

렌넷 커드 내 히스타민 생성에 관한 프로바이오틱 유산균이 생산한 항균 물질의 영향

임은서^{1*} · 최재석²

¹동명대학교 식품영양학과, ²신라대학교 의생명대 바이오산업학부

Effect of antibacterial substances produced by probiotic lactic acid bacteria on histamine formation in rennet curd

Eun-Seo Lim^{1*} and Jae-Suk Choi²

¹Department of Food Science & Nutrition, Tongmyong University, Busan 48520, Republic of Korea

²Division of Bioindustry, College of Medical and Life Sciences, Silla University, Busan 46958, Republic of Korea

(Received December 4, 2017; Revised January 29, 2018; Accepted February 14, 2018)

Purpose of the present study was to investigate the factors affecting the production of antibacterial substances and histamine in rennet curd prepared by inoculation of histamine-producing lactic acid bacteria (LAB) and probiotic LAB. Probiotic *Lactobacillus sakei* PIL52 and *Lactobacillus plantarum* FIL20 produced strong antimicrobial agents against histamine-producing bacteria *Lactobacillus brevis* LAS129, *Enterococcus faecium* SBP12, and *Enterococcus faecalis* SBP58. The lactic acid and crude bacteriocin produced from the probiotic LAB inhibited histamine-producing bacteria in a concentration-dependent manner. As the number of probiotic LAB inoculated for the production of rennet curd increased, the antibacterial activity against histamine-producing bacteria was elevated due to the increased amount of lactic acid and crude bacteriocin in the sample. The growth of probiotic LAB as well as histamine-producing bacteria was inhibited by addition of 10% NaCl, thus the antibacterial substances and histamine contents in rennet curd were significantly lower than those of the control ($P < 0.05$). Meanwhile, the histamine content was not significantly increased when the rennet curd prepared by mixing probiotic LAB and histamine-producing bacteria was stored at 25°C for 5 days. However, the amount of histamine detected in the rennet curd was significantly ($P < 0.05$) increased because the antibacterial activity of the

bacteriocin produced by the probiotic LAB was decreased at 20°C for 20 days.

Keywords: antibacterial activity, crude bacteriocin, histamine, lactic acid

고등어과(Scombridae)와 꽁치과(Scomberosocidae)에 속하는 생선은 히스타민 중독의 대표적인 원인 식품이며, 생선 다음으로 숙성된 치즈 내에서도 흔히 검출된다(Taylor, 1986). 치즈 숙성과정 동안 발생하는 생화학적 변화 중 하나는 단백질이 분해되어 유리 아미노산이 축적되고 이에 따라 세균의 탈탄산 효소에 의해 히스티딘은 히스타민으로 전환된다(Arnold and Brown, 1978).

대부분의 치즈에는 히스티딘 탈탄산 반응을 유발하는 세균의 오염도가 낮기 때문에 히스타민의 농도는 100 mg/kg을 초과하는 경우는 극히 드문 것으로 알려져 있다. 하지만 카다베린이나 푸트레신과 같은 바이오제닉 아민과 혼재할 경우에는 히스타민 중독의 발병 위험은 증가하게 된다(Joosten, 1988a). 실제 생선이 아닌 치즈에 의한 히스타민 중독은 1967년 네덜란드에서 고다(Gouda) 치즈의 섭취에 의해 발생되었으며(Doeglas *et al.*, 1967), 미국에서도 치즈 100 g 당 히스타민 100 mg 이상 함유한 Swiss 치즈에 의해 식중독 사고가 발생한 적이 있다

*For correspondence. E-mail: limsm020@tu.ac.kr;
Tel.: +82-51-629-1714; Fax: +82-51-629-1709

(Sumner, 1987). 바이오제닉 아민은 약리적 활성형이지만, 섭취한다고 하더라도 일반적으로는 장내에 존재하는 아민 산화효소(amine oxidase)에 의해 무독화되기 때문에 특별한 증상은 발생되지 않는다(Askar and Treptow, 1986). 하지만 다량 섭취로 인해 인체의 아민 대사능력이 포화되었거나 특이적 저해제에 의해 산화효소의 활성을 잃게 되면 심각한 증상을 유발하게 된다(Taylor, 1986). 과량의 히스타민은 심장과 감각 및 운동 뉴런을 자극하고, 위산 분비를 촉진하여 메스꺼움과 구토를 유발하기도 하며 그 외에도 발진, 두드러기, 발한, 설사, 두통 및 심계항진 등의 다양한 증상을 동반한다(Morrow *et al.*, 1991).

식품 내 바이오제닉 아민 생성량은 유리 아미노산의 이용능, pH, 수분활성도, 용질 함량, 온도, 세균수 및 미생물간의 상승효과 등 여러 인자에 의해 결정되는데 가장 중요한 것은 lactobacilli, enterococci, micrococci 및 Enterobacteriaceae 등 히스티딘 탈탄산 효소활성을 가진 세균으로부터 기인한다(Gardini *et al.*, 2001; Suzzi and Gardini, 2003). 치즈에는 티라민, 히스타민, 푸트레신, 카다베린, 트립타민 및 2-페닐-에틸아민 등의 바이오제닉 아민이 주로 검출되며 유해 아민의 함량은 치즈 종류, 저장 온도, 숙성 시간 및 미생물 종류 등에 따라 다르다(Vale and Glória, 1997). 치즈에서 분리된 *Lactobacillus buchneri*가 중독을 유발할 수 있을 정도의 히스타민을 생성하는 것으로 밝혀져 특정 유산균이 히스타민을 생성하는 것으로 여러 연구에서 보고되고 있으며 히스티딘 탈탄산 효소 생성능은 균종 및 균주에 따라 상이한 것으로 확인된 바 있다(Sumner *et al.*, 1985). 치즈 내 히스타민 생성은 주로 중온성의 이상발효유산균인 lactobacilli에 의하며 숙성이 진행될수록 이들 균수가 점점 증가됨으로써 탈탄산 효소 활성이 높아지면서 과량의 히스타민이 축적된다(Joosten and Northolt, 1987). Swiss 치즈로부터 분리된 유산균 중 히스티딘의 탈탄산 반응을 유도하는 균종으로는 *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus arabinose*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus helveticus*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus mitis* 및 propionibacteria 등으로 밝혀졌다(Sumner, 1987).

치즈 제조 원료를 철저하게 살균하고 제조 과정 동안 히스티딘 탈탄산화를 유발하는 세균에 오염되지 않도록 위생적으로 제조함으로써 히스타민 생성균의 증식을 감소시킬 수 있고 또한 치즈 숙성 기간이 짧을수록 아민 생성량은 감소시킬 수 있으나 풍미가 저하되는 단점이 있다(Joosten and Northolt, 1987; Stratton *et al.*, 1991). 치즈 제조 시 발효 스타터로서 히스타민을 생성하지 않고 히스타민 산화효소를 생성하는 유산균을 이용하고 저장 온도를 낮추거나 식염 첨가, 가스 치환, 방

사선 및 고압 처리 등의 물리적 방법을 통해서 식품 내 히스타민 함량을 낮출 수 있는 것으로 보고되고 있다(Chong *et al.*, 2011). 한편, 2종의 박테리옌을 생산하는 enterococci과 nisin을 생산하는 *Lactococcus lactis*를 치즈 제조 스타터로 이용할 경우 히스타민 생성균인 *L. buchneri* St2A의 증식이 완전히 저해되었고 히스타민도 검출되지 않은 것으로 확인되었다. 더욱이 히스타민의 함량은 저감화를 위한 물리적 및 화학적 방법을 혼용하는 허들테크놀러지(hurdle technology)를 통해 유의하게 감소시킬 수 있는 것으로 보고되고 있다(Joosten and Nuñez, 1996).

따라서 본 연구에서는 바이오제닉 아민을 생성하지 않고 히스타민 생성균에 대해 항균 활성을 나타내는 프로바이오틱 유산균을 선발한 다음 히스타민 생성 유산균과 혼합 접종하여 렌넷 커드를 제조한 후 프로바이오틱 유산균 및 히스타민 생성균의 초기 접종량, 식염, 저장기간 및 온도가 커드 내 항균물질과 히스타민 함량에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

사용 균주 배양 조건

생선 내장으로부터 분리된 균주 중 바이오제닉 아민을 생성하지 않고 인공 소화액에 대한 강한 저항성, 장관 상피세포에 대한 높은 부착력, 항생제에 대한 강한 내성, 히스타민 분해능 및 항균물질 생성능을 나타낸 *L. plantarum* FIL20과 *Lactobacillus sakei* PIL52를 사용하였다(Lim and Lee, 2016). 한편, 묵은지로부터 분리된 유산균인 *L. fermentum* LAS105, *Leuconostoc mesenteroides* LAS112, *Lactobacillus brevis* LAS129, *Leuconostoc citreum* LAS134, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* LAS137, *Leuconostoc inhae* LAS148 및 *Weissella koreensis* LAS152와 된장에서 분리된 *Enterococcus faecium* SBP12, *Pediococcus halophilus* SBP20, *L. fermentum* SBP33, *L. mesenteroides* SBP37, *Pediococcus pentosaceus* SBP41, *L. acidophilus* SBP55 및 *Enterococcus faecalis* SBP58 등을 실험에 사용하였다(Lim, 2016a, 2016b). 모든 균주들은 Lactobacilli MRS broth (Difco)에 접종한 후 37°C에서 24시간 배양하여 얻은 배양액을 20% (v/v) 글리세롤과 혼합하여 -20°C에서 보관하였다.

유산균의 히스타민 생성능 측정

실험 균주의 히스타민 생성능은 Bover-Cid와 Holzapfel (1999)의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 즉, 실험 균주는 L-histidine

monohydrochloride monohydrate (Sigma-Aldrich, 1 g/L)과 pyridoxal 5-phosphate (Sigma-Aldrich, 1 mg/L)가 함유된 탈카르복시화 액체배지(decarboxylating broth, pH 5.3, Difco)에 접종한 다음 35°C에서 48시간 동안 5회 전배양하였다. Microtiter plate (Falcon)의 well에 실험 균주의 전 배양액(50 µl)과 히스티딘(2%, w/v)이 첨가된 decarboxylase broth (100 µl)를 접종한 후 35°C에서 72시간 동안 혐기적인 조건(Anoxomat system, MART Co.) 하에서 배양한 다음 배지의 색깔이 자색으로 변하면 양성으로 판정하였다.

