

Article

프로바이오틱 유산균의 바이오제닉 아민 분해능에 영향을 미치는 배양 조건

임은서*

동명대학교 식품영양학과

Incubation conditions affecting biogenic amines degradation of probiotic lactic acid bacteria

Eun-Seo Lim*

Department of Food Science & Nutrition, Tongmyong University, Busan 48520, Republic of Korea

(Received September 11, 2017; Revised November 1, 2017; Accepted November 1, 2017)

The purpose of this study was to investigate the inhibitory effect of antibacterial substances produced by probiotic lactic acid bacteria (LAB) against biogenic amines-producing bacteria and the influence of culture conditions on the antibacterial activity of bacteriocin and organic acid. The bacteriocin solutions of *Lactobacillus plantarum* FIL20 (64 AU/ml) and *Lactobacillus paracasei* FIL31 (128 AU/ml) showed strong antibacterial activity against *Serratia marcescens* CIH09 and *Aeromonas hydrophilia* RIH28, respectively. And the lactic acid contents in the cell-free culture supernatants (CFCS) obtained from FIL20 and FIL31 strains were 107.3 ± 2.7 mM and 129.5 ± 4.6 mM, respectively. Therefore, the bacteriocin solution (200 AU/ml) and the CFCS (200 μ l/ml) produced by *L. plantarum* FIL20 and *L. paracasei* FIL31 significantly ($P < 0.05$) decreased the bacterial numbers and histamine and tyramine production ability of *S. marcescens* CIH09 and *A. hydrophilia* RIH28. The amounts of histamine and tyramine produced by the CIH09 strain under conditions of low initial pH (5.0) and incubation temperature (15°C) was significantly reduced by treatment with bacteriocin solution and CFCS obtained from *L. plantarum* FIL20. In addition, the bacterial counts and biogenic amines contents of CIH09 strain were significantly decreased ($P < 0.05$) when sodium chloride (5%) or potassium nitrite (200 mg/g) were mixed with the antibacterial substances of *L. plantarum* FIL20. Consequently, the bacteriocin and organic

acid solution of *L. plantarum* FIL20 and *L. paracasei* FIL31 can be used as a biological preservation to effectively control the production of biogenic amines by the application of hurdle technology.

Keywords: bacteriocin, biogenic amine, lactic acid bacteria, probiotic

수산물 내에 존재하는 다양한 미생물은 주성분인 단백질을 구성하는 아미노산을 분해하여 바이오제닉 아민(biogenic amine)을 생성함으로써 이로 인한 화학적 위해 발생 우려가 크다. 바이오제닉 아민은 미생물의 아미노산 탈탄산반응 혹은 아미노기전달효소에 의한 알데히드 및 케톤의 아미노기전이반응에 의해 주로 생성되는 저분자 유기 질소 성분이다 (Stadnik and Dolatowski, 2010). 가장 대표적인 바이오제닉 아민인 히스타민(histamine)은 히스티딘(histidine), 티라민(tyramine)은 티로신(tyrosine), 트립타민(tryptamine)은 트립토판(tryptophane), 푸트레신(putrescine)은 글루타민(glutamine) 아르기닌(arginine) 및 아그마틴(agmatine), 카다베린(cadaverine)은 라이신(lysine)으로부터 생성된다(Halász *et al.*, 1994). 따라서 식품 내에 아미노산 탈탄산 효소를 생산하는 미생물이 존재하고 이들이 증식하기에 최적의 조건이 갖춰지게 되면 탈탄산반응 효소의 활성이 높아져 바이오제닉 아민 축적량이 증가하게 된다.

정상적인 상태에서는 바이오제닉 아민 섭취 즉시 아민 산

*For correspondence. E-mail: limsm020@tu.ac.kr;
Tel.: +82-51-629-1714; Fax: +82-51-629-1709

화 효소(amine oxidase)의 작용에 의해 무독화될 수 있으나, 이들 분해 효소의 활성이 낮거나, 바이오제닉 아민의 함량이 지나치게 높은 식품을 섭취하게 되면 심각한 질병을 초래하게 된다(Ladero *et al.*, 2010). 바이오제닉 아민은 열에 매우 안정하여 일단 생성된 후에는 가열, 훈연, 냉동 등의 처리에 의해서도 쉽게 파괴되지 않는다(Becker *et al.*, 2001). 바이오제닉 아민에 대한 감수성은 사람에 따라 상이한데 특히 히스타민 함량 500~1,000 mg/kg 이상이면 건강을 위협할 수 있는 정도의 양이다(Ten Brink *et al.*, 1990). 고농도의 히스타민은 안면 홍조, 혀의 마비, 작열감, 금속맛, 두통, 두드러기, 심계항진, 편두통, 호흡곤란, 천식 및 연하곤란 등을 유발하는 “고등어중독(scombroid fish poisoning)” 증상을 동반하므로 수산물과 같은 유해 아민 함량이 높은 식품의 가공 및 저장 과정 중 저감화를 위한 공정이 필요하다(Biji *et al.*, 2016).

바이오제닉 아민은 미생물의 효소 작용으로부터 기인하므로 식품의 저장 온도, pH 및 수분 활성도 저하, 식염 농도 증가, 가스치환이나 진공 포장을 통해 미생물의 증식 억제 및 유도기 연장을 통해 탈탄산 효소 활성을 저해시킴으로써 결국 바이오제닉 아민의 축적량을 감소시킬 수 있다고 보고되고 있다(Suzzi and Gardini, 2003). 한편, 터키식 발효 소시지 제조 시 탈탄산 효소 생성균의 증식을 억제하기 위해 질산염이나 아질산염과 같은 화학 합성 첨가물을 이용할 경우 티라민과 카다베린과 같은 바이오제닉 아민 생성량을 유의하게 감소시킬 수 있었으며(Genççelep *et al.*, 2008), 소르빈산과 안식향산염과 같은 보존제를 정향과 혼합 처리한 경우에도 어류에서 분리된 아민 생성균을 효과적으로 제어할 수 있었다(Wendakoon and Sakaguchi, 1993). 하지만 화학합성품은 돌연변이, 발암 및 급만성 중독 등 독성 발생 우려가 있으므로 최근에는 이를 대체할 수 있는 천연물 탐색에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 락토오스(lactose), 프락토오스(fructose), 글루코오스(glucose)와 같은 당류, 유계놀(eugenol), 카르바크롤(carvacrol)와 같은 정유, 정향, 커민(cumin), 스페어민트(spearmint) 오일, 생강, 마늘, 양파, 고추, 계피 및 녹차 추출물 등의 천연물질이 발효식품 내 바이오제닉 아민 생성을 억제하는 것으로 확인된 바 있다(Gardini *et al.*, 2016).

한편, *Brevibacterium linens*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* 등은 바이오제닉 아민을 무독화시키는 아민 산화 효소를 생산하는 미생물로서 발효식품에 이용할 경우 화학적 위해 요소를 제거하는데 효과적인 것으로 보고된 바 있다(Gardini *et al.*, 2016). 게다가 *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Oenococcus* 속과 같은 유산균도 아민 산화 효소를 생산하는 것으로 알려져 있다(Garcia-Ruiz *et al.*, 2011). 인사일드(ensiled)

생선 슬러리(slurry) 내에서 *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sakei* 등의 아민 산화 효소 활성이 검출되었고, 히스타민과 티라민 분해능을 가진 *L. casei*는 치즈 내 바이오제닉 아민의 축적을 억제하였다(Gardini *et al.*, 2016). 한편, 유산균이 생산한 항균물질인 유기산과 박테리오신 등은 아미노산의 탈탄산화를 유도하는 세균의 증식을 억제하여 결국 바이오제닉 아민의 생성을 감소시키는 것으로 알려져 있다(Zhang *et al.*, 2013).

따라서 본 연구의 목적은 다양한 기능성으로 인하여 숙주의 건강을 이롭게 하는 프로바이오틱 유산균이 생산한 항균물질에 의한 바이오제닉 아민 생성균의 제어 효과와 박테리오신 및 유기산의 항균 활성에 영향을 미치는 배양 조건을 조사하였다.

재료 및 방법

사용 균주

전보(Lim and Lee, 2016)의 연구 결과 인공 소화액에 대한 저항성과 장관 상피세포(HT-29 cell)에 대한 부착능이 강하고 항생제에 대해 강한 내성을 나타내어 프로바이오틱 균주로서의 기준을 충족하고 히스타민을 생산하지 않는 것으로 확인된 *L. plantarum* FIL20, *Lactobacillus paracasei* FIL31 및 *L. sakei* PIL52 유산균을 실험에 사용하였다. 이들은 *Lactobacilli* MRS broth (BD, Difco Co.)에 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후 얻은 배양액은 MRS agar 평판배지 상에서 순수분리 배양한 다음 MRS agar 사면배지에 계대 배양하였다. 한편, 이들 유산균으로부터 생산된 박테리오신에 의해 히스타민 생성량이 감소된 히스타민 생성균 *Enterobacter aerogenes* CIH05, *Serratia marcescens* CIH09, *Enterococcus faecalis* FIH11, *Pediococcus halophilus* FIH15, *Lactobacillus sakei* PIH16, *Enterococcus faecium* PIH19, *Leuconostoc mesenteroides* RIH25 및 *Aeromonas hydrophilia* RIH28은 생선 내장으로부터 분리되었다(Lim and Lee, 2016). 히스타민 생성균은 Brain Heart Infusion (BHI) broth (Difco)에 접종하여 35°C에서 24시간 배양한 후 BHI agar 평판배지에서 순수분리 배양한 다음 BHI agar 사면배지에 계대 배양하였다.

티라민 생성능 확인

티라민 생성능은 Toy 등(2015)의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 즉, 프로바이오틱 유산균과 히스타민 생성균은 decarboxylase broth 500 ml 중 L-tyrosine (Sigma-Aldrich)

4.01 g과 pyridoxal HCl (Sigma-Aldrich) 2.5 mg을 첨가하여 제조한 액체배지(pH 5.3)에 접종하고 35°C에서 8시간 동안 5회 전 배양하였다. 그런 다음 실험 균주의 전 배양액(50 µl)과 티로신(2%, w/v)이 첨가된 decarboxylase broth (100 µl)를 microtiter plate의 well에 각각 접종한 후 35°C에서 72시간 동안 혐기적인 조건(Anoxomat system, MART Co.) 하에서 배양한 다음 배지의 색이 자색으로 변한 경우를 양성균으로 판정하였다. 생선 내장으로부터 분리된 실험 균주 중 바이오제닉 아민을 생성하지 않는 프로바이오틱 유산균과 히스타민 및 티라민을 모두 생성하는 균주를 최종 선발하였다.

