

Isolation and characterization of biogenic amine degrading bacteria in fermented soybean products

Yong Sang Kim and Tai-Boong Uhm*

Faculty of Biological Sciences, Chonbuk National University 561-756, Republic of Korea

I. 서 언

1. Biogenic amines의 일반적 특성

Biogenic amine은 지방족(putricine, cadaverine, spermine, spermidine), 방향족(tyramine, phenylethylamine), 헤테로 방향족(histamine, tryptamine)의 구조를 가진 염기성 질소화합물이다. 식품에서 미생물의 amino acid decarboxylase 작용에 의해 아미노산으로 부터 형성되는 이 물질들은 주로 어류 및 해산물과 청국장, 된장, 치즈, 포도주, 맥주와 같은 발효식품에서 주로 발견되는데 세균에서는 *Acromonas*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Klebsiela*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas* 속 등이 amino acid decarboxylase를 가지는 것으로 보고 되고 있다(1).

2. Biogenic amines의 생체내 대사

음식을 통해 소장에서 흡수 후 이들 biogenic amine들은 인체 또는 미생물의 대사 과정이나 콩팥에서 배출을 통해 제거된다. 인간은 monoamine oxidase (MAO, EC 1.4.3.4)와 diamine oxidase (DAO,

EC 1.4.3.6)가 biogenic amines 분해에 주 역할을 하는 것으로 알려져 있다(2). histamine의 경우 인체 내에서 histamine N-methyltransferase를 통해 N-methylhistamine으로 전환 후, monoamine oxidase (MAO)에 의해 N-methylimidazolylacetic acid로 분해, 또는 diamine oxidase에 의해 imidazolylacetic acid로 산화된다(3). 또한 콩팥은 혈액내의 histamine을 methyl화 시킨 뒤 오줌으로 배설하며, 소장 내에서는 미생물에 의해 활성이 없는 형태인 acetylhistamine으로 전환된다(1). 그러나 식품을 통해 인체 처리 한도 이상을 섭취하든지, MAO 저해제를 섭취하는 경우, 또는 장 질환이 있는 경우(1)에는 분해되지 않은 biogenic amines의 약리적 특성에 의해 독성이 나타날 수 있다(Table 1). 현재 각국의 식품에서 biogenic amines 전체량에 대한 허용 상한선은 정해 있지 않으나 일부 생선류, 육류 또는 그 통조림에 대한 histamine 가이드라인은 정해 놓고 있다. 예를 들어 유럽 연합에서 고등어, 삼치, 청어과 날 생선은 100 mg/kg 이하, 염장 생선은 200 mg/kg이하의 histamine을 함유해야한다고 규제하고 있다(1).

Table 1. Pharmacological effects and toxicity of biogenic amines

Biogenic amine	Pharmacological effects	Toxicity
Histamine	Dilatation of periperal blood vessels, capillaries, and arteries; contraction of intestinal smooth muscle; sensory and motor neuron stimulation	Hypotension, flushing, headache, abdominal cramps, diarrhoea, vomiting, pain, itching (urticarial lesion)
Tyramine	Peripheral vasoconstriction; increase of cardiac output; cause migraine; increase of respiration and blood sugar level	Hypertension, headache
Putrescine & caraverine	Hypotension, bradycardia, paresis of the extremities	Formation of heterocyclic carcinogenic nitrosamines, nitrosopyrrolidine and nitrosopipidine (reaction with nitrite)

2. Biogenic amines 형성 조건

Biogenic amines의 형성은 식품 중의 아미노산 함량과 미생물이 분비하는 L-amino acid decarboxylase의 생성 양과 활성도에 의해 결정된다. Decarboxylase 작용에 의해 아미노산 histidine은 histamine, tyrosine은 tyramine, tryptophane은 tryptamine, arginine은 putricine, lysine은 cadaverine으로 바뀌게 된다. 세균 amino acid decarboxylase의 최적 pH는 일반적으로 산성에서 활성이 높고, 산에 대한 방어 기작으로 산성화 되었을 때 미생물이 이 효소 생성량을 늘리는 것으로 알려져 있다. 환경적 요소로서 온도의 영향이 가장 큰데 세균의 최적 증식온도에서는 decarboxylase 활성 증가로 biogenic amine 생산량이 크게 증가하는 반면 온도가 낮아져 증식이 멈추게 되면 효소 활성 또한 급격히 감소하였다(4). 이러한 이유로 미생물 증식이 잘되고 biogenic amines 생산 조건을 갖춘 식품들은 cold chain에 의한 유통 과정이 필요하다. NaCl은 tyrosine decarboxylase활성을 증가시키는 반면 histidine decarboxylase 활성을 억제하며(5), 산화환원 전위를 낮춘 혐기 상태의 식품에서 histamine의 생산은 증가하는 것으로 나타났다(1).

