

Article

생선 내장으로부터 분리된 프로바이오틱 유산균에 의한 히스타민 생산균의 제어

임은서* · 이남걸

동명대학교 식품영양학과

Control of histamine-forming bacteria by probiotic lactic acid bacteria isolated from fish intestine

Eun-Seo Lim* and Nahm-Gull Lee

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

(Received July 18, 2016; Revised September 12, 2016; Accepted September 13, 2016)

ABSTRACT: In this study, we examined *in vitro* the potential probiotic properties of lactic acid bacteria (LAB) obtained from the fish intestine and their ability to degrade histamine through the production of diamine oxidase (DAO) enzymes and bacteriocin. Among 97 LAB strains isolated from the intestine of croaker, flatfish, pollack, and rockfish, CIL08, CIL16, FIL20, FIL31, PIL45, PIL49, PIL52, and RIL60 isolates exhibited excellent survival rates under simulated gastrointestinal tract conditions, high adhesion ability to HT-29 epithelial cells, and resistance to the antibiotics such as amoxicillin, ampicillin, erythromycin, penicillin G, streptomycin, tetracycline, or vancomycin. In addition, these strains did not produce histamine in decarboxylating broth containing histidine. In particular, 4 strains (CIL08, FIL20, PIL52, and RIL60) that may produce DAO were significantly able to degrade histamine. The bacteriocins produced by FIL20, FIL31, and PIL52 LAB inhibited the growth and histamine production of *Enterococcus aerogenes* CIH05, *Serratia marcescens* CIH09, *Enterococcus faecalis* FIH11, *Pediococcus halophilus* FIH15, *Lactobacillus sakei* PIH16, *Enterococcus faecium* PIH19, *Leuconostoc mesenteroides* RIH25, or *Aeromonas hydrophilia* RIH28. Histamine-producing strains isolated from fish intestine were found to reduce histamine accumulation during co-culture with CIL08, FIL20, PIL52, and RIL60 LAB showing histamine degradation or bacteriocin production ability. The probiotic strains preventing histamine formation were identified as *Pediococcus pentosaceus* CIL08, *Lactobacillus plantarum* FIL20, *Lactobacillus paracasei* FIL31, *Lactobacillus sakei* PIL52, and *Leuconostoc mesenteroides* RIL60 with high similarity based on 16S rRNA gene sequencing.

Key words: bacteriocin, histamine, lactic acid bacteria, probiotic

바이오제닉 아민(biogenic amine)은 알데히드나 케톤의 아미노화와 아미노기 전이화 및 아미노산의 탈탄산반응에 의해 주로 형성되는 염기성 질소 화합물이다. 이는 저분자의 유기 염기로서 화학 구조에 따라 지방족 화합물(putrescine, cadaverine, spermine, spermidine), 방향족 화합물(tyramine, phenylethylamine) 및 헤테로 고리 화합물(histamine, tryptamine) 등으로 분류된다. 바이오제닉 아민은 어육이나 식육 가공품, 유제품, 와인, 맥주, 과일 뿐만 아니라 땅콩이나 초콜릿 등 다양한 식품에서 검출되는데 이는 식품 내에 함유된 *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*,

Pseudomonas, *Salmonella*, *Shigella*, *Photobacterium*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* 및 *Streptococcus* 등의 미생물이나 동식물의 대사과정에 의해 주로 합성된다(Santos, 1996). 적당한 양의 히스타민, 트립타민, 베타-페닐에틸아민 및 티라민 등은 항정신성 약물이나 혈관 수축 효과 등으로 인체에 중요한 생리학적 효과를 나타내는 활성 아민으로 작용하지만, 식품 내에 함유된 과량의 일부 아민은 고혈압, 두통, 설사, 발진, 염증 등을 비롯하여 히스타민 중독이나 티라민 독성과 같은 식이성 질환의 원인이 되기도 한다. 게다가 유해 아민은 암을 유발하는 전구체로서 알려져 있다(Shalaby, 1996).

바이오제닉 아민 중에서 히스타민은 가장 대표적인 활성 아민으로서 신선도가 높은 어류 내에는 히스타민의 함량이 낮

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

으나, 보관하는 동안 세균의 증식 위험이 높은 온도에 노출된 경우 세균이 생산한 히스티딘 탈탄산 효소에 의해 히스타민의 농도는 현저하게 증가 되고, 이는 단순 가열 처리에 의해 제거 되기 어려워 이로 인한 식중독 발생 위험이 높아지게 된다 (Visciano *et al.*, 2012). 식품 내 히스타민의 함량을 감소시키기 위해 신선한 원료의 사용, 위생적인 제조 공정, 온도 조절, 진공 포장, 초고압, 방사선 조사, 식품첨가물 이용 이외에 발효 시 아민을 생성하지 않는 스타터 및 아민 산화 효소(amines oxidase, AO)를 생산하는 미생물의 활용 등이 보고되고 있다 (Naila *et al.*, 2010). 유해 아민은 AO에 의해 산화적 탈아미노화 반응($R-CH_2-NH-R' + O_2 + H_2O \rightarrow R-CHO + H_2N-R' + H_2O_2$)을 통해 분해되는데 이러한 분해 효소는 일부 세균이 생산한다 (Murooka *et al.*, 1979). *Micrococcus* 속이나 *Brevibacterium linens* 등 식품 발효에 관여하는 미생물은 히스타민과 티라민 등을 분해할 수 있고, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus pentosus* 및 *Pediococcus acidilactici* 등의 유산균들도 히스타민을 분해하는 것으로 알려져 있다 (Leuschner *et al.*, 1998).

Kongkiattikajorn (2015)의 보고에 따르면, 발효 어육 소시지 제조 시 유산균 발효 스타터를 사용하지 않은 경우 히스타민, 트립타민, 페닐에틸아민 및 티라민 등 유해 아민의 함량이 매우 높았으나, *L. sakei* KM5474와 *L. plantarum* KM1450 균주를 이용하여 발효시킨 경우 유해 아민 양이 유의하게 감소되었다고 하였다. 발효 식품으로부터 분리된 *Lactobacillus* sp.와 *Pediococcus* sp.는 AO 활성으로 인해 유해 아민의 함량을 감소시켰고 (Garcia-Ruiz *et al.*, 2011), nisin Z와 lacticin 481을 생산하는 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* VR84와 EG49는 히스타민 생성균의 증식 억제 및 그에 따른 아민 축적량을 감소시키는데 효과적인 것으로 알려져 있다 (Tabanelli *et al.*, 2014). 유산균은 발효 과정 동안 당을 분해하여 유산을 비롯하여 과산화수소, 디아세틸, 단쇄지방산 및 박테리옌 등 다양한 항균 물질을 생산하여 유해균을 제어함으로써 향미 개선 및 품질 향상 등의 효과를 발휘한다. 유산균의 대사산물은 인체에 무해하고 안전성이 확보되어 미 FDA로부터 generally recognized as safe (GRAS)로서 승인 받았고, qualified presumption of safety (QPS)의 필수 조건을 충족하여 가공 식품의 보존성 향상을 위한 천연첨가물로서 이용되고 있다. 장 기능 개선을 비롯하여 다양한 생리활성이 밝혀짐에 따라 유산균은 프로바이오틱 균주로 널리 알려져 있으며, 부패균이나 식중독균 제어에 효과적이기 때문에 미생물의 오염도가 높고 선도 저하가 빠른 수산식품의 저장기간 연장을 위한 생물학적 보존제로서 활용 가치가 높다 (Ghanbari *et al.*, 2013).

따라서 본 연구에서는 생선 내장으로부터 분리된 유산균 중 프로바이오틱 균주로서 적합하고 히스타민 분해능이 있는 균주를 선별하여 히스타민 생성균에 대한 제어 효과를 확인하였다.

재료 및 방법

사용 균주 분리 동정

생선 내장(25 g)을 균질화한 시료 용액 1 ml를 채취하여 Brain Heart Infusion (BHI) agar (Difco) 배지 상에 37°C, 48시간 평판 배양하여 얻은 집락을 순수 분리 배양한 다음 BHI agar 사면배지에 계대 배양하였다. BHI broth 상에서 준비된 배양액은 히스티딘이 첨가된 탈카르복시화 배지 상에서 히스타민 생성능을 조사하여 양성 반응을 나타낸 균주를 대상으로 BHI agar 사면배지에 계대 배양 후 그람염색, 세포형태, 포자형성능, 카탈라아제 및 옥시다아제 생성능을 확인하였다. 또한 UNI-L (5'-AGA-GTTTGATCATGGCTCAG-3')와 UNI-R (*Escherichia coli* 1410-1391; 5'-GTGTGACGGGC GGTGTGTAC-3') primer를 사용하여 16S rRNA 염기서열을 분석하여 동정하였다. 즉, 분리 균주는 BHI broth에 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 배양액은 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C)하여 세포를 회수한 다음 PBS (pH 7.0)로 2회 세척하고 20% sodium dodecyl sulfate (SDS)로 용해시켰다. 용균된 세포 현탁액은 85°C에서 약 20분간 가열한 다음 원심분리(13,000 × g, 5분, 4°C)하여 세포 잔해물을 제거하고 상등액으로부터 얻은 DNA는 70% 알코올을 처리하여 침전시켜 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 위한 template DNA로 사용하였다. PCR 반응 혼합물[10 mM Tris-HCl; pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 20 pmol primer, 0.2 mM deoxynucleotide triphosphates, 0.5 U Taq DNA polymerase]과 template DNA (10 ng)는 PCR Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratores Ltd.)를 이용하여 DNA를 증폭(94°C에서 4분간 initial denaturation, 94°C에서 30초간 denaturation, 55°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 1분간 extension, 72°C에서 7분간 final extension, 35 cycle)시켰다. PCR 산물은 전기영동(1.5% agarose gel)하여 밴드를 확인하고 QIA quick PCR purification kit (Qiagen)로 정제하였다. 정제 산물은 DNA sequencer (ABI Prism® 3730 Avant Genetic Analyzer, Applied Biosystem)로 분석하고 난 후 The National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)의 Basic Local Align Search Tool (BLAST) 프로그램을 활용하여 염기서열의 상동성을 확

인하였다(Chen *et al.*, 2008).