프로바이오틱 유산균의 항균물질 생산량 및 항균 활성 측정

프로바이오틱 유산균이 생산한 유기산의 함량을 측정하기 위해 실험 균주는 MRS broth에 접종하고 37°C에서 24시간 배양하여 얻은 배양액은 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C)하였다. 회수한 배양 상등액에 함유된 단백질을 침전시키기 위해 HClO₄ (1 M)을 첨가한 후 0.22 µm membrane filter (Millipore Corp.)로 여과 제공하고 나서 high pressure liquid chromatography (HPLC, Shimadzu)로 유기산 함량을 측정하였다. 이때 컬럼은 Aminex HPX-87H (300 × 7.8 mm: Bio-Rad), 이동상은 5 mM H₂SO₄, 검출기는 refractive index (GBC Scientific Equipement Pty Ltd.)를 사용하였고, 유속 0.5 ml/min, 파장 220 nm 하에서 표준용액의 검량곡선으로부터 유기산의 함량을 정량하였다 (Sgouras *et al.*, 2004). 프로바이오틱 유산균으로부터 얻어진 배양 상등액의 항균 활성을 측정하기 위해 BHI broth 하에서 37°C, 24시간 배양한 히스타민 생성균의 배양액으로부터 초기 균수를 1.0×10^5 CFU/ml로 조정한 다음 BHI broth에 접종하고 배양 상등액을 5% 및 10% 첨가한 후에 37°C에서 24시간 배양하고 표준한천평판배양법으로 잔존하는 균수를 조사하였다.

프로바이오틱 유산균의 조박테리오신 용액은 microtiter plate method로 히스타민 생성균에 대한 항균 활성과 아민 생성량에 미치는 영향을 측정하였다(Lim and Lee, 2016). 즉, MRS broth 상에서 37°C, 24시간 배양하여 상등액을 모은 다음 pH 6.5에 맞추고 카탈라아제(Sigma-Aldrich, 1 mg/ml)를 처리하고 60% (w/v) 황산암모늄을 가하여 단백질을 침전시켰다. 원심분리(12,000 × g, 30분, 4°C)하여 모은 침전물은 20 mM phosphate buffer saline (PBS, pH 6.5)에 현탁시키고 난 다음 투석(molecular weight cut-off 1,000 Da)시켜 조박테리오신 용액을 조제하였다. 히스타민 생성균은 Brain Heart Infusion (BHI) broth (Difco)에 접종하여 37°C에서 24시간 동안 배양한 후 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C)하여 세포를 모은 다음 PBS (pH 7.0)로 2회 세척하였다. 48 well plate (Falcon)에 히스타민 생

성균의 균수를 1.0×10^5 CFU/ml가 되도록 멸균된 BHI broth에 현탁시킨 용액(900 µl)을 가한 다음 이진희석법으로 농도를 조정한 조박테리오신 용액(100 µl)을 첨가하였고 대조구는 조박테리오신 용액 대신 PBS (pH 7.0)를 첨가하였다. 37°C에서 24시간 배양한 후 microplate reader (BioTek, Inc.)로 600 nm에서 흡광도를 측정한 다음 항균 활성(arbitrary units, AU)은 대조구 혼탁도의 50%를 저해하는 최대 희석배수의 역수로 나타내었다.

한편, 프로바이오틱 유산균이 생산한 항균물질이 히스타민 생성량에 미치는 영향을 조사하였다. 즉, 0.0005% pyridoxal-HCl (Sigma-Aldrich)와 0.5% L-histidine hydrochloride monohydrate를 첨가한 TSB (h-TSB)에 히스타민 생성균을 접종 및 35°C에서 24시간 배양하여 얻은 배양액(1 ml)을 조박테리오신 용액(100, 200 AU/ml) 혹은 배양 상등액(100, 200 µl/ml)를 첨가한 h-TSB에 접종하여 35°C에서 24시간 배양하였다. 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C)하여 얻은 상등액은 0.22 µm membrane filter로 여과한 후 Eerola 등(1993)과 Mah 등(2003)의 방법을 일부 변형하여 HPLC로 히스타민 함량을 측정하였다. 즉, 시료 용액 1 ml에 2 N sodium hydroxide 200 µl와 sodium bicarbonate 포화 용액 300 µl을 가한 후 acetone에 용해시켜 제조한 dansyl chloride (Sigma-Aldrich, 10 mg/ml) 2 ml를 첨가하여 40°C에서 45분간 배양하고 난 다음 25% ammonium hydroxide 100 µl를 가하여 dansyl chloride를 제거하였다. 상온에서 약 30분간 방치한 다음 acetonitrile을 가하여 총량을 5 ml로 맞추고 나서 원심분리(2,500 × g, 5분)하여 상등액을 모아 0.22 µm membrane filter로 여과 제공하고 나서 dansyl 유도체를 제조하였다. 시료 내 히스타민 함량은 Nova-Pak C₁₈ 컬럼(150 × 3.9 mm, Waters, Milford), ammonium acetate (0.1 M, solvent A)와 acetonitrile (solvent B)의 이동상을 사용하였고, 1 ml/min의 유속으로 시료 20 µl를 주입하여 254 nm에서 흡광도를 측정하여 표준용액의 검량곡선으로부터 히스타민 함량을 구하였다.

렌넷 커드 제조

히스타민 생성균과 프로바이오틱 유산균은 MRS broth에 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 다음 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C)하여 얻은 세포 침전물은 PBS (pH 7.0)로 2회 세척하였다. 한편, 지방 3.4%가 함유된 시판 우유에 0.02% CaCl₂와 1.0% NaCl를 첨가한 후 85°C에서 20분간 가열한 다음 40°C로 냉각시켰다. 여기에 히스타민 생성균 현탁액(5%, v/v, 1.0×10^5 CFU/ml)과 프로바이오틱 유산균 현탁액(5%, v/v, 1.0×10^5 CFU/ml)을 각각 접종하였다. 그런 다음 0.02% 렌넷을 첨가하여 35°C에서 24시간 배양한 후 생성된 커드는 일정

한 크기($2 \times 2 \text{ cm}^3$)로 자르고 40°C 정도에서 가끔 저어주면서 약 1시간 방치하여 유청을 배출한 후 멸균된 치즈틀에 담아 압착하고 15°C 에서 24시간 숙성시켰다.

렌넷 커드 내 항균물질과 히스타민 생성량 측정

렌넷 커드 내에 유산균이 생성한 유기산의 함량은 Ong 등(2006)에 따라 측정하였다. 채취한 시료(5 g)는 0.009 N 황산(25 ml)과 15.5 N 질산(70 μl)을 혼합한 다음 약 2분간 균질화(10,000 rpm) 하였다. 그런 다음 항온수조(50°C) 내에서 약 1시간 방치한 후 원심분리(4,000 \times g, 20분, 4°C) 해서 지방층인 상등액과 카제인을 함유한 침전물의 중간층을 회수하고 여과제균한 다음 앞서 언급한 방법에 따라 HPLC로 분석하였다. 반면 조박테리오신 용액의 항균 활성은 Coelho 등(2014)의 방법에 따라 시료(5 g)를 채취한 후 원심분리(4,500 \times g, 10분, 4°C)하여 상등액을 모아 PBS (0.5 M, pH 7.0)로 중화시킨 다음 여과제균 후 앞서 언급한 microtiter plate method에 따라 렌넷 커드 제조 시 이용된 히스타민 생성균에 대한 항균활성을 측정하였다.

한편, Innocente 등(2007)의 방법에 따라 히스타민(Sigma-Aldrich, 50 mg)에 1,7-diaminoheptane (50 mg)을 첨가하고 정제수(purified water, 10 ml)를 가하여 표준용액을 제조하였다. 유도체화를 위해 dansyl chloride 용액(5 mg/ml) 1 ml를 취하여 동량의 히스타민 표준 용액에 가한 후 간혹 교반하면서 상온의 암실에서 약 15분간 방치하였다. 그런 다음 L-proline 용액(100 mg/ml) 200 μl 를 가한 후 1분간 진탕 혼합하고 나서 상온의 암실에서 15분간 방치한 다음 diethyl ether (1 ml)로 2회 추출하고 나서 질소 가스로 건조시키고 잔류물은 HPLC에 주입할 acetonitrile에 용해시켰다. 한편, 시료(10 g)에 1,7-diaminoheptane 이 첨가된 0.1 M hydrochloric acid (20 ml)을 첨가한 후 약 2분간 warning blender로 혼합한 다음 원심분리(12,000 \times g, 20분, 4°C)해서 상등액만을 회수하였다. 침전물은 동일한 과정을 반복하여 재 추출하였고 얻어진 상등액은 0.1 M HCl을 첨가하여 50 ml로 정용(mess up)하였다. 유도체화를 위해 추출물(1 ml)에 포화 NaHCO_3 (0.5 ml)와 dansyl chloride (10 mg/ml, 1 ml)를 가하고 반응물은 40°C 에서 60분간 방치한 후 표준용액과 동일한 조건으로 처리한 다음 앞서 언급한 HPLC로 분석하였다.

렌넷 커드 내 항균물질과 히스타민 생성에 영향을 미치는 인자

렌넷 커드 내 유산균의 항균물질과 히스타민 생성량에 대한 초기 접종량, 식염, 저장온도 및 시간의 영향을 조사하였다.

