

막걸리에서 분리한 *Lactobacillus plantarum*의 biogenic amine 생성능

곽희정 · 김재영¹ · 이현숙² · 김순미^{3,*}

식품의약품안전평가원 식품위해평가부 영양기능연구팀,
¹가천대학교 생명과학과, ²동서대학교 식품영양학과, ³가천대학교 영양학과

Formation of Biogenic Amines by *Lactobacillus plantarum* Isolated from *Makgeolli*

Hee Jung Kwak, Jae Young Kim¹, Hyun Sook Lee², and Soon Mi Kim^{3,*}

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

¹Department of Biological Science, Gachon University

²Department of Food Science and Nutrition, Dongseo University

³Department of Food and Nutrition, Gachon University

Abstract We examined biogenic amine (BA) production as well as the diversity of bacterial flora in 11 types of commercial *makgeolli* stored at 4 and 20°C. Moreover, we studied the BA-producing activity of three *L. plantarum* strains isolated from *makgeolli*. At 20°C, the BA content was highly increased and the denatured DNA bands were more variable in non-sterilized *makgeolli* compared to sterilized *makgeolli*. The major BAs produced in commercial *makgeolli* were histamine and putrescine. Histamine, tyramine, putrescine, and cadaverine were produced in excess by inoculation of the three *L. plantarum* isolates to *makgeolli* stored at 20°C for 21 days. These results suggest that some *L. plantarum* strains in *makgeolli* can produce different types of BAs, depending on the extent of degradation of *makgeolli*.

Keywords: *makgeolli*, *Lactobacillus plantarum*, biogenic amine, storage temperature

서 론

막걸리는 쌀을 주원료로 하고 누룩을 중간 배양하여 발효시킨 뒤 여과과정 없이 혼탁하게 거른 술로써, 이 중 누룩은 각종 효소와 함께 자연 발생한 곰팡이, 효모, 세균을 비롯한 발효 미생물의 급원이 된다(1,2). 막걸리는 알코올 발효 과정만을 거치는 와인과 달리 누룩의 곰팡이에 의한 전분의 당화과정과 효모에 의한 알코올 발효가 동시에 일어나는 이중 발효 과정을 거쳐 제조된다(3). 하지만 시판 막걸리는 쌀 이외에도 밀, 옥수수, 고구마 등의 다양한 전분 원료를 사용하며, 누룩 이외에도 효모, 고지 등을 첨가하여 발효시키기도 하고, 과일이나 약초를 첨가하기도 한다(4-6).

막걸리 미생물로는, 막걸리 누룩에서 *Aspergillus oryzae*, *A. niger*, *A. kawachii*, *A. shirousamii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhizopus tritici* 등 여러 누룩곰팡이와 효모들이 분리되었고(7-15), 막걸리에서 *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus acidilactici*, *P. pentosaceus*, *P. damnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *L. murinus*, *L. coprophilus*, *L. collinoides*, *L. brevis*, *L. casei*, *Lactococcus*

lactis subsp. lactis, *Enterococcus faecium* 등의 다양한 유산균이 분리되었다(8,10,13,14,16-19). Jin 등(18)과 Kim 등(19)은 15종의 시판 막걸리에서 16S rRNA 유전자 sequencing을 통해 7종의 *Lactobacillus* (*L. paracasei*, *L. arizonensis*, *L. plantarum*, *L. harbinensis*, *L. parabuchneri*, *L. brevis*, *L. hilgardii*) 유산균을 동정하였다. Min 등(20)과 Kim 등(21)은 막걸리를 4°C와 20°C로 저장하면서 효모와 유산균의 변화를 확인한 결과, 4°C에서는 미생물의 수는 유지되고 *P. acidilactici*가 주종을 이루는 반면, 20°C에서는 효모와 유산균 수가 초기에 증가하다 30일째에 감소하고 *L. plantarum*이 주종을 이루었다고 보고하였다. 이는 살균하지 않은 막걸리의 미생물상은 발효 중에도 다양하게 변화하며, 저장 조건에 따라서도 달라진다는 것을 의미한다.

이와 같이 막걸리에는 많은 수의 유산균이 존재하며, 특히 여러 종의 *Lactobacillus*가 존재하므로 술이지만 잠재적인 건강기능 식품으로서의 효과가 기대된다. 그러나 유산균, 육류, 치즈, 와인 등에서 biogenic amine (BA)이 생성되는데(22), BA는 와인을 비롯한 발효주와 각종 발효식품에서 흔히 발견되며, 주로 미생물에 의한 아미노산의 탈탄산반응 결과로 생성된다(23-27). BA는 생체 내에서 많은 생물학적 활성을 가지나, 한편 인체 건강에 해로운 영향을 미칠 수도 있다. BA를 고농도로 섭취 할 경우 중추신경의 신경전달물질 또는 혈관계에 직·간접적으로 영향을 미쳐 심계항진, 고혈압, 구토, 두통 등을 유발할 수 있으며(25,28,29), 일부 BA는 N-nitrosoamine과 같은 강력한 발암물질로 전환될 수 있는 잠재성을 갖고 있다(23,28-32). 막걸리에서 발견되는 유산균종(21,33-35) 중 *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus hilgardii*,

*Corresponding author: Soon Mi Kim, Department of Food and 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 January 9, 2014; revised April 16, 2014;
accepted April 16, 2014

Lactobacillus brevis, *Lactobacillus plantarum* 등의 균종은 와인에서 BA를 생성할 수 있음이 보고된 바 있다(23). 식품에서의 아민 함량은 BA를 생성하는 세균의 증식과 함께 증가하므로 BA 함량은 식품의 품질이나 열악한 제조 과정의 지표로 이용되는 것이 제안되고 있다(5,36).

