고 있는데, 한약재는 예로부터 많이 이용되고 있어 안정성이 검증되어있으며 그 중, 상백피(Park et al., 1995) 및 오미자(Lee et al., 2003)에서 항균물질을 분리한 연구가 보고되어져 있다. 또한 해조류는 독특한 환경조건인 해양에서 서식하여 독특한 대사계 및 생체 방어계를 가지기 때문에 다양한 생리활성에 관한 연구가 진행되고 있으며 그 중, 항균(Lee et al. 2009; Yoon et al., 2010) 및 효소저해제(Kim et al., 2011; Lee et al., 2010) 등의 연구가 보고되었다.

식품을 소비자가 안전하게 섭취하기 위해 살균공정을 거치는데, 종래에는 미생물의 생육을 억제하기 위해 가열처리를 많이 이용하였지만, 이는 식품 자체의 품질에 영향을 미칠 수 있어, 최근에는 품질에 영향을 미치지 않으면서 살균, 가공 및 조리가 가능한 비가열 처리 기술이 주목 받고 있다. 초정수압 기술은 미생물 생육억제 및 효소의 불활성화를 초래하여 품질이 뛰어난 제품생산이 가능하기 때문에 식품산업에서 중요성이 부각되고 있다(Han and Jeong, 2005).

따라서 본 연구에서는 어육 내 histamine 생성에 근본적 원인인 histamine-producing bacteria의 생육을 억제하고, 그 유래 효소인 HDC의 작용을 저해하기 위한 천연물을 탐색하고, 식품의 한 공정으로서 초정수압 처리에 의한 HDC의 저해효과를 검토하여 이를 실제 식품에 적용하기 위해 고등어에 처리하여 histamine 생성 억제 효과를 알아보았다.



재료 및 방법

1. 실험재료

1-1. 시료

본 연구에 사용된 한약재로 상백피(*Morus alba*)와 오미자(*Schizandra chinensis*)는 경남 양산의 한의원에서 건조된 국내산을 구입하였으며, 건조된 시료를 분쇄한 후 -20°C 에서 보관하여 실험에 사용하였다. 또한 해조류 중 감태(*Ecklonia cava*)와 대황(*Eisenia bicyclis*)은 경북 동해안에서 채취하였으며, 비틀대 모자반(*Sargassum sagamianum*), 지충이(*Sargassum thunbergii*), 외톨개 모자반(*Myagropsis myagroides*) 및 팽생이 모자반(*Sargassum horneri*)은 부산 인근 앞바다에서 채취하여 담수로 깨끗이 수세하고 자연건조 후 동결 건조하여 분쇄기(Deasung atron, Seoul, Korea)로 분쇄한 후, -20°C 에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

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

1-3. 배지 및 시약

실험에 사용한 배지로 NB(Nutrient Broth)는 Accumedia사의 제품을 사용하였고, TSB(Trypticase Soy Broth), Marine Agar(MB), MHB(Muller Hinton Broth), PCA(Plate Count Agar)는 Difco사의 제품을

사용하였다. 실험에 사용한 시약으로 L-histidine monohydrochloride monohydrate, pyridoxal-5'-phosphate, polyethylene glycol no. 300, potassium phosphate monobasic는 Sigma사에서 구입하였다. 그리고 potassium phosphate dibasic, Ethlenediaminetetraacetic acid (EDTA)는 Yakuri사에서 구입하였다. 또한 1,4-dithiothreitol (DTT)는 Boehringer Mannheim사에서 구입하였다.

1-4. 시험균주

실험에 사용된 균주는 가장 대표적인 histamine-producing bacteria로 *Morganella morganii* IFO 3848, ATCC 25830와 대표적인 저온성 histamine-producing bacteria인 *Photobacterium phosphoreum* IFO 13896을 한국미생물보존센터(KCCM)와 미생물자원센터(KCTC)에서 각각 분양 받아 실험에 사용하였다(Hungerford, 2010).

2. 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. 감태 및 대황 유래 Phlorotannin인 Dieckol 분리 및 정제

2-1-1. 액액 분배법에 의한 감태 및 대황 추출물의 분획

감태 및 대황 에탄올 추출물을 용매별로 극성을 높여가며 분획물을 얻었다. 즉, 감태 및 대황 에탄올 추출물에 10배량의 증류수를 현탁한 후, 동량의 n-hexane을 가하여 180 rpm, 1시간 동안 shaker (Dongwon Science Co., Busan, Korea)에서 교반하였다. 이를 정치시켜 상층액을 취하고, 여과, 감압 농축 (RE200, Yamato Co., Tokyo, Japan)하여 n-hexane층을 얻었다. 계속해서 같은 방법으로 수층을 chloroform 및 ethyl acetate로 용매분획 한 다음 여과, 농축하여 각각 분획물을 얻었다.

2-1-2. Silica gel column chromatography에 의한 감태 및 대황 ethyl acetate 추출물의 분획

에탄올 추출물의 ethyl acetate 분획물을 chloroform에서 methanol로 용매계를 단계적으로 극성을 높여가며, 활성화된 silica gel(230-400 mesh, Merck Co., Germany)에 chloroform을 가하여 slurry로 만들고 glass column(50×65 mm, 120 mL)에 충전한 후, 감태 ethyl acetate 분획물을 ethyl acetate로 농도가 400 mg/mL이 되도록 녹였으며, 대황 ethyl acetate 분획물은 methanol로 400

mg/mL 녹인 후, 3000 rpm, 4℃, 10분간 원심 분리하여 상층액을 취해 column에 loading하였다. 감태 ethyl acetate 분획물은 chloroform과 methanol을 용매계로 하여 (10:0→9:1→8:2→7:3→6:4→5:5→4:6→3:7→2:8→1:9→0:10) 순차적으로 100 mL씩 분획하여 22개의 분획물을 얻었으며, 대황 ethyl acetate 분획물은 ethyl acetate와 methanol을 용매계로 하여 (10:0→9:1→8:2→7:3→6:4→5:5→4:6→3:7→2:8→1:9→0:10) 순차적으로 100 mL씩 분획하여 22개의 분획물을 얻었으며, 분리된 분획물은 감압 농축하여 -20℃에 보관하여 실험에 사용하였다.

2-1-3. HPLC에 의한 분리 · 정제

Silica gel column chromatography를 이용하여 분리된 감태 EA6 및 대황 EA2 분획물을 희석하고, 0.45 μ m membrane filter (Advantec, Yoyo Roshi Kaisha Ltd., Tokyo, Japan)로 여과한 후, 20 μ L를 취하여 Table 2와 같은 조건으로 HPLC를 실시하였다.

2-1-4. NMR에 의한 구조 분석

감태 및 대황 에탄올 추출물을 HPLC로 분리한 6번 및 5번 분획을 분자량 측정을 위해 LC/ESI-MS(Nanospace SI-2, Shiseido, Tokyo, Japan)에서 C18 column(LUNA 5 micron-C18, 150×1 mm, Phenomenex, Torrance, Canada)을 이용하였으며, 결과는 LCQ Deca XP mass spectrometer(Thermo finnigan San Jose, CA, USA)로부터 얻었다. NMR 측정은 ^1H 와 ^{13}C spectra는 JNM-ECP

400(500 MHz, JEOL Co., Tokyo, Japan)과 Avance II 900(900 MHz, Bruker, Karlsruhe, Germany) spectrometer를 각각 이용하여 측정하였다.

3. Histamine-Producing Bacteria 생육 저해활성

3-1. Disk Diffusion Method

높이가 4-5 mm인 MHA배지에 균 액의 농도가 약 10^5 - 10^6 CFU 가량 되도록 분주한 후 도말 삽으로 도말하였다. 여기에 지름이 6 mm인 disk를 고정시켜서 일정한 농도로 희석한 한약재 및 해조류 추출물을 20 μ L 흡수시켰다. 이를 실온에서 약 1 시간가량 확산시킨 후, 37°C incubator(DW-M I-250, Dongwon Co, Busan, Korea)에서 24시간 배양하였다. 항균력 측정은 형성된 clear zone의 크기로 판단하였다.

3-2. Minimum Inhibitory Concentration(MIC)

멸균 후 완전히 굳지 않은 MHA배지에 한약재 및 해조류 추출물을 농도별로 첨가하고 시험 균주의 농도가 약 10^5 - 10^6 CFU/mL 되도록 접종한 후 혼합하였다. 이를 평판에 분주하여 실온에서 굳히고, 37°C incubator(DW-M I-250, Dongwon Co, Busan, Korea)에서 24시간 배양하였다. 배양 후 실체 현미경 상에서 균의 성장이 관찰되지 않은 평판의 농도를 최소저해농도(MIC)로 하였다.

4. Histidine Decarboxylase 저해활성

4-1. Histamin-Producing Bacteria의 최적 배양 시간 조건

Histamine-producing bacteria에서 조효소를 최대한 많이 추출하기 위해 균주를 10^5 - 10^6 CFU/mL 되도록 하여 *M. morganii*는 TSB 배지에 접종하여 35℃에 배양하였으며(Tanase et al., 1984), *P. phosphoreum*는 MB 배지에 접종하여(Morii and Kasama, 2004) 25℃에서 배양하였다. 이를 3시간 간격으로 UV/visible spectrophotometer(Optizen 2120 UV, Mecasys, Daejeon, Korea)로 600 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4-2. 조효소액 제조

Histamine-producing bacteria로부터 crude histidine decarboxylase를 추출하기 위해 Tanase 등(1984)의 방법을 참고하였다. *M. morganii* 및 *P. phosphoreum*의 최적 생육 시간을 확인한 결과를 바탕으로 균주를 10^5 - 10^6 CFU/mL 되도록 하여 각각 1% L-histidine monohydrochloride monohydrate를 첨가한 TSB 및 MB에 접종하여 35℃에서 12시간 및 25℃에서 42시간 배양하였다. 균 배양액을 수집하여 원심분리기에서 12,000 × g로 30분간 원심분리한 후 상층액만 취하였다. 수집된 균체에 buffer(0.1 M potassium phosphate buffer(pH 6.5), 0.1 mM sodium EDTA, 0.01 mM pyridoxal phosphate, 0.02 mM dithiothreitol, 1%(v/v) polyethylene glycol no. 300)로 2회 washing 한 후, -20℃에 보관하며 실험에 사용하였

다. Washing한 wet cell을 1:4 비율의 buffer로 현탁시킨 후, 초음파 처리(VCX 130, Sonics & Materials, USA)하여 cell를 붕괴시킨 후, $12,000 \times g$ 에서 20분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 원심분리한 침전물을 다시 1:3 비율로 buffer를 가하여 현탁시킨 후, 한번 더 초음파 처리하고 원심분리한 상층액을 앞의 상층액과 혼합하여 조효소로 실험에 사용하였다.



Table 2. Operating conditions of HPLC

Instrument	Gilson 321 pump	
Column	μ Bondapak C18(3.9 X 300 mm), 125 Å, 10 μ m	
Mobile phase	36% ACN	Gradient for 10 min 28% $\rightarrow$ 50% ACN
Flow rate	1.3 mL/min	1.3 mL/min
Detector	Gilson UV/VIS 151	

Table 3. 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%

4-3. Histidine Decarboxylase 저해활성 측정

4-3-1. 천연물에 의한 Histidine Decarboxylase 저해활성 측정

Histidine decarboxylase 저해활성 실험은 Kanki 등(2007)과 Nitta 등(2009)의 연구를 참고하였다. *M. morganii* 및 *P. phosphoreum* 유래 조효소를 측정하기 위해 buffer(0.1 M potassium phosphate buffer(pH 6.5), 0.1 mM sodium EDTA, 0.01 mM pyridoxal phosphate, 0.02 mM dithiothreitol, 1%(v/v) polyethylene glycol no. 300) 1 mL과 일정 농도로 희석한 한약재 및 해조류 추출물 0.1 mL을 각각 37℃ 및 30℃, 5분 동안 예비배양한 후, 조효소액 0.1 mL를 첨가하여 다시 5분간 각각 37℃ 및 30℃에서 배양하였다. 배양 후, 200 mM L- histidine monohydrochloride monohydrate를 0.2 mL 첨가하여 각각 37℃ 및 30℃에서 15분간 반응시켰다. 반응을 중지시키기 위해 94-96℃에서 5분간 정치시켰다. 이 시료를 histamine 정량을 위하여 Histamine assay kit (Kikkoman Co., Tokyo, Japan)를 사용하여 UV/visible spectrophotometer로 470 nm에서 흡광도를 측정하였다(Sato et al., 2005).

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

A : 시료를 첨가하지 않은 흡광도

B : 시료를 첨가한 흡광도

C : 효소를 첨가하지 않은 흡광도

4-3-2. 천연물에 의한 Histidine Decarboxylase 저해 양식

Histidine decarboxylase에 대한 저해 양식을 알아보기 위해 기질인 L-histidine monohydrochloride의 농도를 5, 8 및 10 mM로 달리 하였으며, 저해제인 dieckol의 농도를 0, 0.1 및 0.2 mM로 위의 histidine decarboxylase 저해 실험방법으로 실험하였다. 이렇게 측정한 결과를 Lineweaver-Burk plot을 이용하여 분석하였다.

4-3-3. 초정수압(High Hydrostatic Pressure, HHP) 처리

M. morganii 및 *P. phosphoreum*에서 추출한 조효소를 다음 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 bar로 정수압으로 각각 3분간 초정수압 처리하여 histidine decarboxylase 저해활성 측정을 하였다.

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

a : 초정수압 처리하지 않은 흡광도

b : 초정수압 처리한 흡광도

5. 고등어육에서의 효과

5-1. 전처리

활어 상태의 고등어를 아이스박스에 해수를 담아 실험실로 운반 후, 30분 이상 안정시켰다. 고등어의 머리와 내장을 제거한 후, clean

bench (DW-CB-511, Dongwon Science Co., Busan, Korea) 내에서 화염 멸균시킨 칼을 이용하여 육만을 채취하였다.

Histamine-producing bacteria에 대한 항균효과를 지닌 천연물을 이용한 고등어육 내에서의 histamine 생성 억제 실험을 위해 *M. morganii* 실험구는 육 42.5 g을 채취하였으며, *P. phosphoreum* 실험구는 NaCl을 육 내에 최종농도가 2%되게 첨가하고 homognizer로 1,000 rpm에서 30초간 균질화 한 후, 천연물을 다양한 최종농도를 정하여 첨가하고, *M. morganii* 및 *P. phosphoreum*을 10^5 CFU/mL를 1/10 희석하여 각각 100 μ L 첨가 후, 다시 1,000 rpm으로 20초간 균질화를 실시하였다. 처리한 육을 멸균된 petri-dish에 옮겨 담고, *M. morganii*를 접종한 육은 $12\pm 1^\circ\text{C}$ 에서 3, 24, 72 및 120시간 저장 실험을 진행하였으며, *P. phosphoreum*를 접종한 육은 $5\pm 1^\circ\text{C}$ 에서 3, 120 및 240시간 저장실험을 진행하였다.

