

## 바이오제닉아민 분해 유전자 보유 *Bacillus* 균주 선발 및 특성

허소정<sup>1</sup>, 정근철<sup>1</sup>, 이현동<sup>1</sup>, 정도원<sup>2</sup>, 이종훈<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>경기대학교 식품생물공학과

<sup>2</sup>동덕여자대학교 식품영양학과

Received: May 10, 2017 / Revised: May 25, 2017 / Accepted: May 25, 2017

### Selection and Characterization of *Bacillus* Strains Harboring the Gene for Biogenic Amine Degradation

Sojeong Heo<sup>1</sup>, Keuncheol Jeong<sup>1</sup>, Hyundong Lee<sup>1</sup>, Do-Won Jeong<sup>2</sup>, and Jong-Hoon Lee<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University, Suwon 16227, Republic of Korea

<sup>2</sup>Department of Food and Nutrition, Dongduk Women's University, Seoul 02748, Republic of Korea

Ten *Bacillus* strains possessing amine oxidase activity were selected from 126 *Bacillus* isolates from meju and doenjang (two traditional Korean soybean foods). Among the isolates, two *B. licheniformis* strains (8MI05 and 8MS03) harbored the amine oxidase gene *yobN*. By conducting a gene search against published *B. licheniformis* genomes, the possession of *yobN* was proved to be a strain-specific property. Both strains degraded four types of biogenic amines (cadaverine, histamine, putrescine, and tyramine) supplemented in tryptic soy broth during their culture. A recombinant harboring *yobN* also degraded the four types of biogenic amines during cultivation. Both *Bacillus* strains could grow at a NaCl concentration of 14% and exhibited strain-specific protease and lipase activities.

**Keywords:** *Bacillus*, biogenic amine, amine oxidase, doenjang, starter

## 서 론

바이오제닉아민(Biogenic amine)은 아미노산의 효소적 탈탄산반응(decarboxylation) 또는 케톤류나 알데히드류의 아미노기 전이반응(transamination)에 의해서 생성되는 저분자량의 질소화합물이다. 바이오제닉아민은 호르몬, 알카로이드, 핵산, 단백질 등의 생합성을 위한 전구물질로써 사용되고, 대사과정에서 생성되며, 체내에서 신경전달물질로써 생리적 역할을 하는 중요한 세포 필수 구성성분이다[1–3]. 그러나, 과량의 바이오제닉아민을 섭취할 경우 두통, 구토와 같은 식중독 유사 증상이 나타나고, 혈압조절 및 혈류 등의 심혈관계에 부정적인 영향을 미치는 것으로 보고되었다[4, 5].

바이오제닉아민은 어류제품, 육류제품, 낙농제품, 맥주, 채소, 과일, 견과류 및 초콜릿 등 다양한 식품에 함유되어 있으며, 특히 단백질이나 유리 아미노산의 함량이 높은 발효식품 또는 부패식품에서 미생물의 탈탄산효소 작용에 의해 다

량 생성되는 것으로 알려져 있다[6–8]. 발효식품의 주요 바이오제닉아민 생성 원인인 박테리아 생육 저해를 통한 바이오제닉아민 저감화를 위해 저온 숙성 또는 생육저해물질 첨가 등의 방안이 검토되었다[1, 6]. 그러나, 주 발효균이 바이오제닉아민을 생성하는 경우, 발효를 저해하는 결과를 초래하였다. 최근에는 이러한 문제점의 해결을 위하여 바이오제닉아민 비생성 균주 또는 바이오제닉아민 분해 균주를 종균으로 사용하여 발효식품에서의 바이오제닉아민 저감화를 시도하고 있다[9–11].

된장은 주원료 콩의 발효, 숙성 과정을 통하여 제조된 우리나라 사람의 주요 단백질 공급원이다. 전통 된장은 환경 및 주원료에서 유래한 곰팡이와 세균의 복합적인 작용에 의해서 된장 특유의 풍미가 만들어지고, 주요 발효미생물의 단백질분해효소에 의하여 콩 단백질이 분해되어 아미노산 함량이 높아진다. 그러나, 숙성 과정 중 생성된 다량의 유리 아미노산이 박테리아의 탈탄산효소 작용에 의해 바이오제닉아민으로 전환되기 때문에 시판 된장의 바이오제닉아민 모니터링이 지속적으로 진행되고 있으며, 특히 tyramine이 높은 것으로 보고되었다[12, 13].