앞서 언급한 방법에 따라 원료에 히스타민 생성균과 프로바이오틱 유산균의 균수를 각각 1.0×10^3 , 10^4 및 10^6 CFU/ml로 조정하여 접종한 다음 제조한 후 접종 균수에 대한 영향을 살펴 보았다. 렌넷 커드 제조 원료에 식염 2.5, 5.0 및 10.0% 농도로 첨가한 다음 히스타민 생성균과 프로바이오틱 유산균 현탁액(1.0×10^5 CFU/ml, 5%, v/v)을 각각 접종하여 제조한 후 식염에 대한 영향을 조사하였다. 한편, 렌넷 커드 제조 원료에 히스타민 생성균과 프로바이오틱 유산균 현탁액(1.0×10^5 CFU/ml, 5%, v/v)을 각각 접종하여 제조한 다음 4, 15 및 25°C 에서 5일간 저장 후 온도에 의한 영향을 살펴 보았고, 제조 원료에 히스타민 생성균과 프로바이오틱 유산균 현탁액(1.0×10^5 CFU/ml, 5%, v/v)을 각각 접종하여 제조한 다음 20°C 에서 5, 10 및 20일간 저장하였다. 앞서 언급한 방법으로 제조한 렌넷 커드를 대조구로 하여 각각의 조건별로 제조한 시료 내에 함유된 조박테리오신 용액의 항균활성과 유기산 및 히스타민 함량의 변화를 측정하였다.

통계처리

실험 항목별로 각각 3회씩 실험하였고 결과값은 평균 \pm 표준편차로 나타내었다. SPSS 프로그램(Ver. 12.0)의 Student's *t*-test를 통해 실험구와 대조구간에 유의적인 차이($P < 0.05$)를 확인하였다.

결과 및 고찰

유산균의 히스타민 생성능

묵은지와 된장에서 분리된 유산균의 히스타민 생성능을 조사한 결과는 Table 1과 같다. 묵은지로부터 분리된 *L. fermentum* LAS105, *L. mesenteroides* LAS112, *L. citreum* LAS134, *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* LAS137, *L. inhae* LAS148, *W. koreensis* LAS15와 된장에서 분리된 *P. halophilus* SBP20, *L. fermentum* SBP33, *L. mesenteroides* SBP37, *P. pentosaceus* SBP41 및 *L. acidophilus* SBP55는 히스타민을 생성하지 않았다. 하지만 묵은지로부터 분리된 *L. brevis* LAS129와 된장에서 분리된 *E. faecium* SBP12 및 *E. faecalis* SBP58은 h-TSB 상에서 히스타민을 생성하였다. 게다가 이전 연구(Lim and Lee, 2016)에서 프로바이오틱 활성을 나타낸 *L. plantarum* FIL20과 *L. sakei* PIL52 유산균은 히스타민을 생성하지 않았다(결과 미제시).

그람 양성 및 음성 세균 및 곰팡이, 효모 등 다양한 미생물들

Table 1. Histamine production ability of the tested LAB

LAB	Origin	Histamine	LAB	Origin	Histamine
<i>L. fermentum</i> LAS105		-	<i>E. faecium</i> SBP12		+
<i>L. mesenteroides</i> LAS112		-	<i>P. halophilus</i> SBP20		-
<i>L. brevis</i> LAS129		+	<i>L. fermentum</i> SBP33		-
<i>L. citreum</i> LAS134	Korean ripened kimchi	-	<i>L. mesenteroides</i> SBP37	Soybean paste	-
<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> LAS 137		-	<i>P. pentosaceus</i> SBP41		-
<i>L. inhae</i> LAS148		-	<i>L. acidophilus</i> SBP55		-
<i>W. koreensis</i> LAS152		-	<i>E. faecalis</i> SBP58		+

이 치즈를 비롯한 많은 발효식품 내에 바이오제닉 아민을 생성하는 것으로 보고되고 있으며, 특히 *Hafnia alvei*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Serratia* sp., *Debaryomyces hanseii*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia jadinii*, *Geotrichum candidum* 등이 주요 히스타민 생성균으로 알려져 있다. 이 뿐만 아니라 발효식품 스타터로 사용되는 여러 유산균들도 유해 아민을 생성하므로 이들 발효식품으로 인한 바이오제닉 아민 중독의 발생 위험이 상당히 높고, 주로 *E. faecium*, *S. mitis*, *L. bulgaricus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. acidophilus* 및 *L. arabinose* 등이 히스티딘 탈탄산 효소를 생성하는 것으로 보고되고 있다(Sumner, 1987). 간장이나 미소(miso) 등과 같은 발효 콩들도 히스티딘 탈탄산 효소의 기질로서 작용하는 단백질을 다량 함유하고 있으므로 히스타민 생성 가능성이 높으며(Stratton et al., 1991), 된장에서 분리된 *L. brevis* GABA 100은 히스타민을 비롯하여 티라민, 푸트레신 및 카다베린을 생성하였고(Kim and Ji, 2015), 발효 된장 내에서 바이오제닉 아민을 생성하는 세균으로 *Bacillus* sp., *Citrobacter* sp., *Clostridium* sp., *Klebsiella* sp., *Escherichia* sp., *Proteus* sp., *Pseudomonas* sp., *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Photobacterium* sp. 등을 비롯하여 *Lactobacillus* sp., *Pediococcus* sp., 및 *Streptococcus* sp. 등의 유산균들도 탈탄산 효소 활성이 강한 것으로 보고된 바 있다(Moon et al., 2010). 한편, 유산균이 우점종인 김치 시료로부터 분리된 *L. brevis*, *Lactobacillus curvatus*, *L. mesenteroides* 등도 티라민을 생성하는 것으로 알려졌다(Kim and Kim, 2014).

히스타민은 히스티딘의 탈탄산 효소를 생산하는 미생물에 의해 생성되는데 특히 우유 단백질에 히스티딘이 많이 함유되어 있어서 효소적 탈탄산 반응을 통해 히스타민이 생성되므로 발효 유제품 내에서 다량 검출된다. Taylor 등(1978)은 히스티딘 탈탄산 효소를 생산하는 112종의 미생물을 분리 동정한 결과 Enterobacteriaceae, *Clostridium* sp., *Lactobacillus* sp. 로 확인되었다고 보고하였다. 치즈 내에서는 *Enterococcus* sp., *Lactobacillus* sp., *Leuconostoc* sp., *Streptococcus* sp. 등의 유산

균들이 주요 생성균으로 확인된 바 있다(Linares et al., 2011). Sumner (1987)는 Swiss 치즈 내에서 히스타민을 생성하는 균으로 *L. fermentum*, *L. helveticus*, *S. faecium* 및 *Streptococcus lactis* 등으로 동정되었다고 보고한 바 있으나, 이들과 달리 본 연구에서 *L. fermentum* LAS105와 *L. fermentum* SBP33은 히스타민을 생성하지 않았다. 한편, Joosten과 Nuñez (1996)도 실험 균주 중에서 히스타민과 티라민을 생성하는 lactobacilli를 동정한 결과 *L. buchneri*와 *L. brevis*라고 보고한 바 있는데 본 연구에서도 *L. brevis* LAS129가 양성 반응을 나타내어 유사한 결과를 얻었다. 따라서 발효식품 내에 상재하는 다양한 유산균들의 아미노산 탈탄산 효소에 의해 바이오제닉 아민이 생성되며, 유해 아민의 생성능은 균주에 따라 상이한 것으로 나타났다.

프로바이오틱 유산균의 유기산 생성량 및 항균 활성

프로바이오틱 유산균의 배양 상등액 내에 함유된 유기산에 의한 히스타민 생성균의 균수와 히스타민 생성량에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 프로바이오틱 유산균을 MRS broth에 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후 얻은 배양 상등액 내에 생성된 유기산의 함량을 조사한 결과 *L. plantarum* FIL20은 107.3 ± 2.7 mM, *L. sakei* PIL52는 134.5 ± 3.3 mM의 유기산을 생성한 반면 이들 균주 모두 초산은 생성하지 않았다. 대조구의 경우 BHI broth 하에서 37°C, 24시간 배양한 후 생균수는 3균주 모두 10⁹ CFU/ml에 이르렀으나, 히스타민 생성량은 균주별로 유의한 차이가 있었는데 *E. faecium* SBP58이 1,816.9 ± 36.3 mg/L으로 가장 많았으며, 그 다음으로는 *L. brevis* LAB129 (1,437.5 ± 17.6 mg/L), *E. faecium* SBP12 (986.4 ± 24.9 mg/L) 순이었다. 한편, *L. plantarum* FIL24의 배양 상등액 100 µl/ml을 첨가한 경우 히스타민 생성 유산균의 균수는 대조구에 비해 약 0.5~0.7 log cycle 감소되었으며, 히스타민 생성량도 유의하게 감소되었고 배양 상등액의 첨가 농도에 의존적으로 균수와 히스타민 생성량이 감소되었다. 또한 *L.*

Table 2. Antibacterial activity of the cell-free culture supernatant produced by probiotic lactic acid bacteria against histamine-producing bacteria

LAB	Lactic acid (mM)	CFCS (μl/ml)	<i>L. brevis</i> LAS129		<i>E. faecium</i> SBP12		<i>E. faecalis</i> SBP58	
			Viable cell counts (CFU/ml)	Histamine content (mg/L)	Viable cell counts (CFU/ml)	Histamine content (mg/L)	Viable cell counts (CFU/ml)	Histamine content (mg/L)
Control			3.3 ± 0.5 × 10 ⁹	1437.5 ± 17.6	2.7 ± 0.9 × 10 ⁹	986.4 ± 24.9	5.7 ± 2.6 × 10 ⁹	1816.9 ± 36.3
<i>L. plantarum</i> FIL20	107.3 ± 2.7	100	8.4 ± 1.6 × 10 ^{8*}	1172.8 ± 20.6*	6.3 ± 0.9 × 10 ^{8*}	725.8 ± 11.7*	8.2 ± 2.4 × 10 ^{8*}	1432.7 ± 40.5*
		200	6.3 ± 2.0 × 10 ^{7*}	905.8 ± 33.6*	3.6 ± 0.7 × 10 ^{7*}	527.5 ± 20.7*	4.7 ± 3.1 × 10 ^{7*}	1118.4 ± 10.3*
<i>L. sakei</i> PIL52	134.5 ± 3.3	100	4.2 ± 0.8 × 10 ^{7*}	1099.8 ± 8.8*	2.1 ± 3.6 × 10 ^{7*}	613.4 ± 15.2*	1.9 ± 0.9 × 10 ^{7*}	1375.7 ± 36.9*
		200	7.3 ± 3.0 × 10 ^{6*}	812.6 ± 14.8*	0.4 ± 2.3 × 10 ^{6*}	413.9 ± 22.7*	6.6 ± 2.7 × 10 ^{5*}	991.3 ± 19.4*

Data are means ± standard deviation (SD) from triplicate determinations.