3. 우리나라 식품에서 biogenic amine들의 분포

조 등(6)은 국내 유통 발효 식품 중에 biogenic

amines들의 분포를 체계적으로 조사하였다.

특히 한국인의 주 부식인 전통 된장에서 putrescine은 99.6-1453.7(평균 462.6) mg/kg, histamine은 260.1-952(평균 569.4) mg/kg, tyramine은 284.7-1430.7(평균 669.5) mg/kg으로 분석한 34종의 식품 가운데 평균적으로 가장 높았으며, 다음으로 멸치 젓갈(putrescine, histamine, tyramine 각 평균 86.5, 624.5, 330.1 mg/kg, 까나리 젓갈(각 평균 84.9, 584.2, 342.7 mg/kg), 시판 간장(각 평균 56.8, 129.8, 594.5 mg/kg), 전통 간장(각 평균 376.9, 225.9, 241.6 mg/kg)들이 높은 수치를 보였다. 김치의 경우 putrescine, histamine, tyramine의 평균 함량은 장류나 젓갈 보다 낮은 수준으로 각각 69.7, 50.0, 49.4 mg/kg이었다. 한국인의 음식 특성 상 일일 섭취량에서 젓갈보다 장류 섭취량이 많다는 것을 고려하면, 이 결과들은 장류가 biogenic amine의 주공급원이 될 수 있다는 것을 보여주었다. GenBank database를 검색했을 때 콩류 발효에 관여하는 미생물들인 *Bacillus*, *Aspergillus*, Lactic acid bacteria, 효모들은 amino acid decarboxylase 유전자들을 함유하고 있다. 단백질 함량이 높은 콩과 proteases 활성이 매우 높은 *Bacillus* sp.와 *Aspergillus* sp.의 존재, 미혐기적 환경과 적당한 발효 온도를 고려할 때 장류는 biogenic amines을 생산하기 좋은 환경이라 할 수 있다. 그러나 장류에서

biogenic amines을 제어할 수 있는 조건들이 확립되어 있지 않아 공장형 된장까지도 비교적 높은 수준의 biogenic amines을 함유(putricine, histamine, tyramine 각각 평균 46.4, 83.6, 133 mg/kg)한다는 점에서 저감화를 위한 방법 개발이 필요한 실정이다.

amine 비생산 균주들의 선발동안 발견했다. 따라서 장류의 biogenic amines 생성 제어를 위해서는 장류 발효, 숙성, 보관 조건하에서 이들 물질을 생성하지 않는 발효 균주 선발과 함께 분해까지 할 수 있는 균주 선발이 가장 효과적인 방법이 될 것이다.

4. 장류에서 biogenic amines 생성 제어 방법

장류의 biogenic amine 함량은 환경적 요인과 함께 발효 미생물의 종류와 특성, 개수에 의해 결정되므로 이들을 제어하는 기술이 필요하다. 그러나 pH, 발효, 숙성, 보관 시 온도, 염도 등의 환경적 요소도 미생물의 증식과 biogenic amine 생산 조건과 관련되어 있으므로 결국은 미생물의 고유 특성이 biogenic 함량을 결정하는 요인이 된다. 장류 발효에서 주요 발효균은 *Bacillus*와 *Aspergillus*이고 이들에 의한 biogenic amines 생산은 종(species) 수준이 아닌 균주(strain) 수준에서 영향을 받는다는 것을 biogenic

5. 장류 *Bacillus* 균주 선발 전략

83종의 장류 시료들로부터 biogenic amines 비생산 *Bacillus* 균주와 분해 균주의 선발을 위한 flow chart는 Fig. 1과 같았다. 장류에 직접 적용할 수 있는 균주들을 분리하기 위해 biogenic amines 비 생산 및 분해 균주들을 대상으로 *Bacillus cereus* 억제 능력, glutamate 생산능, *Bacillus cereus* 장독소 생산 유무에 대한 선발 과정을 거친 뒤 16S rRNA 유전자 서열 분석과 생화학적 검사(BCL card, Vitec II)로 균주 동정을 수행하였다.

