

시판 누룩으로 제조한 막걸리의 품질특성과 biogenic amine 생성

정석태 · 광희정¹ · 김순미^{2*}

국립농업과학원 발효식품과, ¹식품의약품안전처 식품위해평가부 영양기능연구팀,
²가천대학교 생활과학대학 식품영양학과

Quality Characteristics and Biogenic Amine Production of *Makgeolli* Brewed with Commercial *Nuruks*

Seok-Tae Jeong, Hee-Jung Kwak¹, and Soon-Mi Kim^{2*}

Fermentation & Food Science Division, National Academy of Agricultural Science,

¹Nutrition and Functional Food Research Team, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation,

²Department of Food & Nutrition, Gachon University

Abstract *Makgeolli* mashes that were brewed using five different commercial *nuruks* (fermentation starters) were investigated for changes in physicochemistry, microbial diversity, and biogenic amine (BA) production. Mash A brewed with the *nuruk* (Gaeryang-*nuruk*) had the highest level of alcohol concentration and the greatest number of yeast cells, whereas mash E had the greatest number of bacterial cells. Only three biogenic amines were detected in the *makgeolli* mashes: tyramine, putrescine, and cadaverine. Using a PCR-DGGE technique, we observed that mash E had the highest BA production, and had the greatest number of bands on the denaturing gradient gels. We also observed that the numbers of bacterial cells correlated significantly with the putrescine and the total BA content, and that the BA content correlated significantly with the color values (L, a, b). This study shows that the quality of a *makgeolli* can depend on the type of *nuruk*. Therefore, we suggest that the quality management of *makgeolli* should start with the stage of *nuruk* manufacture.

Keywords: *makgeolli* mash, *nuruk*, biogenic amine, PCR-DGGE, microflora

서 론

우리나라는 쌀과 같은 곡물을 발효시킨 곡주양조문화를 갖고 있다. 농경을 생산수단으로 삼았던 우리나라는 삼국형성기에 이미 곡물을 바탕으로 주곡(酒麴, 술누룩)과 곡아(穀芽)를 이용하여 술을 빚는 방법을 익히고 있었으며, 청동기시대까지 건너온 쌀, 밀, 보리, 조, 기장 등의 모든 곡물이 그 술의 원료가 되었다고 한다(1,2). 인위적으로 스타터를 접종하지 않아도 자연적으로 포도나 과일이 발효되어 만들어지는 와인과 달리 곡류는 전분을 수용성 당으로 분해시키는 당화 과정을 필요로 한다. 이 당화과정을 위해 맥주는 맥아에서 생성되는 내열성 전분분해효소를 이용하지만, 아시아-태평양 지역의 고온 다습한 기후는 쌀의 경작과 곰팡이를 이용한 당화에 가장 적절하므로 아시아의 알코올음료는 주로 곰팡이를 이용한 당화제로 제조된다(3,4). 따라서 우리나라는 예로부터 여름철에 자연적으로 곡물에 생육하는 곰팡이, 효모 및 세균을 이용하여 제조한 누룩을 이용하였으며, 이는 전통주 양조에서 당화제와 발효제를 겸비한 미생물 제제의 역할을 한다(5).

누룩은 밀이나 보리, 쌀 등 곡류에 물을 뿌려 반죽하고 성형한 다음 자연적으로 발효시켜서 제조한다. 따라서 당화제의 역할만 하는 일본 코지와 달리 누룩 제조 과정 동안 환경으로부터 유래된 다양한 미생물이 자연적으로 착생하여 생육하므로(4) 누룩이 생산된 지역의 기후나 풍토, 제조 환경 등에 따라 특색 있는 누룩이 만들어 지게 된다. 이러한 미생물의 다양성은 효소활성, 알코올 발효력, 유기산과 유리 아미노산 함량 등에서 차이를 나타내게 되고 이는 전통주의 맛, 향기, 색 등의 품질 특성에 영향을 미치게 된다(6-12). 즉, 우리나라 지역 특산주의 다양성은 결국 각 지방마다의 고유한 누룩의 특성에 기인한다고 할 수 있다. Yu 등(13,14)이 1945년 전과 그 이후의 문헌을 통해 우리나라 전통 누룩의 미생물을 고찰한 연구에 따르면 누룩에서는 총 18속 97종의 사상균과 15속 47종의 효모가 분리·동정되었으며, 세균은 6속 19종이 분리·동정되었는데 누룩 전체 세균의 90% 이상을 차지하는 균은 *Bacillus subtilis*였으며, 젖산균으로는 *Lactobacillus casei*와 *Leuconostoc mesenteroides*가 분리·동정되었다고 하였다. 최근 Song 등(15)은 42종의 누룩에서 *B. amyloliquefaciens*와 *B. subtilis*가 우세한 균이고, 세균수는 평균 7.2 log CFU/10g, 곰팡이는 7.9 log CFU/10g, 효모는 3.5 log CFU/10g, 젖산균은 4.9 log CFU/10g이 포함되어 있다고 보고하였다. 이와 함께 시판 누룩에서 많은 수의 세균이 검출되는 것은 제조공정이 비위생적이기 때문으로 사료된다고 하였으며, 미생물학적으로 위생적이며 당화력이 높고 주정 발효력이 강한 누룩의 제조가 시급하다고 밝힌 바 있다(13,14).

최근 6종류의 서로 다른 누룩을 접종하여 찌쌀과 용수만으로

*Corresponding author: Soon-Mi Kim, Department of Food & Nutrition, Gachon University, Seongnam, Gyeonggi 461-701, Korea
Tel: 82-31-750-5967
Fax: 82-31-750-5974
E-mail: soonmik@gachon.ac.kr
Received August 6, 2013; revised October 1, 2013;
accepted October 2, 2013

제조한 막걸리 술덧의 제조기간 중 미생물의 변화상과 시판 막걸리의 미생물 상을 분자생물학적 기법을 이용하여 연구한 최근 보고(4)에서는 *Bacillus*는 일부 누룩으로 제조한 막걸리에서만 초기에 나타나고 발효 초기에 높은 비율로 존재하던 *Enterobacteriaceae*는 발효가 진행되면서 *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Weissella*와 *Lactococcus* 등의 Lactic acid bacteria(LAB)로 급격히 대체되면서 전체 세균의 77.6%를 차지하였다고 하였다. LAB은 식품의 pH를 낮추고 식품 부패 미생물과 영양물질에 대해 경쟁하고, 이들의 성장을 억제하는 대사산물을 생산하면서 식품에 새로운 풍미와 영양적으로 도움이 되도록 개선해 주는 작용이 있으므로 술 발효에 중요한 역할을 담당한다(16). 최근 유당불내증이나 콜레스테롤을 염려하는 사람 또는 어떤 이유에서든지 유제품 섭취가 어려운 사람들을 위해서 비유제품으로부터 유래한 프로바이오틱스에 대한 요구가 높아지고 있다. 현재까지 식물에서 유래한 LAB에 대한 보고가 많지는 않으나 이들 균종의 건강기능성과 프로바이오틱스로서의 가능성이 활발하게 연구되고 있다(17,18).