된장을 포함하는 장류의 주요 위해요소는 식중독균 *Bacillus*

### \*Corresponding author

Tel: +82-31-249-9656, Fax: +82-31-253-1165

E-mail: jhl@kgu.ac.kr

© 2017, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

*cereus*와 발효과정에서 생성되는 바이오제닉아민이다. *B. cereus* 생육 저해 활성 보유 *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* 균주가 장류로부터 선발되었고[14, 15], 바이오제닉아민 분해 활성을 보유한 *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. subtilis* 균주 또한 분리되었다[16-18]. 또한 장류 발효용 종균으로 선발된 바이오제닉아민 비생성 *Bacillus* 균주들로부터 amine oxidase 유전자 *yobN*의 발현이 확인되었다[19]. 장류의 위해요소 저감화를 위한 *Bacillus* 속 박테리아에 대한 연구가 지속되는 이유는 *Bacillus* 속이 전통 된장의 풍미를 부여하는 우점종으로 보고되고 있어 전통 된장 발효의 종균으로 개발될 높은 가능성이 있기 때문이다[20, 21]. 최근 본 연구자들은 전통 된장 발효 및 숙성 과정 중의 미생물 천이 분석 과정에서 *Bacillus* 속 126 균주를 확보하였다[22]. 본 연구에서는 이들 분리 균주를 대상으로 바이오제닉아민 저감화에 기여할 수 있는 amine oxidase 활성 보유 균주를 선발하여 *yobN* 유전자의 보유 및 된장 발효용 종균으로써의 특성을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배양

메주와 된장에서 분리하여 16S ribosomal RNA 유전자 염기서열 분석을 통하여 동정한 *B. licheniformis* 82균주, *B. methylotrophicus* 18균주, *B. siamensis* 17균주, *B. subtilis* 9균주를 바이오제닉아민 분해 활성 보유 균주 선발에 사용하였다[22]. *Bacillus* 균주들의 동정은 shikimate 5-dehydrogenase 유전자 *aroE*의 염기서열 결정을 통하여 재확인하였다[23]. 본 연구에 사용된 *Bacillus* 균주는 tryptic soy agar (TSA; Difco, USA)와 tryptic soy broth (TSB; Difco)를 사용하여 37°C에서 12시간 배양하였다.

### Oxidase 활성 보유 균주 선발

양혈액(sheep blood; BBL Microbiology Systems, Sparks, MD, USA)을 5% (v/v) 농도로 첨가한 TSA를 사용하여 37°C에서 12시간 배양하여 생성된 colony 표면에 100 mg/l 농도 *N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride (Sigma, USA) 수용액을 도포하여 산화반응에 의한 색깔 변화를 확인하였다. 10초 이내 colony 주변에 어두운 남색 또는 보라색 환이 생기는 균주를 oxidase 활성 보유 균주로 선발하였다.

### Amine oxidase 활성 측정

TSB에서 12시간 배양한 균주 배양액을 새로운 TSB로 희석하여 흡광도(600 nm) 0.5로 동일화 시킨 다음, 배양액의 amine oxidase 활성을 Amplex Red Monoamine Oxidase

Assay Kit (Molecular Probes, USA)를 사용하여 측정하였다. 효소 활성 1 unit은 20°C, pH 6.0에서 20초 동안 pyrogallol로부터 1.0 mg의 purpurogallin을 생성시키는 효소량으로 정의하였다.