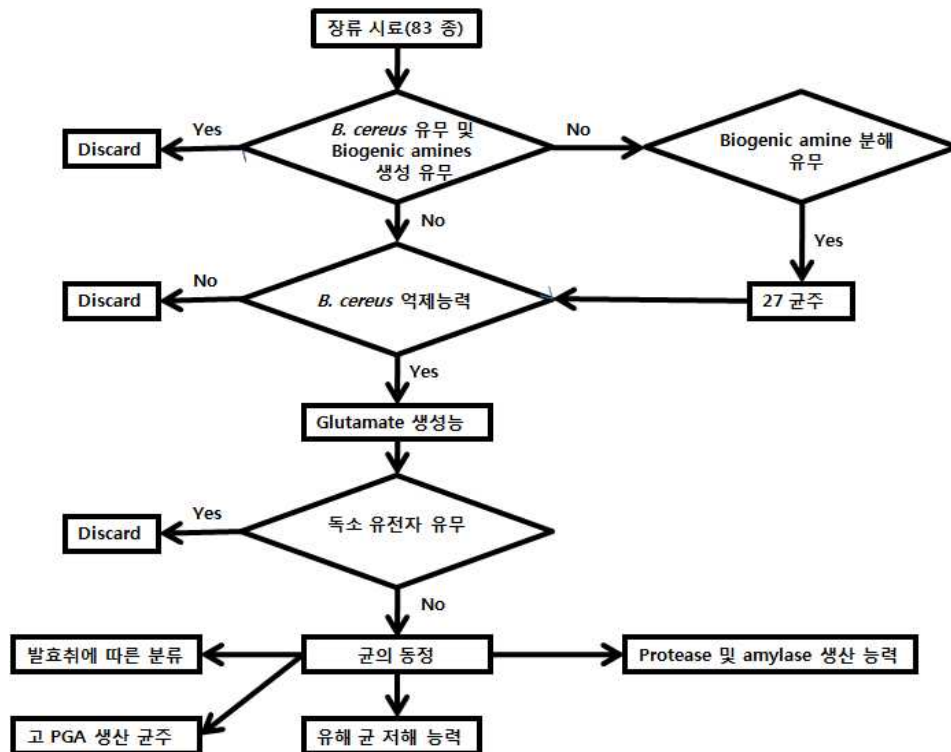


Fig. 1. Flow chart of procedures for the selection of industrially applicable *Bacillus* strains

6. Biogenic amines을 생산하지 않는 균주 선별법

장류 시료가 많아 biogenic amines 생산 균주의 선택적 확인을 위한 high throughput screening 검색 방법이 필요했다. Biogenic amine들은 비공유 전자쌍을 내놓을 수 있는 질소 함유 염기이기 때문에 biogenic amine을 생성하는 경우 배지의 pH는 증가될 것이고 이 변화된 pH는 배지에 함유된 indicator에 의해 확인될 수 있다. 즉, 목표 미생물이 amino acid decarboxylase를 생산할 경우 선택 배지에 첨가된 L-histidine 또는 L-tyrosine은 염기인 histamine이나 tyramine로 바꾸며, 이 때 변화된 pH는 cresol red의 변색으로 확인할 수 있다. 이 원리를 적용한 배지(Table 2)를 이용하여 1차적으로 biogenic amine을 생산하지 않는 *Bacillus* 균주들을 선별할 수 있었다

(Fig. 2). 보라색이 진할수록 biogenic amines을 많이 생산하는 균주로 생각되었으나 1차적으로는 옅은 색의 집락까지도 다음 선발을 위한 대상 균주에서 제외시켰다.

7. Biogenic amines 분해 균주 선발

지금까지 여러 세균들이 biogenic amines을 분해하는 것으로 보고되었다. *Arthrobacter crystallopoietes* KAIT-B-007은 histamine 산화에 특이적으로 관여하는 diamine oxidase를 가지고 있었다(7). 멸치액젓에서 분리한 극도의 호염성 고생물인 *Natrinema gari*는 고염 배지에서 histamine을 분해하는 것으로 보고되었으며 분해 최적의 pH와 온도는 각각 6.5-8.3, 40-55°C이고, NaCl 농도는 3.5-5M 이었다(8). 또한 Tyramine oxidase를 가지고 있는 *Micrococcus varians*

Table 2. A *Bacillus* medium for the detection of biogenic amine formation.