*Significantly differ ($P < 0.05$) from the control group by Student's *t*-test.

CFCS, cell-free culture supernatant.

sakei PIL52로부터 얻은 배양 상등액을 100 μl/ml 처리한 경우는 히스타민 생성 유산균의 균수 및 히스타민 생성량 감소 효과가 *L. plantarum* FIL20에 비해 더 높게 나타났으며, 200 μl/ml를 첨가했을 때는 100 μl/ml 처리한 경우보다 유의하게 낮은 균수와 히스타민의 양이 검출되었다. 이상의 결과에서 볼 때 프로바이오틱 유산균이 생산한 유기산은 히스타민 생성균에 대해 효과적인 항균 활성을 나타내어 균수 감소와 이들의 유해 아민 생성능도 억제하는 것으로 확인되었으며, 특히 *L. sakei* PIL52가 *L. plantarum* FIL24보다 유산의 생성량이 많았으므로 이에 따라 항균 활성도 더 높게 나타난 것으로 추정된다.

발효 식품 내 바이오제닉 아민은 열에 안정하고 관능검사 훈련을 받은 패널조차도 감지하기 어렵기 때문에 아민 생성균의 증식을 억제할 수 있는 항균 활성 검색에 관해 활발하게 연구되고 있다. 식품 내에 생성된 히스타민은 냉동, 가열, 레토르트 처리 및 혼연을 통해서도 파괴되지 않으나(Tapingkae *et al.*, 2010), 감마선 조사, 염장, 진공포장, 고압처리나 히스타민을 분해하는 산화효소 생성능이 있는 미생물을 이용하여 효과적으로 감소시킬 수 있다고 보고되고 있다(Dapkevicius *et al.*, 2000). Herrero-Fresno 등(2012)은 157종의 분리 균주로 치즈 내에 존재하는 히스타민과 티라민의 분해능을 나타낸 유산균을 동정한 결과 *L. casei*로 확인되어 치즈의 숙성 과정 동안 유해 아민의 축적을 막기 위해 유산균을 보조제로 이용하는 것이 효과적이라고 하였다. Min 등(2007b)은 바이오제닉 아민을 생성하는 *Bacillus cereus*, *Enterobacter cloacae* 및 *Alcaligenes faecalis*를 같은 닭 가슴살에 접종한 후 0.2 M 사과산 혹은 유산을 고기 10 g 당 1 ml를 처리한 결과 아민 생성균을 약 1 log cycle 감소시켰으며, 특히 *E. cloacae*는 3 log cycle 감소되었고, 이들이 생성한 유해 아민의 함량도 유의하게 감소되었다고 하였다. 같은 쇠고기에 인위적으로 접종한 바이오제닉 아민 생성균인

A. faecalis, *B. cereus* 및 *E. cloacae*의 균수는 구연산(2 M) 처리에 의해 약 1 log cycle 감소되었고, 같은 돼지고기 내에서는 약 2 log cycle 감소되었다. 게다가 이들 바이오제닉 아민 생성균을 접종한 쇠고기에 유산을 처리한 결과 티라민을 비롯한 푸트레신 등 총 바이오제닉 아민 생성량이 유의하게 감소되었다(Min *et al.*, 2007a). Ozogul 등(2015)에 따르면, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Streptococcus thermophilus*로부터 얻은 배양 상등액은 *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* 및 *E. coli*의 푸트레신 생성량을 65% 이상 감소시켜 일부 유산균은 병원성균이 생성한 바이오제닉 아민을 효과적으로 억제했다고 보고하였는데 이들은 본 연구 결과와 유사하였으며 일부 유산균이 생산한 유기산은 바이오제닉 아민 생성 억제 효과가 있는 것으로 나타났다.

하지만 이와는 달리 pH는 미생물의 아미노산 탈탄산 효소의 활성에 영향을 미치는 중요한 인자로서 산성 영역에서 효소의 활성이 더 높아져 최적의 pH는 4.0~5.5로 나타났으므로 유기산의 첨가에 의해 식품의 pH를 낮추면 미생물의 균수는 감소되었으나 바이오제닉 아민의 생성량에는 별 다른 영향을 주지 못한 것으로 보고된 바 있어(Teodorovic *et al.*, 1994) 본 연구와는 다른 결과를 제시하였다. 따라서 유산균의 균수에 따라 배양 상등액 내에 생성된 유기산의 함량은 상이하고 바이오제닉 아민 생성균의 아민 생성 양에도 큰 차이가 있으므로, 이에 따라 바이오제닉 아민 생성균의 균수와 아민 생성량에 대한 유기산의 항균 활성에는 차이가 있다. 본 연구에서는 유산균의 배양 상등액에 함유된 유산에 의해 바이오제닉 아민 생성균의 균수가 감소되었고 그 결과 검출된 히스타민의 양도 감소된 것으로 추정하였다.

프로바이오틱 유산균이 생산한 조박테리오신 용액의 항균 활성

프로바이오틱 유산균이 생산한 조박테리오신 용액에 의한 히스타민 생성 유산균의 균수와 히스타민 생성량에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 2와 같다. *L. plantarum* FIL20의 조박테리오신 용액은 *L. brevis* LAS129 (128 AU/ml)와 *E. faecalis* SBP58 (256 AU/ml)에 대해 항균 활성을 나타낸 반면 *L. sakei* PIL52가 생산한 조박테리오신 용액은 이들 히스타민 생성 유산균에 대해 항균 활성을 나타내지 않았다. 하지만 *E. faecium* SBP12 (512 AU/ml)의 증식은 *L. sakei* PIL52가 생산한 조박테리오신 용액에 의해 억제되었으나, *L. plantarum* FIL20의 조박테리오신 용액은 이 균의 증식에 영향을 미치지 않았다. 한편, 히스타민 생성균을 BHI broth 하에서 37°C, 24시간 배양한 동안 조박테리오신 용액을 처리했을 때 생균수와 히스타민 생성량을 조사한 결과, *L. plantarum* FIL20의 조박테리오신 용액 100 AU/ml을 처리한 경우 *L. brevis* LAS129의 균수는 대조구에 비해 약 2 log cycle 감소되었고, 히스타민 생성량은 약 300 mg/L 감소되었으며, 조박테리오신 용액 200 AU/ml 처리 시에는 이보다 더 유의하게 감소되었다. 게다가 *L. plantarum* FIL20의 조박테리오신 용액은 *L. brevis* LAS129보다 *E. faecalis* SBP58의 균수와 히스타민 생성량에 대해 더 높은 감소 효과를 나타내었다. *L. sakei* PIL52가 생산한 조박테리오신 용액(100 AU/ml)은 대조구에 비해 *E. faecium* SBP12의 균수는 약 4 log cycle 이상, 히스타민 생성량은 약 640 mg/L 이상 감소시켰고 조박테리오신 용액의 첨가 농도가 높을수록 항균 효과는 유의하게 높았다. 한편, 히스타민 생성균인 *L. brevis* LAB129는 *L. plantarum* FIL20 (64 AU/ml)에 대해 박테리오신을 생산한 반

면, *E. faecium* SBP12와 *L. fermentum* SBP33은 *L. plantarum* FIL20과 *L. sakei* PIL52에 대해 증식을 억제하는 박테리오신을 생산하지 않았다(결과 미제시). 이상의 결과, 특정 유산균이 생산한 조박테리오신 용액의 항균 스펙트럼과 활성은 균주에 따라 다양하며 이들 항균물질은 농도의존적으로 히스타민 생성균의 균수 및 아민 생성량을 효과적으로 감소시켰다.

유산균은 오래 전부터 발효 식품 제조용 스타터로 이용되어 오고 있으며 증식 과정 중 항균물질을 생산함으로써 유해균의 증식을 억제하여 품질을 개선시키므로 다양한 가공식품에 활용되고 있는 안전한 생물학적 보존제로 이미 널리 알려져 있다. 특히 Swiss 치즈 제조에 이용된 박테리오신을 생산하는 유산균은 clostridia의 가스 생성을 지연시켰고, 특히 nisin을 생산하는 lactococci는 clostridia에 의한 치즈의 부패를 억제하는데 효과적이라고 보고된 바 있다(Hirsch *et al.*, 1951). Roberts 등(1992)에 의하면 유당을 이용하고 nisin과 단백질 분해력이 있는 *L. lactis*와 *L. lactis* subsp. *cremoris* JS102를 혼합 스타터로 이용한 경우 Cheddar 치즈 제조에 적합한 정도의 산을 생산하였다고 보고하였고 Zotolla 등(1994)은 이들 nisin을 생산하는 *Lactococcus* sp. 스타터로 Cheddar 치즈를 제조한 결과 *L. monocytogenes*, *C. sporogenes* 및 *S. aureus*와 같은 식중독균의 증식을 억제하는데 효과적이었다고 보고하였다. Nisin Z와 lacticin 481을 생산하는 *L. lactis* subsp. *lactis* VR84와 EG46은 바이오제닉 아민 생성균인 *E. faecalis* EF37의 증식과 티라민 생성을 억제하는데 효과적이었으며, 게다가 *L. lactis* subsp. *lactis* VR84는 *S. thermophilus* PRI60의 사멸을 유도하였고, EG46은 PRI60의 히스타민 축적량을 감소시켰으므로 치즈를 비롯한 각종 발효식품 내에 대량 생산되는 유

Table 3. Antibacterial activity of the bacteriocin produced by probiotic lactic acid bacteria against histamine-producing bacteria

LAB	Bacteriocin solution (AU/ml)	<i>L. brevis</i> LAS129		<i>E. faecium</i> SBP12		<i>E. faecalis</i> SBP58	
		Viable cell counts (CFU/ml)	Histamine content (mg/L)	Viable cell counts (CFU/ml)	Histamine content (mg/L)	Viable cell counts (CFU/ml)	Histamine content (mg/L)
<i>L. plantarum</i> FIL20	Activity		128		ND		256
<i>L. sakei</i> PIL52			ND		512		ND
Control		3.3 ± 0.5 × 10 ⁹	1437.5 ± 17.6	2.7 ± 0.9 × 10 ⁹	986.4 ± 24.9	5.7 ± 2.6 × 10 ⁹	1816.9 ± 36.3
<i>L. plantarum</i> FIL20	100	4.9 ± 2.8 × 10 ⁷ *	1105.4 ± 23.6*	NT	NT	7.5 ± 1.0 × 10 ⁶ *	1482.5 ± 30.8*
	200	2.2 ± 3.1 × 10 ⁶ *	903.5 ± 16.9*	NT	NT	5.5 ± 2.6 × 10 ⁷ *	1209.7 ± 22.7*
<i>L. sakei</i> PIL52	100	NT	NT	9.8 ± 0.9 × 10 ⁴ *	348.7 ± 28.1*	NT	NT
	200	NT	NT	1.1 ± 2.4 × 10 ⁴ *	112.1 ± 34.7*	NT	NT

ND, not detected.