### Amine oxidase 유전자 *yobN* 존재 확인 및 클로닝, 발현

Amine oxidase 유전자 *yobN* 존재 확인을 위한 PCR primer는 GenBank에 등록된 *Bacillus* 속 보유 *yobN* 유전자 염기서열을 ClustalW program을 이용하여 나열한 다음, 상동성이 높은 부분을 선정하여 제작하였다(IF: 5'-ATCGCCGACTCGCTTCTATGA-3', IR: 5'-ATGCCCGTGTCTCCTATGCT-3'). PCR 증폭을 위한 total DNA 추출에는 DNeasy tissue kit (Qiagen, Germany)를 사용하였고, PCR은 50 µl 반응계에서 template DNA, 10 mM dNTP, 1.25 unit *Taq* polymerase (Inclone, Korea) 및 각 primer를 0.5 µM 농도로 첨가하여 T-3000 thermocycler (Biometra, Germany)를 사용하여 수행하였다. 반응조건은 95°C 5분 예비가열 후, 95°C 1분간 변성, 55°C에서 30초 annealing, 72°C에서 1분 중합반응의 과정을 30회 반복하였고, 마지막 72°C에서 5분간 처리한 후 반응을 중단시켰다. 증폭된 PCR 산물은 1.5% (w/v) agarose gel을 이용한 전기영동으로 확인하였으며, Gel & PCR purification system (Inclone)을 이용하여 정제하여 Genotech (Daejeon, Korea)에 의뢰하여 염기서열을 결정하였다. 유전자 상동성 분석은 National Center for Biotechnology Information database (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)의 BLAST program을 이용하여 GenBank에 등록된 염기서열 정보를 대상으로 수행하였다.

완전한 *yobN* 유전자 증폭을 위한 PCR primer는 GenBank에 등록된 *B. licheniformis* WX-02의 *yobN* 유전자(NCBI accession number: AKQ73085.1)를 증폭할 수 있도록 제작하였고(GF: 5'-GGACTTCGTGCAGAGAGGATG-3', GR: 5'-ACATCCCGTCAGAAGGCGGAG-3'), PCR은 *yobN* 유전자 존재 확인과 동일한 조건에서 수행하였다. 8MI05 균주로부터 증폭된 완전한 *yobN* 유전자는 pGEM-T easy vector (Promega, USA)를 이용하여 클로닝하였고, 유전자 발현을 위한 host로는 *Escherichia coli* BL21을 사용하였다. *E. coli* BL21는 Luria-Bertani (LB) 배지(Difco)를 사용하여 37°C에서 12시간 배양하였다. 재조합 vector에 삽입된 단편은 염기서열 결정을 통하여 확인하였다. 재조합균주의 유전자 발현은 LB 배지에 1 mM IPTG를 첨가하여 유도하였다.

### Biogenic amine 정량분석

Amine oxidase 유전자 보유 균주에 의한 바이오제닉아민 저감화 활성은 4종류의 바이오제닉아민을 첨가한 TSB에서 24시간 배양 후, 감소한 바이오제닉아민을 정량분석하여 측정

하였다. 4종류의 바이오제닉아민(cadaverine dihydrochloride, histamine dihydrochloride, putrescine dihydrochloride, tyramine hydrochloride)은 Sigma로부터 구입하였고, 각각 0.25% (w/v) 농도로 첨가하였다[24]. 바이오제닉아민 정량은 식품공전에 따라 dansyl chloride (Sigma)로 유도체화한 다음, HPLC로 분석하였다[25]. HPLC는 Agilent 1200 series system (Agilent Technologies, USA)을 사용하였고, 바이오제닉아민은 UV detector를 이용하여 254 nm에서 검출하였다. Nova-Pak C18 column (4  $\mu$ m, 154  $\times$  4.6 mm, Waters, USA)을 분리에 사용하였고, 용매는 1 ml/min 속도로 흘러주었다. 전개용매는 acetonitrile과 0.1 M ammonium acetate를 50:50 (v/v)으로 혼합한 용매를 19분 동안 90:10으로 변화시킨 다음, 2분 동안 50:50로 변화시켰다. 바이오제닉아민의 정량을 위한 정량곡선은 4종류의 바이오제닉아민에 내부표준물질 1,7-diaminoheptane (Sigma)을 1,000 mg/l 첨가하여 작성하였다. 3반복 수행한 실험결과와 평균과 표준편차를 정량값으로 제시하였다.

