

자반고등어에서 histamine 분해능을 가진 세균의 분리 동정

황수정 · 김영만*

동의대학교 식품영양학과

Received March 3, 2005 / Accepted October 4, 2005

Isolation and Identification of a Histamine-degrading Bacteria from Salted Mackerel. Su-Jung Hwang and Young-Man Kim*. *Department of Food Science and Nutrition, Dong-eui University, Busan 614-714, Korea* – Histamine can be produced at early spoilage stage through decarboxylation of histidine in red-flesh fish by *Proteus morgani*, *Hafnia alvei* or *Klebsiella pneumoniae*. Allergic food poisoning is resulted from the histamine produced when the freshness of Mackerel degrades. Conversely it has been reported that there are bacteria which decompose histamine at the later stage. We isolated histamine decomposers from salted mackerel and studied the characteristics to help establish hygienic measure to prevent outbreak of salted mackerel food poisoning. All the samples were purchased through local supermarket. Histamine decomposers were isolated using restriction medium using histamine 10 species were selected. Identification of these isolates were carried out by the comparison of 16S rDNA partial sequence; as a result, we identified *Pseudomonas putida* strain RA2 and *Halomonas marina*, Uncultured Arctic sea ice bacterium clone ARKXV1/2-136, *Halomonas venusta*, *Psychrobacter* sp. HS5323, *Pseudomonas putida* KT2440, *Rhodococcus erythropolis*, *Klebsiella terrigena* (*Raoultella terrigena*), *Alteromonadaceae* bacterium T1, *Shewanella massilia* with homology of 100%, 100%, 99%, 99%, 99%, 99%, 100%, 95%, 99%, and 100%, respectively. Turbidometry determination method and enzymic method were employed to determine the ability of histamine decomposition. Among those species *Shewanella massilia* showed the highest in ability of histamine decomposition. From these results we confirmed various histamine decomposer were present in salted mackerel product in the market.

Key words – Histamine degrading bacteria, Salted mackerel, 16S rDNA partial sequence, Enzymic method

Histamine은 수산식품이 원인이 되는 식중독에서 발생률이 제일 높은 생물학적 아민의 하나[9,10]로 어육이 선도가 저하하면서 구성 아미노산인 histidine이 *E. coli*[3], *Morganella morgani*[7], *Klebsiella pneumoniae*[12,18], *Hafnia alvei*[5,14], *Citrobacter freundii*[19], *Enterobacter aerogenes* 및 *Vibrio alginolyticus*[21] 등과 같은 부패세균에 의해 탈탄산 과정을 거쳐 형성된다.

어육이 완전히 부패된 단계에서 histamine의 함량은 histaminase의 작용으로 다시 저분자물질로 분해되기 때문에 오히려 감소될 뿐 아니라, 그 부패취 때문에 섭취하는 일은 거의 없어서 식중독을 일으키는 일은 없는 반면, 초기부패단계에서 일단 생성된 histamine은 쉽게 분해되지 않고 다량으로 축적되기 때문에 이들 식품을 섭취하므로써 allergy성 식중독을 일으킬 수 있어 식품위생상 문제가 되고 있다.

고등어는 다량의 histidine 함유로 histidine decarboxylase를 생산하는 세균의 오염과 증식이 용이하며, 이로 인해 histamine이 다량 생성되는 것으로 알려져 있다. 그리고 histamine을 다시 분해하는 효소를 생산하는 세균도 혼재되어 있을 것으로 알려져 있다.

한편, 자반고등어는 재래 수산 시장에서 소규모로 생산되어 내륙지방에서 소비되고 있었지만 최근에 위생적으로 포장한 제품이 대량 생산되어 흡소팩 또는 관광 상품으로 판매가 확대되고 있다. 그러나 histamine에 의한 중독은 대부분 경증이며, 빠른 시간에 회복되고, 자가 치료를 할 수 있어서 통계에 정확히 나타나지 않으며, 더욱이 자반고등어에서 원인이 되는 중독은 거의 보고되지 않고 있다. 때문에 histamine에 의한 식중독 발생상황에 대한 정확한 파악이 불가능하다.

