



낙농유제품인 치즈에 축적된 생체 아민의 다양한 영향 인자에 관한 연구: 총설

†천정환¹ · †김동현¹ · †김현숙² · 송광영^{1*} · 임종수¹ · 최다솜¹ · 김영지¹ · 이수경¹ · †서건호¹

¹건국대학교 수의과대학 및 KU 식품안전연구소, ²건국대학교 수의과대학 수의생리학전공

The Role of Factors Controlling the Accumulation of Biogenic Amines in Various Cheeses as Milk-Based Products: A Review

†Jung-Whan Chon¹, †Dong-Hyeon Kim¹, †Hyun-Sook Kim², Kwang-Young Song^{1*}, Jong-Soo Lim¹, Dasom Choi¹, Young-Ji Kim¹, Soo-Kyung Lee¹ and †Kun-Ho Seo¹

¹KU Center for Food Safety and College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

²Dept. of Veterinary Physiology, College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

Abstract

Fermented foods have often been implicated as causative agents in poisoning due to toxic levels of biogenic amines. Cheese, a milk-based fermented food, is the product most likely to contain potentially harmful levels of biogenic amines, such as tyramine, histamine, putrescine, and so on. Recently, the risk awareness of a dietary uptake of high loads of biogenic amines has increased. Hence, we here review the published literature on several factors known to affect the biosynthesis of biogenic amines and their accumulation in milk-based foods. Furthermore, with regard to risk analysis, we discuss the control of factors related to the synthesis and accumulation of biogenic amines as a means to reduce their incidence in milk-based products, and thus to increase food safety.

Keywords: milk, cheese, biogenic amines, toxicology, lactic acid bacteria, physicochemical factors

서 론

식품 중에서 발효식품(특히 치즈)은 Biogenic Amines(BA)의 중독과 관련 있다(Linares *et al.*, 2011, 2012). 인체가 정상적인 상태에서 외부로부터 BA가 섭취되었을 경우, BA는 아민 산화효소 (amine oxidases)의 활동에 의해 그 독성이 사라지게 된다. 하지만 해독작용에 이상이 발생하거나 음식에 함유된 BA 수치가 정상치보다 높을 경우, BA는 심각한

건강 문제를 일으키는 독성 대사물질이 된다(Ladero *et al.*, 2010; Spano *et al.*, 2010). 1960년에는 편두통과 티라민이 풍부한 음식 (특히 치즈) 사이에 밀접한 연관성이 발견된 바 있으며, 이러한 티라민 섭취에 의해 나타나는 효과를 치즈반응(cheese reaction)이라고 한다(Coutts *et al.*, 1986). BA가 유독성이 있음에도 불구하고, 발효식품 내의 BA 한계치는 관리기관에 의해 표준화되어 있지 않다(Linares *et al.*, 2012).

유제품에 있어서 가장 중요한 BA로는 히스타민(histamine), 티라민, 푸트레신이 있으며, 카다베린(cadaverine) 또한 유제품 내에서 영향을 주는 BA이다(Linares *et al.*, 2011). 이와 같은 BA 생산을 유도하는 아미노산 탈카르복실화 활성은 주로 발효과정에 관여되는 미생물에 의해 발생한다(Linares *et al.*, 2012). 여러 종(species)의 박테리아는 BA를 생산할 수

* These authors contributed equally to this study.

* Corresponding author: Kwang-Young Song, KU Center for Food Safety and College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea. Tel: +82-2-450-4121, Fax: +82-2-3436-4128, E-mail: drkysong@gmail.com

있는데, 우유 속에 존재하는 그람음성균(주로 Enterobacteriaceae)은 히스타민, 푸트레신, 카다베린 등을 생산한다. 하지만 치즈 내에서 BA를 생산하는 주요한 미생물은 유산균은 *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Streptococcus* 속(genera)이다(Calles-Enriquez *et al.*, 2010; Ladero *et al.*, 2011). 이와 같은 그람양성균은 우유 속에 존재하며, 치즈 생산의 전과정 중에서 발생하는 오염에 의해 나타나기도 한다. 뿐만 아니라 starter culture 또는 adjunct culture의 한 부분으로서 존재하기도 하며, 다양한 starter culture 속에 있는 균주가 타이로신(tyrosine) 활성화와 히스타민 탈카르복실화 활성을 한다고 보고한 바가 있다(Calles- Enriquez *et al.*, 2010; La Gioia *et al.*, 2011).

따라서 BA는 식품가공 및 저장 중에 아미노산 탈카르복실화 효소 활성을 하는 박테리아에 의해 생산될 수 있다. 유제품 제조는 살균과정이 아니기 때문에, BA를 생산하는 미생물은 원료에서 나타나는 none-starter LAB로써 식품업계로 들어가는 것이라 예상된다. BA를 생산을 하기 위해서는 아미노산 탈카르복실화 활성을 하는 미생물이 존재함과 동시에 유리기판 아미노산과 탈카르복실화 활성도 필요로 하는데, 이런 활성이 나타나기 위해서는 알맞은 환경 조건까지도 갖추어져야 한다(Russo *et al.*, 2010). 이와 같은 조건에 영향을 주는 요소로는 저온 살균, starter culture 및 효소의 사용, 지속시간, 숙성 온도, 단백질 가수분해의 수치, pH, NaCl 농도, 산소, 물, 상대 습도, 박테리아 밀도, 미생물 간의 상승효과 등이 있다(Gardini *et al.*, 2001). 기술적인 이점에도 불구하고, 많은 낙농업은 전통과 경험에 기초한 기술을 사용한다. 결과적으로 BA 축적 감소를 위한 방법들은 최종생산품의 관능적 특성과 감각적 특성을 변화시키지 않는 이상 바뀌지 않을 것이다(Linares *et al.*, 2012).

치즈는 비살균 및 카세인(casein) 단백질 분해의 과정을 통해 유리 기판 아미노산의 유효성을 보장하기 때문에 BA 생산에 있어서 치즈는 대표적인 모델이 된다. 따라서 치즈 내에서 BA의 수치는 200 mg/kg까지 달할 수 있다(Fernandez *et al.*, 2007). 이와 같은 높은 수치의 BA는 치즈를 섭취하는 소비자에게 직접적인 영향을 준다. 특히 치즈가 식사의 주요 음식 중 하나인 유럽의 경우에는 그 영향이 더 크다. 2009년에 유럽의 치즈 소비량은 1인당 16.6 kg이었다. 하지만 BA 수치는 다양한 요소에 영향을 받기 때문에, 치즈의 종류에 따라 각각의 수치는 다르다(Linares *et al.*, 2012). 치즈 이외에도 케피어(kefir)는 BA가 존재하는 또 다른 발효 유제품이다. 최근 Ozdestan과 Uren(2010)은 케피어 샘플의 BA는 총 함유량이 2.4~35.2 mg/L이며, 그 중에서도 티라민의 수치가 높다고 보고했다. 비슷한 결과로 Chaves-Lopez 등(2011)은 콜롬비아 전통발효유인 쿠미스(kumis)는 BA의

총 함유량이 15.31 mg/L라고 보고했다. 그럼에도 불구하고, 이와 같은 수치는 권장 한계치에 미치지 못한다. 버터밀크, 요구르트 등 다른 우유 발효제품은 영향을 줄 수 있는 수치는 아닌 것으로 드러났다(Souci *et al.*, 2000). 우유 내에 있는 폴리아민(polyamine)인, 스페르민딘(spermidine)과 스페르민(spermine)은 일반적인 형태로 축적된 BA이다(Spano *et al.*, 2010). 하지만 이 BA들이 미생물에 의해서 합성되는지 혹은 endogen origin인지는 아직까지 밝혀지지 않았다(Linares *et al.*, 2012).

BA의 섭취와 관련된 위험에 대한 인식이 점차 증가하며, BA가 음식에 축적되면 안된다는 일반적인 동의에 따라 본 총설 논문은 치즈 제조 및 가공 시 그 수치에 따른 영향을 기술적인 측면에서 대해서 정리하였으며, 이와 같은 기술적인 요소들의 조절이 최종 생산품에 축적되는 BA 양을 감소시킬 수 있다는 것에 초점을 맞추었다. 더 나아가서 유제품 내 BA의 존재, BA의 생리학적 역할 및 독성 영향, BA 합성 및 축적에 적합한 환경, BA 생산 미생물, 식품 내의 BA 및 BA 생산 미생물 검출 방법 등에 대해서도 다루어지며, BA 축적에 영향을 주는 요소는 치즈 내에 축적되는 BA 수치를 감소시키기 위한 다양한 방법 등이 정리되었다. 중독성 화합물의 감소 및 식품 내에 존재하는 BA의 안전 한계치를 정하는데 도움을 줄 것이다. 본 총설논문의 모든 자료들은 이미 발표된 다양한 문헌 등을 정리하여 서술하였다.

생체 아민(Biogenic amines, BA)의 정의

BA는 생물학적 활동을 가진 유기 및 염기성, 질소 화합물로 아미노산의 탈카르복실화 반응에 의해 주로 생산된다. BA는 자연적으로 동식물, 미생물에 의해 생산되지만, 높은 수치의 BA를 함유하고 있는 식품을 섭취할 경우, 체내에 독성이 축적된다(Shalaby, 1996). 유전적 구조나 약물치료로 인해 해독기능에 이상이 있는 소비자가 이 식품을 섭취할 경우에는 문제는 더욱 심각해진다(Bodmer *et al.*, 1999). BA 수치가 높은 식품의 예로는 생선, 수산물, 발효품(육류, 유제품, 채소, 발효성 음료, 와인) 등이 있다. 정성적 및 정량적인 측면에서 식품과 음료 내에서 중요한 BA로는 히스타민(histamine), 티라민(tyramine), 푸트레신(putrescine), 카다베린(cadaverine), β -페틸에틸아민(β -phenyl ethylamine)이 있으며, 이 물질들은 각각 히스티딘(histidine), 타이로신(tyrosine), 오르니틴(ornithine), 라이신(lysine), β -페닐알라닌(phenylalanine) 등의 물질의 탈카르복실화 반응에 의해 생성된다. 식품 내에 존재하는 BA는 전통적으로 미생물의 활동에 대한 지표로 사용됐으며, 식품 내의 높은 수치의

BA는 식품의 품질이 저하됐으며, 생산과정에 결함이 있었음을 의미한다(Linares *et al.*, 2011). 유제품의 종류에 따라서 차이가 있지만, 그 중 특히 치즈는 약 1,000 mg/kg 이상의 BA를 축적할 수 있으며, BA는 독성을 함유하고 있기 때문에 식품 내에 축적되어서는 안 된다고 대다수가 동의했다(Linares *et al.*, 2011).