한편, 유산균 분리를 위해 균질화 한 시료 용액 1 ml를 채취하여 1% (w/v) CaCO_3 가 첨가된 Lactobacilli MRS agar (BD Difco Co.) 평판배지에 접종하여 호기적인 조건 하에서 37°C, 48시간 배양한 후 투명한을 생성하는 집락만을 유산균으로 간주하고 이를 순수 분리 배양하여 MRS agar 사면배지에 계대 배양하였다. 분리된 유산균주를 대상으로 프로바이오틱 균주로서의 적합하고 히스타민 분해능 및 히스타민 생성균에 대한 박테리오토크의 항균 활성을 나타내는 균주를 최종 선발하여 동정하였다. 즉, 형태학적 및 배양학적 특성과 API 50 CHL system (bioMérieux)으로 당 분해능을 조사하였고, DNA를 추출 정제하여 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1492R (*E. coli* numbering 1492-1511; 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') primer으로 DNA를 증폭(97°C에서 5분간 initial denaturation, 94°C에서 1분간 denaturation, 54°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 1분간 extension, 72°C에서 4분간 final extension, 30 cycle) 시킨 후 DNA sequencer (ABI Prism® 3730 Avant Genetic Analyzer, Applied Biosystems)로 분석하여 염기서열의 상동성 (homology)을 확인하였다(Tajabadi *et al.*, 2013).

프로바이오틱 균주 적합성 평가

인공 소화액 하에서의 생존율: 실험 균주의 위액 및 담즙액에 대한 저항성은 Grimoud 등(2010)의 방법을 일부 변형하여 조사하였으며, MRS broth (100 ml)에 전 배양액(1%, v/v)을 접종하고 호기적인 조건 하에서 37°C, 24시간 배양한 후 배양액을 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C)하여 세포만을 모으고, PBS (pH 7.0)로 2회 세척하고 난 다음 1.0×10^8 CFU/ml로 세포수를 조정하였다. PBS에 NaCl (125 mM), KCl (7 mM), NaHCO_3 (45 mM) 및 pepsin (1 mg/ml; Sigma-Aldrich)을 첨가한 다음 pH 2.5로 조정하여 인공 위액을 제조한 다음 유산균을 접종하고 37°C, 2시간 배양하였다. 무균적으로 배양액(1 ml)을 채취하고 MRS agar 상에서 표준한천평판배양법으로 잔존하는 생균수를 측정하였다. 한편, PBS (pH 8.0)에 oxgall (0.5%, Sigma-Aldrich)를 첨가하여 인공 담즙액을 제조한 다음 유산균 세포 현탁액(1.0×10^8 CFU/ml)을 접종하고 37°C, 3시간 배양한 다음 MRS agar 평판배지 상에서 생균수를 측정하였다.

HT-29 세포에 대한 부착능: 인체 유래 상피세포에 대한 실험 균주의 부착능은 Osmanagaoglu 등(2010)의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. HT-29는 Korean Cell Line Bank (KCLB)로부터 분양 받은 다음 56°C, 30분간 가열 처리한 10% (v/v)

fetal bovine serum (FSB, Gibco), 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 100 U/ml penicillin 및 0.1 mg/ml streptomycin을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM, Sigma-Aldrich)에 접종하고 37°C, 5% CO_2 조건 하에서 배양하였다. FBS와 항생제를 첨가하지 않은 DMEM 배지는 6-well culture plate (Falcon, Beckton Dickinson)에 분주하고 monolayer를 형성한 HT-29 세포는 PBS (pH 7.0)로 세척한 다음 동물 세포주(1.0×10^5 cells/ml)를 plate 내에 접종하고 37°C, 5% CO_2 조건 하에서 2시간 동안 전 배양하였다. 한편, MRS broth에서 37°C, 24시간 동안 배양한 유산균 배양액을 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C)하여 세포를 모은 뒤 PBS (pH 7.0)로 세척한 다음 유산균수(1.0×10^8 CFU/ml)를 조정하고 HT-29 세포가 있는 well에 접종한 후 37°C, 2시간 동안 배양하였다. 배양용 배지와 부착되지 않은 동물 세포를 제거하고 난 다음 well 안을 PBS (pH 7.0)로 2회 세척하고 2% formalin으로 overnight 고정하고 나서 2% eosin Y로 염색한 후에 1% acetic acid로 2회 세척하였다. 그런 다음 microplate reader (BioTek, Inc.)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하여 HT-29 세포에 대한 유산균의 부착능을 측정하였다.

항생제에 대한 내성: 실험 균주는 MRS broth에 접종한 다음 37°C에서 24시간 배양한 후 배양액을 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C)하여 세포를 모으고 PBS (pH 7.0)로 2회 세척하여 동일한 buffer에 세균 세포(1.0×10^6 CFU/ml)를 현탁 시켰다. 50°C 정도로 식힌 MRS agar [agar 1.0% (v/v), 10 ml]에 세균 세포 현탁액(1%, v/v)을 접종하고 혼합한 후 MRS agar (10 ml) 평판배지 위에 증충하여 응고시켰다. 응고된 평판배지 위에 직경 8 mm인 well을 만들고 stock solution (1 mg/ml)으로부터 2배 연속 희석한 항생제(vancomycin, erythromycin, tetracycline, ampicillin, amoxicillin, streptomycin, penicillin G, Sigma-Aldrich) 용액을 각 well에 50 μ l씩 loading하였다. 37°C에서 24시간 배양한 후 well 주변에 저해환을 생성한 최소 농도를 측정하여 항생제에 대한 minimum inhibitory concentration (MIC)를 구하였다(Musikasang *et al.*, 2012).

히스타민 생성능: 실험 균주의 히스타민 생성능은 히스티딘을 첨가한 탈카르복시화 배지(decarboxylating medium) 상에서 측정하였다(Bover-Cid and Holzapfel, 1999). 즉, 전구체 아미노산(L-histidine monohydrochloride monohydrate, Sigma-Aldrich, 1 g/L)과 pyridoxal 5-phosphate (1 mg/L)가 첨가된 탈카르복시화 액체배지(decarboxylating broth)에 실험 균주를 접종하고 35°C에서 48시간 동안 5회 전 배양하였다. Microtiter plate의 각 well에 유산균 전 배양액, 음성 대조군(*Pseudomonas*

aeruginosa BK19) 혹은 양성 대조균(*Enterococcus faecalis* ATCC 29212)의 배양액(50 µl)과 히스티딘(2%, w/v)이 첨가된 탈카르복시화 액체배지(100 µl)를 분주하고 난 후 35°C, 72 시간 동안 혐기적인 조건(Anoxomat system, MART Co.) 하에서 배양한 다음 자색으로 변한 경우 양성으로 판정하였다.

프로바이오틱 유산균의 히스타민 분해능 측정

프로바이오틱 유산균의 히스타민 분해능은 Lee 등(2015)의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 즉, 실험 균주는 MRS broth에 접종하여 호기적인 조건 하에서 37°C, 24시간 동안 배양한 후 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C)하였다. 그런 다음 세포만을 모아 PBS (pH 7.0)로 2회 세척하고 세포 현탁액(1 ml, 1.0×10^6 CFU/ml)은 histamine broth (glucose 0.1%, yeast extract 0.2%, NaCl 0.5%, histamine dihydrochloride 0.1%, K_2HPO_4 0.05%; pH 7.0) 10 ml에 접종하고 난 다음 35°C, 5일간 배양하여 얻은 배양액(0.1 ml)은 histamine agar (2%, w/v) 평판배지에 도말 접종하여 30°C, 5일간 배양하였다. 평판 배지 위에 자란 독립된 집락을 선택하여 trypticase soy agar (TSA, Difco) 상에서 순수 분리하고 히스타민 분해능을 조사하기 위해 histamine dihydrochloride (h-TSB, 50 ppm)이 첨가된 trypticase soy broth (TSB)에 접종하고 35°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양액 내에 잔존하는 히스타민의 함량은 Eerola 등(1993)과 Mah 등(2003)의 방법을 일부 변형하여 high pressure liquid chromatography (HPLC, Shimadzu)로 측정하였다. 즉, 히스타민 표준용액(500 ppm) 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. 1으로 여과하였다. 시료 용액(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 45분간 배양하고 난 다음 잔존하는 dansyl chloride는 25% ammonium hydroxide 100 µl를 가하여 제거하였다. 상온에서 30분 방치한 후 추출물에 acetonitrile을 가하여 총량 5 ml로 맞추는 다음 원심분리(2,500 × g, 5분)하여 얻은 상등액을 0.22 µm membrane filter (Millipore Corp.)로 여과하여 dansyl 유도체를 준비하였다. 히스타민 함량 분석을 위해 Nova-Pak C₁₈ 컬럼 (150 × 3.9 mm, Waters, Milford)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.