재조합균주에 의한 바이오제닉아민 저감화 활성은 4종류의 바이오제닉아민을 첨가한 LB broth에서 24시간 배양 후, 감소한 바이오제닉아민을 정량분석하여 측정하였다.

### 기능성 평가

균주들의 내염성은 NaCl을 첨가한 TSA에서의 생장을 통하여 확인하였다. 12%, 14%, 16% (w/v)의 NaCl이 첨가된 배지는 37°C에서 7일 동안 배양하여 colony 형성을 확인하였다. 균주들이 보유한 단백질 분해 활성 확인에는 탈지분유 2% (w/v), 산 생성 활성 확인에는 glucose 2% (w/v)와

CaCO<sub>3</sub> 0.7% (w/v)를 첨가한 TSA를 사용하였고, 지질 분해 활성은 tributyrin 1% (v/v)를 첨가한 tributyrin agar (Sigma)를 사용하였다. Tributyrin agar는 1시간 sonication으로 tributyrin을 유화시킨 다음 멸균하였다. 각 기질이 첨가된 배지에 균주를 접종하고, 37°C에서 24시간 배양하여 생육과 투명환의 생성으로 활성을 확인하였다. 효소 활성에 미치는 NaCl의 영향은 각 기질이 첨가된 배지에 NaCl을 첨가하여 확인하였다.

### 결과 및 고찰

#### Amine oxidase 활성 보유 균주 선발

양혈액이 첨가된 TSA에서 성장한 총 126 *Bacillus* 속 균주의 colony에 *N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride 용액을 도포한 결과, 산화반응을 나타내는 *B. licheniformis* 38균주, *B. siamensis* 1균주, *B. subtilis* 1균주의 총 40균주를 선발하였다.

선발한 40균주를 대상으로 amine oxidase 활성을 측정된 결과, 각각 한 균주가 선발된 *B. siamensis*와 *B. subtilis*는 25.2 U/ml, 12.4 U/ml의 활성을 나타냈다. *B. licheniformis* 38균주 중에서 14BML13 균주는 31.8 U/ml로 가장 높은 활성을 14BDL20 균주는 7.4 U/ml로 가장 낮은 활성을 나타내었다. 추가 실험 진행을 위하여 19.0 U/ml 이상의 활성을 나타낸 10균주를 선발하였다(Table 1). 양혈액배지에서 산화반응을 나타내지 않은 *B. licheniformis* 8DJ14 균주는 2.8 U/ml의 amine oxidase 활성을 나타내어 바이오제닉아민 정량분석을 위한 대조균으로 선발하였다.

**Table 1. Technological properties of 10 *Bacillus* strains showing amine oxidase activity and the effect of NaCl on activity levels.**

Species	Strain	Amine oxidase activity (U/ml)	Growth			Acid production			Protease			Lipase		
			12%	14%	16%	0%	2%	4%	2%	4%	6%	0%	1%	2%
<i>B. siamensis</i>	0BML-1	25.2 $\pm$ 5.0	+	+	-	-	-	-	++	+	-	+	+	-
<i>B. licheniformis</i>	7BDL06	21.3 $\pm$ 9.6	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-
	7BDL07	21.5 $\pm$ 8.9	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-
	8MI05	28.0 $\pm$ 5.7	+	+	-	-	-	-	++	++	+	++	++	++
	8MS03	26.2 $\pm$ 0.3	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-
	14BDE25	20.5 $\pm$ 4.0	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
	14BML8	28.1 $\pm$ 3.1	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-
	14BML13	31.8 $\pm$ 1.6	+	+	+	-	-	-	++	++	+	++	++	++
	14BML19	22.9 $\pm$ 3.2	+	+	-	-	-	-	++	+	-	+	+	-
	14BML25	19.4 $\pm$ 2.2	+	+	-	-	-	-	+	-	-	++	+	-
	8DJ14	2.8 $\pm$ 0.0	+	+	-	-	-	-	++	+	-	++	++	+

One unit of amine oxidase activity was determined as the amount of enzyme that produced 1.0 mg purpurogallin from pyrogallol at 20°C and pH 6.0 in 20 seconds.

Abbreviations: +, positive activity; -, negative activity. Number of (+) indicates the strength of enzyme activities.