Medium composition	Concentration (g/100 ml)
Tryptone	0.5
Yeast extract	0.5
Meat extract	0.5
Sodium chloride	0.25
Glucose	0.05
Tween 80	0.1
MgSO ₄	0.02
MnSO ₄	0.005
FeSO ₄	0.004
Ammonium citrate	0.2
K ₂ PO ₄	0.2
CaCO ₃	0.01
Pyridoxal-5-phosphate	0.005
Histidine + tyrosine	1.0
Bromocresol purple	0.006
Agar	2

adjusted to pH 5.3



Fig. 2. Selective color change around *Bacillus* colonies that produced biogenic amines.

는 소시지 숙성 과정 동안 tyramine을 분해시키는 것이 관측되었다(9). 이외에 *Lactobacillus spp.*도 histamine을 분해시키는 능력을 가지고 있었다(10).

Biogenic amine 선택 배지(11)를 이용하여 전국에서 수집한 83종의 장류로부터 biogenic amine을 생산하지 않는 106개의 균주를 분리하였다. 이들 균들 중 biogenic amine을 분해하는 균주를 선발하는 것은 이미 여러 미생물들의 복합적인 발효에 의해 생성된 장류 내 biogenic amine의 제거에 가장 효율적인 방법이라 할 수 있다. 이를 위해 우리는 Satake 방법(12)을 변형하여 유일한 탄소원 및 질소원으로 2% histamine 및 tyramine을 사용한 pH 7의 합성 배지를 개발하였다. 놀랍게도 biogenic amine을 생산하지 않았던 이들 균들 중 절반이 넘는 67개 균주가 이 배지에서 자랐고 이들 가운데 성장이 빨라 콜로니 직경이 컸던 26 종을 분리하였다(Fig. 3). *B. cereus*는 장류 식중독 균으로 발효 동안 증식하기 쉽기 때문에 이 식중독 균에 길항적으로 작용하는 균주의 선발은 장류 발효에 크게 유익하다. 이들 26 균주들 중 어떤 균주가 장류 식중독 균인 *Bacillus cereus*를 억제하는지 확인하기 위해 paper disc 방법을 사용하여 증식억제능력이 있는 18종을 선발하였다(Fig. 4). 이들 중 억제 능력이 뛰어난 14종을 대상으로 각각 biogenic amine을 첨가한 합성 배지에 접종하고 20일 간 배양 후, HPLC 상에서 histamine 또

는 tyramine 분해 능력이 높은 균주 6종을 선발하였다(Fig. 5).

Table 3. Medium composition for the culture of Biogenic amine-degrading bacteria

Ingredient	Concentration
Histamine + tyramine	0.2%
KH ₂ PO ₄	0.2%
NaCl	0.1%
MgSO ₄	0.01%
agar	1.5%

Final pH 7.0

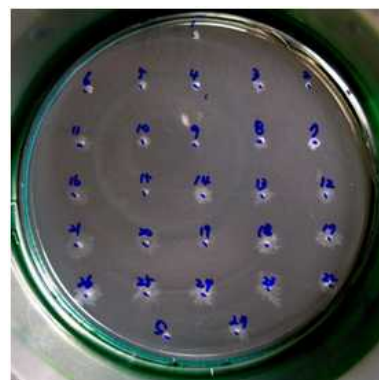


Fig. 3. Growth of *Bacillus* strains with no production of biogenic amines on the minimal synthetic medium containing histamine and tyramine as sole carbon and nitrogen sources

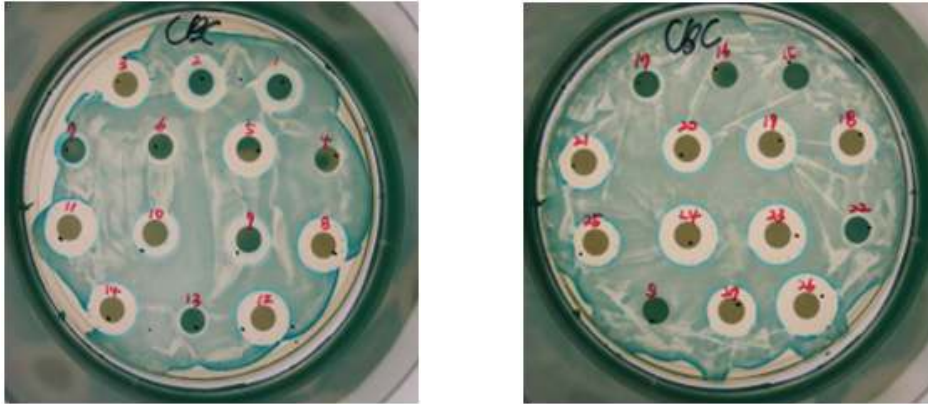


Fig. 4. Selection of antagonistic *Bacillus* species against *Bacillus cereus* by paper disc screening

