J. Fd Hyg. Safety 13(4), 383 - 387(1998)

포장두부에서 분리한 부패세균의 특성에 관한 연구

강선희† · 이용욱 · 오원택*
*서울대학교 보건대학원, *한국식품위생연구원*

A Study on Characteristics of Spoilage Bacteria Isolated from Packed Tofu

Sun-hee Kang†, Yong-wook Lee and Won-taek Oh*
School Public Health, Seoul National University, Seoul 110-799, Korea
**Korea Institute of Food Hygiene, Seoul 156-050, Korea*

ABSTRACT — This study was undertaken with packed tofu products to serve as a basic source for sanitary control of tofu production by detecting spoilage bacteria in tofu from which are isolated, investigating heat-resistance and growth characteristics of spoilage bacteria. Isolated strains were confirmed as relevant strains in tofu spoilage, and Strain No. T1, T2 show 92% probability to be *Enterobacter amnigenus*, and 96% to be *Flavobacterium indologenes* according to the result of identifying strains by using Vitek system. Both strains had high viability at 35°C, pH 6.5. In the heat-resistance test of isolated strains, *Enterobacter amnigenus* T1 was treated for 2 mins, the number remained 56.3% of the initial number at 60°C, 37.8% at 70°C, 34.0% at 80°C and 22.2% at 90°C, and *Flavobacterium indologenes* T2 was treated for 2 mins, the number remained 74.8% of the initial number at 60°C, 65.7% at 70°C, 37.8% at 80°C and 9.3% at 90°C.

Key words □ Packed tofu, Growth characteristics, Heat-resistance, Spoilage bacteria, *Enterobacter amnigenus* T1, *Flavobacterium indologenes* T2

대두의 수용성 단백질을 추출 응고시킨 두부는 영양가와 소화율이 높으며, 대두단백질의 아미노산 조성은 동물성 단백질과 유사하여 곡류 위주의 식생활에서 부족되기 쉬운 필수 아미노산 함량이 높으나[1,2] 수분함량이 90%이고, pH는 약 6.0으로 세균이 증식하기 쉬운 기질이 되어 부패가 일어나기 쉽다. 두부의 균수가 $10^{5\sim6}$/g 정도까지 증가하면, pH는 약 5.5 이하로 떨어지고 맛이 변하여 먹을 수 없게 된다.[3] 보통 30°C에서 15~20시간 후 부패취가 나고 균수가 증가되나,[4,5] 온도가 낮아지면 크게 둔화되어[6,7] 두부의 저장성이 연장된다. 두부의 보존성은 주로 제품 중에 존재하는 세균의 종류와 수에 영향을 받으며,[8,9] 보존온도, 공기, 용수, 취급하는 사람의 손 등으로부터의 2차 오염뿐만 아니라 두부제조공정중의 미생물 오염과 증식에 많은 연관성을 갖는다고 알려졌으나 우리나라에서 제조된 포장두부의 부패에 관여하는 미생물에 대한 동정 및 생육특성에 관한 연구 보고는 거의 없는 실정이다.[10]

† Author to whom correspondence should be addressed.

따라서 본 연구에서는 포장두부를 대상으로 부패 세균을 분리 · 동정하고, 이들 분리세균에 대한 부패성을 검토하고, 부패 세균의 생육특성을 파악하여 두부 제조공정의 위생적 관리를 위한 기초자료로 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

부패균주의 분리

포장두부를 30°C에서 2일 정도 방치하면서 기포발생, 물의 탁도 변화와 부패취로 부패시점을 정하고, 부패균 분리원으로 하였다. 시료 1 g을 9 m*l* 멸균생리식염수로 단계적으로 희석한 다음 nutrient agar(Difco)에 접종한 후 30°C, 2일간 배양하여 균주를 분리하였다. 분리균주는 streak method에 의해 재분리하여 single colony를 얻었다.[10]

분리균주의 부패성은 100 m*l* Duran병에 121°C, 15분간 멸균한 두유액을 40 m*l*씩 분주한 후 냉각하여 준비하고, nutrient broth에 30°C, 48시간 전배양한 각 균주를 초기 균수가 약 10^3 CFU/m*l* 되도록 멸균두유액에 접종하여 30°C,

2일간 배양하면서 액즙 형태, 냄새 등의 관능검사로 확인하였다.[11]

선별균주의 동정

부패성이 확인된 2개균주를 선택하여 nutrient broth에서 30°C, 48시간 순수배양한 후 Gram 염색하여 현미경으로 관찰한 후 GNI용 Vitek card를 이용한 Vitek system(Vitek Jr.)을 통하여 생화학적 성질을 조사하였다.