Kim 등(21)은 상온(20°C)에서 장기간 보관한 막걸리에서 체내에 부정적인 영향을 미칠 수 있는 6종의 BA가 다량 검출되었다는 사실을 보고했다. 또한 BA 생성량의 증가와 비례하여 유산균 중 특히 *L. plantarum* 균종의 증가가 뚜렷함을 확인한 바 있다. 한편 *L. plantarum* 균주 중에는 생성된 BA를 분해시키는 균주도 있는 만큼(37) 막걸리의 BA의 형성과 BA 형성 균주 및 이를 분해시킬 수 있는 균주에 대한 연구가 이루어져야 할 필요가 있다.

최근 막걸리에 대한 연구가 활발히 진행되면서 막걸리 내 유효성분과 미생물에 의한 다양한 기능성이 속속 밝혀지고 있는데, 막걸리의 안전성에 위해요인이 될 수 있는 BA는 중요하게 다뤄야 할 문제이다. BA 생성을 낮출 수 있는 조건을 알아내는 것은 막걸리의 안전성을 확보하여 한국 전통주로서의 위상을 높이고 국내·외 시장을 확대하는데 기여할 수 있을 것으로 본다. 아직까지 막걸리 내 BA 생성과 유산균에 관한 연구는 거의 없다. 본 연구는 시판되고 있는 11종의 막걸리를 4°C 또는 20°C에서 저장하여 BA 생성을 살펴보고 이 중 한 종의 막걸리에서 우점종인 유산균을 찾아낸 후 멸균한 막걸리에 이 균주를 첨가하여 BA 생성여부를 확인하고자 하였다. 또한 활성조효소, 아미노산의 첨가 여부에 따른 이들 유산균의 BA 생성능을 비교해 보았다.

재료 및 방법

재료 및 시약

실험에 사용한 시판 막걸리는 인천광역시 대형마트, 탁·약주 대리점 및 소규모 상점에서 구입한 총 11종 이었다(Table 1). 구입한 막걸리는 4°C 또는 20°C에 각각 10일간 보관한 후 BA 및 미생물 분석에 사용하였다. Histamine (H7250), tryptamine (193747), tyramine (H8502), phenylethylamine (P6513), putrescine (P7505), cadaverine (D22606), spermidine (S2626), spermine (S3256) 등 8종의 biogenic amine과 pyridoxal phosphate (P3657), methanol (34860), 4-chloro-3,5-dinitrobenzotrifluoride (CNBF, 197017), H₃BO₃ (B0252), Na₂B₄O₇ (B9876), sodium acetate (S8750), phenol (P4557), chloroform (C2432), urea (U6504), formamide (47670)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다. Acetonitrile은 Fisher Scientific Inc. (Seoul, Korea)에서 구입하였으며, acetic acid (HAc, 99.7%)는 Showa (Tokyo,

Japan), Tris buffer (0826), sodium dodecyl sulfate (0227), EDTA (0105)는 AMRESCO (Solon, OH, USA) 제품을 각각 사용하였다. 또한 Proteinase K와 RNase A는 iNtRon Biotechnology (Seongnam, Korea), PCR buffer와 Taq DNA polymerase는 BEAMS Biotech (Seongnam, Korea), PCR Thermal Cycler Dice는 TaKaRa Bio Inc. (TP 600, Shiga, Japan)에서 각각 구입하였으며, TBE buffer는 (주)바이오세상(Seongnam, Korea)에서 구입하였다.

막걸리의 BA 측정

막걸리의 BA는 Tang 등(38)의 방법을 응용하여 HPLC로 측정하였다. 막걸리 시료 1 mL을 원심분리기(Micro 17TR, Hanil Science Industrial Co., Inchun, Korea)에서 13,000 rpm (28,756×g)에서 4°C, 5분간 원심분리 하여 얻은 상층액 0.2 µm을 cellulose acetate filter (25CS020AS, ADVANTEC, Tokyo, Japan)로 여과하여 측정 시까지 -20°C 이하에서 보관하였다. 원심분리 후 여과한 상층액 200 µL을 CNBF methanol solution (18.5 mM) 100 µL와 H₃BO₃-Na₂B₄O₇ (pH 9.5) buffer 300 µL와 섞고, 1 mL까지 증류수로 채운 후 65°C에서 30분간 반응시켰다. 2 M HCl 10 µL을 첨가하여 반응을 종료시키고 HPLC로 BA 생성을 확인하였다. 사용한 기기와 컬럼은 각각 L9100 HPLC System (Younglin Int. Co., Anyang, Korea)과 Zorbax Eclipse XDB-C18 컬럼(4.6 ×250 mm, 5 µm, Agilent Technologies Co., Wilmington, DE, USA)이었다. HPLC의 측정은 이동상의 flow rate를 1 mL/min, 농도 구배는 eluent A를 초기 70%에서 100%가 되게 프로그램 하여 총 22분간 시행하였다. 이동상으로 acetonitrile (eluent A)과 sodium acetate buffer (0.1 M, pH 6.2, eluent B)를 이용하였다. 더 높은 검출 한계값을 얻기 위해 CNBF 유도반응 종료 후, 시료 주입 전의 여과 과정을 생략하였다. 컬럼 온도는 35°C, UV detector 파장은 254 nm에서 측정하였다. 8가지 BA 표준물질(histamine, tryptamine, tyramine, phenylethylamine, putrescine, cadaverine, spermidine, spermine; ≥99%)을 동일한 과정으로 측정하여 분석한 peak 시간과 면적을 바탕으로 표준곡선을 작성한 후, 시료 BA의 분석 시 검출된 BA peak 그래프의 정량을 위한 기준으로 이용하였다(Fig. 1). BA 분석은 세 번 반복하여 그 값을 평균과 표준편차로 나타내었다.