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

초정수압 처리에 의한 고등어육 내에서의 histamine 생성 억제 실험을 위해 *M. morganii* 실험구는 육 165 g을 채취하였으며, *P. phosphoreum* 실험구는 NaCl을 육 내에 최종농도가 2%되게 첨가하고, homogenizer로 1,000 rpm에서 30초간 균질화를 시킨 후, *M. morganella* 및 *P. phosphoreum*을 10^5 CFU/mL를 1/10 희석하여 각각 200 μ L 첨가 후 다시 1,000 rpm으로 20초간 균질화를 5회 반복

한 후, 총 1 mL를 첨가하였다. 이를 40 g씩 나눠 진공포장 후, *M. morganii* 실험구는 무처리, 1,000, 2,000 및 3,000 bar로 초정수압 처리하였으며, *P. phosphoreum* 실험구는 무처리, 1000, 2000, 3000 및 4000 bar로 초정수압 처리를 하였다. 초정수압 처리 후, 멸균된 petri-dish에 육을 옮겨 담고, *M. morganii*를 접종한 육은 $12\pm1^{\circ}\text{C}$ 에서 3, 24, 72, 120 및 168시간 저장실험을 진행하였으며, *P. phosphoreum*을 접종한 육은 $5\pm1^{\circ}\text{C}$ 에서 3, 120 및 240시간 저장실험을 진행하였다.

5-2. 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°C 에서 24-48시간 배양한 후, 생성된 집락을 계수하여 측정하였다.

5-3. 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°C 의 물에 20분간 정치시킨 후, 얼음물에 10분간 냉각시켰다. 냉각된 시료를 여과지로 여과한 다음, 여과액을 Histamine assay kit를 사용하여 UV/visible spectrophotometer로 470 nm에서 흡광도를 측정하여 histamine 함량을 정량하였다.

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.



결과 및 고찰

1. Histamine-Producing Bacteria 생육 저해활성

1-1. Disk Diffusion Method에 의한 항균활성

고등어를 비롯한 histamine 생성에 의해 알러지 증상 식중독이 유발되는 대표적인 어종은 free histidine 함량이 다른 어종보다 매우 높다 (Park, 2009). 어육 내에 있는 free histidine이 사후 부적절한 처리 및 관리 등으로 인해 histidine decarboxylase를 생성하는 미생물에 오염되어 histamine으로 전환된다(Lehane and Olley, 2000). 따라서 histamine-producing bacteria의 생육을 억제하는 것이 어육내 histamine을 생성하는 가장 근본적인 대책이다. *M. morgani*는 배양 배지에서 1,000 ppm이상 histamine을 생성하는 능력을 가진 가장 뛰어난 중온성의 histamine 생성 균으로 알려져 있으며(Kim et al., 2001), *P. phosphoreum*은 저온성, 호염성의 histamine 생성 균으로서 저온에서 histamine을 생성하는 능력은 식품위생에서 중요하다 (Morii and Kasama, 2004).

따라서 *M. morgani* 및 *P. phosphoreum*의 생육에 대한 오미자 열수 추출물 및 물 추출물, 비틀대 모자반, 감태 및 지충이 에탄올 추출물의 항균력을 측정한 결과(Table 4), *M. morgani*에 대해 오미자 열수 및 물 추출물과 감태 에탄올 추출물이 10%에서 항균 효과를 보였으나, 5%에서는 오미자 열수 추출물만이 항균 효과를 나타냈다. *P.*

*phosphoreum*에 대해서는 오미자 열수 추출물 및 물 추출물, 비틀대 모자반과 감태 에탄올 추출물이 10% 및 5%에서 항균 효과를 나타내었다. 미생물로부터 자신을 보호하기 위해 생물들은 자신만의 항균성분을 지니고 있는데, 그 중 유기산류는 pH 영역을 낮게 하여 미생물이 자랄 수 있는 환경에 영향을 주어 항균 효과를 나타낸다. 오미자 추출물에는 fumaric acid, citric acid, malic acid 및 itaconic acid의 유기산이 함유되어 있어 이들이 항균 효과를 나타낸다고 보고되어져 있으며, 또한 오미자의 정유 성분으로서 terpineol과 citronellol이 항균력을 나타낸다고 보고되고 있다(Chung et al., 2001; Lee et al., 2003). 또한 해조류는 독특한 환경으로부터 생성된 이차대사물질은 뛰어난 생리활성을 지닌다고 보고되어져 있으며, 특히 갈조류에서 eckol과 같은 phlorotannin이 강한 항균 효과를 지닌다고 보고하였다(Nagayama et al., 2002). 감태와 비틀대 모자반은 갈조류로서, 특히 감태는 fucodiphloroethol G, dieckol, 6,6'-bieckol, 7-phloroeckol 및 phlorofucocuroeckol 등의 다양한 phlorotannin이 함유되어 있다고 보고되어져 있으며(Lee et al., 2009), 감태에서 분리한 eckol이 methicillin에 저항성을 가지는 *Staphylococcus aureus*와 *Salmonella* spp. 에 대하여 항균력을 가지는 것으로 보고되었다.(Choi et al., 2010). 또한 Horie 등(2008)은 비틀대 모자반에서 항균 효과를 지니는 quinone 대사 물질인 sargaquinoic acid 유도체를 분리해내었다. 또한 에탄올과 같은 유기용매로 해조류를 추출 시 해조류 유래 항균물질인 bromophenol계 화합물, terpene류, 지방족화합물 등이 더욱 잘 추출되어 항균효과를 나타내는 것으로 사료된다(Yoon et al., 2010).

Table 4. Antimicrobial activity of various natural materials extracts against *Morganella morganii* and *Photobacterium phosphoreum*

Samples	<i>M. mogarnii</i>		<i>P. phosphoreum</i>	
	10%	5%	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	-	-	-	-

* 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.

1-2. 천연물 에탄올 추출물의 최소생육억제(MIC)

Disk diffusion method 실험결과, *M. morganii*에 높은 감수성을 보였던 감태 에탄올 추출물과 오미자 열수 추출물 및 *P. phosphoreum*에 높은 감수성을 보였던 비틀대 모자반 및 감태 에탄올 추출물과 오미자 열수 추출물을 대상으로 미생물의 생육을 억제하는데 필요한 최소저해농도를 측정하였다(Table 5). *M. morganii*에 대해서 감태 에탄올 추출물 및 오미자 열수 추출물 모두 2 mg/mL의 농도에서 균의 생육을 억제하였다. *P. phosphoreum*에 대한 천연물의 최소저해농도는 비틀대 모자반 에탄올 추출물이 0.015625 mg/mL로 매우 낮은 농도에서 생육을 억제하였으며, 감태 에탄올 추출물 역시 *M. morganii*와는 달리 0.125 mg/mL의 낮은 농도에서 생육을 억제하였다. 오미자 열수 추출물은 1 mg/mL의 비교적 높은 농도로 *P. phosphoreum*의 생육을 억제하였다. Histamine-producing bacteria의 생육을 억제하기 위한 선행연구로서 Shakila 등(1996)은 clove와 cinnamon 에탄올 추출물이 *M. morganii*에 의한 histamine 생성을 95% 억제한다고 보고하였으며, 이는 에탄올 추출물에 의한 spice의 essential oil들에 의한 항균 효과라고 보고하였다. Wendakoon과 Sakaguchi (1993)은 또 다른 강력한 histamine 생성 균인 *Enterobacter aerogenes*에 대하여 clove가 histamine 생성을 억제하는 것을 확인하였으며, 이 역시 clove의 essential oil에 의한 것으로, essential oil의 phenolic 화합물이 미생물의 세포막에 영향을 주는 것으로 보고하였다. 에탄올과 같은 유기용매 추출법은 소수성 물질이 주로 추출되므로, 비틀대 모자반 및 감태 에탄올 추출물에 함유되어진 소수성 물질인 phenolic 화합물

등에 의한 항균 효과로 사료되어지며(Kim et al., 2008; Horie et al., 2008; Choi et al., 2010). 각각의 균주에 대한 생육 억제 효과가 다른 것은 균주의 생화학 특징 및 대사과정과 천연물의 구조에 의한 항균 기작의 차이에 의한 것으로 사료되어진다.



Table 5. Minimum inhibitory concentration of extracts against *Morganella morganii* and *Photobacterium phosphoreum*

	MIC (mg/mL)	
	<i>M. morganii</i>	<i>P. phosphoreum</i>
<i>S. sagamianum</i> EE	N.D	0.015625
<i>E. cava</i> EE	2	0.125
<i>S. chinensis</i> HWE	2	1

* N. D : not done.

* EE, ethanol extract ; HWE, hot water extract.

2. Histidine Decarboxylase 저해활성

2-1. Histamin-producing bacteria의 최적 배양 시간 조건

*M. morganii*를 10^5 - 10^6 CFU/mL이 되도록 TSB 배지에 접종한 후, 35℃에서 36시간 동안 3시간 간격으로 600 nm에서 흡광도를 이용하여 생육 변화를 측정한 결과(Fig. 1), 12시간 동안 급격하게 군수가 증가하다가 완만해지는 것을 알 수 있었다. 따라서 12시간을 최적 배양 시간으로 정하였다.

*P. phosphoreum*를 10^5 - 10^6 CFU/mL이 되도록 MB 배지에 접종한 후, 25℃에서 60시간 동안 3시간 간격으로 600 nm에서 흡광도를 이용하여 생육 변화를 측정한 결과(Fig. 2), 42시간 동안 급격하게 군수가 증가하다가 완만해지는 것을 알 수 있었다. 따라서 42시간을 최적 배양 시간으로 정하였다.



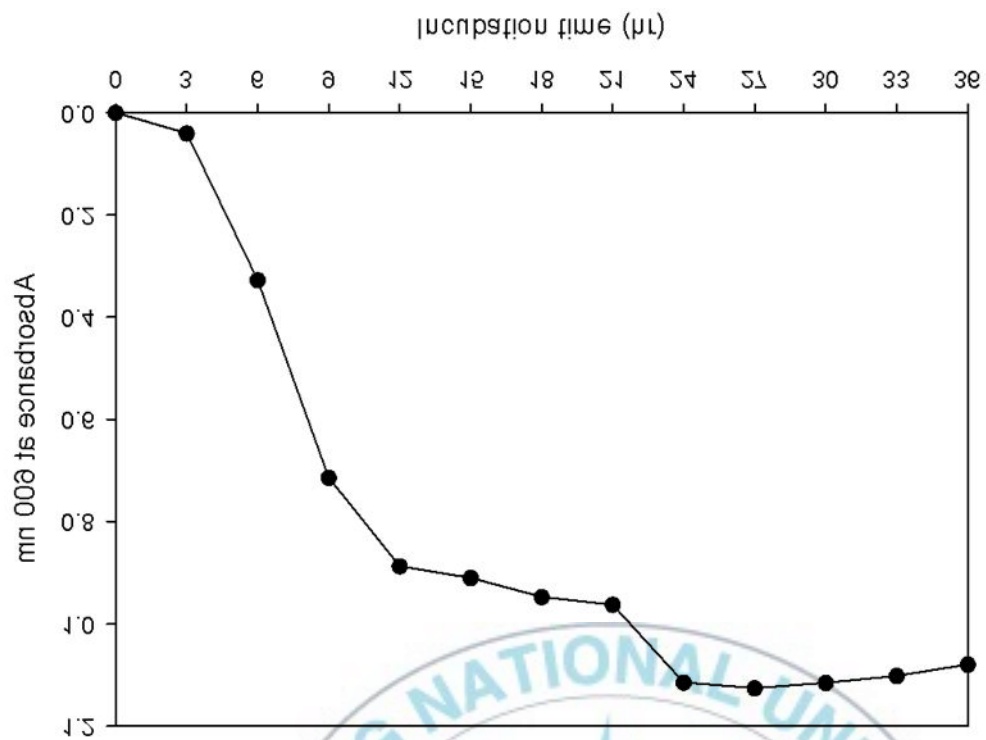


Fig. 1. Effect of incubation time on growth of *Morganella morganii* at 35°C storage.

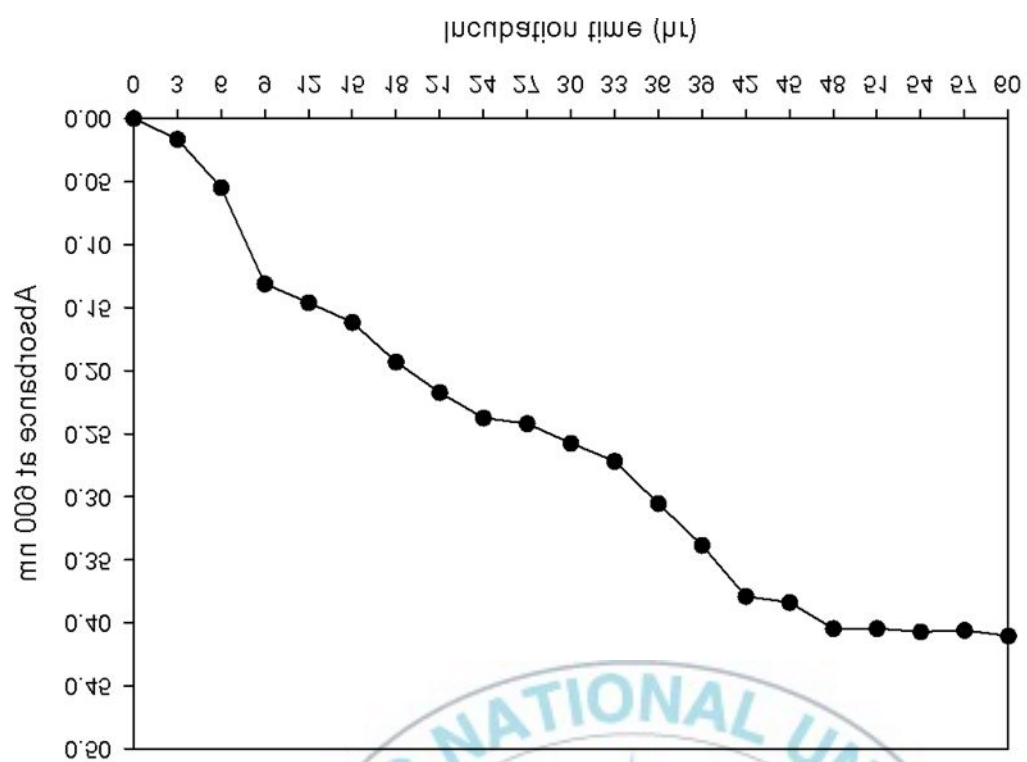


Fig. 2. Effect of incubation time on growth of *Photobacterium phosphoreum* at 25°C storage.