NT, not tested.

Data are means ± standard deviation (SD) from triplicate determinations.

*Significantly differ (*P* < 0.05) from the control group by Student's *t*-test.

해 아민의 생성량을 감소시키기 위해서 유산균의 박테리오신이 효과적이라고 보고된 바 있다(Tabanelli *et al.*, 2014).

한편, lacticin 3147 박테리오신을 생산하는 유산균은 Cheddar 치즈 제조에 이용한 경우 내 지방 함량을 감소시켜 품질 개선 효과도 나타내었으며(Fenelon *et al.*, 1998), 박테리오신 생성 균인 *E. faecalis* INIA4 를 Hispanico 치즈 제조에 이용한 경우 대조구에 비해 단백질 가수분해능 및 유리 아미노산의 양이 유의하게 높았으나 소수성 펩타이드는 감소된 반면 3-methyl-1-butanol, diacetyl 및 acetoin 함량은 증가되어 치즈의 풍미가 한층 더 향상되었다고 알려진 바 있다(Oumer *et al.*, 2001). 게다가 히스타민과 티라민을 생성하는 *L. buchneri*와 *L. brevis*은 pediocin PA-1, bavaricin A 및 lactococcin A의 처리에 의해선 영향을 받지 않았으나, eneterococcal 박테리오신과 nisine에 의해선 효과적으로 증식이 억제되었다고 보고된 바 있었는데 (Joosten and Nuñez, 1996) 본 연구에서도 *L. plantarum* FIL20 과 *L. sakei* PIL52가 생산한 박테리오신은 특정 히스타민 생성 균의 균수를 유의하게 감소시킴으로써 그에 따라 히스타민의 함량 감소에도 효과적인 영향을 미친 것으로 사료된다.

렌넷 커드 내 히스타민 및 항균물질 함량에 영향을 미치는 인자

히스타민 생성균과 프로바이오틱 유산균을 혼합하여 렌넷 커드를 제조한 후 커드 내에 생성된 항균물질과 히스타민의 함량에 영향을 미치는 인자에 대해 조사한 결과는 Table 4와 같다. *E. faecalis* SBP58 단독으로 제조했을 때 커드 내 히스타민의 함량은 $1,548.3 \pm 25.8$ mg/L, *E. faecium* SBP12 단독으로 제조한 경우에는 866.9 ± 34.1 mg/L로 측정되었는데(결과 미 제시), 이들의 함량은 BHI broth 상에서 생성된 양보다 다소 낮게 나타났다. 대조구로 *L. plantarum* FIL20 (1.0×10^5 CFU/ml) 과 *E. faecalis* SBP58 (1.0×10^5 CFU/ml)을 혼합했을 때 렌넷 커드 내에 유산의 함량은 124.2 ± 7.9 mM, *E. faecalis* SBP58에 대한 조박테리오신 용액의 항균 활성은 32 AU/ml이었고, 히스타민의 생성량은 $1,077.5 \pm 30.0$ mg/L로 나타났는데 이는 MRS broth 상에서 얻어진 조박테리오신 용액의 활성보다는 훨씬 낮은 수준이었으나 유산의 함량은 유산균의 혼합 작용에 의해 오히려 증가되었다. *L. sakei* PIL52와 *E. faecium* SBP12 를 혼합하여 제조한 렌넷 커드에서도 배양용 배지 상에서보다 조박테리오신 용액의 항균활성과 히스타민의 생성량이 낮게

Table 4. Factors affecting the production of antibacterial substances and histamine in the fresh cheese prepared by mixing probiotic lactic acid bacteria and histamine-producing bacteria

Incubation condition	<i>L. plantarum</i> FIL20 + <i>E. faecalis</i> SBP58			<i>L. sakei</i> PIL52 + <i>E. faecium</i> SBP12		
	Lactic acid (mM)	Bacteriocin (AU/ml)	Histamine (mg/L)	Lactic acid (mM)	Bacteriocin (AU/ml)	Histamine (mg/L)
Control	124.2 ± 7.9	32	1077.5 ± 30.0	151.5 ± 11.2	128	516.5 ± 13.6
Inoculated cells of LAB (CFU/ml)	10^3	$89.7 \pm 8.2^*$	8	$1508.1 \pm 40.3^*$	$104.5 \pm 9.7^*$	$823.4 \pm 20.1^*$
	10^4	102.8 ± 12.5	8	$1200.5 \pm 22.1^*$	$127.8 \pm 4.5^*$	$761.2 \pm 16.8^*$
	10^6	131.5 ± 6.8	64	$820.7 \pm 18.1^*$	165.7 ± 12.0	$472.3 \pm 22.9^*$
Inoculated cells of HPB (CFU/ml)	10^3	$94.4 \pm 9.6^*$	32	$612.8 \pm 15.4^*$	$91.4 \pm 14.4^*$	$411.8 \pm 8.9^*$
	10^4	110.6 ± 13.2	32	$861.9 \pm 18.7^*$	146.7 ± 8.0	499.3 ± 27.1
	10^6	$148.0 \pm 10.7^*$	32	$1205.8 \pm 33.5^*$	159.5 ± 23.5	$700.3 \pm 26.0^*$
NaCl (%)	2.5	115.3 ± 20.5	32	1000.2 ± 24.8	134.7 ± 8.1	539.7 ± 14.4
	5.0	$88.7 \pm 9.4^*$	ND	$805.9 \pm 32.5^*$	$91.5 \pm 9.0^*$	486.5 ± 33.1
	10.0	$47.5 \pm 13.1^*$	ND	$199.4 \pm 30.4^*$	$60.5 \pm 5.7^*$	$236.9 \pm 41.5^*$
Storage temperature (°C)	4	111.7 ± 17.7	32	1067.2 ± 11.5	138.7 ± 6.3	472.3 ± 45.8
	15	133.2 ± 22.5	32	1091.4 ± 26.1	149.7 ± 15.7	530.9 ± 24.0
	25	$149.5 \pm 9.6^*$	32	1026.8 ± 12.6	150.9 ± 11.1	498.7 ± 15.5
Storage period (days)	5	131.6 ± 11.5	32	996.3 ± 30.1	137.5 ± 7.9	540.6 ± 22.9
	10	138.7 ± 20.1	32	1099.2 ± 18.2	146.6 ± 8.2	$563.8 \pm 11.2^*$
	20	$152.8 \pm 4.2^*$	16	$1315.0 \pm 9.9^*$	161.7 ± 20.7	$735.5 \pm 20.7^*$

LAB, lactic acid bacteria.

HPB, histamine-producing bacteria.

Data are means \pm standard deviation (SD) from triplicate determinations.

*Significantly differ ($P < 0.05$) from the control group by Student's *t*-test.

나타났으나, 박테리오신 및 유산의 함량은 FIL20과 SBP58를 혼합하여 제조한 커드 보다는 높았다. 이는 치즈 원료 보다는 배양용 배지 내에서 유산균의 증식 속도가 더 높았기 때문에 항균물질의 생성량이 더 많이 검출된 것으로 추정된다.

렌넷 커드 내 항균물질과 히스타민 생성에 대한 프로바이오틱 유산균과 히스타민 생성균의 초기 접종 균수의 영향을 살펴본 결과, 프로바이오틱 유산균의 초기 균수가 대조구보다 적을 경우 생성된 박테리오신과 유산의 함량이 낮았고 히스타민 생성량은 대조구에 비해 오히려 높게 나타났다. 또한 히스타민 생성 유산균의 균수도 대조구보다 적을 경우 커드 내에 생성된 히스타민의 함량이 유의하게 낮았고 초기 균수를 1.0×10^6 CFU/ml로 접종하여 제조했을 때에는 대조구보다 높게 검출되었으므로 유산균이 생산한 대사산물인 박테리오신이나 히스타민의 생성량은 초기 균수에 영향을 받는 것으로 확인되었다. 한편 *L. plantarum* FIL20과 *E. faecalis* SBP58을 혼합하여 NaCl 5% 이상 첨가했을 때 커드 내에서 박테리오신은 검출되지 않았고 히스타민의 함량도 유의하게 감소되었다. *L. sakei* PIL52와 *E. faecium* SBP12를 혼합했을 때에는 NaCl 5% 첨가에 의해 조박테리오신 용액의 항균 활성이 유의하게 감소되었으나 히스타민의 함량은 대조구와 큰 차이가 없었으며, NaCl 10% 첨가했을 때에는 박테리오신은 검출되지 않았고 히스타민의 함량도 유의하게 감소되었다. 이처럼 항균 물질과 히스타민의 생성량이 낮게 검출된 것은 고농도의 식염에 의해 프로바이오틱 유산균과 히스타민 생성균의 증식이 모두 억제되었기 때문인 것으로 사료된다.