선별균주의 생육특성 조사

선별균주의 생육특성은 멸균두유액에 전배양한 선별균주를 일정량씩 접종하고 정치배양하면서 배양시간, 배양온도(10, 20, 25, 30, 35, 40°C, 12 hrs), 초기 pH(5.0, 6.0, 6.5, 7.0, 8.0, 30°C, 12 hrs)에 따른 영향을 조사하였다.

선별균주의 내열성 검토

선별균주의 내열성은 멸균두유액에 선별균주를 초기균수가 $10^{8\sim9}$ CFU/m*l*되도록 접종하여 멸균시험관에 5 m*l*씩 넣고 60~90°C, 0.5~2분간 열처리하면서 처리온도와 시간에 따른 잔존균량을 측정하여 검토하였다.[12]

결과 및 고찰

부패균주 분리

포장두부를 30°C, 2일 정도 방치하면서 관능적으로 부패가 인정될 때를 두부의 부패시점으로 보고 이것을 부패균 분리원으로 이용하여, nutrient agar에 30°C, 2일간 평판배양한 후 streak method에 의해 재분리하여 single colony를 얻었다. 이중 대부분을 차지하고 있는 3개의 균주를 선별하였으나, 그 중 한 개의 균주는 생육속도가 매우 느려 나머지 2개의 균주를 분리, 선별하였다.

분리균주 2종의 부패성을 확인하기 위해 두부시료와 증류수를 동일 비율로 섞어 캡튜브에 15 m*l*씩 분주하고 121°C, 15분간 멸균 · 냉각하여 두부액을 준비하고, 분리한 각 균주를 nutrient broth에 30°C, 48시간 전배양한 후 상기 준비한 멸균두부액에 초기균수가 약 10^3 CFU/m*l*되도록 접종하여 30°C, 2일간 배양하면서 액즙의 형태와 냄새 등 관능검사로 부패성을 확인한 결과, 두 균주 모두 8시간 이후부터 경미한 부패취를 나타냄으로써, 두부의 부패원인이 되는 균주임을 알 수 있었다.

선별균주 동정

두부의 부패균으로 선별된 균주 Strain No. T1, T2를 Gram 염색하여 현미경으로 관찰한 결과, 두개의 균주 모두 Gram 음성 간균이었다. 그리고 Vitek system을 이용하여 생화학적 동정을 실시한 결과는 Table 1과 같았다. Strain No. T1, T2는 아미노산인 lysine, tryptophane 및 arginine을 분해하지 못하였고, Strain No. T1의 경우 당인 raffinose, sucrose, rhamnose, L-arabinose, glucose를 이용하였으며, Strain No. T2의 경우는 sucrose만을 이용하였다. 또한 Strain No. T1의 경우 glucose, lactose, maltose, mannitol, xylose로 부터 산을 생성하였으며, Strain No. T2는 glucose, maltose로 부터 산을 생성하였다. Polymycin B에 의해 Strain No. T1 생육이 저해되나 Strain No. T2는 저해되지 못하였고, esculin은 둘다 가수분해시키나 H_2S는 생성하지 않았다. 따라서 Strain

Table 1. Physicochemical characteristics of Strain No. T1, T2 on GNI Vitek card

Variables	Reactions	
	Strain No. T1	Strain No. T2
Growth control	+[1]	+
Decarboxylase base control		
Lysine	–[2]	–
Ornithine	+	–
Arginine	–	–
Carbohydrate utilization		
Raffinose	+	–
Sorbitol	–	–
Sucrose	+	+
Inositol	–	–
Adonitol	–	–
Rhamnose	+	–
L-Arabinose	+	–
Glucose	+	–
Growth at DP300	–	–
Acid production		
Glucose	+	+
Lactose	+	–
Maltose	+	+
Mannitol	+	–
Xylose	+	–
Acetamide utilization	–	–
Esculin hydrolysis	+	+
Plant Indican splitting	–	–
Urea degradation	–	–
Citrate utilization	+	–
Malonate utilization	+	–
Tryptophane utilization	–	–
Growth at *p*-coumaric	+	–
H_2S production	–	–
ONPG fermentation	+	–
Growth at polymycin B	–	+
Oxidase reaction	–	–

[1] +: Positive.
[2] –: Negative.

No. T1은 *Enterobacter amnigenus*일 확률이 92%이고, Strain No. T2은 *Flavobacterium indologenes*일 확률이 96%였다. 따라서 선별균주인 Strain No. T1, T2를 Enterobacter amnigenus T1과 *Flavobacterium indologenes* T2로 각각 명명하였다.