프로바이오틱 유산균의 항균물질 함량 측정

히스타민 및 티로신을 모두 생산하는 균주를 대상으로 바이오제닉 아민을 생산하지 않는 프로바이오틱 유산균의 박테리옌 활성을 측정하였다. 유산균은 MRS broth에 접종하여 37°C에서 24시간 배양하여 얻은 배양액 내 세포를 제거하기 위해 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C)하여 배양 상등액을 모아 1 N NaOH를 이용하여 pH 6.5로 맞추고 catalase (1 mg/ml, Sigma-Aldrich)를 처리하여 유산과 과산화수소의 영향을 배제하였다. 배양 상등액에 황산암모늄(50%, w/v)을 첨가한 후 4°C에서 overnight 동안 교반하면서 단백질을 침전시켜 원심분리(12,000 × g, 30분, 4°C)를 통해 침전물만을 회수하였다. 이를 20 mM phosphate buffer saline (PBS, pH 6.5)에 현탁시킨 다음 4°C에서 24시간 동안 투석(투석막 molecular weight cut-off 1,000 Da, Spectrum Medical Industries, Inc.) 시킨 것을 조 박테리옌 용액으로 사용하였다. 박테리옌 용액의 항균 활성은 히스타민과 티로신을 모두 생산하는 균주를 대상으로 microtiter plate method (Hole *et al.*, 1991)으로 측정하였다. 바이오제닉 아민을 생산하는 균주는 BHI broth에 접종하여 35°C에서 24시간 배양한 후 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C)하여 모은 세포를 PBS (pH 7.0)로 2회 세척하고 1.0 × 10⁵ CFU/ml로 균수를 조정된 다음 BHI broth가 분주된 plate (Falcon) well에 접종하였다. 여기에 조 박테리옌 용액을 순차적으로 2배씩 희석하여 첨가한 다음 35°C에서 24시간 배양한 후 microplate reader (BioTek, Inc.)를 이용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 박테리옌 용액 대신 PBS (pH 7.0)을 처리한 대조구 혼탁도의 약 50%를 나타내는 최대 희석배수의 역수를 박테리옌 활성(arbitrary units)으로 나타내었다.

박테리옌 용액 제조 시와 동일한 조건에서 얻어진 배양 상등액에 HClO₄ (1 M)를 첨가하여 단백질을 침전시키고 난 다음 0.22 µm membrane filter (Millipore Corp.)로 여과시켜 high-pressure liquid chromatography (HPLC, Shimadzu)로 유

산 및 초산의 함량을 측정하였다. 이때 Aminex HPX-87H (300 × 7.8 mm: Bio-Rad) 컬럼의 온도는 35°C로 유지하였고, H₂SO₄ (5 mM)를 이동상으로 하여 유속 0.5 ml/min 하에서 refractive index (GBC Scientific Equipment Pty Ltd.) 검출기로 파장 220 nm에서 분석하였다. 표준용액의 검량곡선으로부터 유산 및 초산의 함량을 정량하였다(Sgouras *et al.*, 2004).

유산균이 생산한 항균물질이 바이오제닉 아민 생성균의 증식에 미치는 영향

선발된 바이오제닉 아민 생성균의 증식에 대하여 유산균이 생산한 박테리옌 및 유기산의 영향을 조사하기 위해 바이오제닉 아민 생성균은 Trypticase Soy Broth (TSB)에 접종하여 35°C에서 24시간 배양한 다음 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C)하여 모은 세포를 PBS (pH 7.0)로 2회 세척하였다. 균수를 1.0 × 10⁵ CFU/ml로 조정하여 TSB에 접종하고 프로바이오틱 유산균이 생산한 박테리옌(50, 100, 200 AU/ml) 및 배양 상등액(50, 100, 200 µl/ml)을 각각 첨가하여 35°C에서 24시간 동안 호기적인 조건 하에서 배양하였다. 그런 다음 배양액을 무균적으로 채취하여 적당히 희석한 후 Plate Count Agar (PCA) 상에서 표준한천평판배양법에 따라 잔존하는 생균수를 측정하였다.

유산균이 생산한 항균물질이 바이오제닉 아민 생성량에 미치는 영향

유산균의 항균물질이 바이오제닉 아민 생성량에 미치는 영향은 Shakila 등(1996)의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 즉, TSB에 0.0005% pyridoxal HCl과 0.5% L-histidine hydrochloride monohydrate (Sigma-Aldrich) 및 L-tyrosine dihydrochloride monohydrate (Sigma-Aldrich)를 첨가한 배지(BA-TSB)에 바이오제닉 아민 생성균을 각각 접종한 다음 35°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양액 1 ml를 채취하여 박테리옌 용액(50, 100, 200 AU/ml) 혹은 배양 상등액(50, 100, 200 µl/ml)이 첨가된 BA-TSB (10 ml)에 접종한 다음 35°C에서 24시간 배양하였다. 배양액은 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C)하고 얻은 상등액을 0.22 µm membrane filter로 여과한 다음 바이오제닉 아민 함량을 측정하였다.

Eerola 등(1993)과 Mah 등(2003)의 방법을 일부 변형하여 배양액 내에 잔존하는 바이오제닉 아민의 함량을 HPLC로 측정하였다. 즉, 바이오제닉 아민 혼합 표준용액(histamine dihydrochloride, tyramine hydrochloride) 500 mg/L 및 세포 배양액 1 ml에 0.4 M perchloric acid (Merck) 9 ml를 가하고 진탕 혼합한 후 원심분리(3,000 × g, 10분)하여 얻은 상등액은 Whatman

paper No. 1로 여과하였다. 여과액(1 ml)에 2 N sodium hydroxide (200 µl)와 sodium bicarbonate 포화 용액(300 µl)을 가하고 acetone에 용해 시킨 dansyl chloride (Sigma-Aldrich, 10 mg/ml) 2 ml를 첨가하여 40°C에서 약 45분간 배양하고 난 다음 잔존하는 dansyl chloride는 25% ammonium hydroxide (100 µl)를 가하여 제거하였다. 그런 다음 상온에서 약 30분간 방치한 후 acetonitrile을 가하여 총량 5 ml로 맞춰 원심분리 (2,500 × g, 5분)하고 상등액을 0.22 µm membrane filter로 여과하여 dansyl 유도체를 준비하였다. 바이오제닉 아민 함량 분석을 위해 Nova-Pak C₁₈ 컬럼 (150 × 3.9 mm, Waters)을 사용하였고, 이동상 ammonium acetate (0.1 M, solvent A)와 acetonitrile (solvent B)의 유속은 1 ml/min, 시료는 20 µl로 주입하였으며 254 nm에서 흡광도를 측정하였다.

유산균이 생산한 향균물질의 바이오제닉 아민 생성 억제능에 영향을 미치는 배양 조건

유산균 향균물질의 바이오제닉 아민 생성 억제능에 대한 pH, 배양온도, 아질산 칼륨 및 식염의 영향을 조사하였다. BA-TSB에 바이오제닉 아민 생성균을 각각 접종한 다음 35°C에서 24시간 동안 배양하여 전 배양액을 준비하였다. 그런 다음 BA-TSB의 pH를 5.0, 6.0 및 7.0으로 조정한다 다음 박테리오신 용액(100 AU/ml) 혹은 배양 상등액(100 µl/ml)을 첨가한 후 전 배양액(1.0 × 10⁵ CFU/ml, 1%, v/v)을 접종하고 나서 35°C에서 24시간 배양하였다. 한편, BA-TSB에 박테리오신 용액 (100 AU/ml) 혹은 배양 상등액(100 µl/ml)을 첨가한 후 전 배양액(1%, v/v)을 접종하고 나서 15, 25 및 45°C에서 24시간 배양하였다. 또한 BA-TSB에 NaCl을 1.0, 2.0 및 5.0% (w/v)의 농도로 가한 다음 박테리오신 용액(100 AU/ml) 혹은 배양 상등액(100 µl/ml)을 첨가한 후 전 배양액(1%, v/v)을 접종하고 나서 35°C에서 24시간 배양하였다. 게다가 BA-TSB에 아질산 칼륨을 50, 100 및 200 µg/g의 농도로 가한 다음 박테리오신 용액(100 AU/ml) 혹은 배양 상등액(100 µl/ml)을 첨가한 후 전 배양액(1%, v/v)을 접종하고 나서 35°C에서 24시간 배양하였다. 대조구는 BA-TSB에 박테리오신 용액(100 AU/ml) 혹은

배양 상등액(100 µl/ml)만을 첨가한 후 전 배양액(1%, v/v)을 접종하고 나서 35°C에서 24시간 배양하였다. 각각의 배지로부터 얻은 배양액은 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C)한 다음 상등액을 0.22 µm membrane filter로 여과한 후 앞서 언급한 방법에 따라 바이오제닉 아민 함량과 표준화된천평판배양법에 따라 생균수를 측정하였다.

통계처리

실험 항목별로 각각 3회씩 실험하여 얻은 결과값은 평균 ± 표준편차로 나타내었다. SPSS 프로그램(Ver. 12.0)의 Student's *t*-test를 통해 실험구와 대조구간에 유의적인 차이($P < 0.05$)를 확인하였다.