2-2. 천연물에 의한 Histidine decarboxylase 저해활성 측정

어육 내에 존재하는 free histidine은 'histidine decarboxylase (HDC)'라는 효소에 의해서 탈탄산 작용에 의해 histamine으로 전환된다. HDC에 의한 histamine의 생성은 주로 미생물 유래의 HDC에 의한 것으로 어육 내에 존재하는 HDC 극히 미량이어서 영향이 적다 (Lehane and Olley, 2000). 따라서 histamine-producing bacteria 유래 HDC 저해를 통해 histamine 생성을 억제하기 위해 천연물 추출물로부터 *M. morganii* 및 *P. phosphoreum* 유래 crude HDC의 저해활성을 측정하였다(Table 6,7). 해조류인 감태, 대황, 비틀대 모자반, 지충이, 팽생이 모자반, 외톨개 모자반 에탄올 및 물 추출물에 대한 *M. morganii* 및 *P. phosphoreum* 유래 crude histidine decarboxylase 저해활성을 측정한 결과(Table 6), 전반적으로 해조류 에탄올 추출물이 *M. morganii* 유래 HDC에 더 높은 저해 효과를 보였으며, 그 중 비틀대 모자반 에탄올 추출물이 *M. morganii* 유래 HDC에 대해 1 mg/mL 농도에서 81.10% 저해하여 가장 높은 저해 효과를 나타냈으며, 그에 이어 감태 및 대황 에탄올 추출물이 각각 33.79 및 19.82% 저해하는 것을 확인하였다. 해조류 추출물에 대한 *P. phosphoreum* 유래 HDC 저해 효과는 감태 및 대황 에탄올 추출물이 각각 31.75 및 25.08%로 가장 높았다. 한약재 추출물에 대한 *M. morganii* 및 *P. phosphoreum* 유래 HDC 저해 효과를 측정한 결과 (Table 7), 오미자 에탄올 추출물이 1 mg/mL농도에서 15.40%으로 가장 높았으며, 그에 이어 오미자 열수 추출물이 14.71%, 상백피 에탄올 추출물이 8.22%의 저해 효과를 나타내었다. 또한 *P.*

phosphoreum 유래 HDC에 대한 한약재 추출물의 저해 효과는 오미자 에탄올 추출물이 13.37%로 가장 높은 저해 효과를 나타내었다고, 오미자 열수 추출물이 8.47%로 그 다음 높은 저해 효과를 나타내었다. Ryu 등(2003)은 비틀대 모자반 메탄올 추출물에서 분리한 farnesylacetone derivative들이 cholinesterase에 대한 저해 효과가 있다고 보고 하였으며, Choi 등(2007)은 비틀대 모자반에서 분리한 plastoquinone류가 cholinesterase를 저해한다고 보고하였다. 또한 오미자는 유기산 및 정유 성분이 함유되어 있어 유기산에 의해 pH가 변화하여 효소가 작용하는 환경을 변화시키거나 정유 성분에 포함된 phenolic 화합물에 의한 효소 저해에 의한 것으로 사료되어진다 (Chung et al., 2001; Lee et al., 2003). Polyphenol 화합물은 소수성 및 수소 결합을 통해 단백질과 친화력이 뛰어나서 효소와 강한 복합체를 형성하여 효소작용을 저해한다고 보고되고 있으며(Ahn et al., 2007), 여러 효소 억제와 관련된 선행 논문에서 감태 함유되어 있는 phlorotannin들이 α -glucosidase와 amylase(Lee et al., 2009), tyrosinase(Kang et al., 2012) 및 metalloproteinase(Kim et al., 2006) 등의 효소를 억제한다는 보고에 의해 감태 에탄올 추출물을 더욱 분리하며 *M. morganii* 유래 HDC의 저해 효과를 측정하였다 (Table 8). 액액 분배하여 얻은 ethyl acetate 분획에서 1 mg/mL농도에서 45.29% 저해활성을 나타냈으며, 이를 silica gel chromatography를 통한 분획물에서 52.58% 저해활성을 보였다. 최종적으로 HPLC를 이용하여 감태에서 분리한 dieckol은 1 mg/mL에서 60.87%의 높은 저해활성을 보였다. 이와 같은 결과는 해조류를 액액

분배 실시 하였을 때, ethyl acetate 분획에서 여러 종류 phlorotannin들이 함유되어 있다는 보고와 유사한 결과이며(Lee et al., 2009; Barwell et al., 1989; Lee et al., 2010; Heo et al., 2009), 분리가 진행될 수록 *M. morganii* 유래 HDC의 저해 효과가 증진됨을 확인할 수 있었다. 또한 Shibata 등(2002)은 대황에서 phloroglucinol, eckol, phlorofucofuroeckol A, dieckol 및 8,8'-bieckol의 여러 종류의 phlorotannin이 함유되어 있다는 보고에 의해 대황 에탄올 추출물을 추후 분리를 진행하며 *M. morganii* 유래 HDC의 저해 효과를 측정하였다(Table 9). 대황 에탄올 추출물을 액액 분배하여 얻은 ethyl acetate 분획물 1 mg/mL농도에서 39.84% 저해 효과를 나타냈으며, 이를 silica gel chromatography를 실시한 분획물에서 42.44%로 분리를 진행할수록 *M. morganii* 유래 HDC에 대한 저해 효과가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 대황에서도 HPLC에 의해 분리된 fraction 5가 1 mg/mL농도에서 68.24%으로 HDC 저해 활성이 높았으며, IC₅₀ 값이 0.61 mg/mL으로 나타났다(Table 10). 이를 분자량 및 H, C-NMR을 통해 dieckol임을 확인하였다. 따라서 감태 및 대황 에탄올 추출물에 대한 *M. morganii* 유래 HDC의 저해 효과는 해조류 유래 phlorotannin인 dieckol이 지니고 있는 hydroxyl group이 단백질과 결합하여 복합체를 형성함으로써 HDC의 효소 활성 및 결합 부위에 결합하여 활성을 저해할 것으로 사료된다(Birari and Bhutani, 2007; Lee et al., 2010).

Table 6. Inhibition activity of various seaweeds extracts against crude histidine decarboxylase from *Morganella morganii* and *Photobacterium phosphoreum*

(Unit : %)

	<i>M. morganii</i>		<i>P. phosphoreum</i>	
	Ethanol	Water	Ethanol	Water
<i>E. cava</i>	33.79 ±1.72 ^{Ab1)}	13.93 ±0.19 ^{Ba}	31.75 ±2.39 ^a	N.D
<i>E. bicyclis</i>	19.82 ±2.56 ^{Ac}	5.96 ±0.95 ^{Bc}	25.08 ±1.79 ^b	N.D
<i>S. sagamianum</i>	81.10 ±2.31 ^{Aa}	7.68 ±1.35 ^{Bb}	4.91 ±2.82 ^c	N.D
<i>S. thunbergii</i>	12.91 ±3.50 ^{Ac}	8.22 ±2.73 ^{Ab}	8.11 ±0.72 ^c	N.D
<i>S. horneri</i>	0.56 ±0.79 ^{Bd}	5.77 ±2.50 ^{Abc}	N.D	N.D
<i>M. myagroides</i>	0.20 ±0.17 ^{Ad}	1.93 ±1.78 ^{Ac}	N.D	N.D

* Concentration : 1 mg/mL.

* N.D : not done.

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

Table 7. Inhibition activity of various medicinal herbs extracts against crude histidine decarboxylase from *Morganella morganii* and *Photobacterium phosphoreum*

(Unit : %)

Samples	<i>M. morganii</i>	<i>P. phosphoreum</i>
<i>M. alba</i> EE	8.22±0.68 ^b	5.80±1.88 ^b
<i>S. chinensis</i> EE	15.40±1.78 ^a	13.37±1.02 ^a
<i>S. chinensis</i> HWE	14.71±0.80 ^a	8.47±1.77 ^{ab}

* Concentration : 1 mg/mL.

* N.D : not done.

^{a-b} Means in the same column bearing different superscript in samples are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

* EE, ethanol extract ; HWE, hot water extract.

Table 8. Inhibitory activities of *Ecklonia cava* extracts against histidine decarboxylase from *Morganella morganii*

Sample	Inhibiton activity (%)
EtOH extract	33.79±1.72 ^d
Ethyl acetate fraction	45.29±1.22 ^c
EA 6 ¹⁾	52.58±0.46 ^b
Fraction 6 ²⁾	60.87±1.89 ^a

* Concentration : 1 mg/mL.

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

²⁾ Dieckol

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

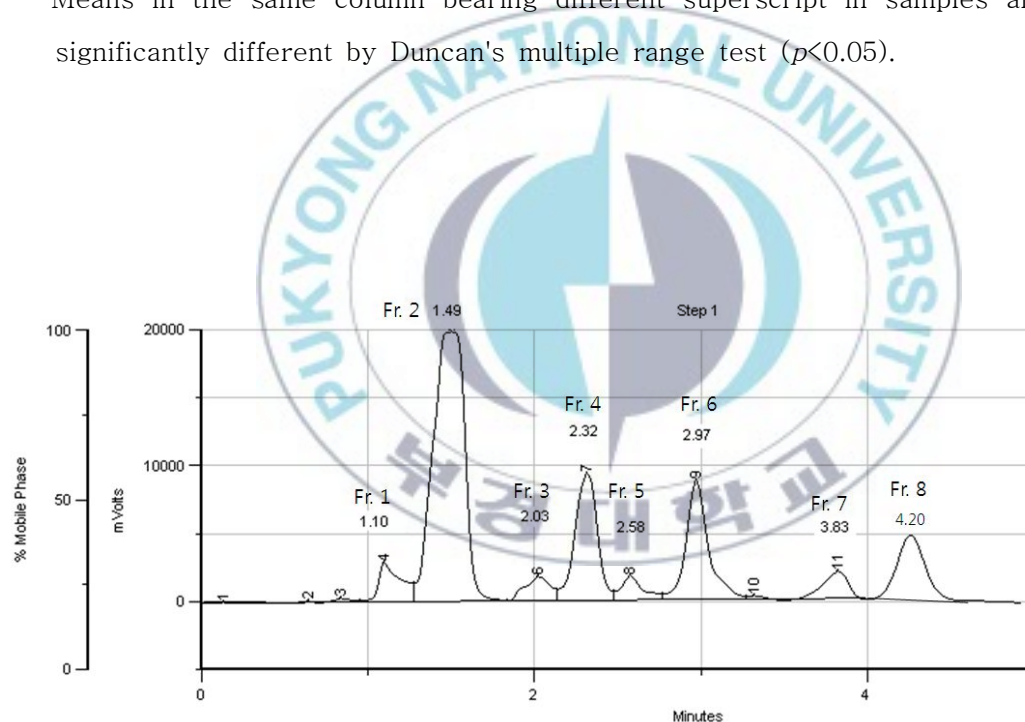


Fig. 3. HPLC chromatogram of EA6 isolated from ethyl acetate fraction of *Ecklonia cava* ethanol extract.

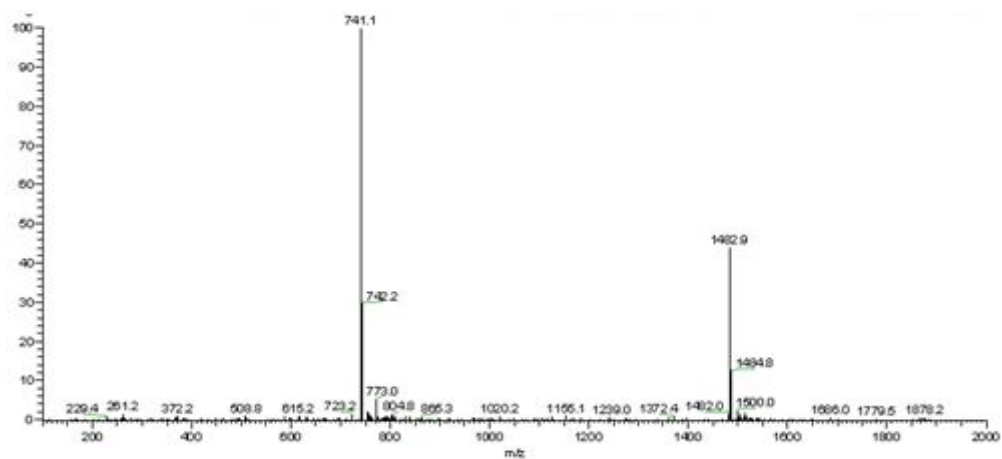


Fig. 4. Negative LC/ESI-MS for dieckol from *Ecklonia cava* ethanol extract.

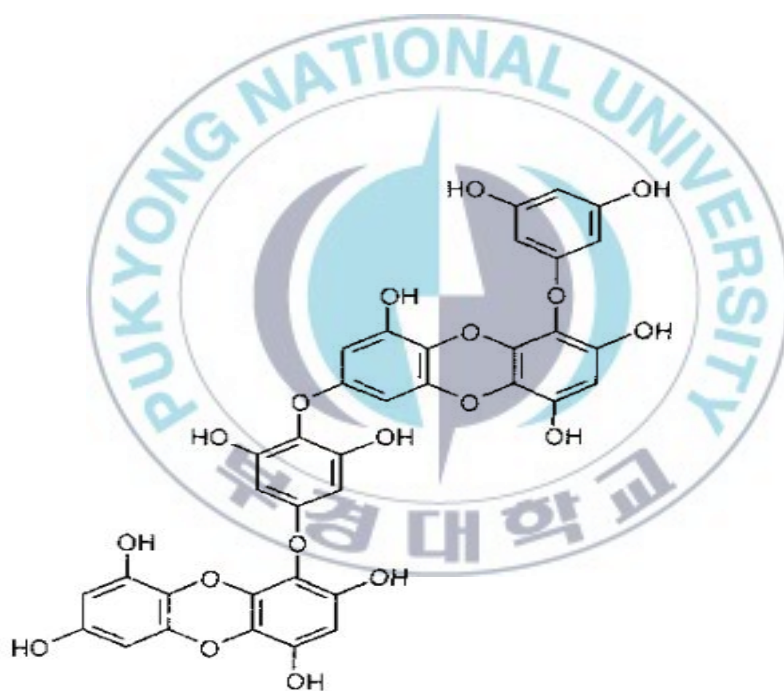


Fig. 5. Structure of dieckol.

Table 9. Inhibitory activity of *Eisenia bicyclis* extracts against histidine decarboxylase from *Morganella morganii*

Sample	Inhibiton activity (%)
EtOH extract	19.82±2.56 ^d
Ethyl acetate fraction	39.84±1.06 ^b
EA 2 ¹⁾	42.44±0.56 ^b
Fraction 5 ²⁾	68.24±1.62 ^a
Fraction 7	42.97±1.91 ^b
Frantion 8	34.47±1.34 ^c

* Concentration : 1 mg/mL.