선별균주의 생육특성

선별균주의 생육곡선—선별균주인 *Enterobacter amnigenus* T1과 *Flavobacterium indologenes* T2를 멸균한 두유액에 초기균수 약 10^3 CFU/m*l*되게 각각 접종하여 30°C, 37 시간 동안 정치배양하면서 배양시간에 따른 생육곡선을 작성하였다. 그 결과, Fig. 1에서 보는 바와 같이 *Enterobacter amnigenus* T1은 *Flavobacterium indologenes* T2에 비해 생육이 빠른 것으로 관찰되었다.

배양온도의 영향—100 m*l* Duran병에 두유액(pH 6.5)을 40 m*l*씩 넣어 멸균한 후, 전 배양한 *Enterobacter amnigenus* T1과 *Flavobacterium indologenes* T2를 약 10^2 CFU/m*l* 접종하고 10~40°C에서 12시간 정치배양하며 생육에 대한 배양온도의 영향을 관찰하였다. 그 결과, Fig. 2에서 보는 바와 같이 *Enterobacter amnigenus* T1의 경우 35°C에서 가장 생육이 왕성하였고, 35°C에 비해 10°C에서는 약 56%, 20°C에서는 약 32%, 25°C에서는 약 18%의 생육이 저해되었다. *Flavobacterium indologenes* T2 또한 35°C에서 가장 왕성한 생육을 나타내었으며, 이에 비해 10°C에서는 약 57%, 20°C에서는 약 35%, 25°C에서는 약 25%의 생육저해효과를 보였다.

초기 pH의 영향—초기 pH를 각각 5.0~8.0으로 조정한

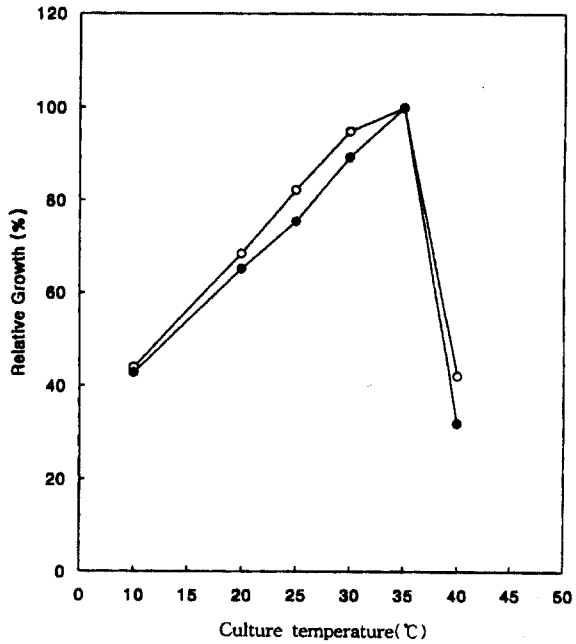

Fig. 2. Effects of temperature on the relative growth of *Enterobacter amnigenus* T1 and *Flavobacterium indologenes* T2 at 12 hrs.

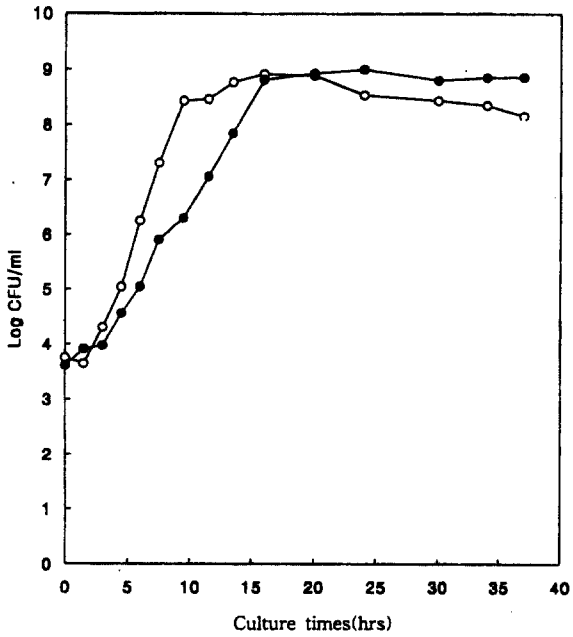

Fig. 1. Growth curves on *Enterobacter amnigenus* T1 and *Flavobacterium indologenes* T2 isolated from packed tofu.