저장온도의 영향을 살펴본 결과, 렌넷 커드 제조 직후 4°C와 15°C에서 5일간 저장했을 때에는 항균 물질과 히스타민의 함량이 대조구와 큰 차이가 없었으며, *L. plantarum* FIL20과 *E. faecalis* SBP58의 혼합으로 제조한 렌넷 커드를 25°C에서 5일간 저장 후에도 박테리오신과 히스타민의 함량은 큰 변화가 없었다. 유산의 함량은 다소 증가되었는데 이는 15°C 이하의 저장 온도와는 달리 25°C에서 균의 증식에 따른 것으로 판단되며 다소 증가된 유산에 의해 히스타민의 생성량이 유의하게 감소된 것은 아니었다. 또한 *L. sakei* PIL52와 *E. faecium* SBP12의 혼합으로 제조한 렌넷 커드 내에 생성된 유산, 박테리오신 및 히스타민의 양도 대조구와 큰 차이가 없었다. 한편, 프로바이오틱 유산균을 첨가하지 않고 히스타민 생성균만으로 렌넷 커드를 제조한 후 25°C에서 5일간 저장했을 때에는 히스타민의 함량이 유의하게 증가되었다(결과 미제시).

저장기간의 영향을 살펴보기 위해 렌넷 커드 제조 후 20°C에서 10일간 저장했을 때에는 박테리오신과 유산 및 히스타민 생성량은 대조구와 크게 다르지 않았으나, 20일 저장 후에는

유산의 함량은 다소 증가되었으나 박테리오신의 활성은 유의하게 감소되었고 이에 따라 히스타민의 함량도 높게 검출되었다. 이상의 결과에서 볼 때 유산균의 초기 접종량, 식염, 저장기간 및 온도는 항균물질 생산량에 영향을 미치는 중요한 인자로서 항균물질 생산 유산균의 초기 접종량이 증가할수록 항균물질 생산량은 증가되어 히스타민의 함량을 감소시키는데 효과적이었다. 또한 히스타민 생성량은 아민 생성균의 균수에 비례적으로 증가되었으며, 저장온도 20°C에서 20일 이상 저장한 조건에서는 항균 물질인 박테리오신의 활성이 감소되어 히스타민 생성량이 증가된 반면, 식염 10% 이상 첨가에 의해서 히스타민 생성균의 증식이 억제됨에 따라 아민의 생성량도 유의하게 감소되었다.

치즈의 제조 방식은 매우 다양하고 위해요소중점관리기준(HACCP)을 적용하지 않은 공정으로 제조할 경우 잡균의 오염도도 높은 발효 유제품이다. 이에 따라 바이오제닉 아민 식중독의 발생 위험이 높은 식품 중에 하나로써 시료 100 g 중에 히스타민 10 mg 정도 섭취했을 때 중독을 유발하게 된다(Herrero-Fresno *et al.*, 2012). 치즈는 주요 스타터인 유산균에서부터 숙성에 관여하는 비스타터(non-starter) 유산균에 이르기까지 매우 다양하고 복합적인 미생물이 존재하는 발효 식품으로써 비스타터 유산균의 균수가 많을수록 바이오제닉 아민의 생성량은 증가하는 것으로 보고되고 있으며, 숙성 기간이 긴 치즈일수록 유해 아민의 함량이 유의하게 증가된다고 알려져 있다(Guarcello *et al.*, 2015). 치즈 내에 존재하는 Enterobacteriaceae는 카다베린과 티라민을 주로 생성하며, 이상 발효(heterofermentative) 유산균은 히스타민을 주로 생산하는 것으로 보고된 바 있다(Calzada *et al.*, 2015).

일반적으로 치즈 내 탈탄산 효소를 생성하는 미생물의 균수는 원심제균(bactofugation), 여과제균 및 저온살균 등을 통해 감소시킬 수 있다고 알려져 있다(Calzada *et al.*, 2015). 게다가 유산균 스타터를 접종하여 치즈를 제조한 경우 숙성 2주 동안 원료나 환경으로부터 오염된 미생물이 생성한 바이오제닉 아민 생성을 지연시키는 것으로 밝혀져 본 연구 결과와 유사하게 유산균의 바이오제닉 아민 제어 효과를 보고한 바 있다(Martuscelli *et al.*, 2005). 하지만 또 다른 연구 결과에 따르면 치즈 제조에 이용된 스타터에 의해 유리 아미노산이 축적됨으로써 lactobacilli가 히스타민을 생성을 촉진하는 경우도 알려진 바 있다(Hayaloglu *et al.*, 2005). Martuscelli 등(2005)은 Pecorino Abruzzese 치즈 내에 바이오제닉 아민 함량을 측정 한 결과, 스타터 없이 원유에서 유래된 균으로 제조한 경우 60일 숙성 후 총 아민 함량은 697 mg/kg이었고, 주로 히스타민, 티라민 및 푸트레신 등이 검출되었다. 반면 멸균된 우유에 스

타터를 접종하여 숙성한 경우에는 1,086 mg/kg의 아민 함량이 측정되었고 페닐에틸아민, 티라민, 에틸아민 및 푸트레신 등이 가장 많이 검출되었다고 하였다. 또한 Roig-sagués와 Eerola (1997)에 의하면 치즈 내에 아민을 생성하는 미생물의 수가 적어도 치즈 스타터로 사용된 유산균이 히스타민과 티라민의 형성을 감소시키지 않았다고 보고한 바 있어 스타터인 유산균들 중에서 특정 균종은 바이오제닉 아민을 생성하며, 바이오제닉 아민 생성균에 대한 항균 활성도 유산균종에 따라 상이한 것을 다른 문헌과 본 연구 결과에서 확인하였다.

치즈 내 바이오제닉 아민 함량은 치즈의 종류, 우유의 종류, 가열 조건, 치즈의 부위, 숙성 조건, 숙성 후 과정, 포장 형태, 저장 시간과 온도, 치즈 제조에 이용된 발효 스타터, 유리 아미노산의 이용능, pH, 수분 활성도, 세균수, 아미노산 탈탄산 효소 활성을 가진 미생물의 존재 유무 등에 영향을 받는다(Guarcello *et al.*, 2015). Sumner 등(1990)은 히스타민 생성균인 *L. buchneri*의 접종량에 따라 치즈 내에 생성한 히스타민의 양이 다르다고 하였으며, 실험에 사용한 최고 접종량인 10^5 CFU/ml를 접종했을 때 저장 90일 후 100 g 당 80 mg의 히스타민이 검출되었다고 하였다. 반면 가장 낮은 히스타민의 함량인 15 mg은 접종량 10^2 CFU/ml에서 확인되었다고 하여 본 연구 결과와 유사하게 히스타민 생성균의 초기 접종 균수가 많을수록 식품 내 히스타민 생성량도 증가되었다. Joosten과 Nuñez (1996)에 따르면, 대조구의 경우 치즈 제조에 이용된 히스타민 생성균 *L. buchneri* St2A의 균수는 4주 숙성 후 약 $10^6 \sim 10^8$ CFU/g 정도에 이르렀으나, *E. faecalis* INIA 4-07과 EFS2가 생산한 박테리옌 및 nisin을 생산하는 *L. lactis*와 혼합하여 치즈를 제조한 결과 히스타민 생성균의 균수는 100 CFU/g 이하로 감소되었는데 이는 박테리옌의 항균 효과에 기인한 것이라고 하였다. 한편, 대조구의 치즈 내에서 검출된 히스타민의 함량은 숙성 4개월 만에 177~214 mg/kg으로 나타나 히스타민 생성균의 초기 접종량에 따라 증가되었으나, 박테리옌 생성균을 접종한 결과 히스타민은 검출 한계 이하(< 10 mg/kg)로 나타났으며 이는 *L. buchneri* St2A의 증식 억제에 기인하였으며, 박테리옌 생성균을 처리함으로써 치즈 내 잔존하는 히스타민의 함량은 대조구에 비해 유의하게 낮았는데 본 연구 결과도 이와 유사하였다.

한편 치즈에 생성된 히스타민 함량은 발효에 관여한 미생물의 단백질 분해능에 의존하며 고농도의 식염을 첨가한 경우 단백질 분해능을 저해한다고 알려져 5.5% NaCl이 첨가된 MRS broth 상에서는 히스타민이 생성되지 않았으나, Swiss 치즈 제조 시 첨가한 동일한 농도의 식염에 의해선 아민 생성이 저해되지 않았다(Sumner *et al.*, 1990). *L. bulgaricus* 52는 NaCl이

첨가되지 않은 배지 내에서 가장 많은 양의 유해 아민을 생성한 반면 0.5% NaCl을 첨가한 경우 아민의 합성 능력이 다소 감소되었다고 하였다(Chander *et al.*, 2006). 발효 소시지 제조 시 6% NaCl을 첨가했을 때 enterobacteriaceae, enterococci 및 호기성 저온 세균수는 유의하게 낮아졌고 이에 따라 바이오제닉 아민 생성량도 감소되었다(Roseiro *et al.*, 2006). 된장 내에 함유된 바이오제닉 아민 함량은 NaCl 12% 첨가했을 때 8% 이하 첨가한 경우보다 유의하게 낮았으며(Kim *et al.*, 2005), 유사하게 Feta 치즈와 다짐육(meat batter) 내에서도 고농도의 식염에 의해 바이오제닉 아민의 생성이 억제되었다(Bover-Cid *et al.*, 2009). 부패된 인디언 멀치(*Stolephorus indicus*) 내에 함유된 *Morganella morganii*, *Proteus vulgaris* 및 *Enterobacter aerogenes*는 5% NaCl이 첨가된 배지 내에서 고농도의 히스타민을 생성하였으나, 10% NaCl에 의해서는 히스타민이 생성되지 않았다(Rodtong *et al.*, 2005). 이와 같이 기존의 연구 결과와 유사하게 본 연구에서도 고농도의 식염에 의해 히스타민은 효과적으로 억제되었는데 바이오제닉 아민의 생성량을 억제할 수 있는 최적의 식염 농도는 아민의 종류와 생성균에 따라 상이한 것으로 판단된다.