자반고등어 및 수산가공품의 안전성 측면과 수산물의 소비확대, 수산가공업의 활성화를 위하여 histamine 분해능을 가진 세균에 관한 연구의 필요성이 있다고 사료되어 식품위생대책 수립과 안전한 자반고등어의 제조에 관한 기초 자료를 얻고자 유통 중인 자반고등어 완제품에서 histamine 분해세균을 분리 동정한 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

균주 분리

균주분리원인 자반고등어는 대형마트에서 2003년 10월 내에 시판된 제품으로 구입한 날부터 6일 동안 5℃에서 냉장보관하였다. 이는 초기부패 상태를 만들어주기 위해서였다. 균주분리용 배지는 탄소원과 질소원으로써 histamine만을 첨

*Corresponding author

Tel : +82-51-890-1591, Fax : +82-81-890-2152

E-mail : ymkim@deu.ac.kr

가한 제한배지[11]를 제조하여 사용하였다. 따라서, 자반고등어 육질부위를 멸균한 면봉으로 문지르고 이 면봉을 제한배지에 도말하여 25°C에서 72시간 배양하여 증식하는 균주를 분리하였다.

시험균주의 분리

제한배지에 '핵선배양하여 증식하는 균을 FDA[4] 및 Bergey's manual[6]와 Yoguchi et al.[20]를 참고로 하여 형태학적 및 생화학적 시험과 25°C에서 NaCl 농도에 따른 성장정도 시험을 실시하여 최종 시험균주를 분리하였다.

16S rDNA 염기서열 분석에 의한 동정

균주를 LB broth (Luria-bartani broth, 10g of Tryptic digest of casein (Tryptopane); 5 mg of Yeast extract; 10g of NaCl; pre-adjusted to pH 7.0)에서 35°C, 18시간 동안 증균 배양한 후, 반응과정을 거쳐 DNA를 추출하였다.

PCR 반응은 DNA thermal cycler (Perkin-Elmer Cetus)를 사용했으며, primer는 6F (5'GRAGTTTGATCMTGGC; corresponding to positions 6 to 23 of *Escherichia coli* 16S rRNA)와 1492R (5'GGTTA CCTTGTACGACTT; corresponding to positions 1472 to 1492 of *E. coli*)를 사용하였다[8,22].

염기서열 분석은 ABI 310 Automatic Sequencer (Perkin elmer co., U.S.A.)와 Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin elmer co., USA)를 사용하여 실시하였고, 확보된 염기서열은 NCBI (National center for biotechnology information)에서 제공하는 World Wide Web Blast DNA database search service (blastn 2.0)를 이용하여 검색하였다.

Histamine 분해능 재확인

자반고등어에서 분리한 시험균주의 histamine 분해능을 다시 확인하기 위하여 Nutrient broth 1l, 3% NaCl, 1.4% histamine dihydrochloride (Sigma)의 조성으로 배지를 제조하여 사용하였다.[11] 이 배지에 시험균주를 각각 접종하여 배양하면서 탁도측정법으로 미생물의 농도를 측정하였고, 효소법으로 histamine 농도를 측정하였다. 이러한 방법으로 균주의 생육곡선과 histamine의 분해와의 관계를 관찰하였다.

탁도측정법(Turbidometry determination) - 시험균주의 생육곡선을 관찰하기 위하여 미생물의 농도를 분광광도계(Ultrospec 3000, Pharmacia biotech)를 사용하여 600 nm에서 측정하였다.

효소법(Enzymic method) - Histamine의 농도 측정은 Lerke et al.[13]과 Summer and Taylor[17]의 효소법에 의하였다. 시약은 Diamine oxidase (DAO, Sigma) 0.35 IU/ml, Hydrogen peroxidase (HRP, Sigma) 17.24 IU/ml로 탈 이온화 된 물에 녹여 준비하였다. Leuco crystal violet (LCV, Aldrich)은 0.5%

HCl에 용해시켜 준비하고 phosphate buffer는 KH_2PO_4 와 Na_2HPO_4 혼합물 0.15 M 용액을 사용하며 pH 6.8로 보정하였다. 일단 준비한 모든 시약은 0~2°C에, 특히 LCV용액은 냉암소 저장하여 사용하였다.