결과 및 고찰

생선 내장으로부터 분리된 균주의 바이오제닉 아민 생성능

전보(Lim and Lee, 2016)에서 조기, 가자미, 명태 및 우럭 내장으로부터 분리된 히스타민 생성균(*M. morganii* CIH03, *E. aerogenes* CIH05, *S. marcescens* CIH09, *C. freundii* PIH21 및 *A. hydrophilia* RIH28)과 프로바이오틱 유산균(*Pediococcus pentosaceus* CIL08, *L. plantarum* FIL20, *L. paracasei* FIL31, *L. sakei* PIL52, *Leuconostoc mesenteroides* RIL60)의 티로신 생성능을 조사한 결과는 Table 1과 같다. 히스타민 생성균 중에서 *E. aerogenes* CIH05는 티라민을 생성하지 않은 반면 *M. morganii* CIH03, *S. marcescens* CIH09, *C. freundii* PIH21 및 *A. hydrophilia* RIH28은 티라민을 생성하지 않았다. 프로바이오틱 유산균 중에서 히스타민을 생성하지 않은 *P. pentosaceus* CIL08과 *L. mesenteroides* RIL60은 티라민을 생성한 반면 *L. plantarum* FIL20, *L. paracasei* FIL31 및 *L. sakei* PIL52는 티라민을 생성하지 않았다. 이상의 결과, 균종에 따라 생성하는 바이오제닉 아민의 종류가 다르고 유산균 중에서도 일부는 바이오제닉 아민을 생성하는 것을 확인하였다. 이들 실험 균주 중에서 히스타민을 생성하는 CIH03, CIH09, PIH21 및 RIH28

Table 1. Histamine and tyramine production ability of the strains isolated from fish intestine

Histamine-producing strain	Histamine	Tyramine	Probiotic LAB	Histamine	Tyramine
<i>M. morganii</i> CIH03	+	+	<i>P. pentosaceus</i> CIL08	-	+
<i>E. aerogenes</i> CIH05	+	-	<i>L. plantarum</i> FIL20	-	-
<i>S. marcescens</i> CIH09	+	+	<i>L. paracasei</i> FIL31	-	-
<i>C. freundii</i> PIH21	+	+	<i>L. sakei</i> PIL52	-	-
<i>A. hydrophilia</i> RIH28	+	+	<i>L. mesenteroides</i> RIL60	-	+

균주와 바이오제닉 아민을 생성하지 않은 FIL20, FIL31 및 PIL52 유산균을 최종 선발하였다.

어류로부터 유래하는 세균 중에서 바이오제닉 아민을 생산하는 세균으로는 *M. morgani*, *Klebsiella pneumoniae*, *Hafnia alvei*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *E. aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia fonticola*, *Serratia liquefaciens*, *Raoultella planticola*, *Raoultella ornithinolytica*, *Providencia stuartii* 및 *C. freundii* 등이 있다고 알려져 있다. 뿐만 아니라 장내 세균, *Clostridium* 속, *Vibrio alginolyticus*, *Acinetobacter lowfii*, *Plesiomonas shigelloides*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas* 속 및 *Photobacterium* 속 등도 히스타민 생성균으로 보고된 바 있는데 이는 본 연구 결과에서 확인된 세균과 부분적으로 일치하였다(Visciano *et al.*, 2012). 다양한 식품 내에 존재하는 아민의 형태는 미생물이 생산하는 탈탄산 효소의 활성에 따라 결정되는데 수산 가공품 내에서 바이오제닉 아민을 생성하는 세균은 *Enterobacteriaceae*, *Micrococcaceae* 및 *Lactobacilli* 등으로 알려져 있어 본 연구 결과에서 분리된 균도 이에 속하는 것으로 확인되었다. *E. cloacae* 및 *Pantoea agglomerans* 등은 푸트레신과 카다베린 등을 주로 생성하고 염장 및 발효 멸치로부터 분리된 *Paenibacillus tyramigenes* 등은 티라민 생성균으로 보고된 바 있다. 게다가 어간장에서 분리된 *Micrococcus* 속과 *Staphylococcus* 속은 히스타민, 푸트레신 및 카다베린을 생산하는 탈탄산 효소를 생산하는 것으로 밝혀졌으며, 수산 가공품 내에서 바이오제닉 아민을 생산하는 *Tetragenococcus muriaticus*나 *Tetragenococcus halophilus*와 같은 내염성 유산균도 분리되었다(Zaman *et al.*, 2009). 또한 생선 사일리지(silage)로부터 분리된 *Lactobacillus* 속, *L. sakei* 및 *L. mesenteroides* 등도 히스타민을 생산하는 것으로 보고된 바 있는데(Zaman *et al.*, 2009) 이와는 달리 본 연구에서 분리된 *L. sakei* PIL52 및 *L. mesenteroides* RIL60은 히스타민을 생성하지 않았다.

한편, *Lactococcus* 속과 *Streptococcus* 속은 *A. hydrophila*, *E. faecalis*, *Escherichia coli*, *K. pneumoniae* 및 *Pseudomonas aeruginosa* 등이 생산한 히스타민 및 티라민의 축적량을 유의하게 증가시키는 것으로 알려져 있다(Kuley and Özogul, 2011). 대개는 발효식품 제조에 중요한 역할을 하는 유산균도 히스타민, 카다베린, 푸트레신을 생산하는 것으로 알려져 있고 가장 흔하게 티라민을 생성하는 균주로 보고되었고 유산균의 티로신 탈탄산 효소는 페닐에틸아민(2-phenylamine)을 생산하는 페닐알라닌도 탈탄산화시킨다. *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus fructivorans*, *Pediococcus parvulus* 및 *Lactobacillus brevis* 등은 와인 내에 유해 아민을 축적하는 것으로 확인되었고, 치즈, 쇠고기, 소시지 등으로부터 분리된 *Lactobacillus curvatus*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus* 및 *L. paracsei* 등도 아미노산의 탈탄산화를 유도하여 과량의 바이오제닉 아민을 생산하는 것으로 알려져 바 있다(Gardini *et al.*, 2016). 반면, Nieto-Arribas 등(2009)은 Manchego 치즈로부터 분리된 *L. plantarum*과 *L. paracsei* subsp. *paracsei*는 바이오제닉 아민을 생성하지 않는 것으로 확인되어 치즈 내 유해 아민의 함량을 낮추는데 효과적이었다고 보고하였다. 프로바이오틱 유산균 *L. casei* TISTR389 및 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* TISTR895는 히스타민 혹은 티라민을 생성한 반면 *L. acidophilus*, *L. lactis* subsp. *lactis* 및 *L. plantarum* 등은 바이오제닉 아민을 생성하지 않았기 때문에 여러 연구 결과 바이오제닉 아민 생성능은 균종 보다는 균주에 따라 상이한 것으로 확인되었다(Priyadarshani and Rakshit, 2011).

프로바이오틱 유산균의 항균물질 생성능

최종 선발된 프로바이오틱 유산균이 생산한 유기산의 함량 및 바이오제닉 아민 생성균에 대한 박테리오신의 활성을 측정 한 결과는 Table 2와 같다. *M. morgani* CIH03, *S. marcescens*

Table 2. Content of antibacterial substances produced by probiotic lactic acid bacteria

Antibacterial substances content		Probiotic LAB		
		<i>L. plantarum</i> FIL20	<i>L. paracsei</i> FIL31	<i>L. sakei</i> PIL52
Bacteriocin activity (AU/ml)	<i>M. morgani</i> CIH03	ND	ND	ND
	<i>S. marcescens</i> CIH09	64	ND	ND
	<i>C. freundii</i> PIH21	ND	ND	ND
	<i>A. hydrophila</i> RIH28	ND	128	ND
Organic acid (mM)	Acetic acid	ND	ND	ND
	Lactic acid	107.3 ± 2.7	129.5 ± 4.6	134.5 ± 3.3

ND, not detected.

CIH09, *C. freundii* PIH21 및 *A. hydrophilia* RIH28에 대해 *L. sakei* PIL52로부터 제조한 박테리오신 용액의 항균 활성은 나타나지 않았다. 하지만 *L. plantarum* FIL20의 박테리오신 용액은 *S. marcescens* CIH09에 대해 64 AU/ml의 항균 활성을 나타내었고, *L. paracasei* FIL31의 박테리오신 용액은 *A. hydrophilia* RIH28에 대해 128 AU/ml의 항균 활성을 나타내었다. 한편 *L. plantarum* FIL20, *L. paracasei* FIL31 및 *L. sakei* PIL52 균주는 초산을 생성하지 않았고 유산만을 생성하였으며, 생성량은 각각 107.3 ± 2.7 mM, 129.5 ± 4.6 mM 및 134.5 ± 3.3 mM로 나타나 *L. plantarum*은 *L. paracasei*와 *L. sakei*에 비해 다소 적은 양의 유산을 생성하였다. 이들 유산균들은 조건부 이상발효 유산균(facultatively heterofermentative lactic acid bacteria)으로서 혐기적 환경 하에서는 당을 대사해 주요 산물인 유산을 생성하나 특정 조건이나 배양 성분 존재 하에서는 유산 이외에 이산화탄소 및 기타 대사 산물을 생성하는 균종이다.

어류 및 그 가공품은 다양한 영양성분으로 구성되어 부패균과 식중독균의 증식을 위한 이상적인 환경으로써 미생물학적 및 생화학적 분해로 인하여 쉽게 부패되므로 염장, 훈연, 혹은 통조림 형태로 가공하거나 화학합성 첨가물을 사용하여 저장성을 연장시키고 있으나, 이러한 방법들은 식품의 영양학적 가치 및 풍미 저하를 비롯하여 독성 등 부작용 발생 우려가 크기 때문에 소비자들은 최소한의 가공 공정을 통해 제조한 위생학적으로 안전하고 건전한 식품을 선호하고 있다. 이러한 요구에 맞춰 유산균이 생산하는 항균물질을 생물학적 보존제로 이용함으로써 가공식품의 저장성을 부여하고 화학합성품의 사용에 따른 돌연변이 혹은 발암 발생 위험을 최소화할 수 있다는 연구 결과에 따라 유산균은 안전한 식품보존제 및 허들테크놀로지(hurdle technology)에도 이용되고 있다. 생물학적 보존제로 가장 각광받고 있는 유산균은 유기산, 디아세틸(diacetyl), 아세토인(acetoin), 과산화수소, 루테린(reuterin), 루테리클리클린(reutericyclin), 항진균성 펩타이드 및 박테리오신 등 다양한 항균물질을 생산하기 때문에 식품 내 병원성 식중독균이나 부패균 제어에 효과적인 것으로 알려져 있다(Ghanbari et al., 2013).