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

²⁾ Dieckol

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

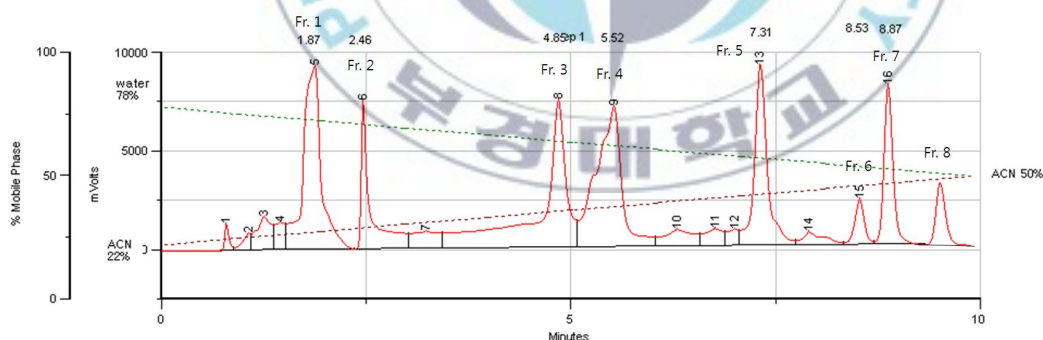


Fig. 6. HPLC chromatogram of EA2 isolated from ethyl acetate fraction of *Eisenia bicyclis* ethanol extract.

Table 10. Inhibitory activities of dieckol from *Eiesnia bicyclis* extract against histidine decarboxylase from *Morganella morganii*

Sample	Inhibiton activity (%)		IC ₅₀ (mg/mL)
	1 mg/mL	0.5 mg/mL	
Dieckol	68.24±1.62 ^a	40.81±1.51 ^b	0.61±0.02

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

2-3. 천연물에 의한 Histidine Decarboxylase 저해 양식

효소 반응계에서 어떤 물질이 효소를 실행시키지 않고 효소반응속도를 감소시키는 현상을 저해라고 하며, 이 현상을 초래하는 물질을 저해제라고 한다. 효소는 활성부위에 기질이 가역적으로 결합하여 반응이 진행되는 기질 특이성을 지닌다. 따라서 저해제를 통하여 효소의 특이성, 효소와 저해제와의 결합특성을 예측 할 수 있으며, 나아가 신약 개발 및 식품 공정에서 효소를 control 하여 식품의 품질을 개선시킬 수 있다.

본 연구에서는 감태 유래 phlorotannin의 일종인 dieckol에 대한 *M. morganii* 유래 HDC에 대한 저해기작을 측정한 결과(Fig. 7), 저해제가 효소의 활성부위를 중심으로 기질과 서로 점령하려는 경쟁적 저해를 하는 것을 확인 할 수 있었다. 이는 만약 충분한 기질이 존재한다면, 효소는 저해 받지 않게 된다. 따라서 기질이 증가할수록 효소의 최대반응속도는 영향을 받지 않으며 단지 효소와 기질 간의 해리 상수가 증가하게 된다. Dieckol은 해양 polyphenol의 일종으로 polyphenol에 의한 효소 저해 연구에서 catechin이 α -glucosidase 및 pancreatic lipase를 경쟁적으로 저해한다고 하였다(You et al., 2012). 또한 phenolic 화합물들이 구조상 phenol ring에 hydroxylic group과 electron donator group이 존재하여 이들이 tyrosinase의 기질과 선택적으로 작용하여 효과적으로 저해가 된다고 하였다(Fenoll et al., 2005). 그러나 dieckol에 대한 α -glucosidase와 amylase(Lee et al., 2009) 및 tyrosinase(Kang et al., 2012)의 저해로는 비경쟁적 저해의 형태를 나타내어 본 연구와는 다른 경향을 보였다. 따라서 본 연구

에서 dieckol의 hydroxylic group이 효소 활성부위와 결합하여 기질과 경쟁적으로 저해하는 것으로 사료되어진다(You et al., 2012; Fenoll et al., 2005).



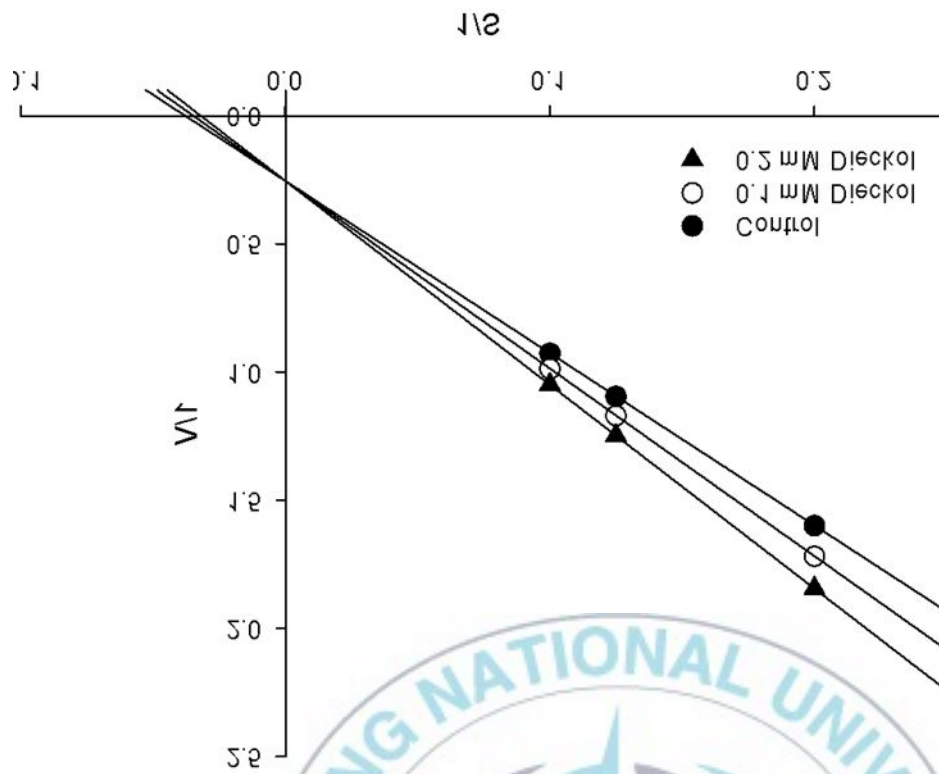


Fig. 7. The Lineweaver-Burk plots of dieckol for the histidine decarboxylase inhibitory activity mode from *Morganella morganii*.

2-4. 초정수압 처리에 의한 Histidine Decarboxylase 저해활성

소비자들이 접하는 식품은 안전성과 안정성이 가장 중요하다. 따라서 식품 산업에서 식품이 소비자에게 유해하지 않으며, 식품 고유의 성질을 그대로 공급하는 것이 요구되고 있다. 이에 식품의 부패 및 품질 변화에 가장 큰 요인으로 효소 및 미생물에 의한 변화를 들 수 있다 (Park et al., 2010). 종래에는 가장 대표적인 방법으로 가열처리에 의해 효소 불활성화 및 미생물의 생육 억제 효과를 많이 이용하였지만, 이는 식품 고유의 성질 변화 및 영양소 파괴 등을 초래함으로 이를 최소화하기 위해 식품 산업에서 비가열 처리 기술의 중요성이 대두되고 있다.

비가열 처리 기술 중 초정수압(High Hydrostatic Pressure) 기술은 식품을 물이 들어 있는 chamber에 넣어 식품을 둘러싸고 있는 물을 압축하는 것으로, 지구상에서 가장 압력이 높은 곳은 현재까지 알려진 태평양의 Mariana Trench의 심해 10,911 m에서의 압력이다. 수중에서 수심이 10 m씩 깊어짐에 따라 1 atm씩 높아지므로, 약 1,100 atm에 해당된다(Han and Jeong, 2005).

식품산업에서 이용되는 초정수압 기술은 자연계에서 존재하지 않는 100~1000 MPa에 해당되는 압력을 가하는데, 일반적으로 초정수압이 가해지면, 비공유결합인 이온결합, 소수결합 및 수소결합이 변하게 되는데, 단백질 분자는 비공유결합으로 전체 구조를 이루고 있기 때문에 결합이 풀어지는 폴립현상(Unfolding)으로 인해 단백질의 기능적 특성에 변화가 초래된다(Hong and Yoo, 1999). 효소는 3차원 분자 배열에 의한 활성부위로부터 생물학적 활성을 지니는데 활성부위의 변화

및 단백질의 폴립현상으로 인해 효소의 활성이 변화를 초래한다 (Rastogi et al., 2007).

이에 고등어 육 내에 존재하는 free-histidine을 histamine으로 전환시키는 효소인 HDC를 초정수압 처리에 의해 저해함으로써 histamine 생성을 억제하기 위해, *M. morganii* 및 *P. phosphoreum* 유래 crude한 HDC에 대하여 1,000, 2,000, 3,000 및 4000 bar를 각각 처리하였다. 그 결과(Table 11), *M. morganii* 유래 HDC를 1,000 bar 처리 시 처리하지 않은 HDC보다 0.9%로 그 억제율이 매우 미비하였지만, 2,000, 3,000 및 4000 bar 처리 시 각각 4.69, 19.41 및 23.24%로 높은 저해율을 보였으며, *P. phosphoreum* 유래 HDC는 각각 46.05, 57.04, 63.33 및 84.48% 저해됨으로써 압력이 점점 높아질수록 활성이 크게 억제되는 것을 확인할 수 있었다. Morild (1981)는 효소에 100-400 MPa 범위에서 가역적인 변화를 주면 단백질의 conformation 변화와 sub-unit의 분리에 의해 활성이 억제 된다고 하였다. 초정수압 처리에 의해 식품의 갈변화를 초래하는 polyphenoloxidase, 풍미를 저하시키는 peroxidase, 과일의 물성을 연화시키는 pectin methylesterase, 감귤류 주스에서 응집물을 생성시키는 pectinesterase 및 단백질 분해효소인 papain과 미생물 유래 α -amylase 등의 효소활성이 감소한다고 보고되어져 있다(Rastogi et al., 2007). 이와 같이 histamine을 생성하는 HDC 역시 초정수압 처리에 의해 단백질의 3차구조가 변화하여 효소 활성부위의 변화로 인한 활성이 감소하는 것으로 사료되어진다. 특히 *M. morganii* 유래 HDC보다 *P. phosphoreum* 유래 HDC가 초정수압에 더욱 불안정한 것을

확인할 수 있었다. 이는 histamine-producing bacteria 유래 HDC의 amino acid의 서열이 달라 그 구조의 차이에 의한 초정수압 처리로 인해 활성부위 및 단백질 변화 정도가 다른 것으로 사료되어진다 (Kanki et al., 2007).



Table 11. Inhibitory activity against histidine decarboxylase from *Morganella morganii* and *Photobacterium phosphoreum* treated with high hydrostatic pressure

	Inhibitory activity (%)			
	1000 bar	2000 bar	3000 bar	4000 bar
<i>M. morganii</i>	0.90 ±0.10 ^d	4.69 ±1.69 ^c	19.41 ±1.52 ^b	23.24 ±0.23 ^a
<i>P. phosphoreum</i>	46.05 ±4.41 ^c	57.04 ±4.80 ^b	63.33 ±3.29 ^b	84.48 ±2.44 ^a

– : Not done.

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

3. 고등어육에서의 효과

3-1. 항균 천연물을 이용한 고등어육 중의 Histamine 생성 억제

3-1-1. 미생물 생육 억제 효과

고등어가 어획되어 유통 과정을 거친 후 소비자가 접할 때에는 냉장 상태로 이루어지기 때문에 실제로 이를 적용하기 위해 $12\pm 1^{\circ}\text{C}$ 의 저온저장을 통한 실험이 이루어졌으며, *P. phosphoreum*의 실험구는 $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ 의 냉장 조건에서 실험이 이루어졌다. 비록 *M. morganii*는 중온성 균으로서 25°C 이상의 온도에 잘 생육하지만, Kim 등(2002)과 Kanki 등(2004)에 의하며 $10\text{--}15^{\circ}\text{C}$ 에서 생육이 가능하여 histamine을 생성하는 것으로 보고되어져 있다.

따라서 *M. morganii* 및 *P. phosphoreum*에 대한 항균 효과를 나타낸 천연물 추출물을 실제로 고등어육에 첨가함으로써 고등어육 중에서 *M. morganii* 및 *P. phosphoreum*의 생육을 억제하고 그로 인해 고등어육 중의 histamine 생성이 억제되는지 알아보기 위해, 우선 감태 에탄올 추출물을 2.5, 5 및 10 MIC 농도가 되도록 *M. morganii*를 접종한 고등어 육에 첨가하여 $12\pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 저장하며 생균수를 측정하였다. 그 결과(Fig. 8), 초기 균수는 10^4 CFU/mL으로 동일하게 측정되었으나, 저장 일차가 지남에 따라 무처리구의 고등어육의 생균수는 점차 증가하는 반면, 저장 24시간부터 감태 에탄올 추출물을 2.5 MIC 농도로 첨가한 고등어육의 생균수는 5일이 지난 생균수가 10^4 CFU/mL로 증가하지 않았으며, 5 및 10 MIC 농도로 첨가한 고등어육의 생균수는

10¹ CFU/mL으로 감소하여 저장시간이 지남에도 불구하고 생육이 억제됨을 확인하였다.

또한 *P. phosphoreum*을 접종한 고등어 육에 감태 에탄올 추출물을 0.5 및 1 mg/mL, 비틀대 모자반 에탄올 추출물을 0.1 및 0.5 mg/mL, 오미자 열수 추출물을 1 mg/mL 첨가하여 5±1℃에서 저장하며 생균수를 측정한 결과(Fig. 9), 처리하지 않은 고등어 육의 생균수는 10⁴ CFU/mL으로 천연물 추출물을 첨가한 처리구의 생균수인 10³ CFU/mL보다 높았다. 또한 저장시간이 지나감에 따라 무처리구의 생균수는 5일 및 10일에 각각 10⁵ 및 10⁶ CFU/mL로 점차 증가하였지만, 감태 및 비틀대 모자반 에탄올 추출물을 첨가한 처리구에는 10일에 각각 10³ 및 10⁴ CFU/mL로 균의 성장이 억제됨을 확인할 수 있었다. Mejlholm과 Dalgaard (2002)는 essential oil 중 oregano 및 cinnamon oil이 *P. phosphoreum*에 대하여 항균력을 지녀 MA포장한 대구 필렛의 유통기간을 연장한다고 보고하였다.

Lee 등(2011)은 주요 식중독 균인 *Staphylococcus aureus*에 대한 외톨개 모자반의 항균 효과를 확인하고 실제로 식품에 적용 가능한 것인지 확인하기 위해 beef extract, soluble starch 및 soybean을 함유한 식품 모델 배지에서 외톨개 모자반 분획물 중 항균활성을 나타내는 분획물의 8 MIC를 적용하여 time-kill curve test를 실시한 결과, 시간이 지남에 따라 *S. aureus*가 사멸 또는 생육이 억제됨을 확인하였다. 따라서 천연물 추출물이 고등어육 중에서 *M. morganii* 및 *P. phosphoreum*의 생육을 억제하는 것을 확인할 수 있었다.