**Amine oxidase 유전자 *yobN* 존재 확인**

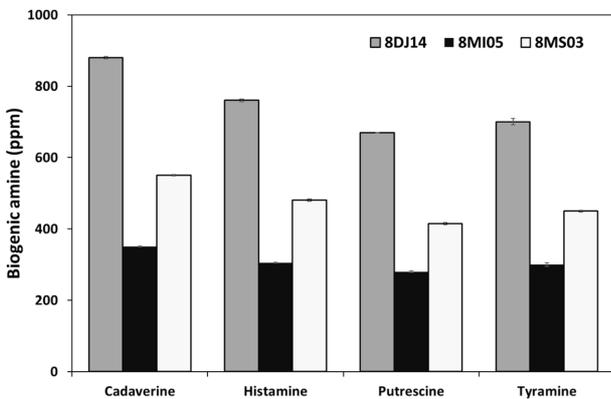
Amine oxidase 활성 측정을 통하여 선발된 *Bacillus* 10균주를 대상으로 amine oxidase 유전자 *yobN* 특이적 primer IF와 IR을 이용하여 PCR을 진행한 결과, 8MI05, 8MS03 균주로부터 예상 크기와 일치하는 약 400 bp의 증폭 산물이 확인되었다. 두 균주로부터 증폭된 DNA 단편은 *B. licheniformis* WX-02 균주의 amine oxidase 유전자와 100% 상동성을 나타내어, 8MI05와 8MS03 균주의 *yobN* 유전자 보유가 확인되었다.

가장 높은 amine oxidase 활성을 나타낸 *B. licheniformis* 14BML13 균주가 *yobN* 유전자를 보유하지 않은 것으로 보아 *yobN* 유전자 외에도 amine oxidase 활성에 기여할 수 있는 추가적 요인이 존재할 가능성이 있어, 이에 대한 추가적 연구가 필요하다.

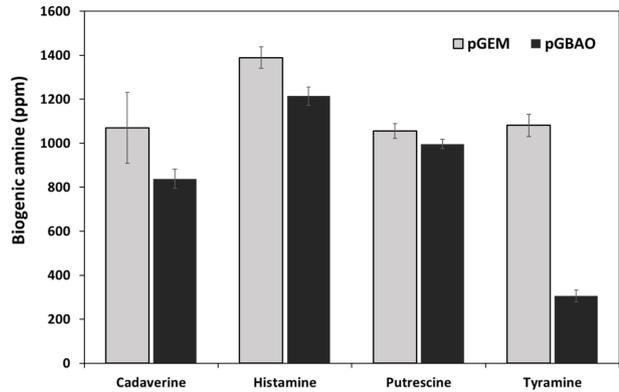
**Amine oxidase 유전자 *yobN* 보유에 의한 바이오제닉아민 저감화**

*yobN* 유전자의 보유가 확인된 8MI05와 8MS03 균주를 4종류 바이오제닉아민을 첨가한 TSB에서 배양한 다음, 바이오제닉아민의 감소를 확인하였다. 8MI05와 8MS03 균주 배양액으로부터는 음성대조군 8DJ14 균주 배양액 대비 4종류 바이오제닉아민 감소가 확인되었고, 특히 8MI05 균주의 저감화 능력이 높은 것으로 나타났다(Fig. 1). 대조군 대비 8MI05 균주는 4종류 바이오제닉아민을 평균 444 ppm 감소시켰고, 8MS03 균주는 평균 279 ppm 감소시켰다.

*yobN* 유전자의 기능성 규명을 위하여 8MI05 균주 유래의 완전한 *yobN* 유전자를 증폭하여 pGEM-T easy vector에 삽입한 재조합 플라스미드 pGBAO를 구축하고, 이 플라스미드를 보유한 재조합균주에 의한 4종류 바이오제닉아민의 감소를 확인한 결과, 대조군 대비 감소가 확인되었다. 가장 높



**Fig. 1. Biogenic amine degradation by *B. licheniformis* strains 8MI05 and 8MS03 during their cultures in TSB supplemented with four types of biogenic amines.** Oxidase activity negative strain 8DJ14 was used as the negative control.



