

전통 발효 된장으로부터 분리된 바이오제닉 아민 생성 바실러스균에 대한 유산균의 항균 활성

임은서* 

동명대학교 식품영양학과

Antibacterial activity of lactic acid bacteria against biogenic amine-producing *Bacillus* spp. isolated from traditional fermented soybean paste

Eun-Seo Lim* 

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

(Received August 28, 2018; Revised October 4, 2018; Accepted October 18, 2018)

In the present study, biogenic amine-forming *Bacillus* spp. and bacteriocin-producing lactic acid bacteria (LAB) isolated from Doenjang were generally identified through 16S rRNA gene sequencing, and the physicochemical and microbiological characteristics of cheonggukjang prepared using the isolated strains were investigated. Biogenic amine-producing bacteria from the samples were identified as *Bacillus licheniformis* DB102, *B. subtilis* DB203, *B. stearothermophilus* DB206, *B. pumilus* DB209, *B. subtilis* DB310, *B. coagulans* DB311, *B. cereus* DB313, *B. amyloliquefaciens* DB714, *B. amyloliquefaciens* DB915, *B. licheniformis* DB917, *B. cereus* DB1019, *B. subtilis* DB1020, *B. megaterium* DB1022. The bacteriocin-producing LAB showed antibacterial effect against biogenic amine-producing *Bacillus* spp. were identified as *Lactobacillus plantarum* DLA205, *L. brevis* DLA501, *L. fermentum* DLA509, *L. acidophilus* DLA703, and *Enterococcus faecalis* DLA804. The bacteriocin produced by the LAB significantly decreased the viable numbers and the amine production ability of the biogenic amine-forming *Bacillus* spp. in a concentration dependent manner. Therefore, the pH, ammonia nitrogen and biogenic amine content of cheonggukjang prepared by mixed

culture of the LAB and *Bacillus* spp. were significantly decreased compared to the control group.

Keywords: *Bacillus*, bacteriocin, biogenic amine, lactic acid bacteria

두류 및 그 가공품 내에 함유된 단백질, 아미노산, 이소플라빈, 비타민 및 무기질 등 생리활성 물질들의 다양한 기능성이 밝혀짐에 따라 이들은 오랫동안 식품 산업에 널리 이용되고 있다. 하지만 발효 과정 동안 다양한 미생물들의 아미노산 탈탄산 효소에 의해 발암물질 전구체인 바이오제닉 아민 (biogenic amine)이 콩으로 만든 장류 내에서 다량 검출된다 (Santos, 1996). 장류 내에 주로 함유된 바이오제닉 아민인 아그마틴 (agmatine), 카다베린 (cadaverine), 히스타민 (histamine), 티라민 (tyramine), 트립타민 (tryptamine), 베타-페닐에틸아민 (β -phenylethylamine) 등은 각각 아르기닌 (arginine), 라이신 (lysine), 히스티딘 (histidine), 티로신 (tyrosine), 트립토판 (tryptophan), 페닐알라닌 (phenylalanine) 등의 아미노산으로부터 생성된다 (Shalaby, 1996).

발효 가공품 숙성에 관여하는 미생물의 종류에 따라 탈탄산 효소를 합성하는 능력이 서로 다르기 때문에 우점종 미생

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

물의 종(species)과 균수가 유해 아민의 생성량을 결정할 뿐만 아니라 장류의 숙성 과정 및 저장 조건에 따라서도 함량에 큰 차이가 있다(Nout *et al.*, 1993). 게다가 원료 내 두류의 함량, 미생물의 유리 아미노산 이용능 및 세균의 성장 속도, 탈탄산 효소 합성과 효소 활성에 영향을 미치는 배양 조건 등도 바이오제닉 아민 생성량에 영향을 미치는 중요한 인자로 알려져 있다(Santos, 1996).

한국 전통 재래식 된장은 콩으로부터 분해된 비교적 많은 양의 아미노산을 함유하고 있고 이는 바이오제닉 아민 생성을 위한 원료가 되며, 발효 과정 동안 *Bacillus* sp., *Citrobacter* sp., *Clostridium* sp., *Klebsiella* sp., *Escherichia* sp., *Proteus* sp., *Pseudomonas* sp., *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Photobacterium* sp., *Lactobacillus* sp., *Pediococcus* sp. 및 *Streptococcus* sp. 등의 세균들이 주로 바이오제닉 아민을 생성하는 것으로 보고되고 있다(Brink *et al.*, 1990). 일본식 발효 된장인 미소 내에는 *Enterococcus faecium*과 *Lactobacillus bulgaricus*에 의해 주로 티라민이 생성되고, 히스타민은 *L. sanfrancisco*에 의해 생성되었으며, 낫또(natto) 내에 함유된 *Lactobacillus* sp.도 히스타민 생성균으로 확인되었다(Ibe *et al.*, 1992). 특히 재래식 된장 내에 있는 *Clostridium perfringens*는 단백질이 풍부한 배지 내에서 증식 가능하며, 필수 아미노산이 부족한 경우 증식이 억제되었으므로 유해 아민은 아미노산이 풍부한 환경에서 흔히 검출된다(Moon *et al.*, 2010). 전통적인 방식으로 제조된 청국장 내에는 *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquenfaciens*, *B. licheniformis* 및 *B. thuringiensis* 등이 우점종 세균이고 이들이 주요 바이오제닉 아민 생성균인 것으로 보고된 바 있다(Han *et al.*, 2007).

식품을 통해 섭취된 바이오제닉 아민의 일정량은 체내 아민 산화효소(amine oxidase)에 의해 분해됨으로써 건강을 위협할 정도는 아니지만, 분해 효소의 활성이 낮거나 아민 섭취량이 지나치게 많을 경우에는 안면 홍조, 두드러기, 호흡 곤란 등 아민 중독 증상을 유발하게 된다(Ladero *et al.*, 2010). 따라서 바이오제닉 아민 생성량을 줄이기 위해선 발효식품 제조 과정 중 유해 아민 생성량이 적은 종균을 사용하거나, 아민 분해능이 있는 균주를 이용함으로써 유해 아민에 의한 독성의 위험을 감소시킬 수 있다. 게다가 유산균이 생산한 유기산이나 박테리옌과 같은 항균물질에 의하여 바이오제닉 아민 생성균의 증식을 억제함으로써 식품 내 아민의 함량을 감소시킬 수 있는 것으로 보고된 바 있다(Lim and Lee, 2016).

따라서 본 연구에서는 된장으로부터 분리된 바실러스균주 중에서 바이오제닉 아민 생성능을 확인하였고, 이들에 대한 항균 활성을 나타내는 유산균을 분리 동정하였다. 바이오제닉

아민을 생성하는 바실러스균과 항균 활성을 나타내는 유산균과의 혼합 배양으로 청국장을 제조하여 이화학적 특성 및 유해 아민 생성량의 감소 효과를 측정하였다.

재료 및 방법

바이오제닉 아민 생성 바실러스균 분리 동정

부산 소재 전통 시장 및 대형 마트에서 판매하는 된장 10종을 수집한 후 시료 30 g에 멸균 인산완충용액(phosphate buffer saline, PBS, pH 7.0) 270 ml를 첨가하여 스토마카(3 M Centre)로 약 2분간 균질화 하였다. 내열성 포자 형성균을 얻기 위해 시료 용액을 80°C에서 15분간 가열 처리한 다음 상등액 0.1 ml를 취하여 Luria-Bertani (LB, BD Difco Co.) 평판배지 표면에 도말한 후 37°C에서 48시간 배양하였다. 평판배지에 자란 서로 다른 형태의 집락을 각각 취하여 순수 분리한 다음 Bover-Cid과 Holzappel (1999)의 방법에 의하여 아미노산 탈탄산 효소 활성을 측정하였다. 즉, 분리 균주의 효소 유도를 촉진시키기 위해 전구체 아미노산(1-histidine monohydrochloride monohydrate, 1-tyrosine disodium salt, 1-lysine monohydrochloride 및 1-ornithine monohydrochloride, Sigma-Aldrich, 1 g/L)과 pyridoxal 5-phosphate (1 mg/L)를 첨가한 탈카르복시화 액체배지(decarboxylating broth)에서 균 접종 후 37°C에서 24시간 동안 5회 전 배양하였다. Microtiter plate (Falcon, Becton Dickinson)의 각 well에 각각의 아미노산(2%, w/v)이 첨가된 탈카르복시화 액체배지(100 µl)와 전 배양액(50 µl)을 접종한 후 혐기적인 조건(Anoxomat 8000 system, MART Co.)에서 37°C, 72시간 동안 배양한 후 자색으로 변하면 바이오제닉 아민 생성균으로 판정하였다.