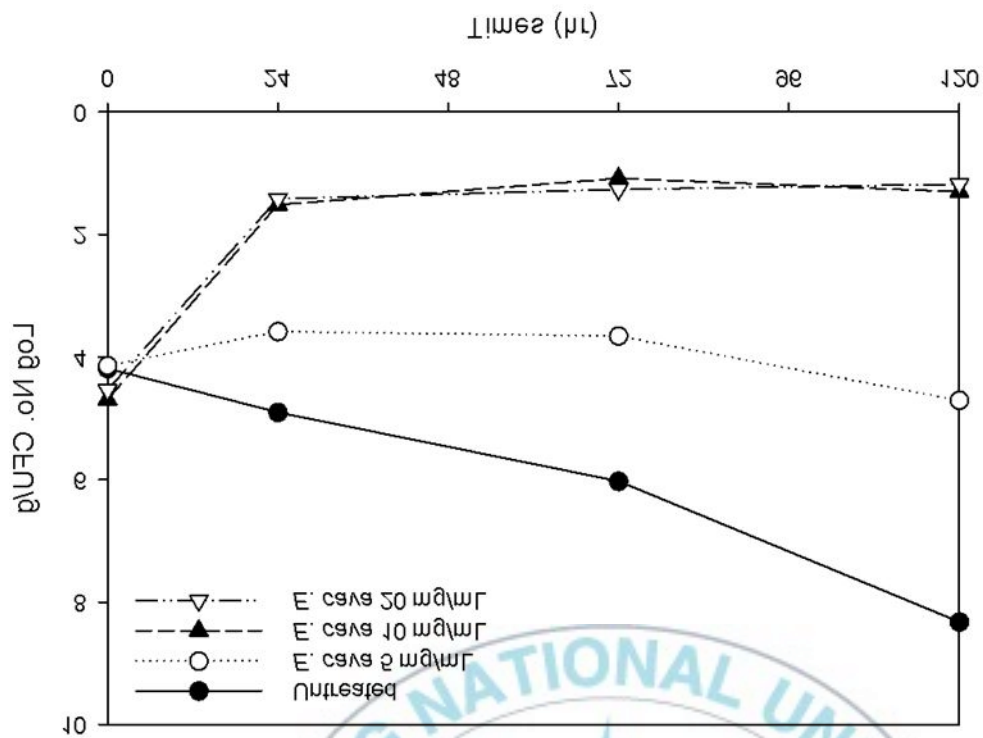


Fig. 8. Changes in viable cell counts of mackerel muscle inoculated with *Morganella morganii* treated with *Ecklonia cava* ethanol extract at $12\pm1^{\circ}\text{C}$.

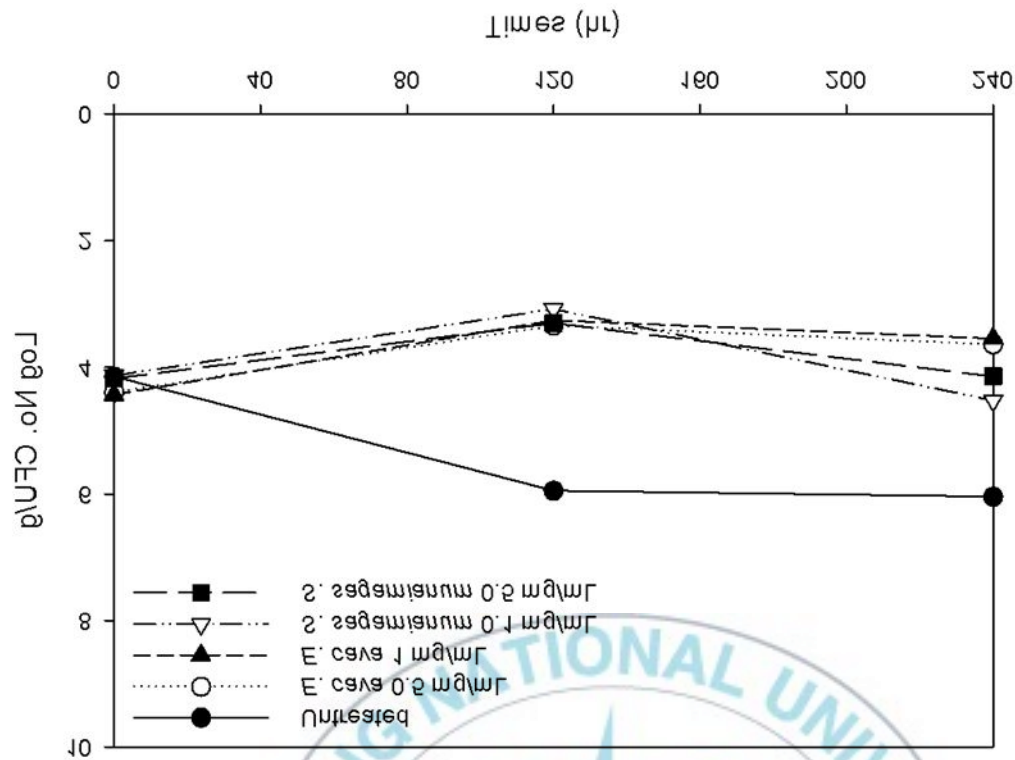


Fig. 9. Changes in viable cell counts of mackerel muscle inoculated with *Photobacterium phosphoreum* treated with *Ecklonia cava* and *Sargassum sagamianum* ethanol extracts at $5\pm 1^{\circ}\text{C}$.

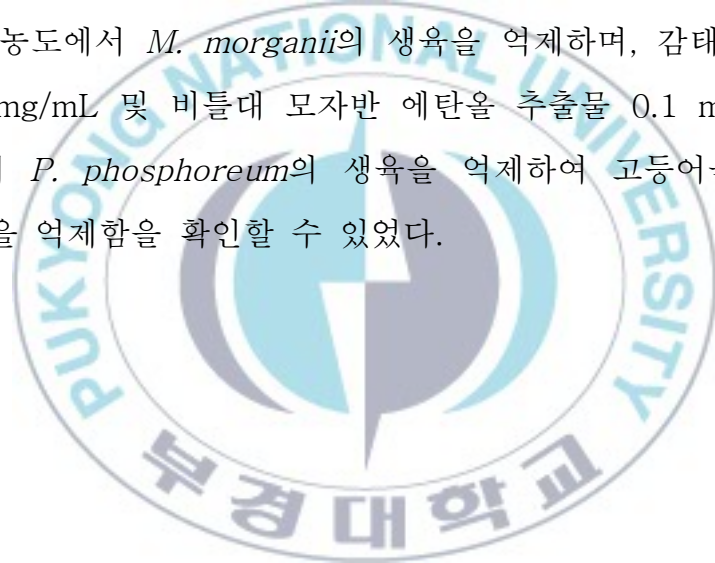
3-3-2. 고등어육 중의 Histamine 생성량 측정

감태 에탄올 추출물의 *M. morganii*에 대한 항균 효과에 의해 고등어육내의 histamine 생성 억제 효과를 확인하기 위해서 $12\pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 저장일차별로 고등어육 중의 histamine 함량을 측정하였다. 그 결과(Fig. 10), 무처리구인 고등어육은 72시간 때 22.43 mg/kg으로 histamine 양이 다소 증가하다가 120시간 때 2523.08 mg/kg으로 급격히 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 감태 에탄올 추출물을 첨가한 고등어육에서 histamine 양이 저장 120시간 동안 0-3.20 mg/kg로 아주 소량 생성되어 극단적으로 histamine 생성이 억제됨을 확인하였다.

감태 및 비틀대 모자반 에탄올 추출물의 *P. phosphoreum*에 대한 항균 효과에 의해 고등어육내의 histamine 생성 억제 효과를 확인하기 위해서 $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 저장일차별로 고등어육 중의 histamine 함량을 측정한 결과(Fig. 11), 저장 10일 때 무처리구의 histamine 함량이 72.05 mg/kg로 증가하였지만, 감태 및 비틀대 모자반 에탄올 추출물을 첨가한 처리구의 histamine 함량은 0-0.89 mg/kg로 증가하지 않았다.

어육내에서 histamine 생성은 어류가 부패되기 전 초기에 미생물 유래 HDC에 의해 histidine이 histamine으로 빠르게 전환된다(Lehane and Olley, 2000). 따라서 외관상으로 부패가 되지 않았음에도 불구하고 histamine이 다량 생성되어 식중독을 유발하게 된다. Wendakoon 와 Sakaguchi (1993)는 강력한 histamine 생성균인 *Enterobacter aerogenes*가 유도기 후에 amine이 생성되며, 정지기 동안 amine이 최대 생성된다는 보고하였으며, Kanki 등(2004) 역시 sardine

homogenate에 *P. phosphoreum*을 접종하였을 때, 유도기를 지나 대수증식기에 histamine이 급격하게 증가하며, 정지기에 histamine 함량이 최대가 되는 것으로 나타났다. 본 연구의 결과에서도 *M. morganii* 및 *P. phosphoreum*를 접종한 고등어육에서는 각각 3일 및 10일까지 10^6 CFU/mL으로 유도기를 지나 대수 증식기에 접어드는 시점에서 histamine이 증가함을 확인할 수 있었다. Wendakoon과 Sakaguchi (1993)은 강력한 histamine 생성균인 *Enterobacter aerogenes*에 대하여 clove 0.5%를 첨가하였을 때 histamine 억제 효과를 보였으며, 이는 clove의 정유 성분에 존재하는 phenolic 화합물이 미생물의 세포막에 영향을 주었다고 보고하였다. 따라서 감태 에탄올 추출물이 5 mg/mL 이상의 농도에서 *M. morganii*의 생육을 억제하며, 감태 에탄올 추출물 0.5 mg/mL 및 비틀대 모자반 에탄올 추출물 0.1 mg/mL 이상의 농도에서 *P. phosphoreum*의 생육을 억제하여 고등어육에서 histamine 생성을 억제함을 확인할 수 있었다.



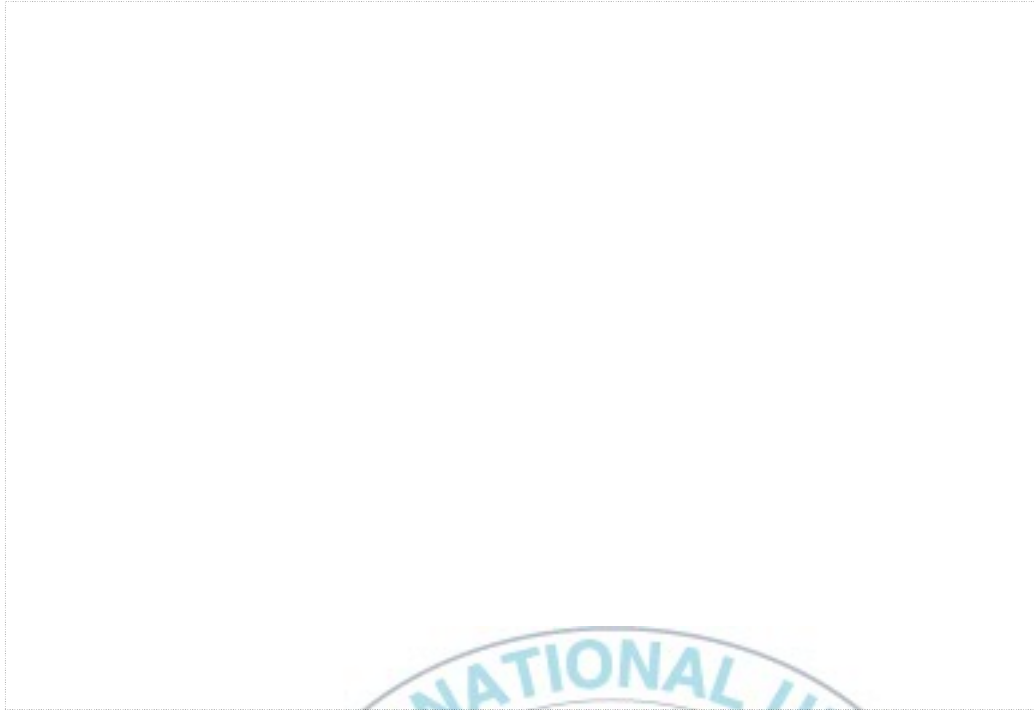


Fig. 10. Changes in histamine contents of mackerel muscle inoculated with *Morganella morganii* treated with *Ecklonia cava* ethanol extract at $12\pm 1^{\circ}\text{C}$. ^{a-b} Means in the same column bearing different superscript in samples are significantly different by Duncan's multiple range test ($p<0.05$).

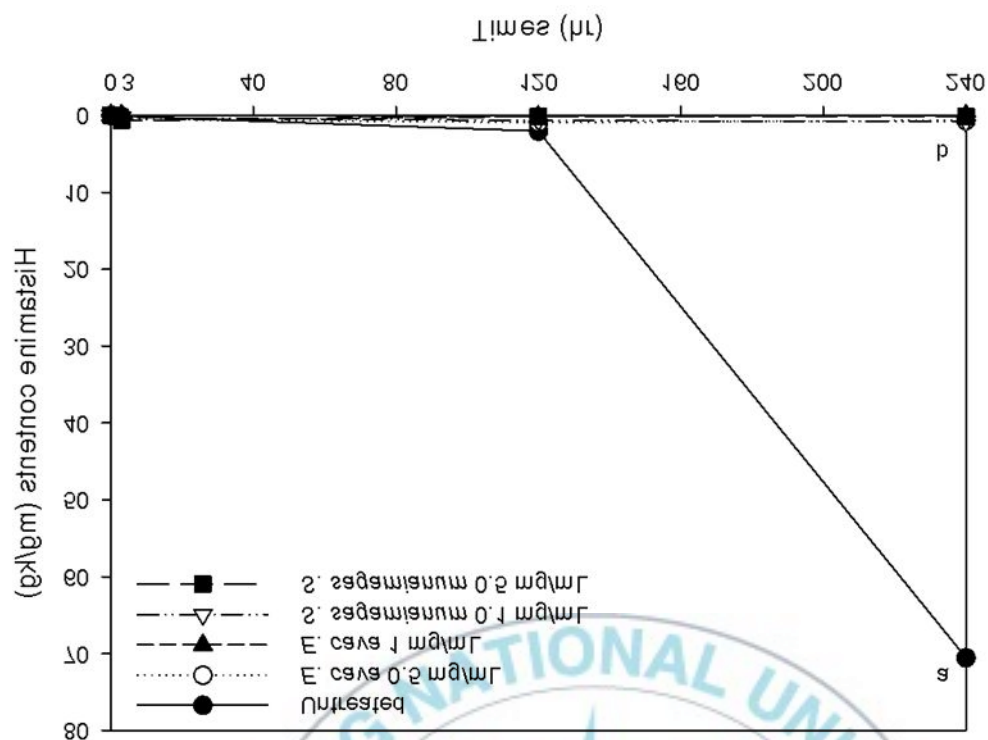


Fig. 11. Changes in histamine contents of mackerel muscle inoculated with *Photobacterium phosphoreum* treated with *Ecklonia cava* and *Sargassum sagamianum* ethanol extracts at $5 \pm 1^\circ\text{C}$. ^{a-b} Means in the same column bearing different superscript in samples are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$)

3-2. 효소 저해 천연물을 이용한 고등어육 중의 Histamine 생성 억제

효소 저해 천연물을 이용한 고등어육 중의 histamine 생성을 억제하기 위한 실험을 한 결과(Fig. 12,13), *P. phosphoreum* 유래 HDC를 첨가한 고등어육이 *M. morganii* 유래 HDC를 첨가한 고등어육보다 histamine 생성이 적었다. Kanki 등(2007)의 *M. morganii* 및 *P. phosphoreum* 유래 재조합 HDC에 대한 온도에 대해 검토한 연구에서 *M. morganii* 유래 재조합 HDC가 20℃에서 63% 저해되며, *P. phosphoreum* 유래 재조합 HDC는 36% 활성이 감소되고, 5℃의 경우 각각 90 및 84% 활성이 감소된다고 보고하여, 본 연구에서도 *P. phosphoreum* 유래 HDC가 더 낮은 온도 조건에서 활성이 감소하여, *M. morganii* 유래 HDC보다 control의 histamine 생성량이 낮은 것으로 사료된다.