**Fig. 2. Biogenic amine degradation by *E. coli* recombinant harboring *yobN* during its culture in LB broth supplemented with four types of biogenic amines.** The *yobN* gene from strain 8MI05 was inserted into pGEM-T easy vector, and designated as pGBAO. Recombinant containing pGEM-T easy vector (pGEM) was used as the negative control. The expression of *yobN* was induced by IPTG addition.

은 저감화가 확인된 tyramine의 경우 775 ppm의 감소가 확인되었고, 가장 낮은 저감화가 나타난 putrescine은 59 ppm의 감소가 나타났다(Fig. 2). 재조합균주의 바이오제닉아민 저감화 활성이 확인됨에 따라 *yobN* 유전자의 바이오제닉아민 분해 기능이 재확인되었다.

***Bacillus* 속 박테리아의 *yobN* 유전자 보유**

지금까지 전통 장류에서 분리된 바이오제닉아민 분해 활성 보유 *Bacillus* 속 박테리아는 *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. idriensis*로 동정되었지만, *yobN* 유전자의 보유는 *B. subtilis*와 *B. idriensis* 균주에서만 확인되었다[19]. 본 연구에서는 *B. licheniformis* 균주의 *yobN* 유전자 보유가 amine oxidase 활성과 일치하지 않으며, 균주 특이적인 특성으로 확인되었다. 따라서 GenBank에 유전체 정보가 등록된 *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. subtilis* 균주를 대상으로 *yobN* 유전자의 보유를 검토하였다.

2017년 4월 기준, 총 8균주의 완전한 유전체 정보가 GenBank에 공개된 *B. licheniformis*의 경우, 5균주가 *yobN* 유전자를 보유하고 있는 것으로 확인되었다(Table 2). 가장 많은 유전체 정보가 등록된 *B. subtilis*의 경우, 53균주의 완전한 유전체 정보 중에서 47균주의 보유가 확인되었다. 한편, 총 20균주의 완전한 유전체 정보가 공개된 *B. amyloliquefaciens*의 경우, *yobN* 유전자를 보유한 균주는 확인되지 않았으며, 30균주의 불완전 유전체 정보에서도 확인되지 않았다. 따라서 *B. licheniformis*와 *B. subtilis*의 *yobN* 유전자 보유는 균주 특이적인 특징으로 나타났고, *B. amyloliquefaciens*의 *yobN*

**Table 2. The existence of genes *yobN*, *hdc*, and *tdc* in the published *Bacillus* genomes.**

Species	Published genome		Target gene		
	Draft	Complete	<i>yobN</i>	<i>hdc</i>	<i>tdc</i>
<i>B. amyloliquefaciens</i>	30	20	0	0	0
<i>B. licheniformis</i>	40	8	5	0	0
<i>B. subtilis</i>	89	53	47	0	0

Searches for the target genes were performed against the complete genomes registered in NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) as of April 29, 2017.

유전자 비보유는 종(species) 특이적인 특징으로 추정된다.

한편, Eom *et al.* [19]은 histamine과 tyramine의 생성에 관여하는 histidine decarboxylase 유전자 *hdc*와 tyrosine decarboxylase 유전자 *tdc*를 보유한 *B. subtilis* H'J53-3 균주의 존재를 보고하였다. *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. subtilis* 균주의 완전한 유전체 정보를 대상으로 *hdc* 및 *tdc* 유전자의 보유를 검토한 결과, 이들 유전자를 보유한 균주는 존재하지 않았다(Table 2). 따라서 *B. subtilis* H'J53-3 균주는 *hdc* 및 *tdc* 유전자를 보유한 플라스미드를 가지고 있을 것으로 추정된다.

### 된장 발효용 종균으로써의 기능성

고염에서의 생장은 고염에서 발효 및 숙성이 일어나는 된장 발효용 종균이 가져야 할 필수적 조건이다. 또한 주원료 콩에 다량으로 함유된 단백질과 지질의 분해를 통하여 된장 특유의 관능적인 특성이 나타나기 때문에 단백질 및 지질 분해 활성은 종균 선발의 기준이 될 수 있다. 본 연구에서 선발한 amine oxidase 활성 보유 *B. licheniformis* 9균주와 *B. siamensis* 1균주를 대상으로 된장 발효 관련 기능성을 평가하였다(Table 1).