막걸리에는 많은 수의 유산균이 존재하며, 특히 여러 종의 *Lactobacillus*가 존재하므로 잠재적인 건강기능성 식품으로서의 연구결과가 기대된다. 그러나 이와는 별도로 많은 연구들은 LAB이 Biogenic Amine (BA)을 생성한다는 사실을 보고하고 있다. BA는 와인을 비롯한 발효주와 각종 발효식품에서 흔히 발견되는 생물학적 활성을 띠는 염기성 유기물질이며, 살아있는 미생물에 의한 아미노산의 탈탄산 반응 결과 생성되는 물질이다(19). 막걸리에서 발견되는 LAB 균종(4,20-22) 중 *Leu. mesenteroides*, *Lac. hilgardii*, *Lac. brevis*, *Lac. plantarum* 등의 균종은 와인에서 BA를 생성할 수 있음이 보고된 바 있다(19). BA는 중추신경 전달물질 또는 혈관계에 작용하는 등 다양한 생리활성을 나타내는 필수 성분이기도 하지만 다량을 섭취할 경우 독성을 나타내기도 한다(23). 식품에서의 아민 함량은 BA를 생성하는 세균의 증식과 함께 증가하므로 BA 함량은 식품의 품질이나 열악한 제조 과정의 지표로 이용되는 것이 제안되고 있다(24).

본 연구진은 이전의 연구에서 시판 막걸리를 4°C와 20°C에 저장할 경우 저장온도와 저장기간이 증가하면서 BA의 생성량이 증가하였고 이와 비례하여 LAB 균종 특히 *Lac. plantarum* 균종의 증가가 뚜렷함을 확인한 바 있다(20). 그러나 *Lac. plantarum* 균주 중에는 생성된 BA를 분해시키는 균주도 있는 만큼(25) 막걸리 제조의 밀거름이 되는 누룩의 상태부터 BA의 형성 및 BA 형성 균주에 대한 연구가 이루어져야 한다. 따라서 본 연구에서는 국내 약·탁주 제조업체에서 사용하는 대표적인 개량누룩 1종과 재래누룩 4종을 선발하여 각각 막걸리를 담고, 담금 과정 중의 각 누룩 별 술덧의 이화학적, 미생물학적 변화와 BA생성특성을 조사함으로써 앞으로 국내 시판 누룩의 품질향상 연구를 위한 기초자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

막걸리 제조

막걸리 제조를 위해 사용한 누룩은 국내에서 대표적으로 유통되고 있는 5종을 각각 구입하였고, 원료용 쌀은 강원도 철원에서 2010년 생산된 것을 건조시킨 증자건조미(moisture 8.07%, Samchang, Ansong, Korea)를 10회 이상 세척하고 3시간 침지한 뒤 2시간 물빼기를 한 다음 사용하였다. 막걸리 제조에 사용된 재료량은 Table 1과 같으며, 시판 누룩의 사용량은 제품 별 당화력을 고려하여 결정하였다(11). 누룩 A의 역가는 다른 누룩에 비해 5

Table 1. Composition of raw materials in makgeolli mashes prepared using commercial nuruks

	Makgeolli mash				
	A	B	C	D	E
Rice (kg)	1	1	1	1	1
Nuruk (g)	20	100	100	100	100
Yeast (g)	4	4	4	4	4
Water (L)	3	3	3	3	3

배 더 강한 것으로, 제조사에서 판매 시 제시한 역가를 기준으로 하였다. 알코올 발효용 효모는 일반적으로 막걸리 발효에 많이 사용하고 있는 *Saccharomyces cerevisiae* (La Parisienne, Lesaffre, Saint-Nazaire, France)를 이용하였으며, 각 처리구별 4g씩 접종하였으며 25°C에서 발효시켰다. 막걸리 술덧의 품질특성 변화는 쌀이 물을 흡수하고 누룩 효소에 의해 발효가 시작되어 분석용 상등액을 취할 수 있는 발효 1일후부터 3일 간격으로 조사하였으며, 효모집중 7일 뒤 압착한 발효액을 냉장보관 하면서 분석용 재료로 사용하였다.

당도 및 pH 측정

술덧의 당도는 디지털 굴절계(PR-201, ATAGO, Tokyo, Japan)로 측정하였으며, pH는 pH meter (Beckman, Model 115PD, Istek, Seoul, Korea)로 측정 하였다.

산도 측정

산도는 시료 1 mL를 취해 phenolphthalein 지시약을 넣고 0.1 N NaOH 용액으로 적정하여 소비된 양을 초산 함량(%)으로 환산하였다(26).

알코올 함량 측정

알코올 농도는 술덧 100 mL를 취하여 국제청의 주류분석규정(27)에 따라 증류한 후 15°C에서 주정계를 이용하여 측정하였다.

휘발산 측정

술덧의 휘발산 함량은 알코올 농도 측정에 사용된 증류액을 30 mL를 취한 후 0.01 N NaOH로 pH가 8.2-8.4가 될 때까지 적정하여 초산으로 환산하였다(28).

색도 측정

술덧의 색도는 UV-visible spectrophotometer (UV spectrophotometer 1601, Shimadzu Co, Kyoto, Japan)를 이용하여 측정하였으며, 밝기(L), 적색도(a), 황색도(b) 값을 측정하여 Hunter's color value로 나타내었다. 이때 대조구로는 증류수를 사용하였다.

미생물 수 측정

효모는 진균수 측정용 페트리필름(Petrifilm, 3M Inc., St. Paul, MN, USA)에 미생물 균체 희석액 1 mL를 도말하여 25°C에서 48시간 배양 후 colony를 계수하여 측정하였다. 세균은 일반세균수 측정용 페트리필름(Petrifilm, 3M Inc.)에 균체 희석액 1 mL를 도말하여 35°C에서 48시간 배양 후 colony를 계수하여 측정하였다. 모든 분석은 3회 반복하여 수행하였다.

미생물의 DGGE 분석

술덧에 함유되어 있는 미생물 분포를 알아보기 위하여 Kim 등

(20)의 방법으로 시료 2-3 mL을 4°C, 13,000 rpm에서 5분간 원심 분리한 후 침전물의 DNA를 추출하고, PCR과 agarose gel electrophoresis 및 DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)를 실시하였다. 추출한 DNA는 세균에 특이적인 primer인 p338f (5'-ACGGGGGGACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')와 P518r (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')을 이용하여 진행하였고, 이후 DGGE 분석을 위해 oligo-GC clamp (5'-CGCCCCGCGCGGCGGGGCGGGGCGGGGCG-3')를 붙인 GC-p338f를 사용하였다. PCR은 10x PCR buffer (BEAMS Biotech., Seongnam, Korea), dNTPs 0.25 mM, Taq DNA polymerase (BEAMS Biotech.), 각 primer 0.3 µM에 1.5 µL의 DNA를 넣어 30 µL의 반응 혼합물을 만들어 PCR Thermal Cycler Dice (TP600, TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan)를 이용해 진행하였다. DGGE 분석은 Dcode™ Universal Mutation Detection system (BioRad Lab Inc., Hercules, CA, USA)을 이용하였다. 전기영동은 30-60% urea-formamide 변성제가 들어 있는 0.75 mm polyacrylamide gel (8%(w/v) acrylamide-bisacrylamide 37.5:1)을 만들어 14시간 동안 1x TAE buffer (Biosesang, Seongnam, Korea)에서 60°C, 80 V로 일정한 온도와 전압을 유지하면서 진행하였다. DGGE gel은 전기영동 후 GelStar Stain (Gel Star™, Lonza, ME, USA)을 이용하여 15분간 염색한 후 Dual UV transilluminator (UVT-260D, Optima, Tokyo, JAPAN)와 Digital Gel Documentation (Gel Doc 1000, BioRad Lab Inc., Hercules, CA, USA)으로 band를 확인하였다.