M. morganii 유래 HDC에 대해 높은 저해 효과를 나타낸 감태, 대황, 비틀대 모자반, 오미자 에탄올 및 열수 추출물을 고등어육에 첨가하여 histamine 생성 억제 효과를 알아보기 위해 고등어육에 천연물 추출물을 각각 5 mg/mL의 최종 농도가 되도록 처리한 후 12±1℃에서 저장하며 histamine 생성량을 측정한 결과(Fig. 11), 천연물 추출물을 첨가한 고등어 육중의 histamine 생성량이 전반적으로 무처리구보다 유의적으로 감소한 것으로 나타났다. 특히 대황 에탄올 추출물은 120시간 저장 후 고등어 육중에서 41.67 mg/kg의 histamine을 생성하여 무처리구의 histamine 생성량인 96.67 mg/kg 보다 약 56.89%의 가장 많은 histamine 생성을 억제하였으며, 감태 에탄올 추출물 억

시 고등어 육중 51.92 mg/kg의 histamine을 생성하여 무처리구 보다 약 46.29%의 histamine 생성을 억제하여 뛰어난 효과를 나타내었다. 또한 비틀대 모자반 에탄올, 오미자 열수 및 에탄올 추출물이 120시간 때 각각 61.67, 62.28 및 76.79 mg/kg의 histamine을 생성하여 대조구보다 각각 약 36.21, 35.06 및 20.55% histamine 생성을 억제함을 확인할 수 있었다. 이 결과는 *in vitro* 상에서 *M. morganii* 유래 HDC 저해 효과 실험과 달리 대황 및 감태 에탄올 추출물을 첨가한 고등어육에서 histamine 생성량이 가장 낮게 나타났는데, Lee 등(2011)은 외톨개 모자반 에탄올 추출물 유래 항균 물질이 식품 구성성분인 탄수화물, 단백질 및 지질과의 영향에 대한 상관관계 연구에서 높은 농도의 starch가 있을 경우, 항균력이 감소하고, 5% 이상의 beef extract 및 1% 이상의 soybean oil이 존재할 경우, 항균력이 감소한다고 보고한 바 있다. 따라서 천연물 유래 생리활성물질이 *in vitro* 상에서 뛰어난 효과를 지니지만, 실제로 이를 적용시켰을 때에 고등어육 중의 여러 성분들과 작용하여 경향이 달라진 것으로 사료된다. 따라서 *in vitro* 상에서 *M. morganii* 유래 HDC에 대하여 뛰어난 저해능을 보인 dieckol이 감태 및 대황에 다량 함유되어 있어 histamine 생성량이 억제된 것으로 사료되어진다.

P. phosphoreum 유래 HDC에 대해 높은 저해 효과를 나타낸 감태, 대황, 오미자 에탄올 및 열수 추출물을 고등어육에 첨가하여 histamine 생성 억제 효과를 알아보기 위해 고등어육에 천연물 추출물을 각각 5 mg/mL의 최종 농도가 되도록 처리한 후 $5\pm1^{\circ}\text{C}$ 에서 저장하며 histamine 생성량을 측정한 결과(Fig. 12), 120시간 동안 전반적

으로 천연물 추출물을 첨가한 처리구가 무처리보다 histamine 생성을 억제하였다. 특히 오미자 열수 추출물을 첨가한 처리구에서 44.10 mg/kg의 histamine을 생성하여 무처리구의 63.85 mg/kg보다 약 30.93% 유의적으로 가장 크게 억제함을 확인하였다. 그 다음으로 감태, 대황 및 오미자 에탄올 추출물이 각각 48.87, 51.02 및 54.36 mg/kg의 histamine을 생성하여 천연물 추출물들이 *P. phosphoreum* 유래 HDC의 작용을 억제하여 histamine 생성이 감소하는 것을 확인하였다.



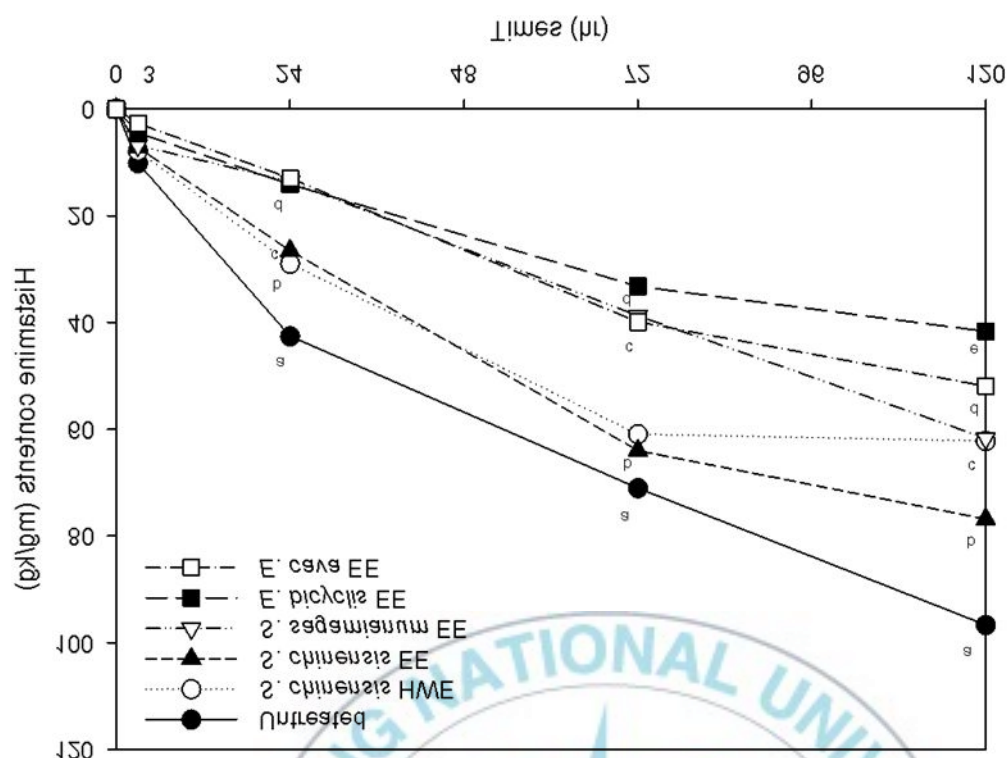


Fig. 12. Changes in histamine contents of mackerel muscle inoculated with crude histidine decarboxylase from *Morganella morganii* treated with natural materials ethanol extracts at $12 \pm 1^\circ\text{C}$. Concentration : 5 mg/mL. ^{a-d} Means in the same column bearing different superscript in samples are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$). HWE, hot water extract ; EE, ethanol extract.

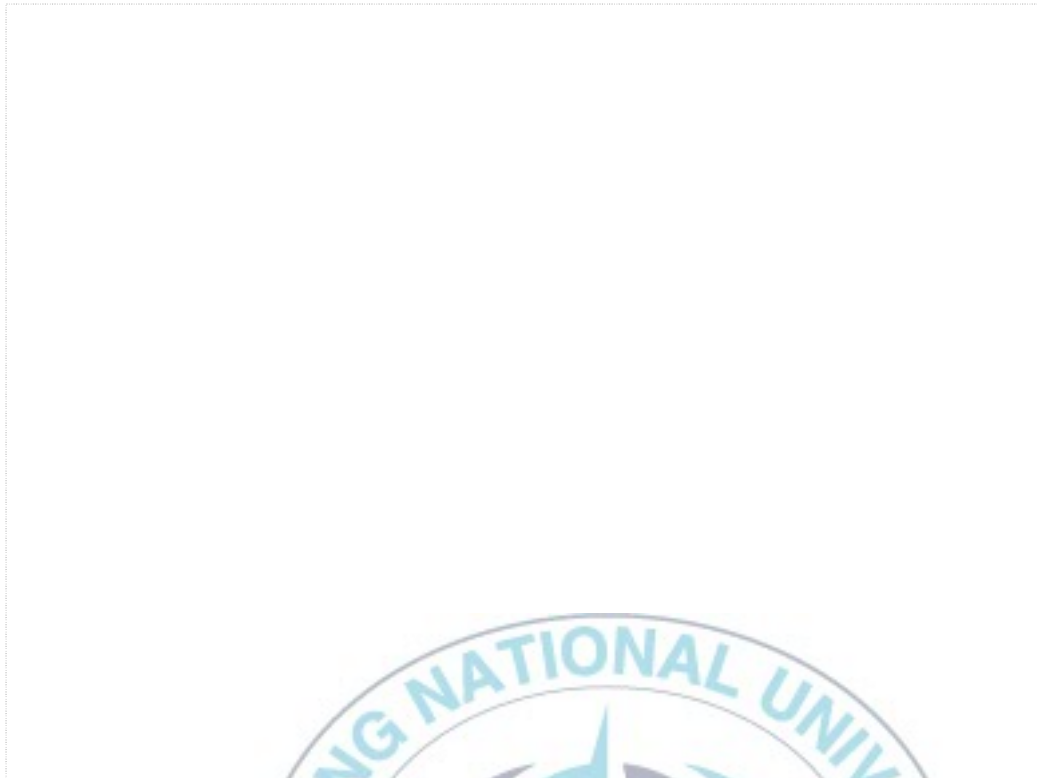


Fig. 13. Changes in histamine contents of mackerel muscle inoculated with crude histidine decarboxylase from *Photobacterium phosphoreum* treated with natural materials ethanol extracts at $5\pm 1^{\circ}\text{C}$. Concentration : 5 mg/mL. ^{a-d} Means in the same column bearing different superscript in samples are significantly different by Duncan's multiple range test ($p<0.05$). HWE, hot water extract ; EE, ethanol extract.

3-3. 초정수압에 의한 고등어육내의 Histamine 생성 억제

3-3-1. 미생물 생육 억제 효과

식품산업에서 초정수압 처리는 식품의 영양소 및 품질 변화를 최소화 하면서 열을 가하지 않아도 열을 가해서 미생물을 살균시키는 효과를 나타낸데 주로 이용되어 왔다. 초정수압에 의한 미생물 살균 기작은 비공유결합이 변함으로써 일어나는데, 생체 고분자 물질인 단백질, 핵산, 다당류 등이 초고압에 의해 그 구조가 파괴되고, 지질 역시 초고압에 의해 변화되어 미생물의 세포막이 변화 및 파괴되며, 세포 형태 변화 등으로 인해 미생물을 사멸시킨다(Han and Jeong, 2005; Patterson, 2005).

초정수압 처리에 대한 *M. morganii* 및 *P. phosphoreum*에 미치는 영향을 알아보기 위해 고등어육에 각 균주를 10^4 CFU/mL로 접종시킨 후, *M. morganii*를 접종한 고등어육에는 1000, 2000 및 3000 bar의 조건으로 초정수압을 처리하였으며, *P. phosphoreum*을 접종한 고등어육에는 1000, 2000, 3000 및 4000 bar의 초정수압을 처리하여 생균수를 측정하였다. *M. morganii*를 접종한 고등어육의 생균수를 측정한 결과(Fig. 14), 무처리구 및 1000 bar 처리구에서 초기 생균수가 10^4 CFU/mL이 검출되었으며, 2000 bar 처리구는 10^3 CFU/mL, 3000 bar 처리구는 10^1 CFU/mL으로 균이 무처리구 및 1000 bar 처리구보다 적게 검출되었다. 이를 $12 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 7일 동안 저장하며 생균수를 측정한 결과, 무처리 및 1000 bar 처리구는 5일차 때 10^8 CFU/mL의 균이 측정되었지만, 2000 및 3000 bar 처리구는 각각

10^5 및 10^3 CFU/mL으로 균이 측정되었고, 7일차 경우에도 10^5 및 10^3 CFU/mL으로 균의 생육을 억제하는 것으로 나타났다. 따라서 2000 bar 이상의 초정수압 처리에 의해 *M. morganii*의 성장이 억제됨을 확인하였다. 또한 3000 bar에서 10^1 CFU/mL의 균이 측정된 것으로 보아 3000 bar 이상의 초정수압을 *M. morganii*에 가했을 때는 완전 사멸이 가능할 것으로 사료되어진다.

*P. phosphoreum*을 접종한 고등어육의 생균수를 측정한 결과(Fig. 15), 초기 생균수가 무처리, 1000 및 2000 bar에서 각각 10^4 , 10^4 및 10^3 CFU/mL이 측정되었지만, 3000 및 4000 bar 처리구에서 생균수가 검출되지 않았다. 이를 10일간 $5 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 저장실험을 진행한 결과, 무처리와 1000 bar 처리구가 5일차에 10^5 CFU/mL에서 10일차 때 10^6 CFU/mL로 꾸준히 증가하였다. 이에 비해 2000 bar의 처리구의 경우 5일차 때 10^3 CFU/mL, 10일차 때 10^5 CFU/mL이었으며, 3000 bar 처리구는 5일차에 10^1 CFU/mL, 10일차 때 생균수가 10^3 CFU/mL으로 나타났다. 그러나 4000 bar 처리구에서는 10일 동안 생균수가 측정되지 않았다. 위의 결과와 같이 *P. phosphoreum*은 $5 \pm 1^\circ\text{C}$ 와 같은 저온에서 잘 자라며, 이는 냉장고의 냉장 조건과 동일함으로 식품위생에 중요한 요인이라 할 수 있다. 이와 같은 결과를 미루어 볼 때, *P. phosphoreum*은 1000 bar에 큰 민감성을 보이지 않지만, 2000 bar이상의 초고압의 조건에서는 균의 성장을 억제하는 것을 확인할 수 있었으며, 4000 bar에는 균이 멸균되는 효과를 확인할 수 있었다. 따라서 초정수압 처리는 생선으로 부터 *M. morganii* 및 *P. phosphoreum*의 생육을 저해하여 histamine 생성뿐만 아니라, 식품의

유통기간도 연장할 수 있을 것으로 사료된다.