막걸리 유산균의 PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) 분석

시판 막걸리 내에 BA를 생성하는 미생물을 동정하기 위해 막걸리 시료 2-3 mL을 13,000 rpm (28,756×g), 4°C에서 5분간 원심

Table 1. List of the commercial makgeolli used in this study

Sample	Alcohol content (%)	Ingredients of <i>makgeolli</i>	note
A	5	rice 50%, wheat 40%, starch 10%	raw
B	6	rice 100%	raw
C	6	rice 33.9%, wheat 62.9%, fructo-oligosaccharide 3.2%	raw
D	6	rice 90%, starch sugar 10%	raw
E	6	rice 100%	raw
F	7	wheat 100%	raw
G	7	rice 10%, wheat 77.22%, oligosaccharide 10%	raw
H	9	wheat 76%, starch 24%	raw
I	6	rice 90%, oligosaccharide 10%	sterilized
J	7	rice 100%	sterilized
K	6	rice 90%, isomalto-oligosaccharide 10%	raw

분리 하여 얻은 pellet을 이용하였고, 분석 전까지 -20°C 이하에서 보관하였다. DNA 추출은 phenol 법(39-41)을 이용하였다.

추출한 DNA는 박테리아에 특이적인 primer, p338f (5'-ACGGG GGGACTCTACGGGAGGCAGCAG-3')와 p518r (5'-ATTACCGC GGCTGCTGG-3')을 이용하여 polymerase chain reaction (PCR)을 진행하였고 이후 변성 구배 젤 전기영동(DGGE) 분석을 위해 oligo-GC clamp (5'-CGCCCGCCGCGCGGGGGGGGGGGGG GGC-3')를 붙인 GC-p338f를 사용하였다. PCR은 $10\times$ PCR buffer, 0.25 mM의 각각의 dNTPs, 5IU Taq DNA polymerase, 0.3 μM 의 각각의 primer에 1.5 μL 의 DNA를 넣어 30 μL 의 반응혼합물을 만들어 주고 PCR Thermal Cycler를 이용하여 진행하였다. 증폭 조건은 94°C 에서 5분간 최초 변성과정을 진행한 뒤 94°C 에서 30초 동안 변성, 58°C 에서 30초 동안 primer 붙이기, 72°C 에서 30초 동안 DNA 연장을 35회 반복한 뒤 마지막 72°C 에서 10분간 최종 DNA 연장을 진행하였다. PCR 산물은 1.5% agarose gel을 0.5X TBE buffer (T2004, Biosesang, Seongnam, Korea)에 넣고 전기영동(Mupid-2 plus, OPTIMA, Tokyo, JAPAN)을 하여 Dual UV transilluminator (UVT-260D, OPTIMA, Tokyo, JAPAN)와 GS-700 Imaging Densitometer, Digital Gel Documentation (BioRad Lab Inc., CA, USA)으로 bacteria specific band를 확인한 뒤 DGGE 분석을 하였다.

DGGE는 Dcode™ Universal Mutation Detection System (Bio-Rad Lab Inc., Hercules, CA, USA)을 이용하였다. 전기영동은 urea와 formamide (47670) 변성제가 30-60% 농도차가 있는 8% (w/v, acrylamide-bisacrylamide 37.5:1, BIO-RAD) polyacrylamide gel을 만들어 14시간 동안 1x TAE buffer 안에서 60°C , 80V (Power Pac™ HC, BIO-RAD, Hercules, CA, USA)로 일정한 전압과 온도를 유지하면서 진행하였다. 전기영동 후 DGGE gel은 GelStar Stain™ (Lonza, Rockland, ME, USA)을 이용해 15분간 염색한 뒤 Dual UV transilluminator와 Digital Gel Documentation (GelDoc 1000, Bio-Rad Lab Inc., Hercules, CA, USA)으로 band를 확인하였다. 멸균한 날로 젤 안의 band를 자른 뒤, 증류수와 섞어 튜브에 넣고 상온에 보관한 뒤 (주)솔젠트(Daejeon, Korea)에서 DNA를 추출하여 염기서열을 분석하였다. 이후 NCBI BLAST search를 이용해 확인하였다.

막걸리 유산균의 분리

유산균 균주 분리에 사용한 막걸리는 Table 1의 K 제품이었다. 이를 20°C 에서 7일간 저장한 뒤, 0.1 mL를 취해 Difco™ *Lactobacilli* MRS agar (288210, BD Difco, Sparks, MD, USA) 평판배지에 도말한 후 Incubator (VS-1203P3V, Vision Scientific, Daejeon, Korea)에서 28°C , 24시간 배양하였다. 여기서 생성된 colony를 순수 분리하여 각각 Difco™ *Lactobacilli* MRS broth (288130, BD Difco, Sparks, MD, USA)에서 증식시켰다.