1. 생체 아민의 분류

BA를 분류하는 방법에는 여러 가지가 있다. BA는 화학 구조에 따라서 지방족 화합물(푸트레신, 카다베린, 스퍼민, 스퍼미딘), 방향족 화합물(티라민, 페닐에틸아민), 헤테로사이클릭 화합물(히스타민, 트립타민)으로 분류할 수 있다. 또한 아민기의 개수에 따라서 모노아민(티라민, 페닐에틸아민), 디아민(푸트레신, 카다베린), 폴리아민(스퍼민, 스퍼미딘)으로 분류할 수 있다(Linares *et al.*, 2011). Fig. 1에 자세하게 나타내어져 있다. BA는 탈카르복시화 반응을 거쳐서 응축과정을 통해 생성되기 때문에 스퍼민, 스퍼미딘 등의 폴리아민은 BA로 분류하면 안 된다고 한다(Bardocz, 1999).

2. 생체 아민의 생리학적 역할

진핵세포 내에서 BA는 호르몬, 알칼로이드, 핵산, 단백질 등의 전구체로서 역할을 하기 때문에 BA의 합성은 필수적이다(Premont *et al.*, 2001). 몇몇 BA는 신경전달물질로써 작용을 하며, 푸트레신, 스퍼미딘 등의 BA는 주된 생물학적 기능(예: DNA, RNA, 단백질 합성조절)에 필요로 한다(Igarashi *et al.*, 2001). 비록 원핵세포 내에서 BA 합성은 산성 환경에 저항하기 위해서 박테리아가 사용하는 방어기체인 탈카르복실화 반응의 이행에 관여하는 듯하나 이 물

질의 합성의 생리학적 역할은 아직까지 잘 알려져 있지 않다. 산성 스트레스에 의한 BA 생산에 대한 연구는 카다베린을 생산하는 *Escherichia coli*, *Salmonella enteric* serovar Thyphimurium, *Vibrio vulnificus* 등의 미생물을 통해서 폭넓게 진행되어 왔다(Lee *et al.*, 2007). 탈카르복실화 반응은 양성자를 소비하고, 아민과 CO₂를 방출함으로써 외부 pH를 원상복구 시키기 때문에 산성 스트레스 환경에서 생존할 수 있도록 한다(Rhee *et al.*, 2002; van de Guchte *et al.*, 2002). BA 생산은 Electrogenic amino acid/amine antiport는 양성자동력(proton motive force)을 생기게 함으로써 에너지를 획득하는 방법을 제공한다(Molenaar *et al.*, 1993). 이 기능은 높은 양의 ATP를 생산하는데 필요한 호흡연쇄가 결핍된 유산균(LAB)과 같은 미생물에게 있어서 특히 중요하다(Vido *et al.*, 2004). 또한 BA 생산은 박테리아 내에서 삼투 및 산화 스트레스 반응(osmotic and oxidative stress response) 등 다른 생리학적 기능을 조절한다(Tkachenko *et al.*, 2001).

3. 생체 아민 독소의 영향

비록 BA는 많은 필수 생리학적 기능을 하는데 필요하지만 높은 수치의 BA를 함유하는 식품을 섭취하게 되면 독소의 영향을 받게 된다(Igarashi *et al.*, 2001). 식품을 섭취한 후에 소량의 BA는 일반적으로 소화기관 내에서 아민 산화효소(monoamine oxidases, MAO, and diamine oxidase, DAO)로 인해 생리학적으로 덜 활성적인 형태로 대사작용을 한다. 또한 히스타민은 메틸화(메틸전달효소의 활동에 의해)를 통해서 독성이 없어지거나 아세틸화 된다(Taylor and Sumner, 1986; Lehane and Olley, 2000). 그러나 높은 수치의 BA를 함유한 식품의 섭취 또는 부족한 해독작용(유전

Biogenic amines		Symptoms
<i>Polyamines</i>	▶ Agmatine	▶▶▶
<i>Diamines</i>	▶ Cadaverine Putrescine	▶▶▶ Hypotension Bradycardia Lockjaw Potentiate effects of other amines
	▶ Histamine	▶▶▶ Respiratory distress Heart palpitations
<i>Monoamines</i>	▶ Tyramine	▶▶▶ Hypertensive reactions Migraines Increased blood sugar levels
	▶ Tryptamine	▶▶▶ Increased blood pressure
	▶ β -Phenylethylamine	▶▶▶ Increased blood pressure Migraines

Fig. 1. Classification of biogenic amines related to foods and their symptoms (O'Sullivan *et al.*, 2013)

적인 이유나 몇몇 약물 또는 알코올에 의한 억제효과로 발생함)은 BA가 순환계에 들어가도록 하며, 아드레날린 (adrenaline)과 노르아드레날린(noradrenaline)이 위산의 분비를 유발할 뿐만 아니라 심박출량의 증가, 편두통, 빈맥, 혈당 수치 증가, 고혈압 등을 초래할 수 있다(Shalaby, 1996; Bodmer *et al.*, 1999). 또한 Premont 등(2001)은 파킨슨 증후군, 정신분열증, 우울증 환자의 BA 수치가 높다고 보고 했다. 그러나 BA의 독성수치는 개개인의 특성에 의존하기 때문에 그 수치를 규정하는 것은 어렵다. Wohrl 등(2004)은 75 mg의 순수한 액체인 경구 히스타민(일반 식사에서 발견되는 수치)을 투여한 음식과민증이 없는 건강한 여성 중 50%가 즉각증상 뿐만 아니라 지연증상을 유발 할 수 있다고 보고 했다(Linares *et al.*, 2011). BA가 인간에게 미치는 영향은 Fig. 2에 자세하게 설명되어 있다.

BA의 독성수치의 규정에 있어 또 하나의 문제는 그것의 상승 작용(synergistic effect)이다. 예를 들어, 기니피그 (guinea pig) 와 실험 쥐를 통한 실험에서 카다베린과 다른 아민이 히스타민의 독성의 증가시킨다고 보여졌다. 이러한 아민은 디아민 산화효소 억제제(diamine oxidase inhibitor) 역할을 하며, 아민의 존재 유무에 따라 숙성된 치즈를 섭취하는 것이 왜 같은 양의 히스타민이 함유된 수용액을 섭취하는 것 보다 독성이 강한지 설명할 수 있다(Taylor and Sumner, 1986; Lehane and Olley, 2000). 또한 2차 아민(예: 푸트레신, 카다베린)은 아질산염(nitrite)과 반응하여 발암성 니트로사민(nitrosamine)을 형성할 뿐만 아니라 *E. coli* 0157:H7 등의 장병원체(enteropathogen)의 장점막에 부착하여 티라민의 수치를 증가시킨다(Ten Brink *et al.*, 1990; Lyte, 2004). 여러 식중독 사건을 통하여 BA는 감염인자(causative agent)라고 제기되었으며, BA 중에서도 히스타민에 의해 일어난 식중독이 가장 심각하다. 히스타민 중독은 scombroid fish의 섭취로 인해 발생하기 때문에 scombroid poisoning이라고도 불린다(Taylor, 1983). 치즈 섭취로 인한 BA 식중독은

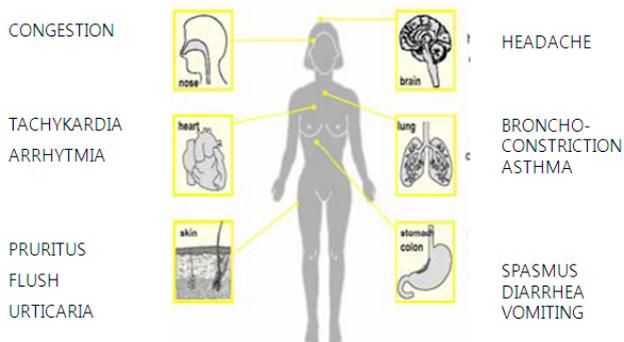


Fig. 2. Various serious symptom of human contaminated from biogenic amines (Naila *et al.*, 2010)

티라민에 의해 발생하기 때문에 “cheese reaction”이라고 알려져 있다(Silla Santos, 1996).

식품 내의 BA 함유량에 관한 구체적인 규정이 있다. 해산물의 경우에는 히스타민이 포함된 정확한 기준이 있지만 다른 식품 내의 BA 상한치는 권고되거나 제안만 되어 있다(예: 식품 kg 당 100 mg의 히스타민 또는 알코올음료 1 L 당 2 mg의 히스타민)(Linares *et al.*, 2011). 티라민의 경우에는 한계치가 100~800 mg/kg으로 권장되었으며, β -페틸에틸아민의 경우에는 제한치가 30 mg/kg으로 제안되었다(Halasz *et al.*, 1994). 비록 더 많은 연구가 필요하지만 식품에 함유되어야 할 BA 양은 최소 수치로 유지해야 된다는 전반적인 합의가 있다.

낙농식품에 발생하는 생체 아민

우유 발효제품, 특히 치즈는 BA 생산 및 축적에 적절한 환경을 제공한다(Fernandez *et al.*, 2006). 하지만 우유 속의 박테리아 수, 우유 열처리 강도 또는 지속 및 시간, 숙성 과정 조건 등이 치즈의 종류마다 다르기 때문에 치즈의 종류에 따라서 BA의 생산 및 축적에 큰 차이가 있는 것으로 잘 알려져 있다(Linares *et al.*, 2012). Starter culture의 사용 또한 자연산 치즈 미생물과의 상호작용을 통해 BA 생산을 직접적으로 또는 간접적으로 영향을 줄 수 있다(Ordóñez *et al.*, 1997). 이것 이외에도 치즈 내의 BA 분포에 차이가 있는 것으로 발견되었다(Novella-Rodríguez *et al.*, 2003). 이 모든 변수는 숙성 기간 또는 치즈를 분석한 부분에 따라서 다른 종류의 치즈와 심지어 같은 종류의 치즈에게서 발견되는 BA 분포 차이에 기여한다. 유제품에 함유된 BA 양에 관한 개요를 설명하기 위해서 유용한 자료는 Table 1에 요약되어 있다.

낙농식품에 존재하는 BA를 생산하는 미생물

발효 유제품 내에 BA의 생산과 축적이 일어나기 위해서는 제품 내에 중독성 화합물을 합성 할 수 있는 미생물이 존재해야 한다. BA를 생산할 수 있는 미생물로는 효모균, 그람양성균, 그람음성균이 있는데, 일반적으로 이러한 미생물들은 치즈 내에 존재한다(Table 2). 그러나 이 미생물들이 최종 생산품 내에 높은 수치의 BA를 생성하는 것은 아니다(Linares *et al.*, 2012).

