

## 국내 참치 부산물 내 히스타민 생성 주요 세균의 특성 구명

방민우 · 정창대 · 김선호 · 장문백<sup>1</sup> · 이성실<sup>2</sup> · 이상석\*

순천대학교 동물자원과학과, <sup>1</sup>중앙대학교 동물자원과학과, <sup>2</sup>경상대학교 응용생명과학부

Received January 12, 2009 / Accepted February 17, 2009

**Characteristics of Histamine Forming Bacteria from Tuna Fish Waste in Korea.** Min-Woo Bang, Chang-Dae Chung, Moon-Baek Chang<sup>1</sup>, Sung-Sil Lee<sup>2</sup> and Sang-Suk Lee\*. *Department of Animal Science, Suncheon National University, <sup>1</sup>Department of Animal Science & Technology, Chung-Ang University, <sup>2</sup>Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University, 540-742, Suncheon, Korea* - Biogenic amines are generally formed through the decarboxylation of specific free amino acids by exogenous decarboxylases released by microbial species associated with the fish products and fermented feeds. This study was conducted to investigate the properties of e tuna waste regarding the control of degradation of biogenic amines (histamine, tyramine, tryptamine, putrescine, and cadaverine) that might be related with the anti-nutritional factor of the tuna waste that is used for manufacturing domestic fish meal. The values of pH and the salt content were 6.51, 3.35% in tuna waste and 5.58 and 5.83% in tuna fish meal, respectively. The strains and dominant bacteria tested in the tuna waste sample were 9.20, 9.29, 5.67, 7.82 and 7.58 log CFU/g of total bacteria, aerobic plate count (APC), total coliform (TC), *Lactobacillus spp.* and *Bacillus spp.*, respectively. The main histamine forming-bacteria (HFB) in tuna waste were detected by silica gel thin-layer chromatography (TLC) and 7 histamine-forming bacterial species were isolated among microbes grown in selective medium. The histamine concentration was determined by detection of fluorescence of o-phthaldialdehyde (OPA) derivatives using HPLC and the date were used to reconfirm the identities of the amine-producing bacteria. The 15 histamine-forming bacteria strains grown in trypticase soy broth (TSB) supplemented with 1% L-histidine (TSBH) were identified as *Lactococcus(L.) lactis* subsp. *lactis*, *Klebsiella pneumoniae*, *L. garvieae* 36, *Vibrio olivaceus*, *Hafnia alvei* and *L. garvieae* which were main dominant amine - producing strains, and *Morganella morganii* identified by 16S ribosomal RNA (rRNA) sequencing with PCR amplification. A Phylogenetic tree generated from the 16S rRNA sequencing data showed different phyletic lines that could be readily classified as biogenic amine forming gram-positive and negative bacteria.

**Key words :** Histamine forming bacteria, Biogenic amine, 16S rRNA, tuna fish waste

### 서 론

2000년도 국내 어분생산량은 약 52,000톤으로 이는 전체 동물성 단백질사료 생산량의 약 40%를 차지하고 있으며, 특히 동물성 단백질인 혈분, 육골분 등이 점차 제한됨에 따라 어분의 지속적인 사용이 예상되고 있다. 참치 부산물은 국내 어분생산의 주요 원료로 사용되고 있으며 이는 가축의 주요 영양소공급원으로 이용되는 메티오닌, 시스틴 이외에도 비타민 B군, 칼슘, 인의 함량이 높기 때문이다[7]. 어분의 품질에 영향을 미치는 주된 항영양인자로 미생물에 의해 다량 발생하는 biogenic amine이 있다. 이중 가장 널리 알려진 항영양인자로서 알려진 histamine은 histidine decarboxylase를 생산하는 세균의 오염과 증식에 의한 탈산산과정을 거쳐 생성되며 고등어나, 꽂치, 정어리, 참치 등에 다량 함유되어 있다. Histamine을 가지고 있는 세균의 종류는 매우 다양한

것으로 알려져 있으며 이 중 *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Clostridium perfringens*, *Vibrio spp.* 등이 주요생성균주로 알려져 있다[11,16]. 어분 내 주로 함유되어 있는 histamine으로 인해 scombroid 중독을 일으켜 발진, 두드러기, 구역질, 구토, 설사, 홍조, 피부 가려움증 등을 포함한 다양한 종류의 증상을 가지고 있다[2,19,33,35]. 이외에도 사료제조과정상 열처리과정에서 lysine과 결합하여 gizzerosine이라는 난분해성 amine이라는 유독물질을 만들어내기도 한다[8,22]. 미국 식품의약국(FDA)에서는 어분 내 히스타민의 농도가 200 ppm 이상 경우 질병을 유발할 수 있고 500 ppm이상일 경우 치명적으로 동물에 영향을 줄 수 있다고 보고하고 있다[9,22]. 이에 국내 어분제조회사 및 배합사료회사에서는 정기적으로 어분의 히스타민 측정하고 있다. 본 연구는 국내 어분의 주원료로 사용되는 참치 부산물의 히스타민 생성 미생물에 의한 biogenic amine의 생성 및 분해조절방안연구를 위한 방안을 탐색하기 위하여 어분 원료로 사용하는 참치 부산물 내 히스타민 생성미생물을 파악하는데 목적을 두고 실시하였다.