히스타민 생성균에 대한 박테리오신의 항균 활성 측정

MRS broth로부터 얻은 유산균 배양 상등액 내 유산의 영향을 배제하기 위해 6 N NaOH를 이용하여 pH 6.5로 조정하고, 과산화수소를 제거하기 위해 catalase (Sigma-Aldrich, 1 mg/ml)를 처리한 다음 황산암모늄[60% (w/v)]을 첨가하여 단백질 침전을 위해 교반(4°C, overnight)하였다. 원심분리(12,000 × g, 30분, 4°C)해서 침전물만을 모으고 20 mM PBS (pH 6.5)에 현탁시킨 다음 molecular weight cut-off가 1,000 Da인 투석막 (Spectrum Medical Industries, Inc.)을 이용하여 4°C, 24시간 동안 투석해서 조 박테리오신 용액을 조제하였다. 생선 내장으로부터 분리된 히스타민 생산균에 대한 박테리오신 용액의 항균 활성은 microtiter plate method (Holo *et al.*, 1991)에 따라 측정하였다. 즉, 히스타민 생성 균주는 BHI broth에 접종하여 37°C, 24시간 배양한 후 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C)하여 세포를 모으고 PBS (pH 7.0)로 2회 세척한 다음 세균 세포수를 1.0×10^5 CFU/ml로 조정하였다. Plate well에 BHI broth를 분주하고 이진 희석법으로 농도를 맞추는 박테리오신 용액과 히스타민 생성 균주의 세포 현탁액 1% (v/v)를 첨가한 다음 37°C에서 24시간 배양한 후 microplate reader를 이용하여 흡광도 (600 nm)를 측정하였다. 박테리오신 활성(arbitrary units, AU)은 대조구(PBS, pH 7.0 처리구)의 혼탁도에 비해 50% 저해된 최대 희석배수의 역수로 표시하였다.

박테리오신에 의한 히스타민 생성 억제 효과 측정

생선 내장으로부터 분리된 히스타민 생성균에 대한 프로바이오틱 유산균이 생산한 박테리오신의 영향은 Shakila 등(1996)의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 즉, 0.0005% pyridoxal-HCl (Sigma-Aldrich)와 0.5% L-histidine hydrochloride monohydrate를 혼합한 TSB (h-TSB)에 히스타민 생성균을 접종하고 35°C에서 24시간 배양하였다. 배양액(1 ml, 10^8 CFU/ml)을 채취하여 박테리오신 용액(200 AU/ml)을 첨가한 h-TSB (5 ml)에 접종하고 35°C에서 24시간 배양하였다. 배양 직후 배양액을 채취하여 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C)하고 얻은 상등액은 0.22 µm membrane filter로 여과한 후 앞서 언급한 방법에 따라 HPLC를 사용하여 히스타민 함량을 측정하였다.

유산균과의 혼합 배양에 의한 히스타민 생성량 변화 측정

히스타민 생성 억제능이 있는 유산균과 생선 내장으로부터 분리된 히스타민 생성균을 혼합 배양한 후 히스타민 함량 변화를 측정하였다. 즉, BHI broth와 MRS broth 배양액으로부터 각각 얻은 히스타민 생성균과 프로바이오틱 유산균의 세포

현탁액(1.0×10^6 CFU/ml) 1% (v/v)씩 BHI broth에 접종한 다음 37°C에서 24시간 배양하여 얻은 배양액으로부터 잔존하는 히스타민 함량을 HPLC로 측정하였다.

통계처리

항목별 총 3회 실험하여 얻은 측정값은 평균±표준편차로 나타내었으며, SPSS 프로그램(Ver. 12.0)의 paired *t*-test를 통해 대조구와의 유의적인 차이($P < 0.05$)를 검증하였다.

결과 및 고찰

프로바이오틱 균주 적합성 평가

조기, 가자미, 명태 및 우럭 내장으로부터 분리된 유산균 97 균주 중에서 프로바이오틱 균주로서 적합하다고 추정되는 8 균주를 대상으로 인공 소화액에 대한 저항성, 인체 상피세포에 대한 부착능, 항생제에 대한 감수성 및 히스타민 생성능 등에 관한 결과는 Table 1과 같다. pH 2.5로 조정된 인공 위액에서 2시간 배양했을 때 FIL31과 PIL52는 초기 균수(10^8 CFU/ml)로부터 약 1 log cycle 이하만 감소되었고, 그 이외의 균주도 10^6 CFU/ml 이상을 유지하였다. 게다가 oxgall 0.5% 하에서 3시간 배양한 후 CIL08, FIL20 및 FIL31은 10^8 CFU/ml을 유지하였고, CIL16, PIL45, PIL49 및 RIL60은 10^7 CFU/ml 이상 생존하였으나, PIL52는 다른 균주들에 비해 담즙액 하에서 저항성이 다소 낮았다. 분리된 10균주의 HT-29 세포에 대한 부착능은 6.9–31.4%로 균주에 따라 다소 차이가 있었으나, 특히, CIL08, FIL20 및 PIL45는 20% 이상의 부착능을 나타내었다. 항생제에 대한 내성은 균주에 따라 큰 차이를 보였는데, CIL08 균주는 amoxicillin, streptomycin 및 vancomycin, CIL16 균주는 ampicillin, penicillin G 및 streptomycin, FIL20 균주는

penicillin G, tetracycline, vancomycin, FIL31 균주는 ampicillin, erythromycin, penicillin G, streptomycin 및 vancomycin, PIL45 균주는 amoxicillin 및 erythromycin, PIL49 균주는 erythromycin, tetracycline 및 vancomycin, PIL52 균주는 ampicillin, penicillin G, tetracycline 및 vancomycin, RIL60 균주는 amoxicillin, ampicillin 및 vancomycin 등에 대한 저항성이 강한 것으로 나타났다. 한편, 선발된 8종의 유산균은 모두 히스타민 생성능이 없는 것으로 확인되었다. 프로바이오틱 균주 선발 기준으로는 소화액에 대한 강한 저항성이 있어야 하고 장관 상피세포에 부착하여 항균물질을 생산함으로써 장내 유해 미생물의 증식을 억제할 수 있어야만 하는데 본 연구에서 선발된 8종은 이러한 조건을 *in vitro* 상에서 충족하였다.

혼제 연어로부터 분리된 *Lactobacillus curvatus* ET06, ET30 및 ET31, *Lactobacillus fermentum* ET35, *Lactobacillus delbrueckii* ET32, *P. acidilactici* ET34, *Enterococcus faecium* ET05, ET12 및 ET 88은 인공 소화기관 내에서 저항성이 강하고 *Listeria monocytogenes*에 대한 박테리오파지를 생산하는 것으로 확인되었으며, Caco-2 세포에 대한 부착능도 상당히 높아 프로바이오틱 균주로 적합하다고 알려져 있다(Todorov *et al.*, 2011). 생선 젓갈에서 분리한 *L. plantarum* DHK10은 낮은 pH와 0.5% oxgall 하에서 높은 생존율을 보이고, 항균물질을 생산하여 유해 미생물 제어능력이 있다고 보고된 바 있다(Cho *et al.*, 2006). 해산어로부터 분리된 84종의 유산균(*Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus paracasei*, *L. plantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus lactis* 및 *Carnobacterium piscicola*)들은 oxacillin, cefoxitin, ceftriaxone, streptomycin, tobramycin, neomycin, oleandomycin, oxolinic acid 등의 항생제에 대한 저항성이 강한 반면, vancomycin, penicillin G 및 furans 등에는 민감한 것으로 보고되었다(Chahad *et al.*, 2012).

Table 1. Acid and bile tolerance, adhesion ability to HT-29 cell, antibiotic resistance, and histamine production of LAB strains obtained from fish intestine

Strain	Origin	Viable cell counts (CFU/ml)		Adhesion ability to HT-29 cell (%)	Antibiotic resistance (MIC, µg/ml)							Histamine production
		Gastric juice	Intestinal juice		Amoxicillin	Ampicillin	Erythromycin	Penicillin G	Streptomycin	Tetracycline	Vancomycin	
CIL08	Croaker	$5.3 \pm 0.6 \times 10^6$	$2.2 \pm 0.4 \times 10^8$	20.3 ± 2.5	16	<2	<2	4	128	4	64	-
CIL16	Croaker	$1.9 \pm 2.1 \times 10^6$	$3.4 \pm 1.2 \times 10^7$	31.4 ± 4.6	<2	32	4	16	32	8	4	-
FIL20	Flatfish	$8.4 \pm 3.5 \times 10^6$	$5.0 \pm 2.1 \times 10^8$	16.8 ± 1.8	4	8	<2	32	4	32	64	-
FIL31	Flatfish	$7.1 \pm 0.9 \times 10^7$	$4.8 \pm 0.9 \times 10^8$	10.4 ± 1.9	<2	16	32	64	16	8	32	-
PIL45	Pollack	$8.5 \pm 2.2 \times 10^6$	$9.1 \pm 1.3 \times 10^7$	22.5 ± 0.6	16	4	16	<2	<2	8	4	-
PIL49	Pollack	$6.6 \pm 1.4 \times 10^6$	$8.5 \pm 3.2 \times 10^7$	6.9 ± 1.1	4	<2	64	8	4	16	32	-
PIL52	Pollack	$5.1 \pm 2.4 \times 10^7$	$9.9 \pm 3.0 \times 10^6$	11.9 ± 1.7	8	128	4	64	8	16	32	-
RIL60	Rockfish	$7.4 \pm 2.8 \times 10^6$	$7.7 \pm 3.5 \times 10^7$	8.8 ± 2.0	64	16	4	<2	8	<2	128	-