Biogenic Amine 분석

술덧에 함유되어 있는 BA 분석은 Kim 등(20)의 방법으로 HPLC를 이용하여 histamine, tryptamine, tyramine, phenylethylamine, putrescine, cadaverine, spermidine, spermine 등 모두 8종의 BA를 측정하였다. 즉, 원심 분리한 후 0.20 µm 수용성 filter로 여과한 시료 상층액 200 µL에 CNBF methanol solution (18.5 mM) 100 µL와 H₃BO₃-Na₂B₄O₇(pH 9.5) buffer 300 µL를 섞고, 1 mL까지 증류수로 채운 후 65°C에서 30분간 반응시켰다. 반응은 2M HCl (10 µL)로 종료시켰다. CNBF로 유도된 BA 검출을 위한 이동상으로는 acetonitrile (eluent A)과 HAc-NaAc buffer (0.1 M, pH 6.2, eluent B)를 이용하였다.

HPLC는 UV/Vis detector가 부착된 HPLC (YL9101, Younglin Co., Anyang, Korea)와 Zorbax Eclipse XDB-C18 칼럼(4.6×250 mm, 5 µm, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)을 사용하였다. 이동상의 유속은 1 mL/min, 농도 구배는 eluent A를 초

기 70%에서 100%가 되도록 프로그램하여 총 22분간 시행하였다. 칼럼 온도는 35°C, UV detector의 파장은 254 nm에서 시행하였다. 8가지 BA 표준물질에서 검출된 peak 시간을 바탕으로 표준곡선을 확보한 후, 막걸리 시료에서의 BA 생성 확인을 위한 기준으로 이용하였다.

통계 분석

모든 측정 결과는 MINITAB version 14 (Minitab Inc., State College, PA, USA)를 이용하여 One-way 또는 Two-way ANOVA로 분석한 후 유의차를 검정하였다. 이와 함께 술덧의 물리화학적 특성과 미생물 수에 대하여 BA와의 상관관계를 분석하였다.

결과 및 고찰

pH와 총 산

시판되고 있는 5종의 누룩으로 담금한 막걸리 술덧의 발효 1일, 4일, 7일째의 pH 및 생성된 총 산의 결과는 Table 2와 같다. 발효 초기 술덧의 pH는 4.40-5.00이었으나 4일째 pH 3.58-3.79로 감소하였으며, 이후 약간 증가하는 경향을 보여 7일째 pH는 3.66-4.05를 나타내었다. 개량누룩을 사용한 누룩 A는 4일 이후 다른 시험구에 비해 pH가 크게 증가하는 경향을 나타내었다. 술덧의 총 산은 발효 1일에 3.56-4.66%이었으며, 4일째까지 완만한 증가를 보이다가 7일째에는 3.69-6.7%까지 증가하였으며, 누룩 간 큰 차이를 나타냈다($p < 0.001$). 술덧의 총 산은 누룩 C의 경우 다른 시험구와 달리 발효 초기부터 7일까지 일정한 속도로 증가하였으며, 최종 총 산 함량도 가장 많았던 반면 누룩A는 초기 총 산 함량은 가장 많았으나 4일째 크게 감소하였으며, 7일째 다시 상승하였으나 최종 총 산 함량은 가장 낮았다($p < 0.001$). 본 연구에서 술덧의 발효가 진행됨에 따라 총 산 함량이 증가하는데도 pH가 낮아지지 않는 경향은 Choi 등(11)이 5종의 시판누룩으로 석탄주를 제조한 연구와도 유사하였는데, 이 연구에서는 발효가 진행되면서 유기산이 알코올과 상호 반응하여 ester와 같은 향기 물질 생성에 이용됨으로써 pH가 증가되었을 가능성(29)과 단백질 분해로 아미노산이 증가하여 술덧에 완충작용을 높여 주었을 가능성(30)을 제시하였다. 또한 So 등(30)은 실험실에서 제조한 누룩과 시판누룩 그리고 쌀 입국으로 제조한 막걸리 술덧 중 시판 누룩의 총 산 함량이 발효일수가 경과할수록 현저히 높아진 이유가 다른 술덧에 비해 젖산균의 수가 현저히 많았고 이로 인해 젖산이 생성된 것으로 보았다.

Table 2. The pH, total acidity and total sugar of makgeolli mashes brewed with commercial nuruks

Makgeolli mash	pH			Total acidity (%) ¹⁾			Total sugar (%)		
	1 ²⁾	4	7	1	4	7	1	4	7
A	4.40±0.00 ³⁾	3.57±0.29	4.05±0.03	0.28±0.03	0.19±0.00	0.22±0.01	4.47±0.06	6.23±0.12	7.53±0.32
B	4.90±0.00	3.82±0.03	3.93±0.03	0.21±0.02	0.21±0.02	0.25±0.00	3.27±0.06	5.93±0.15	6.57±0.23
C	4.50±0.00	3.58±0.01	3.66±0.07	0.25±0.00	0.33±0.02	0.41±0.01	3.07±0.21	5.73±0.15	6.63±0.46
D	5.00±0.00	3.73±0.02	3.84±0.10	0.23±0.00	0.24±0.01	0.39±0.09	2.63±0.12	5.33±0.06	5.33±0.49
E	4.97±0.06	3.57±0.26	3.75±0.06	0.21±0.00	0.23±0.02	0.31±0.06	2.90±0.20	5.57±0.29	6.23±0.75
Makgeolli mash ⁴⁾		$p < 0.001$			$p < 0.001$			$p < 0.001$	
Fermentation time ⁵⁾		$p < 0.001$			$p < 0.001$			$p < 0.001$	

¹⁾As acetic acid

²⁾Fermentation time (days)

³⁾Values are expressed as mean±SD.

⁴⁾The effect of commercial nuruks on physicochemical properties in makgeolli mashes

⁵⁾The effect of fermentation time on physicochemical properties in makgeolli mashes

당도

막걸리에서의 당은 막걸리의 향기와 단맛에 영향을 주는 주요 성분이며, 막걸리의 전분질 원료는 당화효소에 의해 당분으로 분해되고 동시에 효모의 영양원이나 발효 기질로 이용되므로 효모의 에탄올 생산농도를 결정짓는 요인이기도 하다(6,11,29). 술덧의 당 함량은 발효 1일에 2.63-4.47%였던 것이 4일째 5.33-6.23%로 크게 증가하였으며 누룩 D를 제외하고는 7일째까지 완만하게 증가하는 경향을 나타내었다(Table 2). 누룩 A는 발효 초기부터 7일째까지 가장 높은 당도를 유지하였으며, 누룩 D의 당도가 가장 낮았다. 당 함량은 누룩의 종류 및 발효기간에 따라 유의적인 차이($p<0.001$)를 나타내었다. 그러나 막걸리나 약주 발효에 있어서 당 함량 및 당류를 포함한 가용성 고형분 함량의 변화는 연구에 따라 많은 차이가 있다. Choi 등(11) 및 Park 등(31)은 본 연구와 유사한 결과를 보고한 반면, Han 등(6), Jin 등(29)은 발효 초기부터 당 함량이 감소한다는 상반된 결과를 보여주고 있다. Park 등(31)은 이러한 차이에 대하여 연구에 사용된 전분질이 증자한 쌀이 아닌 생 전분이므로 호화전분의 분해속도보다 느려서 당화작용이 지속적으로 일어났을 것으로 고찰하였으나 Choi 등(11) 및 본 연구의 경우 증자한 쌀가루나 쌀을 사용한 경우이므로 전분의 호화 여부 이외에 다른 요인의 영향이 있을 것으로 볼 수 있다. 실제 Park 등(32)은 우리의 전통술인 벽향주를 고문헌에 수록된 제법에 따라 7가지의 방법으로 제조하여 실험한 연구에서 제법에 따라 가용성 고형분 함량의 변화 양상이 다양하게 나타남을 보여주었다. 이들 제법은 전분질 원료의 종류 및 함량, 누룩의 사용량, 익반죽 여부와 담금 방법에서 차이를 보이는 만큼 술덧에서의 당 함량의 변화는 다양한 요인에 의해 영향을 받을 것으로 사료된다.