몇몇 종의 효모균은 지방족 아민(aliphatic amine) 생산이 가능한 미생물로 알려져 있지만 치즈에서 분리된 *Debaryomyces hansenii* 균주와 *Yarrowia lipolytica* 균주 중 소수의 미생물만이 각각히스타민과 티라민 생산이 가능한 것 같았다(Suzzi *et al.*, 2003; Gardini *et al.*, 2006). *Y. lipolytica*, *Pichia jadinii*,

Table 1. Biogenic amine content in various cheese products

	Milk type	Reference	Histamine	Tyramine	Putrescine	Cadaverine
			(mg/kg)			
Cheese (Raw milk)	Cow	Fernández <i>et al.</i> (2007)	Undetected	Undetected	Undetected	Undetected
	Cow	Mayer <i>et al.</i> (2010)	10.9	6.4	1.8	3.2
	Cow	Innocente and D'Agostin (2002)	28.55	29.89	75.87	15.56
	Goat	Pinho <i>et al.</i> (2004)	15.6	216.28	217.84	349.72
	Sheep	Schirone <i>et al.</i> (2011)	0	499.6	394.1	26.8
Cheese (Pasteurized milk)	Cow	Fernández <i>et al.</i> (2007)	65.42	80.9	175.39	Undetected
	Cow semiripened	Latorre-Moratalla <i>et al.</i> (2009)	24.38	32.92	22.6	33.49
	Cow Smear	Mayer <i>et al.</i> (2010)	168.3	24.76	31.3	748.2
	Cow Gorgonzola		23.7	Not determined	Not determined	Undetected
	Cow Edam		3.2	Not determined	Not determined	Undetected
	Cow Gouda		Not determined	2.43	Not determined	Undetected
	Cow Cheddar		25.4	Not determined	4.8	Undetected
	Cow Emmental Hard		23.5	52.2	38	98.3
	Goat Feta	Valsamaki <i>et al.</i> (2000)	84.6	246	193	82.8
	Sheep Pecorino Abruzzese	Martuscelli <i>et al.</i> (2005)	90	280	200	80
Roquefort	Mayer <i>et al.</i> (2010)	9.9	Not determined	18.3	8.9	
Cheese (Blue)		Novella-Rodriguez <i>et al.</i> (2003)	376.6	1,585.4	257.2	2,104.4
Mixture	Fernández <i>et al.</i> (2007)	1,041.81	Not determined	1,051.98	756.78	

Table 2. Biogenic amines producing microorganisms form various dairy products

	Producer microorganisms	Reference	Biogenic amine
Gram positive	<i>Lactobacillus buchneri</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus parabuchneri</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Streptococcus thermophiles</i> , <i>Enterococcus casseliflavus</i> , <i>Enterococcus durans</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Enterococcus hirae</i> , <i>Enterococci</i>	Calles-Enriquez <i>et al.</i> (2010), Bunková <i>et al.</i> (2009), La Gioia <i>et al.</i> (2011), Ladero <i>et al.</i> (2012), Ladero <i>et al.</i> (2011), Coton <i>et al.</i> (2011)	Histamine, Tyramine, Putrescine, Phenylethylamine
Gram negative	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Morganella morganii</i> , <i>Halomonas sp.</i> , <i>Pseudomonasputida</i> , <i>Serratia</i> , <i>Proteus</i>	Coton <i>et al.</i> (2011), Marino <i>et al.</i> (2000)	Histamine, Tyramine, Putrescine, Cadaverine, Phenylethylamine
Molds and yeast	<i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Geotrichum candidum</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i> , <i>Debaryomyces hansenii</i>	Gardini <i>et al.</i> (2006), Wyder <i>et al.</i> (1999), Roig-Sagués <i>et al.</i> (2002)	Histamine, Tyramine, Putrescine, Cadaverine, Phenylethylamine

Geotrichum candidum 등의 미생물의 존재는 히스타민 및 푸트레신의 수치 증가와 관련 있다(Roig-Sagues *et al.*, 2002). 우유에 오염을 일으키는 대부분의 그람음성균(예: *Escherichia coli*, *Hafnia alvei*, *Klebsiella pneumonia*, *Morganella morganii*, *Pseudomonas*, or *Serratia* spp)은 히스타민, 푸트레신, 카다베린 등의 BA를 생산할 수 있다(Marino *et al.*, 2000; Roig-Sagues *et al.*, 2002; Coton *et al.*, 2011). 그러나 우유 내에서 그람음성균 수치의 증가는 BA 중에서도 푸트레신 또는 카다베린의 수치와 관련있다(Pircher *et al.*, 2007; Delbes-Paus *et al.*, 2012). 이와 같은 경우에 발생하는 BA 수치의 증가는 부적절한 제조 관리 및 위생 환경에 의해서 일어난다.

그렇지만 치즈 내에서 BA가 생산되는 주원인은 그람양성균의 존재다(Linares *et al.*, 2011). 그람양성균 중에서도 히스타민과 티라민을 생산하는 LAB가 BA를 생산하는 주요 미생물로 알려져 있는데 최근 연구는 이 박테리아들이 푸트레신을 생산하는데 주목하고 있다(Ladero *et al.*, 2011, 2012). *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* 등의 genera에는 서로 다른 종에 속하지만 BA를 생산하는 균주가 있다(Table 2). 그 외에 BA를 생산하는 LAB로는 티라민을 생산하는 lactococci와 lactobacilli가 있다(Nieto-Arribas *et al.*, 2009). 하지만 이 종의 동정은 16S rRNA 유전자의 서열분석과 분류학적 관련성에 근거한 것이 아니기 때문에 잘못 분류했을 가능성이 있다(Fernandez *et al.*, 2007). 따라서 여기에 언급된 모든 BA를 생산하는 LAB는 원래 우유와 치즈 내에 속하는 미생물 종이며, 발효 유제품 제조 시에도 발생할 수 있다(Varnam and Sutherland, 1994; Linares *et al.*, 2011).

낙농식품에 생체 아민 축적에 영향을 미치는 요소

유제품 내에 BA 생합성 및 축적이 일어나기 위해서는 탈카복실화 활성을 하는 박테리아와 기판 아미노산이 존재해야 하며, 박테리아의 성장 및 탈카복실화 효소 활성에 적합한 환경 조건이 충족되어야 한다(Linares *et al.*, 2012). 이 모든 매개변수가 BA 생산에 주는 영향은 매우 다양하다.

1. BA를 생산하는 미생물의 역할

BA를 생산하는 미생물의 존재는 중독성 화합물의 생합성에 필수적인 조건이다. 그러나 BA의 높은 수치를 나타내는 원인은 미생물의 존재 이외에도 유제품 제조 및 저장 시에 발생하는 여러 가지 요소에 의해서도 발생된다(Ladero *et al.*, 2008). 미생물의 BA 생산 능력은 종보다는 균주와 밀접한 관련이 있으며, 이러한 미생물을 감정하는데 비특정 방법이 사용되기 때문에 치즈 내에 발생하는 높은 수치

의 BA와 LAB 수의 증가에 대한 연관성을 찾기란 쉽지 않다(Linares *et al.*, 2012).

LAB의 BA 생산 능력은 플라스미드, 가동성 원소, acidic resistance island와 연관된 수평적 유전자(horizontal gene transfer)의 이동을 통하여 얻게 된 사실임에는 틀림없다(Marcobal *et al.*, 2006). 하지만 종종 이 특성은 종의 특징(예를 들어, *Enterococcus*의 티라민 생산, *Lactococcus*의 푸트레신 생산)으로 간주된다(Ladero *et al.*, 2011, 2012). 후자의 경우에는 우유 환경의 적응과 균주를 발효 starter로 사용함으로써 실제로 가해진 선택압이 비활성 또는 바람직하지 못한 맛을 부여하는 푸트레신 생산 능력 손실을 야기하는 것으로 나타났다. 유산균에 의한 BA의 합성에 관한 것은 Fig. 3에 자세하게 나타나 있다.

유제품 내에서 BA를 생산하는 미생물의 정량 및 특정 검출 위한 분자생물학적 방법의 발전은 BA를 생산하는 미생물의 수와 식품 내에 함유되어 있는 BA의 수치 측정을 가능케 했다(Ladero *et al.*, 2008, 2010, 2012). BA를 생산하는 미생물의 최저 수치는 최종생산물 내에 높은 수치의 BA를 초래한다고 제기되었다(Ladero *et al.*, 2010).

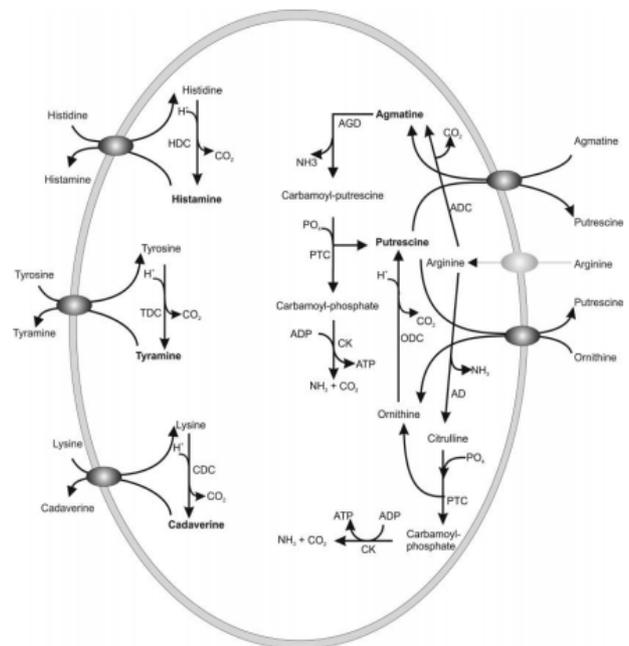


Fig. 3. Biogenic amine biosynthesis pathways in lactic acid bacteria (Calzada *et al.*, 2013).

Arginine decarboxylase (ADC), agmatine deiminase (AGD), arginine deiminase (AD), histidine decarboxylase (HDC), lysine decarboxylase (LDC), tyrosine decarboxylase (TDC), ornithine decarboxylase (ODC), carbamate kinase(CK), and putrescine carbamoyl transferase (PTC).

2. 스타터 컬처(Starter culture)

대부분의 산업 낙농업 발효에서는 starter culture를 사용하여 최종생산품의 표준품질을 보장한다. Starter culture로 사용되는 몇몇 LAB는 특정 아미노산 탈카복실화 효소 활동을 가지고 있을 수도 있어 유제품에 축적되는 BA를 합성하는 잠재성을 가지고 있다. 이 그룹에 속하는 것은 앞서 언급했듯이 lactococci, lactobacilli, streptococci이다.

BA를 생산하는 균주를 포함하는 위험은 BA 생산 가능성이 있는 균주를 제거한 특성이 잘 반영된 starter culture를 사용함으로써 최소화할 수 있다. 낙농장으로부터 얻은 *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactococcus lactis* 등의 많은 균주는 히스타민, 티라민, 푸트레신 생산자로 동정되었다(La Gioia *et al.*, 2011; Ladero *et al.*, 2011). 만약 우리가 그 중에 속하는 균주를 종종 치즈 생산용의 starter culture로 사용할 경우 이것은 특히 의의가 있다. Burdychova와 Komprda(2007)는 히스타민을 생산하는 *Lactobacillus helveticus* 균주를 치즈 생산에 사용하는 starter culture로부터 분리했다. 마찬가지로 다른 숙성된 치즈로부터 분리된 *Lactobacillus* spp. 또한 티라민과 푸트레신 등을 생산하는 BA를 발견할 수 있었다(Ladero *et al.*, 2011). BA 생산과 관련된 유전자의 결핍을 European Food Safety Agency가 도입한 “Qualified Presumption of Safety” (QPS) 평가 설계의 검증기준에 대하여 문제를 제기했다(EFSA, 2011; Linares *et al.*, 2011). 이러한 평가를 하기 위해 현재 BA 생산자를 식별하고 양을 확인하기 위한 분자생물학적 방법이 사용 가능하다(Ladero *et al.*, 2010, 2012).