Histamine 농도 측정 - 시험균주를 증식속도가 상대적으로 빠른 것은 4시간 간격으로 52시간 동안 배양하였고, 증식속도가 느린 것은 8시간 간격으로 120시간 동안 배양하여 각 배양액을 원심분리하였다. 균체를 가라앉혀 상층액을 시료로 사용하였다. 상층액 0.5 ml에 buffer (pH 6.8) 1 ml와 DAO, HRP를 각각 0.5 ml를 넣어 충분히 섞은 후, 0.1 ml의 LCV용액을 넣었다. 37°C에서 2시간 배양한 후, 596 nm (crystal violet이 최대 흡광도로 나타나는 파장)에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

시험균주의 선별 및 일반적인 특징

제한배지에서 증식하는 균 중 colony 크기가 상대적으로 큰 것을 선별하여 44균주를 1차적으로 순수 분리하였다. 2차 균주 선정을 위하여 1차 선별된 44균주를 형태학적 및 생화학적 시험과 25°C에서 NaCl 농도에 따른 성장정도 시험을 비교하여 최종 시험균주를 선별하였다. 최종으로 선별된 10종 중 1종은 Gram 양성균, 9종은 Gram 음성균이었으며, 모든 균이 catalase반응은 양성, indole 생성은 음성으로 나타났다. 시험균주 1번, 6번, 10번의 3종은 형광성 색소를 지니고 있음을 확인할 수 있었으며, 시험균주 10번만이 gelatin 분해능을 지니고 있었다(Table 1). 그리고 25°C에서 NaCl 농도에 따른 성장 정도를 확인한 결과, 6번 균주의 경우 NaCl 농도 0%~9%까지 전체적으로 잘 자랐으며, 2, 4, 5, 9번 균주는 NaCl 농도 0%에서 전혀 자라지 않은 것을 확인할 수 있었다. 10균주 중 1, 7, 8번 균주를 제외한 균주 모두가 NaCl 농도 3%에서 전반적으로 잘 자라는 것을 확인할 수 있었다(Table 2).

16S rDNA 염기서열 분석에 의한 동정

제한배지에서 분리한 10균주를 동정하기 위해 API Kit와 세균자동동정기 시스템(MicroLog TMs system, release 4.0, Biolog Inc., U.S.A.) 등을 사용하여 동정을 시도하였으나 생화학 시험용 인공배지에서 증식이 원활하지 못하였고 기존에 구축된 데이터 베이스의 정보 부족으로 상호유사성이 떨어지는 등의 문제점이 발생하였다. 그래서 16S rDNA 염기서열 분석에 의한 동정을 시도하였다 그 결과 분리된 10균주 모두 동정이 가능하였으며, *Pseudomonas putida* strain RA2, *Halomonas marina*, Uncultured Arctic sea ice bacterium clone ARKXV1/2-136, *Halomonas venusta*, *Psychrobacter* sp. HS5323, *Pseudomonas putida* KT2440, *Rhodococcus erythropolis*, *Klebsiella terrigena* (*Raoultella terrigena*), *Alteromonadaceae* bacterium T1, *Shewanella massilia*로 동정되었다(Table 3). 그리고 각각 100%, 100%, 99%,

Table 1. Morphological and biochemical characteristics of isolated strains

Tested items	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Gram staining	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Luminescence	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Oxidase	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Indole production	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrate	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
TSI test	K/K	K/K	K/K	K/K	K/A	K/A	K/K	K/K	K/A	A/K
H ₂ S reaction	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Gelatine hydrolase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Methyl red	-	N.G	-	-	N.G	-	-	-	N.G	-
Voges-Proskauer	-	N.G	-	-	N.G	-	-	-	N.G	-

-, negative; +, positive; N.G, No Growth.

K/K, No fermentation; K/A, Glucose fermentation only; A/K, Glucose fermentation only.

Table 2. Growth of isolated bacterial strain under different NaCl concentration at 25°C

	0%	1%	3%	5%	7%	9%
1	+	+++	+++	++++	+	-
2	-	+	++++	+++	+	+
3	+++	+++	+++	+	-	-
4	-	++	+++	-	-	-
5	-	+++	+++	++	+	-
6	+++	++++	++++	++++	++++	+++
7	+++	+++	++	+	-	-
8	+	+++	+	-	-	-
9	-	+++	+++	++	-	-
10	+++	++++	++++	+++	-	-

-, no growth; +, weak growth; ++, growth; +++, good growth; +++++, best growth.