색도

막걸리는 담금 및 저장하는 과정에서 미생물에 의한 발효와 당, 아미노산 함량의 변화 등에 의한 화학적 반응이 일어남에 따라 색도가 변화한다(30,33-35). 5종의 시판누룩으로 담근 막걸리 술덧의 발효기간 중 색도 결과는 Fig. 1에 나타내었으며, L, a, b 값 모두 누룩 종류 및 발효기간에 따른 유의적인 차이($p<0.001$)를 보여주었다. 막걸리 술덧의 밝기를 나타내주는 L값은 발효 초기 누룩 A가 91.90으로 가장 높았으며, 누룩 B가 70.92로 가장 낮아서 누룩에 따른 차이를 보였으나 4일에는 92.03-93.25로 밝기가 증가하였으며, 5종의 술덧 모두 비슷한 수치를 나타내었다. 그러나 7일에 측정된 L값은 65.88-98.62로 큰 차이를 보였다. 즉, 누룩A의 경우 다른 처리구와 달리 4일째 보다 증가하여 발효기간 내내 증가하는 추세를 보인 반면, 누룩 E는 7일에 4일 측정값에 비해 26.15가 감소하여 밝기가 크게 떨어진 것을 알 수 있었다. 반면 적색도를 나타내는 a값은 L값과는 반대로 나타났으며 누룩 사이의 변화 양상은 비슷하였다. 누룩 A의 경우 발효초기 -0.21이었던 것이 4일에 -0.47로 감소하였다가 7일에는 더욱 감소하여 -0.98이 된 반면 누룩 E의 경우 1일, 4일에 각각 -0.16, 0.47이었던 것이 7일에는 4.33으로 급격히 증가하였다. 황색도를 나타내 주는 b값은 a값과 유사한 경향을 보여주었다. 즉, 5종의 누룩으로 담근 막걸리 술덧은 발효 4일째까지는 밝기는 증가하고, 적색과 황색은 감소하였으나 7일에는 다시 밝기는 감소하고 적색과 황색은 증가하는 경향을 보여주었다. 그러나 누룩 A는 발효 7일까지 밝기와 황색은 지속적으로 증가한 반면 적색은 점차 감소하는 것으로 나타났다. 누룩 A의 경우, 원료로 밀기울을 사용하고 배양된 누룩 곰팡이를 접종하여 제조한 것으로 이런 차이가 결과에 반영된 것으로 판단된다.

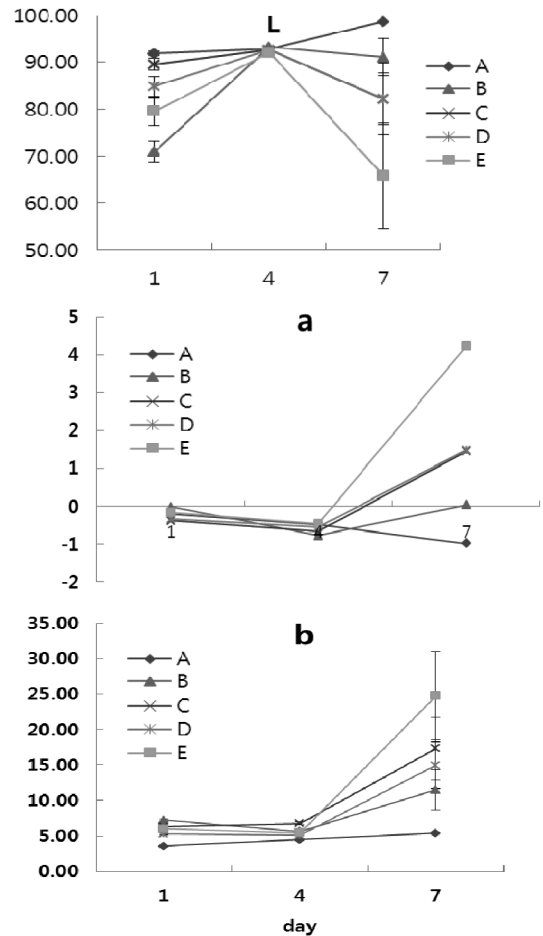


Fig. 1. Changes of color values of *makgeolli* mashes brewed with the five different commercial *nuruks*. Values are expressed as the means±standard deviation. L: lightness, a: redness, b: yellowness

알코올과 휘발산

술덧은 담금 후 원료 중의 전분질이 누룩 중의 당화효소에 의해 당분으로 분해되고 이후 당분은 효모의 발효기질로 이용되므로 일정한 기간까지 알코올 함량이 증가한다(29). 또한 이렇게 생성된 알코올은 유해 미생물의 오염을 방지함과 동시에 효모의 발효력을 향상시켜 주는 중요한 요소가 된다(33). 발효 7일에 측정된 막걸리 술덧의 알코올 농도와 휘발산 함량은 Fig. 2와 같다. 누룩 A의 알코올 농도가 가장 높아서 13.6%를 나타냈으며, 누룩 B(10.37%), 누룩 C(9.73%), 누룩 E(8.05%), 누룩 D(7.9%)의 순서 이었다. 이는 누룩 A를 제외하고는 일반적으로 알려져 있는 막걸리 술덧의 알코올 농도에 못 미치는 결과이다. 대부분의 막걸리 제조사는 쌀 무게 대비 2배 미만의 용수를 사용하여 알코올 농도가 높은 원주를 생산한 후 여기에 물을 첨가하여 최종 알코올 농도를 6-7%로 희석하여 유통을 시킨다(36). 이 경우 알코올 농도가 높아지므로 발효 도중 알코올의 저해작용과 고농도의 당도로 인하여 누룩 속에 존재하는 미생물의 생육이 저해 되어 누룩 간 특성의 차이를 판단하기가 어렵게 된다. 따라서 본 실험에서는 쌀 무게 대비 3배의 용수를 사용하였으며, 이로 인해 알코올의 농도가 낮아진 것으로 볼 수 있다. 실제로 Son 등(36)은 초기 가수량을 달리하여 제조한 막걸리의 품질특성 연구에서 원료 쌀의 2배의 물을 첨가한 대조구의 경우 알코올 농도가 15.5%였으나 4배를 첨가한 막걸리는 8.7%였으며, 가수량이 증가할수록

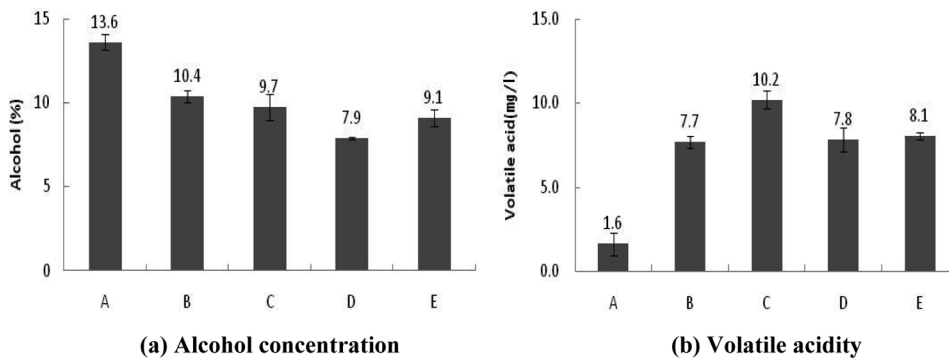


Fig. 2. Alcohol concentration and volatile acidity of *makgeolli* mashes brewed with commercial *nuruks* on day 7. Values are expressed as the means±standard deviation.