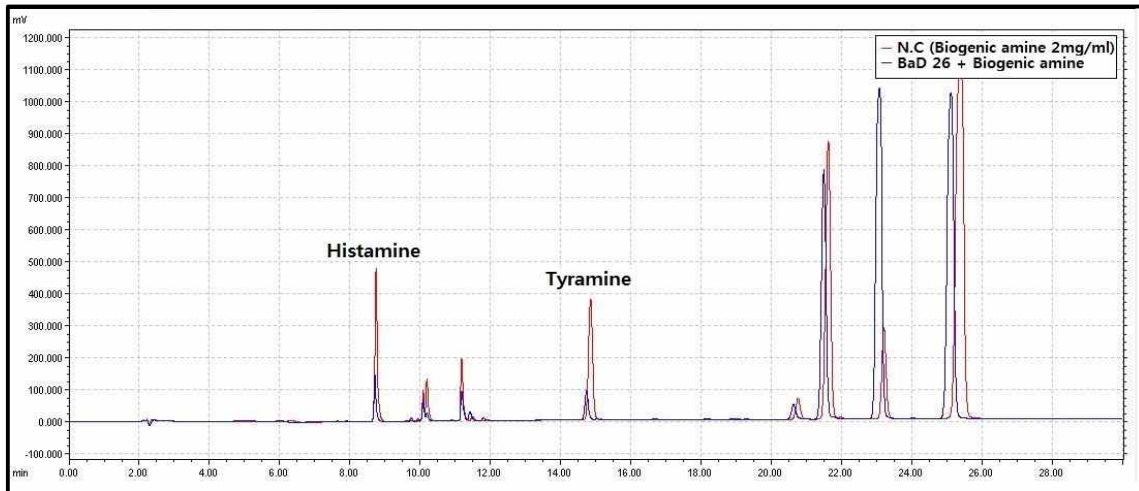


Fig. 5. HPLC chromatogram indicating the degradation of histamine and tyramine after reaction with the culture supernatant of *Bacillus* strain no. 26.

Table 4. Change in residual histamine and tyramine during the reaction with the cell pellet of *Bacillus* strain no 24.

Residual %	N.C	30min	1hr	3hr	6hr	12hr	48hr
Histamine %	100	65	73	60	57	55	54
(mg/ml)	(2)	(1.3)	(1.46)	(1.2)	(1.14)	(1.1)	(1.08)
Tyramine %	100	33	37	29	29	23	21
(mg/ml)	(2)	(0.66)	(0.74)	(0.58)	(0.58)	(0.46)	(0.42)

8. Biogenic amines 분해균주들의 동정

분리한 균주들의 동정을 위해 16S rRNA 유전자 서열 분석과 48 종의 생화학 검사를 수행하였다.

16S rRNA 유전자 서열 분석은 27F와 1492R의 universal primers를 이용 PCR을 수행하여 유전자 염기 서열을 분석한 뒤 RDP II database상의 type strain

을 대상으로 하여 phylogenetic tree를 작성하였다. 생화학 검사는 Vitec II 장비에서 분석할 수 있는 BCL Card를 사용하였다. 동정 결과들은 다음과 같았다(Table 5).

Table 5. Identification of biogenic amine degrading *Bacillus* strains

Strain	16S rRNA sequences/BCL card(Vitec II)
Strain no 3, 5, 12, 19, 24, 26	<i>Bacillus</i> spp.

9. Biogenic amines 분해 효소의 최적 PH

Strain 24를 배양 후 분리한 cell pellet을 사용하여 45°C에서 3시간 동안 pH 4.5, pH 7, pH 8.5에서 각각 기질로서 biogenic amine과 반응 시켰다. HPLC에서 biogenic amine 분해 정도를 측정한 결과 histamine 분해율은 각 pH에서 43%, 45%, 42%였고 tyramine 분해율은 71%, 70%, 68%였다. pH에 의한 활성변화율은 큰 변화가 없었지만 histamine 분해는 중성에서, tyramine 분해는 산성에서 약간 더 높음을 보였다(Table 6).

Table 6. Optimal pH stability of biogenic amine degrading enzyme produced from *Bacillus* strain no 24.