99%, 99%, 99%, 100%, 95%, 99%, 100%의 상동성을 보였다. 한편 Arnold and Brown[2]은 *Pseudomonas*, *Proteus*, *Escherichia*, *Vibrio*, *Klebsiella*, *Clostridium* 속의 그리고 Alin[1]과 Satake and Fugita[16]은 *Salmonella*와 *Achromobacter* 속의 균이 histamin 분해능이 있었다고 보고한 바 있어 동정된 균주와 일치성이 보여진다.

Histamine 분해능 시험

효소법은 2단계의 연속적인 효소시스템을 이용하여 histamine을 측정하는 방법으로 먼저, diamine oxidase가 histamine의 분해를 촉매하여 imidazole acetaldehyde, ammonia와 hydrogen peroxide 등의 반응생성물을 형성시킨다. 두 번째 첨가되는 효소인 peroxidase는 LCV (Leuco crystal violet)를 환원형에서 산화형으로 변화시키는데 LCV는 환원형에서는 색을 띠지 않다가 peroxidase에 의하여 산화형이 되면 보라색을 띠는 성질을 갖고 있다. 이러한 메커니즘으로 histamine 분해를 확인하였으며, 탁도측정법으로 시험균주의 생육곡선을 관찰하였다. 이와 같은 방법으로 미생물의 생육곡선과 histamine의 분해와의 관계를 관찰한 결과는 Fig. 1과 2에 나타내었다.

시험균주의 histamine 분해능을 관찰한 결과, *Shewanella massilia*가 빠른 시간에 분해가 이루어지는 것을 확인 할 수 있었고, 제한배지에서 분리한 10균주 모두, 대수증식기가 시작되는 지점에서 급속한 분해가 관찰 되었다. 이것은 histamine의 분해가 효소 활성이 대량으로 이루어지는 대수증식기에 활발히 시작되고 있다는 것으로 증식과 더불어 세포외에 배출되는 균체 외 효소에 의한 것으로 추정할 수 있다.

Table 3. 16S rRNA gene sequence homology between isolated strain and GenBank registered strain

Strain	Genbank registration	GenBank ID	Homology(%)
No. 1	<i>Pseudomonas putida</i> strain RA2	AY121980	100
No. 2	<i>Halomonas marina</i>	AJ306890	100
No. 3	Uncultured Arctic sea ice bacterium Clone ARKXV1/2-136	AY165598	99
No. 4	<i>Halomonas venusta</i>	AJ306894	99
No. 5	<i>Psychrobacter</i> sp. HS5323	AY443042	99
No. 6	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	AE016778	99
No. 7	<i>Rhodococcus erythropolis</i> strain NV100/50/6670	AY147846	100
No. 8	<i>Klebsiella terrigena</i> (<i>Raoultella terrigena</i>)	YI7670	95
No. 9	<i>Alteromonadaceae</i> bacterium T1	AY177717	99
No. 10	<i>Shewanella massilia</i>	AJ006084	100