알코올 농도는 감소하여 6배 첨가의 경우는 6.1%로 낮아졌다고 보고한 바 있다. 그러나 이들 막걸리 원주를 최종 알코올 함량이 6%가 되도록 가수 하였을 때의 막걸리 총 수율과 알코올 농도, 총 산도 등은 대조구보다 초기 용수의 양을 증가시킬 경우 더 높아진다는 흥미로운 결과를 제시하였으며, 이러한 결과는 용수를 2배 첨가한 대조구에서는 전분이 조금만 당화되어도 물의 양이 적어 당분의 농도가 급격히 증가하여 당화 속도에 영향을 주기 때문으로 추정하였다. 따라서 이러한 영향을 최소화하기 위하여 급수량을 증가시켜 실험한 본 결과에서 실험군별 알코올 함량의 차이가 크게 나타난 것은 누룩 중의 효소력이나 술덧 중에 생육하는 효모의 활성 차이에 기인하는 것으로 추측된다. 반면, 휘발산은 알코올 농도가 가장 높았던 누룩 A의 함량이 극히 낮아서 1.62 ppm 이었고, 누룩 B(7.67 ppm), 누룩 D(7.84 ppm), 누룩 E(9.10 ppm), 누룩 C(10.19 ppm)의 순으로 증가하였다. 막걸리에 함유되어 있는 휘발산은 주로 초산으로, 휘발산 함량이 많다는 것은 발효나 숙성 중에 초산 생성균에 의한 이상발효가 진행되었다는 것을 간접적으로 나타내는 것이다(37). 휘발산은 술의 기호성에 바람직하지 않은 성분으로 과량으로 함유되어 있을 때, 식초냄새와 같은 불쾌취를 내기 때문에 가능한 막걸리 발효에서 생성을 억제할 필요가 있다. 본 실험에서는 대부분 32-204 mg/L 정도의 분포를 보여, 일반적인 막걸리에서 생성될 수 있는 정도의 초산함량을 보였다. 그러나 누룩 종류별 처리구간에는 큰 차이를 보였다. 알코올 농도가 높은 A 누룩의 경우 현저하게 휘발산 함량이 낮았는데, 이러한 결과는 A처리구에서 생성된 고농도의 알코올에 의해 초산균의 생육이 억제된 것으로 판단된다(38).

미생물 균수

발효 1일과 7일에 술덧에 함유되어 있는 효모와 총 세균의 수를 측정된 결과는 Table 3에 나타내었다. 발효 초기에 5.5×10⁷-1.2×10⁸의 범위를 나타내던 효모의 수는 7일에 3.4×10⁶-3.7×10⁷로 유의적으로 감소하였다(p<0.001). 총 세균 수 역시 감소하여 발효 초기 1.3×10⁸-1.4×10⁹의 범위였으나 7일에는 2.7×10⁵-2.9×10⁷로 유의적으로 감소하였다(p<0.001). 술덧 중 가장 높은 알코올 농도를 나타낸 누룩 A의 7일째 효모 수가 가장 많았으며, 누룩 C, 누룩 D, 누룩 E, 누룩 B순이었다. 총 세균 수는 누룩 E가 가장 많았으며, 누룩 C, 누룩 A, 누룩 D, 누룩 B의 순이었다. 막걸리 발효 과정 중의 미생물 수의 변화를 관찰한 연구(30-31,39)는 효모 수는 발효 2일에 최고에 도달하고 이후 감소한다고 하였다. 또한 젖산균 수에 있어서는 So 등(30)은 시판 누룩 술덧은 담금 즉시 많은 수가 존재하였으나 이후 2일까지 급격히 증가한 후 서서히 감소하였다고 하였으며, 모든 술덧에서 미생물의 총 집락수

Table 3. The microbial cell counts of *makgeolli* mashes brewed with commercial *nuruks*

Makgeolli mash	Yeast		Bacteria	
	1 ¹⁾	7	1	7
A	8.6×10 ⁷ ²⁾	3.7×10 ⁷	1.3×10 ⁸	8.5×10 ⁶
B	9.7×10 ⁷	2.5×10 ⁶	2.8×10 ⁸	2.7×10 ⁵
C	1.2×10 ⁸	1.7×10 ⁷	1.4×10 ⁹	2.7×10 ⁷
D	8.1×10 ⁷	5.0×10 ⁶	8.2×10 ⁸	3.1×10 ⁶
E	5.5×10 ⁷	3.4×10 ⁶	1.3×10 ⁸	2.9×10 ⁷

¹⁾Fermentation time (days)

²⁾CFU/mL

는 효모수와 젖산균수를 합한 수와 거의 일치한다고 하였다. 또한 Park 등(31)은 젖산균과 초산균 집락수가 발효 1일째 가장 높았다가 이후 서서히 감소하는 양상을 보인다고 하여 본 연구와 일치하고 있음을 알 수 있었다.

Biogenic amine

막걸리 덧의 발효 1, 4, 7일에 생성된 BA의 종류와 함량을 측정한 결과는 Fig. 3과 같다. 분석 대상인 8종의 BA 중 술덧에서는 tyramine, putrescine과 cadaverine의 3종 만이 검출되었으며, 이중 미량 검출된 cadaverine을 제외한 tyramine, putrescine함량은 누룩의 종류 및 발효기간에 따라 유의적인 차이(p<0.001)를 나타내었다. 5종의 술덧 모두에서 putrescine은 발효 초기인 1일부터 검출되었으며, tyramine은 누룩C, 누룩D, 누룩E의 발효 7일째에서만 검출되었다. Cadaverine은 누룩 E에서만 검출되었으며 발효 1일부터 검출되었다. 이는 4°C에서 저장한 1종의 시판 막걸리에서는 미량의 putrescine만을 검출할 수 있었다는 보고(20) 및 쌀과 밀가루 배합비율을 달리하여 담근 4종의 막걸리를 4°C, 10°C에서 저장한 경우 tyramine, putrescine과 cadaverine 만이 검출되었다는 보고(23)와도 일치한다. 즉, putrescine은 막걸리 뿐만 아니라 막걸리 덧에서도 가장 주된 BA라는 사실을 확인할 수 있었다. 반면, 막걸리를 20°C에서 저장할 때 검출되었던 histamine과 tryptamine(23)은 검출되지 않았다. BA는 발효식품이나 발효주에서 흔히 발견되는 물질로써 식품 원재료에 포함된 효소나 미생물이 분비하는 효소에 의한 아미노산의 탈탄산 반응에 의해 생성된다(40,41). 따라서 식품 중 BA 함량은 미생물의 증식 특히 젖산균과 같은 세균의 증식과 함께 증가하므로 식품의 품질이나 열악한 제조 과정의 지표로 사용할 것을 제안하고 있다(23,24,42). 본 연구결과 누룩 E는 3종의 BA가 모두 검출되었을 뿐만 아니