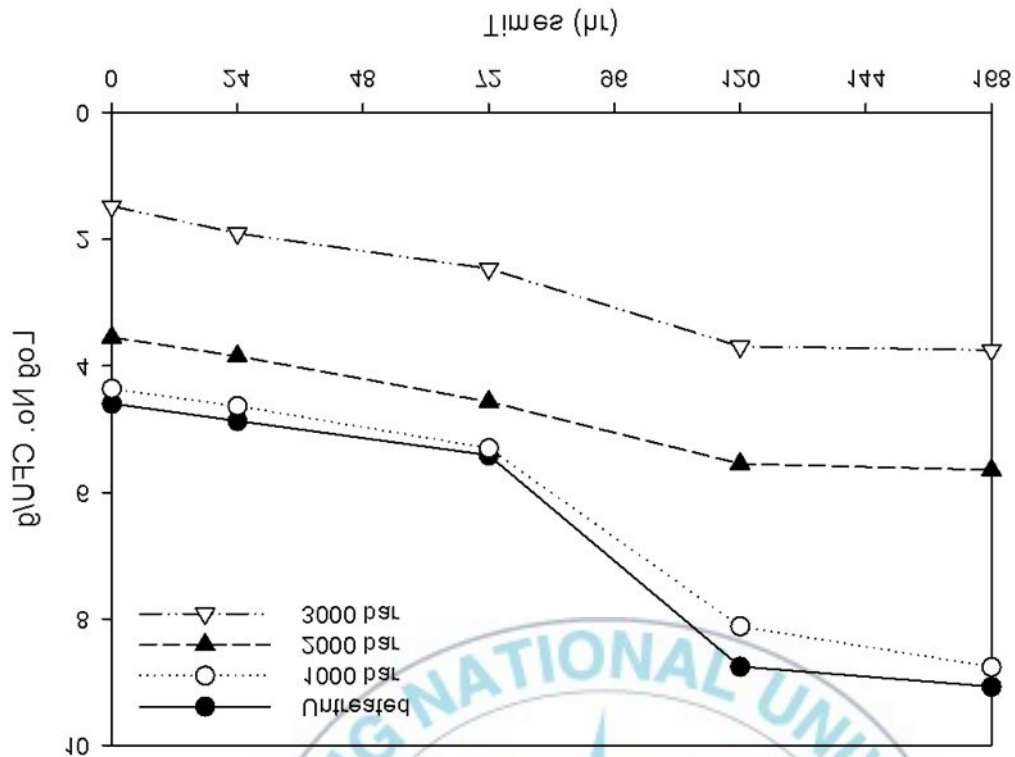


Fig. 14. Changes in viable counts of mackerel muscle inoculated with *Morganella morganii* treated with high hydrostatic pressure at $12 \pm 1^\circ\text{C}$.

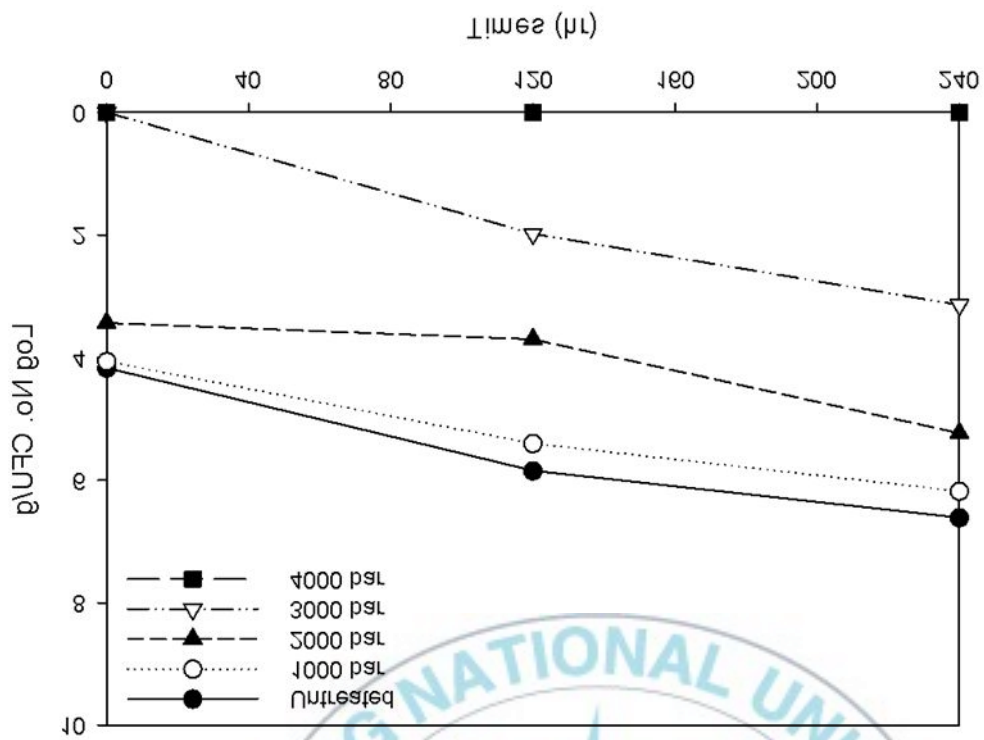


Fig. 15. Changes in viable counts of mackerel muscle inoculated with *Photobacterium phosphoreum* treated with high hydrostatic pressure at $5 \pm 1^\circ\text{C}$.

3-3-2. 고등어육내의 Histamine 생성량 측정

초정수압 처리에 의한 고등어육 중의 histamine 생성 억제 효과를 알아보기 위해 *M. morganii*를 접종한 고등어육 중의 histamine 함량을 위의 조건에서 측정한 결과(Fig. 16), 저장 후 1일차 무처리구 및 처리구 고등어 육에서 모두 histamine 함량이 5 mg/kg으로 소량 검출되었지만, 3일 후에는 무처리 및 1000 bar 처리구에서 각각 24.36 및 17.95 mg/kg으로 다소 증가하는 경향을 볼 수 있었다. 그러나 2000 및 3000 bar 처리구에서는 histamine 함량이 큰 변화를 나타내지 않았다. 5일간 저장한 경우 무처리 및 1000 bar 처리구에서 각각 3072.82 및 2635.90 mg/kg의 histamine이 생성되어 무처리구에 비해 1000 bar 처리구가 다소 적은 histamine을 생성하였지만, 큰 histamine 생성 억제 효과를 나타내지 못했다. 그러나 2000 bar 처리구의 경우 1-5일 동안 저장 시 1.02-2.05 mg/kg의 histamine이 생성되었고, 7일에는 10.19 mg/kg으로 histamine 함량이 약간 증가하였으며, 3000 bar 처리구의 경우 7일 저장 동안에 0.26-1.79 mg/kg의 histamine이 생성되어 고등어육 중의 histamine을 극단적으로 억제하였다.

초정수압 처리에 의한 고등어육 중의 histamine 생성 억제 효과를 알아보기 위해 *P. phosphoreum*를 접종한 고등어육 중의 histamine 함량을 위의 조건에서 측정한 결과(Fig. 17), 무처리구와 처리구 모두 5일까지 histamine 생성량이 1.15 mg/kg이하로 거의 생성되지 않았지만, 무처리의 경우 10일이 경과한 후 56.28 mg/kg의 histamine을 생성하였다. 그에 비해 1000 bar 처리구는 2.69 mg/kg, 2000-4000

bar 처리구는 0.64 mg/kg으로 histamine이 거의 생성되지 않아, 초고압 처리에 의해 histamine 생성이 억제됨을 확인하였다.

M. morganii 및 *P. phosphoreum*을 접종한 고등어육의 histamine 생성 결과는 앞서 언급한 생균수와 같은 경향으로 *M. morganii*를 접종한 고등어육은 무처리 및 1000 bar 처리구의 생균수가 3일차 때 10^4 CFU/mL에서 5일차 때 10^8 CFU/mL로 균수가 크게 증가함으로써 고등어육 중의 histamine 역시 각각 3072.82 및 2635.90 mg/kg으로 많이 생성되는 것을 알 수 있었으며, 7일에 생균수는 각각 10^9 및 10^8 CFU/mL로 정지기에 접어들어 histamine 함량이 각각 5698.46 및 5173.33 mg/kg으로 가장 많은 양을 생성하였다. 또한 *P. phosphoreum*을 접종한 고등어육 역시 5일까지 10^5 CFU/mL에서 10일차 10^6 CFU/mL로 점점 증가하면서 histamine이 생성되는 것을 확인할 수 있었다. *P. phosphoreum*을 접종한 고등어육의 1000 bar 처리구는 10일까지 2.69 mg/kg으로 소량 histamine이 생성되었지만, 생균수 결과와 비교했을 때, 무처리와 같은 경향을 균수가 증가함으로써 추후 저장 시 histamine이 다량 생성될 가능성이 있을 것으로 사료된다. 따라서 초정수압 처리가 균을 사멸 및 억제하여 유도기 및 정지기를 지연시키고 동시에 HDC의 활성을 저해함으로써 고등어육에서 histamine 생성을 억제하는 것으로 사료된다.

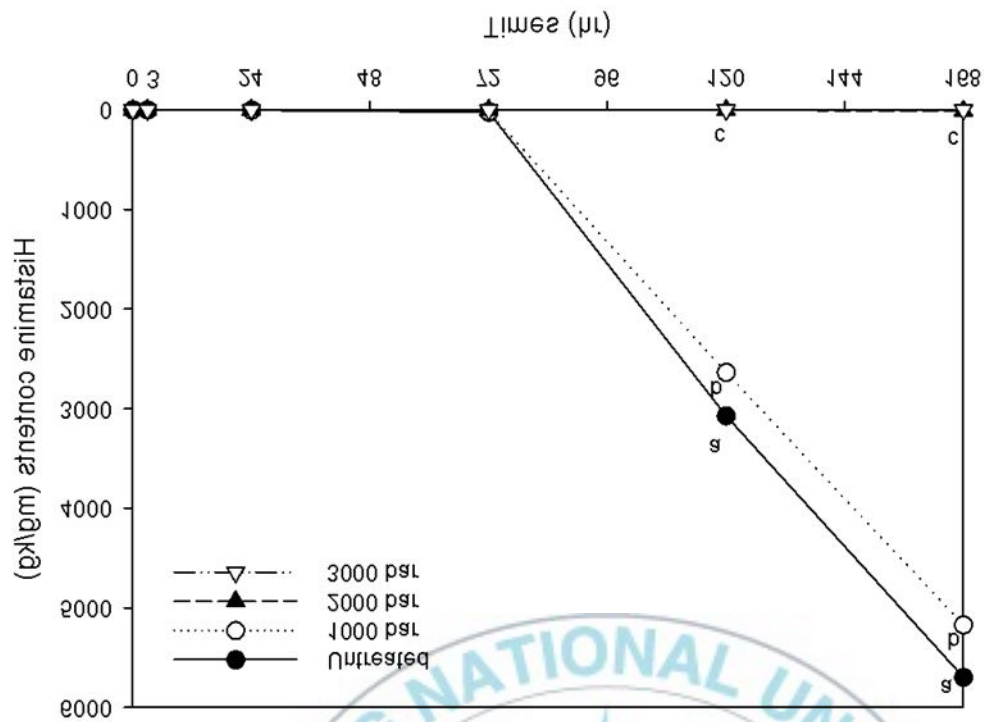


Fig. 16. Changes in histamine contents of mackerel muscle inoculated with *Morganella morganii* treated with high hydrostatic pressure at $12 \pm 1^\circ\text{C}$. ^{a-c} Means in the same column bearing different superscript in samples are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

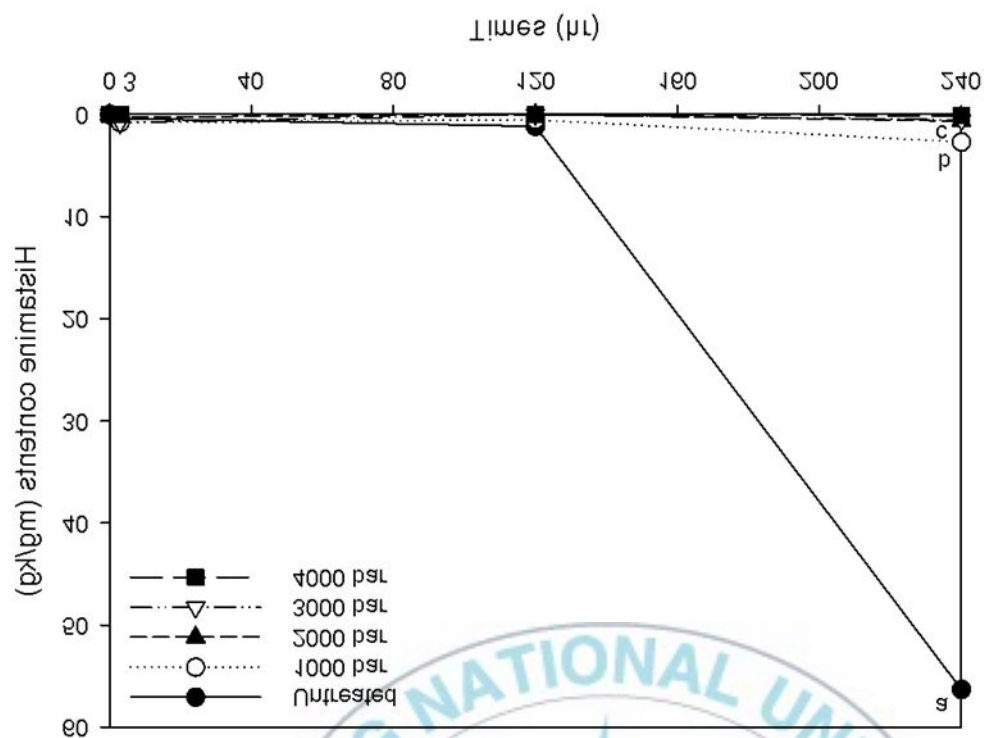


Fig. 17. Changes in histamine contents of mackerel muscle inoculated with *Photobacterium phosphoreum* treated with high hydrostatic pressure at $5 \pm 1^\circ\text{C}$. ^{a-c} Means in the same column bearing different superscript in samples are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

요 약

1. 천연물 및 초정수압 Histamine-Producing Bacteria에 대한 항균 효과 및 그 유래 Histidine Decarboxylase의 저해 효과

1-1. 한약재 및 해조류에 대한 *M. morganii* 및 *P. phosphoreum*의 항균력을 측정한 결과, 오미자 열수 및 에탄올 추출물과 감태 에탄올 추출물이 *M. morganii*에 대해 항균력을 나타냈으며, 오미자 열수 및 에탄올 추출물과 감태 및 비틀대 모자반 에탄올 추출물이 *P. phosphoreum*에 대해 항균력을 보였다.