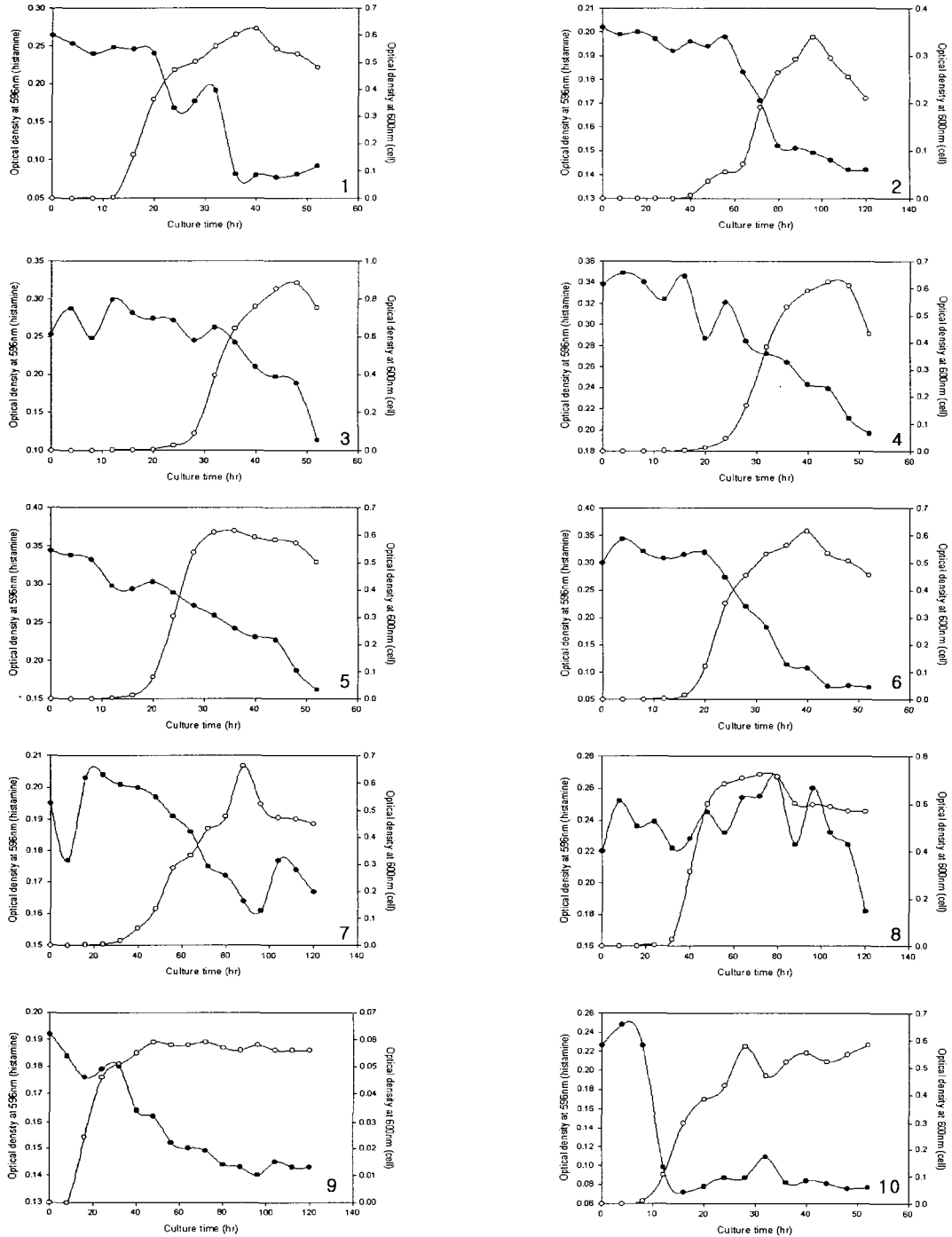


Fig. 1. Change of histamine concentration by growth of isolated bacteria. 1, *Pseudomonas putida* strain RA2; 2, *Halomonas marina*; 3, Uncultured Arctic sea ice bacterium clone ARKXV1/2-136; 4, *Halomonas venusta*; 5, *Psychrobacter* sp. HS5323; 6, *Pseudomonas putida* KT2440; 7, *Rhodococcus erythropolis* strain NVI 00/50/6670; 8, *Klebsiella terrigena* (*Raoultella terrigena*); 9, *Alteromonadaceae* bacterium T1; 10, *Shewanella massilia*.

이상의 결과로 차반고등어에서 분리 동정한 균주 중 histamine을 분해하는데 활용 가능성이 높은 균주는 10균주 중 비교적 저농도인 25℃에서 최적의 상태를 보이고, NaCl 농도 0%~9%의 폭넓은 범위에서 성장 가능한 *Pseudomonas*

putida KT2440로 사료되며, *Shewanella massilia*도 NaCl 농도 0%~5%에서 성장이 가능하고 시험균주 중 최고의 분해능을 보여 활용 가능성이 높을 것이라 사료된다.