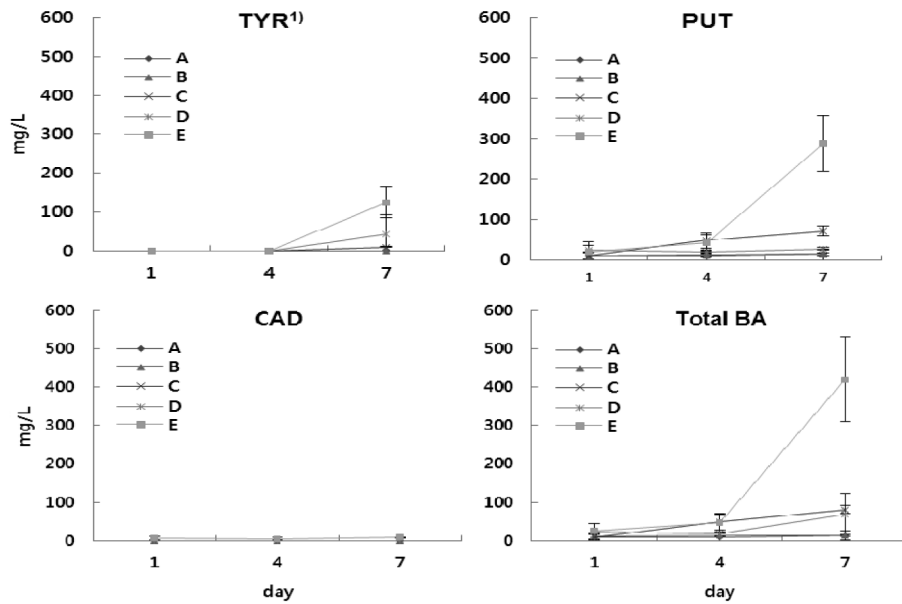


Fig. 3. The individual and total biogenic amine content produced in *makgeolli* mashes brewed with commercial *nuruks*. Values are expressed as the means±standard deviation. ¹⁾TYR: tyramine, PUT: putrescine, CAD: cadaverine, BA: biogenic amine

라 함량 또한 상대적으로 높게 나타났음을 알 수 있다. 이처럼 누룩의 종류만 달리하여 제조한 5종의 술덧에서 생성된 BA의 종류와 함량이 다르다는 사실은 막걸리의 품질은 누룩의 제조 단계에서부터 관리되어야 한다는 사실을 시사한다.

미생물 균총의 변화

5종의 막걸리 덧의 미생물 균총을 발효 1일과 7일째 시료로부터 분석한 DGGE 밴드는 Fig. 4와 같다. 1일째 막걸리 덧의 미생물은 누룩 E를 제외하고는 누룩 간에 별다른 차이를 보이지 않았다. 그러나 7일째는 각각의 술덧 별로 미생물 양상이 다양해지는 것을 알 수 있었고, BA 생성량이 총 세균 수 간의 상관관계도 높지는 않지만 유의적임을 알 수 있었다(0.556, $p < 0.05$). 총 세균 수가 가장 많았던 누룩 E의 밴드가 가장 다양해졌으며, 다른 막걸리 덧의 밴드 패턴과도 차이가 나는 것을 확인할 수 있었다. 본 연구에서는 이들 밴드의 미생물을 동정하지는 않았으나 전보(20)에서 막걸리를 20°C에 저장하는 경우 4°C에 비해서 DGGE 밴드의 수가 증가하였으며, 이들은 주로 젖산균임을 밝힌 바 있다. 또한 젖산균 수의 증가와 함께 검출되는 BA의 종류와 함량이 증가했다는 사실로부터 본 연구에서의 누룩 E의 총 세균수 및 BA 생성이 DGGE 밴드의 다양성과 관련이 있음을 추측할 수 있다.

이화학적 특성과 Biogenic amine 함량의 상관관계

위에서 살펴본 시판 누룩 5종으로 담근 막걸리 술덧의 7일째 이화학적 특성과 BA 함량 간의 상관계수를 Table 4에 제시하였다. 술덧의 알코올 함량과 효모 수, 당도 사이는 유의적인 상관관계를 나타내어 효모수가 증가함에 따라 당으로부터 알코올 생성이 증가함을 알 수 있었다. 한편 총 세균수가 증가하면서 pH는 유의적으로 감소하였으나 총 세균수와 총 산 함량 사이에는 유의적인 상관관계를 볼 수 없었다. 이러한 결과는 본 실험에서 사용한 누룩의 종류에 기인한 것으로 판단되는데, 자연 발효시킨 누룩에는 다양한 세균이 존재하며 세균의 종류에 따라 산 생성능에 큰 차이가 나는 것으로 알려져 있다(43). BA와 미생물 수

1A¹⁾ 1B 1C 1D 1E 7A 7B 7C 7D 7E

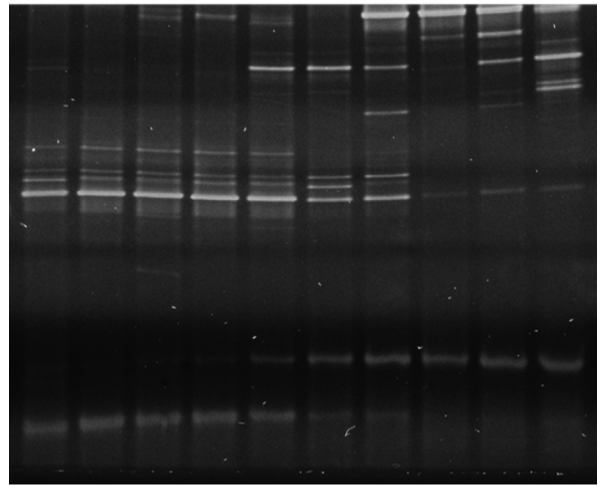


Fig. 4. DGGE profiles of DNA extracted from *makgeolli* mashes brewed with commercial *nuruks* on day 1 and day 7. ¹⁾Number 1 and 7 mean the fermentation day of *Makgeolli* mashes and abbreviation A, B, C, D and E mean *makgeolli* mash brewed with the five different *nuruks*, respectively.

의 관계에서는 총 세균수와 putrescine, 총 BA함량은 5% 수준에서 정의 상관관계를 나타내었으나 효모 수와는 유의적인 관계를 보이지 않았다. 와인의 경우는 사과산 발효과정에서 *Oenococcus oeni* 같은 유산균에 의해 BA가 생성된다는 보고들이 있으며 BA를 생성하는 주된 미생물은 젖산균으로 알려져 있다(44-46). 한가지 특이한 사항은 putrescine과 총 BA 뿐 아니라 3종의 술덧에서만 검출된 tyramine 함량 또한 L, a, b값과 유의적인 상관관계($p < 0.001$)를 나타냈다는 점이다. 이는 본 연구에서 미생물의 변화 및 화학적 변화가 BA의 생성에 영향을 미쳤을 것을 시사하는 결과라 할 수 있다. 막걸리는 우리나라를 대표하는 술답게 많은 연구가 행해져 왔다. 그러나 이들 연구는 대부분 막걸리에 대