유제품에 BA 축적을 감소시키기 위한 또 다른 처리 방법은 생선용 소스, 소시지, 와인 발효에 사용되는 BA를 분해시킬 수 있는 박테리아를 포함하여 보조배양을 사용하는 것이다(Naila *et al.*, 2010; Garcia-Ruiz *et al.*, 2011; Zaman *et al.*, 2011). Munster cheese 제조 시에는 *Brevibacterium linens*를 사용하여 히스타민과 티라민을 이화시키는 것으로 보고되었다(Leuschner *et al.*, 1998).

3. 살균

우유는 풍성한 유기액체로서 각각 다른 미생물의 성장에 필수적인 영양분을 제공한다. 실제로 저장 조건이 부적절한 경우에는 미생물의 무계가 10^7 cfu/mL가 될 수 있다(Varnam and Sutherland, 1994). 미살균 우유에 함유된 주요한 미생물로는 중온성 LAB, 장내세균(enterobacteriaceae), *Pseudomonas* 또는 *Acinetobacter*와 같은 psychotropic microorganism이 있다(Martuscelli *et al.*, 2005; Serio *et al.*, 2007).

이 모든 그룹의 미생물은 BA 생산자로 규정되어 있다(Linares *et al.*, 2011). 저온 살균법은 열처리 방법으로 미살

균 우유에 들어있는 미생물을 감소시키는데 사용한다. 잡균, 병원균, 소비하기에 안전하지 않은 식품으로 만드는 중독성 화합물을 생산하는 미생물 등의 수를 줄임으로써 유제품의 유통 기한을 늘이기 위해 유업에 의해 오랜 기간 동안 사용되어 왔다(Lewis, 2003). 저온 살균법의 목적은 우유 속에 존재하는 박테리아의 완전한 박멸이 아닌 발효 과정이 위험하지 않도록 보장함과 동시에 건강에 해를 끼치지 않을 수치로 감소시키는 것이다. 저온 살균법은 우유 속에 있는 미생물(BA 생산자를 포함해서)의 수를 감소시킨다. 그렇게 함으로써 저온 살균된 우유로 제조된 치즈는 비살균 우유로 제조된 치즈들 보다 더 낮은 수치의 BA를 함유하고 있다(Naila *et al.*, 2010). 그러나 살균된 우유를 사용하여 치즈를 제조하여도 가끔 제품 안에서 높은 수치의 BA가 검출 될 때가 있다(Pircher *et al.*, 2007). 이와 같은 경우는 치즈가 BA를 생산하는 미생물에 의해서 감염된 경우는 위생적인 환경조건의 결여 때문이다(Ladero *et al.*, 2009). 게다가 몇몇 BA를 생산하는 *Lactobacillus*와 *Enterococcus*는 저온 살균법에 저항성을 가지고 있기 때문에 열처리 후에 제 2차 미생물로 성장하여 최종 산물에 BA 생산을 초래한다(Ladero *et al.*, 2011). 앞서 언급된 두 가지 사실은 살균된 우유로 만들어진 치즈 내에 높은 수치의 BA가 있다는 것을 설명하고 있다. 따라서 저온 살균법 자체는 유제품 속에 존재하는 BA의 양을 줄이는데 궁극적인 해결방법이 될 수 없다. 몇몇 저자들은 저온 살균법을 고압과 같은 다른 처리 법을 함께 통합시킴으로써 이 치즈 속에 존재하는 BA양을 줄일 수 있는 기술을 뛰어넘는 방법이라고 제기 했지만 이에 대한 결과는 아직까지 선보인 바가 없다(Novella-Rodriguez *et al.*, 2002; Ladero *et al.*, 2011). 결과적으로 미생물의 수가 조절된 우유를 사용한다고 하더라도 만약 그것이 BA를 생산하는 starter로 집중되었다면 문제는 끊이지 않게 될 것이다. 따라서 BA 생산능력을 고려했을 때 좋은 starter를 선택하는 것은 무척이나 중요하다(Linares *et al.*, 2012).

4. 숙성 과정 및 단백질 가수분해

치즈 숙성은 유당, 지방분해 등을 포함하는 복잡한 생화학 과정과 관련이 있으며, 더 복잡한 과정인 단백질 또는 단백질 분해의 이화작용이 관여한다. 숙성과정은 starter인 LAB와 none-starter LAB와 프로피온산 세균(propionic acid bacteria), 곰팡이, 효모 등으로 구성된 2차 미생물에 의해 실행된다(Beresford and Williams, 2004). Starter는 단백질 분해에 기여하며, none-starter LAB는 펩톤분해와 유리아미노산 방출을 담당한다(Lynch *et al.*, 1997). 원유로 제조한 몇몇 블루치즈는 높은 BA 축적과 관계된 곰팡이의 활동에 의해

단백질 분배 활성이 나타난다(Fernandez *et al.*, 2007).

숙성과 단백질 가수분해는 치즈 내의 BA 축적에 영향을 주는 중요한 요소이다(Fernandez-Garcia *et al.*, 2000). 숙성 시간에 따라서 단백질 가수분해 속도는 증가하며 decarboxylic activity의 기관으로 작용하는 유리아미노산의 축적을 증가시킨다(Fernandez *et al.*, 2007). Decarboxylic activity는 결국 BA 축적을 일으키게 된다. 보통 숙성 과정이 길어질수록 BA 함유량이 더 많아진다. 단 기간 숙성한 치즈와 비교했을 때 장기간 동안 숙성한 치즈(높은 수치의 BA를 초래하는)가 높은 단백질 가수분해 속도를 가지고 있다고 보고하는 많은 연구가 있다(Bunkova *et al.*, 2010; Ladero *et al.*, 2010). 뿐만 아니라 히스타민의 경우도 장기간 동안 숙성된 치즈로부터 높은 수치를 발견할 수 있는데, 이것은 숙성기간 동안 발생한 단백질 가수분해효소가 치즈 내에 히스타민의 축적과 생산을 증가시킨 것을 의미한다(Ladero *et al.*, 2008). 티라민의 경우에도 똑같은 경향을 보였다(Ladero *et al.*, 2010). 치즈우유 또는 커드(curd)에 단백질분해효소를 첨가했을 경우 치즈의 숙성 과정 속도가 빨라졌을 뿐만 아니라 작은 펩티드와 아미노산의 이용 가능성을 나타냈다. 이것은 BA 생산에 직접적인 영향을 준다(Mohedano *et al.*, 1998; Fernandez-Garcia *et al.*, 1999).

5. 물리화학적 요소

pH, 소금 농도, 온도 등 많은 물리화학적 요소는 발효 유제품 생산 시, BA를 생산하는 미생물의 성장과 탈카복실화 활동에 영향을 미칠 수 있다. 몇몇 연구들은 이러한 요소들이 BA 생산에 미치는 영향에 대해 조사하였지만 이 요소들과 BA 생산의 상호작용에 대한 결과는 거의 알려진 바가 없다(Linares *et al.*, 2012).

1) pH

낙농업의 발효는 본질적으로 유당과 유산의 발효에 의한 낮은 pH 환경과 연관되어 있다(Linares *et al.*, 2012). BA 생합성의 생리학적 역할은 BA와 BA를 생산하는 미생물에 따라 다를 수 있지만 BA 생합성은 산성 스트레스 조건에서 생존율을 높이는 낮은 세포 외 pH의 중성화를 위한 시스템으로 제안되었다(Rhee *et al.*, 2002). 유산균에 있어서 가장 널리 알려진 이론은 특정한 아미노산 탈카복실화 효소를 가지고 있는 균주는 낙농업의 발효와 같은 환경에 의한 산성 스트레스에 대응하기 위해서 BA를 생산한다는 것이다(Wolken *et al.*, 2006). 이 이론은 LAB에서 발견된 pH 감소와 BA 생산의 관계에 의해서 뒷받침되어 지고 있다(Fernandez *et al.*, 2007). 확실히 낮은 pH는 몇몇 아미노산 탈카복실화 효소 활성에 있어서 결정적인 요인이다(Teodorovic *et al.*, 1994).

여러 논문들이 산성 pH는 타이로신 데카르복실라아제와 다른 박테리아 아미노산 데카르복실라아제에 최적이라고 설명하고 있다(Moreno-Arribas and Lonvaud-Funel, 2001; Schelp *et al.*, 2001). 더욱이 데카르복실라아제를 암호화하는 유전자가 낮은 pH에서 발현 될 수 있다. Linares 등(2009)은 낮은 pH 환경에서 *Enterococcus durans*이 생산한 증가한 티라민 양은 데카르복실라아제(*tdcA*)와 수송체(*tyrP*) 유전자 발현의 유도에 의해 자극되었다고 나타냈다. 한편 이와 같은 현상은 중성 pH에서는 발견되지 않았다. 마찬가지로 *L. brevis*의 *tdc*와 *aguA1*(각각 티라민과 푸트레신 생산에 관여) 유전자는 복제적(transcriptionally)으로 낮은 pH에 의해서 유도된다(Arena *et al.*, 2010).

종합적으로 몇몇 연구자들은 산성화가 빠르게 일어나면 BA 수치가 감소한다고 하지만 낮은 pH는 최종 생산품에 BA 축적을 일으킬 수 있는 매개변수이다(Linares *et al.*, 2012). 그러나 pH 조건은 발효과정에 내재되어 있기 때문에 조절하기 어렵다.

2) 온도

온도는 치즈 제조 및 BA 축적(특히 숙성 및 저장 단계)에 영향을 미치는 중요한 매개변수이다. 일반적으로 BA 축적 및 생산은 치즈 생산 및 저장 온도와 함께 증가한다. 생산물의 저장은 생산의 마지막 두 단계(숙성에서 소비까지)를 포함한다. 여러 보고에 의하면 저온 숙성 및 저장(예: 5°C)은 히스타민, 티라민, 푸트레신, 카다베린 등의 BA 축적을 감소시키는 반면 숙성 및 저장 온도가 상승할수록 BA의 축적 양이 증가한다고 나타내고 있다(Martuscelli *et al.*, 2005; Bunkova *et al.*, 2010). LAB에 의해 생산된 티라민에 영향을 주는 요소에 대한 multifactorial study는 높은 온도가 *L. brevis*와 *Enterococcus faecium*의 티라민 생산량을 증가시키는 것을 나타냈다(Marcobal *et al.*, 2006). 게다가 히스타민을 생산하는 *S. thermophilus* 균주는 우유에서 성장된 후 저온(4°C)에 보관되었을 때에 낮은 양의 히스타민을 생산한다. 이와 같은 감소는 유전자 발현 또는 낮은 세포수의 존재 보다는 히스티민 탈카복실화 효소 자체의 활동의 저하 때문이다(Calles-Enriquez *et al.*, 2010). 치즈가 만약 냉장고에 보관되었다 하더라도 BA 축적치는 소비하기에 안전 한도가 넘을 수 있다고 설명된 적도 있다(Bunkova *et al.*, 2010). 한 단계 더 나아가 냉동 온도(예: -18°C)는 BA 축적의 증가를 방해하는데 그 이유는 아마도 미생물이 활동을 멈추기 때문이다(Andic *et al.*, 2010). 하지만 더 적절한 해결책이 필요하다.

