

미생물에 의한 불휘발성아민의 분해

이태식 · 박정흠 · 이명숙* · 허성호**

국립수산진흥원

*부산수산대학 미생물학과

**동의공업전문대학 식품공업과

Microbial Degradation of Non-volatile-amine

Tae-Seek LEE, Jeong-Heum PARK, Myung-Suk LEE* and Sung-Ho HUR**

National Fisheries Research and Development Agency, Kijang-up, Yangsangun,
Kyungsangnam-do 620-900, Korea

*Dept. of Microbiology, National Fisheries University of Pusan, Nam-gu,
Pusan 608-737, Korea

**Dept. of Food Technology, Dongeui Technical Junior College,
Pusan 614-050, Korea

The degradation of non-volatile-amines by microorganisms were investigated. The degrading activity could be noted in four strains isolated from fermented sardine sauce, and those were *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* P-2, *Pseudomonas fluorescens* P-3 and *Enterobacter aerogenes*. The strongest degrading activity of non-volatile-amines was showed in *Pseudomonas fluorescens* P-3 among the four strains isolated. The optimum temperature for degradation by *Pseudomonas fluorescens* P-3 was 35°C, corresponding to the optimum temperature for growth of this strain, pH between 7.0 and 7.5 could gave effective degradation and the optimum concentration of NaCl was 0 and/or 1%.

서 론

불휘발성 아민은 주로 미생물의 대사과정중에 생성되어지는 2차대사산물로서 인체의 신경계와 혈관계에 나쁜 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 이러한 아민은 치즈, 소시지 혹은 수산발효식품에 많은 것으로 알려져 있는데 서 등(1988)에 의하면 멸치 및 정어리의 발효가공품중에 불휘발성 아민의 일종인 histamine이 200~2,000ppm 정도 함유되어 있다고 보고한 바 있다.

이러한 불휘발성 아민중 histamine, cadaverine, 그리고 putrescine 등은 인체내에서 monoamine

oxidase inhibitor와 반응하거나 식품중에 다량 존재할 경우 두통, 발열, 고혈압, 알레르기 등의 현상을 일으킬 수 있으며(Arnold and Brown, 1978) 특히 아질산과 반응하여 발암성물질인 nitrosamine을 생성한다고 알려져 있다(Okuzumi et al., 1984). 그러나 현재 우리들이 상식하고 있는 수산발효 식품에 있어서 이러한 여러가지 부패성 불휘발성 아민에 대한 집중적인 조사연구는 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 수산발효식품의 제조 속성시에 생성되어지는 여러가지 불휘발성 아민을 효과적으로 배제하기 위한 방법을 모색하기 위하여 정어리젓갈에서 histamine 분해능을 가진 균주

를 분리, 동정하였고, 이 분리균주에 의한 각종 amine의 분해 활성 최적조건을 검토하여 얻은 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

시약: 실험에 사용된 histamine dihydrochloride, putrescine dihydrochloride, cadaverine dihydrochloride, 그리고 4-fluoro-7-nitrobenzofurazane은 sigma (시약특급) 제품을 사용하였다.

Histamine 분해능을 가진 세균의 분리 및 동정: 정어리 전어체를 silent cutter로 세절하고 식염을 10% 첨가한 다음 35°C에서 75일간 숙성시킨 젓갈에서 histamine 분해능이 있는 세균을 분리하기 위해 Table 1과 같은 조성의 배지, 즉 탄소원과 질소원으로써 histamine만을 첨가한 제한배지를 조제하여 사용하였다. 이 평판배지에 적당히 희석한 시료 젓갈을 도말, 배양하여 증식하는 균을 아민분해능이 있는 균주를 분리하였고 분리균의 생화학적 동정은 Bergey's manual of systematic bacteriology (Krieg and Holt, 1984)의 방법에 따랐다.

Amine의 분해실험: Nutrient borth(Difco)에 임의의 농도의 각종 amine 표품을 첨가하고 pH를 조정된 다음 같은 조건의 배지에서 전배양시킨 종균을 일정량 접종하고 배양시간에 따른 amine의 분해를 측정하였다.

Amines의 추출 및 정량: 배양배지에서의 amines 추출과 추출된 amines의 정량은 Tonogai et al.(1984)의 방법에 따랐다(Fig. 1).