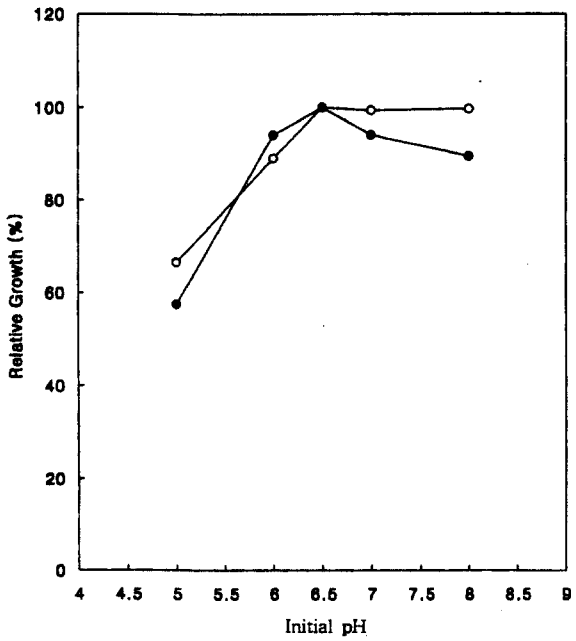

Fig. 3. Effects of pH on the relative growth of *Enterobacter amnigenus* T1 and *Flavobacterium indologenes* T2 at 12 hrs.

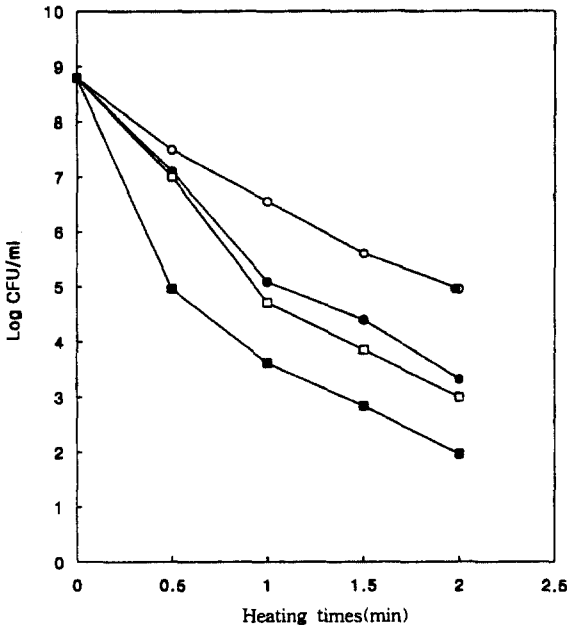

Fig. 4. Change on the thermal death of *Enterobacter amnigenus* T1 isolated from packed tofu.
-○- 60°C, -●- 70°C, -□- 80°C, -■- 90°C.

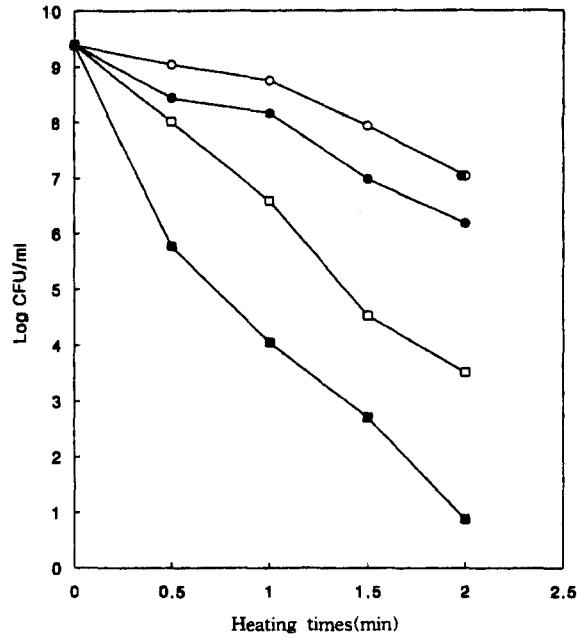

Fig. 5. Change on the thermal death of *Flavobacterium indologenes* T2 isolated from packed tofu.
-○- 60°C, -●- 70°C, -□- 80°C, -■- 90°C.

두유액에 초기균수를 약 10^2 CFU/ml되게 접종하여 30°C, 12시간 정치배양하여 *Enterobacter amnigenus* T1과 *Flavobacterium indologenes* T2의 생육에 대한 초기 pH의 영향을 관찰하였다. 그 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 *Enterobacter amnigenus* T1의 경우 초기 pH 6.5일 때는 다른 pH보다 생육이 왕성하였다. 초기 pH를 6.5로 조정하였을 때에 비해 초기 pH가 5.0일 때는 약 33%, 초기 pH 6.0일 때는 11%의 생육저해효과를 볼 수 있었다.