3) 소금(염화나트륨)

발효제품에 함유된 소금 농도는 BA 축적에 영향을 주는 또 다른 요소이다. 전통적으로 소금은 발효와 숙성 과정 중에 식중독 및 부패를 방지하는 마지막 목적으로 병원균의 성장을 억제하기 위해서 사용됐다. 즉, 박테리아 성장률을 감소시킴으로써 나타나는 또 하나의 결과는 최종산물의 BA 수치가 낮아지는 것이다(Linares *et al.*, 2012).

미살균 우유를 사용해서 제조한 대부분의 치즈에서는 장인치즈(artisanal cheese)와 전통적인 치즈(traditional cheese)에서 주로 BA를 생산하는 *Enterococcus* spp.가 높은 수치로 발견된다. 높은 수치의 염화나트륨(5%)을 *Enterococcus faecalis*를 접종한 우유에 첨가하면 티라민과 2-페닐에틸아민(2-phenylethylamine)의 최소 생산량을 감소한다(Gardini *et al.*, 2001). BA 생산의 감소는 높은 소금 양이 BA 생산 박테리아의 성장과 아미노산 탈카르복실화 활동에 미치는 억제 효과로 인해 발생할 수 있다(Chander *et al.*, 1989; Gardini *et al.*, 2001). 염화나트륨의 비슷한 효과가 *Lactobacillus bulgaricus* 또는 *Lactobacillus buchneri*를 접종한 우유를 사용하여 제조한 치즈로부터 관찰된 바가 있다(Chander *et al.*, 1989; Sumner *et al.*, 1990).

6. 기술적 숙성 후 과정(Post-ripening technological processes)

지난 10년간 시장은 고객의 요구에 따라 반응을 보였으며, 시장이 점점 발전함에 따라 전통적인 형태로 판매되기 보다는 소비자들이 쉽게 이용할 수 있는 즉석식품(ready-to-eat products)의 형태로 판매되기 시작하였다. 이와 같은 앞으로의 과정은 더 많은 조작을 요구함으로써 미생물 오염에 의한 위험 증가시킨다(Reij and Den Aantrekker, 2004). 숙성 후 과정은 BA와 BA 생산자의 존재에 직접적인 영향을 주는 것으로 보이는데, 이것은 미살균 우유에 존재하는 BA를 생산하는 박테리아 수의 증가 또는 기술적인 과정에서 일어나는 오염이 원인이 될 수 있다(Custodio *et al.*, 2007). Ladero 등(2009)은 숙성 후 과정의 영향이 히스타민을 생산하는 미생물에 주는 영향과 다양한 치즈 속에 함유되어 있는 히스타민 양을 보고하였다. 경우에 따라서는 전체 치즈에서 히스타민을 생산하는 박테리아가 발견되지 않았다. 하지만 치즈를 작게 분쇄한(grating) 후에 히스타민 양과 히스타민 생산 미생물의 수가 증가하는 것을 발견할 수 있었다. 이 결과는 숙성 후 과정에 의한 외부 오염을 의미한다(Linares *et al.*, 2012). 따라서 치즈 가루는 조작과 치즈 조각의 표면적 용적 비의 증가에 의한 미생물 오염을 촉진하는 것으로 보인다(Linares *et al.*, 2011, 2012). 치즈 조각의 표면적 용적 비는 BA 생산 박테리아의 수를 증가시키며, 그 후에 BA 축적 또한 증가시킨다.

BA 검출에 이용되는 다양한 방법

BA에 관한 응용연구의 중요한 분야는 식품 내에 존재하는 BA를 더 효율적인 방법으로 검출하는 것이다. 이 방법은 검출하는 대상에 따라 2종류로 나뉘는데, 첫 번째는 BA 자체를 검출하는 방법이며, 두 번째는 BA 생산 미생물을 검출하는 방법이다.

크로마토그래피 기술이 등장하면서 BA의 검출 방법이 발전하게 되었다. 초기에 식품 내 BA 검출에 사용되었던 기술은 얇은 막 크로마토그래피였으며, 현재는 신뢰할 수 있는 양적 자료와 높은 해상도를 가지며, 여러 종류의 아민을 효율적으로 분리하는 분석기술이 있다. 식품 내의 BA 정량검사에 사용하는 기술로는 over-pressure layer chromatography, 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC), 가스 크로마토그래피가 있으며, UV, electrochemical and fluorescence techniques BA-detection techniques, ophthaldehyde(OPT), fluorescamine, dansyl chloride 등의 물질과 함께 사용하는 pre- & post-column derivatization도 있다(Rogers and Staruszkiewicz, 1997; Onal, 2007; Linares *et al.*, 2011). 모세관 전기이동(capillary electrophoresis)을 사용한 BA 검출법도 많이 발전되었는데, 이 기술은 감도, 재현성, 직선 비정, 정확도, 효율이 모두 최적화되어 있다(Oguri, 2000). 특정한 BA(예: 히스타민)를 검출하는 생화학적 분석법도 도입되었으나 분석을 방해하는 지방과 단백질을 함유한 치즈를 분석하는 경우에 효율성이 떨어짐으로 분석 효율을 향상 시킬 필요가 있다(Lopez-Sabater *et al.*, 1994; Linares *et al.*, 2011). BA 생산 미생물을 검출하기 위해서는 이 미생물의 존재 확인에 사용되는 pH 농도 지표가 포함된 분별배지와 함께 주사법이 초기에 사용되었다(Bover-Cid and Holzapfel, 1999). 그러나 이 방법은 미생물의 성장과 분리를 필요로 하기 때문에 상당한 시간과 노력을 요한다. 탈카르복실화 효소를 암호화하는 유전자를 밝혀냄으로써 PCR을 통한 BA 생산 미생물을 검출하는 새로운 방법이 개발되었다(Landete *et al.*, 2005; Lucas *et al.*, 2005). 탈카르복실화 효소를 암호화하는 유전자의 존재와 BA 합성 사이의 관계는 많은 연구자들이 실험을 통해 밝혔으며, 아미노아실-탈카르복실화 효소를 암호화하는 유전자를 포함한 균주 또한 잠재적인 BA 생산자들이기 때문에 이 미생물들이 음식 내에 있어서는 안 된다. 따라서 이 유전자들은 BA 생산 균주를 검출하기 위해 사용되는 특정 프라이머 설계에 있어서 적합하다. 실제로 이 분야에 대한 많은 연구가 진행되었다(Landete *et al.*, 2007).

티라민을 생산하는 LAB를 검출하기 위한 목적으로 많은 프라이머 세트가 개발되었으며, 밀크 커드(milk curd)와 치즈 샘플 내에 존재하는 BA 생산 미생물 및 치즈 제조 과

정 중 티라민을 생산하는 박테리아를 검출하기 위해 PCR이 사용되었다(Fernandez *et al.*, 2004, 2006; Coton and Coton, 2005). 이 기술의 큰 장점은 샘플에서 BA가 검출되기 전에 미생물 생산자를 검출한다는 것이다(Linares *et al.*, 2011). 따라서 최종생산품에 축적되는 BA를 예상하는데 도움을 준다. 이 방법은 치즈 생산의 단계와는 상관없이 사용할 수 있으며 유제품 회사에 있어서도 유용한 도구이다. 이 방법은 시장에 판매되는 치즈에도 사용되었으며, PCR와 HPLC의 결과 사이에 밀접한 연관성이 나타났다(Fernandez *et al.*, 2007).

히스타민을 생산하는 그람양성균을 검출하기 위해서 3세트의 프라이머가 개발되었으며, 그람음성균을 검출하기 위해서 2세트의 프라이머가 제안되었다(Landete *et al.*, 2005; de las Rivas *et al.*, 2006). 또한 몇몇 세트의 프라이머가 카다베린과 푸트레신 생산 균주를 검출하기 위해서 제안되었다(de las Rivas *et al.*, 2006). 히스타민, 티라민, 푸트레신을 생산하는 LAB를 동시 검출하기 위해 multiplex PCR method가 도입되었지만 아직까지 이 방법은 유제품 샘플에 사용되지 않고 있다(Coton and Coton, 2005; Marcobal *et al.*, 2005).

PCR은 최적 조건에서 높은 감도와 특이성을 나타내지만 2가지 문제점을 가지고 있다. 첫 번째는 전통적인 종점 분석으로 자료를 분석해야 한다는 것이며, 두 번째는 주형 정량(template quantification)이 불가능하다는 것이다. Real time quantitative PCR(q-PCR)은 PCR의 문제를 보완해준다. 이 방법은 PCR의 증폭 과정을 연속적으로 감시할 수 있도록 하며, 적절한 조건에서 샘플 내에 존재하는 목표로 하는 DNA의 정량도 가능하게 한다. Q-PCR로 히스타민 생산 LAB를 검출하기 위해서 새로운 프라이머 세트가 설계되었다(Lucas *et al.*, 2008). 이 방법은 2시간 안에 균주의 히스타민 생산 능력을 검출할 수 있으며, 치즈 제조의 여러 단계와 최종생산품에 성공적으로 사용되었다(Ladero *et al.*, 2008). 제조과정 초기 단계의 낮은 C_T 값(높은 수의 히스타민 생산 LAB를 의미함)은 숙성된 치즈 샘플 내 높은 수치의 히스타민과 연관성을 보였다. 즉, 이러한 PCR 방법은 BA 생산자를 초기에 검출하는데 유용할 뿐 아니라 starter로 선택된 LAB의 특성을 밝히는데도 유용하다(Linares *et al.*, 2011).

낙농식품 내 BA 함량 감소를 위한 방법

BA 생산에 필요한 조건과 이 물질을 생산하는 미생물에 대한 현재까지의 정보는 유제품 내 BA의 축적 감소에 영향을 준다. BA가 생산되기 위해서는 탈카르복실화 반응을 일으키는 미생물이 필요하며, 이 미생물들은 우유 내에 존재할 수 있기 때문에 많은 연구자들이 우유 처리법과 식품 내

의 BA 수치에 대한 관계에 대해 연구해왔다. 여러 종류의 치즈 내에 존재하는 BA 수치에 대한 분석은 치즈가 원유로 제조 되었을 경우, 더 많은 BA를 함유하는 것을 나타내었다(Fernandez *et al.*, 2007). 일반적으로 원유로 제조한 치즈 내의 BA 수치는 저온 살균 우유로 제조한 치즈 내의 BA 수치보다 높다(Fernandez *et al.*, 2007). 저온 살균법은 흔히 사용되는 처리법으로 병원성 미생물과 변패 미생물의 수를 감소시키기 위해서 치즈 제조에 사용된다. 많은 연구자들이 저온 살균법이 식품 내에 존재하는 BA 생산 미생물의 수를 감소시키면서 BA 수치 또한 감소시킨다는 결론을 내렸다. 확실히, 저온 살균 처리된 우유로 제조한 치즈 내에서 발견된 *Enterobacteriaceae*와 *enterococci* 수는 2~3 대수 단위 낮다(Novella-Rodriguez *et al.*, 2004).