화학보존제의 대체제로 사용되는 유산균은 가공품의 관능학적 품질에 악영향을 주지 않고 부패균을 제어하여 식품의 위생학적 기준을 충족시킬 수 있으며, generally recognized as safe (GRAS)에 등재된 유산균의 항균 물질은 수산 가공품의 저장 기간을 연장시키는데 효과적인 유용한 물질로 알려져 있다. 유산균의 항균 활성은 영양분을 두고 유해균과 경쟁하거나 항균 활성을 나타내는 대사산물의 생산을 통해 부패균과 식중독균의 증식을 억제한다(Ghanbari et al., 2013). 유산균이 생산

한 가장 대표적인 항균물질인 유기산의 비헤리 형태의 분자가 세포막을 통과하여 세포 내 pH를 감소시켜 세포막 전위를 방해하고 대사 기능을 파괴시켜 항균 활성을 나타낸다(Kashket, 1987). 한편, 박테리오신은 리보솜에 의해 생합성되는 단백질성 항균물질로서 대사 반응에 필수적인 효소 활성을 저해하거나 세포막을 파괴하여 양성자 구동력을 약화시키거나 세포 내 유용 물질 유출을 통해 항균작용을 나타낸다(Veskovič Moračanin et al., 2014). 유산균의 박테리오신은 *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* 및 *Clostridium* 속 등 주요 병원성 식중독균의 증식 억제에 효과적일 뿐만 아니라 히스타민을 비롯한 각종 바이오제닉 아민을 생산하는 미생물의 증식 및 탈탄산 효소 활성을 억제한다고(Tabanelli et al., 2014) 보고된 바 있으며 본 연구 결과에서도 일부 유산균이 생산한 박테리오신은 바이오제닉 아민 생성균에 대해 항균 활성을 나타내었다. 한편, *Leuconostoc* 속과 *Pediococcus* 속의 배양 상등액은 *S. aureus*, *Shigella flexneri*, *Salmonella* 속 및 *E. coli* O157:H7의 증식을 억제한 저해환을 형성하는 등(Coolborn, 2005) 유산균의 배양 상등액 내에 존재하는 유산 및 초산과 같은 약산은 유해균에 대해 광범위한 항균활성을 나타내는 중요한 화합물이다. 특히 비헤리형 유산은 헤리형 보다 약 10~600배 더 강력한 항균활성을 나타낸다고 알려져 있으며(Toy et al., 2015), 본 연구의 일부 유산균이 생산한 배양 상등액에도 많은 양의 유산이 함유되어 있었으므로 이로 인해 바이오제닉 아민 생성균에 대한 증식 억제 효과를 얻을 수 있는 것으로 추정된다.

프로바이오틱 유산균이 생산한 항균물질의 항균력

프로바이오틱 유산균로부터 제조한 박테리오신 용액과 배양 상등액의 바이오제닉 아민 생성균에 대한 항균 활성 및 유해 아민 생성량에 미치는 영향에 관한 결과는 Tables 3, 4 및 5와 같다. *L. plantarum* FIL20과 *L. paracasei* FIL31이 생산한 박테리오신 용액의 항균 활성은 농도의존적으로 나타나 FIL20의 박테리오신 용액 200 AU/ml 처리에 의해서 *S. marcescens* CIH09의 균수가 대조구에 비해 약 3 log cycle 감소되었고, FIL31의 박테리오신 용액(200 AU/ml)에 의해서도 *A. hydrophilia* RIH28의 균수가 약 4 log cycle 감소되었다. 한편, 배양 상등액에 의한 항균 활성도 농도의존적으로 나타났는데 50 µl/ml의 농도로 처리한 경우에는 대조구의 균수와 비슷한 수준을 유지하였으나, FIL31과 PIL52가 생산한 박테리오신 용액을 100 혹은 200 µl/ml의 농도로 처리한 경우 바이오제닉 아민을 생성하는 균수를 유의하게 감소시켰다($P < 0.05$). 특히 균주별 배양 상등액(200 µl/ml)의 항균 활성을 비교한 결과, *M. morgani* CIH032 및 *A. hydrophilia* RIH28의 균수는 *L. sakei* PIL52에

의해 감소 효과가 가장 크게 나타났고, *S. marcescens* CIH09와 *C. freundii* PIH21의 균수도 *L. paracasei* FIL31 및 *L. sakei* PIL52의 배양 상등액에 의해 더 효과적으로 억제되었다. 한편,

S. marcescens CIH09의 히스타민 함량도 *L. plantarum* FIL20이 생산한 박테리오신 용액 100 AU/ml 이상의 농도에 의해 유의하게 감소되었고 *A. hydrophilia* RIH28이 생산한 히스

Table 3. Changes in the bacterial counts of biogenic amine-producing strains by treatment of the bacteriocin and the cell-free culture supernatant from probiotic lactic acid bacteria

Biogenic amine-producing strain	Probiotic LAB	Viable cell counts (CFU/ml)						
		Control	Bacteriocin (AU/ml)			CFCS (μl/ml)		
			50	100	200	50	100	200
<i>M. morgani</i> CIH03	<i>L. plantarum</i> FIL20			NT		$4.1 \pm 2.0 \times 10^9$	$2.0 \pm 0.1 \times 10^{8*}$	$1.1 \pm 0.6 \times 10^{8*}$
	<i>L. paracasei</i> FIL31	$7.1 \pm 2.6 \times 10^9$		NT		$1.5 \pm 1.1 \times 10^9$	$8.9 \pm 0.7 \times 10^8$	$5.5 \pm 1.3 \times 10^{8*}$
	<i>L. sakei</i> PIL52			NT		$9.7 \pm 0.5 \times 10^8$	$3.6 \pm 1.8 \times 10^{8*}$	$8.1 \pm 1.2 \times 10^{7*}$
<i>S. marcescens</i> CIH09	<i>L. plantarum</i> FIL20		$6.0 \pm 2.5 \times 10^8$	$3.1 \pm 0.7 \times 10^{7*}$	$2.0 \pm 3.0 \times 10^{6*}$	$9.1 \pm 0.5 \times 10^9$	$9.0 \pm 2.1 \times 10^8$	$7.1 \pm 0.2 \times 10^{8*}$
	<i>L. paracasei</i> FIL31	$2.4 \pm 0.9 \times 10^9$		NT		$8.8 \pm 3.6 \times 10^8$	$5.5 \pm 1.9 \times 10^{8*}$	$9.7 \pm 2.3 \times 10^{7*}$
	<i>L. sakei</i> PIL52			NT		$3.6 \pm 2.3 \times 10^{8*}$	$4.1 \pm 0.5 \times 10^{8*}$	$9.0 \pm 3.0 \times 10^{7*}$
<i>C. freundii</i> PIH21	<i>L. plantarum</i> FIL20			NT		$7.1 \pm 2.5 \times 10^9$	$5.2 \pm 0.6 \times 10^9$	$4.1 \pm 2.3 \times 10^9$
	<i>L. paracasei</i> FIL31	$3.8 \pm 2.6 \times 10^9$		NT		$6.0 \pm 2.8 \times 10^8$	$3.1 \pm 2.2 \times 10^{8*}$	$6.3 \pm 3.0 \times 10^{7*}$
	<i>L. sakei</i> PIL52			NT		$1.4 \pm 3.6 \times 10^9$	$2.8 \pm 3.0 \times 10^{8*}$	$5.0 \pm 1.1 \times 10^{7*}$
<i>A. hydrophilia</i> RIH28	<i>L. plantarum</i> FIL20			NT		$7.0 \pm 0.9 \times 10^8$	$8.0 \pm 0.6 \times 10^{7*}$	$6.2 \pm 1.4 \times 10^{7*}$
	<i>L. paracasei</i> FIL31	$6.9 \pm 3.5 \times 10^8$	$4.0 \pm 1.5 \times 10^{6*}$	$7.4 \pm 2.5 \times 10^{5*}$	$5.8 \pm 2.3 \times 10^{4*}$	$4.5 \pm 3.0 \times 10^8$	$7.7 \pm 2.0 \times 10^{7*}$	$4.1 \pm 0.5 \times 10^{7*}$
	<i>L. sakei</i> PIL52			NT		$5.4 \pm 0.4 \times 10^8$	$8.1 \pm 0.4 \times 10^{7*}$	$9.9 \pm 3.5 \times 10^{6*}$

The cultures of biogenic amine-forming bacteria (1.0×10^5 CFU/ml) were inoculated into trypticase soy broth containing bacteriocin solution (50, 100, 200 AU/ml) or CFCS (50, 100, 200 μl/ml) obtained from the probiotic LAB and incubated under aerobic condition for 24 h at 35°C. And then the number of viable cells remaining in the cultures was measured by a standard plate count method using plate count agar.

Data are means±standard deviation (SD) from triplicate determinations.

*Significantly differ ($P < 0.05$) from the control group by Student's *t*-test.

CFCS, cell-free culture supernatant.

NT, not tested.

Table 4. Changes in the histamine content detected in the biogenic amine-producing strains by treatment of the bacteriocin and the cell-free culture supernatant from probiotic lactic acid bacteria

Biogenic amine-producing strain	Probiotic LAB	Histamine content (mg/L)						
		Control	Bacteriocin (AU/ml)			CFCS (μl/ml)		
			50	100	200	50	100	200
<i>M. morgani</i> CIH03	<i>L. plantarum</i> FIL20			NT		$3,425.7 \pm 29.5$	$3,067.7 \pm 25.7$	$2,785.1 \pm 16.0^*$
	<i>L. paracasei</i> FIL31	$3,346.7 \pm 27.5$		NT		$3,299.5 \pm 30.7$	$3,256.4 \pm 41.8$	$2,981.0 \pm 10.9^*$
	<i>L. sakei</i> PIL52			NT		$3,459.1 \pm 15.9$	$3,166.7 \pm 46.7$	$2,711.5 \pm 23.8^*$
<i>S. marcescens</i> CIH09	<i>L. plantarum</i> FIL20		$2,948.5 \pm 16.9$	$2,481.0 \pm 18.1^*$	$2,245.7 \pm 15.7^*$	$2,871.5 \pm 22.7$	$2,794.6 \pm 30.6$	$2,449.5 \pm 28.4^*$
	<i>L. paracasei</i> FIL31	$3,012.5 \pm 38.1$		NT		$3,009.5 \pm 30.4$	$2,942.5 \pm 26.4$	$2,369.4 \pm 16.4^*$
	<i>L. sakei</i> PIL52			NT		$2,999.4 \pm 11.8$	$2,864.0 \pm 33.7$	$2,254.1 \pm 33.8^*$
<i>C. freundii</i> PIH21	<i>L. plantarum</i> FIL20			NT		$2,594.7 \pm 31.0$	$2,278.0 \pm 26.6$	$1,974.5 \pm 9.9^*$
	<i>L. paracasei</i> FIL31	$2,479.3 \pm 40.5$		NT		$2,299.4 \pm 18.0$	$1,912.4 \pm 23.2^*$	$1,745.6 \pm 15.7^*$
	<i>L. sakei</i> PIL52			NT		$2,301.4 \pm 20.6$	$1,846.4 \pm 12.0^*$	$1,611.5 \pm 27.1^*$
<i>A. hydrophilia</i> RIH28	<i>L. plantarum</i> FIL20			NT		$3,002.5 \pm 30.6$	$2,791.0 \pm 20.6$	$2,416.8 \pm 12.7^*$
	<i>L. paracasei</i> FIL31	$2,940.7 \pm 39.8$	$2,354.4 \pm 20.5^*$	$2,064.5 \pm 22.4^*$	$1,547.4 \pm 30.5^*$	$2,995.4 \pm 22.5$	$2,691.5 \pm 37.5$	$2,216.0 \pm 16.4^*$
	<i>L. sakei</i> PIL52			NT		$2,912.2 \pm 15.4$	$2,411.7 \pm 8.4^*$	$2,013.5 \pm 11.4^*$

The biogenic amine-forming bacteria were inoculated into trypticase soy broth (BA-TSB) containing 0.0005% pyridoxal HCl and 0.5% l-histidine hydrochloride monohydrate and incubated for 24 h at 35°C. The cultures were propagated in BA-TSB supplemented with bacteriocin solution (50, 100, 200 AU/ml) or CFCS (50, 100, 200 μl/ml) under aerobic condition for 24 h at 35°C and then the histamine content in the supernatant obtained by centrifugation was measured by HPLC.