가물치 내장으로부터 분리된 *L. mesenteroides* sp. *mesenteroides* 는 pH 2.0에서 2시간 배양 후 활성을 잃었으나, pH 3.0 이상에서는 활성을 유지하였으며, bile salts 0.5% 하에서는 8시간 동안에도 생존하였다. 또한 streptomycin에 대해선 강한 저항성을 보였고, amoxicillin과 kanamycin에 대해서도 비교적 저항할 수 있었으나, gentamycin, tetracycline, chloramphenicol 및 ampicillin에 대해선 감수성이 높게 나타났다(Allameh *et al.*, 2012). Balcázar 등(2008)은 무지개 송어의 표피와 내장으로부터 분리한 유산균(*L. lactis*, *L. plantarum*, *L. fermentum*)들은 생선 내장 점막 상피세포에 약 11.6–17.4%의 높은 부착능을 보였고, pH 2.5에서 1.5시간 노출되었을 때에도 생존하였으며, 고농도의 담즙 하에서도 강한 저항성을 나타내었다고 하였다. 본 연구에서 분리된 유산균은 기존에 보고된 유산균들과 배양조건과 균종에 따라 활성의 차이는 있지만, 인공 위액과 담즙액에 대한 저항성과 상피세포에 대한 부착능 및 항생제에 대한 내성이 비교적 높은 것으로 확인되었다.

Straub 등(1995)은 식품발효에 관여하는 유산균 523종의 바이오제닉 아민 생성능을 조사한 결과, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* 및 몇몇 *Lactobacillus* (*L. pentosus*, *L. sakei*) 등은 바이오제닉 아민을 생성하지 않았으나, *Carnobacteria*, *Lactobacillus buchmeri*, *L. curvatus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus alimentarius*, *L. brevis*, *Lactobacillus bavarius* 및 *L. delbrueckii* ssp. *lactis* 등은 바이오제닉 아민을 생성하는 것으로 보고하였다. 육류로부터 분리된 *L. brevis*, *L. buchnerii*, *L. curvatus*, *Lactobacillus carnis*, *Lactobacillus divergens* 및 *Lactobacillus hilgardii* 등도 바이오제닉 아민을 생성하는 유산균으로 확인되었다(Majjala *et al.*, 1993). Priyadarshani와 Rakshit (2011)의 보고에 의하면, 프로바이오틱 유산균 중에서 *Lactobacillus casei* TISTR389는 많은 양의 히스타민(1,820.9 ± 3.5 mg/L)과 티라민(5,486.99 ± 47.6 mg/L)을 생성하였고, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* TISTR895는 히스타민(459.1 ± 0.63 mg/L)을 생산한 반면, *L. acidophilus*, *L. lactis* subsp. *lactis* 및 *L. plantarum* 등은 바이오제닉 아민을 생성하지 않았다고 하였다. 이와 같이 여러 연구 결과에서 보듯이 바이오제닉 아민 생성능은 균종에 의존하기 보다는 균주에 따라 차이가 있는 것으로 판단된다.

프로바이오틱 유산균의 히스타민 분해능

인공 소화액에 대해 저항성, 상피세포에 대한 부착능 및 항생제에 대한 내성이 강하며, 히스타민 생성능이 없는 8균주를 대상으로 히스타민 분해능을 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. CIL16, FIL31, PIL45 및 PIL49 균주는 히스타민 분해능을 보

이지 않았으나, CIL08, FIL20, PIL52 및 RIL60 균주는 대조구의 히스타민 함량을 약 20–30% 정도 감소시킨 것으로 나타났으며, 그 중에서 RIL60의 분해능이 가장 높게 나타났다.

식품을 통해 섭취된 바이오제닉 아민은 장내 점막에 있는 AO 및 특정 세균이 생산하는 AO에 의해 분해되어 무독화되며, AO는 아미노기의 수에 따라 monoamine oxidases (MAO)와 diamine oxidases (DAO)로 분류되고 히스타민은 DAO에 의해 분해된다. 또한 히스타민은 methyl 혹은 acetyltransferase에 의해 무독화될 수 있는데, 만약 이들 효소들이 유전적으로 문제가 발생하거나 항우울제 약물 혹은 알코올 등의 효소 저해제의 영향을 받을 경우 바이오제닉 아민이 분해되지 않아 인체 건강을 위협하게 된다(Linares *et al.*, 2011). 바이오제닉 아민 분해 효소는 중성 내지는 알칼리성 범위에서 최대 활성을 나타내고 효소의 활성을 위해 산소는 필수적이며 DAO의 활성은 히스타민 축적량에 영향을 준다(Dapkevicius *et al.*, 2000).

Dapkevicius 등(2000)에 따르면, 어묵으로부터 분리된 77종의 유산균 중에서 48균주는 MRS broth 내에서 히스타민 분해능이 확인되었고, 이 중에서도 *L. sakei*는 히스타민의 양을 40% 이상 감소시켜 히스타민 생성균을 제어하는데 효과적인 어류 슬러지 스타터라고 보고하였는데 본 연구의 분리 균주들은 이보다는 분해능이 다소 낮았다. 와인으로부터 분리된 유산균 중에서 히스타민 분해능은 균주에 따라 다양하였으며, *Pediococcus pentosaceus* IFI-CA 30은 약 10% 정도를 분해한 반면, *L. casei* IFI-CA 52는 54% 정도를 감소시켰다(Garcia-Ruiz *et al.*, 2011). 태국 전통 발효 어육 소시지 제조 시 AO 생성균인 *L. plantarum* KM5474 및 *L. sakei* KM1450을 이용하여 발효시킨 경우 바이오제닉 아민 함량이 유의하게 감소되었다고 하였다(Kongkiattikajorn, 2015).

Zaman 등(2010)은 생선 및 어육 가공품으로부터 분리한 *Bacillus amyloliquefaciens* FS-05는 다른 균에 비해 히스타민

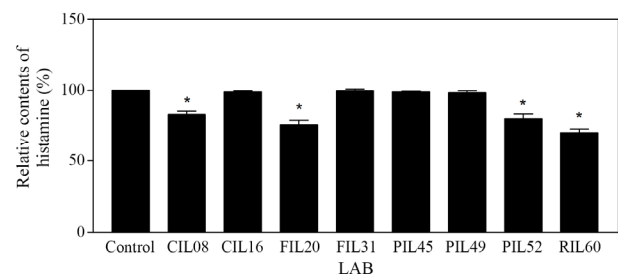


Fig. 1. Percentage of degradation of the histamine by LAB obtained from fish intestine. Data are means ± standard deviation (SD) from triplicate determinations. *Significantly differ ($P < 0.05$) from the control group by paired *t*-test.

분해능이 유의하게 높아 24시간 이내에 초기 함량의 약 59.9%의 히스타민을 분해했다고 보고하였다. 한편, 생선으로부터 분리된 *Bacillus* sp. LMG21002와 *Bacillus megaterium* KL-197 및 *Bacillus coagulans* 등은 히스타민 분해능이 있는 것으로 확인되었고, *Staphylococcus condiment* FS-22와 *Staphylococcus carnosus* FS-19는 히스타민을 각각 27.4%와 29.1% 분해하였다고 보고된 바 있다(Kim and Kim, 2006). 멸치젓갈 내 히스타민 농도를 감소시킬 수 있는 균주 검색 결과, *Staphylococcus xylosus* No. 0538은 다른 균주들에 비해 월등히 높은 히스타민 분해능을 나타내어 0.5 mM 히스타민이 함유된 buffer 내에서 24시간 이내에 히스타민 농도를 38% 감소시켰다(Mah and Hwang, 2009). 염장 어육 가공품으로부터 히스타민 분해능이 있는 균주를 분리 동정한 결과, *Rummeliibacillus stabekisii*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* 및 *Bacillus subtilis* 등으로 확인되었고, 이 중에서 *B. polymyxa*가 가장 높은 히스타민 분해 활성을 나타내었고, 분해능은 배양 온도, pH 및 염 농도에 영향을 받는다고 하였다(Lee *et al.*, 2015). 따라서 본 결과와 이미 보고된 결과에 따르면 세균의 히스타민 분해능은 균종 및 배양조건에 따라 상이하며, 유산균의 분해능은 DAO 생성에 기인하는 것으로 추정된다.