선발된 균주는 동정을 위해 DNA extraction kit (Qiagen)로 DNA를 추출 정제한 다음 27F (5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3')와 1492R (5'GGTTACCTTGTTACGACTT-3') primer를 사용하여 PCR Thermal cycler (Bio-Rad Laboratories Ltd.)로 반응시켰다. 초기 변성 (97°C, 5분), 변성 (94°C, 1분), 풀림 (56°C, 1분), 신장 (72°C, 1분 30초) 및 연장 (72°C, 5분) 조건 하에서 35회 반복하여 DNA를 증폭시켰다. PCR 산물은 전기영동(1.5% agarose gel, w/v)하고 PCR purification kit (Qiagen)로 정제한 다음 DNA sequencer (ABI Prism[®] 3730 Avant Genetic Analyzer, Applied Biosystems)로 분석한 후 National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)의 Basic Local Align Search Tool (BLAST) 프로그램 (version 2.0.8.)으로 염기서열의 상동성을 비교하였다.

항균물질 생성 유산균 분리 동정

앞서 바실러스균 분리를 위해 제조한 균질화한 시료 용액 1 ml를 취하여 1% CaCO₃ (w/v)가 첨가된 Lactobacilli MRS agar (BD Difco Co.) 평판배지에 접종하여 호기적인 조건에서 37°C, 48시간 배양하였다. 투명환을 생성한 집락을 유산균으로 간주하고 순수 분리 배양한 후 앞서 언급한 방법에 따라 바이오제닉 아민 생성능을 조사하여 음성 반응을 나타낸 균주를 선발하였다. 유산균의 항균 물질 조제를 위해 MRS broth에서 37°C, 24시간 배양한 후 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C)하여 얻은 배양 상등액 내 유기산의 함량은 Sgouras 등(2004)의 방법에 따라 HPLC(high pressure liquid chromatography) (Shimadzu)로 측정하였다. 유산균의 항균 물질 조제를 위해 MRS broth에서 37°C, 24시간 배양한 후 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C)하여 얻은 배양 상등액으로부터 조 박테리오신 용액은 Lim (2017)의 방법에 따라 조제하였고, 박테리오신 용액의 항균 활성은 바이오제닉 아민 생성 바실러스균에 대하여 microtiter plate method (Holo *et al.*, 1991)에 따라 측정하였다. 즉, 바이오제닉 아민 생성 바실러스 균주는 Brain Heart Infusion (BHI) broth (BD Difco Co.)에 접종한 다음 37°C, 24시간 배양하여 얻은 배양액을 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C)해서 모은 세포 침전물은 PBS (pH 7.0)로 2회 세척하고 세포수를 1.0 × 10⁵ CFU/ml로 조정하였다. Microplate well에 BHI broth를 분주하고 이진 희석법으로 농도를 맞춘 박테리오신 용액과 바이오제닉 아민 생성 바실러스 균주의 세포 현탁액 1% (v/v)를 첨가한 다음 37°C에서 24시간 배양한 후 microplate reader (Bioteck, Inc.)를 이용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 박테리오신 활성 (arbitrary units, AU)은 박테리오신 용액 대신 PBS (pH 7.0)를 첨가한 대조구의 혼탁도의 50%를 나타낸 최대 희석배수의 역수로 표시하였다. 바이오제닉 아민 생성 바실러스균에 대하여 박테리오신의 항균 활성을 나타낸 유산균을 최종 선발하여 바실러스균과 동일한 조건에서 염기서열 분석을 통해 동정하였다.

바이오제닉 아민 생성 바실러스균에 대한 유산균 항균물질의 항균 활성

바이오제닉 아민 생성 바실러스균의 증식에 대한 유산균이 생산한 유기산 및 박테리오신의 영향을 조사하기 위해 바실러스균은 BHI broth에 접종한 후 35°C에서 24시간 배양하였다. 배양액을 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C)해서 얻은 세포는 PBS (pH 7.0)로 2회 세척하고 균수는 1.0 × 10⁵ CFU/ml로 조정하였다. 세포 현탁액 1% (v/v)를 BHI broth에 접종하고 유산

균이 생산한 박테리오신(150, 300 AU/ml) 혹은 배양 상등액(200 µl/ml)을 첨가하여 37°C에서 24시간 호기적인 조건에서 배양하였다. 배양액 내 바실러스균의 생균수는 BHI 평판배지에서 표준천평판배양법으로 측정하였다.

한편, 바실러스균의 바이오제닉 아민 생성량에 대한 유기산 및 박테리오신의 영향은 Shakila 등(1996)의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 즉, Trypticase Soy Broth (TSB)에 전구체 아미노산(L-histidine monohydrochloride monohydrate, L-tyrosine disodium salt, L-lysine monohydrochloride 및 L-ornithine monohydrochloride, Sigma-Aldrich, 1 g/L)과 pyridoxal 5-phosphate (1 mg/L)를 첨가한 배지(BA-TSB)에 바이오제닉 아민 생성균을 각각 접종한 다음 35°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양액 1 ml를 채취하여 박테리오신 용액(150, 300 AU/ml) 혹은 배양 상등액(200 µl/ml)이 첨가된 BA-TSB (10 ml)에 접종한 다음 35°C에서 24시간 배양하였다. 배양액을 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C)해서 얻은 상등액을 0.22 µm membrane filter (Millipore Co.)로 여과한 다음 Eerola 등(1993)과 Mah 등(2003)의 방법을 일부 변형하여 바이오제닉 아민 함량을 측정하였다. 즉, 바이오제닉 아민 혼합 표준용액 500 ppm 및 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 µl를 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.

바실러스균과 유산균의 혼합 배양으로 제조한 청국장의 특성

청국장의 제조: 바이오제닉 아민 생성 바실러스균 단독(대조구) 및 바이오제닉 아민 생성 바실러스균과 박테리오신 생산 유산균의 혼합(실험구)으로 청국장을 제조한 후 청국장의 미생물학적 및 이화학적 특성을 조사하였다. 대두(100 g)를 수세한 후 증류수(1 L)에 24시간 침지한 후 물기를 빼고 121°C에서 30분간 증자 후 40~45°C 전후로 냉각시켰다. 바실러스균

은 BHI broth, 유산균은 MRS broth에 각각 접종하여 37°C, 24 시간 배양 후 얻은 배양액으로부터 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C)해서 모은 세포를 PBS (pH 7.0)로 세척하고 난 다음 각각의 균수를 1.0×10^6 CFU/ml로 조정하였다. 세포 현탁액을 증자된 콩에 1% (v/w)가 되도록 골고루 접종한 다음 80%의 습도 하에서 37°C, 72시간 발효시켜 청국장장을 제조하였다.

청국장장의 미생물학적 및 화학적 특성: 청국장장에 존재하는 세균수 측정을 위해 발효 완료된 시료 10 g에 증류수 90 ml를 가하여 스토마커로 균질화하고 일정한 단계까지 십진 희석한 시료 용액 중 바실러스균과 유산균수 측정을 위해 LB 및 MRS 평판배지에 각각 접종한 다음 37°C에서 24시간 배양 후 생성된 집락수를 계수하여 Log CFU/g으로 나타내었다. 한편, 균질화한 시료의 pH는 pH meter (Fisher Scientific)로 측정하였다. 적정산도 측정을 위해 시료 5 g에 동량의 증류수를 가하고 1% (w/v) 페놀프탈레인 지시약을 첨가한 다음 0.1 N NaOH 용액으로 적정하여 그 소비량을 측정하여 다음 계산식 [산도(%) = 0.1 N NaOH 소비량 × 0.1 N NaOH 역가 × 0.9] / 시료량에 대입하였다. 아미노태 질소는 Formol 적정법(Shon *et al.*, 2001)으로 측정하기 위해 시료 5 g을 취하여 멸균 증류수 50 ml에 현탁시킨 후 상온에서 약 30분간 교반시켰다. 시료 용액은 10,000 rpm에서 15분간 동안 원심분리하고 난 다음 0.45 μm syringe filter로 여과하여 얻은 여액 10 ml에 0.1% 페놀프탈레인 지시약을 첨가한 후 0.1 N NaOH 표준용액으로 미홍색이 될 때까지 적정하였다. 여기에 포르말린 용액(35~40%) 20 ml를 첨가한 후 pH 8.3이 될 때까지 소요된 0.1 N NaOH 표준용액의 양으로 아미노태 질소 함량을 계산하였다. 암모니아태 질소 함량은 암모니아태 질소 중화적정법(Lee *et al.*, 2012)으로 측정하기 위해 시료 5 g을 증류수와 혼합 진탕한 후 거즈로 여액과 대두를 분리하였다. 분리된 여액을 10,000 rpm에서 10분 동안 원심분리한 후 상등액을 20 ml로 정용하고, 적정 시료 용액으로 사용하였다. 상등액 전량에 4% NaOH 용액을 0.7 ml 첨가한 다음 산화마그네슘 0.3 g과 비등석을 넣고 증류수로 약 150 ml로 맞춘 후 증류하였다. 100 ml의 수기에 미리 0.05 N 황산용액 25 ml를 넣고 증류액을 약 70 ml 정도 모은 후 증류수로 100 ml로 정용하였다. 증류한 시료 100 ml를 500 ml 삼각플라스크에 옮기고 메틸레드-브롬크레졸그린 혼합 지시액 3~4방울을 넣은 다음 용액의 색이 자회색(pH 4.8)이 나타날 때까지 소요된 0.05 N NaOH 용액의 양으로부터 암모니아태 질소의 농도를 계산하였다. 바이오제닉 아민 함량은 Han 등(2007)의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 즉, 시료 5 g에 0.1 N HCl 20 ml를 가한 후 균질화한 다음 원심분리(7,000 × g, 20분, 4°C)한 후 상등액을 회수하고 남은 잔사에 0.1 N HCl를 가하여 반복

조작해서 상등액을 모두 합쳐 최종 50 ml에 맞춰 추출 용액으로 사용하였다. 시험 용액의 dansyl chloride를 이용한 유도체화한 후에 앞서 설명한 조건에 따라 HPLC를 이용하여 바이오제닉 아민 함량을 측정하였다.