Table 4. Correlation coefficients between physicochemical properties and biogenic amine contents of *makgeolli* mashes on 7day

	pH	Acidity	Total sugar	Chromatocity			Alcohol	Volatile acidity	Microbe No.		Biogenic amines		
				L ¹⁾	a	b			Yeast	Bacteria	TYR ²⁾	PUT	Total
pH	1.000	-0.695** ³⁾	0.326	0.613*	-0.597*	-0.665**	0.634*	-0.813***	0.319	-0.707**	-0.419	-0.449	-0.449
Acidity		1.000	-0.379	-0.412	0.396	0.441	-0.665**	0.657**	-0.297	0.261	0.245	0.120	0.161
Total sugar			1.000	0.380	-0.357	-0.364	0.779**	-0.569*	0.510	0.030	-0.276	-0.137	-0.187
L				1.000	-0.999***	-0.990***	0.624*	-0.573*	0.533*	-0.563*	-0.713**	-0.801***	-0.793***
a					1.000	0.984***	-0.601*	0.540*	-0.516*	0.569*	0.732**	0.818***	0.812***
b						1.000	-0.637*	0.654**	-0.562*	0.578*	0.663**	0.782**	0.763**
Alcohol							1.000	-0.799***	0.800***	-0.143	-0.425	-0.304	-0.351
Volatile acidity								1.000	-0.636*	0.380	0.205	0.285	0.264
Yeast									1.000	0.130	-0.384	-0.343	-0.366
Bacteria										1.000	0.392	0.613*	0.556*
TYR											1.000	0.878***	0.943***
PUT												1.000	0.987***
Total BA													1.000

¹⁾L: lightness, a: redness, b: yellowness

²⁾Tyr: tyramine, Put: putrescine

³⁾* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

한 발효 특성이나 영양적 특성에 영향을 미치는 균주 개발에 대한 연구라 할 수 있다(34). 막걸리는 각종 영양성분과 함께 미량의 생리활성물질 등을 함유하고 있을 뿐만 아니라 다수의 효모와 젖산균이 살아있는 상태에서 대량 유통되는 세계적으로도 그 예를 찾아보기 어려운 술이다(47). 그러나 이러한 이점은 제조나 저장, 유통과정 중 관리 소홀로 인하여 막걸리의 품질을 떨어뜨리고 막걸리의 이미지를 저하시키는 요인이 된다. 따라서 막걸리의 품질을 관리하는 표준화된 방법을 확립하여 막걸리 품질 저하 현상을 해결할 수 있는 새로운 방법이 절실히 필요한 실정(34)이며, 막걸리 중의 BA는 막걸리의 품질 지표로 활용될 수 있음을 시사한 바 있다(20,21). 본 연구는 막걸리의 품질관리를 위해서 제조 및 유통단계뿐만 아니라 막걸리의 원료가 되는 누룩에서부터의 관리가 필요함을 시사하고 있으며, 이러한 노력들이 세계적으로 막걸리가 ‘건강에 좋은 술’로 인식되는데 기여할 수 있기를 바란다.

요 약

본 연구는 국내 약·탁주 제조업체에서 사용하는 대표적인 개량누룩 1종과 재래누룩 4종을 선발하여 막걸리를 담고, 담금 과정 중의 누룩에 따른 술덧의 이화학적, 미생물학적 변화와 BA 생성 특성 및 이들의 상관관계를 조사하고자 하였다. 발효 초기 술덧의 pH는 4.40-5.00이었으나 4일째 감소한 후 이후 약간 증가하는 경향을 나타내었다. 발효 7일째의 총 산 함량은 시험구 간의 차이가 크게 나타나 누룩 C가 가장 많았으며, 개량누룩을 사용한 누룩 A가 가장 낮았다. 술덧의 당도는 누룩 D가 가장 낮았으며, 누룩 A는 발효 초기부터 7일까지 가장 높은 당도를 유지하였다. 발효 7일째 술덧의 색도를 측정된 결과 밝기는 누룩 A가 가장 높고, 누룩 E가 가장 낮았으나 적색과 황색은 이와 반대되는 결과를 보여주었다. 술덧의 알코올 농도는 누룩 A가 가장 많았으며, 누룩 B, 누룩 C, 누룩 E, 누룩 D의 순이었으나, 휘발산은 알코올 농도가 가장 많았던 누룩 A의 함량이 가장 낮았다. 술덧의 효모 수와 총 세균 수는 발효 1일에 비해 7일에 감소하였다. 발효 7일째 효모 수는 가장 높은 알코올 농도를 나타낸 누룩 A가 가장 많았고, 총 세균 수는 누룩 E가 가장 많았다.

술덧에서 검출된 BA는 총 3종으로 putrescine은 5종의 술덧 모두에서 발효 초기부터 검출되었으며, tyramine은 누룩 C, 누룩 D, 누룩 E의 발효 7일째에서만 검출되었고, cadaverine은 누룩 E에서만 발효 1일째부터 검출되었다. 이들 술덧의 미생물 균주의 변화를 PCR-DGGE 기법으로 살펴본 결과 발효 1일과 7일째 BA 생성량이 가장 많았던 누룩 E의 밴드가 가장 다양해지는 것을 확인할 수 있었다. 위의 이러한 특성 간의 상관관계를 분석한 결과 총 세균수는 putrescine 및 총 BA 함량과 정의 상관관계를 나타내었고, BA와 색도(L, a, b값) 역시 유의적인 상관관계가 있음을 알 수 있었다. 본 연구는 막걸리의 품질 지표로 활용될 수 있는 BA의 생성이 누룩의 종류에 따라 다르다는 것과 함께 막걸리의 품질 관리는 누룩의 제조 단계에서부터 시작되어야 함을 시사하고 있다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 한식 세계화 및 전통식품 산업화 기술 개발 사업(과제번호: PJ006699) 및 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(과제번호: PJ008600)의 연구비 지원으로 수행된 연구결과물의 일부로 이에 감사 드립니다. 또한 본 연구 수행에 도움을 주신 가천대학교 생명과학과 김재영 교수와 식품영양학과 한아라 학생에게 감사 드립니다.

References

1. Chang JH. Development of alcoholic beverages using traditional alcoholic beverages and rice. *Food Sci. Indus.* 12: 61-63 (1991)
2. Chang JH. History of traditional Korean alcoholic beverages. *Food Sci. Indus.* 3: 42-49 (1990)
3. Lee CH. Cereal fermentations in countries of the Asia-Pacific region. In: *Fermented cereals. A global perspective*, Haard NF, Odunfa SA, Lee CH, Quintero-Ramírez R, Lorence-Quiñones A, Wachter-Radarte C. FAO Agricultural Services Bulletin 138, Rome, Italy (1999)
4. Jung MJ, Nam YD, Roh SW, Bae JW. Unexpected convergence of fungal and bacterial communities during fermentation of traditional Korean alcoholic beverages inoculated with various natural starters. *Food Microbiol.* 30: 112-123 (2012)