하지만, *Shewanella massilia*의 경우 병원성이 의심되고 모

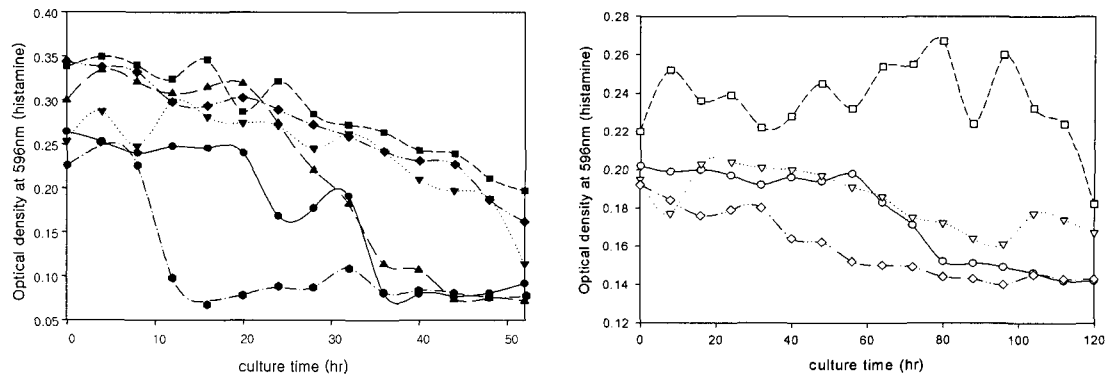


Fig. 2. Change of histamine concentration by growth of isolated bacteria.

●, *Pseudomonas putida* strain RA2; ○, *Halomonas marina*; ▼, Uncultured Arctic sea ice bacterium clone ARKXV1/2-136; ■, *Halomonas venusta*; ◆, *Psychrobacter* sp. HS5323; ▲, *Pseudomonas putida* KT2440; ▽, *Rhodococcus erythropolis* strain NVI 00/50/6670; □, *Klebsiella terrigena* (*Raoultella terrigena*); ◇, *Alteromonadaceae* bacterium T1; ●, *Shewanella massilia*.

든 균주의 최적활성실험 등이 부족하기 때문에 분리한 균주의 이용성을 더 높이기 위해서는 병원성 실험이나 최적활성 범위 측정 등의 대한 검토가 더 필요하다고 사료된다.

요 약

Histamine은 적색육 어류의 histidine이 어육 중의 *Morganella morganii*, *Hafnia alvei* 및 *Klebsiella pneumoniae*와 같은 부패세균에 의해 탈탄산 되어 초기에 형성되는 것으로 allergy 성 식중독을 일으킬 수 있다. 이는 적색육 어류인 고등어의 선도저하 시에 많이 생성된다. 그리고 부패 후기에는 histamine을 분해하는 세균도 존재하는 것으로 알려져 있다. 그러므로, histamine 식중독의 잠재력을 지닌 자반고등어로 인한 식중독 사고 예방과 그 위생 대책을 수립하는데 필요한 자료를 얻고자 자반고등어에서 histamine 분해능을 가진 균을 분리, 동정하였다. 시료는 대형마트에서 시판되는 상태로 구입하였다. 질소원과 탄소원으로써 histamine만을 첨가한 제한배지를 사용하여 histamine 분해능을 가진 균을 분리하였다. 그리고 Gram staining, oxidase, catalase, citrate, TSI test, H₂S reaction 및 indole 생성 등의 기본적인 생화학적 동정시험을 거쳐 10종의 시험균주를 선택하였다. 이 균주들을 16S rRNA gene 염기서열 비교에 의한 계통발생학적 분석을 이용하여 동정하였다. 그 결과, *Pseudomonas putida* strain RA2, *Halomonas marina*, Uncultured Arctic sea ice bacterium clone ARKXV1/2-136, *Halomonas venusta*, *Psychrobacter* sp. HS5323, *Pseudomonas putida* KT2440, *Rhodococcus erythropolis*, *Klebsiella terrigena* (*Raoultella terrigena*), *Alteromonadaceae* bacterium T1, *Shewanella massilia*의 10종이 모두 동정되었으며, 각각 100%, 100%, 99%, 99%, 99%, 100%, 95%, 99%, 100%의 상동성을 보였다.

Histamine 분해능의 존재를 탁도측정법과 효소법에 의해 확인한 결과, 분리된 10종 모두의 histamine 분해능이 재확

인 되었고, 그 중 *Shewanella massilia*가 최대의 histamine 분해능을 보이는 것으로 확인되었다. 이 결과로 자반고등어 시판 제품에는 다수의 histamine 분해 세균이 존재하는 것을 확인할 수 있었으며, 이 세균을 활용한다면 식품 내 존재하는 histamine을 효과적으로 분해할 수 있을 것이라 예상된다.