Table 1. Medium for the isolation of amine-degradative bacteria

Histamine dihydrochloride	0.2g
KH ₂ PO ₄	0.2g
NaCl	0.5g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.01g
Agar	1.5g
D. W.	100ml
pH	7.0

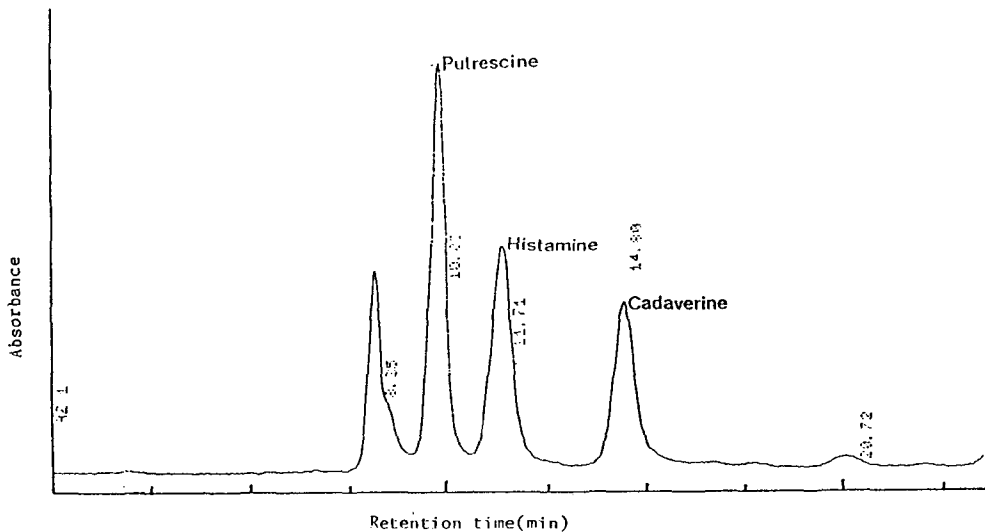


Fig. 1. Elution pattern of NBD-F derivatives of non-volatile-amines by HPLC: Instrument; Waters 2,000, Column; U-bondapak C 18, Mobilephase: E-OH: 0.1M phosphate buffer=47:53, Flow rate; 1.0ml/min, Fluorescence detector; Ext 470nm, Emi 530nm.

결과 및 고찰

분리균주의 생화학적 특징: 질소원과 탄소원으로 histamine만을 사용한 제한배지에서 선별된 균주들의 생화학적 특징은 Table 2와 같았다. 분리된 4균주는 모두 Gram음성 간균이었으며 catalase, oxidase 모두 양성으로 P₁은 *Pseudomonas aeruginosa*, P₂와 P₃는 *Pseudomonas fluorescens* 그리고 E₁은 *Enterobacter aerogenes*로 동정되었다.

Arnold와 Brown(1978) 등은 어류내장에서 histamine 분해능이 있는 균종으로 *Pseudomonas*, *Proteus*, *Escherichia*, *Vibrio*, *Klebsiella* 그리고 *Clostridium*속을 분리 보고하였고, Rowland와 Grasso(1975)는 포유동물의 장에서 분리한 *Streptococcus faecalis*와 *Klebsiella aerogenes* 등도 nitrosamines의 분해능이 있는 것으로 보고하였다. 한편 *Saccharomyces rouxii*와 *Rhizopus oryzae* 등의 효모도 amines 분해능이 있는 것으로 보고(Harada and Yamada, 1979)되기도 하여 amines 분해능이 있는 균주는 세균과 효모중 다수가 있는 것으로 사료되며 사용 시료에 따라 분리균종에 약간의 차이가 나타나는 것으로 추정되어진다.