통계처리

실험 항목별로 각각 3회씩 실험하여 얻은 결과값은 평균 ± 표준편차로 나타내었다. 바이오제닉 아민 생성 바실러스균에 대한 박테리옌 농도별 항균 활성에 관한 결과는 SPSS 프로그램(Ver. 12.0)의 Student's *t*-test를 통해 실험구와 대조구간에 유의적인 차이($P < 0.05$)를 확인하였다. 한편, 바이오제닉 아민 생성 바실러스균과 박테리옌 생성 유산균을 혼합하여 제조한 청국장장의 미생물학적 및 화학적 특성에 관한 결과는 일원배치 분산분석(One-Way ANOVA)의 Duncan's multiple range test를 통해 $P < 0.05$ 유의 수준에서 검정하였다.

결과 및 고찰

된장으로부터 바이오제닉 아민 생성 바실러스균 분리 및 동정

전통 발효 된장 10종을 대상으로 바실러스균을 분리한 후 바이오제닉 아민을 생성하는 균주를 선발하여 16S rRNA 염기서열 분석을 통해 동정한 결과 총 6종의 시료에서 유해 아민 생성 균주가 존재하는 것으로 확인되었다(Table 1). 시료 1에서는 카다베린을 생성하는 *B. licheniformis* DB102, 시료 2에서는 티라민을 생성하는 *B. subtilis* DB203, 카다베린 및 히스타민을 생성하는 *B. stearothermophilus* DB206, 카다베린을 생성하는 *B. pumilus* DB209가 분리되었다. 게다가 시료 3에서는 히스타민을 생성하는 *B. subtilis* DB310, 히스타민과 푸트레신을 생성하는 *B. coagulans* DB311, 카다베린과 푸트레신을 생성하는 *B. cereus* DB313이 확인되었고, 시료 7에서는 푸트레신을 생성하는 *B. amyloliquefaciens* DB714, 시료 9에서는 카다베린과 티라민을 생성하는 *B. amyloliquefaciens* DB915, 히스타민을 생성하는 *B. licheniformis* DB917 균주로 동정되었다. 시료 10에서는 티라민을 생성하는 *B. cereus* DB1019, 카다베린과 티라민을 생성하는 *B. subtilis* DB1020, 카다베린을 생성하는 *B. megaterium* DB1022가 분리되었고 시료별 분리 균주의 염기서열 분석 결과 96.3~100.0%의 상동성을 나타내었다. 이상의 결과, 시료별 내재된 바이오제닉 아민 생성 균종에 차이가 있었고, 동일한 균종일지라도 생성하는 바이오제닉 아민의 종류가 상이한 것으로 확인되었다.

Table 1. Screening and identification of biogenic amine producing-*Bacillus* spp. isolated from traditional Korean fermented Doenjang

Sample No.	Strain	Identification using 16S rRNA sequencing analysis		Biogenic amine-producing ability			
		Related strain in NCBI (Accession No.)	Similarity (%)	Cadaverine	Histamine	Putrescine	Tyramine
1	DB102	<i>Bacillus licheniformis</i> PBI (MH470474)	99.9	+	-	-	-
	DB203	<i>Bacillus subtilis</i> PS01 (MG496015)	99.0	-	-	-	+
2	DB206	<i>Bacillus stearothermophilus</i> N1233 (KY433303)	99.8	+	+	-	-
	DB209	<i>Bacillus pumilus</i> PM2 (KX350055)	98.1	+	-	-	-
3	DB310	<i>Bacillus subtilis</i> GS1 (MG273747)	96.3	-	+	-	-
	DB311	<i>Bacillus coagulans</i> LA204 (KM096994)	100.0	-	+	+	-
	DB313	<i>Bacillus cereus</i> B4 (KM391942)	99.7	+	-	+	-
7	DB714	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> PB3 (MH470473)	99.9	-	-	+	-
9	DB915	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SML1161 (MG937586)	97.2	+	-	-	+
	DB917	<i>Bacillus licheniformis</i> KKR2017 (MF040751)	98.0	-	+	-	-
	DB1019	<i>Bacillus cereus</i> WS-1 (MF964937)	99.9	-	-	-	+
10	DB1020	<i>Bacillus subtilis</i> SPB18 (KY082729)	100.0	+	-	-	+
	DB1022	<i>Bacillus megaterium</i> SAK (KM369985)	98.4	+	-	-	-

된장의 주 원료인 콩은 단백질 함량이 높기 때문에 가수분해되어 얻어진 유리 아미노산으로부터 다량의 바이오제닉 아민이 생성되므로 안전성에 대한 우려가 큰 식품이다. 재래식 및 개량식 된장에서 주로 검출되는 바이오제닉 아민으로는 푸트레신, 카다베린, 히스타민, 티라민, 스페르미딘 및 스페르민 등이 있다고 보고된 바 있는데(Cho *et al.*, 2006), 본 연구에 사용된 전통 발효 된장에서도 이들과 유사한 바이오제닉 아민을 생성하는 바실러스균이 분리되었다. Moon 등(2010)에 따르면, 된장으로부터 바이오제닉 아민을 생성하는 미생물을 탈탄산화배지 및 multiplex PCR 분석을 통해 확인한 결과, 히스타민 생성균인 *Clostridium* spp.과 티라민 생성균인 *Pseudomonas* spp. 등으로 동정되었다. Straub 등(1995)은 발효 식품으로부터 분리된 총 523균주를 대상으로 바이오제닉 아민(푸트레신, 카다베린, 히스타민, 티라민 및 페닐에틸아민) 생성능을 조사한 결과, *Lactococcus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp., *Streptococcus* spp. 및 *Lactobacillus pentosus*와 *L. sakei* 등과 같은 *Lactobacillus* spp.은 생성하지 않았던 반면 *Carnobacteria* spp., *L. buchneri*, *L. curvatus*, *L. reuteri*, *Staphylococcus carnosus* 등은 다량의 바이오제닉 아민을 생성하였고, *L. alimentarius*, *L. brevis*, *L. bavaricus*, *L. delbrueckii* ssp. *lactis*, *Micrococcus* spp. 및 *Staphylococcus piscifermentans* 등도 소량 생성하는 것으로 확인되었으나, 본 연구에서 실험한 전통 발효 된장 내에는 우점종인 바실러스균들이 바이오제닉 아민 생성량을 증가시키는 원인균으로 확인되었다.

Bai 등(2013)에 따르면, 춘장으로부터 분리된 미생물을 동정할 결과, 주로 분포하는 세균으로는 *B. subtilis* (91.0%), *B.*

coagulans (4.5%), *B. licheniformis* (1.1%) 및 *Bacillus firmus* (1.1%) 등으로 확인되었다. 이 중에서 우점종인 *B. subtilis*는 바이오제닉 아민 생성능이 비교적 약하게 나타났고, *B. coagulans*는 다른 바실러스속 균주들에 비해 가장 낮은 바이오제닉 아민을 생성하였는데 이는 본 연구의 결과와 유사하게 발효 장류에서는 바실러스균들이 유해 아민을 주로 생성에 관여하는 것으로 확인되었다.