막걸리에서 분리한 colony를 동정하기 위하여 API 50CH (BioMerieux, Lyon, France)로 탄수화물 대사시험(carbohydrates metabolic test)을 진행하였다. 이후 분리한 균주로부터 추출한 DNA를 주형으로 16s rRNA 유전자를 PCR 반응으로 증폭시켰다. PCR

반응에는 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1492R (5'-GGCTACCTTGTACGACT-3')을 primer로 사용하였다. 염기서열 분석은 (주)솔젠트(Daejeon, Korea)에 의뢰하여 진행하였다. API 50CH test와 16s rRNA 염기서열 분석을 통해 분리된 균주가 Table 2와 같이 *Lactobacillus plantarum* 균주임을 확인하였고 이후의 실험에 사용하였다.

*Lactobacillus plantarum*의 BA 생성능

L. plantarum 균주의 BA 생성능을 확인하기 위해 막걸리를 멸균하고 여기에 분리한 *L. plantarum*을 접종 한 후 배양하여 BA를 측정하였다. 각각의 *L. plantarum* colony는 MRS broth 배지에서 $\text{OD}_{600\text{nm}}=0.5$ 정도가 되었을 때 멸균한 막걸리 3 mL에 30 μL 씩 접종하여 진탕배양기(VS-8480SF, Vision Scientific, Daejeon, Korea)에서 28°C 로 유지하면서 배양한 후 Tang 등(38)의 방법을 응용하여 HPLC로 BA를 검출하였다. 즉 막걸리를 13,000 rpm (28,756 \times g), 4°C 에서 5분간 원심분리 하여 얻은 상층액을 0.2 μm filter로 여과한 후 앞에서 기술한 것과 동일한 CNBF 유도과정과 HPLC 분석법을 사용하였다. 이 때 멸균한 막걸리는 Table 1의 D 제품으로서, 4°C 에서 3일 보관한 신선한 막걸리와 20°C 에서 21일 보관한 오래된 막걸리를 각각 121°C 에서 15분간 가열하여 멸균하였다. 멸균 막걸리 배양액에 PLP, 또는 PLP와 아미노산을 같이 첨가하여 이들 첨가여부에 따라 BA 생성능이 달라지는지를 확인하였다. PLP는 *L. plantarum*의 아미노산 탈탄산반응에 관여하는 조효소이므로 첨가하였고, 아미노산은 멸균에 의해 BA의 전구체인 아미노산이 변성되었을 것을 우려해 BA의 전구체로 사용되는 아미노산 6가지(tyrosine, histidine, phenylalanine, ornithine, lysine, tryptophan)를 각각 2 g/L씩 첨가해 주었다.

결과 및 고찰

시판 막걸리의 BA 함량

본 연구에서 사용한 시판 막걸리는 총 11종이었다. 이중 살균 막걸리는 2종이었고 나머지 9종은 생막걸리였다. 막걸리의 알코올 함량은 5.9%였으며, 유통기한은 살균막걸리는 3개월-1년, 생막걸리는 10-30일까지로 다양하였다. 막걸리의 원재료도 소맥분 100% 또는 쌀 100%인 제품 이외에도 쌀, 소맥분, 전분, 전분당 등의 비율을 달리한 제품 등 다양하였으며, 제조일 부터 구입 시까지의 경과일도 당일에서 26일(살균제품)까지 다양하였다(Table 1). 구입한 제품은 실험 시까지 4°C 와 20°C 에 10일간 보관한 후 BA 및 미생물 동정에 사용하였다.

시판 막걸리를 4°C 와 20°C 에서 10일 동안 저장한 뒤 생성된 BA 함량을 측정한 결과는 Table 3과 같다. 생막걸리는 4°C 에 비해 20°C 에서 저장한 경우 저장기간이 증가함에 따라 BA 양이 급격히 증가한 반면, 살균 막걸리는 저장온도에 따른 BA 변화가 거의 없었다. 시판 막걸리에서 가장 많이 검출된 BA는 histamine과 putrescine이고 spermine과 spermidine은 극소량 검출되었다. Putrescine은 저장온도 및 살균 여부에 관계없이 검출되어 putrescine이 막걸리의 주된 BA임을 알 수 있었다. 와인의 주요

Table 2. Lactic acid bacteria used in this study

Strain	Sequencing	Primer	Length
<i>L. plantarum</i> T3-10	16s rRNA gene, Partial sequence	27F-1492R	1447 bp
<i>L. plantarum</i> bh6	16s rRNA gene, Partial sequence	27F-1492R	1468 bp
<i>L. plantarum</i> M01210	16s rRNA gene, Partial sequence	27F-1492R	1471 bp

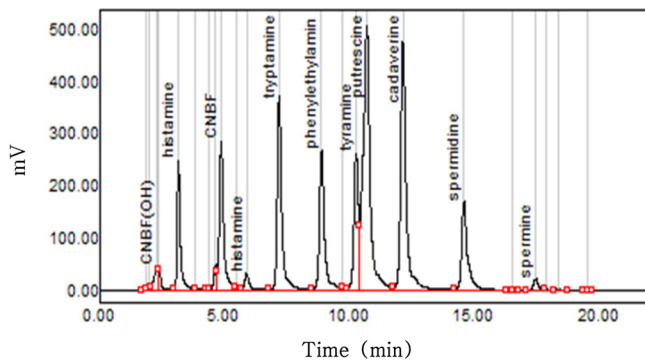


Fig. 1. HPLC chromatogram of the CNBF derivatives of 200 μ M biogenic amines standard solution.

3대 BA는 histamine, tyramine, putrescine이라고 보고된 바 있어 (42,43), 본 연구와 유사하였다.