Table 2. Biological characteristics of isolated strains

Items	P-1	P-2	P-3	E-1
Gram stain	-	-	-	-
Shape	rod	rod	rod	rod
Oxidase	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+
H-L(O)	+	+	+	+
(F)	-	-	-	+
Motility	+	+	+	+
Casein hydrolysis	+	+	+	-
Lipase (tween80 hydrolysis)	+	+	+	-
Fluorescent pigments	-	+	+	-
Indole	-	-	-	-
V-P test	-	-	-	+
M-R test	-	-	-	-
Citrate	+	+	+	+
Lysine	+	+	+	+
Arginine	+	+	+	-
Arabinose	-	-	-	+
Cellobiose	-	-	-	+
Lactose	-	-	-	+
Glucose	+	+	+	+
Sucrose	-	-	-	+
Trehalose	-	-	-	+
Dulcitol	-	-	-	-
Salicine	-	-	-	+
Maltose	-	-	-	+
Raffinose	-	-	-	+
Mannitol	-	-	-	+
Rhamnose	-	-	-	+
Xylose	-	-	-	+
Galactose	-	-	-	+

분리균주에 의한 불취발성 아민의 분해: 분리된 4균주의 아민분해능을 비교하여 보다 강력한 분해능을 가진 균주를 선별하기 위하여 nutrient broth에 histamine, putrescine 및 cadaverine을 각각 568, 351, 655ppm으로 첨가하고 예비실험에서 밝혀진 생육최적 pH인 7.0으로 조절시킨 뒤 전배양한 종균(O.D.₆₆₀=1.0)을 1ml 접종하여 35℃에서 40시간 배양한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 4균주중 P₃균주가 가장분해능이 좋아 histamine의 경우 51% 분해되었고, putrescine과 cadaverine도 각각 60%, 44%가 분해되었는데 비해 E₁균주는 histamine 15%, putrescine 22%, 그리고 cadaverine 24%정도 분해하여 가장 낮은 분해능을 나타내었다. 균종에 따른 amines의 분해능의 차이는 여러연구자들에 의해 보고(Nakamura와 Urakubo, 1987; Omara, 1987)된 바 있으며, 본 실험결과 *Pseudomonas*속이 *Enterobacter aerogenes*보다는 분해능이 좋은 것으로 나타났다.

Amine분해에 영향을 미치는 조건: 위의 실험결과와 각종 amine분해능이 가장 강한 P₃균주를 선별하여 amines분해에 영향을 미치는 온도, pH, 그리고 식염농도를 실험하였다.

온도: 최초농도를 histamine, putrescine, cadaverine 각각 568, 351, 655ppm으로 조정첨가한 nutrient broth(pH 7.0)에 종균(O.D.₆₆₀=1.0)을 1ml 첨가하여 20, 25, 30, 35℃에서 각기 40시간 배양한 결과 histamine의 경우는 25~35℃에서 고른 분해율(64~73%)을 보였으나 20℃에서는 분해율(50%)이 상당히 감소하였다(Fig. 3).

그러나 putrescine이나 cadaverine의 분해는 온도 상승에 따라 분해율도 증가하는 것으로 나타나(Fig. 3), histamine의 경우보다 온도의 영향을 많이 받는 것으로 나타났다.

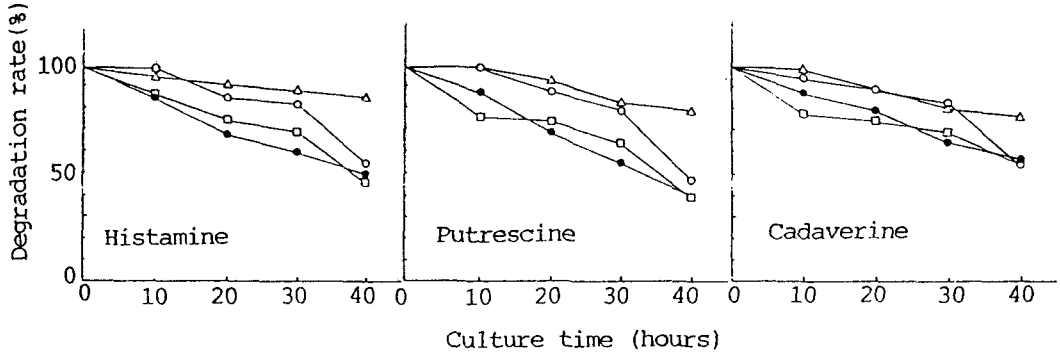


Fig. 2. Degradation of non-volatile-amines by four experimental strains at 35°C.