5. Kim IH, Park WS, Koo YJ. Comparison of fermentation characteristics of Korean traditional alcoholic beverage with different input step and treatment of rice and *nuruk* (Korean-style bran koji). *Korean J. Diet. Culture* 11: 339-348 (1996)
6. Han EH, Lee TS, Noh BS, Lee DS. Quality characteristics in mash of *takju* prepared by using different *nuruk* during fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.* 29: 555-562 (1997)
7. Lee WK, Kim JR, Lee MW. Studies on the changes in free amino acids and organic acids of *takju* prepared with different *koji* strains. *J. Korean Agric. Chem. Soc.* 30: 323-327 (1987)
8. Kim TY, Yoon IW. Fermentation characteristics of traditional alcoholic beverages brewed with improved *nuruk*. *J. East Asian Soc. Dietary Life* 7: 399-404 (1997)
9. Lee TS, Han EH. Volatile flavor components in mash of *takju* prepared by using *Rhizopus japonicus nuruks*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 32: 691-698 (2000)
10. Lee TS, Choi JY. Volatile flavor components in mash of *takju* prepared by using *Aspergillus kawachii nuruks*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 37: 944-950 (2005)
11. Choi JH, Jeon JA, Jung ST, Park JH, Park SY, Lee CH, Kim TJ. Quality characteristics of *seoktanju* fermented by using different commercial *nuruks*. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* 39: 56-62 (2011)
12. Lee MK, Lee SW, Bae SM. The quality of *yakju* be brewed from many kind of *nuruk*. *J. East Asian Soc. Dietary Life* 1: 99-111 (1991)
13. Yu TS, Kim HS, Ha HP, Kim TY, Yoon IW. Bibliographical study on microorganism of *nuruk* (Until 1945). *J. Korean Soc. Food Nutr.* 25: 170-179 (1996)
14. Yu TS, Kim J, Kim HS, Hyun JS, Ha HP, Park MG. Bibliographical study on microorganism of traditional Korean *nuruk* (Since 1945). *J. Korean Soc. Food Nutr.* 27: 789-799 (1998)
15. Song SH, Lee CH, Lee SH, Park JM, Lee HJ, Bai DH, Yoon SS, Choi JB, Park YS. Analysis of microflora profile in Korean traditional *nuruk*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 23: 40-46 (2013)
16. Calo-Mata P, Arlindo S, Boehme K, de Miguel T, Pascoal A, Barros-Velazquez J. Current applications and future trends of lactic acid bacteria and their bacteriocins for the biopreservation of aquatic food products. *Food Bioprocess Tech.* 1: 43-63 (2008)
17. Rivera-Espinoza Y, Gallardo-Navarro Y. Non-dairy probiotic products. *Food Microbiol.* 27: 1-11 (2010)
18. Molin G. *Lactobacillus plantarum*; The role in foods and in human health. pp. 353-393 In: *Handbook of Fermented Functional Foods*. Farnworth ER (ed), CRC Press, Florida, USA (2008)
19. Ancín-Azpilicueta C, González-Marco A, Jiménez-Moreno N. Current knowledge about the presence of amines in wine. *Crit. Rev. Food Sci.* 48: 257-275 (2008)
20. Kim JY, Kim DH, Park P, Kang HI, Ryu EK, Kim SM. Effects of storage temperature and time on the biogenic amine content and microflora in Korean turbid rice wine, *makgeolli*. *Food Chem.* 128: 87-92 (2011)
21. Kwon SJ, Ahn TY, Sohn JH. Analysis of microbial diversity in *makgeolli* fermentation using PCR-DGGE. *J. Life Sci.* 22: 232-238 (2012)
22. Min JH, Kim YH, Kim JH, Choi SY, Lee JS, Kim HK. Comparison of microbial diversity of Korean commercial *makgeolli* showing high β -glucan content and high Antihypertensive activity, respectively. *Mycobiology* 40: 138-141 (2012)
23. Kim SM, Han AR. Storage properties and biogenic amines production of *makgeolli*s brewed with different proportions of rice and wheat flour. *Korean J. Food Sci. Technol.* 44: 583-591 (2012)
24. Landete JM, Ferrer S, Polo L, Pardo I. Biogenic amine in wines from three spanish regions. *J. Agr. Food Chem.* 53: 1119-1124 (2005)
25. Fadda S, Vignolo G, Oliver G. Tyramine degradation and tyramine/histamine production by lactic acid bacteria and *Kocuria* strains. *Biotechnol. Lett.* 23: 2015-2019 (2001)
26. Song JC, Park HJ, Shin WC. Change of *takju* qualities by addition of cyclodextrin during the brewing and aging. *Korean J. Food Technol.* 29: 895-900 (1997)
27. NTSTSI. Manufacturing guideline of *takju* and *yakju*. National Tax Service Technological Service Institute. Seoul, Korea, pp. 195-198 (2005)
28. Park CS, Lee TS. Quality characteristics of *takju* prepared by wheat flour *nuruks*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 34: 296-302 (2002)
29. Jin TY, Kim ES, Eun JB, Wang SJ, Wang MH. Changes in physicochemical and sensory characteristics of rice wine, *yakju* prepared with different amount of red yeast rice. *Korean J. Food Sci. Technol.* 39: 309-314 (2007)
30. So MH, Lee YS, Noh WS. Changes in microorganisms and main components during *takju* brewing by a modified *nuruk*. *Korean J. Food Nutr.* 12: 226-232 (1999)
31. Park JH, Yeo SH, Choi JH, Jeong ST, Choi HS. Production of *makgeolli* using rice treated with *gaeryang-nuruk* (for non-steaming process) extract. *Korean J. Food Preserv.* 19: 144-152 (2012)
32. Park JH, Yeo SH, Jeong ST, Choi HS, Jeon JA, Choi JH. Characteristics of *byeok-hyang-ju* made by various processing methods originated from ancient documents. *Korean J. Food Preserv.* 17: 826-834 (2010)
33. Kim JY, Sung KW, Bae HW, Yi YH. pH, acidity, color, reducing sugar, total sugar, alcohol and organoleptic characteristics of puffed rice added *takju* during fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.* 39: 266-271 (2007)
34. Lee JW, Shim JY. Quality characteristics of *makgeolli* during freezing storage. *Food Eng. Prog.* 14: 328-334 (2010)
35. Lee JW, Park JW. Quality characteristics of *makgeolli* during separation storage methods. *Food Eng. Prog.* 14: 346-353 (2010)
36. Son HS, Park BD, Ko BK, Lee CH. Quality characteristics of *takju* produced by adding different amounts of water. *Korean J. Food Sci. Technol.* 43: 453-457 (2011)
37. Fleet GH. *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Philadelphia, PA, USA. pp. 400-401 (1993)
38. Yang HG. *Food Industry*. Semunsa, Seoul, Korea. pp. 370-384 (1994)
39. Park JH, Bae SM, Yook C, Kim JS. Fermentation characteristics of *takju* prepared with old rice. *Korean J. Food Sci. Technol.* 36: 609-615 (2004)
40. Silla-Santos MH. Biogenic amines; their importance in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 29: 213-231 (1996)
41. Brink BT, Damink C, Joosten H, Huis in't Veld J. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 11: 73-84 (1990)
42. Önal A. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chem.* 103: 1475-1486 (2007)
43. Park CD, Jung HK, Park HH, Hong JH. Identification and fermentation characteristics of lactic acid bacteria isolated from hahyangju *nuruk*. *Korean J. Food Preserv.* 14: 188-193 (2007)
44. Lonvaud-Funel A, Joyeux A. Histamine production by wine lactic acid bacteria; isolation of a histamine producing strain of *Leuconostoc oenos*. *J. Appl. Bacteriol.* 77: 401-407 (1994)
45. Moreno-Arribas V, Torlois S, Joyeux A, Bertrand A, Lonvaud-Funel A. Isolation, properties and behaviour of tyramine-producing lactic acid bacteria from wine. *J. Appl. Microbiol.* 88: 584-593 (2000)
46. Rosi I, Nannelli F, Giovani G. Biogenic amine production by *Oenococcus oeni* during malolactic fermentation of wines obtained using different strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *LWT-Food Sci. Technol.* 42: 525-530 (2008)
47. Lee HS, Kwak HJ, Kim JY, Cho WK, Kim SM. A survey of drinking habits and health perception of *makgeolli*. *Korean J. Food Culture* 25: 544-557 (2010)