Biogenic amine	N.C	pH 4.5	pH 7	pH 8.5
Histamine % (mg/ml)	100 (2)	57 (1.14)	55 (1.1)	58 (1.16)
Tyramine % (mg/ml)	100 (2)	29 (0.58)	30 (0.6)	32 (0.64)

Table 7. Thermal stability of biogenic amine-degrading enzyme produced from *Bacillus* strain no 24.

Biogenic amine	N.C	2°C	25°C	30°C	37°C	45°C	60°C
Histamine % (mg/ml)	100 (2)	67 (1.34)	93 (1.86)	71 (1.42)	67 (1.34)	56 (1.12)	78 (1.56)
Tyramine % (mg/ml)	100 (2)	40 (0.8)	51 (1.02)	36 (0.72)	35 (0.7)	32 (0.64)	95 (1.9)

10. Biogenic amine 분해 효소의 최적 온도

Strain no 24를 배양한 후 분리한 cell pellet을 사용하여 각 온도에서 3 시간 동안 pH 7에서 각각 기질로서 biogenic amine과 반응시켰다. HPLC에서 biogenic amine의 분해 정도를 측정한 결과 histamine 과 tyramine 모두 45°C에서 각각 44%, 68%의 분해율을 보여 열안정성이 높은 효소임을 보였다(Table 7).

결 론

장류에 존재하는 높은 농도의 biogenic amines을 줄이기 위한 방법으로선 전통 장류에 존재하는 발효 세균들을 대상으로 biogenic amines 분해능을 갖는 세균들을 분리하였다. 동정 결과 *Bacillus* 균으로 밝혀졌고 이 균들은 histamine의 경우 약 45%, tyramine의 경우 70% 이상의 분해율을 보여 잠재적으로 장류 제조에 사용할 수 있는 능력을 보였다. 앞으로 이 균들을 실제 장류 제품에 접종하여 사용했을 경우 biogenic amine을 줄일 수 있을지에 대한 검증이 필요하다.

참고 문헌

1. Karovicova, J and Z. Kohajdova. 2005. Biogenic amines in food. *Chem Pap.* 59, 70-79.
2. Naila, A., S. Flint, G. Fletcher, P. Bremer, and G. Meerdink. 2010. Control of biogenic amines in food-existing and emerging approaches. *J. Food Sci.* 75, 139-150.
3. Maintz, L and N. Novak. 2007. Histamine and histamine intolerance. *Am. J. Clin. Nutr.* 85, 1185-1196.
4. Du, W.X., C.M. Lin, A.T. Phu, J.A. Cornell, M.R. Marshall, C.I. Wei. 2002. Development of biogenic amines in yellowfin tuna(*Thunnus albacarcs*): effect of storage and correlation with decarboxylase-positive bacterial flora. *J. Food Sci.* 67, 292-301.
5. Silla-Santos, M.H. 1996. Biogenic amines: their importance in foods. *Int. J. Food Sci.* 16, 213-231.
6. Cho, T-Y., G.H. Han, K-N. Bahn, Y-W. Son, M-R. Jang, C-H. Lee, S-H. kim, D-B. Kim, and S-B. Kim. 2006. Evaluation of biogenic amines in Korean commercial fermented foods. *Korean J. Food Sci. Technol.* 38, 730-737.
7. Sekiguchi, Y., H. Makita, A. Yamamura, and K. Matsumoto. 2004. A thermostable histamine oxidase from *Arthrobacter crystallopoirtes* KAIT-B-007. *J. Biosci. Bioeng.* 97, 104-110.
8. Tapinkae, W., S. Tanasupawat, K.L. Parkin, S. Benjakul, and W. Visessanguan. 2010. Degradation of histamine by extremely halophilic archaea isolated from high salt-fermented fishery products. *Enzyme Microbial. Technol.* 46, 92-99.
9. Leuschner, R.K.G. and W.P. Hammes. 1998. Tyramine degradation by *Micrococci* during ripening of fermented sausage. *Meat Sci.* 49, 289-296.
10. Dapkevicius, M., M.J.R. Nout, F.M. Romboots, J.H. Houben, and W. Wymenga. 2000. Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms. *Int. J. Food Microbiol.* 57, 107-114.
11. Bover-Cid, S. and W.H. Holzapfel. 1999. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *Int. J. Food. Microbiol.* 53, 33-41.
12. Satake, K., S. Ando, and H. Fugita. 1953. Bacterial oxidation of some primary amines. *J. Biochem.* 49, 299-315.