히스타민 생성균에 대한 박테리옌 활성

생선 내장으로부터 히스타민을 생성하는 균주를 16S rRNA 염기서열 분석을 통해 동정하고 프로바이옌으로 적합하다고 추정되는 유산균 박테리옌의 항균 활성을 측정한 결과는 Table 2와 같다. 초기 내장으로부터 분리된 히스타민 생성균

인 CIH03, CIH05 및 CIH09의 염기서열 분석 결과 상동성 99% 이상의 *Morganella morganii*, *Enterobacter aerogenes* 및 *Serratia marcescens*으로 각각 동정되었다. 가자미로부터 분리된 FIH11과 FIH15는 각각 *E. faecalis*와 *Pediococcus halophilus*으로 동정되었고, 명태 내장으로부터 분리된 PIH16, PHI19 및 PIH21은 *L. sakei*, *E. faecium* 및 *Citrobacter freundii* 등으로 확인되었다. 그리고 우렁으로부터 히스타민 생성능이 높은 RIH25 및 RIH28 균주는 상동성 99.7%와 99.0%의 *L. mesenteroides* 및 *Aeromonas hydrophilia*로 동정되었다. 이와 같이 생선 내장으로부터 히스타민 생성능이 높은 10균주를 대상으로 프로바이옌 균주로 추정되는 유산균 8종의 박테리옌 활성을 조사한 결과, CIL08, CIL16, PIL45, PIL49 및 RIL60 유산균은 히스타민 생성균에 대해 항균활성을 나타내는 박테리옌을 생산하지 않았다. 하지만 FIL20, FIL31 및 PIL52 유산균은 일부 히스타민 생성균에 대해 항균력을 나타내었으며, 박테리옌 활성은 히스타민 생성 균주에 따라 다소 차이가 있었다. 특히, *E. faecalis*와 *L. sakei* 등에 대한 FIL20의 박테리옌 활성은 128 AU/ml, *S. marcescens*에 대한 활성은 64 AU/ml이고 *L. mesenteroides*에 대해선 32 AU/ml의 활성을 나타내었다. FIL31의 박테리옌 활성을 측정된 결과, *E. aerogenes* (256 AU/ml), *A. hydrophilia* (128 AU/ml) 및 *P. halophilus* (32 AU/ml)에 대한 항균 활성을 나타내었다. PIL52의 박테리옌은 *E. faecium*에 대해 가장 높은 항균 활성(1,024 AU/ml)을 나타내었고, *E. aerogenes*에 대해선 512 AU/ml의 활성을 나타내었다.

Lakshmanan 등(2002)에 따르면, 냉장 저장한 생선과 새우로부터 분리된 아민 생성 우점종균으로는 *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Shewanella* 및 *Pseudomonas* 속 등의 그람 음성

Table 2. Bacteriocin activity of LAB against histamine-producing strains isolated from fish intestine

Identification of histamine-producing strain					Bacteriocin activity of LAB (AU/ml)							
No.	Origin	Accession No. related strain in NCBI	Similarity (%)	Identification	CIL08	CIL16	FIL20	FIL31	PIL45	PIL49	PIL52	RIL60
CIH03	Croaker	AB089245	99.6	<i>Morganella morganii</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CIH05	Croaker	JN850605	99.8	<i>Enterobacter aerogenes</i>	ND	ND	ND	256	ND	ND	512	ND
CIH09	Croaker	AY498856	99.2	<i>Serratia marcescens</i>	ND	ND	64	ND	ND	ND	ND	ND
FIH11	Flatfish	EU887827	99.9	<i>Enterococcus faecalis</i>	ND	ND	128	ND	ND	ND	ND	ND
FIH15	Flatfish	AB911557	98.4	<i>Pediococcus halophilus</i>	ND	ND	ND	32	ND	ND	ND	ND
PIH16	Pollack	KM267630	100.0	<i>Lactobacillus sakei</i>	ND	ND	128	ND	ND	ND	ND	ND
PIH19	Pollack	EU887814	100.0	<i>Enterococcus faecium</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,024	ND
PIH21	Pollack	DQ923490	99.9	<i>Citrobacter freundii</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
RIH25	Rockfish	HQ588348	99.7	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	ND	ND	32	ND	ND	ND	ND	ND
RIH28	Rockfish	KU216164	99.0	<i>Aeromonas hydrophilia</i>	ND	ND	ND	128	ND	ND	ND	ND

ND, Not detected.

균뿐만 아니라 *Micrococcus* 속 등의 그람 양성균이 주를 이룬다고 보고하였다. 히스타민을 생성하는 히스티딘 탈탄산 효소는 Enterobacteriaceae, *Clostridium* 및 *Lactobacillus* 등으로부터 확인되었고, 고등어 중독(scombroid poisoning)과 관련된 히스타민 생성 세균으로는 *M. organii*, *E. aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Photobacterium phosphoreum*, *Photobacterium histaminum* 및 *Hafnia alvei* 등이 알려져 있다(Morii et al., 1988). 게다가 *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Clostridium perfringens*, *E. aerogenes* 및 *Vibrio alginolyticus* 등은 어류로부터 분리된 히스타민 생성균이다(Shalaby, 1996). Middlebrooks 등(1988)은 생선으로부터 히스타민 생성균을 동정한 결과, *Acinetobacter lwoffii*, *Pseudomonas putrefaciens* 및 *A. hydrophilia* 등으로 확인되었다고 하였다. 특히, 어류로부터 분리된 내염성균에서도 *Staphylococcus*, *Vibrio* 및 *Pseudomonas* 등이 히스타민을 생성하는 것으로 알려져 있다(Shalaby, 1996). Kim 등(2009)에 따르면, 생선으로부터 분리된 119균주 중 56균주(47.1%)는 히스타민(0-4,073.3 mg/kg), 푸트레신(2,831.2-4,759.5 mg/kg) 혹은 카다베린(0-1,735.9 mg/kg)을 생산하는 것으로 확인되었고, 이 중에서 23균주는 3,488.6-4,073.3 mg/L의 다량의 히스타민을 생산하였으며, 분리균을 동정한 결과 주로 *Enterobacter* 속이라고 보고하였다. 일부 세균의 바이오제닉 아민 생성 조건으로는 우선 해당 균주는 유리 아미노산의 이용능을 가지고 있어야 하고, 탈탄산 효소에 의해 아민 생성을 위한 적합한 대사 경로를 거치고, 균의 증식과 아민 생성 효소의 활성을 위한 최적의 배양 조건 하에서 최대의 양을 생성하게 되는데(Ten Brink et al., 1990), 여러 연구 결과에 따르면 균주 및 배양조건에 따라 히스타민 생성량이 다양하다.

Gómez-Sala 등(2015)은 생선 및 수산가공품으로부터 총 1245종의 유산균을 분리하였고 이 중에서 197종은 부패균 및 식이성 병원균에 대한 항균활성을 나타내는 유산균임을 확인하였으며, 64종 유산균의 항균력은 박테리옌 생산에 기인한다고 하였다. 또한 박테리옌을 생산하는 유산균을 동정한 결과, *E. faecium*, *E. faecalis*, *P. pentosaceus*, *Weissella cibaria*, *L. sakei* subsp. *carnosus*, *L. sakei* subsp. *sakei*, *L. curvatus* subsp. *curvatus* 및 *L. mesenteroides* subsp. *cremoris* 등으로 확인되었다. 게다가 수산식품 등에 주로 분포하는 그람 양성 및 음성의 병원성균과 부패균에 대한 해산어로부터 분리된 유산균(*E. faecium*, *Enterococcus sanguinicola*, *E. faecalis*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus mundtii*, *Enterococcus pseudoavium*, *L. lactis* 및 *Carnobacterium* sp.)의 박테리옌 생성능을 조사한 결과, *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *A. hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*,

Vibrio anguillarum 및 *Carnobacterium* 등에 대해 강한 항균 활성을 나타내었고, *B. cereus*, *Bacillus pumilus*, *B. subtilis*, *Brochotrix thermosphacta* 및 *S. aureus*에 대해서도 항균 효과가 나타났다(Chahad et al., 2012). Nugrahani 등(2016)은 *L. casei*가 생산하는 박테리옌은 어류 내에 많은 양의 히스타민을 생산하여 히스타민 중독 위험 가능성이 높은 *Pseudomonas* sp., *Proteus morganii* 및 *Micrococcus* sp. 등의 증식을 억제하는 효과를 보고하였다. Nisin Z와 lacticin 481을 생산하는 *L. lactis* subsp. *lactis* VR84와 EG46 균주는 히스타민 생산균인 *Streptococcus thermophilus* PRI60에 대한 살균효과를 나타내지는 않았지만, 증식 억제 및 히스타민 축적량을 감소시키는 효과는 뛰어났으므로 유산균 박테리옌의 히스타민 제어능이 확인된 바 있다(Tabanelli et al., 2014). 한편, 박테리옌의 활성은 항균물질을 생산하는 균주와 배양조건 및 히스타민 생성 균주에 따라 다양하다.

박테리옌에 의한 히스타민 생성 억제 효과

히스타민 생성균에 대한 박테리옌 활성을 나타낸 유산균을 대상으로 박테리옌(200 AU/ml) 처리에 의한 히스타민 함량 변화를 측정한 결과는 Table 3과 같다. 히스타민 생성균이 생성한 히스타민 함량은 1018.2 ± 34.7 mg/L - 3150.2 ± 50.4 mg/L로 균주에 따라 상이한 차이가 나타났다. FIL20의 박테리옌 처리에 의해서 *S. marcescens* CIH09, *E. faecalis* FIH11, *L. sakei* PIH16 및 *L. mesenteroides* RIH25의 히스타민 함량을 56-76% 정도 감소시켰고, FIL31의 박테리옌에 의해서도 *E. aerogenes* CIH05 (29%), *P. halophilus* FIH15 (74%) 및 *A. hydrophilia* RIH28 (38%)의 히스타민 생성을 억제하는 효과가 나타났다. 또한 PIL52의 박테리옌도 *E. aerogenes* CIH05의 히스타민 생성량을 25% 감소시키고, *E. faecium* PIH19의 생성량도 약 20% 감소시켰다.