바이오제닉 아민 생성 바실러스균에 대한 박테리오신 생산 유산균 동정 및 항균 활성

바이오제닉 아민 생성 바실러스균에 대해 항균 활성을 나타내는 박테리오신을 생산하는 유산균을 분리 동정한 결과는 Table 2와 같다. DLA205 균주의 염기서열 분석 결과 99.0%의 상동성을 나타내는 *Lactobacillus plantarum*으로 동정되었고, 이 균주가 생산한 박테리오신은 *B. licheniformis* DB102 (1,024 BU/ml)와 *B. subtilis* DB310 (512 BU/ml)에 대해 항균 활성을 나타내었다. DLA501 균주는 *L. brevis* (상동성 97.5%)로 동정되었고, *B. subtilis* DB310 (128 BU/ml), *B. coagulans* DB311 (16 BU/ml) 및 *B. amyloliquefaciens* DB714 (32 BU/ml)에 대해 항균 작용을 나타내는 박테리오신을 생산하였다. DLA 509 균주는 *L. fermentum*으로 동정되었고 상동성은 100.0%으로 확인되었으며, *B. subtilis* DB203 (256 BU/ml), *B. cereus* DB313 (64 BU/ml) 및 *B. subtilis* DB1020 (2048 BU/ml)에 대한 항균 활성을 나타낸 박테리오신을 생산하였다. DLA703 균주는 *L. acidophilus* (상동성 99.5%)으로 동정되었고, 이 균주가 생산하는 박테리오신은 바이오제닉 아민 생성 바실러스균

Table 2. Identification and antibacterial activity of bacteriocin-producing LAB against biogenic amine-forming *Bacillus* spp.

Bacteriocin producing-LAB		Strain				
		DLA205	DLA501	DLA509	DLA703	DLA804
Identification using 16S rRNA sequencing analysis	Related strain in NCBI (Accession No.)	<i>Lactobacillus plantarum</i> 002A (MH532530)	<i>Lactobacillus brevis</i> Z22 (KX608727)	<i>Lactobacillus fermentum</i> 6702 (KX218443)	<i>Lactobacillus acidophilus</i> CKCS01 (KX822694)	<i>Enterococcus faecalis</i> F3S2 (KY486244)
	Similarity (%)	99.0	97.5	100.0	99.5	98.1
Bacteriocin activity (AU/ml)	<i>B. licheniformis</i> DB102	1,024	-	-	-	-
	<i>B. subtilis</i> DB203	-	-	256	-	-
	<i>B. stearothermophilus</i> DB206	-	-	-	-	-
	<i>B. pumilus</i> DB209	-	-	-	-	8
	<i>B. subtilis</i> DB310	512	128	-	-	-
	<i>B. coagulans</i> DB311	-	16	-	-	-
	<i>B. cereus</i> DB313	-	-	64	-	-
	<i>B. amyloliquefaciens</i> DB714	-	32	-	-	512
	<i>B. polymyxa</i> DB915	-	-	-	-	-
	<i>B. licheniformis</i> DB917	-	-	-	-	8
	<i>B. cereus</i> DB1019	-	-	-	-	-
	<i>B. subtilis</i> DB1020	-	-	2,048	-	-
	<i>B. megaterium</i> DB1022	-	-	-	128	-

LAB, lactic acid bacteria.

들 중 유일하게 *B. megaterium* DB1022 (128 BU/ml)에 대해 항균 활성을 나타내었다. DLA804 균주는 98.1%의 상동성을 나타낸 *Enterococcus faecalis*로 동정되었고, 생산한 박테리오킨은 *B. pumilus* DB209 (8 BU/ml), *B. amyloliquefaciens* DB714 (512 BU/ml) 및 *B. licheniformis* DB917 (8 BU/ml)에 대해 항균 활성을 나타내었다. 이상의 결과에서 볼 때, 유산균이 생산한 박테리오킨의 항균 스펙트럼은 균종에 따라 다르며, 지시 균주의 종류에 따라 박테리오킨의 항균 활성에도 큰 차이가 있음을 할 수 있었다.

항균 활성을 나타낸 유산균의 박테리오킨이 바실러스균의 생균수 및 바이오제닉 아민 생성량에 미치는 영향을 살펴본 결과는 Table 3과 같다. *L. plantarum* DLA205가 생산한 박테리오킨 용액 150 및 300 BU/ml를 처리한 결과, *B. licheniformis* DB102의 생균수는 대조구에 비해 각각 2.5 및 3.6 log cycle 감소되었고, 카다베린의 생성량도 유의하게 감소되었다. 하지만 DLA205의 항균 활성은 *B. licheniformis* DB102에 대한 것보다 *B. subtilis* DB310의 균수 및 아민 생성 억제에 대해선 다소 낮게 나타났다. *L. brevis* DLA501의 박테리오킨은 150 BU/ml 이상 처리한 경우 대조구에 비해 유의하게 생균수 감소 및 바이오제닉 아민 생성량 감소 효과가 나타났으나, 활성의 정도는 *L. plantarum* DLA205보다는 낮게 나타났다. *L. fermentum* DLA509가 생산한 박테리오킨의 항균 활성은 *B. subtilis* DB

1020에 대해 가장 높게 나타나 이들의 생균수는 박테리오킨 용액 150 BU/ml 처리에 의해 대조구보다 약 4.4 log cycle 이상 감소되었고, 카다베린과 티라민의 생성량도 60% 이상 감소시켰다. *L. acidophilus* DLA703의 박테리오킨 용액도 *B. megaterium* DB1022의 생균수를 효과적으로 감소시켰으며 그에 따라 카다베린의 생성량도 대조구에 비해 각각 20% (150 BU/ml) 및 40% (300 BU/ml) 정도 낮게 나타났다. *E. faecalis* DLA804가 생산한 박테리오킨 300 BU/ml을 처리한 경우 *B. pumilus* DB209와 *B. amyloliquefaciens* DB714의 생균수는 대조구에 비해 각각 1.7과 3.1 log cycle 감소하였으나, *B. licheniformis* DB917의 생균수 감소 효과는 거의 나타나지 않았다. 게다가 DB714가 생성한 푸트레신 함량은 DLA804 균주의 박테리오킨에 의해 유의하게 감소되었으나, DB209와 DB917이 생산한 카다베린과 히스타민의 함량은 대조구와 비슷한 수준이었다.

한편, 본 실험에 사용된 총 5종의 유산균 배양 상등액 200 µl/ml를 처리한 경우 바실러스균의 생균수 감소 및 바이오제닉 아민 생성량 저하에 관한 유의할 만한 효과는 나타나지 않았다(결과 미제시). 이상의 결과에서 볼 때 박테리오킨의 항균 활성은 유산균의 종류에 따라 바실러스균에 대한 항균 스펙트럼 및 항균 활성에 차이가 있으며, 박테리오킨에 의한 바실러스균의 증식이 억제됨에 따라 이들이 생산한 바이오제닉 아민

생성량 감소 효과도 나타났다. 하지만 본 연구에 사용된 유산균이 생산한 유산의 함량은 대략 $85.4 \pm 1.9 \sim 112.4 \pm 3.0$ mM (결과 미제시)로 측정되었는데, 이 정도의 유산 양으로는 바이오제닉 아민 생성 바실러스균의 균수 및 유해 아민 생성량 감소에는 크게 영향을 미치지 못하였다.

유산균의 박테리오신은 다양한 그람 양성 및 음성의 부패균이나 식중독균에 대한 증식 및 유해균의 대사산물 생성 억제 등의 항균 활성을 나타내는 것으로 많은 연구 결과를 통해 밝혀진 바 있다. Abdulla (2014)는 요구르트로부터 분리된 *L. acidophilus* LB1-LB6의 총 6균주가 생산한 박테리오신은 *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pyrogenes* 보다 더 강하게 *B. subtilis*의 증식을 억제할 수 있었다고 보고한 바 있다. 게다가 유제품, 육류, 해산물 및 와인으로부터 분리된 *L. fermentum*, *L. plantarum* 및 *L. brevis*가 생산한 박테리오신도 *B. cereus* MTCC 1305에 강한 항균 활성을 나타낸 것으로 보고된 바 있다(Gandevia et al., 2017). 이전 보고(Lim, 2016)에 의하면 멸치 젓갈로부터 분리된 *Pediococcus acidilactici* MCL11이 생산한 박테리오신도 히스타민 생성균인 *B. licheniformis* MCH01에 대해 높은 항균 활성(256 BU/ml)을 나타낸 것으로 확인된 바 있는데 이는 바이오제닉 아민을 생성하는 바실러스균에 대한 본 연구의 유산균으로부터 얻어진 박테리오신의 항균 활성과도 유사하다. 박테리오신을 생산하는 enterococci와 *L. lactis*는 히스타민 생성균인 *L. buchneri* St2A의 과도한 증식을 완전하게 억제하여 치즈 내에서 히스타민이 전혀 검출되지 않았다(Joosten and Nuñez, 1996). 게다가, lacticin이란 박테리오신을 생산하는 *L. lactis* subsp. *lactis* EF46은 유해 아민 생성균인 *S. thermophilus* PRI60의 증식 억제 및 히스타민 축적능을 효과적으로 억제하였다고 보고된 바 있어(Tabanelli et al., 2014), 본 연구 결과와 유사하게 특정 유산균이 생산한 박테리오신은 바이오제닉 아민 생성균에 대한 항균 활성을 나타내는 것으로 확인되었으므로 이들 균주들을 유해 아민 생성 위험이 높은 식품 제조에 활용한다면 아민의 독성 위험을 낮추는데 효과적일 것으로 판단된다.