선발된 균주들은 모두 14% (w/v) NaCl을 첨가한 TSA에서 생육을 나타내어 평균 NaCl 농도 12%인 된장에서의 생육에는 문제가 없는 것으로 나타났다. 한편, *Bacillus* 균주들의 유기산 생성은 한천배지 상에서 거의 확인되지 않았다. 10균주 모두 NaCl이 첨가된 한천배지에서 균주 특이적인 protease와 lipase 활성을 나타냈지만, NaCl이 6% 초과하여 첨가된 경우 protease 활성을 나타내는 균주는 없었다. Lipase 활성 측정을 위한 tributyrin은 4% (w/v) 이상의 NaCl 농도에서 녹지 않아 최대 NaCl 첨가량을 결정할 수 없지만, 소금이 상당량 존재하는 상태에서 *Bacillus* 균주가 lipase 활성을 나타낼 것으로 추정된다.

본 연구에서 선발된 *B. licheniformis* 8MI05는 바이오제닉아민 저감화 활성을 보유하고 있으며, 내염성뿐만 아니라 protease 및 lipase 활성 측면에서 우수성을 나타내어, 생물

학적 위해요소에 의한 위험성을 낮추고 된장 발효에 관능적 특성을 향상시킬 수 있을 것으로 예상된다. 해당 균주의 가능성이 된장 담금을 통하여 확인된다면 우수한 발효용 종균으로써 된장 발효에 기여할 것으로 기대된다.

### 요약

메주와 된장에서 분리한 *Bacillus* 속 126균주를 대상으로 amine oxidase 활성을 나타낸 10균주를 분리하였다. 그 중, *B. licheniformis* 8MI05와 8MS03 균주는 동일한 염기서열을 가진 amine oxidase 유전자(*yobN*)를 보유하고 있었다. 공개된 *B. licheniformis* 유전체 정보를 대상으로 *yobN* 유전자의 보유를 검색한 결과, *yobN* 유전자 보유는 균주 특이적인 특성으로 확인되었다. 두 균주 모두 4종류 바이오제닉아민(cadaverine, histamine, putrescine, tyramine) 분해 활성을 나타냈고, *yobN* 유전자를 보유한 재조합균주에서도 바이오제닉아민 분해 활성이 확인되었다. Amine oxidase 유전자 보유 균주들은 14% NaCl 농도에서 생육 가능하였고, 균주 특이적인 protease 및 lipase 활성을 나타내었다.

### Acknowledgments

This research was supported by the Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF), funded by the Ministry of Education (NRF-2016R1D1A1B01011421 and NRF-2016R1D1A1B03930239). This work was also supported by the Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (IPET) through the Technology Commercialization Support Program funded by the Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA, 815003-3). The work of Hyundong Lee was supported by Kyonggi University's Graduate Research Assistantship 2016.

### References

- Silla Santos MH. 1996. Biogenic amines: their importance in foods. *Int. J. Food Microbiol.* **29**: 213-231.
- Mele T, Carman-Krzan M, Juric DM. 2010. Regulatory role of monoamine neurotransmitters in astrocytic NT-3 synthesis. *Int. J. Dev. Neurosci.* **28**: 13-19.
- Pei Y, Asif-Malik A, Canales JJ. 2016. Trace amines and the trace amine-associated receptor 1: pharmacology, neurochemistry, and clinical implications. *Front. Neurosci.* **10**: 148.
- Blackwell B. 1963. Hypertensive crisis due to monoamine-oxidase inhibitors. *Lancet* **2**: 849-850.
- Alvarez MA, Moreno-Arribas MV. 2014. The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. *Trends Food Sci. Technol.* **39**: 146-155.