시판 막걸리 중 G 제품은 4°C에서 저장한 경우에도 histamine 이 471.48±48.98 mg/L로, 같은 온도에서 저장한 생막걸리 중 유일하게 histamine이 다량으로 검출되었다. Histamine은 식중독과 부분적인 면역 시스템 장애, 알레르기를 유발할 수 있으며(23), tyramine과 phenylethylamine은 혈관수축인자들을 분비해서 고혈압을 일으킬 수 있다(44). Putrescine, cadaverine, spermine, spermidine은 이들 자체의 독성은 없으나 histamine과 tyramine, phe-

nylethylamine의 간과 장내 대사과정에 관여하는 monoamine oxidase, diamine oxidase와 반응하여 이들의 부정적 효과를 악화시킬 수 있고, 또한 질산염과 반응하여 발암물질인 니트로소아민을 형성할 수 있다(28-32,45,46). 식품 내 histamine 섭취 시 8-40 mg은 약한 정도, 40-80 mg은 중등 정도, 100 mg 이상은 극심한 중독증상을 일으킬 수 있는데, 반면 tyramine은 100 mg 이상을 섭취해야 중독증상을 일으킬 수 있다고 보고되어 있다(47). G 막걸리는 tyramine (135.73±9.81 mg/L)과 putrescine (188.90±7.76 mg/L)도 다른 시판 막걸리에 비해 많이 검출되었다. 그러나 모든 BA가 부정적인 효과를 주는 것만은 아니다. Putrescine, cadaverine, spermidine 등 일부 BA는 유리라디칼 소거능이 있고, tyramine의 경우 매우 높은 항산화 효과를 갖는다는 보고가 있다(48,49).

시판 막걸리 중 쌀을 90% 이상 함유한 B, D, E, K 생막걸리는 4°C에서 저장할 경우 10일 뒤에도 총 BA의 양이 16.86-33.42 mg/L로 증가되지 않고 유지되는 경향을 보이고, histamine이나 tyramine 등의 BA가 생성되지 않았다. 이것은 쌀로 만든 막걸리가 다른 원료로 제조한 막걸리에 비해 저온저장 시 BA 생성이 효과적으로 억제될 가능성을 제시해 주는 것이다. 실제로 Kim과 Han(5)은 최근 쌀과 밀가루 배합비율을 달리하여 막걸리를 담가 4°C와 20°C에 저장하며 BA 생성량을 살펴 본 결과 쌀만으로 제조되었거나 쌀 배합비율이 높은 막걸리는 밀가루 비율이 높은 막걸리에 비해 4°C 뿐만 아니라 20°C에서도 BA 생성이 크게 감소했다는 결과를 보고한 바 있다.

원료 및 제조공정이 표준화되어있는 시판 맥주의 경우, 제조사

Table 3. Analysis of biogenic amine contents in commercial *makgeolli* stored at 4 or 20°C, 10 days (mg/L)

	A	B	C	D	E	F	G	H	I ¹⁾	J	K
Stored at 4°C, 10 days											
HIS ²⁾	ND ³⁾	ND	ND	ND	ND	ND	471.5±49.0	ND	ND	ND	ND
TPR	ND	ND	ND	ND	ND	7.6±13.1	ND	1.8±3.1	5.2±9.0	ND	ND
PHE	ND	ND	ND	ND	ND	16.4±28.5	ND	ND	7.4±12.9	ND	ND
TYR	62.6 ⁴⁾ ±5.0	ND	ND	ND	ND	1.9±3.3	135.7±9.8	2.8±2.8	6.4±8.5	ND	ND
PUT	128.6±36.6	24.5±10.3	14.1±5.3	33.4±4.6	6.8±1.7	17.0±0.8	188.9±7.8	14.0±1.9	43.5±8.4	48.9±3.5	23.6±21.0
CAD	3.9±6.8	ND	6.1±10.5	ND	10.1±4.3	1.1±1.9	2.9±2.9	3.6±3.2	6.8±11.8	0.7±0.6	ND
SPD	2.2±3.8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	12.5±12.9	7.4±6.4	ND
SPM	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Total	197.3	24.5	20.2	33.4	16.9	44.0	799.0	22.2	81.8	57.0	23.6
Stored at 20°C, 10 days											
HIS	415.9 ±72.7	936.9 ±294.2	1329.8 ±391.2	867.4 ±314.5	ND	1126.5 ±181.0	1415.1 ±288.8	695.0 ±132.9	ND	ND	ND
TPR	ND	242.1 ±27.3	155.5 ±39.2	58.3 ±14.9	ND	ND	453.0 ±66.8	3.3 ±4.4	ND	ND	ND
PHE	ND	154.6 ±35.3	106.5±24.2	78.2 ±24.1	13.1 ±11.4	1.0±1.7	227.5 ±39.7	ND	ND	ND	36.5 ±8.8
TYR	193.9 ±14.8	354.9 ±89.4	295.7 ±66.4	301.0 ±63.9	369.4 ±48.7	174.6 ±5.8	230.9 ±19.8	180.8 ±22.6	ND	3.0 ±5.2	376.4 ±65.5
PUT	1087.9 ±123.9	2094.1 ±592.8	1847.6 ±509.1	2456.3 ±763.6	1161.0 ±211.9	582.8 ±78.4	1565.9 ±266.8	31.3 ±8.9	39.2 ±10.6	27.5 ±38.3	2519.7 ±621.2
CAD	ND	434.1 ±122.0	236.3 ±66.0	165.9 ±53.9	24.3 ±5.0	98.7 ±15.7	169.3 ±28.5	2.6±3.2	ND	1.3±2.3	35.3±13.4
SPD	ND	ND	ND	ND	10.1±2.8	ND	ND	ND	6.7±6.0	1.4±2.4	ND
SPM	ND	ND	ND	ND	40.5±37.7	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Total	1697.7	4216.7	3971.4	3927.1	1618.4	1983.6	4061.7	913.0	45.9	33.2	2967.9