Zaman 등(2010)에 의하면, 생선 내에 함유된 바이오제닉 아민의 함량은 시료 내 호기성균 및 단백질 분해 활성이 우수한 세균수와 상관이 있으며, 히스타민 함량은 62.5-393.3 ppm으로 측정되어 미FDA에서 권고하는 히스타민 함량 50 ppm을 훨씬 초과하였다고 하였다. 또한 수산 가공품 내 바이오제닉 아민 축적량은 유리 아미노산에 대한 세균의 탈탄산 효소 활성에 기인하며, 단백질 분해능이 있는 세균은 단백질을 분해함으로써 아민 생성균의 탈탄산화에 이용될 기질인 아미노산을 제공하는 중요한 역할을 한다고 보고하였다. 히스타민 분해능이 있는 *S. xyloso* No. 0538은 박테리옌을 생성하는 것으로 확인되었고, 아민 생성균인 *B. licheniformis*에 대한 강한 항균 활성을 나타내었다(Mah and Hwang, 2009). 화학합성 첨

가물의 독성에 대한 소비자들의 우려로 인해 이를 대체할 수 있는 인체에 무해한 천연 보존제를 선호함에 따라 유산균이 생산하는 천연 단백질성 항균물질인 박테리옌은 식품의 저장성 향상과 품질 개선을 위해 많이 이용되고 있다. 박테리옌은 세포 내 리보솜에 의해 합성되는 항균성 펩타이드 물질로서 인체 내 단백질 분해 효소에 의해 쉽게 분해되어 잔류성이 없으며, 이를 생산하는 유산균과 유사한 종에서부터 부패균 및 식중독균 등 다양한 그람양성과 음성균에 대한 광범위한 항균 스펙트럼을 나타낸다(Klaenhammer, 1993). 게다가 박테리옌의 항균 활성을 인해 대상 균주들이 생산하는 효소 및 유해물질의 생성량 감소에도 효과적이므로 바이오제닉 아민 분해능이 있는 균주를 발효 스타터로 이용함으로써 제품 내에 유해아민의 축적량을 감소시킬 수 있다(Leuschner *et al.*, 1998).

Joosten과 Nuñez (1996)에 의하면, 히스타민 생성균인 *L. buchneri* St2A를 우유에 190 CFU/ml를 첨가하여 4개월 동안

치즈를 숙성시킨 후 균수는 1.1×10^8 CFU/g에 이르고 히스타민 생성량은 200 mg/kg에 달한 반면, 박테리옌 생성균인 *enterococci*와 *L. lactis*를 처리한 결과, St2A의 증식과 히스타민 생성이 완전히 저해되었다고 보고하였다. Thiruneelakandan 등(2013)에 따르면, *L. planatum*의 배양 상등액이나 대조구(무처리구)에 비해 부분 정제된 박테리옌을 처리한 경우 참치 시료 내 히스타민 함량이 유의하게 감소되었다고 하였는데, 본 연구에서 사용된 유산균의 박테리옌에 의해서도 히스타민 생성량을 감소시키는데 효과적이었다.

유산균과의 혼합 배양에 의한 히스타민 생성량 변화

생선 내장으로부터 분리된 히스타민 생성균과 히스타민 분해능 및 박테리옌 생산능이 있는 유산균 세포 현탁액을 BHI broth에 접종하여 37°C에서 24시간 혼합 배양한 후 배양액 내에 잔존하는 히스타민 함량을 측정된 결과는 Table 4와 같다.

Table 3. Effects the bacteriocin produced by LAB on histamine accumulation of histamine-producing strain

Histamine-producing strain	Histamine content (mg/L)			
	Control	Bacteriocin concentration (200 AU/ml)		
		FIL20	FIL31	PIL52
<i>Enterobacter aerogenes</i> CIH05	2564.2 ± 20.5	NT	1814.2 ± 30.1*	1916.9 ± 52.1*
<i>Serratia marcescens</i> CIH09	3012.5 ± 38.1	1147.9 ± 23.0*	NT	NT
<i>Enterococcus faecalis</i> FIH11	1687.2 ± 19.5	700.2 ± 15.2*	NT	NT
<i>Pediococcus halophilus</i> FIH15	1214.5 ± 40.3	NT	313.6 ± 11.7*	NT
<i>Lactobacillus sakei</i> PIH16	2316.9 ± 28.7	1010.5 ± 31.4*	NT	NT
<i>Enterococcus faecium</i> PIH19	1018.2 ± 34.7	NT	NT	813.2 ± 27.3*
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> RIH25	3150.2 ± 50.4	769.2 ± 29.7*	NT	NT
<i>Aeromonas hydrophilia</i> RIH28	2940.7 ± 39.8	NT	1809.3 ± 40.5*	NT

Data are means ± SD from triplicate determinations.

*Significantly differ ($P < 0.05$) from the control group by paired *t*-test.

NT, Not tested.

Table 4. Changes of histamine contents during co-culture with probiotic LAB showing histamine degradation and bacteriocin production ability

Histamine-producing strain	Control	Histamine content (mg/L)				
		LAB				
		CIL08	FIL20	FIL31	PIL52	RIL60
<i>Enterobacter aerogenes</i> CIH05	2564.2 ± 20.5	2146.2 ± 16.4*	1956.2 ± 25.3*	2777.5 ± 40.2	2113.4 ± 41.5*	1816.2 ± 33.7*
<i>Serratia marcescens</i> CIH09	3012.5 ± 38.1	2564.1 ± 30.3*	2136.7 ± 26.1*	3164.1 ± 45.6	2469.2 ± 22.8*	2304.4 ± 18.7*
<i>Enterococcus faecalis</i> FIH11	1687.2 ± 19.5	1429.5 ± 19.4*	1162.4 ± 20.5*	1754.3 ± 25.5	1458.3 ± 20.7*	1301.2 ± 17.2*
<i>Pediococcus halophilus</i> FIH15	1214.5 ± 40.3	996.3 ± 11.3*	962.5 ± 13.1*	1234.6 ± 20.9	996.7 ± 15.8*	910.5 ± 17.5*
<i>Lactobacillus sakei</i> PIH16	2316.9 ± 28.7	1962.4 ± 30.0*	1605.4 ± 16.9*	2258.6 ± 30.5	1989.2 ± 31.0*	1749.5 ± 11.8*
<i>Enterococcus faecium</i> PIH19	1018.2 ± 34.7	835.2 ± 13.4*	779.2 ± 11.9*	1113.5 ± 29.4	908.0 ± 12.4*	756.2 ± 9.7*
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> RIH25	3150.2 ± 50.4	2563.4 ± 20.3*	2306.5 ± 34.1*	3247.6 ± 16.3	2634.0 ± 17.5*	2451.2 ± 20.3*
<i>Aeromonas hydrophilia</i> RIH28	2940.7 ± 39.8	2425.1 ± 11.5*	2408.5 ± 27.1*	2857.2 ± 31.7	2264.1 ± 40.0*	2134.7 ± 19.3*

Data are means ± SD from triplicate determinations.

*Significantly differ ($P < 0.05$) from the control group by paired *t*-test.

CIL08 및 RIL60 균주들의 히스타민 분해능에 의해 배양액 내에 잔존하는 히스타민 함량이 대조구에 비해 유의하게 감소되었다. FIL20 및 PIL52 균주들은 히스타민 분해능뿐만 아니라 박테리옌 생산능이 확인되었으나, BHI broth 상에서 FIL20의 박테리옌 활성은 MRS broth에서 생산된 활성의 50% 수준이었고, PIL52 균주의 박테리옌 활성은 BHI broth에서 나타나지 않았다. 따라서 FIL20과 PIL52 균주들의 히스타민 생성능에 대한 감소 효과는 BHI broth 상에서 다소 낮게 나타났으며, FIL31 균주도 BHI broth 내에서는 박테리옌 활성이 나타나지 않아 히스타민 축적량이 대조구와 차이가 없었다.

Özogul (2011)에 따르면, 식품에서 유래한 병원균에 의한 바이오제닉 아민 생성에 대한 유산균의 영향을 살펴본 결과, *L. lactis* subsp. *lactis* 및 *L. plantarum*과 병원균을 혼합했을 때 배양액 내에 암모니아 함량이 유의하게 감소되었으나, 아민 형성에 대한 유산균의 저해효과는 크게 나타나지 않았다고 하였다. Tabanelli 등(2014)은 박테리옌을 생산하는 *L. lactis* subsp. *lactis* VR84 및 EG46과 티라민 생성능이 있는 *E. faecalis* EF37을 혼합 배양한 결과, EF37의 균수는 유의하게 감소되었으며, 초기 접종량에 따라 증식 속도와 최대 균수에 차이가 있었으므로 바이오제닉 생성균의 초기 접종량이 적을수록 티라민 축적량은 감소되었다고 하였다. 생선을 발효하는 동안 바이오제닉

아민 축적 감소를 위한 발효 스타터의 영향을 살펴본 결과, AO 활성이 있는 *S. carnosus* FS19 (27.7%)와 *B. amyloliquefaciens* FS05 (15.4%)는 대조구에 비해 유의하게 히스타민 농도를 감소시켰다(Zaman *et al.*, 2011). Mah와 Hwang (2009)은 히스타민 분해능이 있는 *S. xylosus*를 멸치젓갈 숙성을 위한 스타터로 이용한 경우, 대조구에 비해 히스타민 함량을 약 16.0% 감소시켜 젓갈 제조 시 제품의 안전성을 강화시키는데 도움이 되었다고 보고한 바 있다. *L. plantarum*-15, *S. xylosus*-12, *P. pentosaceus*-ATCC33316 및 *L. casei* subsp. *casei*-1.001 등의 유산균을 혼합하여 제조한 어육 소시지 내에 생성된 히스타민을 비롯한 각종 바이오제닉 아민의 함량이 유의하게 낮아졌다고 보고된 바 있다(Yongjin *et al.*, 2007).