#### \*Corresponding author

Tel : +82-61-750-3237, Fax : +82-61-750-3230

E-mail : rumen@sunchon.ac.kr

## 재료 및 방법

### 공시재료 채취

어분 제조 시 이용되는 참치 부산물은 국내 최대 참치 생산회사인 ㈜동원수산에서 참치통조림 제조 시 부산물로 나오는 참치 부산물을 2006년 8월부터 2006년 12월까지 10회 채취하여 본 실험에 사용하였다.

### pH 및 염도 측정

시료의 pH 및 염도측정을 위해 참치 부산물과 어분을 homogenizer (Kinematica Co., Swiss)로 균질화한 후 시료 1g을 9 ml의 증류수에 희석한 후 측정하였으며, 시료 내 pH는 pH M503P meter (Corning Glass Works, Medfield, MA, USA)를 사용하였다. 염도 측정은 Mohr 방법[30]에 의하여 NaCl 0.12 g을 삼각플라스크에 칭량하고 물 20 ml에 녹여 여기에 10% K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub> 지시약 1 ml을 가하고, 0.1 N AgNO<sub>3</sub> 용액을 갈색 뷰렛에서 적하하여 0.1 N AgNO<sub>3</sub> 용액의 역가를 구하였다. 참치 부산물은 homogenizer를 이용하여 균질화 후 시료 2 g을 채취하여 18 ml의 증류수에 희석, 원심분리하여 상층액 10 ml를 채취하였다. 여기에 10% K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub> 지시약 1 ml을 가하고, 0.1 N AgNO<sub>3</sub> 용액을 갈색 뷰렛에서 적하하여 어분의 염도를 측정하였다.

### 참치 부산물 내 주요 우점 미생물 분석

어분 제조 시 사용되는 참치 부산물 내 주요 우점 미생물을 분석하기 위하여 10회에 걸쳐 채취한 참치 부산물을 20 ml의 potassium phosphate buffer (0.05 M, pH 7.0)를 사용하여 균질화 시켰다. 참치 부산물 내 주요 우점 미생물을 측정하기 위해 총 5반복에 걸쳐 참치 부산물 내 존재하는 주요 우점 미생물을 선택배지를 사용하여 분석하였다. 시료 내 호기성 미생물과 총균수 측정을 위해 APC agar (aerobic plate agar, Difco, Detroit, MI, USA) 및 LB agar (Luria Bertani; Difco, Detroit, MI, USA)에 0.5% NaCl를 첨가하여 37°C에서 48시간 배양 후 균수를 측정하였다. 총 대장균수는 Macconkey sorbitol agar (Difco, Detroit, MI, USA)를 이용하여 37°C에서 24시간 배양 후 측정하였다. 유산균과 바실러스균의 측정을 위해 MRS agar (deMan Rogosa and Sharpe; Difco, Detroit, MI, USA)와 MYP agar (Mannitol egg-yolk-polymixin; Merck, Darmstadt, Germany)를 사용하였다[31]. Histamine과 biogenic amines 함량 분석을 위해 1% L-histidine이 포함된 trypticase soy broth (TSB)에서 48시간 배양 후 2 ml를 채취하였다.

### HPLC을 이용한 biogenic-amines의 분석

Histamine dihydrochloride, methylamine hydrochloride, ethylamine hydrochloride, tyramine, 2-phenylethylamine

hydrochloride, 1,4-diaminobutane dihydrochloride 또는 putrescine, 1,5-diaminopentane dihydrochloride 또는 cadaverine (Sigma-Aldrich)를 표준시약으로 사용하였으며, Eluent A는 각각의 0.05 M sodium phosphate monobasic (pH5.5), methanol, 그리고 THF (80:19:1 v/v)를 이용하였다 [4]. Eluent B는 methanol과 0.05 M sodium phosphate buffer (pH5.5)를 80:20으로 하여 이용하였다. Sodium phosphate monobasic의 pH는 1N NaOH를 이용하여 5.5로 보정하였다. OPA분석을 위해 methanol 5.9375 ml 안에 2-mercaptoethanol (MCE) 0.3125 ml와 OPA 0.044 g으로 구성하여 만들어진 OPA시약은 24시간 이내에 사용하였다.

HPLC는 system600E system controller (Waters, Milford), Waters 616 pump, Waters 717 plus autosampler로 구성되어 있으며 Chromatographic data의 분석과 수집은 Millennium<sup>32</sup> system을 이용하였다. Column은 Varian (Pursuit XRs 5u C-18 250×4.6 mm)을 이용하였다. 형광 detector의 excitation 파장은 330 nm 및 emission 파장은 418 nm이었다.