¹⁾Sterilized *makgeolli*

²⁾HIS: histamine, TRP: tryptamine, PHE: phenylethylamine, TYR: tyramine, PUT: putrescine, CAD: cadaverine, SPD: spermidine, SPM: spermine

³⁾ND: Not detected

⁴⁾Mean±standard deviation (n=3)

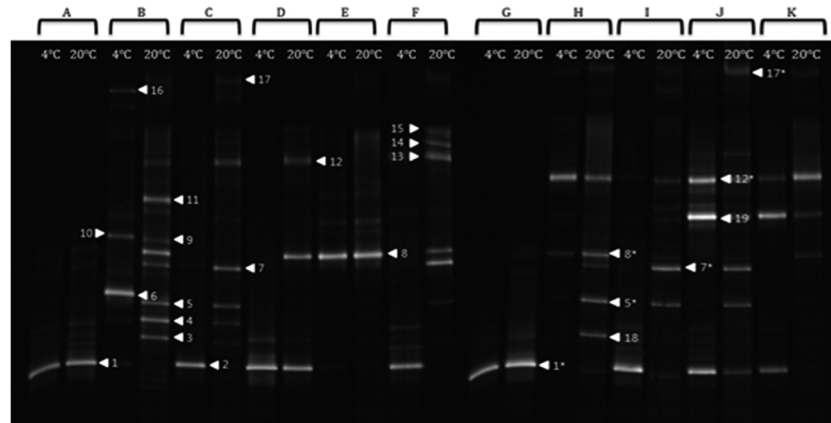


Fig. 2. PCR-amplified (GC338f-518r in 16s rRNA) DNA was obtained from each *makgeolli* samples stored at 4 and 20°C. Interesting DNA bands on DGGE gel was extracted and used for DNA sequencing.

별 BA 함량의 차이가 크지 않았다(38). 이에 비해 본 연구에서 분석한 시판 막걸리는 4°C에서 저장한 막걸리임에도 불구하고 총 BA 양이 가장 많은 G의 경우는 798.96 mg/L이었던 반면 E 제품의 경우는 16.86 mg/L에 불과하였다. 이것은 아직 국내에 있는 막걸리 회사들의 원료, 제조공정 및 유통과정이 표준화되어 있지 않은 결과로 보인다. 그리고 E와 K 막걸리는 생막걸리임에도 불구하고 20°C에서 10일 동안 저장했을 때에도 histamine이 검출되지 않은 것은 매우 바람직한 결과이며 원료 및 제조공정 표준화에 따라서 막걸리의 품질 향상을 크게 기대할 수 있다는 사실을 시사한다. 현재 막걸리 제품의 유통기한은 따로 정해진 것이 없이 제조사가 정하는 것이지만 이에 대한 객관적인 지침이 필요하며, 특히 외부 기온 및 유통방법에 따라 차별화되어야 할 것으로 생각된다.

Tang 등(38)이 시판 맥주 18종의 BA를 측정하고 모든 시판 맥주에서 putrescine은 2.12-8.23 mg/L, histamine은 0.65-4.62 mg/L, tyramine이 2.96-7.15 mg/L 검출되었다. 4°C에서 저장한 시판 막걸리의 경우 모든 막걸리에서 putrescine만 6.8-188.9 mg/L 정도 검출된 것과는 매우 상이한 양상이지만, 이는 대부분의 시판 맥주가 살균된 상태에서 유통되는 반면 생막걸리의 경우는 살아있는 미생물이 함유된 상태로 시판된다는 특수성 때문으로 매우 당연한 결과라고 볼 수 있다.

저장 온도에 따른 시판 막걸리의 미생물 양상 변화

본 연구진은 이미 시판되는 한 종의 막걸리를 4°C와 20°C에서 30일간 저장하는 동안의 미생물 변화를 PCR-DGGE를 통해 살펴본 바 있다(21). 본 연구에서는 4°C와 20°C에서 10일간 저장한 시판 막걸리 11종으로부터 DNA를 추출하고 16s rRNA gene을 PCR로 증폭시켜 DGGE를 수행한 결과 비슷한 결과를 얻을 수 있었다(Fig. 2). 즉, 4°C에 비해 20°C에서 저장한 막걸리에서 미생물의 변성된 DNA band가 다양하게 나타났다. 4°C에서 저장한 막걸리는 비교적 유사한 세균 집단이 나타난 반면, 20°C에서 저장한 막걸리에서는 각각의 막걸리마다 독특한 세균 집단을 구성하고 있는 것을 확인할 수 있었다. 4°C에서 나타난 밴드가 20°C에서 선명도가 약해진 것은 해당 미생물의 수가 줄어들었거나 다른 미생물들의 증식이 상대적으로 증가하여 초기에 비해 우점종이 변화한 것일 수 있다. 또한 시판 막걸리 미생물들이 4°C에 비해 20°C에서 주종이 다양하게 변화하는 것은 20°C에서 저장한 시판 막걸리에서의 BA 종류 및 함량 증가와 관련 있을 가능성이 있다.