히스타민 생성균에 대한 항균활성이 있는 프로바이오틱 유산균 동정

생선 내장으로부터 분리된 유산균 중 프로바이오틱 균주로서 적합하고 히스타민 분해능이 있으며 박테리옌 생산에 의한 히스타민 생성균의 항균 활성을 나타낸 균주를 최종 선발하여 형태학적 및 배양학적 특성, API 50 CHL kit에 의한 당 발효능 및 16S rRNA 염기서열 분석을 통해 동정한 결과는 Table 5와 같다. CIL08과 RIL60 균주는 구균인 반면, FIL20, FIL31

Table 5. Identification of the probiotic LAB showing histamine degradation and bacteriocin production ability according to phenotypic characteristics, carbohydrate fermentation, and 16S rRNA gene sequencing

Contents		LAB				
		CIL08	FIL20	FIL31	PIL52	RIL60
Phenotypic characteristics	Cell shape	Coccus	Rod	Rod	Rod	Coccus
	Gram staining	+	+	+	+	+
	Motility	-	-	-	-	-
	Gas from glucose	-	-	+	+	-
	Lactic acid	L	D	D	L	L
	Catalase	+	+	-	-	+
API50 CHL system	Types of available carbohydrate	L-Arabinose, Ribose, D-Xylose, Galactose, D-Glucose, D-Fructose, D-Mannose, N-Acetylglucosamine, Amygdaline, Esculine, Salicin, Cellobiose, Maltose, Lactose, Saccharose, D-Raffinose, β -Gentiobiose	L-Arabinose, D-Ribose, Galactose, D-Glucose, D-Fructose, D-Mannose, Mannitol, Sorbitol, α -Methyl-D-Mannoside, Cellobiose, Maltose, Lactose, Melibiose, Saccharose, Trehalose, Melezitose, D-Turanose	L-Arabinose, Ribose, Galactose, D-Glucose, D-Fructose, D-Mannose, Mannitol, Sorbitol, N-Acetylglucosamine, Amygdaline, Esculine, Salicin, Cellobiose, Maltose, Lactose, Saccharose, Trehalose, Melezitose, β -Gentiobiose, D-Tagatose	L-Arabinose, D-Ribose, D-Xylose, Galactose, D-Glucose, D-Fructose, D-Mannose, L-Rhamnose, Mannitol, Sorbitol, N-Acetylglucosamine, Amygdaline, Salicin, Cellobiose, Maltose, Lactose, Melibiose, Saccharose, Trehalose, β -Gentiobiose, D-Turanose	L-Arabinose, Ribose, D-Xylose, D-Glucose, D-Fructose, D-Mannose, Esculine, Cellobiose, Maltose, Melibiose, Saccharose, Trehalose, D-Raffinose
16S rRNA sequencing	Related strain in NCBI	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Lactobacillus sakei</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
	Accession No.	KF111712	EU213062	KP868712	KM267631	JN853602
	Similarity (%)	99.9	98.7	99.0	99.5	98.5
Identification		<i>Pediococcus pentosaceus</i> CIL08	<i>Lactobacillus plantarum</i> FIL20	<i>Lactobacillus paracasei</i> FIL31	<i>Lactobacillus sakei</i> PIL52	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> RIL60

및 PIL52 균주는 간균이었고 5균주 모두 운동성이 없는 그람 양성균이었다. FIL31과 PIL52 균주는 포도당을 분해하여 가스를 생성하였으나, CIL08, FIL20 및 RIL60 균주는 가스를 생성하지 않았다. CIL08, PIL52 및 RIL60 균주는 L형의 유산을 생성하였고, CIL08, FIL20 및 RIL60은 catalase를 생성하였다. 한편, 당 발효능과 염기서열 분석을 통해 *P. pentosaceus* CIL08, *L. plantarum* FIL20, *L. paracasei* FIL31, *L. sakei* PIL52 및 *L. mesenteroides* RIL60으로 동정되었다.

Ghanbari 등(2009)은 생선 내장으로부터 분리된 유산균을 동정한 결과, *L. sakei*, *L. plantarum*, *Lactobacillus coryneformis*, *Lactobacillus alimentarius*, *L. brevis*, *L. casei* 및 *Lactobacillus oris* 등으로 확인되었다고 하였다. 한편, 민물고기 내장으로부터 항균 활성을 가진 유산균으로 *L. sakei* 111이 보고된 바 있으며(Bajpai et al., 2016), Nirunya 등(2008)은 생선, 새우 및 패류의 내장으로부터 분리된 160종의 유산균 중 *P. pentosaceus* LM2, *P. pentosaceus* SL4 및 *E. faecium* SF가 프로바이오틱 균주로 적합하다고 보고한 바 있다. Migaw 등(2014)도 생선 내장으로부터 분리된 9종의 유산균 중에서 박테리옌의 생성능을 조사한 결과, *Enterococcus durans*, *L. lactis* 및 *E. faecium* 등이 *Listeria innocua* 및 기타 유산균에 대한 항균활성을 나타내었으며, 이들은 프로바이오틱으로서 식품의 생물학적 보존제로서 유용하다고 하였다.

생선은 단백질 함량이 높아서 부패 발생 가능성이 높고 특히 히스타민은 표피나 내장에 분포하는 아미노산 탈탄산 효소 생산균에 의해 과량의 히스타민으로 분해되어 이를 섭취한 경우 알레르기 식중독을 유발하게 되므로 본 연구에서는 프로바이오틱 유산균이 생산한 항균물질과 히스타민 분해능에 의한 유해 아민 축적량 감소 효과를 살펴보았다. 프로바이오틱 유산균은 강산이나 담즙산 등의 소화액에 대한 저항성으로 인체 소화기관을 통과하는 동안 생존하여 장에 도달한 후 장 점막 상피세포에 부착하고 항생제에 대한 내성으로 인해 장관 내에서 증식하는 동안 항균물질을 생산하여 장내에 유입된 유해균의 증식을 억제시킨다. 생선 내장으로부터 분리된 유산균 중에서 *L. plantarum* FIL20 균주는 인공 소화액 및 항생제에 대한 저항성이 높고 장관 상피세포에 대한 부착능이 높으므로 프로바이오틱 균주로서 적합한 것으로 나타났다. 또한 히스타민 분해능 및 박테리옌 생산능을 모두 가지고 있어 일부 히스타민 생성균에 대한 항균 활성 및 히스타민 생성량을 감소시키므로 유해 아민 저감화에 효과적일 것으로 사료된다. 게다가 프로바이오틱 유산균은 소화액에 대한 저항성이 높아 체내에 유입된 아미노산 탈탄산 효소 생산균의 제어에도 유용하며, 히스타민 분해능이 있는 유산균을 발효 스타터로 이용할

경우 발효 식품의 저장성 향상과 품질 개선 효과를 얻을 수 있을 것으로 판단된다.

적 요

본 연구에서는 생선 내장으로부터 분리된 유산균의 프로바이오틱 특성과 아민 산화효소(diamine oxidase, DAO) 및 박테리옌 생산을 통한 히스타민 분해능을 조사하였다. 조기, 가자미, 명태 및 우럭 내장으로부터 분리된 총 97종의 유산균 중에서 CIL08, CIL16, FIL20, FIL31, PIL45, PIL49, PIL52 및 RIL60 균주는 인공 소화액에 대한 저항성이 강하고, HT-29 상피세포에 대해서도 높은 부착력을 보였으며, 항생제(amoxicillin, ampicillin, erythromycin, penicillin G, streptomycin, tetracycline 및 vancomycin)에 대한 내성도 강한 것으로 나타났다. 게다가 이들 균주들은 히스타민이 함유된 탈카르복시화 액체배지에서 히스타민을 생산하지 않았다. 특히 DAO를 생산하는 것으로 추정되는 CIL08, FIL20, PIL52 및 RIL60 등의 4균주는 히스타민 분해능이 유의하게 높았다. FIL20, FIL31 및 PIL52 유산균이 생산한 박테리옌에 의해 *Enterococcus aerogenes* CIH05, *Serratia marcescens* CIH09, *Enterococcus faecalis* FIH11, *Pediococcus halophilus* FIH15, *Lactobacillus sakei* PIH16, *Enterococcus faecium* PIH19, *Leuconostoc mesenteroides* RIH25 혹은 *Aeromonas hydrophilia* RIH28의 증식과 히스타민 생성량이 유의하게 감소되었다. 또한 생선 내장에서 분리된 히스타민 생성균과 히스타민 분해능 혹은 박테리옌 생산능을 가진 CIL08, FIL20, PIL52 및 RIL60 유산균과 혼합 배양에 의해 히스타민 축적량이 감소되었다. 히스타민 생성을 억제하는 프로바이오틱 유산균의 배양학적 특성과 16S rRNA 염기서열 분석을 통해 *Pediococcus pentosaceus* CIL08, *Lactobacillus plantarum* FIL20, *Lactobacillus paracasei* FIL31, *Lactobacillus sakei* PIL52 및 *Leuconostoc mesenteroides* RIL60으로 동정되었다.