### Histamine 생성 미생물 분리

어분 내 주요 항영양 인자로 작용하는 Histamine을 생성하는 주요 균주를 분리하기 위하여 참치 부산물 1 g을 potassium phosphate buffer (0.05 M, pH 7.0) 9 ml에 희석한 후 Histamine 선택배지로 사용되고 있는 Niven's media [26]에 도말하였다. 도말 후 37°C, 48시간 배양한 후 그 중 파란색 또는 보라색 콜로니만 분리하여, 분리된 미생물의 순수배양을 위해 각각 1% L-histidine (Sigma)이 첨가된 Trypticase Soy broth (TSB)와 Trypticase Soy agar (Difco, USA)에 접종, 도말하였다[17]. 최종 histamine 생성균주를 분리하기 위해 37°C, 48시간 배양한 후 분석 전까지 glycerol를 첨가한 후 분리균주를 냉동보관하였다.

### 히스타민 생성능 확인

히스타민이 첨가된 배지에서 분리한 미생물은 10 ml methyl alcohol에 혼합 후 원심분리하여 상층액만 채취하였다. 상층액은 methanol을 제거한 후 110°C dry oven에서 60분간 건조된 silical gel TLC (thin layer chromatography) plate에 점적하였다. 히스타민 생성을 확인하기 위하여 아세트산 95%와 암모니아 5%로 채워진 TLC chamber에서 발현시킨 후 3% ninhydrin 시약을 분무하여 발색정도를 확인하였다[15].

### 16S rRNA gene 염기서열 분석에 의한 동정

Histamine 생성균주의 genomic DNA 추출은 1% L-histidine이 첨가된 TSB (trypticase soy broth)에서 1 ml를 취한 뒤 15,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 다시 5분간 원심분리하고 펠렛만 남긴 후 500 µl 5%

Chelex (Biorad)를 처리하여 DNA를 추출하였다. PCR (Polymerase chain reaction)반응은 DNA thermal cycler (Biorad, USA)를 사용하였다. 증폭에 사용된 universal Primer는 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')와 1492R (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3')를 사용하여 수행하였다. PCR 조건은 94°C에서 5분간 초기변성을 실시한 다음 94°C에서 45초간 변성, 55°C에서 45초간 부착, 72°C에서 1분간 신장 반응 과정을 32회 반복하여 증폭한 다음 마지막으로 72°C에서 10분간 신장하였다. PCR 생성물을 cloning하기 위하여 Promega (USA)의 pGEM<sup>®</sup> - T Vector System을 이용하였다. 16S rRNA 유전자의 염기 서열 분석은 ABI 310 Automatic Sequencer (Perkin elmer co., USA)를 이용하여 실시하였다. 16S rRNA 유전자의 염기서열간의 유사도가 높은 유전자를 찾기 위하여 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) search program을 이용하여 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 Genbank에서 염기서열을 비교하였다. 16S rRNA 유전자 염기서열과 database에 얻어진 염기서열은 CLUSTAL W program으로 정렬된 계통수 제작에 이용하였다[44]. PHYLIP software (version 3.6)의 neighbor-joining 방법의 Kimura 2-parameter 모델을 사용하여 계통수를 작성하였다[10]. neighbor-joining data의 bootstrap 분석 시 1,000회의 resampling을 적용하여 tree topology의 평가 기준으로 사용하고 이를 토대로 계통수를 작성하였다.

## 결과 및 고찰

### 참치 부산물의 pH와 염도

참치 부산물과 참치 부산물로 제조된 어분 내 pH와 염도 함량은 Table 1과 같다. 참치 부산물과 참치 어분 내 pH는 각각 6.51, 5.58로 나타났으며, NaCl 함량은 각각 3.35%, 5.83%로 측정되었다. pH는 참치 어분보다 참치 부산물이 더 높았으며, NaCl 함량은 참치 어분이 높음을 알 수가 있었다. 이는 참치 부산물을 가공처리과정에서 수분 증발로 인하여 참치 어분의 NaCl 농도가 증가된 것에 기인하며 NaCl 함량이 증가함에 따라 어분 내 미생물의 수도 감소된 것으로 분석되었다[13]. 자반고등어 및 과메기에서 분리한 히스타민을 이용하는 미생물은 NaCl 농도가 0-7%까지 전반적으로 성장하는 것으로 알려져 있으며 어류내 존재하는 미생물은 NaCl

Table 1. Values of pH and salt content in tuna fish waste and tuna fish meal

|                  | Tuna fish waste        | Tuna fish meal |
|------------------|------------------------|----------------|
| pH               | 6.51±0.10 <sup>a</sup> | 5.58±0.13      |
| Salt content (%) | 3.35±0.24              | 5.83±0.05      |

<sup>a</sup>Mean±Stand Deviation values

농도가 3%에서 전반적으로 잘 자라는 것으로 보고되어져 있다[37].