Flavobacterium indologenes T2의 경우 또한 초기 pH가 6.5일 때 생육이 가장 왕성하였다. 초기 pH를 5.0으로 조정했을 때는 초기 pH를 6.5로 조정하였을 때 보다 약 43%, pH 6.0일 때는 6%, pH 8.0에서는 11%의 생육저해효과를 볼 수 있었다.

선별균주의 내열성

선별균주인 *Enterobacter amnigenus* T1과 *Flavobacterium indologenes* T2의 내열성을 60~90°C, 0.5~2분간 열처리하면서 관찰하였다.

그 결과, *Enterobacter amnigenus* T1은 Fig. 4에서 보는 바와 같이 60°C에서 2분 처리하였을 경우 초기보다 56.3%, 70°C에서는 37.8%, 80°C에서는 34.0%, 90°C에서 처리했을 때는 22.2%의 균수가 잔존하였다.

또한 *Flavobacterium indologenes* T2 경우는 Fig. 5에서 보는 바와 같이 60°C에서 2분 처리하였을 때 74.8%, 70°C에서는 65.7%, 80°C에서는 37.3%, 90°C에서 처리했을 경우는 9.3%의 균수가 잔존하였다.

국문요약

본 연구는 포장두부에서 부패 세균을 분리 · 동정하고, 부패 균주의 생육특성과 내열성을 조사하여 두부 제조 공정의 위생관리를 위한 기초자료로 제시할 목적으로 수행되었다. 포장두부의 부패에 관여하는 세균을 분리하여 Vitek system을 이용하여 동정한 결과, Strain No. T1은 *Enterobacter amnigenus*일 확률이 92%, Strain No. T2는 *Flavobaterium indologenes*일 확률이 96%이었다. 이들 균주는 35°C와 pH 6.5일 때 가장 생육이 왕성하였다. *Enterobacter amnigenus* T1의 내열성을 검토한 결과, 60°C에서 2분 처리하였을 경우 초기보다 56.3%,

70°C에서는 37.8%, 80°C에서는 34.0%, 90°C에서 처리했을 때는 22.2%가 잔존하였고, *Flavobacterium indologenes* T2 경우는 60°C에서 2분동안 처리하였을 때 74.8%, 70°C에서는 65.7%, 80°C에서는 37.3%, 90°C에서 처리했을 경우는 9.3%가 잔존하였다.

참고문헌

1. Miller, C.D., Denning, H. and Bauer, A.: Relation of nutrients in commercially prepared soybean curd, *Food Res.*, **17**, 261 (1952).
2. 이경원: 국민영양과 대두의 수입정책, 식품과학, **15**, 40 (1982) .
3. 하덕모: 최신식품미생물학, 신광출판사 (1995).
4. 송석훈, 장건형: 두부의 shelf-life 연장에 관한 연구(제2보), 기술연구보고(제3집), 육군기술연구소, p. 5 (1964).
5. 송석훈, 장건형: 두부의 shelf-life 연장에 관한 연구(제2보), 기술연구보고(제4집), 육군기술연구소, p. 21 (1965).
6. 이명환, 이혜원: 두부의 물성 및 보존에 관한 연구, 서울여자대학 논문집 제 13호, p. 437 (1984).
7. 北村廣志, 佐佐木裕: 素材豆腐の 開發と應用, 食品と開發, **26**(2), 24 (1991).
8. 白川武志: 豆腐の粘性 敗について, 日本食品工業學會誌, **32**(1), 1-6 (1985).
9. Antonieta, G.A. and Marth, E.H.: Growth and activity of lactic-acid bacteria in soymilk, *J. Milk and Food Technol.*, **34**(2), 63-68 (1971).
10. 신동화, 김문숙, 배경숙, 고영희: 두부 부패에 관여하는 주요 미생물 동정, 한국식품과학회지, **24**(1), 29-30 (1992).
11. 안은숙, 김문숙, 신동화: 식용 식물로부터 얻은 추출물의 두부, 어묵, 막걸리 변질균에 대한 항균성 검색, 한국식품과학회지, **26**(6), 733-739 (1994).
12. 김창남: Surimi-Based Imitation Crab의 위해미생물 분석 및 Serratia fonticola CM1의 생육특성 연구, 연세대학교 박사학위 논문 (1996).