*Enterobacteriaceae*는 유제품 내에서 카다베린을 생산하는 주요 미생물이다. Marino 등(2000)은 *Enterobacteriaceae* 수를 조절함으로써 치즈 내의 카다베린 수치를 감소시킬 수 있다고 주장한 바가 있다. 또 다른 균주인 *Enterococcus*는 티라민 주요 생산자이다. 원유로 제조된 치즈 내의 티라민 수치는 저온 살균 시킨 우유로 제조된 치즈보다 30배 정도 높는데, 이와 같은 수치의 현저한 차이는 치즈 내에 존재하는 *enterococci*의 수로 설명할 수 있다(Marino *et al.*, 2000; Novella-Rodriguez *et al.*, 2004).

저온 살균 우유로 제조된 치즈 내의 낮은 BA 수치의 원인이 느린 단백질 가수분해와 아미노산 방출 속도 때문이라고 설명한다(Lau *et al.*, 1991). 또한 보조인자 피리독살인산(pyridoxal phosphate)의 열감도는 탈카르복실화 활성화에 필요하다고 제기된 바가 있다(Ordóñez *et al.*, 1997).

압력을 이용한 살균과 같은 다른 우유 처리법 또한 식품 내의 BA 수치를 감소시키는 방법으로 연구되어왔다. 압력이 더 많은 단백질 가수분해를 유도하여, 더 많은 기판을 생산하지만 가압된 우유로 제조된 치즈 내의 BA 수치와 저온 살균된 우유로 제조된 치즈 내의 BA 수치에는 큰 차이가 없었다. 이와 같은 결과는 적절한 우유 처리법으로 BA 생산 미생물의 수를 조절하는 방법이 유제품 내에 BA 축적을 방지하는 중요한 요소라는 것을 나타낸다(Novella-Rodriguez *et al.*, 2003).

단백질 가수분해는 치즈 숙성에 필요하며, 아미노산은 치즈의 맛을 더욱 풍부하게 하기 때문에 BA 생산에 영향을 주는 아미노산을 유제품 내에서 감소시키는 것은 쉽지 않다(Fernandez and Zuniga, 2006).

또한 BA 합성 능력이 없는 starter를 선택하는 것은 유제품 내에 BA 수치를 감소시킬 수 있는 중요한 방법이다. 위에서 언급하였듯이 PCR는 탈카르복실화 효소를 암호화하는 유전자를 검출할 수 있기 때문에 BA 합성 능력이 없는

starter 선택에 있어서 뛰어난 도구다(Linares *et al.*, 2011). 탈카르복실화 효소와 수송체를 암호화하는 유전자의 발현을 돕는 요소들에 대한 연구는 BA 축적을 감소시킬 수 있는 새로운 방법들을 제시할 것이다.

맺음말

안전은 식품 생산에 있어 항상 충족되어야 하는 기본적인 조건이다. BA의 수치는 치즈 내에 불균등하게 분배되어 있으며, 이런 BA의 수치는 해독작용이 약화된 소비자에게는 건강상의 문제를 발생시킨다. 현재로서 발효식품 내 BA의 한계허용수치는 아직까지도 규정된 것이 없는 점에도 불구하고 소비자가 쉽게 구할 수 있는 발효식품 중 치즈가 가장 높은 BA수치를 가지고 있다. 그렇기 때문에 더욱더 엄격한 규정이 실행되어야 한다. BA 합성 및 축적에 관여하는 요소에 대해 더 많이 연구되어진다면 유제품 내에 축적되고 합성되는 BA의 수치를 감소시킬 수 있는 다양한 방법을 알게 될 것이다. 치즈 내 BA 생산은 많은 변수(BA 생산 미생물, 미생물의 단백질 가수분해 및 탈카르복실화 효소 활동, 숙성 시간, 숙성 및 저장 온도 등)에 의해 결정되는 복잡한 현상이다. 이러한 측면에서 미루어 볼 때 산성 pH는 *in vitro*에서 BA 축적을 증가시킨다고 할 수 있다. 그러나 다른 물리 화학적 조건(예를 들어, 아미노산의 이용가능성, 온도, 소금 농도)과 마찬가지로 이러한 매개변수는 발효과정에 내재되어 있기 때문에 이를 바꾸는 것은 어렵다. 이러한 사실이 BA 축적을 방지하는 핵심적인 대처는 치즈 제조 시에 BA를 생산하는 미생물의 수를 감소시킨다는 것을 명확하게 나타낸다. 현재까지는 유제품 내에 BA 축적을 감소시키는 요소 중 적절한 열처리를 통하여 BA를 생산하는 미생물의 수를 조절하는 방법이 가장 중요한 요소였다. 또한 위생, BA 합성 능력이 없는 발효균 선택, 저온 저장 등과 같은 조건을 향상시킴으로써 더욱더 안전한 생산을 높이는 것은 BA 축적을 감소시키며, 몸에 더 좋은 치즈 생산할 수 있다. 이러한 목적을 위하여 quantitative PCR을 토대로 종균배양과 원료 또는 치즈 제조와 숙성 과정 내에 존재하는 BA를 생산하는 미생물의 수를 검출할 수 있는 방법이 설명되었다. 또한 BA 축적을 방지하는 새로운 방법을 얻기 위해서는 BA 합성에 관여하는 요소에 대한 지식과 BA가 소비자의 건강에 미치는 영향에 대한 지식을 향상시키기 위해서는 더 많은 연구가 필요하다.

보다 안전한 식품을 원하는 소비자의 요구에 의해 최근 BA에 대한 연구를 증진시켰지만 아직까지도 여전히 문제점이 남아있다. 유제품(특히 치즈)은 많은 양의 BA를 축적하는 발효식품이다. BA와 같은 독성 물질은 여러 병상적

인 측면과 관련되어 있지만 이 물질이 소비자에게 어떠한 영향을 미치는지 알아내기 위해서는 더 많은 연구가 필요하다. 우유 품질의 영향과 우유 처리법에 대한 분석은 이 요소들이 유제품 내의 BA 수치를 감소시키는데 있어서 중요한 역할을 담당하는 것을 나타냈다. 더 나아가 BA 합성에 관여하는 유전자를 가지고 있지 않은 starter의 선택 또한 중요하다는 것을 나타냈다. 그 외에 활발히 진행되고 있는 연구 분야로는 식품 내에 존재하는 BA를 보다 감도가 높고 신속하게 검출하는 기술, BA 생산 미생물 검출 및 정량을 위한 PCR 방법 개발 등이 있다. BA 생산에 관여하는 대사 경로와 조절 메커니즘, BA의 생리학적 역할에 대한 지식은 식품 내의 BA 합성 및 축적을 감소시키는 새로운 방법의 발달에 도움이 될 것이다.

요 약

발효식품은 식품 중에서도 생체 아민(biogenic amine, BA) 중독을 일으키는 문제점을 가지고 있는데, 우유 발효식품 중에서는 치즈가 티라민(tyramine), 히스타민(histamine), 푸트레신(putrescine) 등이 유해한 수치의 BA를 함유하고 있는 생산품이라고 추측되고 있다. 다시 말해서, 생체 아민(BA)은 생물학적 활동을 가진 유기 및 염기성, 질소 화합물로 주로 아미노산이 탈카르복실화 반응(decarboxylation)을 거쳐서 생성된다. 다양한 종류의 식품(예: 유제품)은 높은 수치의 BA를 함유하고 있다. 치즈에서는 1 kg 당 1,000 mg 이상의 BA가 검출되기도 한다. BA 함유량이 높은 치즈를 섭취할수록 체내에 독성이 축적된다. 때문에 유제품 내의 BA 함유에 관한 특정한 규정이 없더라도 유제품 내에 BA가 축적되는 현상을 방지해야 한다. 높은 수치의 BA를 함유한 식품을 섭취하였을 경우에 발생하는 위험에 대한 인식이 점점 높아지고 있다. 유제품 제조 및 가공 시에 BA의 생합성 및 축적에 영향을 주는 요소를 과학기술적 측면에서 연구가 요구된다. 따라서 BA의 합성 및 축적에 영향을 미치는 요소에 대한 이해도가 높을수록 유제품의 BA 함유량을 감소시킬 수 있다. 이러한 BA는 3 가지의 조건이 만족될 때 합성이 이루어진다. (i) 이용 가능한 기질 아미노산(substrate amino acid)가 있어야 하며, (ii) 이화작용경로가 활성화된 미생물이 존재해야 하며, (iii) 탈카르복실화 반응활성(decarboxylation activity)이 일어나기에 적합한 환경 조건을 필요로 한다. 이 3가지의 조건들은 저온살균, starter culture의 사용, NaCl 농도, 시간, 숙성 및 보존 온도, pH, 온도, 숙성 후 기술적인 과정 등 여러 가지 요소에 영향을 받으며, 이 요소들에 대한 과학적인 이해가 요구된다. 또한 BA 생산과 관련된 요소들, 특히 환경 조건, BA 생산 미생

물, 유전자 구성, BA 생산에 관여하는 생합성경로, 유제품 내에 존재하는 BA 및 BA 생산 미생물 검출 방법 등에 대한 연구가 집중적으로 향후 진행되어야 할 것이다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품기술기획평가원 수출전략기술개발사업(no. 313010-3)에 의해 이루어졌습니다. 또한 한국연구재단 중견연구자 지원사업(2012R1A2A2A-01015344)의 연구비지원을 받았습니다.