### 주요우점 균주 분포 및 histamine forming bacteria 분리

각각의 선택배지에서 배양한 참치 부산물 내 총세균, APC, *Escherichia coli*, *Lactobacillus* spp. 및 *Bacillus* spp.는 각각 9.20, 9.29, 5.67, 7.82 및 7.58 log CFU/g로 측정되었다(Table 2). 또한 참치 부산물로 만들어진 참치 어분 내 총 세균 및 *Bacillus* spp.는 2.12와 2.01 log CFU/g로 참치 부산물에 비교하여 볼 때 가공처리과정 중에 열에 의한 *E. coli* 등의 미생물의 사멸을 관찰할 수 있었다. 국내에서 사료로 사용되고 있는 어분은 2008년도에 고시된 국내사료법규의 범위와 기준고시에서 *Salmonella* D그룹만을 음성으로 고시하고 있으며[29] 기타 세균에 대해서는 법적 제한을 두고 있지 않다. 그러나 유럽의 사료법규에는 *Salmonella*, *E. coli*, *Campylobacter*, *Enterobacteria* 등 병원성 미생물의 규제를 강화하고 있는 실정이다[24]. 반면에 가공식품은 특성에 따라 식중독균의 원인이 되는 대장균 O157:H7은 검출되어서는 안되며, *Bacillus cereus*는 1 g 당 1,000 이하로 규정하고 있다. 수산물에 대한 세균 규격으로는 최종 유통판매 되는 냉동어의 경우 총 세균 수는 100,000 CFU/g 이하 및 대장균은 10 CFU/g 이하로 제한하고 있다. 대만의 경우 식품법규 상 APC 배양 시 5.0 log CFU/g 으로 제한되어 있으며[34], 본 연구결과 9.29 log CFU/g는 식품을 제조하기 원료로서 부적합하지만 어분을 제조하기 위한 사료 원료로서의 이용은 가능한 것으로 사료된다.

### 히스타민 생성 미생물 분리

Histidine이 첨가된 제한배지에 획선 배양하여 증식된 균주를 Bergey's manual을 참고로 하여 형태학으로 분리한 후, silica gel TLC 분석을 통한 참치 부산물에서 분리한 미생물의 히스타민 발현된 양을 측정하였다. 참치 부산물 내 histamine 양성 반응 균주를 선별하기 위하여 histamine 표준용액을 각각 10 mg, 30 mg, 50 mg으로 정량한 후 TLC plate에 적정하였다(Fig. 1). 총 균주 17개 중 15개 균주가 양성 반응을 보여 주었으며 이는 히스타민 생성균주를 분리하는데 유용한 방법으로 이용이 가능할 것으로 사료된다[22].

Table 2. Total bacteria, aerobic plate count (APC), total coliform (TC), *Lactobacillus* spp. and *Bacillus* spp. in tuna fish-meal and fish wastes (log CFU/g)

|             | Total bacteria | APC                    | TC        | <i>Lactobacillus</i> spp. | <i>Bacillus</i> spp. |
|-------------|----------------|------------------------|-----------|---------------------------|----------------------|
| Fish wastes | 9.20±0.16      | 9.29±0.12 <sup>a</sup> | 5.67±0.21 | 7.82±0.45                 | 7.58±0.86            |
| Fish meal   | 2.12±0.31      | nd                     | nd        | nd                        | 2.01±0.32            |

<sup>a</sup>Mean±SD values, nd: not detected

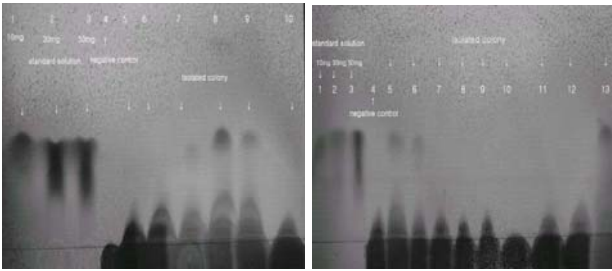


Fig. 1. Histamine identification using TLC plate method. No. 1, 2, 3: histamine dihydro - chloride standard solution 10, 30, 50 mg; No. 4: negative control; No. 5~10: Isolated colony; No. 5~13: Isolated colony

16S rRNA 염기서열 비교에 의한 histamine 생성 미생물 동정

TLC 분석에 의해 양성으로 확인된 15종의 균주는 16S rRNA 염기서열을 분석한 후 계통분류학적으로 어떤 division에 속하는지 확인하기 위해 NCBI에서 제공하는 BLAST을 이용하여 비교하였다. 본 분석결과 *Lactococcus* sp. 3종, *Klebsiella* sp.1종, *Morganella* sp. 1종, *Vibrio* sp. 1종, *Hafnia* sp. 1종을 포함한 총 7종의 서로 다른 균주가 확인되었다. 이들 균주는 *L. garvieae* 36 (AY946285)와 98%, *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 (AE006456)와 99%, *Klebsiella pneumoniae* (EF197996)와 99%, *Morganella morganii* CPD30 (AY464464)와 98%, *Vibrio olivaceus* HC010916A-1 (AY827492)와 99%, *Hafnia alvei* 718 (AY572428)와 99%, *L. garvieae* NRIC 0612 (AB267905)와 99%의 상동성을 보였다(Table 3).