- , *Pseudomonas aeruginosa* P-1;
- , *Pseudomonas fluorescens* P-2;
- , *Pseudomonas fluorescens* P-3;
- △, *Enterobacter aerogenes* E-1.

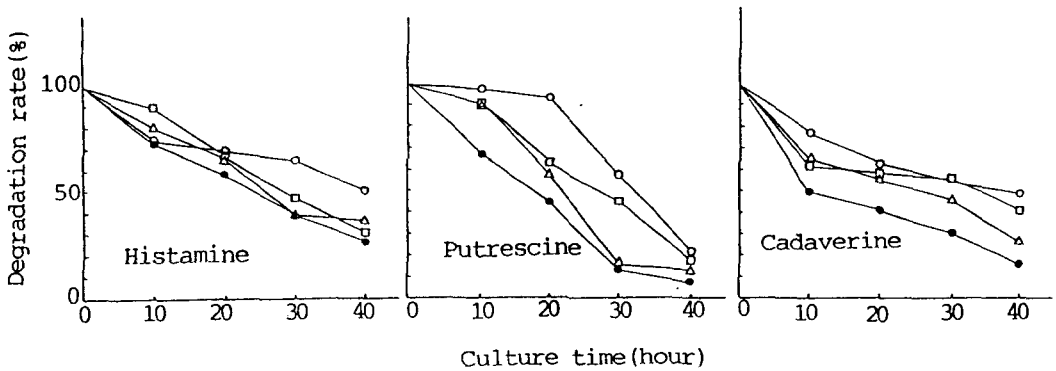


Fig. 3. Effect of temperature on the degradation of non-volatile-amines by *Pseudomonas fluorescens* P-3.

- , 20°C; □, 25°C; △, 30°C; ●, 35°C.

pH: pH를 6.5에서 8.0사이로 조정한 배지에서 P₃균주의 histamine 분해능은 pH에 별다른 영향을 받지 않았으나 putrescine의 경우는 pH 6.5~7.5사이에서 가장 분해능이 높았다. 그러나 cadaverine의 경우는 histamine이나 putrescine보다 분해최적 pH 범위가 좁아져 pH 7.5가 최적조건이었고 pH 7.0과 8.0에서의 분해능은 pH 7.5에서 보다 약 17% 감소하였으며 pH 6.5에서는 약 31% 감소하였다(Fig. 4).

식염농도: Nutrient broth에 histamine, putrescine, cadaverine을 일정농도 첨가한 후 식염을 0~8% 첨가하고 종균을 접종하여 35°C에서 40시간 배양한 후 amines의 분해율을 Fig. 5에 나타내었다.

histamine의 분해능은 식염 4%까지는 영향을 받

지 않았으나 5% 이상에서는 분해능이 감소하였고 putrescine의 분해능은 4%부터 저해받기 시작하였다. cadaverine의 분해능은 식염농도 1% 이상에서 저해받기 시작하여 식염농도의 증가에 따라 분해능도 감소하는 것으로 나타났다.

요 약

수산발효식품의 제조, 숙성중에 생성되는 부패성 불취발성아민의 효과적인 분해방법을 모색하기 위하여 정어리 젓갈에서 아민분해능이 있는 균주를 분리 동정하였고, 이 균주중 가장 아민분해능이 강한 균주를 선별하여 분해최적조건을 실험한 결과를 요약하면 다음과 같다.