1-2. 최소저해농도를 측정한 결과, 오미자 열수 및 감태 에탄올 추출물이 2 mg/mL에서 *M. morganii*의 생육을 저해하였고, 비틀대 모자반 에탄올 추출물이 0.015625 mg/mL에서 *P. phosphoreum*의 생육을 저해하여 가장 큰 항균 효과를 나타내었다.

1-3. Histamine-producing bacteria 유래 crude HDC의 저해 효과를 측정한 결과, 비틀대 모자반 에탄올 추출물이 1 mg/mL에서 *M. morganii* 유래 HDC를 81.10% 저해하였으며, 감태 에탄올 추출물이 1 mg/mL에서 *P. phosphoreum* 유래 HDC를 31.75% 저해하였다.

1-4. 감태 및 대황 에탄올 추출물에서 분리한 dieckol에 대한 *M. morganii* 유래 HDC의 저해 효과를 측정한 결과, 0.61 mg/mL의 IC₅₀ 값을 나타내었으며, 경쟁적 저해 형태를 나타냈다.

1-5. Histamine-producing bacteria 유래 crude HDC를 초정수압 처리한 결과, 1000, 2000, 3000 및 4000 bar 조건에서 *M. morganii* 유래 HDC를 각각 0.90, 4.69, 19.41 및 23.24% 저해하였으며, *P. phosphoreum* 유래 HDC를 각각 46.05, 57.04, 63.33 및 84.48% 저해하였다.

2. 고등어육에서의 효과

2-1. *M. morganii* 및 *P. phosphoreum*에 대해 항균력을 나타낸 천연물을 고등어육에 첨가한 후 각각의 균주를 접종하여 생균수 및 histamine 생성량을 측정한 결과, *M. morganii*에 대해 감태 에탄올 추출물을 2.5 MIC 농도로 첨가한 처리구의 생균수에서도 5일 동안 10⁴ CFU/mL로 정지하였으며, histamine 생성 역시 1.15 mg/mL 이하로 억제되었으며, *P. phosphoreum*에 대해 감태 및 비틀대 모자반 에탄올 추출물이 각각 0.5 및 0.1 mg/mL에서도 생균수가 10일까지 10³ 및 10⁴ CFU/mL로 억제되었고, histamine 생성 역시 0.89 mg/kg으로 억제되었다.

2-2. *M. morganii* 및 *P. phosphoreum* 유래 HDC의 저해 효과를

나타낸 천연물을 고등어육에 첨가한 후 histamine 생성량을 측정한 결과, *M. morganii* 유래 HDC를 접종한 고등어육에서는 대항 및 감태 에탄올 추출물이 무처리구에 비해 각각 56.89 및 51.92%로 histamine 생성을 억제하였으며, *P. phosphoreum* 유래 HDC를 접종한 고등어육에서는 오미자 열수 추출물을 첨가한 처리구가 30.93%로 가장 큰 histamine 생성억제 효과를 나타냈다.

2-3. *M. morganii* 및 *P. phosphoreum*을 각각 접종시킨 고등어육을 초정수압 처리 후 생균수 및 histamine 생성량을 측정한 결과, 2000 bar 이상의 압력에서 *M. morganii*의 경우 7일까지 10^5 CFU/mL, *P. phosphoreum*의 경우 10일까지 10^5 CFU/mL로 균의 사멸 및 성장이 억제되었으며, histamine 생성 역시 10 mg/kg 이하로 억제되었다.



참고 문헌

Ahn IS, Park JY, Do MS. 2007. Weight control mechanism and antiobesity functional agents. J Korean Soc Food Sci Nutr 36, 503-513.

Barwell CJ, Blunden G, Manandhar PD. 1989. Isolation and characterization of brown algal polyphenols as inhibitors of α -amylase, lipase and trypsin. J Appl Phycol 1, 319-323.

Birari RB, Bhutani KK. 2007. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. Drug Discov Today 12, 879-889.

Chung KH, Lee SH, Lee YC, Kim JT. 2001. Antimicrobial activity of *Omiija* (*Schizandra chinensis*) extracts. J Korean Soc Food Sci Nutr 30, 127-132.

Choi BW, Ryu G, Park SH, Kim ES, Shin J, Roh SS, Shin HC, Lee BH. 2007. Anticholinesterase activity of plastoquinones from *Sargassum sagamianum*: lead compounds for alzheimer's disease therapy. Phytother Res 21, 423-426.

Choi JG, Kang OH, Brice OO, Lee YS, 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.

Dapkevicius MLNE, Nout MJR, Rombouts FM, Houben JH, Wymenga W. 2000. Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms. Int J Food Microbiol 57, 107-114.

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.

Fenical W. 1983. Marine plants: a unique and unexplored resource. In plants: The Potentials for Extracting Protein, Medicines, and Other Useful Chemicals (workshop Proceedings). DIANE publisher, Washington, USA, 147-153.

Fenoll LG, Rodriguez-Lopez JN, Varon R, Garcia-Ruiz PA, Garcia-Canovas F, Tudela J. 2005. Action mechanism of tyrosinase on meta- and para-hydroxylated monophenols. *Biol Chem* 381, 313-320.

Fishery Production Survey. 2011. Production survey of mackerel. [Http://fs.fips.go.kr/index.jsp](http://fs.fips.go.kr/index.jsp).

Frank HA, Baranowski JD, Chongirawatana M, Burst PA, Premaratne RJ. 1985. Identification and decarboxylase activities of bacteria isolated from decomposed mahimahi(*Coryphaena hippurus*) after incubation at 0 and 32°C. *Food Microbiol* 2, 331-340.

Han GD, Jeong BY. 2005. High pressure processing on foods. *Food Industry and Nutrition* 10, 30-36.

Hayashi H. 1995. Pyridoxal enzymes: mechanistic diversity and uniformity. *J Biochem-Tokyo* 118, 463-473.

Heo SJ, Hwan JY, Choi JI, Han JS, Kim HJ, Jeon YJ. 2009. Diploretrohydroxycarmalol isolated from *Ishige okamurae*, a brown algae, a potent α -glucosidase and α -amylase inhibitor,

alleviates postprandial hyperglycemia in diabetic mice. *Eur J Pharmacol* 615, 252-256.

Hong SI, Yoo KM. 1999. High pressure food processing technology. *Bulletin of Food Technology* 12, 26-42.

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.

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

Kang SM, Heo SJ, Kim KN, Lee SH, Yang HM, Kim AD, Jeon YJ. 2012. Molecular docking studies of a phlorotannin, dieckol isolated from *Ecklonia cava* with tyrosinase inhibitory activity. *Bioorgan Med Chem* 20, 311-316.

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 Microb* 73, 1467-1473.

Kanki M, Yoda T, Ishibashi M, Tsukamoto T. 2004.

Photobacterium phosphoreum caused a histamine fish poisoning incident. Int J Food Microbiol 92, 79-87.

Kim KH, Roh SG, Li CR, Jin CF, Kim A, Choi WC. 2008. Anti-diabetic effects of banaba leaf extracts (*Lagerstroemia speciosa* Pers.) through solvents. J Life Sci 18, 1305-1311.

Kim DH, Jung JY, Kim KBWR, Lee CJ, Kwak JH, Kim MJ, Sunwoo C, Kim HJ, Jung SA, Kim TW, Cho YJ, Ahn DH. 2011. Effects of Heat and pH treatment on α -amylase inhibitory activity of *Ecklonia cava* ethanol extract. Kor J Fish Aquat Sci 44, 791-795.

Kim MM, Ta QV, Mendis E, Rajapakse N, Jung WK, Byun HG, Jeon YJ, Kim SK. 2006. Phlorotannins in *Ecklonia cava* extract inhibit matrix metalloproteinase activity. Life Sci 79, 1436-1443.

Kim SH, Price RJ, Morrissey MT, Field CI, An H. 2002. Histamine production by *Morganella morganii* in mackerel, albacor, mahi-mahi, and salmon at various storage temperatures. J Food Sci 67, 1522-1528.

Lee SH, Han JS, Heo SJ, Jeon YJ. 2010. Protective effects of

dieckol isolated from *Ecklonia cava* against high glucose-induced oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells. Toxicol In Vitro 24, 375-381.

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.

Lee SH, Park MH, Heo SJ, Kang SM, Ko SC, Han JS, Jeon YJ. 2010. Dieckol isolated from *Ecklonia cava* inhibits α -glucosidase and α -amylase in vitro and alleviates postprandial hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. Food Chem Toxicol 48, 2633-2637.

Lee SH, Yong-Li, Karadeniz F, Kim MM and 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 SJ, Song EJ, Kim KBWR, Lee CJ, Jung JY, Kwak JH, Choi MK, Kim MJ, Kim TW, Ahn DH. 2010. Inhibitory effects of *Sargassum thunbergii* ethanol extract against α -amylase. Kor J Fish Aquat Sci 43, 648-653.

Lee SY, Song EJ, Kim KBWR, Yoon SY, Kim SJ, Lee SJ, Hong YK, Lim SM, Ahn DH. 2009. Antimicrobial activity of ethanol extract from *Sargassum thunbergii*. J Korean Soc Food Sci Nutr 38, 502-508.

Lee SY, Song EJ, Kim KBWR, Lim SI, Hong YK, Ahn DH. 2011. Antimicrobial activity of *Myagropsis myagroides* and interaction with food composition. Food Sci Biotechnol 20, 85-92.

Lehane L, Olley J. 2000. Histamine fish poisoning revisited. Int J Food Microbiol 58, 1-37.

Leuschner RG, Heidel M, Hammes WP. 1998. Histamine and tyramine degradation by food fermenting microorganism. Int J Food Microbiol 39, 1-10.

Mah JH, Hwang HJ. 2009. Inhibition of biogenic amine formation in a salted and fermented anchovy by *Staphylococcus xylosus* as a protective culture. Food Control 20, 796-801.

Mah JH, Kim YJ, Hwang HJ. 2009. Inhibitory effects of garlic and other spices on biogenic amine production in *Myeolchi-jeot*,

Korean salted and fermented anchovy product. Food Control 20, 449-454.

Mejlholm O, Dalgaard P. Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. Lett Appl Microbiol 34, 27-31.

MIFAFF. 2011. Statistic Database for Marine Products. [Http://www.fips.go.kr:7001/jsp/dp/pc/pc_year_item_list.jsp?menuDepth=050203](http://www.fips.go.kr:7001/jsp/dp/pc/pc_year_item_list.jsp?menuDepth=050203).

Morii H, Kasama K. 2004. Activity of two histidine decarboxylase from *photobacterium phosphoreum* at different temperatures, pHs, and NaCl concentrations. J Food Protect 67, 1736-1742.

Morild E. 1981. The theory of pressure effects on enzyme. Adv Protein Chem 34, 93-166.

Moya-Garcia AA, Medina MÁ, Sánchez-Jiménez F. 2005. Mammalian histidine decarboxylase: from structure to function. Bioessays 27, 57-63.

Nagayama K, Iwamura Y, Shibata Y, Hirayama I, Nakamura T. 2002. Bactericidal activity of phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome*. J Antimicrob Chemoth 50,889-893.

NFRDI. 2009. Chemical composition of marine products in korea 2009; Second edition. National Fisheries & Development Institute p 24-146.

NFRDI. 2011. Information of General Fisheries. http://portal.nfrdi.re.kr/wesea?id=det&flag=01&info_id=7946&cPage=1&limit=10&sc=&sv=.

Niven CF, Jeffrey MB, Corlett DA. 1981. Differential plating medium for quantitative detection of histamine-producing bacteria. Appl Environ Microb 41, 321-322.

Park JY, Na SY, Lee YJ. 2010. Present and future of non-thermal food processing technology. Food Science and Industry 43, 1-20.

Park SY. 2009. Food quality evaluation of raw and salted mackerel collected at market in busan. Ph.D. Thesis, Pukyong

National University, Busan, Korea.

Park UY, Chang DS, Cho HR. 1992. Screening of antimicrobial activity for medicinal herb extracts. J Korean Soc. Food Nutr 21, 91-96.

Park UY, Kim SH, Kim JH, Kim YG, Chang DS. 1995. Purification of antimicrobial substance for the extract from the root bark of *Mours alba*. J Fd Hyg Safety 10, 225-230.

Patterson MF. 2005. Microbiology of pressure-treated foods. J Appl Microbiol 98, 1400-1409.

Ramesh A, Venugopalan VK. 1986. Densities and characteristics of histamine-forming luminous bacteria of marine fish. Food Microbiol 3, 103-105.

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

Ryu G, Park SH, Kim ES, Choi BW, Ryu SY, Lee BH. 2003. Cholinesterase inhibitory activity of two farnesylacetone

derivatives from the brown alga *Sargassum sagamianum*. Arch Pharm Res 26, 796-799.

Sato Tsuneo, Horiuchi Tatsuo, Nishimura Ikuko. 2005. Simple and rapid determination of histamine in food using a new histamine dehydrogenase from *Rhizobium* sp.. Anal Biochem 346, 320-326.

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°C. Z Lebensm Unters For 203, 71-76.

Shibata T, Fujimoto K, Nagayama K, Yamaguchi K, Nakamura T. 2002. Inhibitory activity of brown algae, phlorotannins against hyaluronidase. Int J Food Sci Tech 37, 703-709.

Tanase S, Guirard BM, Snell EE. 1984. Purification and properties of a pyridoxal 5'-phosphate-dependent histidine decarboxylase form *Morganella morganii* AM-15. J Biol Chem 260, 6738-6746.

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

Valfre F, Caprino F and Turchini GM. 2003. The health benefit of seafood. Veterinary Research Communication 27, 507-512.

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.

Wendakoon CN, Sakaguchi M. 1994. Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. J Food Protect 58, 280-283.

Wildman REC. 2001. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cardiac arrhythmias In: Handbook of nutraceuticals and functional foods. CRC Press LLC, Florida, U.S.A., 331-344.

You Q, Chen F, Wang X, Jiang Y, Lin S. 2012. Anti-diabetic activities of phenolic compounds in muscadine against alpha-glucosidase and pancreatic lipase. Food Sci Technol 46, 164-168.

Yoon SY, Lee SY, Kim KBWR, Song EJ, Lee SJ, Lee CJ, Park NB, Jung JY, Kwak JH, Nam KW, Ahn DH. 2010. Antimicrobial activity of the *Sargssum fulvellum* ethanol extract and the effect of temperature and pH on their activity. Korean J Food Sci Technol 42, 155-159.