감사의 글

이 논문은 2004학년도 동의대학교 교내 연구비에 의하여 수행된 결과로 연구비 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Alin, K. 1950. Bacterial production and destruction of histamine in vitro. *Acta allergologica* III, 136-156.
2. Arnold, S. H. and W. D. Brown. 1978. Histamine(?) toxicity from fish products. *Adv. Food Res.* **24**, 114.
3. Ferencik, M. 1970. Formation of histamine during bacterial decarboxylation of histidine in the flesh of some marine fishes. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* **14**, 52-60.
4. Food and Drug Administration. 1992. Bacteriological analytical manual. 7th Edition. AOAC International.
5. Havelka, B. 1967. Role of the *Hafnia* bacteria in the rise of histamine in tuna fish meat. *Cesk. Hyg.* **12**, 343-352.
6. Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley and S. T. Williams. 1994. *Bergey's manual of Determinative bacteriology* (9th edition), Baltimore, Williams & Wilkins Co., 260-274.
7. Kawabata, T., K. Ishizaka, T. Mura and T. Sasaki. 1956. Studies on the food poisoning associated with putrefaction of marine products. VII. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* **22**, 41-47.
8. Kim, C. H., Y. Sako and Y. Ishida. 1995. Inheritance of PSP toxin composition in toxin dinoflagellate alexandrium spp., *Korean J. Phycol.* **10**(1), 59-67.
9. Kimata, M and A. Kawai. 1958. Studies on the histamine

- formation of *Proteus morgani* Mem. College Agr. Kyoto Univ., Fish. Ser. Special Issue, 92-99.
10. Kimata, M. and A. Kawai. 1959. Studies on the histamine formation of *Proteus morgani*. Mem. Res. Inst. Food Sci. Kyoto University 18, 1-7.
 11. Lee T. C. 1992. Characterization and utilization of the amine dehydrogenase and the protease of *Pseudomonas fluorescens* P-3 Isolated from salt-fermented sardine, *Sardinops melanosticta*. Ph. D. Thesis, Kyungsoong University, Busan, Korea.
 12. Lerke, P. A., S. B. Werner, S. L. Taylor and L. S. Guthertz. 1978. Scombroid poisoning. Report of an outbreak. *West J. Med.* 129, 381-386.
 13. Lerke, P. A., M. H. Porcuna and H. B. Chin. 1983. Screening test for histamine in fish. *J. Food Sci.* 48, 155-157.
 14. Omura, V., R. J. Price and H. S. Olcott. 1978. Histamine forming bacteria isolated from spoiled skipjack tuna and jack mackerel. *J. Food Sci.* 43, 1779-1787.
 16. Satake, K., S. Ando and H. Fugita. 1953. Bacterial oxidation of some primary amines. *The Journal of biochemistry* 49(4), 299-315.
 17. Summer, S. S and S. L. Taylor. 1989. Detection method for histamine-protection dairy-related bacteria using diamine oxidase and leucocrystal violet. *Journal of Food Protection* 52, 105-108.
 18. Taylor, S. L., L. S. Guthertz, M. Leatherwood and E. R. Lieber. 1979. Histamine production by *Klebsiella pneumoniae* an incident of Scombroid fish poisoning. *Appl. Environ. Microbiol.* 37(2), 274-278.
 19. Taylor, S. L and M. W. Speckhard. 1983. Isolation of histamine-producing bacteria from frozen tuna. *Mar, Fish. Rev.* 45, 35-39.
 20. Yoguchi, R., M. Okuzumi and T. Fujii. 1990. Seasonal variation in numbers of mesophilic and halophilic histamine-forming bacteria in inshore of Tokyo Bay and Sagami Bay. *Nippon suisan Gakkishi.* 56(9), 1467-1472.
 21. Yoshinaga, D. H and H. A. Frank. 1982. Histamine-producing bacteria in decomposing skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *Appl Environ. Microbiol.* 44, 447-452.
 22. Yoshinaga, L., T. Kawai and Y. Ishida. 1995. Lysis of *Gymnodinium nagasakiense* by marine bacteria. In: Lassus P, Arzul G, Erard E, Gentien P, Marcailliu C (eds) Harmful Marine Algal Blooms, Lavoisier publishing, Paris, 682-692.