한편, 유산균이 생산한 대표적인 항균 물질인 유기산은 비해리된 분자가 확산을 통해 세포막을 투과하여 세포질 내 pH를 감소시켜 세포막 전위를 방해하고 세포의 필수 대사 기능을 마비시킬 뿐만 아니라 능동 수송을 어렵게 하여 물질 이동을 방해함으로써 결국 세포를 사멸시킨다(Kashket, 1987). *L. lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus acidophilus*, *S. thermophilus* 및 *L. plantarum* 등으로부터 얻은 배양 상등액이 푸트레신, 티라민 및 히스타민의 생성을 억제하는데 효과적이라는 사실도 확인된 바 있다(Ozogul et al., 2017). 된장으

로부터 분리된 *B. subtilis* BCNU 9171로부터 얻은 배양 상등액 75% 처리한 경우 *Escherichia coli*가 생성한 바이오제닉 아민은 87.3%, 50% 첨가했을 때에는 68.1% 감소되었다(Park and Joo, 2017). 하지만 이들 결과와는 달리 본 연구에서 실험한 유산균의 배양 상등액(200 μ l/ml)으로는 바이오제닉 아민 생성 바실러스균의 증식 억제 효과를 얻을 수 없었는데 이는 바실러스균은 유기산에 대한 내성이 강한 포자 형성균으로서 유산균이 생산한 유산의 양으로는 증식과 유해 대사산물 생성을 억제하기 어려운 것으로 추정된다.

선발된 균주로 제조한 청국장기의 이화학적 특성

바실러스균에 대하여 항균 활성이 500 BU/ml 이상인 박테리오신을 생산하는 유산균과 바실러스균의 혼합 배양에 의해 제조한 청국장기의 바실러스균 및 유산균의 생균수와 이화학적 특성에 관해 조사한 결과는 Table 4와 같다. *B. licheniformis* DB102 및 *L. plantarum* DLA205와의 혼합 배양 결과, 대조구(바실러스균 단독 배양)에 비해 바실러스균은 약 1.6 log cycle 낮았고, 유산균수는 $8.4 \pm 2.6 \times 10^8$ CFU/g에 이르렀으며, pH (5.57 ± 0.33)는 낮아진 반면 산도($0.48 \pm 0.06\%$)는 높아졌다. 게다가 아미노태 질소 함량(424.63 ± 0.66 mg%)은 증가된 반면, 암모니아태 질소량(143.73 ± 0.08 mg%)과 카다베린의 함량(281.4 ± 22.3 mg/g)은 유의하게 감소되었다. 한편, *L. plantarum* DLA205와 *B. subtilis* DB310을 혼합한 경우 유산균의 생균수는 *B. licheniformis* DB102와 혼합했을 때와 비슷한 수준이었으나, 바실러스균의 생균수는 다소 높게 나타났으며, pH, 암모니아태 질소 및 바이오제닉 아민 함량 감소 효과와 산도와 아미노태 질소 함량의 증가량은 *B. licheniformis* DB102보다 낮았다. *L. fermentum* DLA509와 *B. subtilis* DB1020을 혼합 배양한 청국장 내 바실러스균의 생균수는 실험 균주들 중 가장 낮은 값을 나타내었고 유산균수도 가장 높게 측정되었으며, pH는 가장 낮은 반면 그에 따라 산도는 가장 높게 측정되었다. 암모니아태 질소 및 바이오제닉 아민 함량의 감소 효과 및 아미노태 질소 함량의 증가량도 유의하게 높았다. 하지만 *E. faecalis* DLA804와 *B. amyloliquefaciens* DB714의 혼합 배양으로 제조한 경우에는 본 연구에 사용된 바실러스균 중에서 가장 많은 생균수가 측정되었고, pH와 산도는 *L. plantarum* DLA205와 *B. subtilis* DB310의 혼합으로 제조한 청국장과 비슷한 수준이었다. 또한 암모니아태 질소 함량 및 바이오제닉 아민 함량 감소율과 아미노태 질소 함량 증가율도 다른 균주들과 혼합했을 때보다 효과가 낮게 나타났다. 이상의 결과에서 볼 때 유산균과 바실러스균을 혼합하여 청국장을 제조할 경우 바실러스균 단독 배양일 때보다 생균수는 유의하

Table 3. Changes in the viable cell counts and biogenic amine-production ability of *Bacillus* spp. by treatment of the bacteriocin obtained from LAB

LAB	Viable cell counts (CFU/ml)				Cadaverine (mg/L)				Histamine (mg/L)				Putrescine (mg/L)				Tyramine (mg/L)			
	0	150	300	LAB	0	150	300	LAB	0	150	300	LAB	0	150	300	LAB	0	150	300	
<i>Bacillus</i> sp.																				
<i>L. plantarum</i> DLA205	4.7±	9.7±	8.4±	85.3±	347.5±	127.4±	85.3±	NT	184.7±	112.3±	105.7±	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
<i>B. licheniformis</i> DB102	1.2×10 ⁷	3.5×10 ⁸ *	3.0×10 ⁸ *	10.7*	20.8	11.4*	10.7*	NT	39.0	25.7*	13.6*	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
<i>B. subtilis</i> DB310	1.0±	4.6±	1.4±	0.6×10 ⁷ *	NT	NT	NT	NT	184.7±	112.3±	105.7±	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
<i>B. subtilis</i> DB310	4.5±	8.7±	3.3±	1.5×10 ⁸ *	NT	NT	NT	NT	437.8±	315.4±	270.1±	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
<i>B. coagulans</i> DB311	3.0×10 ⁸	1.2×10 ⁸ *	1.5×10 ⁸ *	0.4×10 ⁷	NT	NT	NT	NT	20.3	9.7*	13.5*	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
<i>L. brevis</i> DLA501	5.2±	4.9±	1.1±	0.3×10 ⁷ *	NT	NT	NT	NT	516.2±	489.3±	420.7±	2089.2±	1750.2±	1300.4±	12.9*	NT	NT	NT	NT	NT
<i>B. amyloliquefaciens</i> DB714	7.1±	5.3±	1.5±	0.1×10 ⁸ *	NT	NT	NT	NT	8.2	2.9*	7.7*	703.5±	567.4±	471.2±	NT	NT	NT	NT	NT	NT
<i>B. subtilis</i> DB203	1.9±	9.5±	2.4±	0.7×10 ⁷ *	NT	NT	NT	NT	4.1	10.8*	4.5*	169.4±	130.4±	94.0±	NT	NT	NT	NT	NT	NT
<i>B. cereus</i> DB313	4.3±	1.0±	3.7±	2.8×10 ⁷ *	942.3±	725.4±	605.7±	NT	1663.5±	951.4±	824.7±	7.5	2.7*	5.5*	NT	NT	NT	NT	NT	NT
<i>B. subtilis</i> DB1020	2.4±	8.8±	9.1±	4.0×10 ⁸ *	142.5±	50.4±	33.7±	NT	26.8	20.1*	12.4	541.7±	207.4±	143.8±	NT	NT	NT	NT	NT	NT
<i>B. megaterium</i> DB1022	3.0×10 ⁸	3.6×10 ⁸ *	4.0×10 ⁸ *	0.1×10 ⁶ *	8.9	4.5*	12.5*	NT	NT	NT	NT	36.8	10.7*	22.7*	NT	NT	NT	NT	NT	NT
<i>B. pumilus</i> DB209	6.2±	1.7±	8.2±	1127.7±	1402.7±	1127.7±	830.7±	NT	928.5±	903.5±	887.2±	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
<i>E. faecalis</i> DLA804	0.4×10 ⁸	3.0×10 ⁸ *	0.1×10 ⁶ *	2.0×10 ⁷	751.5±	773.8±	759.3±	NT	16.9	30.4	5.5*	852.4±	517.3±	446.2±	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	7.5±	5.6±	0.5±	1.8×10 ⁸ *	19.1	22.9	9.9	NT	13.7	6.1*	10.3*	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	2.8×10 ⁹	0.7×10 ⁸	1.8×10 ⁸ *	1.1×10 ⁸ *	NT	NT	NT	NT	928.5±	903.5±	887.2±	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	5.3±	8.1±	4.8±	2.2×10 ⁷	NT	NT	NT	NT	16.9	30.4	5.5*	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	6.6±	1.1±	4.7±	2.0×10 ⁷	NT	NT	NT	NT	928.5±	903.5±	887.2±	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	3.3×10 ⁷	2.5×10 ⁸	2.0×10 ⁷						16.9	30.4	5.5*	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT

Data are Means ± SD from triplicate determinations.
 *Significantly differ ($P < 0.05$) from the control group by Student's *t*-test.
 NT, not tested.