한편 *H. alvei*, *M. morganii*와 *K. pneumoniae*는 scombroid 중독 발생에 있어 히스타민이 주원인이 되는 균주로 알려져 있으며, *Klebsiella* spp.는 다량의 histamine을 생산할 능력이 있는 균주로 보고되었다[6,21,32]. 이들뿐 아니라 다른 여러 어류 내에서도 다양한 박테리아 종이 히스타민을 생산할 수 있는 것으로 확인되었다[10,30]. 어류의 장내 히스타민 생성 균으로 *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia fonticola*, *Serratia liquefaciens*, *Raoultella* (formerly *Klebsiella*) *planticola*, *Raoultella ornithinolytica*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium* spp., *Vibrio alginolyticus*, *Acinetobacter lowffi*, *Plesiomonas shigelloides*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas* spp., 및 *Photobacterium* spp. 등이 보고되고 있다[1,18,20,27,34,36]. 또한 Fig. 2에서 나타낸 바와 같이 16s rDNA 염기서열에 의한 계통도 분석결과 각기 미생물들이 다른 계통임을 보여주며 biogenic amines를 생성하는 그람 양성균과 음성균으로 분류될 수 있다.

Biogenic amine 생성량 측정

Histamine 분석을 위한 가장 적절한 방법으로는 특정 전문

Table 3. Identification of histamine forming bacteria isolated from tuna fish waste that contains 1% histamine by 16S rRNA, basing on the output results from NCBI

| Strains No. | Organism identified                          | Gene bank accession number | Percentage identity (%) |
|-------------|--|----------------------------|-------------------------|
| 1           | <i>L. garvieae</i> 36                        | AY946285                   | 98                      |
| 2           | <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> IL1403 | AE006456                   | 99                      |
| 3           | <i>K. pneumoniae</i>                         | EF197996                   | 99                      |
| 4           | <i>M. morganii</i> CPD30                     | AY464464                   | 98                      |
| 5           | <i>V. olivaceus</i> HC010916A-1              | AY827492                   | 99                      |
| 9           | <i>H. alvei</i> 718                          | AY572428                   | 99                      |
| 11          | <i>L. garvieae</i> NRIC 0612                 | AB267905                   | 99                      |

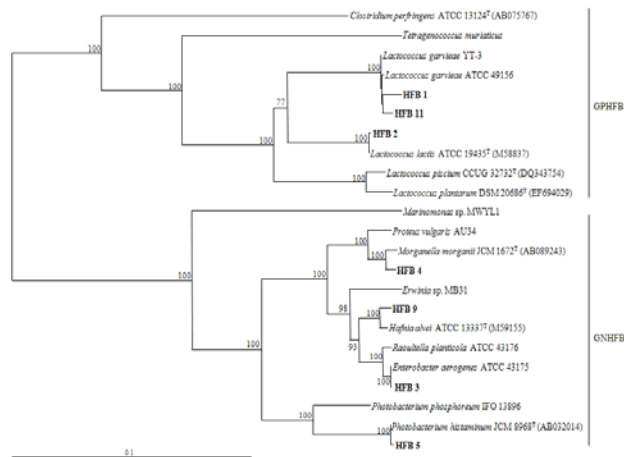


Fig. 2. Phylogenetic tree of 16S rRNA HFB. Only bootstrap values greater than 50% are shown on the internal nodes. GPFB: Gram positive histamine-forming bacteria; GNHFB: Gram negative histamine-forming bacteria

기술과 장시간 분석시간이 요구됨에도 불구하고, high-performance liquid chromatography (HPLC)와 liquid chromatography를 이용하는 것이 가장 적절한 것으로 제시되고 있다[3,14,23,25,28]. HPLC는 biogenic amines 및 biogenic index로 사용되고 있는 histamine, putrescine, cadaverine을 동시에 정성·정량 분석이 가능하다[5]. 16s rRNA 염기서열을 통해 분석한 7종의 histamine 생성균주의 biogenic amines 함량을 OPA 유도체를 이용하여 분석하였다. Histamine, methylamine, ethylamine, tyramine, phenylethylamine, putrescine 및 cadaverine의 retention time은 각기 23.9, 30.4, 36.6, 39.9, 52.6, 56.6 및 64.3 min으로 나타났다(Fig. 3, Table 4). 이 표준 곡선을 바탕으로 7종의 histamine 농도를 측정할 결과 *K. pneumoniae*가 403.01 ppm으로 가장 높은 농도를 나타냈으며 *M. morganii*는 48.5 ppm이었다. Histamine을 포함한 methylamine, ethylamine, tyramine, phenylethylamine, putrescine 등 biogenic amines의 함량도 *K. pneumoniae*가 가