Data are means ± SD from triplicate determinations.

*Significantly differ ($P < 0.05$) from the control group by Student's *t*-test.

CFCS, cell-free culture supernatant.

NT, not tested.

Table 5. Changes in the tyramine content detected in biogenic amine-producing strains by treatment of the bacteriocin and the cell-free culture supernatant from probiotic lactic acid bacteria

Biogenic amine-producing strain	Probiotic LAB	Tyramine content (mg/L)						
		Control	Bacteriocin (AU/ml)			CFCS (μl/ml)		
			50	100	200	50	100	200
<i>M. morgani</i> CIH03	<i>L. plantarum</i> FIL20		NT			1,570.4 ± 10.7	1,235.4 ± 8.8*	1,064.7 ± 13.1*
	<i>L. paracasei</i> FIL31	1,678.4 ± 8.5	NT			1,495.5 ± 16.7	1,095.4 ± 9.7*	846.7 ± 23.0*
	<i>L. sakei</i> PIL52		NT			1,705.6 ± 19.1	1,420.1 ± 20.3*	1,119.5 ± 10.4*
<i>S. marcescens</i> CIH09	<i>L. plantarum</i> FIL20		3,312.5 ± 25.3	3,015.7 ± 42.8	2,645.0 ± 16.4*	3,259.7 ± 13.7	3,085.7 ± 39.7	2,816.7 ± 10.8*
	<i>L. paracasei</i> FIL31	3,694.2 ± 24.7		NT		3,498.4 ± 9.4	3,351.9 ± 35.7	3,011.7 ± 10.3*
	<i>L. sakei</i> PIL52			NT		3,704.5 ± 11.6	3,411.7 ± 20.4	2,951.0 ± 13.3*
<i>C. freundii</i> PIH21	<i>L. plantarum</i> FIL20			NT		3,001.0 ± 24.4	2,847.5 ± 33.1	2,413.4 ± 11.6*
	<i>L. paracasei</i> FIL31	2,977.2 ± 16.3		NT		2,816.5 ± 18.2	2,595.0 ± 12.4*	2,216.5 ± 14.0*
	<i>L. sakei</i> PIL52			NT		2,794.4 ± 20.3	2,691.4 ± 33.4	2,016.4 ± 7.6*
<i>A. hydrophilia</i> RIH28	<i>L. plantarum</i> FIL20			NT		2,704.3 ± 27.0	2,691.5 ± 36.7	2,360.7 ± 5.9*
	<i>L. paracasei</i> FIL31	2,827.5 ± 33.5	2,597.4 ± 36.1	2,361.4 ± 11.4*	1,999.5 ± 27.4*	2,616.7 ± 29.1	2,594.7 ± 46.8	2,203.0 ± 11.7*
	<i>L. sakei</i> PIL52			NT		2,659.8 ± 28.8	2,425.7 ± 4.7*	2,016.7 ± 20.2*

The biogenic amine-forming bacteria were inoculated into BA-TSB containing 0.0005% pyridoxal HCl and 0.5% l-tyrosine dihydrochloride monohydrate and incubated for 24 h at 35°C. The cultures were propagated in BA-TSB supplemented with bacteriocin solution (50, 100, 200 AU/ml) or CFCS (50, 100, 200 μl/ml) under aerobic condition for 24 h at 35°C and then the tyramine content in the supernatant obtained by centrifugation was measured by HPLC.

Data are means ± SD from triplicate determinations.

*Significantly differ ($P < 0.05$) from the control group by Student's *t*-test.

CFCS, cell-free culture supernatant.

NT, not tested.

타민의 함량은 *L. paracasei* FIL31의 박테리오신(50 AU/ml)에 의해서 유의하게 감소되었다($P < 0.05$). *L. plantarum* FIL20의 배양 상등액(200 μl/ml)에 의해서 *M. morgani* CIH03, *S. marcescens* CIH09, *C. freundii* PIH21 및 *A. hydrophilia* RIH28의 히스타민 함량이 유의하게 감소되었다($P < 0.05$). *L. paracasei* FIL31 및 *L. sakei* PIL52의 배양 상등액 100 μl/ml에 의해 *C. freundii* PIH21과 *A. hydrophilia* RIH28이 생산한 히스타민 함량이 효과적으로 감소되었다. 한편, *L. plantarum* FIL20 (200 AU/ml)과 *L. paracasei* FIL31 (100 AU/ml)의 박테리오신 용액에 의해 *S. marcescens* CIH09와 *A. hydrophilia* RIH28이 생산한 티라민 함량이 유의하게 감소되었다($P < 0.05$). *M. morgani* CIH03이 생산한 티라민은 *L. plantarum* FIL20, *L. paracasei* FIL31 및 *L. sakei* PIL52의 배양 상등액(100 μl/ml)에 의해 유의하게 감소되었으며, *S. marcescens* CIH09가 생산한 티라민은 이들 유산균 배양액(200 μl/ml)에 의해 효과적으로 감소되었다($P < 0.05$). *C. freundii* PIH21과 *A. hydrophilia* RIH28이 생산한 티라민은 *L. paracasei* FIL31 혹은 *L. sakei* PIL52의 배양 상등액(100 μl/ml)에 의해 대조군보다 훨씬 낮은 양의 티라민이 검출되었다. 따라서 유산균의 박테리오신 활성이 높거나 배양 상등액 내에 함유된 유산의 함량이 많을수록 바이오제닉 아민 생성균의 균수와 히스타민 혹은 티라민의 함량을 감소시

키는데 효과적인 것으로 확인되었다.

아민 산화효소를 생산하는 미생물을 이용하여 바이오제닉 아민 함량을 효과적으로 저하시킬 수 있으므로 *Staphylococcus xylosum*가 염장 및 발효 멸치 내 히스타민과 티라민 축적을 억제하고 *Micrococcus varians*에 의해서도 발효 소시지의 숙성 과정 동안 티라민의 함량을 유의하게 감소시키는 효과를 나타내었다(Zaman *et al.*, 2009). 하지만 *Staphylococcus* 속과 *Micrococcus* 속은 바이오제닉 아민을 분해하는 효소를 생산함으로써 유해 아민의 저감화 효과는 있으나, 발효식품에 기능성을 부여하긴 어려운 균종들이다. 이에 반해 프로바이오틱 유산균은 면역기능 강화, 항암, 항산화, 항콜레스테롤 활성을 비롯하여 항균물질 생산에 따른 바이오제닉 아민 생성균에 대한 항균 활성을 나타내어 유해 아민의 생성을 지연시키거나 억제시킨다. 게다가 일부 lactobacilli는 아미노산의 탈탄산 반응을 유도하는 탈카르복실화 효소 활성이 없고 알데히드, 과산화수소, 암모니아로 바이오제닉 아민을 산화시키는 효소를 가지고 있으므로 발효식품 및 가공식품에 이용하게 되면 유해 아민의 함량을 낮춰서 이로 인한 위해를 감소시킨다(Naila *et al.*, 2010). 아미노산 탈탄산 효소를 생산하지 않은 *L. plantarum*, *L. casei* subsp. *casei*, *Pediococcus acidilactici* 및 *S. xylosum*를 혼합한 경우 어육(silver carp) 소시지 내에 히스타민, 푸트레

신, 카다베린, 티라민 및 트립타민 등의 축적을 효과적으로 억제할 수 있으므로 박테리오신을 생산하는 유산균은 가공 식품 및 발효 식품에 유용한 첨가물로 이용될 수 있다(Yongjin *et al.*, 2007).

니신(nisin)을 생산하는 *L. lactis*는 히스타민 생성균인 *Lactobacillus buchneri* St2A의 증식을 완전히 저해하였고 박테리오신을 생산하는 유산균을 치즈 제조에 이용한 경우 히스타민이 전혀 검출되지 않았다고 보고된 바 있다(Joosten and Nuñez, 1996). Nugrahani 등(2016)은 *L. casei*가 생산한 박테리오신은 히스타민 생성균의 증식을 저해하는데 효과적이었으므로 이를 수산물 가공품 제조 시 첨가함으로써 유해 아민의 중독 위험을 감소시킬 수 있다고 보고하였다. Tabanelli 등(2014)은 박테리오신을 생산하는 lactococci에 의해 *S. thermophilus* PRI60의 증식과 히스타민 생산의 억제능이 효과적으로 나타났으며, 니신 Z의 생산균인 *L. lactis* subsp. *lactis* VR84는 streptococci의 사멸을 유도하였고 히스타민의 생성이 억제되어 소량만 잔존하게 되었고, 이와 같이 히스타민을 생성하는 균의 증식과 아민 생성량 감소 효과는 *L. lactis* subsp. *lactis* CG27에 의해서도 유사한 결과가 나타났다고 보고된 바 있으므로 기존의 결과와 유사하게 본 연구에서도 특정 유산균이 생산한 박테리오신으로 바이오제닉 아민의 생성을 억제시킬 수 있는 것으로 판단된다.