Table 4. Microbiological and physicochemical characteristics of Cheonggukjang prepared with mixed starter cultures of biogenic amine-forming *Bacillus* spp. and bacteriocin-producing lactic acid bacteria

<i>Bacillus</i> sp.	Starter	Viable cell counts (CFU/g)		pH	Titratable acidity (%)	Amino type nitrogen contents (mg%)	Ammonium nitrogen contents (mg%)	Biogenic amine contents (mg/g)				
		<i>Bacillus</i>	LAB					Cadaverine	Histamine	Putrescine	Tyramine	
<i>B. licheniformis</i> DB102	Control	5.4±1.1×10 ^{8c}	ND	7.14±0.12 ^c	0.15±0.01 ^a	366.37±2.03 ^a	187.52±0.15 ^b	451.7±11.7	NT	NT	NT	NT
<i>L. plantarum</i> DLA205	<i>L. plantarum</i> DLA205	9.7±2.0×10 ^{6ab}	8.4±2.6×10 ^{8ab}	5.57±0.33 ^a	0.48±0.06 ^b	424.63±0.66 ^b	143.73±0.08 ^a	281.4±22.3	NT	NT	NT	NT
<i>B. subtilis</i> DB310	Control	7.1±0.5×10 ^{8d}	ND	6.99±0.02 ^c	0.24±0.02 ^a	354.11±1.75 ^a	214.71±0.22 ^{bc}	NT	146.7±9.7	NT	NT	NT
<i>L. plantarum</i> DLA205	<i>L. plantarum</i> DLA205	2.0±1.6×10 ^{7b}	6.8±0.4×10 ^{8b}	5.91±0.19 ^b	0.35±0.04 ^b	400.35±0.42 ^{ab}	185.42±0.11 ^b	NT	106.8±7.6	NT	NT	NT
<i>B. subtilis</i> DB1020	Control	8.2±3.4×10 ^{8c}	ND	7.37±0.11 ^c	0.10±0.01 ^a	396.01±1.94 ^{ab}	199.48±0.26 ^b	180.5±13.0	NT	NT	NT	NT
<i>L. fermentum</i> DLA509	<i>L. fermentum</i> DLA509	3.6±1.8×10 ^{6a}	1.5±0.9×10 ^{9b}	5.32±0.21 ^a	0.62±0.07 ^{bc}	467.82±0.89 ^{bc}	129.61±0.19 ^a	111.5±8.8	NT	NT	NT	620.7±10.2
<i>B. amyloliquefaciens</i> DB714	Control	1.7±0.2×10 ^{9d}	ND	7.26±0.06 ^c	0.12±0.03 ^a	402.57±0.86 ^{ab}	254.0±0.09 ^d	NT	NT	NT	NT	499.2±16.8
<i>E. faecalis</i> DLA804	<i>E. faecalis</i> DLA804	4.6±3.0×10 ^{8c}	5.0±1.0×10 ^{8b}	5.87±0.17 ^{ab}	0.39±0.01 ^b	448.30±0.51 ^b	230.64±0.05 ^d	NT	NT	NT	NT	1246.5±33.5
								NT	101.6±29.7	NT	NT	NT

Data are Means ± SD from triplicate determinations and means with the different letters in the same column are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test of One-Way ANOVA.
 NT, not tested.

게 낮았는데 이는 유산균과 영양분의 경합에 의하거나 유산균의 증식에 따라 생산된 박테리오신으로 인하여 바실러스균의 증식이 억제된 것으로 추정된다. 발효 과정 중 유산균이 증식에 따라 유기산이 생성되어 pH는 감소된 반면 산도는 증가하게 되었고, 유해 아민을 생성하는 바실러스균에 대한 항균작용으로 탈탄산 효소의 활성 감소로 인해 암모니아태 질소 및 바이오제닉 아민 함량이 감소하게 된 것으로 판단된다. 한편 바실러스균 뿐만 아니라 유산균에서 기인하는 단백질 분해 효소의 활성에 의해 아미노태 질소 함량은 증가된 것으로 사료된다.

발효 장류는 원료 내에 세린, 프롤린, 히스티딘, 글루탐산, 아스파탐, 페닐알라닌 등의 유리 아미노산을 함유하므로 이로부터 바이오제닉 아민이 생성되는 것으로 알려져 있다(Seok *et al.*, 1994). 청국장은 콩 단백질의 분해 과정 중 탈아미노 반응에 의해 생성된 암모니아태 질소의 함량이 증가할수록 이취가 많이 나므로 이를 변패 또는 이상발효의 지표로 이용한다. 한편 아미노태 질소는 단백질 분해 효소에 의해 단백질이 아미노산으로 분해되는 정도를 나타내므로 청국장이나 된장 등 발효 장류의 구수한 맛과 품질을 나타내는 지표 값으로써 식품 공전 상에는 0.28% 이상 함유되도록 명시되어 있는데(Lee *et al.*, 2014), 본 연구의 결과 바실러스균 단독 배양보다는 유산균과의 혼합 배양에 의해 암모니아태 질소 함량은 감소되었고, 아미노태 질소 함량은 증가되어 공전 기준치보다 높은 것으로 나타났다.

Bai 등(2013)은 춘장 시료 내 히스타민과 티라민 함량의 확연한 차이는 시료의 물리화학적 및 미생물학적 차이에 기인한다고 하였다. Hassaine 등(2009)에 따르면, 바이오제닉 아민 생산을 위한 최적의 pH는 약산성이라고 하였는데 본 연구에서는 유산균의 유산에 의해 청국장의 pH는 약산성에 도달하였으나, 유산균의 박테리오신 생성으로 인하여 바실러스균의 증식이 억제됨으로써 유해 아민의 함량이 낮아진 것으로 판단된다. 한편, Mah와 Hwang (2009)은 식염 첨가에 의해 유해 아민의 생성량이 감소된다고 하였고 Byun 등(2012)은 바이오제닉 아민 함량은 시료 내 생균수가 많을수록 증가한다고 보고한 바 있어 유해 아민의 생성량은 배양 조건에 따라 상이하며, 본 연구 결과도 이들과 유사하게 아민 생성균의 균수가 낮을수록 아민의 함량이 낮은 것을 알 수 있었다.

아민 분해능이 있는 *L. plantarum* D-103 균주로 미소 된장을 25°C에서 120일간 발효시켜 제조한 결과, 발효 기간 동안 식염 농도는 10.4%로 일정하게 유지되었고 pH는 6.2에서부터 4.6으로 감소되었다. 게다가 발효 40일 후 총 휘발성 염기 질소량은 대조구에 비해 유의하게 낮게 검출되었으며, 120일

후에는 히스타민과 총 바이오제닉 아민의 함량은 각각 58%와 27% 감소되었음을 확인하였으므로 바이오제닉 아민 분해능을 가진 스타터의 적용은 유해 아민의 축적을 효과적으로 감소시킬 수 있다(Lee *et al.*, 2016). Lee 등(2014)에 따르면, *B. subtilis* MC31과 *L. sakei* 383 균주로 혼합 발효한 청국장의 pH는 시간이 지남에 따라 서서히 증가하여 초기에는 6.52 ± 0.0066 이었으나, 72시간 후에는 7.88 ± 0.0066 으로 나타났고 총산도는 0시간에는 $0.17 \pm 0.0020\%$ 이었으나, 72시간 후에는 $0.04 \pm 0.0000\%$ 로 감소되었다. 암모니아태 질소 함량은 $213.35 \pm 0.08 \text{ mg}\%$ 이었는데 이는 *B. subtilis* MC31 단독으로 발효시킨 청국장의 암모니아태 질소 함량($238.74 \pm 0.18 \text{ mg}\%$) 보다 낮게 나타나 유산균과 혼합 발효한 경우 이취의 발생을 감소시킬 수 있었다. 또한 이들 균주들로 혼합 발효시킨 청국장 내 아미노태 질소 함량은 $419.49 \pm 1.08 \text{ mg}\%$ 로 발효가 진행됨에 따라 대두의 단백질이 분해됨에 따른 것이라고 보고한 바 있다. 또한 *B. subtilis* CKB 단독 혹은 *L. plantarum* ATCC 8014와 혼합 배양에 의해 청국장을 제조하여 생균수와 pH 변화를 조사한 결과, 바실러스 균수는 배양 12시간 만에 약 10^4 CFU/g으로 증가되었고 pH는 초기 6.5로부터 96시간 배양 후 7.7로 증가되었다. 반면 유산균과 혼합 배양한 경우 바실러스 균수는 단일 배양한 경우와 거의 차이 없었던 반면, 유산균의 균수는 초기(5.0×10^7 CFU/g)에서부터 서서히 감소되어 96시간 발효 후에는 $9.0 \times 10^5 \sim 2.1 \times 10^6$ CFU/g 정도 검출되었다. 혼합 배양에 의해 96시간 만에 청국장의 pH는 7.2로 단독 배양에 비해 다소 낮았는데 이는 유산균의 영향인 것으로 보여진다. 이러한 결과는 청국장의 원료인 대두 내 영양소를 바실러스균이 주로 이용하여 증식하였으며 바실러스균의 급격한 생육으로 인하여 유산균의 증식은 억제된 것으로 추정하여 본 연구 결과와는 다소 차이가 있었다.