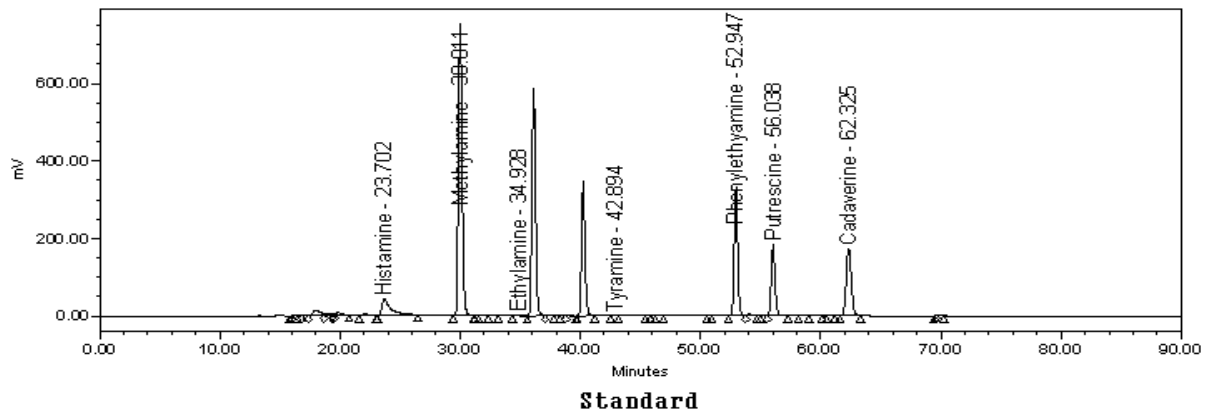


Fig. 3. HPLC profiles of the OPA-derivatives of a biogenic amines standard solution and peak identities: histamine, methylamine, ethylamine, tyramine, phenylethylamine, putrescine, cadaverine.

Table 4. Histamine and biogenic amines (ppm) produced in supernatant of culture borth by histmine forming bacteria

| Isolated strains | Organism identified                   | His    | Met  | Eth   | Tyr  | Phe  | Put   | Cad   | Total biogenic amines |
|------------------|---------------------------------------|--------|------|-------|------|------|-------|-------|-----------------------|
| 1                | <i>L. garvieae</i> 36                 | 7.86   | 0.12 | ND    | 2.60 | ND   | 0.41  | 0.08  | 11.07                 |
| 2                | <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> | 10.92  | 0.22 | 0.05  | 0.03 | ND   | 0.41  | 0.08  | 11.71                 |
| 3                | <i>K. pneumoniae</i>                  | 403.01 | 1.99 | 15.58 | ND   | ND   | 3.55  | 0.53  | 424.66                |
| 4                | <i>M. morgani</i> CPD30               | 48.55  | ND   | ND    | ND   | 2.06 | 23.45 | 0.52  | 74.58                 |
| 5                | <i>V. olivaceus</i> HC010916A-1       | 3.73   | 1.11 | ND    | ND   | ND   | 1.22  | 0.29  | 6.35                  |
| 6                | <i>L. garvieae</i> NRIC 0612          | 4.35   | 0.03 | ND    | ND   | ND   | 4.76  | 13.85 | 22.99                 |
| 7                | <i>H. alvei</i> 718                   | 3.75   | 0.02 | ND    | ND   | ND   | 0.88  | 0.12  | 4.77                  |

His: histamine; Met: methylamine; Eth: ethylamine; Tyr: tryamine; Phe: 2-phenylethylamine; Put: putrescine; Cad: cadaverine; ND: Not detected.

장 높은 농도를 보였다. Lopez-Sabater 등[21]은 *Klebsiella* spp. 1,000 ppm 이상의 히스타민을 생성한다고 보고하였으며, 이 중 참치에서 추출한 *Klebsiella. oxytoca* 및 *Klebsiella. pneumoniae*는 1% histidine이 첨가된 TSB 배지에서 1,000 ppm 이상의 히스타민을 생산한다고 보고하였다. 그러나 저염 처리된 멸치에서 분리한 *Klebsiella. oxytoca*의 histamine 농도는 26.7ppm으로 분리한 종마다 차이가 있는 것으로 보고되었다 [12]. 게다가 본 연구에서 동정한 *H. alvei*, *M. morgani*는 생선 식중독의 주원인이 되는 scombroid를 생성하는 미생물로 밝혀져 있다[31]. 따라서 질 좋은 어분을 제조하기 위해서는 참치 부산물 내 히스타민 생성 미생물을 제어하기 위한 방안이 필요할 것으로 사료된다.