한편, 바이오제닉 아민을 생성하지 않는 유산균 단독 처리보다는 혼합 균주로 발효식품을 제조할 경우 바이오제닉 아민 제어에 대한 상승 효과가 나타났으며, 이는 유산균이 생산한 유기산에 의해 pH가 급격하게 감소되었기 때문이라고 보고된 바 있다(Hu *et al.*, 2007). 유기산도 GRAS 물질로서 안전한 식품첨가물로 사용할 수 있으나, 과량 사용시 풍미에 저하시키는 단점이 있지만 적당한 양(1~3%)을 사용할 경우 오히려 풍미를 개선시키는 효과가 있다고 알려져 있으며, *Bacillus cereus*를 인위적으로 접종한 돼지고기에 유산(0.2 M)을 처리한 경우 바이오제닉 아민의 양이 유의하게 감소되었다(Min *et al.*, 2007). 따라서 박테리오신이나 유기산과 같은 유산균의 항균물질은 유해 물질인 바이오제닉 아민의 축적을 제어하는데 효과적인 도구로 이용할 수 있다. Toy 등(2015)은 *L. lactis* subsp. *lactis* IL 1403, *L. mesenteroides* subsp. *cremoris* DSMZ 20346, *Pediococcus acidophilus* ATCC 25741 및 *S. thermophilus* NCFB 2392의 배양 상등액에 함유된 유기산에 의해 *S. aureus* ATCC 29213, *E. coli* ATCC 25922, *L. monocytogenes* ATCC 7677 및 *Salmonella paracasei* A NCTC 13의 증식과 이들이 생산한 티라민의 양을 유의하게 감소시켰다고 보고한 바 있으며 이와 유사하게 본 연구의 바이오제닉 아민 생성균에 대한

항균 활성도 유산균의 배양 상등액 내의 함유된 유기산에 기인하는 것으로 사료된다.

바이오제닉 아민 생성량에 영향을 미치는 인자

선발된 총 4종의 바이오제닉 아민 생성균 중에서 히스타민과 티라민 생성량이 가장 많은 *S. marcescens* CIH09에 대한 *L. plantarum* FIL20의 박테리오신과 배양 상등액의 저해능에 배지의 pH, 배양 온도, 식염 및 아질산 칼륨이 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 6과 같다. 박테리오신 용액(100 AU/ml)과 배양 상등액(100 µl/ml)을 각각 처리하고 pH 5.0으로 조정된 배지 내에서 배양한 경우 CIH09의 균수는 대조구(pH 6.57)에 비해 유의하게 낮았고 히스타민의 함량도 유의하게 낮았으나, 티라민의 함량은 대조구와 크게 다르지 않았다. 하지만 pH 6.0과 7.0에서 박테리오신과 배양 상등액의 항균 활성은 대조구와 비슷한 수준을 유지하였다. 한편, 박테리오신 용액과 배양 상등액을 처리한 후 15°C에서 배양한 경우는 대조구(35°C)보다 유의하게 낮은 균수와 바이오제닉 아민 함량을 나타낸 반면, 25°C와 45°C에서 배양한 경우에는 대조구와 거의 비슷한 수준의 바이오제닉 아민을 생성하였다. 박테리오신 용액 혹은 배양 상등액 및 식염의 농도 1%는 균수와 바이오제닉 아민 함량에 유의한 영향을 미치지 않았으나, 박테리오신과 식염의 농도를 2% 이상 첨가했을 때 균수와 바이오제닉 아민을 유의하게 감소시켰고 배양 상등액의 항균 활성은 식염 5%를 첨가했을 때 유의하게 더 낮은 균수와 아민 함량을 나타내었다. 게다가 이들 항균물질의 항균 활성은 화학합성 첨가물과 혼합 처리에 의해서도 유의하게 증가되었는데 아질산 칼륨(200 µg/g)과 박테리오신 용액 혹은 배양 상등액을 처리한 경우 바이오제닉 아민을 생성하는 세균의 균수와 유해 아민 함량을 유의하게 감소시켰다.

한편, 수산 가공품 내에 히스타민을 생성하는 주요 원인균인 *M. morganella* CIH03이 생성한 히스타민의 양은 pH 5.0, 배양 온도 15°C, 식염 5% 혹은 아질산 칼륨 200 µg/g과 *L. plantarum* FIL20의 배양 상등액(100 µl/ml)을 혼합 처리했을 때는 배양 상등액만을 처리한 대조구에 비해 유의하게 낮게 나타났다(결과 미제시). 이와 같은 결과에서 볼 때, 박테리오신 용액 혹은 유기산과 같은 항균물질의 항균 활성은 배지의 pH 및 배양 온도 등 배양 조건에 따라 다소 상이하며, 이들 항균 물질의 항균 활성을 증가시키기 위해 식염이나 화학합성 첨가물과 혼용하는 허들 테크놀로지에 적용함으로써 독성 유발 가능성이 높은 유해 첨가물의 사용량을 줄이면서 항균 효과를 상승시킬 수 있을 것으로 판단된다.

수산 가공품 내 바이오제닉 아민 함량은 미생물의 종류, 균

Table 6. Effect of pH, culture temperature, salt and potassium nitrite on *S. marcescens* CIH09 viability and biogenic amine production when incubated with bacteriocin and CFCS of *L. plantarum* FIL20

Treatments	Viable cell counts (CFU/ml)		Histamine (mg/L)		Tyramine (mg/L)		
	Bacteriocin (100 AU/ml)	CFCS (100 µl/ml)	Bacteriocin (100 AU/ml)	CFCS (100 µl/ml)	Bacteriocin (100 AU/ml)	CFCS (100 µl/ml)	
Control	3.1 ± 0.7 × 10 ⁶	9.0 ± 2.1 × 10 ⁸	2,481.0 ± 18.1	2,794.6 ± 30.6	3,015.7 ± 42.8	3,085.7 ± 39.7	
pH	5.0	5.8 ± 1.6 × 10 ^{5*}	2.2 ± 0.3 × 10 ^{7*}	1,651.4 ± 20.3*	1,963.5 ± 28.4*	2,823.5 ± 26.8	2,606.8 ± 12.1
	6.0	2.0 ± 0.9 × 10 ⁶	1.4 ± 1.8 × 10 ⁸	2,372.2 ± 18.0	2,714.2 ± 30.2	2,909.3 ± 9.9	2,714.5 ± 8.8
	7.0	5.0 ± 0.5 × 10 ⁶	3.5 ± 0.8 × 10 ⁸	2,294.2 ± 36.4	2,871.3 ± 24.1	2,802.5 ± 31.8	3,055.1 ± 36.7
Incubation temperature (°C)	15	2.9 ± 1.1 × 10 ^{5*}	5.2 ± 0.3 × 10 ^{5*}	1,257.3 ± 22.8*	1,528.5 ± 33.3*	2,113.5 ± 12.3*	2,401.2 ± 20.6*
	25	4.6 ± 0.7 × 10 ^{5*}	7.1 ± 3.0 × 10 ^{6*}	1,614.5 ± 11.7*	2,497.1 ± 40.1	2,411.6 ± 8.5*	2,811.3 ± 15.0
	45	6.2 ± 1.9 × 10 ⁶	8.1 ± 2.4 × 10 ⁸	2,361.4 ± 30.5	2,611.7 ± 31.5	2,956.1 ± 16.2	3,114.3 ± 20.5
NaCl concentration (%)	1.0	4.3 ± 0.8 × 10 ⁶	7.7 ± 1.2 × 10 ⁸	2,561.7 ± 29.1	2,708.5 ± 20.7	2,865.1 ± 27.1	3,006.5 ± 11.5
	2.0	8.6 ± 0.2 × 10 ^{5*}	4.0 ± 0.8 × 10 ⁸	2,013.5 ± 9.3*	2,399.5 ± 31.2	2,417.2 ± 15.1*	2,746.5 ± 48.1
	5.0	5.5 ± 2.3 × 10 ^{5*}	9.2 ± 0.5 × 10 ^{6*}	1,842.3 ± 15.5*	2,063.4 ± 13.5*	2,058.9 ± 20.9*	2,269.5 ± 30.1*
Potassium nitrite concentration (µg/g)	50	4.0 ± 1.4 × 10 ⁶	7.9 ± 2.2 × 10 ⁸	2,316.4 ± 4.5	2,666.4 ± 20.3	2,940.2 ± 10.7	3,016.8 ± 5.7
	100	3.0 ± 2.0 × 10 ⁶	8.2 ± 0.6 × 10 ⁸	2,031.2 ± 9.0*	2,291.5 ± 45.7	2,436.1 ± 16.1*	2,800.1 ± 14.9
	200	5.9 ± 2.5 × 10 ^{5*}	7.3 ± 0.9 × 10 ^{7*}	1,974.5 ± 20.1*	2,163.9 ± 14.2*	2,075.2 ± 20.4*	2,213.2 ± 25.1*

Data are means ± SD from triplicate determinations.

*Significantly differ ($P < 0.05$) from the control group by Student's *t*-test.

CFCS, cell-free culture supernatant.

수 및 유리 아미노산의 이용능, 탈탄산 효소의 활성화에 대한 배양 조건(온도, 식염 농도 및 pH)에 따라 주로 결정된다. 유산균은 발효과정 동안 당을 분해하여 유기산을 생성하는 대표적인 균종으로서 발효가 진행됨에 따라 배양액의 pH가 급격하게 감소되어 아미노산의 탈탄산 반응을 유발하는 미생물의 증식이 억제되었기 때문에 바이오제닉 아민의 축적량이 감소된다고 알려져 있다(Zhang *et al.*, 2013). 또한 닭고기에서 인위적으로 접종한 *B. cereus*, *E. cloacae* 및 *Alcaligenes faecalis*가 생산한 바이오제닉 아민 생성량은 0.2 M 초산, 구연산 혹은 유산에 의해 유의하게 감소되었다(Min *et al.*, 2007). 게다가 멸치 젓갈로부터 분리된 바이오제닉 아민 생성균에 의해 생성된 푸트레신, 카다베린 및 티라민의 함량은 유산(5, 10%), 구연산(5, 10%) 및 소르빈산(0.1, 0.2%) 처리에 의해 약 15~45% 정도 감소되었다고 보고된 바 있는데(Mah and Hwang, 2009) 이들과 유사하게 본 연구 결과에서도 pH가 낮은 조건 하에서는 바이오제닉 아민 생성균의 증식이 억제되기 때문에 이들이 생성한 아민의 함량도 낮아지는 것으로 추정된다.