6. Shalaby AR. 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Res. Int.* **29**: 675-690.
7. Suzzi G, Gardini F. 2003. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *Int. J. Food Microbiol.* **88**: 41-54.
8. Karovicova J, Karovicova Z. 2005. Biogenic amines in food. *Chem. Pap.* **59**: 70-79.
9. Nieto-Arribas P, Poveda JM, Seseña S, Palop L, Cabezas L. 2009. Technological characterization of *Lactobacillus* isolates from traditional Manchego cheese for potential use as adjunct starter cultures. *Food Control* **20**: 1092-1098.
10. Dapkevicius MLNE, Nout MJR, Rombouts FM, Houben JH, Wymenga W. 2000. Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms. *Int. J. Food Microbiol.* **57**: 107-114.
11. Zaman MZ, Bakar FA, Jinap S, Bakar J. 2011. Novel starter cultures to inhibit biogenic amines accumulation during fish sauce fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **145**: 84-91.
12. Lee HT, Kim JH, Lee SS. 2009. Analysis of microbiological contamination and biogenic amines content in traditional and commercial doenjang. *J. Food Hyg. Safety* **24**: 102-109.
13. Shukla S, Park HK, Kim JK, Kim M. 2010. Determination of biogenic amines in Korean traditional fermented soybean paste (Doenjang). *Food Chem. Toxicol.* **48**: 1191-1195.
14. Eom JS, Choi HS. 2016. Inhibition of *Bacillus cereus* growth and toxin production by *Bacillus amyloliquefaciens* RD7-7 in fermented soybean products. *J. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 44-55.
15. Lee JY, Shim JM, Lee KW, Cho KM, Kim GM, Shin JH, et al. 2016. Inhibition of *Bacillus cereus* in doenjang fermented with multiple starters showing inhibitory activity against pathogens. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **44**: 254-260.
16. Kim YS, Jeong JO, Cho SH, Jeong DY, Uhm TB. 2012. Antimicrobial and biogenic amine-degrading activity of *Bacillus licheniformis* SCK B11 isolated from traditionally fermented red pepper paste. *Korean J. Microbiol.* **48**: 160-170.
17. Kim YS, Cho SH, Jeong DY, Uhm TB. 2012. Isolation of biogenic amines-degrading strains of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* from traditionally fermented soybean products. *Korean J. Microbiol.* **48**: 220-224.
18. Lee ES, Kim YS, Ryu MS, Jeong DY, Uhm TB, Cho SH. 2014. Characterization of *Bacillus licheniformis* SCK A08 with antagonistic property against *Bacillus cereus* and degrading capacity of biogenic amines. *J. Food Hyg. Safety* **29**: 40-46.
19. Eom JS, Seo BY, Choi HS. 2015. Biogenic amine degradation by *Bacillus* species isolated from traditional fermented soybean food and detection of decarboxylase-related genes. *J. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 1519-1527.
20. Jeon HH, Jung JY, Chun BH, Kim MD, Baek SY, Moon JY, et al. 2016. Screening and characterization of potential *Bacillus* starter cultures for fermenting low-salt soybean paste (Doenjang). *J. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 666-674.
21. Lee KH, Choi HS, Hwang KA, Song J. 2016. Quality changes in doenjang upon fermentation with two different *Bacillus subtilis* strains. *J. East Asian Soc. Diet. Life* **26**: 163-170.
22. Jeong DW, Kim HR, Jung G, Han S, Kim CT, Lee JH. 2014. Bacterial community migration in the ripening of doenjang, a traditional Korean fermented soybean food. *J. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 648-660.
23. Jeong DW, Jeong M, Lee JH. 2017. Antibiotic susceptibilities and characteristics of *Bacillus licheniformis* isolates from traditional Korean fermented soybean foods. *LWT - Food Sci. Technol.* **75**: 565-568.
24. Capozzi V, Russo P, Ladero V, Fernandez M, Fiocco D, Alvarez MA, et al. 2012. Biogenic amines degradation by *Lactobacillus plantarum*: toward a potential application in wine. *Front. Microbiol.* **3**: 122.
25. Jeong DW, Lee B, Her JY, Lee KG, Lee JH. 2016. Safety and technological characterization of coagulase-negative staphylococci isolates from traditional Korean fermented soybean foods for starter development. *Int. J. Food Microbiol.* **236**: 9-16.