## 요 약

Biogenic amines은 발효제품과 같이 어류 속의 미생물에서 분비된 decarboxylase의 free amino acid의 decarboxylation에 의해 형성된다. 본 연구는 국내 어분 제조원료로 이용되고 있는 참치 부산물의 항영양인자로 작용하는 biogenic amines (histamine, tyramine, tryptamine, putrescine, cadaverine)의

분해조절을 위해 참치 부산물의 특성 구명을 위한 연구로 실시하였다. 참치 부산물의 pH 및 염도 농도는 6.51과 3.35%이었으며, 참치 어분의 pH 및 염도 농도는 5.58과 5.83%이었다. 참치 부산물 내 존재하고 있는 균주 및 주요 미생물을 확인한 결과 Total bacteria, aerobic plate count (APC), Total coliform (TC), *Lactobacillus* spp. 및 *Bacillus* spp.는 각각 9.20, 9.29, 5.67, 7.82 및 7.58(Log CFU/g)이었다. 참치 부산물 내 히스타민 주요 생성균을 확인하기 위해 TLC 방법을 이용하였으며 히스타민 선택배지에서 추출한 미생물 중 총 7종의 히스타민 생성 균주를 선발하였다. 선발된 균주는 HPLC 분석을 통하여 히스타민 농도를 측정하여 아민 생성 미생물을 재확인하였다. Trypticase soy broth에 1% L-histidine (TSBH)을 첨가한 배지에서 분리한 7종의 히스타민 생성 균주를 16S rRNA 염기서열 분석 방법을 통해 분석한 결과, 참치 부산물 내 주요 우점 아민 생성 미생물은 *L. lactis* subsp. *lactis*, *K. pneumonlae*, *L. garvieae*, *V. olivaceus*, *H. alvei*, *L. garvieae* 및 *Morganella morgani*가 주요 균주로 분석되었다. 16S rRNA 분석결과로 만들어진 phylogenetic tree는 다른 계통임을 보여 주며 이는 biogenic amine을 생성하는 그람 양성 및 음성균으로 분류될 수 있다.

## 감사의 글

이 논문은 2006년도 순천대학교 학술연구비 공모과제 및 2006년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2006-신진교수지원-F00036).