한편, Kang과 Park (1984)는 고등어 내에 생성된 히스타민은 10%의 구연산 처리에 의해 효과적으로 저해되었다고 하였으나, 히스티딘 탈탄산 효소의 활성화는 pH 2.5~6.5의 산성 영역이 최적이라고 보고하였다. *L. brevis*의 티로신 탈탄산 효소의 활성화는 pH 5.0에서 최대에 이르렀으나 pH 7.4에서 효소 활성이 가장 안정하여 배양 7일 후에도 활성을 92% 유지하였다

(Zhang and Ni, 2014). pH 산성 영역에서 *Enterococcus durans*와 *E. faecium*의 티라민 생성량은 증가되었고, *L. lactis* 및 *L. brevis*의 히스티딘 탈탄산 효소의 최대 활성화도 낮은 pH에서 나타났다고 알려져 있다(Gardini *et al.*, 2016). *L. curvatus*는 발효 소시지의 발효 후기에 가장 많은 양의 티라민을 생성하였는데 이는 pH가 낮을 때 티로신 탈탄산 효소의 활성이 높아졌기 때문이라고 보고하였으므로(Cid *et al.*, 2008) 바이오제닉 아민을 생성하는 균주에 따라 생성량에 영향을 미치는 최적의 pH는 다소 차이가 있는 것으로 여겨진다.

미생물의 증식을 위한 최적 온도는 바이오제닉 아민 생성에 적합한 조건이므로 *E. faecalis* EF37은 16~44°C의 범위 내에서 온도가 높아질수록 균의 성장 속도도 빨라지고 티라민의 축적량도 급격하게 증가하였다. 티라민 생성에 관여하는 탈탄산 효소의 최대 활성을 나타내는 온도는 균종에 따라 상이하여 *E. faecalis*는 30~37°C인 반면 *L. brevis*는 50°C인 것으로 확인되었다(Marcobal *et al.*, 2012; Gardini *et al.*, 2016). 한편, *S. thermophilus*의 히스티딘 탈탄산 효소의 활성화는 5°C의 낮은 온도에서도 검출되었고 온도가 서서히 증가함에 따라 효소 활성도 증가되어 50°C에서 최대에 이르며 그 이상의 온도에서는 활성이 급격하게 감소되었다. *M. morgani*, *R. planticola*, *Phytobacterium phosphoreum* 및 *Photobacterium damsela*의 히스티딘 탈탄산 효소 활성을 위한 최적 온도는 30~40°C 범위라고 알려져 있다(Kanki *et al.*, 2007). 바이오제닉 아민은 히스

티딘 탈탄산 효소를 생산하는 미생물의 증식이 왕성한 온도대에서 다량 생성되기 때문에 7.2°C 보다 21.1°C 이상의 온도에서 히스타민 생성량이 최대에 이르렀고 특히 32.2°C 부근에서 급속하게 히스타민이 생성되었다고 하여(Visciano *et al.*, 2012) 기존의 결과와 본 연구는 유사한 경향을 나타내었다. 한편, Klausen과 Huss (1987)는 히스티딘을 함유하고 있는 액체 배지 및 고등어 내에 존재하는 *M. morgani*는 0~5°C의 온도 범위 내에서 증식은 되지 않더라도 과량의 히스타민이 검출되었다고 보고하여 본 결과와는 다소 차이가 있었다. Kim 등 (2009)은 41종의 어류, 오징어, 조개를 대상으로 바이오제닉 아민 함량을 조사한 결과, 오징어와 조개에서는 기준치 이하의 유해 아민이 검출된 반면, 어류에서는 많은 양의 아민이 검출되었고 이들은 25°C에서 24시간 저장하는 동안 36.6~2123.9 mg/kg에 이르렀으나 4~10°C에서는 2~3일 후에 서서히 증가되어 유해 아민의 축적량은 저장 온도에 따라 상이하다고 보고하였다.

한편, 식염 농도 및 배양 온도는 미소(일본식 된장) 발효 과정 동안 히스타민, 페닐에틸아민, 트립타민 및 티라민 형성에 영향을 미치는 중요한 배양 인자로서 식염 5% 이하인 경우와 25~35°C의 온도 범위 내에서 유의하게 많은 양의 아민이 생성되었다고 하여(Chin and Koehler, 1986) 본 연구 결과와는 다소 차이가 있었다. 일반적으로 식염의 농도가 높아질수록 탈탄산 반응에 관여하는 미생물의 대사 활성이 감소하기 때문에 바이오제닉 아민의 축적량도 크게 감소하게 된다. Bargossi 등 (2015)에 따르면 티로신 탈탄산 효소의 활성은 식염 10% 농도에서 실패되었고 *E. faecalis* EF37은 식염 농도 2~6% 하에서 티라민과 페닐에틸아민의 축적량이 감소된 반면, *E. faecium*과 *E. faecalis*의 티라민 생성량은 식염 5% 하에서 부분적으로 감소되었으나, 탈탄산 효소의 활성은 식염 15% 하에서도 유의한 변화가 나타나지 않았다고 하였다. 한편, *S. thermophilus*의 히스티딘 탈탄산 효소 활성에 대한 식염의 영향이 세포와 배양 상등액 내에서 다소 차이가 있었는데 식염 2.5%는 세포의 성장을 억제시켜 히스타민이 거의 생성되지 않은 반면 배양 상등액 내에 있는 탈탄산 효소의 활성은 식염 5% 정도에서는 거의 영향을 받지 않았고 20~30% 농도 하에서 서서히 감소되었다(Tabanelli *et al.*, 2012).

한편 아질산염은 바이오제닉 아민 생성을 억제하는데 효과적인 식품첨가물로서 75 mg/L의 농도로 발효 소시지 내 푸트레신, 티라민 및 카다베린의 생성을 제어할 수 있다고 Genççelep 등(2007)은 보고하였다. 게다가 이탈리아인 소시지에 아질산염(150 mg/kg)을 첨가한 경우 푸트레신의 축적 억제 효과가 지속적으로 나타났다. 또한 유산균 스타터와 아질산염(0.05%)

을 혼용했을 때 소시지의 숙성기간 동안 푸트레신 생성량이 현저하게 줄었다(Ayhan *et al.*, 1999). 터키식 쇠고기 소시지 수축(Sucuk) 내 바이오제닉 아민 형성에 대한 아질산염과 니신의 영향을 살펴본 결과 아질산염은 페닐에틸아민, 푸트레신, 카다베린, 티라민 및 히스타민의 함량을 저하시켰고, 니신은 유산균수 및 트립타민의 생성을 억제시키는데 효과적이었다고 보고하여(Kurt and Zorba, 2010) 본 연구의 결과도 이와 유사하게 유산균의 항균물질과 화학합성 첨가물을 혼합 처리하여 유해 아민의 생성량을 유의하게 감소시킬 수 있음을 확인하였다. 따라서 바이오제닉 아민을 생성하는 균주에 따라서 물리 화학적 인자들이 세포 활성과 아민 생성량에 미치는 영향은 상이하며, 바이오제닉 아민의 축적을 감소시키는 효과는 제어 인자를 단독으로 처리하는 것보다 혼합적으로 처리하는 것이 유용하다고 알려져 있다(Latorre-Moratalla *et al.*, 2010).

이상의 결과를 요약하면, 생선 내장에는 많은 양의 바이오제닉 아민을 생성하는 세균들이 상재하고 있으며 과도한 양의 아민을 섭취한 경우 알레르기 반응을 비롯하여 심각한 증상을 유발하게 된다. 따라서 유해 아민의 저감화를 위해 다양한 방법이 이용되고 있는 가운데 독성 유발 가능성이 낮고 생리활성을 나타내는 유산균의 항균물질을 이용함으로써 아민 생성균의 증식을 억제하고 축적량을 감소시킬 수 있음을 확인하였다. 특히 박테리옌 용액은 특정 세균에 대해서만 항균 활성을 나타내었고 배양 상등액 내에 함유된 유기산과 함께 농도의존적으로 아민 생성균의 증식을 억제하였다. 배지의 초기 pH (5.0) 및 배양 온도(15°C)가 낮을수록 히스타민과 티라민을 생성하는 *S. marcescens* CIH09의 증식과 아민 축적량은 감소되었다. 또한 프로바이오틱 유산균의 항균 활성은 식염이나 화학합성 첨가물과 혼용에 의해 유의하게 증가되었으므로 허들테크놀로지에 이용한다면 독성 유발 가능성이 높은 첨가물의 사용량을 줄일 수 있고, 단백질 성분인 박테리옌은 체내 단백질 분해효소에 의해 쉽게 분해되어 잔류성이 없는 안전한 생물학적 보존제로서 이용 가치가 높을 것으로 사료된다.

적 요

본 연구에서는 프로바이오틱 유산균이 생산한 항균물질에 의한 바이오제닉 아민 생성균의 제어 효과와 박테리옌 및 유기산의 항균 활성에 영향을 미치는 배양 조건을 조사하였다. *Lactobacillus plantarum* FIL20 (64 AU/ml) 및 *Lactobacillus paracasei* FIL31 (128 AU/ml)의 박테리옌 용액은 *Serratia marcescens* CIH09과 *Aeromonas hydrophilia* RIH28에 각각

강한 항균 활성을 나타내었고 FIL20과 FIL31 균주로부터 얻은 배양 상등액 내에 유산 함유량은 각각 107.3 ± 2.7 mM과 129.5 ± 4.6 mM로 나타났다. 따라서 *L. plantarum* FIL20과 *L. paracasei* FIL31이 생산한 박테리오신 용액(200 AU/ml) 및 배양 상등액(200 μ l/ml)의 처리에 의해 *S. marcescens* CIH09 및 *A. hydrophilia* RIH28의 균수 및 히스타민과 티라민의 생성량을 유의하게 감소시켰다($P < 0.05$). 초기 pH (5.0)와 배양 온도(15°C)가 낮은 조건 하에서 CIH09 균주가 생산한 히스타민과 티라민의 생성량은 *L. plantarum* FIL20이 생산한 박테리오신 용액이나 배양 상등액 처리에 의해 유의하게 감소되었다. 또한 식염 5% 혹은 아질산 칼륨(200 μ g/g)과 FIL20 유산균의 항균물질을 혼용한 경우 바이오제닉 아민을 생성하는 세균의 균수와 유해 아민 함량을 유의하게 감소시켰다($P < 0.05$). 결론적으로 *L. plantarum* FIL20과 *L. paracasei* FIL31의 박테리오신 및 유기산 용액은 허들 테크놀로지에 적용하여 바이오제닉 아민 생성을 효과적으로 제어할 수 있는 생물학적 보존제로 이용될 수 있을 것이다.

감사의 말

이 논문은 2017학년도 동명대학교 교내학술연구비 지원에 의하여 연구되었음(2017F065).