한편, 바실러스균 단독 배양일 때보다 유산균과의 혼합 배양일 때 적정 산도가 더 높게 나타났으며 이는 유산균이 생산한 유기산에 기인하는 것으로 여겨진다. 바실러스균 단독으로 발효한 경우 아미노태 질소 함량은 0.44%인 반면 유산균과 혼합 배양한 경우 0.46%로 나타나 유의한 차이는 없었으며, 암모니아태 질소 함량은 바실러스의 단독 배양과 유산균과의 혼합 배양에 의해 각각 75.6 mg%과 50.4~56.0 mg%으로 나타났다고 보고된 바 있는데 (Ju and Oh, 2009), 이들과 유사하게 본 연구 결과에서 보듯이 청국장 제조 시 바실러스균과 항균 물질을 생산하는 유산균과 혼합 배양하게 되면 유기산 생성에 의해 pH는 감소하는 반면, 산도는 증가하게 되며, 박테리오신 등의 항균 물질 생성에 따라 아민 생성균의 증식 억제 및 사멸로 인하여 암모니아태 질소 및 바이오제닉 아민 함량이 감소

되었음을 확인하였다.

정상적인 조건 하에서 식품으로 섭취된 바이오제닉 아민은 장관 점막 내 아민 산화효소(amine oxidase)에 의해 신속하게 분해된다. 이들 효소는 산화된 아미노기의 수에 의존하여 monoamine oxidase (MAO)와 diamine oxidase (DAO)로 분류된다. 특히 히스타민은 메틸이나 에틸 전이효소에 의해 무독화될 수도 있으나(Linares *et al.*, 2011), 이들 효소가 유전학적인 결함이나 알코올 혹은 항우울제와 같은 저해제의 섭취로 인해 기능 장애가 유발되면 바이오제닉 아민은 순환계로 들어가서 인체 각 기관에 독성을 발휘하여 건강 상에 심각한 문제를 초래하게 된다(McCabe-Sellers *et al.*, 2006). 바이오제닉 아민은 아미노산의 탈탄산 효소 생성능이 있는 미생물에 기인하는 것으로 이들로 인해 식품 내에 고농도로 축적되고 이를 섭취하게 되면 아민 산화효소에 의한 무독화 메커니즘의 능력을 상실하게 되어 중독 증상을 유발하게 된다. 바이오제닉 아민의 양이 1,000 mg/kg을 초과하게 되면 메스꺼움, 호흡 곤란, 두통, 혈압 상승 혹은 하강을 유발하게 되므로 독성을 나타내는 아민의 생성량을 감소시키기 위한 물리화학적 및 미생물학적 방법에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다(Chang and Chang, 2012).

바이오제닉 아민의 제어를 위해선 초고압 살균, 방사선 조사, 식염이나 포도당 첨가, 낮은 pH, 혐기성 상태, 보존료와 같은 식품 첨가물을 처리할 경우 유의한 저감 효과를 얻을 수 있다고 보고된 바 있다. 비록 바이오제닉 아민 생성은 저온에서 억제되나, 일부 5°C 이하에서 증식 가능한 저온성 세균도 냉장 온도에서 유해 아민을 생성하는 것으로 확인된 바 있으므로 저온 저장은 효과적인 방법이 아닌 것으로 보고되었다. 이외에도 가열 처리나 냉동 저장을 통해서도 아민의 함량을 어느 정도 감소시킬 수 있긴 하나 이러한 물리적인 방법은 식품의 물성이나 관능학적으로 품질 악화와 영양가 파괴를 초래할 수 있으므로 제한적으로 이용되고 있다(Leuschner *et al.*, 1998; Naila *et al.*, 2010). 이러한 단점을 보완하기 위해선 발효 식품 제조 시 신선한 원료를 사용하고 바이오제닉 아민 생성균에 오염되지 않도록 위생적으로 관리해야 하며, 아민 산화효소 생성능이 있는 미생물을 발효 식품 스타터로 이용하여 아민을 분해시킴으로써 아민의 위해를 감소시킬 수 있다(Zaman *et al.*, 2011). 게다가 유해 아민의 저감화를 위한 미생물학적 방법으로는 박테리오신을 비롯하여 유산, 초산, 과산화수소, 류테린(reuterin), 디아세틸(diacetyl), 지방산 등 다양한 항균 물질을 생산하는 유산균을 이용하는 연구가 활발하게 진행되고 있다. 유산균은 발효 식품의 스타터로서 항균 물질 생산에 의해 부패균이나 식중독균의 증식을 억제함으로써 안전성과 품

질 및 풍미 향상에도 유용하며, 프로바이오틱 균주로서 유해 아민으로 인한 알레르기 및 암 발생 위험을 낮춰 줄 뿐만 아니라 항암, 항산화, 항콜레스테롤, 면역 기능 강화 등의 기능성을 나타내므로 인체 건강에 대해 유익균으로 알려져 있다(Naila *et al.*, 2010; Ghanbari *et al.*, 2013).

다양한 그람 양성 및 음성 세균은 증식하는 동안 항균 활성을 나타내는 박테리오신이라는 단백질 구조의 물질을 생산한다. 박테리오신은 리보솜에 의해 합성되며 2차 대사 산물인 항생제와는 달리 주로 성장 단계 동안 생산된다. 이 화합물은 분자량이 거의 10 kDa 정도의 저분자 화합물로서 번역 후 변형(posttranslational modification)되며, 포유 동물의 장내 소화 효소인 프로테아제(protease)에 의해 쉽게 분해되므로 식품에 이용하여 섭취하게 되더라도 체내 잔류 위험이 극히 낮다(Beasley and Saris, 2004). 박테리오신을 생산하는 세균 중에서도 특히 유산균에 주목하는 이유는 오래전부터 사용되어 오면서 안전성이 충분히 입증되었고 다양한 생리 활성이 보고되고 있기 때문이다. 유산균의 박테리오신은 천연 물질의 생물학적 보존제로서 제조 및 저장하는 동안 유해 세균으로부터 식품의 품질을 보존할 수 있을 뿐만 아니라 독성 발생 위험이 극히 낮아 미국 FDA 인정 식품 첨가 안전 물질(generally recognized as safe, GRAS)로서 식품 산업에 널리 이용되고 있다(And and Hoover, 2003). 박테리오신의 항균 메커니즘으로는 효소의 불활성화를 통한 대사 반응 정지, 세포막에 분포하는 음이온 지질과 반응하여 막에 구멍을 뚫어 세포 내 유용 성분을 유출시키거나 세포막의 기능을 마비시킴으로써 결국 세균을 사멸시킨다(Vesković Moračanin *et al.*, 2014). 따라서 아민 생성균에 대한 항균 활성을 나타내는 박테리오신 생산 유산균의 이용을 통해 유해 아민의 독성 위험을 낮출 수 있으며, 특히 기능성이 뛰어난 프로바이오틱 유산균을 발효 스타터로 활용한다면 건강에 이로운 안전한 발효 식품 제조가 가능할 것으로 사료된다. 향후에는 식품의 품질 저하를 유발할 수 있는 물리화학적 단독 처리보다는 안전한 천연 항균 물질을 혼용하는 허들 테크놀로지(hurdle technology)를 통해 유해 아민 제어 효과를 극대화시킬 수 있는 방법에 관한 연구를 진행할 것이다.

적 요

본 연구에서는 된장으로부터 바이오제닉 아민 생성 바실러스균과 박테리오신 생산 유산균은 16S rRNA 염기서열 분석을 통해 동정하였고, 이들 균주들의 혼합 배양으로 제조한 청국장

의 이화학적 및 미생물학적 특성을 조사하였다. 총 10종의 시료로부터 바이오제닉 아민을 생성하는 바실러스균은 *Bacillus licheniformis* DB102, *B. subtilis* DB203, *B. stearothermophilus* DB206, *B. pumilus* DB209, *B. subtilis* DB310, *B. coagulans* DB311, *B. cereus* DB313, *B. amyloliquefaciens* DB714, *B. amyloliquefaciens* DB915, *B. licheniformis* DB917, *B. cereus* DB1019, *B. subtilis* DB1020, *B. megaterium* DB1022로 동정되었다. 바이오제닉 아민 생성 바실러스균에 대해 항균 활성을 나타낸 박테리옌 생산균은 *Lactobacillus plantarum* DLA 205, *L. brevis* DLA501, *L. fermentum* DLA509, *L. acidophilus* DLA703 및 *Enterococcus faecalis* DLA804로 확인되었다. 유산균의 박테리옌은 농도의존적으로 바이오제닉 아민 생성균의 생균수 및 아민 생성능을 유의하게 감소시켰다. 따라서 유해 아민 생성균에 대한 항균 활성을 나타낸 유산균의 증식에 따라 유산균과 바실러스균을 혼합 배양하여 제조한 청국장 pH, 암모니아태 질소 함량 및 바이오제닉 아민 함량은 대조구에 비해 유의하게 감소되었다.