## References

- Ababouch, L., M. E. Afila, S. Rhafiri, and F. Busta. 1991. Identification of histamine-producing bacteria isolated from sardine (*Sardina pilchardus*) stored in ice and at ambient temperature (25°C). *Food Microbiology* **8**, 127-136.
- An, H., and B. Ben-Gigirey. 1998. Scombrotoxin poisoning, pp. 68-69, In Millar, I., D. Gray, and N. Strachan (eds.), *Microbiology of seafoods*, London: Chapman and Hall Ltd.
- Antoine, F. R., C. I. Wei, R. C. Littell, and M. R. Marshall. 1999. HPLC Method for analysis of free amino acids in fish using o-Phthaldialdehyde precolumn derivatization. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **47**, 5100-5107.
- Brillantes, S. and W. Samosorn. 2001. Determination of histamine in fish sauce from Thailand using a solid phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Fish Science* **67**, 1163-1168.
- Chang, S., J. W. Ayres, and W. E. Sandine. 1985. Analysis of cheese for histamine, tyramine, tryptamine, histidine, tyrosine, and tryptophane. *Journal of Dairy Science* **68**, 2840-2846.
- Chen, H. C. 2007. Determination of histamine and histamine-forming bacteria in tuna dumpling implicated in a food-borne poisoning. *Food Chemistry* **106**, 612-618.
- Church. 1991. *Livestock feeds and feeding*. Reston Co., 133-149.
- Fairgrieve, W. T., M. S. Myers, R. W. Hardy and F. M. Dong. 1994. Gastric abnormalities in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed amine-supplemented diets or chicken gizzard-erosion-positive fish meal. *Aquaculture* **127**, 219-232.
- FDA. 1992. *Bacteriological analytical manual*. Arlington, VA: AOAC International
- Felsenstein, J. 2002. PHYLIP (phylogeny inference package), version 3.6a, Seattle: Department of Genetics, University of Washington, Seattle, WA, USA.
- Gallardo, J. M., C. G. Sotelo., R. L. Perez-Martin and Z. Lebensm. 1997. *Unters. Forsch A* **204**, 336.
- Halász, A., A. Baráth, L. Simon-Sarkadi, and W. Holzapfel. 1994. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science and Technology* **5**, 42-49.
- Hwang, S. J. and Y. M. Kim. 2005. Isolation and identification of a histamine-degrading bacteria from salted mackerel. *Journal of Life Science* **15**, 743-748.
- Innocente, N., M. Biasutti, M. Padovese, and Moret, S. 2007. Determination of biogenic amines in cheese using HPLC technique and direct derivatization of acid extract. *Food Chemistry* **101**, 1285-1289.
- Jeya Shakila, R., T. S. Vasundhara, and K. V. Kumudavally. 2001. A comparison of the TLC-densitometry and HPLC method for the determination of biogenic amines in fish and fishery products. *Food Chemistry* **75**, 255-259.
- Kim, S. H., J. Barros-Velazquez, B. Ben-Gigirey, J. B. Eun, S. H. Jun, and C. I. Wei. 2003. Identification of the main bacteria contributing to histamine formation in seafood to ensure product safety. *Food Science and Biotechnology* **12**, 451-460.
- Kung, H. F. 2007. Histamine contents and histamine-forming bacteria in miso products in Taiwan. *Food Chemistry* **101**, 351-356.
- Kung, H. F. 2007. Histamine contents and histamine-forming bacteria in sufu products in Taiwan. *Food Control* **18**, 381-386.
- Lehane, L. and J. Olley. 2000. Histamine fish poisoning revisited. *International Journal of Food Microbiology* **58**, 1-37.
- Lopez-Sabater, E. I., J. J. Rodriguez-Jerez, M. Hernandez-Herrero, A. X., Roig-Sagues, and Mora-Ventura, M. A. T. 1996. Sensory quality and histamine formation during controlled decomposition of tuna (*Thunnus thynnus*). *Journal of Food Protection* **59**, 167-174.
- Lopez-Sabater, E. I., J. J. Rodriguez-Jerez, A. X. Roig-Sagues, and M. A. T. Mora-Ventura. 1994. Bacteriological quality of tuna fish (*Thunnus thynnus*) destined for canning: Effect of tuna handling on presence of histidine decarboxylase bacteria and histamine level. *Journal of Food Protection* **57**, 318-323.
- Macana, J. 2006. Long-term follow-up of histamine levels in a stored fish meal sample. *Animal Feed Science and Technology* **127**, 169-174.
- Marcobal, A., M. C. Polo, P. J. Martí'n-A'lvarez, and M. V. Moreno - Arribas. 2005. Biogenic amine content of red Spanish wines: comparison of a direct ELISA and a HPLC method for the determination of histamine in wines. *Food Research International* **38**, 387-394.
- Miklos, M. 2007. Feed regulation in the european union. Proceeding of the 5th vietnames-hungarian international conference. 11-13.
- Moret, S. and L. S. Conte. 1996. High-performance liquid chromatographic evaluation of biogenic amines in foods: An analysis of divergent methods of sample preparation in relation to food characteristics. *Journal of Chromatography A* **729**, 363-369.
- Niven, C. F., M. B., Jeffreg and D. A. Corlett. 1981. Differential plating medium for quantitative detection of histamine-producing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **41**, 321-322.
- Okuzumi, M., A. Hiraishi, T. Kobayashi, and T. Fujii. 1994. *Photobacterium histaminum* sp. nov., a histamine-producing marine bacterium. *International Journal of Systemic Bacteriology* **44**, 631-636.
- Paleologos, E. K. and M. G. Kontominas, 2004. On-line solid-phase extraction with surfactant accelerated on-col-

- umn derivatization and micellar liquid chromatographic separation as a tool for the determination of biogenic amines in various food substrates. *Analytical Chemistry* **76**, 1289-1294.
29. Protocol of feed processing. 2007. Korea feed Ingrediengs Association.
30. Sheen, R. T. and H. L. Kahler. 1938. Effect of Ions on Mohr method for chloride determination. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition* **10**, 628-629.
31. Stratton, J. E., R. W. Hutkins, and S. L. Taylor. 1991. Biogenic amines in cheese and other fermented foods. *Journal of Food Protection* **54**, 460-470.
32. Taylor, S. L. and M. Speckard. 1983. Isolation of histamine-producing bacteria from frozen tuna. *Marine Fisheries Review* **45**, 35-39.
33. Taylor, S. L. 1986. Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects. *Critical Reviews in Toxicology* **17**, 91-128.
34. Tsai, Y. H., H. F. Kung, T. M. Lee, H. C. Chen, S. S. Chou, and C. I. Wei. 2005. Determination of histamine in canned mackerel implicated in a food borne poisoning. *Food Control* **16**, 579-585.
35. Tsai, Y. H., H. F. Kung, T. M. Lee, G. T. Lin, and D. F. Hwang. 2004. Histaminelated hygienic qualities and bacteria found in popular commercial scombroid Wsh Willets in Taiwan. *Journal of Food Protection* **67**, 407-412.
36. Tsai, Y. H., H. F. Kung, Q. L. Lin, J. H. Hwang, S. H. Cheng, and C. I. Wei. 2005. Occurrence of histamine and histamine-forming bacteria in kimchi products in Taiwan. *Food Chemistry* **90**, 635-641.
37. Tsai, Y. H., C. Y. Lin, L. T. Chien, T. M. Lee, C. I. Wei, and D. F. Hwang. 2006. Histamine contents of fermented fish products in Taiwan and isolation of histamine-forming bacteria. *Food Chemistry* **98**, 64-70.