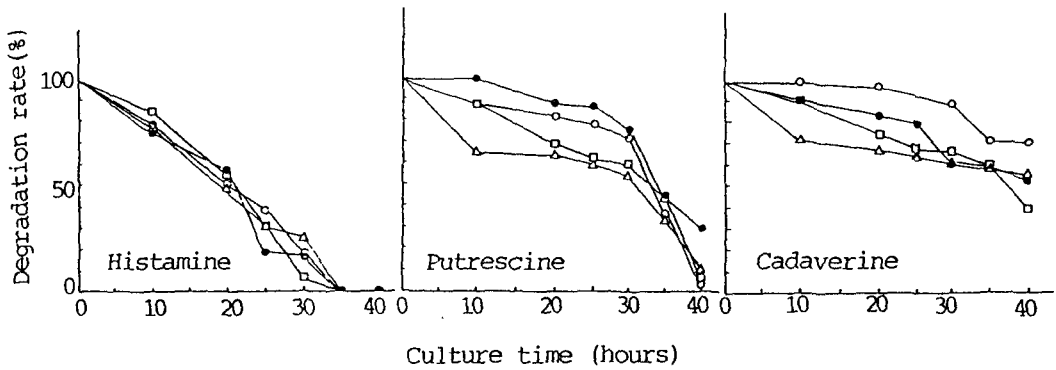


Fig. 4. Effect of pH on the degradation of non-volatileamines by *Pseudomonas fluorescens* P-3.
○, pH 6.5; △, pH 7.0; □, pH 7.5; ●, pH 8.0.

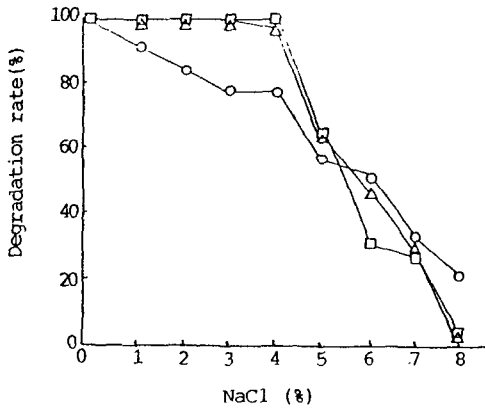


Fig. 5. Degradation rate of non-volatile-amines by *Pseudomonas fluorescens* P-3, at various NaCl concentrations after incubating for 40 hrs.
□, Histamine; △, Putrescine; ○, Cadaverine

1. 정어리젓갈에서 amine분해능이 있는 4균주를 분리하였는데 각각 *Pseudomonas aeruginosa*, 2종의 *Pseudomonas fluorescens* 그리고 *Enterobacter aerogenes*로 동정되었다.

2. 위의 4균주에 의한 histamine, putrescine 그리고 cadaverine의 분해능은 어느 경우이든 *Pseudomonas fluorescens*가 가장 강하였고, *Enterobacter aerogenes*가 가장 약하였다.

3. *Pseudomonas fluorescens*에 의한 histamine, putrescine 그리고 cadaverine의 분해능은 약간의 차이가 있었으나 온도 35°C, pH 7.5부근에서 가장 좋았고 식염농도의 증가에 따라서 감소하여 0~1% 사이에서 가장 분해능이 좋았다.

참 고 문 헌

- Arnold, H. and D. Brown. 1987. Histamine toxicity from fish products. *Advan. Food Res.*, 24, 113~154.
- Harada, K. and K. Yamada. 1979. Microbial degradation of nitrosamines-- I. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.*, 45, 925~928.
- Krieg, M. and J. G. Holt. 1984. *Bergey's manual of systematic Bacteriology*. 8th ed. Vol. 1, Williams, Baltimore-London.
- Nakamura, T. and G. Urakubo. 1987. Degradation of N-nitrosamines by enteric bacteria and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 28, 136~141.
- Okuzumi, M., M. Awano and Y. Ohki. 1984. Effects of temperature, pH value and NaCl concentration on histamine formation of N-group bacteria. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.*, 50(10), 1757~1762.
- Omura, Y. and H. S. Olcott. 1987. Histamine-forming bacteria isolated from spoiled skipjack tuna and Jack mackerel. *J. Food Sci.*, 43, 1779~1783.
- Rowland, I. R. and P. Grasso. 1975. Degradation of N-nitrosamines by intestinal bacteria. *Appl. Microbiol.*, 29, 7~12.
- Suh, S. B., H. Y. Yun, C. K. Park and S. J. Kim. 1988. Quality improvement of salt-fermented sardine by beheading of raw fish. *Bull. Nat. Fish. Res. Dev. Agency*, 41, 87~96.

Tonogai, Y., Y. Yoshihoito and M. Harada. 1984. A
separative determination of putrefactive non-
volatile amines in raw fish and product by H.
P. L. C. with fluorescence detector. J. Food

Hyg. Soc. Japan, 25, 41~46.

1989년 12월 9일 접수

1990년 2월 15일 수리