References

- Abdulla AA.** 2014. Antimicrobial activity of *Lactobacillus acidophilus* that carry the bacteriocin gene. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* **3**, 269-276.
- And HC and Hoover DG.** 2003. Bacteriocins and their food applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2**, 82-100.
- Bai X, Byun Y, and Mah JH.** 2013. Formation and destruction of biogenic amines in *Chunjang* (a black soybean paste) and *Jajang* (a black soybean sauce). *Food Chem.* **141**, 1026-1031.
- Beasley SS and Saris PEJ.** 2004. Nisin-producing *Lactococcus lactis* strains isolated from human milk. *J. Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 5051-5053.
- Bover-Cid S and Holzapfel WH.** 1999. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **53**, 33-41.
- Brink B, Damink C, Joosten HMLJ, and Huis In't Veld JHJ.** 1990. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Int. J. Food Microbiol.* **11**, 73-84.
- Byun BY, Lee AJ, and Mah JH.** 2012. Occurrence of biogenic amines in Miso, Japanese traditional fermented soybean paste. *J. Food Sci.* **77**, T216-T223.
- Chang M and Chang HC.** 2012. Development of a screening method for biogenic amine producing *Bacillus* spp. *Int. J. Food Microbiol.* **153**, 269-274.
- Cho TY, Han GH, Bahn KN, Son YW, Jang MR, and Lee CH.** 2006. Evaluation of biogenic amines in Korean commercial fermented foods. *Korean J. Food Sci. Technol.* **38**, 730-737.
- 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.
- Gandevia HA, Rana ND, and Desai BA.** 2017. Screening, production and antibacterial activity of bacteriocin from *Lactobacillus* sp. *BMR Microbiol.* **3**, 1-8.
- Ghanbari M, Jami M, Domig KJ, and Kneifel W.** 2013. Seafood biopreservation by lactic acid bacteria-a review. *LWT-Food Sci. Technol.* **54**, 315-324.
- Han GH, Cho TY, Yoo MS, Kim CS, Kim JM, Kim HA, Kim MO, Kim SC, Lee SA, Ko YS, et al.** 2007. Biogenic amines formation and content in fermented soybean paste (Cheonggukjang). *Korean J. Food Sci. Technol.* **39**, 541-545.
- Hassaine O, Zadi-Karam H, and Karam NE.** 2009. Evaluation of biogenic amines formation by proteolytic enterococci strains isolated from raw dromedary milks from Southern Algeria. *J. Food Saf.* **29**, 381-393.
- Holo H, Nilssen O, and Nes IF.** 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.
- Ibe A, Nishima T, and Kasai N.** 1992. Bacteriological properties of and amine-production conditions for tyramine- and histamine-producing bacterial strains isolated from soybean paste (miso) starting materials. *Jap. J. Toxicol. Environ. Health* **38**, 403-409.
- Joosten HMLJ and Nuñez M.** 1996. Prevention of histamine formation in cheese by bacteriocin-producing lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1178-1181.
- Ju KE and Oh NS.** 2009. Effect of the mixed culture of *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum* on the quality of Cheonggukjang. *Korean J. Food Sci. Technol.* **41**, 399-404.
- Kashket ER.** 1987. Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiol. Rev.* **46**, 233-244.
- Ladero V, Calles-Enriquez M, Fernández M, and Alvarez MA.** 2010. Toxicological effects of dietary biogenic amines. *Curr. Nutr. Food Sci.* **6**, 145-156.
- Lee GY, Kim SI, Jung MG, Seong JH, Lee YG, Kim HS, Chung HS, Lee BW, and Kim DS.** 2014. Characteristics of Chungkookjang that enhance the flavor and GABA content in a mixed culture of *Bacillus subtilis* MC31 and *Lactobacillus sakei* 383. *J. Life Sci.* **24**, 1102-1109.
- Lee YC, Kung HF, Huang YL, Wu CH, Huang YR, and Tsai YH.** 2016. Reduction of biogenic amines during miso fermentation by *Lactobacillus plantarum* as a starter culture. *J. Food Prot.* **79**, 1556-1561.
- Lee SY, Park NY, Kim JY, and Choi HS.** 2012. Quality characteristics of rice-doenjang during fermentation by differently shaped meju and adding starter. *Korean J. Food Nutr.* **25**, 505-512.
- Leuschner RG, Heidel M, and Hammes WP.** 1998. Histamine and tyramine degradation by food fermenting microorganisms. *Int. J. Food Microbiol.* **39**, 1-10.
- Lim ES.** 2016. Microbiological and chemical properties of sourdough

- fermented with probiotic lactic acid bacteria. *Korean J. Microbiol.* **52**, 84–97.
- Lim ES.** 2017. Incubation conditions affecting biogenic amines degradation of probiotic lactic acid bacteria. *Korean J. Microbiol.* **53**, 273–285.
- Lim ES and Lee NG.** 2016. Control of histamine-forming bacteria by probiotic lactic acid bacteria isolated from fish intestine. *Korean J. Microbiol.* **52**, 352–364.
- Linares DM, Martin M, Ladero V, Alveraz MA, and Fernandez M.** 2011. Biogenic amines in dairy products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **51**, 691–703.
- Mah JH, Ahn JB, Park JH, Sung HC, and Hwang HJ.** 2003. Characterization of biogenic amine-producing microorganisms isolated from *Myeolchi-Jeot*, Korean salted and fermented anchovy. *J. Microbiol. Biotechnol.* **13**, 692–699.
- Mah JH and Hwang HJ.** 2009. Effect of food additives on biogenic amine formation in *Myeolchi-jeot*, a salted and fermented anchovy (*Engraulis japonicas*). *Food Chem.* **114**, 168–173.
- McCabe-Sellers BJ, Staggs CG, and Bogle ML.** 2006. Tyramine in foods and monoamine oxidase inhibitor drugs: A crossroad where medicine, nutrition, pharmacy, and food industry converge. *J. Food Compos. Anal.* **19**, S58–S65.
- Moon JS, Cho SK, Choi HY, Kim JE, Kim SY, Cho KJ, and Han NS.** 2010. Isolation and characterization of biogenic amine producing bacteria in fermented soybean pastes. *J. Microbiol.* **48**, 257–261.
- 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.
- Nout MJR, Ruiker MMW, Bouwmeester HM, and Beljaars PR.** 1993. Effect of processing conditions on the formation of biogenic amines and ethyl carbamate in soybean tempe. *J. Food Saf.* **33**, 293–303.
- Ozogul F, Toy N, Ozogul Y, and Hamed I.** 2017. Function of cell-free supernatants of *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* strains on histamine formation by foodborne pathogens in histidine decarboxylase broth. *J. Food Process Preserv.* **41**, e13208.
- Park YJ and Joo WH.** 2017. Inhibition of biogenic amine production by *Bacillus* sp. BCNU 9171 isolated from Doenjang. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **45**, 299–304.
- Santos MH.** 1996. Biogenic amines: their importance in foods. *Int. J. Food Microbiol.* **29**, 213–231.
- Seok YR, Kim YH, Kim S, Woo HS, Kim TW, Lee SH, and Choi C.** 1994. Change of protein and amino acid composition during cheonggukjang fermentation using *Bacillus licheniformis* CN-115. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **37**, 65–71.
- 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 RJ, Vasundhara TS, and 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 degrees C. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **203**, 71–76.
- Shalaby AR.** 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Res. Int.* **29**, 675–690.
- Shon MY, Kwon SH, Sung CK, Park SK, and Choi SD.** 2001. Changes in chemical components of Chungkugjang prepared with small black bean. *Korean J. Life Sci.* **11**, 284–290.
- Straub BW, Kicherer M, Schilcher SM, and Hammes WP.** 1995. The formation of biogenic amines by fermentation organisms. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **201**, 79–82.
- 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 bacteriocin forming lactococci. *Int. J. Food Microbiol.* **190**, 14–23.
- Veskovič Moračanin S, Dukáč DA, and Memiši NR.** 2014. Bacteriocins produced by lactic acid bacteria—a review. *APTEFF* **45**, 271–283.
- Zaman MZ, Bakar FA, Jinap S, and Bakar J.** 2011. Novel starter cultures to inhibit biogenic amines accumulation during fish sauce fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **145**, 84–91.