온도는 치즈 내 히스타민 생성에 중요한 역할을 하는데 예를 들어 Swiss 치즈는 21~26°C에서 약 2~7주간 저장하는 동안 히스타민을 생성하는 lactobacilli에 의해 유의한 양의 아민이 생성되었다(Stratton *et al.*, 1991). 또한 9, 14, 18 및 21°C에 저장한 Gouda 치즈 내 히스타민의 함량은 온도가 높아짐에 따라 증가되었고(Joosten, 1988b), 히스타민 생성균인 *L. buchneri*가 함유된 저염 Cheddar 치즈 내에서 히스타민 축적을 억제하기 위한 가장 중요한 인자는 저장 온도라고 보고된 바 있다(Stratton *et al.*, 1991). *L. buchneri*는 Gouda 치즈의 숙성 온도와 pH가 높을수록 많은 양의 히스타민을 생성하였는데 1년간 숙성시킨 후 21°C에 저장한 경우 6.8 mM/kg의 히스타민이 검출된 반면 9°C에서는 2.2 mM/kg이 생성되었다. 한편 숙성 2주 후 pH 5.39일 때 히스타민의 생성량은 6.5 mm/kg인 반면 pH 5.19일 때는 3.4 mM/kg이 검출되었다(Joosten, 1988b). 이란 White brine 치즈 내 바이오제닉 아민 중 카다베린의 생성량이 히스타민, 티라민 및 푸트레신에 비해 유의하게 높았고 생성된 아민의 함량은 숙성 시간 및 온도가 높을수록 증가되었다(Aliakbarlu *et al.*, 2009). 기존의 결과와 유사하게 본 연구 결과에서도 렌넷 커드 내에 생성된 히스타민의 함량은 저장온도가 25°C 이상일 때 유의하게 증가되었는데 바이오제닉 아민의 함량이 증가되는 저장 온도는 아민의 종류와 생성균에 따라 다소 차이가 있었다.

Guarcello 등(2015)은 전통 방식으로 제조한 Apulian와 Sicilian

치즈 내의 바이오제닉 아민 함량을 측정된 결과 히스타민, 티라민 및 푸트레신의 함량이 높게 나타났으며, 숙성 기간이 짧은 30일 이내 동안에는 유해 아민이 검출되지 않았던 반면 숙성 기간이 진행될수록 히스타민의 함량은 급격하게 증가되었으며 특히 실험한 치즈의 50%는 중독을 유발할 수 있는 정도의 양을 생성하였다고 보고하였다. Valsamaki 등(2000)은 Feta 치즈 제조 후 4개월간 숙성하는 동안 바이오제닉 아민의 함량을 조사한 결과 티라민과 푸트레신의 함량이 높았던 반면, 트립타민과 페닐에틸아민의 농도는 매우 낮게 나타났다고 하였으며, 숙성기간이 경과됨에 따라 총 아민 함량은 점진적으로 증가하여 102일만에 620 mg/kg에 이르렀다고 하였다. El-Zahar (2014)에 의하면 Mish, Ras 및 Blue 이집트 치즈에 함유된 바이오제닉 아민의 함량은 100 g 당 21~130 mg 정도에 이르며 이는 *Enterococci* sp.의 증식에 기인한 것으로 확인되었다. 또한 치즈의 저장 기간이 길어질수록 유해 아민의 생성량도 증가되었고 그 중에서 히스타민의 검출량이 가장 높았으며 그 양은 히스타민 중독을 유발할 정도라고 보고하였다. 이러한 결과들과 유사하게 본 연구의 렌넷 커드 내 히스타민의 함량도 저장기간이 길어질수록 유의하게 증가되었다.

치즈에 의한 히스타민 중독은 사용된 우유의 품질과 관련이 있는데 원료나 환경으로부터 혼입된 히스타민 탈탄산 효소를 생성하는 유산균 및 기타 잡균에 의해 유발되기 때문에 철저한 살균 공정을 거친 우유를 사용해야 한다(Stratton *et al.*, 1991). 미국은 참치 가공품에 한하여 히스타민 50 mg/100 g 이하의 허용 한계치를 설정하였으나, 그 외에 식품에는 기준치가 설정되어 있지 않으므로 건강을 위협하지 않는 히스타민의 허용 범위 설정이 시급하다(Taylor, 1986). 따라서 많은 연구 자료를 통해 바이오제닉 아민의 유해성을 파악하고 독성을 유발하는 역치를 결정하여 유해 아민의 검출량이 높은 수산가공품, 치즈, 와인, 소시지 등의 식품에 허용 한계치를 설정해야 하고 아올러 아민의 생성을 억제할 수 있는 저감화 방법을 모색해야 한다. 바이오제닉 아민 함량을 낮추기 위해 기존에 이용되고 있는 가열 처리나 저장 온도를 낮추거나 숙성 시간을 단축시킬 경우 식품의 조직감, 영양가 및 향미 저하에 따라 식품의 물리화학적 변화를 초래할 수 있으며, 고농도의 식염을 가하게 되면 성인병 발생 위험이 높아지게 된다. 본 연구 결과와 같이 바이오제닉 아민을 생성하지 않는 프로바이오틱 유산균은 독성 유발 가능성이 낮은 항균 물질을 생산하여 유해 아민 생성균의 증식을 억제하고 그 결과 아민의 생성량을 효과적으로 낮출 수 있었으므로 생물학적 보존제로 안전성이 입증된 유산균은 유해 아민 제어를 위해 이용 가치가 높다고 사료된다. 아미노산 탈탄산 효소를 생성하지 않고 안전성 평가를 통해 독

성이 없으며 프로바이오틱 활성을 나타내는 유산균을 대상으로 아민 생성균에 대해 강한 항균 활성과 저장 온도와 기간 동안에도 항균 활성이 안정한 유산균을 스타터로 활용하면 발효 식품 내에 유해 아민의 생성을 최소화할 수 있을 것이다.

적 요

본 연구에서는 히스타민을 생성하는 유산균과 이에 항균 활성을 나타내는 프로바이오틱 유산균을 혼합 접종하여 제조한 렌넷 커드 내 항균물질과 히스타민 생산에 영향을 미치는 인자를 조사하였다. 프로바이오틱 유산균인 *Lactobacillus plantarum* FIL20과 *Lactobacillus sakei* PIL52는 히스타민 생성균인 *Lactobacillus brevis* LAS129, *Enterococcus faecium* SBP12 및 *Enterococcus faecalis* SBP58에 대해 강력한 항균 물질을 생산하였고, 프로바이오틱균이 생산한 유산과 박테리오신의 항균 활성은 농도의존적이었다. 렌넷 커드 제조를 위해 접종한 프로바이오틱 유산균의 균수가 많을수록 항균 물질 생성량이 증가되어 히스타민 생성균에 대한 항균 활성도 높아졌다. 프로바이오틱 유산균과 히스타민 생성균은 NaCl 10% 첨가에 의해 증식이 억제됨으로써 렌넷 커드 내에 항균 물질과 히스타민의 함량은 대조구보다 유의하게 낮았다($P < 0.05$). 한편, 프로바이오틱 유산균과 히스타민 생성균을 혼합하여 제조한 렌넷 커드를 25°C에서 5일간 저장 했을 때 히스타민의 함량은 유의하게 증가되지 않았으나, 20°C에서 20일간 저장한 경우에는 프로바이오틱 유산균이 생산한 항균 물질의 활성이 감소됨에 따라 렌넷 커드 내에 히스타민의 함량이 유의하게 증가되었다($P < 0.05$).

References

- Aliakbarlu, J., Alizadeh, M., Razavi-Rohani, M., Vahabzade, Z., Saei, S.S., and Agh, N. 2009. Effects of processing factors biogenic amines production in Iranian white brine cheese. *Res. J. Biol. Sci.* 4, 23-28.
- Arnold, S.H. and Brown, W.D. 1978. Histamine toxicity from fish products. *Adv. Food Res.* 34, 113-154.
- Askar, A. and Treptow, H. 1986. Biogenic amine in Lebensmitteln. Ulmer Verlag, Stuttgart, Germany.
- Bover-Cid, S. and Holzapfel, W.H. 1999. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 52, 33-41.
- Bover-Cid, S., Torriani, S., Gatto, V., Tofalo, R., Suzzi, G., and Belletti, N. 2009. Relationships between microbial population