References

- Ayhan, K., Kolsarici, N., and Alsancak-Özkan, G. 1999. The effects of starter culture on the formation of biogenic amines in Turkish soudjouks. *Meat Sci.* **53**, 183-188.
- Bargossi, E., Gardini, F., Gatto, V., Montanari, C., Torriani, S., and Tabanelli, G. 2015. The capability of tyramine production and correlation between phenotypic and genetic characteristics of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* strains. *Front. Microbiol.* **6**, 1371-1377.
- Becker, K., Southwick, K., Reardon, J., Berg, R., and MacCormack, J.N. 2001. Histamine poisoning associated with eating tuna burgers. *JAMA* **285**, 1327-1330.
- Biji, K.B., Ravishankar, C.N., Venkateswarlu, R., Mohan, C.O., Srinivasa Gopal, T.K. 2016. Biogenic amines in seafood: a review. *J. Food Sci. Technol.* **53**, 2210-2218.
- Chin, K.D.H. and Koehler, P.E. 1986. Effect of salt concentration and incubation temperatures on formation of histamine, phenethylamine, tryptamine and tyramine during miso fermentation. *J. Food Prot.* **49**, 423-427.
- Cid, S.B., Miguelez-Arriazo, M.J., Beckerc, B., Holzapfel, W.H., and Vidal-Carous, M.C. 2008. Amino acid decarboxylation by *Lactobacillus curvatus* CTC273 affected by the pH and glucose availability. *Food Microbiol.* **25**, 269-277.
- Coolborn, A. 2005. Antibacterial quantification from lactic acid bacteria isolated from food sources and soil. *J. Food Sci.* **3**, 568-571.
- Eerola, S., Hinkkanen, R., Lindfors, E., and Hirvi, T. 1993. Liquid chromatographic determination of biogenic amines in dry sausages. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* **75**, 575-577.
- Garcia-Ruiz, A., González-Rompinelli, E.M., Bartolomé, B., and Moreno-Arribas, M.V. 2011. Potential of wine-associated lactic acid bacteria to degrade biogenic amines. *Int. J. Food Microbiol.* **148**, 115-120.
- Gardini, F., Özogul, Y., Suzzi, G., Tabanelli, G., and Özogul, F. 2016. Technological factors affecting biogenic amine content in foods: a review. *Front. Microbiol.* **7**, 1-18.
- Genççelep, H., Kaban, G., Aksu, M.I., Öz, F., and Kaya, M. 2008. Determination of biogenic amine in sucuk. *Food Control* **19**, 868-872.
- Genççelep, H., Kaban, G., and Kaya, M. 2007. Effects of starter cultures and nitrite levels on formation of biogenic amines in sucuk. *Meat Sci.* **77**, 424-430.
- Ghanbari, M., Jami, M., Domig, K.J., and Kneifel, W. 2013. Seafood biopreservation by lactic acid bacteria- a review. *LWT-Food Sci. Technol.* **54**, 315-324.
- Halász, A., Barath, A., Simon-Sarkadi, L., Holzapfel, W. 1994. Biogenic amines and their production by micro-organisms in food. *Trends Food Sci. Technol.* **5**, 42-49.
- Hole, H., Nilssen, O., and Nes, I.F. 1991. Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene. *J. Bacteriol.* **173**, 3879-3887.
- Hu, Y., Xia, W., and Liu, X. 2007. Changes in biogenic amines in fermented silver carp sausages inoculated with mixed starter cultures. *Food Chem.* **104**, 188-195.
- Joosten, H.M.L.J. and Nuñez, M. 1996. Prevention of histamine formation in cheese by bacteriocin-producing lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1178-1181.
- Kang, J.H. and Park, Y.H. 1984. Effect of food additives on histamine formation during processing and storage of mackerel. Effect of salt, acidulans and sweetenings. *Bull. Korean Fish. Soc.* **17**, 383-390.
- Kanki, M., Yoda, T., Tsukamoto, T., and Baba, E. 2007. Histidine decarboxylases and their role in accumulation of histamine in tuna and dried saury. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 1467-1473.
- Kashket, E.R. 1987. Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiol. Rev.* **46**, 233-244.
- Kim, M.K., Mah, J.H., and Hwang, H.J. 2009. Biogenic amine formation and bacterial contribution in fish, squid and shellfish. *Food Chem.* **116**, 87-95.
- Klausen, N.K. and Huss, H.H. 1987. Growth and histamine production

- by *Morganella morganii* under various temperature conditions. *Int. J. Food Microbiol.* **5**, 147–156.
- Kuley, E. and Özogul, F.** 2011. Synergistic and antagonistic effect of lactic acid bacteria on tyramine production by food-borne pathogenic bacteria in tyrosine decarboxylase broth. *Food Chem.* **127**, 1163–1168.
- Kurt, S. and Zorba, O.** 2010. Biogenic amine formation in Turkish dry fermented sausage (sucuk) as affected by nisin and nitrite. *J. Sci. Food Agric.* **90**, 2669–2674.
- Ladero, V., Calles-Enriquez, M., Fernández, M., and Alvarez, M.A.** 2010. Toxicological effects of dietary biogenic amines. *Curr. Nutr. Food Sci.* **6**, 145–156.
- Latorre-Moratalla, M.L., Bover-Cid, S., Talon, R., Garriga, M., Zanardi, E., Ianieri, A., Fraqueza, M.J., Elias, M., Drosinos, E.H., and Vidal-Carous, M.C.** 2010. Strategies to reduce biogenic amine accumulation in traditional sausage manufacturing. *LWT-Food Sci. Technol.* **43**, 20–25.
- Lim, E.S. and Lee, N.G.** 2016. Control of histamine-forming bacteria by probiotic lactic acid bacteria isolated from fish intestine. *Korean J. Microbiol.* **52**, 352–364.
- Mah, J.H., Ahn, J.B., Park, J.H., Sung, H.C., and Hwang, H.J.** 2003. Characterization of biogenic amine-producing microorganisms isolated from *Myeolchi-Jeot*, Korean salted and fermented anchovy. *J. Microbiol. Biotechnol.* **13**, 692–699.
- Mah, J.H. and Hwang, H.J.** 2009. Effects of food additives on biogenic amine formation in *Myeolchi-jeot*, a salted and fermented anchovy (*Engraulis japonicas*). *Food Chem.* **114**, 168–173.
- Marcobal, A., De las Rivas, B., Landete, J.M., Tabera, L., and Muñoz, R.** 2012. Tyramine and phenylethylamine biosynthesis by food bacteria. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **52**, 448–467.
- Min, J.S., Lee, S.O., Jang, A., Jo, C., and Lee, M.** 2007. Control of microorganisms and reduction of biogenic amines in chicken breast and thigh by irradiation and organic acids. *Poult. Sci.* **86**, 2034–2041.
- Naila, A., Flint, S., Fletcher, G., Bremer, P., and Meerdink, G.** 2010. Control of biogenic amines in food-existing and emerging approaches. *J. Food Sci.* **75**, R139–R150.
- Nieto-Arribas, P., Poveda, J.M., Seseña, S., Palop, L., and Cabezas, L.** 2009. Technological characterization of *Lactobacillus* isolates from traditional Manchego cheese for potential use as adjunct starter cultures. *Food Control* **20**, 1092–1098.
- Nugrahani, A., Hardoko, and Hariati, A.M.** 2016. Characterization of bacteriocin *Lactobacillus casei* on histamine-forming bacteria. *J. Life Sci. Biomed.* **6**, 15–21.
- Priyadarshani, W.M.D. and Rakshit, S.K.** 2011. Screening selected strains of probiotic lactic acid bacteria for their ability to produce biogenic amines (histamine and tyramine). *Int. J. Food Sci. Technol.* **46**, 2062–2069.
- Sgouras, D., Maragkoudakis, P., Petraki, K., Martine-Gonzalez, B., Erioutou E., Michopoulos, S., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E., and Mentis, A.** 2004. *In vitro* and *in vivo* inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus casei* strains Shirota. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 518–526.
- Shakila, R.J., Vasundhara, T.S., and Rao, D.V.** 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. Forsch.* **207**, 17–76.
- Stadnik, J. and Dolatowski, Z.J.** 2010. Biogenic amines in meat and fermented meat products. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* **9**, 251–263.
- Suzzi, G. and Gardini, F.** 2003. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *Int. J. Food Microbiol.* **88**, 41–54.
- Tabanelli, G., Montanari, C., Bargossi, E., Lanciotti, R., Gatto, V., Felis, G., Torriani, S., and Gardini, F.** 2014. Control of tyramine and histamine accumulation by lactic acid bacteria using bacteriocidin forming lactococci. *Int. J. Food Microbiol.* **190**, 14–23.
- Tabanelli, G., Torriani, S., Rossi, F., Rizzotti, L., and Gardini, F.** 2012. Effect of chemico-physical parameters on the histidine decarboxylase (HdcA) enzymatic activity in *Streptococcus thermophilus* PR160. *J. Food Sci.* **77**, M231–M237.
- Ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H.M.L.J., and Huis Veld, J.H.J.** 1990. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Int. J. Food Microbiol.* **11**, 73–84.
- Toy, N., Özogul, F., and Özogul, Y.** 2015. The influence of the cell free solution of lactic acid bacteria on tyramine production by food borne-pathogens in tyrosine decarboxylase broth. *Food Chem.* **173**, 45–53.
- Veskovič Moračanin, S., Dukič, D.A., and Memiši, N.R.** 2014. Bacteriocins produced by lactic acid bacteria—a review. *APTEFF* **45**, 271–283.
- Visciano, P., Schirone, M., Tofalo, R., and Suzzi, G.** 2012. Biogenic amines in raw and processed seafood. *Front. Microbiol.* **3**, 1–10.
- Wendakkon, C.N. and Sakaguchi, M.** 1993. Combined effects of cloves with potassium sorbate and sodium benzoate on the growth and biogenic amine production of *Enterobacter aerogenes*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**, 678–679.
- Yongjin, H., Wenshui, X., and Xiaoyong, L.** 2007. Changes in biogenic amines in fermented silver carp sausages inoculated with mixed starter cultures. *Food Chem.* **104**, 188–195.
- Zaman, M.Z., Abdulmir, A.S., Bakar, F.A., Selamat, J., and Bakar, J.** 2009. A review: microbiological, physicochemical and health impact of high level of biogenic amines in fish sauce. *Am. J. Appl. Sci.* **6**, 1199–1211.
- Zhang, Q., Lin, S., and Nie, X.** 2013. Reduction of biogenic amine accumulation in silver carp sausage by an amine-negative *Lactobacillus plantarum*. *Food Control* **32**, 496–500.
- Zhang, K. and Ni, Y.** 2014. Tyrosine decarboxylase from *Lactobacillus brevis*: soluble expression and characterization. *Protein Expr. Purif.* **94**, 33–39.