Table 4. Profiles of bacteria identified from the sequence of DNA bands on DGGE gel extracted from commercial *makgeolli*s

DGGE Band No.	Closest relative	Sequence ¹⁾ homology (%)
1	<i>Oryza sativa</i>	99
2	<i>Aegilops speltoides</i>	98
3	<i>Lactobacillus</i> sp. JCM 2770	99
4	<i>Lactobacillus farciminis</i>	97
5	<i>Lactobacillus perolens</i> L534	98
6	<i>Staphylococcus succinus</i> SB72	99
7	<i>Lactobacillus harbinensis</i> T9-8, T12-11	98
8	<i>Lactobacillus brevis</i>	98
9	<i>Pediococcus clausenii</i>	92
10	<i>Staphylococcus gallinarum</i>	99
11	<i>Lactobacillus rossiae</i> strain	98
12	<i>Lactobacillus plantarum</i>	98
13	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99
14	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99
15	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99
16	<i>Staphylococcus aureus</i>	95
17	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	94
18	<i>Lactobacillus</i> sp. JCM 2770	98
19	<i>Lactobacillus fermentum</i> IM053	98

¹⁾Percentages of sequence homology were determined by using the BLAST search programme at the NCBI website.

4°C에서 저장한 B 막걸리의 주된 세균은 Fig. 2와 Table 4에서 보는 바와 같이 *Staphylococcus succinus* (band 6)와 *Staphylococcus gallinarum* (band 10)이었으며, E 제품은 *L. brevis* (band 8)가 주종을 이루고 있었다. 또한 H 제품은 *L. plantarum* (band 12), J 제품은 *L. plantarum* (band 12)과 *L. fermentum* (band 19), K 제품은 *L. fermentum* (band 19)이 주된 미생물로 나타났다. 20°C에서 저장한 막걸리에서 공통적으로 많이 증식한 균은 *L. perolens* (band 5), *L. harbinensis* (band 7), *L. brevis* (band 8), *L. plantarum* (band 12), *L. satsumensis* (band 17)였다. 이는 Kim 등(19)이 15종의 막걸리(탁주)의 미생물을 DGGE로 분석한 결과와 비교하였을 때, *L. plantarum*, *L. harbinensis*, *L. fermentum* 등이 본 연구에서 수집한 시판 막걸리 미생물과 일치하는 것을 확인

Table 5. Biogenic amine production by lactic acid bacteria strains: determination was made after cultivation at 28°C

Condition	Storage (day)		
	5	10	15
Serilized fresh <i>makgeolli</i>			
<i>L. plantarum</i> T3-10	ND ¹⁾	ND	ND
<i>L. plantarum</i> bh6	ND	ND	ND
<i>L. plantarum</i> M01210	ND	ND	ND
Sterilized fresh <i>makgeolli</i> + PLP			
<i>L. plantarum</i> T3-10	TYR	TYR	TYR
<i>L. plantarum</i> bh6	TYR	TYR	TYR
<i>L. plantarum</i> M01210	TYR	TYR	TYR
Sterilized fresh <i>makgeolli</i> + PLP + amino acids			
<i>L. plantarum</i> T3-10	ND	HIS, TYR	HIS, TYR
<i>L. plantarum</i> bh6	ND	HIS, TYR	HIS, TYR
<i>L. plantarum</i> M01210	ND	HIS, TYR	HIS, TYR
Sterilized old <i>makgeolli</i> + PLP			
<i>L. plantarum</i> T3-10	TYR, PUT, CAD	HIS, TYR, PUT, CAD	HIS, TYR, PUT, CAD
<i>L. plantarum</i> bh6	HIS, TYR, PUT, CAD ²⁾	HIS, TYR, PUT, CAD	HIS, TYR, PUT, CAD
<i>L. plantarum</i> M01210	HIS, TYR, PUT, CAD	HIS, TYR, PUT, CAD	HIS, TYR, PUT, CAD

¹⁾ND: Not detected

²⁾HIS: histamine, TYR: tyramine, PUT: putrescine, CAD: cadaverine

할 수 있었다. 그리고 Chang 등(50)이 시판되는 김치의 미생물을 DGGE로 확인한 결과 *L. sakei*, *Weissella koreensis*, *Leuconostoc inha*가 주종을 이루고 있는 것을 보고했고, Kim 등(51)은 된장에 있는 미생물을 분석한 결과 *Enterococcus faecium*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Tetragenococcus halophilus*가 주종을 이루고 있는 것을 보고했다. 김치와 된장, 막걸리는 한국을 대표하는 발효식품이지만 원료 및 제조과정이 각각 다르기 때문에 발효식품에서 우세한 미생물들에도 확연한 차이가 있음을 알 수 있었다.

막걸리에서 분리한 유산균의 BA 생성능

4°C에서 3일 보관한 D 막걸리(저온 저장한 신선한 막걸리) 또는 20°C에서 21일 보관한 D 막걸리(실온 저장한 오래된 막걸리)를 멸균한 뒤 여기에다 막걸리에서 분리한 3종의 *L. plantarum*을 접종하고, 배양액에 PLP와/또는 아미노산을 첨가하여 BA 생성을 측정하는 결과는 Table 5와 같다. 이들 3종의 *L. plantarum*은 Jin 등(18)이 막걸리에서 분리한 18종의 colony 중 16S rRNA 염기서열이 100% 일치하는 *L. plantarum* T3-10과 곡물발효유에서 분리한 *L. plantarum* bh6, 그리고 알코올발효유에서 분리한 *L. plantarum* M01210이다.