References

- Allameh, S.K., Daud, H., Yusoff, F.M., Saad, C.R., and Ideris, A. 2012. Isolation, identification and characterization of *Leuconostoc mesenteroides* as a new probiotic from intestine of snakehead fish (*Channa Striatus*). *Afr. J. Biotechnol.* **11**, 3810-3816.
- Bajpai, V.K., Han, J.H., Nam, G.J., Majumder, R., Park, C.S., Lim, J.H., Paek, W.K., Rather, I.A., and Park, Y.H. 2016. Characterization and pharmacological potential of *Lactobacillus sakei* 111 isolated

- from fresh water fish *Zacco koreanus*. *DARU J. Pharm. Sci.* **24**, 1–12.
- Balcázar, J.L., Vendrell, D., De Blas, I., and Ruiz-Zarzuela, I. 2008. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria from intestinal microbiota of fish. *Aquaculture* **278**, 188–191.
- Bover-Cid, S. and Holzapfel, W.H. 1999. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **52**, 33–41.
- Chahad, O.B., Bour, M.E., Calo-Mata, P., Boudabous, A., and Barros-Velázquez, J. 2012. Discovery of novel biopreservation agents with inhibitory effects on growth of food-borne pathogens and their application to seafood products. *Res. Microbiol.* **163**, 44–54.
- Chen, H.C., Kung, H.F., Chen, W.C., Lin W.F., Hwang, D.F., Lee Y.C., and Tsai, Y.H. 2008. Determination of histamine and histamine-forming bacteria in tuna dumpling implicated in a food-borne poisoning. *Food Chem.* **106**, 612–618.
- Cho, G.S., Do, H.K., Bae, C.Y., Cho, G.S., Whang, C.W., and Shin, H.K. 2006. Candidate of probiotic bacteria isolated from several *jeotgals*: Korean traditional fermented seafoods. *J. Food Sci. Nutr.* **11**, 140–145.
- Dapkevicius, M.L.N.E., Nout, M.J.R., Rombouts, F.M., Houben, J.H., and Wymenga, W. 2000. Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms. *Int. J. Food Microbiol.* **57**, 107–114.
- 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.
- García-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.
- Ghanbari, M., Jami, M., Domig, K.J., and Kneifel, W. 2009. Seafood biopreservation by lactic acid bacteria- A review. *LWT-Food Sci. Technol.* **54**, 315–324.
- Ghanbari, M., Rezaei, M., Jami, M., and Nazari, R.M. 2013. Isolation and characterization of *Lactobacillus* species from intestinal contents of beluga (*Huso huso*) and Persian sturgeon (*Acipenser persicus*). *Iran. J. Vet. Res.* **10**, 152–157.
- Grimoud, J., Durand, H., Courtin, C., Monsan, P., Ouame, F., Theodorou, V., and Roques, C. 2010. *In vitro* screening of probiotic lactic acid bacteria and prebiotic glucooligosaccharides to select effective synbiotics. *Anaerobe* **16**, 493–500.
- Gómez-Sala, B., Muñoz-Atienza, E., Sánchez, J., Basanta, A., Herranz, C., Hernández, P.E., and Cintas, L.M. 2015. Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from fish, seafood and fish products. *Eur. Food Res. Technol.* **241**, 341–356.
- Holo, 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.
- Joosten, H.M. and Nuñez, M. 1996. Prevention of histamine formation in cheese by bacteriocin-producing lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1178–1181.
- Kim, M.W. and Kim, Y.M. 2006. Isolation and identification of histamine degrading bacteria from Kwamegi. *Kor. J. Life Sci.* **16**, 120–125.
- Kim, M.K., Mah, J.H., and Hwang, H.J. 2009. Biogenic amine formation and bacteria contribution in fish, squid and shellfish. *Food Chem.* **116**, 87–95.
- Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**, 39–86.
- Kongkiattikajorn, J. 2015. Potential of starter culture to reduce biogenic amines accumulation in *som-fug*, a Thai traditional fermented fish sausage. *J. Ethn. Foods* **2**, 186–194.
- Lakshamanan, R., Shakila, R.J., and Jeyasekaran, G. 2002. Survival of amine-forming bacteria during the ice storage of fish and shrimp. *Food Microbiol.* **19**, 617–625.
- Lee, Y.C., Lin, C.S., Liu, F.L., Huang, T.C., and Tsai, Y.H. 2015. Degradation of histamine by *Bacillus polymyxa* isolated from salted fish products. *J. Food Drug Anal.* **23**, 836–844.
- Leuschner, R.G., Heidel, M., and Hammes, W.P. 1998. Histamine and tyramine degradation by food fermenting microorganisms. *Int. J. Food Microbiol.* **39**, 1–10.
- Linares, D.M., Martín, M.C., Ladero, V., Alvarez, M.A., and Fernández, M. 2011. Biogenic amines in dairy products. *Crit. Rev. Food Sci.* **51**, 691–703.
- 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. Inhibition of biogenic amine formation in a salted and fermented anchovy by *Staphylococcus xylosus* as a protective culture. *Food Control* **114**, 168–173.
- Maijala, R.L., Erola, S.H., Aho, M.A., and Him, J.A. 1993. The effect of GDL-induced pH decrease on the formation of biogenic amines in meat. *J. Food Prot.* **50**, 125–129.
- Middlebrooks, B.L., Toom, P.M., Douglas, W.L., Harrison, R.E., and McDowell, S. 1988. Effects of storage time and temperature on the microflora and amine development in Spanish mackerel (*Scomberomorus maculatus*). *J. Food Sci.* **53**, 1024–1029.
- Migaw, S., Ghrairi, T., Belguesmia, Y., Choiset, Y., Berjeaud, J.M., Chobert, J.M., Hani, K., and Haertle, T. 2014. Diversity of bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated from Mediterranean fish viscera. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 1207–1217.
- Mori, H., Cann, D.C., and Taylor, L.Y. 1988. Histamine formation by luminous bacteria in mackerel stored at low temperatures. *B. Jpn. Soc. Sci. Fish.* **54**, 299–305.
- Murooka, Y., Doi, N., and Harada, T. 1979. Distribution of membrane bound monoamine oxidase in bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **38**, 565–569.
- Musikasang, H., Sohsomboon, N., Tani, A., and Maneerat, S. 2012. Bacteriocin-producing lactic acid bacteria as a probiotic potential from Thai indigenous chickens. *Czech J. Anim. Sci.* **57**, 137–149.
- 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.
- Nirunya, B., Suphitchaya, C., and Tipparat, H.** 2008. Screening of lactic acid bacteria from gastrointestinal tracts of marine fish for their potential use as probiotics. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* **30**, 141–147.
- Nugrahani, A., Anik, H., and Hariati, M.** 2016. Characterization of bacteriocin *Lactobacillus casei* on histamine-forming bacteria. *J. Life Sci. Biomed.* **6**, 15–21.
- Osmanagaoglu, O., Kiran, F., and Ataoglu, H.** 2010. Evaluation of *in vitro* probiotic potential of *Pediococcus pentosaceus* OZF isolated from human breast milk. *Probiotics Antimicrob. Proteins* **2**, 162–174.
- Özogul, F.** 2011. Effects of specific lactic acid bacteria species on biogenic amine production by foodborne pathogen. *Int. J. Food Sci. Technol.* **46**, 478–484.
- 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.
- Santos, M.H.S.** 1996. Biogenic amines: their importance in foods. *Int. J. Food Microbiol.* **29**, 213–231.
- 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 degrees C. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **203**, 71–76.
- Shalaby, A.R.** 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Res. Int.* **29**, 675–690.
- Straub, B.W., Kicherer, M., Schilcher, S.M., and Hammes, W.P.** 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.
- Tajabadi, N., Mardan, M., Saari, N., Mustafa, S., Bahreini, R., and Manap, M.Y.A.** 2013. Identification of *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus fermentum* from honey stomach of honeybee. *Braz. J. Microbiol.* **44**, 717–722.
- Ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H.M.L., and Veld, J.H.J.** 1990. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Int. J. Food Microbiol.* **11**, 73–84.
- Thiruneelakandan, G., Sesuraj, V.J., Babu, V., Senthikumar, V., Kathiresan, K., Sivakami, R., and Anthoni, S.A.** 2013. Efficacy of preserving sea foods using marine *Lactobacillus*. *Sci. Technol. Arts Res. J.* **2**, 10–13.
- Todorov, S.D., Furtado, D.N., Saad, S.M.I., Tome, E., and Franco, B.D.G.M.** 2011. Potential beneficial properties of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from smoked salmon. *J. Appl. Microbiol.* **110**, 971–986.
- Visciano, P., Schirone, M., Tofalo, R., and Suzzi, G.** 2012. Biogenic amines in raw and processed seafood. *Front. Microbiol.* **3**, 1–10.
- 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., Bakar, F.A., Selamat, J., and Bakar, J.** 2010. Occurrence of biogenic amines and amines degrading bacteria in fish sauce. *Czech. J. Food Sci.* **28**, 440–449.
- Zaman, M.Z., Bakar, F.A., 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.