참고문헌

1. Andiç, S., Gençcelep, H., Tunçtürk, Y. and Köse, S. 2010. The effect of storage temperatures and packaging methods on properties of Motal cheese. *J. Dairy Sci.* 93: 849-859.
2. Arena, P. A., Russo, P., Capozzi, V., Beneduce, L. and Spano, G. 2010. Effect of abiotic stress conditions on expression of the *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 tyrosine decarboxylase and agmatine deiminase genes. *Ann. Microbiol.* 61:179-183.
3. Arlorio, M., Coisson, J. D., Travaglia, F., Capasso, M., Rinaldi, M. and Martelli, A. 2003. Proteolysis and production of biogenic amines in toma piemontese PDO cheese during ripening. *Ital. J. Food Sci.* 15:395-404.
4. Bardocz, S. 1999. Role of biogenic amines—summing up or what is it we do not know? In: *Biogenically active amines in food*, Vol. III. pp 1-4. European Community, Ed.
5. Beresford, T. P. and Williams, A. 2004. “The microbiology of cheese ripening,” in *Cheese chemistry, physics and microbiology*, eds P. F. Fox, P. L. H. McSweeney, T. M. Cogan, and T. P. Guinee (Amsterdam: Elsevier), 287-317.
6. Bodmer, S., Imark, C. and Kneubühl, M. 1999. Biogenic amines in foods: Histamine and food processing. *Inflam. Research* 48:296-300.
7. Bover-Cid, S. and Holzapfel, W. H. 1999. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 53:33-41.
8. Bunková, L., Bunka, F., Hlobilová, M., Vanátková, Z., Nováková, D. and Dráb, V. 2009. Tyramine production of technological important strains of *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Streptococcus*. *Eur. Food Res. Technol.* 229: 533-538.
9. Bunková, L., Bunka, F., Mantlová, G., Cablová, A., Sedláček, I., Švec, P., Pachlová, V. and Krácmár, S. 2010. The effect of ripening and storage conditions on the distribution of tyramine, putrescine and cadaverine in Edam-cheese. *Food Microbiol.* 27:880-888.
10. Burdychova, R. and Komprda, T. 2007. Biogenic amine-forming microbial communities in cheese. *FEMS Microbiol. Lett.* 276:149-155.
11. Calles-Enríquez, M., Eriksen, B. H., Andersen, P. S., Rattray, F. P., Johansen, A. H., Fernández, M., Ladero, V. and Álvarez, M. A. 2010. Sequencing and transcriptional analysis of the *Streptococcus thermophilus* histamine biosynthesis gene cluster: Factors that affect differential *hdcA* expression. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:6231-6238.
12. Calzada, J., del Olmo, A., Picón, A., Gaya, P. and Nuñez, M. 2013. Reducing biogenic-amine-producing bacteria, decarboxylase activity, and biogenic amines in raw milk cheese by high-pressure treatments. *Appl. Environ. Microbiol.* 79:1277-1283.
13. Chander, H., Batish, V. H., Babu, S. and Singh, R. S. 1989. Factors affecting amine production by a selected strain of *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Food Sci.* 54:940-942.
14. Chaves-López, C., Serio, A., Martuscelli, M., Paparella, A., Osorio, E. and Suzzi, G. 2011. Microbiological characteristics of Kumis, a traditional fermented Colombian milk, with particular emphasis on Enterococci population. *Food Microbiol.* 28:1041-1047.
15. Coton, E. and Coton, M. 2005. Multiplex PCR for colony direct detection of Gram-positive histamine- and tyramine-producing bacteria. *J. Microbiol. Methods* 63: 296-304.
16. Coton, M., Delbés-Paus, C., Irlinger, F., Desmaures, N., Le Fleche, A., Stahl, V., Montel, M. C. and Coton, E. 2011. Diversity and assessment of potential risk factors of Gram-negative isolates associated with French cheeses. *Food Microbiol.* 29:88-98.
17. Coutts, R. T., Baker, G. B. and Pasutto, F. M. 1986. Foodstuffs as sources of psychoactive amines and their precursors: Content significance and identification. *Adv. Drug Res.* 15:169-232.
18. Custódio, F. B., Tavares, E. and Glória, M. B. 2007. Extraction of bioactive amines from grated Parmesan

- cheese using acid, alkaline and organic solvents. *J. Food Compos. Anal.* 20:280-288.
19. de las Rivas, B., Marcobal, A., Carrascosa, A.V. and Muñoz, R. 2006. PCR detection of foodborne bacteria producing the biogenic amines histamine, tyramine, putrescine, and cadaverine. *J. Food Prot.* 69:2509-2514.
 20. Delbès-Paus, C., Pochet, S., Helinck, S., Veisseire, P., Bord, C., Lebecque, A., Coton, M., Desmasures, N., Coton, E., Irlinger, F. and Montel, M. C. 2012. Impact of Gram-negative bacteria in interaction with a complex microbial consortium on biogenic amine content and sensory characteristics of an uncooked pressed cheese. *Food Microbiol.* 30:74-82.
 21. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). 2011. Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA J.* 9:2393.
 22. Fernandez, M. and Zuniga, M. 2006. Amino acid catabolic pathways in lactic acid bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* 32:155-183.
 23. Fernandez, M., Florez, A. B., Linares, D. M., Mayo, B. and Alvarez, M. A. 2006. Early PCR detection of tyramine-producing bacteria during cheese production. *J. Dairy Res.* 73:318-321.
 24. Fernández, M., Linares, D. M., del Rio, B., Ladero, V. and Álvarez, M. A. 2007. HPLC quantification of biogenic amines in cheeses: Correlation with PCR-detection of tyramine-producing microorganisms. *J. Dairy Res.* 74: 276-282.
 25. Fernandez, M., Linares, D. M. and Alvarez, M. A. 2004. Sequencing of the tyrosine decarboxylase cluster of *Lactococcus lactis* IPLA 655 and the development of a PCR method for detecting tyrosine decarboxylating lactic acid bacteria. *J. Food Prot.* 67:2521-2529.
 26. Fernández-García, E., Tomillo, E. J. and Nuñez, M. 2000. Formation of biogenic amines in raw milk Hispanic cheese manufactured with proteinases and different levels of starter culture. *J. Food Prot.* 63:1551-1555.
 27. Fernández-García, E., Tomillo, J. and Nuñez, M. 1999. Effect of added proteinases and level of starter culture on the formation of biogenic amines in raw milk Manchego cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 52:189-196.
 28. 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.
 29. Gardini, F., Martuscelli, M., Caruso, M. C., Galgano, F., Crudele, M. A., Favati, F., Guerzoni, M. E. and Suzzi, G. 2001. Effect of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetic, proteolytic activity and biogenic amines production of *Enterococcus faecalis*. *Int. J. Food Microbiol.* 64:105-117.
 30. Gardini, F., Tofalo, R., Belletti, N., Iucci, L., Suzzi, G., Torriani, S., Guerzoni, M. E. and Lanciotti, R. 2006. Characterization of yeasts involved in the ripening of Pecorino Crotonese cheese. *Food Microbiol.* 23:641-648.
 31. Halasz, A., Barath, A., Simon-Sarkadi, L. and Holzapfel, W. H. 1994. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends Food Sci. Technol.* 5:42-49.
 32. Igarashi, K., Ito, K. and Kashiwagi, K. 2001. Polyamine uptake systems in *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.* 152: 271-278.
 33. Innocente, N. and D'Agostin, P. 2002. Formation of biogenic amines in a typical semihard Italian cheese. *J. Food Prot.* 65:1498-1501.
 34. La Gioia, F., Rizzotti, L., Rossi, F., Gardini, F., Tabanelli, G. and Torriani, S. 2011. Identification of a tyrosine decarboxylase gene (*tdcA*) in *Streptococcus thermophilus* 1TT45 and analysis of its expression and tyramine production in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:1140-1144.
 35. Ladero, V., Calles-Enriquez, M., Fernández, M. and Álvarez, M. A. 2010. Toxicological effects of dietary biogenic amines. *Curr. Nutr. Food Sci.* 6:145-156.
 36. Ladero, V., Fernández, M. and Álvarez, M. A. 2009. Effect of post-ripening processing on the histamine and histamine-producing bacteria contents of different cheeses. *Int. Dairy J.* 19:759-762.
 37. Ladero, V., Fernández, M., Calles-Enriquez, M., Sánchez-Llana, E., Cañedo, E., Martín, M. C. and Álvarez, M. A. 2012. Is biogenic amines production a strain-dependent trait in enterococci?. *Food Microbiol.* 30:132-138.
 38. Ladero, V., Linares, D. M., Fernández, M. and Álvarez, M. A. 2008. Real time quantitative PCR detection of histamine-producing lactic acid bacteria in cheese: relation with histamine content. *Food Res. Int.* 41:1015-1019.
 39. Ladero, V., Rattray, F. P., Mayo, B., Martín, M. C., Fernández, M. and Álvarez, M. A. 2011. Putrescine producing *Lactococcus lactis*: Sequencing and transcrip-

- tional analysis of the biosynthesis gene cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:5507-5511.
40. Landete, J. M., de Las Rivas, B., Marcobal, A. and Muñoz, R. 2007. Molecular methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on foods. *Int. J. Food Microbiol.* 117:258-269.
 41. Landete, J. M., Ferrer, S. and Pardo, I. (2005). Which lactic acid bacteria are responsible for histamine production in wine? *J. Appl. Microbiol.* 99:580-586.
 42. Latorre-Moratalla, M. L., Bosch-Fusté, J., Lavizzari, T., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, M. T. and Vidal-Carou, M. C. 2009. Validation of an ultra high pressure liquid chromatographic method for the determination of biologically active amines in food. *J. Chromatogr. A* 1216: 7715-7720.
 43. Lau, K. L., Barbano, M. and Rasmussen, R. R. 1991. Influence of pasteurization of milk on protein breakdown in Cheddar cheese during aging. *J. Dairy Sci.* 74:727-740.
 44. Lee Y. H., Kim, B. H., Kim, J. H., Yoon, W. S., Bang, S. H. and Park, Y. K. 2007. CadC has a global translational effect during acid adaptation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* 189: 2417-2425.
 45. Lehane, L. and Olley, J. 2000. Histamine fish poisoning revisited. *Int. J. Food Microbiol.* 58:1-37.
 46. Leuschner, R. G. and Hammes, W. P. 1998. Degradation of histamine and tyramine by *Brevibacterium linens* during surface ripening of Munster cheese. *J. Food Prot.* 61:874-878.
 47. Lewis, M. J. 2003. "Improvements in the pasteurisation and sterilisation of milk," in *Dairy processing: Improving quality*, ed. G. Smit (Cambridge: Woodhead Publishing Limited), 81-103.
 48. Linares, D. M., Del Río, B., Ladero V., Martínez, N., Fernández, M., Martín, M. C. and Alvarez, M. A. 2012. Factors influencing biogenic amines accumulation in dairy products. *Front Microbiol.* 3:180.
 49. Linares, D. M., Fernández, M., Martín, M. C. and Álvarez, M. A. 2009. Tyramine biosynthesis in *Enterococcus durans* is transcriptionally regulated by the extracellular pH and tyrosine concentration. *Microb. Biotechnol.* 2:625-633.
 50. Linares, D. M., Martín, M. C., Ladero, V., Alvarez, M. A. and Fernandez, M. 2011. Biogenic amines in dairy products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 51:691-703.
 51. Lopez-Sabater, E. I., Rodriguez-Jerez, J. J., Hernandez-Herrero, M. and Mora-Ventura, M. T. 1994. Evaluation of histidine decarboxylase activity of bacteria isolated from sardine (*Sardina pilchardus*) by an enzymatic method. *Lett. Appl. Microbiol.* 19:70-75.
 52. Lucas, P. M., Claisse, O. and Lonvaud-Funel, A. 2008. High frequency of histamine-producing bacteria in the enological environment and instability of the histidine decarboxylase production phenotype. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:811-817.
 53. Lucas, P. M., Wolken, W. A., Claisse, O., Lolkema, J. S. and Lonvaud-Funel, A. 2005. Histamine-producing pathway encoded on an unstable plasmid in *Lactobacillus hilgardii* 0006. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1417-1424.
 54. Lynch, C. M., McSweeney, R. L., Fox, R. E., Cogan, T. M. and Drinan, E. D. 1997. Contribution of starter lactococci and non-starter lactobacilli to proteolysis in Cheddar cheese with a controlled microflora. *Lait.* 77:441-459.
 55. Lyte, M. 2004. The biogenic amine tyramine modulates the adherence of *Escherichia coli* O157:H7 to intestinal mucosa. *J. Food Prot.* 67:878-883.
 56. Marcobal, A., de las Rivas, B., Moreno-Arribas, M. V. and Muñoz, R. 2006. Evidence for horizontal gene transfer as origin of putrescine production in *Oenococcus oeni* RM83. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:7954-7958.
 57. Marcobal, A., de las Rivas, B., Moreno-Arribas, M.V. and Muñoz, R. 2005. Multiplex PCR method for the simultaneous detection of histamine-, tyramine-, and putrescine-producing lactic acid bacteria in foods. *J. Food Prot.* 68:874-878.
 58. Marino, M., Maifreni, M., Moret, S. and Rondinini, G. 2000. The capacity of Enterobacteriaceae species to produce biogenic amines in cheese. *Lett. Appl. Microbiol.* 31:169-173.
 59. Martuscelli, M., Gardini, F., Torriani, S., Mastrocola, D., Serio, A., Chaves-López, C., Schirone, M. and Suzzi, G. 2005. Production of biogenic amines during the ripening of Pecorino Abruzzese cheese. *Int. Dairy J.* 15: 571-578.
 60. Mayer, H. K., Fiechter, G. and Fischer, E. 2010. A new ultra-pressure liquid chromatography method for the determination of biogenic amines in cheese. *J. Chromatogr.*