- dynamics and putrescine and cadaverine accumulation during dry fermented sausage ripening. *J. Appl. Microbiol.* **106**, 1397–1407.
- Calzada, J., Olmo, A.D., Picon, A., Gaya, P., and Nuñez, M.** 2015. Effect of high-pressure on the microbiology, proteolysis, biogenic amines and flavor of cheese made from unpasteurized milk. *Food Bioprocess Technol.* **8**, 319–332.
- Chander, H., Batish, V.K., Babu, S., and Singh, R.S.** 2006. Factors affecting amine production by a selected strain of *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Food Sci.* **54**, 940–942.
- Chong, C.Y., Abu Bakar, F., Russly, A.R., Jailah, B., and Mahyudin, N.A.** 2011. The effects of food processing on biogenic amines formation. *Int. Food Res. J.* **18**, 867–876.
- Coelho, M.C., Silva, C.C.G., Ribeiro, S.C., Dapkevicius, M.L.N.E., and Rosa, H.J.D.** 2014. Control of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese using protective lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **191**, 53–59.
- Dapkevicius, M.L.N.E., Nout, M.J.R., Rombouts, F.M., Houben, J.H., and Wymenga, W.** 2000. Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms. *Int. J. Food Microbiol.* **57**, 107–114.
- Doeglas, H.M.G., Huisman, J., and Nater, J.P.** 1967. Histamine intoxication after cheese. *Lancet* **2**, 1361–1362.
- Eerola, S., Hinkkanen, R., Lindfors, E., and Hirvi, T.** 1993. Liquid chromatographic determination of biogenic amines in dry sausages. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* **75**, 575–577.
- El-Zahar, K.M.** 2014. Biogenic amines and microbiological profile of Egyptian cheeses. *Uni. J. Food Nutr. Sci.* **2**, 18–26.
- Fenelon, M.A., Ryan, M.P., Rea, M.C., Guinee, T.P., Ross, R.P., Hill, C., and Harrington, D.** 1998. Elevated temperature ripening of reduced fat Cheddar made with or without lactacin 3147 producing starter cultures. *J. Dairy Sci.* **82**, 10–22.
- Gardini, F., Martuscelli, M., Caruso, M.C., Galgano, F., Crudele, M.A., Favati, F., Guerzoni, M.E., and Suzzi, G.** 2001. Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. *Int. J. Food Microbiol.* **64**, 105–117.
- Guarcello, R., Diviccaro, A., Barbera, M., Giampiccoli, E., Settanni, L., Minervini, F., Moschetti, G., and Gobbetti, M.** 2015. A survey of the main technology, biochemical and microbiological features influencing the concentration of biogenic amines of twenty Apulian and Sicilian (Southern Italy) cheeses. *Int. Dairy J.* **43**, 61–69.
- Hayaloglu, A.A., Guven, M., Fox, P.F., and McSweeney, P.L.** 2005. Influence of starter son chemical, biochemical, and sensory changes in Turkish White-brines cheese during ripening. *J. Dairy Sci.* **88**, 3460–3474.
- Herrero-Fresno, A., Martinez, N., Sánchez-Llana, E., Díaz, M., Fernández, M., Martín, M.C., Ladero, V., and Alvarez, M.A.** 2012. *Lactobacillus casei* strains isolated from cheese reduce biogenic amines accumulation in an experimental model. *Int. J. Food Microbiol.* **157**, 297–304.
- Hirsch, A., Grinsted, E., Chapman, H.R., and Mattick, A.T.R.** 1951. A note on the inhibition of an anerobic sporeformer in Swiss-type cheese by a nisin-producing *Streptococcus*. *J. Dairy Res.* **18**, 205–206.
- Innocente, N., Biasutti, M., Padovese, M., and Moret, S.** 2007. Determination of biogenic amines in cheese using HPLC technique and direct derivatization of acid extract. *Food Chem.* **101**, 1285–1289.
- Joosten, H.M.L.J.** 1988a. The biogenic amine contents of Dutch cheese and their toxicological significance. *Neth. Milk Dairy J.* **42**, 25–42.
- Joosten, H.M.L.J.** 1988b. Conditions allowing the formation of biogenic amines in cheese. 3. Factors influencing the amounts formed. *Neth. Milk Dairy J.* **41**, 329–357.
- Joosten, H.M.L.J. and Northolt, M.D.** 1987. Conditions allowing the formation of biogenic amines in cheese. 2. Decarboxylative properties of some non-starter bacteria. *Neth. Milk Dairy J.* **41**, 259–280.
- Joosten, H.M.L.J. and Nuñez, M.** 1996. Prevention of histamine formation in cheese by bacteriocin-producing lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1178–1181.
- Kim, N.Y. and Ji, G.E.** 2015. Characterization of the production of biogenic amines and gamma-aminobutyric acid in the soybean pastes fermented by *Aspergillus oryzae* and *Lactobacillus brevis*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 464–468.
- Kim, M.J. and Kim, K.S.** 2014. Tyramine production among lactic acid bacteria and other species isolated from kimchi. *LTW-Food Sci. Technol.* **56**, 406–413.
- Kim, J.H., Kim, D.H., Ahn, H.J., Park, H.J., and Byun, M.W.** 2005. Reduction of the biogenic amine contents in low salt-fermented soybean paste by gamma irradiation. *Food Control* **16**, 43–49.
- Lim, E.S.** 2016a. Microbiological and chemical properties of sourdough fermented with probiotic lactic acid bacteria. *Kor. J. Microbiol.* **52**, 84–97.
- Lim, E.S.** 2016b. Effect of the mixed culture of heterofermentative lactic acid bacteria and acid-tolerant yeast on the shelf-life of sourdough. *Kor. J. Microbiol.* **52**, 471–481.
- Lim, E.S. and Lee, N.G.** 2016. Control of histamine-forming bacteria by probiotic lactic acid bacteria isolated from fish intestine. *Kor. J. Microbiol.* **52**, 352–364.
- Linares, D.M., Martín, M., Ladero, V., Alveraz, M.A., and Fernandez, M.** 2011. Biogenic amines in dairy products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **51**, 691–703.
- Mah, J.H., Ahn, J.B., Park, J.H., Sung, H.C., and Hwang, H.J.** 2003. Characterization of biogenic amine-producing microorganisms isolated from *Myeolchi-Jeot*, Korean salted and fermented anchovy. *J. Microbiol. Biotechnol.* **13**, 692–699.
- Martuscelli, M., Gardini, F., Torriani, S., Mastrocola, D., Serio, A., Chaves-Lopez, C., Schirone, M., and Suzzi, G.** 2005. Production of biogenic amine during the ripening of Pecorino Abruzzese cheese. *Int. Dairy J.* **15**, 571–578.
- Min, J.S., Lee, S.O., Jang, A., Jo, C., and Lee, M.** 2007a. Irradiation and

- organic acid treatment for microbial control and the production of biogenic amines in beef and port. *Food Chem.* **104**, 791–799.
- Min, J.S., Lee, S.O., Jang, A., Jo, C., and Lee, M.** 2007b. Control of microorganisms and reduction of biogenic amines in chicken breast and thigh by irradiation and organic acids. *Poult. Sci.* **86**, 2034–2041.
- Moon, J.S., Cho, S.K., Choi, H.Y., Kim, J.E., Kim, S.Y., Cho, K.J., and Han, N.S.** 2010. Isolation and characterization of biogenic amine-producing bacteria in fermented soybean pastes. *J. Microbiol.* **48**, 257–261.
- Morrow, J.D., Margolies, G.R., Rowland, J., and Jackson Roberts, L.** 1991. Evidence that histamine is the causative toxin of scombroid-fish poisoning. *N. Engl. J. Med.* **324**, 716–720.
- Ong, L., Henriksson, A., and Shah, N.P.** 2006. Development of probiotic Cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Bifidobacterium* spp. and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid. *Int. Dairy J.* **16**, 446–456.
- Oumer, B.A., Gaya, P., Fernandez-Garcia, E., Marciaca, R., Garde, S., Medina, M., and Nunez, M.** 2001. Proteolysis and formation of volatile compounds in cheese manufactured with a bacteriocin-producing adjunct culture. *J. Dairy Res.* **68**, 117–129.
- Ozogul, F., Tabanelli, G., Toy, N., and Gardini, F.** 2015. Impact of cell-free supernatant of lactic acid bacteria on putrescine and other polyamine formation by foodborne pathogens in ornithine decarboxylase broth. *J. Agri. Food Chem.* **63**, 5828–5835.
- Roberts, R.F., Zottola, E.A., and McKay, L.L.** 1992. Use of a nisin producing starter culture suitable for Cheddar cheese manufacture. *J. Dairy Sci.* **75**, 2353–2363.
- Rodtong, S., Nawong, S., and Yongsawatdigul, J.** 2005. Histamine accumulation and histamine-forming bacteria in Indian anchovy (*Stolephorus indicus*). *Food Microbiol.* **22**, 475–482.
- Roig-Sagués, A. and Eerola, S.** 1997. Biogenic amines in meat inoculated with *Lactobacillus sake* starter strains and an amine-positive lactic acid bacterium. *Eur. Food Res. Technol.* **205**, 227–231.
- Roseiro, C., Santos, C., Sol, M., Silva, L., and Fernandes, I.** 2006. Prevalence of biogenic amines during ripening of a traditional dry fermented pork sausages and its relation to the amount of sodium chloride added. *Meat Sci.* **74**, 557–563.
- Sgouras, D., Maragkoudakis, P., Petraki, K., martine-Gonzalez, B., Eriotou, E., Michopoulos, S., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E., and Mentis, A.** 2004. *In vitro* and *in vivo* inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus casei* strains Shirota. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 518–526.
- Stratton, J.E., Hutkins, R.W., and Taylor, S.L.** 1991. Biogenic amines in cheese and other fermented foods: a review. *J. Food Prot.* **54**, 460–470.
- Sumner, S.S.** 1987. Histamine production in Swiss cheese. Ph.D thesis. University of Wisconsin-Madison, USA.
- 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.
- Sumner, S.S., Speckhard, M.W., Somers, E.B., and Taylor, S.L.** 1985. Isolation of histamine-producing *Lactobacillus buchneri* from Swiss cheese implicated in a food poisoning outbreak. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 1094–1096.
- Suzzi, G. and Gardini, F.** 2003. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *Int. J. Food Microbiol.* **88**, 41–54.
- Tabanelli, G., Montanari, C., Bargossi, E., Lanciotti, R., Gatto, V., Felis, G., Torriani, S., and Gardini, F.** 2014. Control of tyramine and histamine accumulation by lactic acid bacteria using bacteriocin forming lactococci. *Int. J. Food Microbiol.* **190**, 14–23.
- Tapingkae, W., Tanasupawat, S., Parkin, K.L., Benjakul, S., and Visessanguan, W.** 2010. Degradation of histamine by extremely halophilic archaea isolated from high salt-fermented fishery products. *Enzyme Microbiol. Technol.* **46**, 92–99.
- Taylor, S.L.** 1986. Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects. *Crit. Rev. Toxicol.* **17**, 91–128.
- Taylor, S.L., Guthertz, L.S., Leatherwood, M., Tillman, F., and Lieber, E.R.** 1978. Histamine production by foodborne bacterial species. *J. Food Safety* **1**, 173–187.
- Teodorovic, V., Buncic, S., and Smijanec, D.** 1994. A study of factors influencing histamine production in meat. *Fleischwirtsch* **74**, 170–172.
- Vale, S. and Glória, M.B.** 1997. Determination of biogenic amines in cheese. *J. AOAC Int.* **80**, 1006–1012.
- Valsamaki, K., Michaelidou, A., and Polychronidou, A.** 2000. Biogenic amine production in Feta cheese. *Food Chem.* **71**, 259–266.
- Zotolla, E.A., Yezzi, T.L., Ajao, D.B., and Roberts, R.F.** 1994. Utilization of Cheddar cheese containing nisin as an antimicrobial agent in other foods. *Int. J. Food Microbiol.* **24**, 227–238.