- A 1217:3251-3257.
61. Mohedano, A. F., Fernández, J., Gaya, P., Medina, M. and Nuñez, M. 1998. Effect of the cysteine proteinase from *Micrococcus* sp. INIA 528 on the ripening process of Hispanico cheese. *J. Dairy Res.* 65:621-630.
 62. Molenaar, D., Bosscher, J. S., Ten Brink, B., Driessen, A. J. M. and Konings, W. N. 1993. Generation of a proton motive force by histidine decarboxylation and electrogenic histidine/histamine antiport in *Lactobacillus buchneri*. *J. Bacteriol.* 175:2864-2870.
 63. Moreno-Arribas, V. and Lonvaud-Funel, A. 2001. Purification and characterization of tyrosine decarboxylase of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 isolated from wine. *FEMS Microbiol. Lett.* 195:103-107.
 64. 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.* 75:139-150.
 65. Nieto-Arribas, P., Seseña, S., Poveda, J. M., Palop, L. and Cabezas, L. 2009. Genotypic and technological characterization of *Lactococcus lactis* isolates involved in processing of artisanal Manchego cheese. *J. Appl. Microbiol.* 107:1505-1517.
 66. Novella-Rodríguez, S., Veciana-Nogués, M. T., Izquierdo-Pulido, M. and Vidal-Carou, M. C. 2003. Distribution of biogenic amines and polyamines in cheese. *J. Food Sci.* 68:750-755.
 67. Novella-Rodríguez, S., Veciana-Nogués, M. T., Roig-Sagués, A. X., Trujillo-Mesa, A. J. and Vidal-Carou, M. C. 2002. Influence of starter and nonstarter on the formation of biogenic amine in goat cheese during ripening. *J. Dairy Sci.* 85:2471-2478.
 68. Novella-Rodríguez, S., Veciana-Nogues, M. T., Trujillo-Mesa, A. J. and Vidal-Carou, M. C. 2003. Profile of biogenic amines in goat cheese made from pasteurized and pressurized milks. *J. Food Sci.* 67:2940-2944.
 69. Novella-Rodríguez, S., Veciana-Nogues, M. T., Roig-Sagues, A., Trujillo-Mesa, A. and Vidal-Carou, M. C. 2004. Evaluation of biogenic amines and microbial counts throughout the ripening of goat cheeses from pasteurized and raw milk. *J. Dairy Res.* 71:245-252.
 70. Onal, A. 2007. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in food. *Food Chem.* 103:1475-1486.
 71. Ordóñez, A. I., Ibañez, F. C., Torre, P. and Barcina, Y. 1997. Formation of biogenic amines in Idiazabal Ewe's milk cheese: Effect of ripening, pasteurization, and starter. *J. Food Prot.* 60:1371-1375.
 72. O'Sullivan, D. J., Giblin, L., McSweeney, P. L., Sheehan, J. J. and Cotter, P. D. 2013. Nucleic acid-based approaches to investigate microbial-related cheese quality defects. *Front Microbiol.* 4:1.
 73. Özdestand, Ö. and Üren, A. 2010. Biogenic amine content of kefir: a fermented dairy product. *Eur. Food Res. Technol.* 231:101-107.
 74. Pinho, O., Pintado, A. I., Gomes, A. M., Pintado, M. M., Malcata, F. X. and Ferreira, I. M. 2004. Interrelationships among microbiological, physicochemical, and biochemical properties of Terrincho cheese, with emphasis on biogenic amines. *J. Food Prot.* 67:2779-2785.
 75. Pircher, A., Bauer, F. and Paulsen, P. 2007. Formation of cadaverine, histamine, putrescine and tyramine by bacteria isolated from meat, fermented sausages and cheeses. *Eur. Food Res. Technol.* 226:225-231.
 76. Premont, R. T., Gainetdinov, R. R. and Caron, M. G. 2001. Following the trace of elusive amines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98:9474-9475.
 77. Reij, M. W. and Den Aantrekker, E. D. 2004. Recontamination as a source of pathogens in processed foods. *Int. J. Food Microbiol.* 91:1-11.
 78. Rhee, J. E., Rhee, J. H., Ryu, P. Y. and Choi, S. H. 2002. Identification of the cadBA operon from *Vibrio vulnificus* and its influence on survival to acid stress. *FEMS Microbiol. Lett.* 208:245-251.
 79. Rhee, J. E., Rhee, J. H., Ryu, P. Y. and Choi, S. H. 2002. Identification of the cadBA operon from *Vibrio vulnificus* and its influence on survival to acid stress. *FEMS Microbiol. Letts.* 208:245-251.
 80. Rogers, P. L. and Staruszkiewicz, W. 1997. Gas chromatographic method for putrescine and cadaverine in canned tuna and mahimahi and fluorometric method for histamine (minor modification of AOAC Official Method 977.13): collaborative study. *J. AOAC Int.* 80:591-602.
 81. Roig-Sagués, A. X., Molina, A. P. and Hernandez-Herrero, M. M. 2002. Histamine and tyramine-forming microorganisms in Spanish traditional cheeses. *Eur. Food Res. Technol.* 215:96-100.
 82. Russo, P., Spano, G., Arena, M. P., Capozzi, V., Grieco, F. and Beneduece, L. 2010. Are consumers aware of

- the risks related to biogenic amines in food? *Curr. Res. Technol. Edu. Top. Appl. Microbiol. Microb. Biotechnol.* 2:1087-1095.
83. Schelp, E., Worley, S., Monzingo, A. F., Ernst, S. and Robertus, J. D. 2001. pH induced structural changes regulate histidine decarboxylase activity in *Lactobacillus* 30a. *J. Mol. Biol.* 306:727-732.
 84. Schirone, M., Tofalo, R., Mazzone, G., Corsetti, A. and Suzzi, G. 2011. Biogenic amine content and microbiological profile of Pecorino di Farindola cheese. *Food Microbiol.* 28:128-136.
 85. Serio, A., Paparella, A., Chaves-López, C., Corsetti, A. and Suzzi, G. 2007. Enterococcus populations in Pecorino Abruzzese cheese: biodiversity and safety aspects. *J. Food Prot.* 70:1561-1568.
 86. Shalaby, A. R. 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Res. Int.* 29:675-690.
 87. Silla Santos, M. H. 1996. Biogenic amines: Their importance in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 29:213-231.
 88. Souci, S. W., Fachmann, W. and Kraut, H. 2000. Food composition and nutrition tables. Stuttgart: Medpharm GmbH Scientific Publishers.
 89. Spano, G., Russo, P., Lonvaud-Funel, A., Lucas, P., Alexandre, H., Grandvalet, C., Coton, E., Coton, M., Barnavon, L., Bach, B., Rattray, F., Bunte, A., Magni, C., Ladero, V., Alvarez, M., Fernández, M., Lopez, P., de Palencia, P. F., Corbi, A., Trip, H. and Lolkema, J. S. 2010. Biogenic amines in fermented foods. *Eur. J. Clin. Nutr.* 64:S95-S100.
 90. Sumner, S. S., Roche, F. and Taylor, S. L. 1990. Factors controlling histamine production in swiss cheese inoculated with *Lactobacillus buchneri*. *J. Dairy Sci.* 73: 3050-3058.
 91. Suzzi, G., Schirone, M., Martuscelli, M., Gatti, M., Fornasari, M. E. and Neviani, E. 2003. Yeasts associated with Manteca. *FEMS Yeast Res.* 3:159-166.
 92. Taylor, S. L. 1983. Histamine poisoning associated with fish, cheese and other foods. *FAO/WHO monograph CX/PH 83/11.*
 93. Taylor, S. L. and Sumner, S. S. 1986. Determination of histamine, putrescine, and cadaverine. In: *Seafood quality determination*, pp. 235-245. Kramer, D.E. and Liston, J., Eds., Elsevier, Amsterdam.
 94. Ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H. M. L. J. and Huis in't Veld, J. H. J. 1990. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 11:73-84.
 95. Teodorovic, V., Buncic, S. and Smiljanic, D. 1994. A study of factors influencing histamine production in meat. *Fleischwirtschaft* 74:170-172.
 96. Tkachenko, A., Nesterova, L. and Pshenichnov, M. 2001. The role of the natural polyamine putrescine in defense against oxidative stress in *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* 176:155-157.
 97. Valsamaki, K., Michaelidou, A. and Polychroniadou, A. 2000. Biogenic amine production in Feta cheese. *Food Chem.* 71:259-266.
 98. Van de Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S. D. and Maguin, E. 2002. Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.* 82: 187-216.
 99. Varnam, A. H. and Sutherland, J. P. 1994. Milk and milk products: Technology, chemistry and microbiology. London: Chapman & Hall, 451.
 100. Vido, K., Le Bars, D., Mistou, M. Y., Anglade, P., Gruss, A. and Gaudu, P. 2004. Proteome analyses of heme-dependent respiration in *Lactococcus lactis*: Involvement of the proteolytic system. *J. Bacteriol.* 186: 1648-1657.
 101. Wohrl, S., Hemmer, W., Focke, M., Rappersberger, K. and Jarisch, R. 2004. Histamine intolerance-like symptoms in healthy volunteers after oral provocation with liquid histamine. *Allergy Asthma Proc.* 25:305-311.
 102. Wolken, W. A., Lucas, P. M., Lonvaud-Funel, A. and Lolkema, J. S. 2006. The mechanism of the tyrosine transporter TyrP supports a proton motive tyrosine decarboxylation pathway in *Lactobacillus brevis*. *J. Bacteriol.* 188:2198-2206.
 103. Wyder, M. T., Bachmann, H. P. and Puhani, Z. 1999. Role of selected yeasts in cheese ripening: an evaluation in foil wrapped Raclette cheese. *Lebensm. Wiss. Technol.* 32:333-343.
 104. Zaman, M. Z., Abu-Bakar, F., 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.