저온 저장한 신선한 막걸리를 멸균한 후 3종의 colony를 접종했을 때 PLP나 아미노산을 첨가하지 않은 경우는 15일까지 BA가 검출되지 않았다. PLP를 첨가해준 경우 3종의 colony를 접종한 모든 막걸리에서 15일까지 미량의 tyramine만 검출되었다. 그리고 아미노산과 PLP를 함께 첨가한 경우는 3종의 막걸리에서 모두 10일과 15일 후에 tyramine과 histamine이 검출되었다. 20°C에서 21일간 저장하는 동안 미생물의 활발한 대사과정으로 유리 아미노산 함량이 많을 것으로 예상되는 오래된 막걸리는 멸균 후 PLP만 추가해주었음에도 불구하고 3종의 colony 모두 5일, 10일, 15일째에 과량의 tyramine, histamine, putrescine, cadaverine이 검출되었다. 이는 신선한 생막걸리에 아미노산을 추가하는 것 보다 20°C에서 오래 동안 저장하면서 막걸리 전체의 다양한 미생물 군집이 만들어낸 유리 아미노산들이 BA 생성에 더 유리할 수 있다는 증거이다. 또한 신선한 막걸리를 멸균하고 *L. plantarum*을

접종한 경우는 유리 아미노산의 부족으로 해당 colony가 BA를 생성하지 못한 것으로 보인다. 조효소 PLP를 첨가해준 경우 tyramine만 미량 검출되는 것과 조효소 PLP에 6종의 아미노산을 추가해주었을 때 tyramine 이외 추가로 histamine만 생성된 결과가 이런 추측을 뒷받침해준다. 따라서 *L. plantarum* 3종의 strains은 막걸리에서 histamine과 tyramine을 생성할 수 있음을 알 수 있었다.

와인에서 BA 생성은, BA를 생성할 수 있는 세균의 존재여부 뿐만 아니라 아미노산 전구체의 존재, pH, 유산발효(malolactic fermentation) 기간이 영향을 미친다는 보고가 있다(52). 아미노산 탈탄산효소(decarboxylase) 활성은 산성 환경에서 강해지는데 최적 pH는 4.0-5.5이고, 이러한 환경에서 세균은 산성화를 방어하기 위한 기전의 일부로 탈탄산효소의 생성능이 증가한다(48,53). 그리고 D-glucose 같은 발효성 탄수화물(fermentable carbohydrate)은 0.5-2.0%의 비율일 때, 세균의 성장과 아미노산 탈탄산효소 활성을 증가시켜 줄 수 있고, 3%가 초과되면 효소활성을 억제한다(54). 산소도 BA 형성에 중요한 영향을 미치는데, 한 예로 *Enterobacter cloacae*는 호기성 환경일 때에 비해 혐기성 환경에서 putrescine 생성 능력이 반으로 줄어든다(48). Histidine 탈탄산효소 활성은 산소가 존재할 경우 비활성화 되거나 파괴되는 것으로 보이고(54), histamine이 존재할 경우 활성이 약해진다(48). 그리고 탈탄산효소를 가지고 있는 세균의 성장을 위한 최적의 온도는 20-37°C이며(53), 염화나트륨의 존재는 tyrosine 탈탄산효소 활성을 증가시키고 histidine 탈탄산효소의 활성은 억제한다(31,55). 그러나 이러한 BA 생성에 영향을 미치는 연구들을 대부분 와인에서 이루어진 것이며, 본 연구 결과에서 나타난 것처럼 제조 및 저장 조건에 따라 다량의 BA가 형성될 수 있는 막걸리에서는 알려진 것이 거의 없다. 이와 함께 현재 *Lactobacillus sp.*의 BA 생성능에 대한 연구 또한 대부분의 와인에서만 이루어졌을 뿐 막걸리에서 분리한 *L. plantarum*에서 BA를 확인한 논문은 없다. 앞으로 막걸리에서 분리한 균의 BA 생성 배지 조건 등을 확립할 후가 연구가 필요하며 이러한 연구는 앞으로 막걸리의 BA 생성을 억제하는 기술을 개발함에 있어서 중요한 기초 자료가 될 것이다.

요 약

본 연구는 시판되고 있는 막걸리의 저장 온도에 따른 BA 생성의 차이를 비교하고, 시판 막걸리의 우점종을 찾아내어, 이 균을 멸균 막걸리에 접종함으로써 BA 생성여부를 확인하고자 하였다.

시판 막걸리 11종을 구입해 4°C와 20°C에서 각각 10일 동안 저장한 뒤 BA 함량을 확인한 결과, 생막걸리는 4°C에 비해 20°C에서 10일간 저장함에 따라 BA 양이 급격히 증가하였고, 살균 막걸리는 온도에 따른 BA 변화가 없었다. 시판 막걸리에서 가장 많이 검출된 BA는 histamine과 putrescine이었다. 4°C에서 저장한 막걸리에 비해 20°C에서 저장한 막걸리에서 미생물의 변성된 DNA band가 다양하게 나타났다. 4°C에서 저장한 시판 막걸리의 주된 bacteria는 *Staphylococcus succinus*와 *Staphylococcus gallinarum*, *Lactobacillus (L.) brevis*, *L. plantarum*, *L. fermentum*였고, 20°C 막걸리에서 공통적으로 증식한 균은 *L. perolens*, *L. harbinensis*, *LBARR16SI L. brevis*, *L. plantarum*, *L. satsumensis*이었다. 막걸리에서 분리한 18종의 colony 중 3종의 *L. plantarum* strains을 4°C에서 3일간 보관한 신선한 막걸리를 멸균한 후 접종하고 BA 생성능을 비교한 결과, PLP나 아미노산을 첨가하지 않은 경우는 접종 후 15일까지 BA가 검출되지 않았다. 멸균막걸리에 PLP를 추가해준 경우 3종의 colony를 접종해준 모든 막걸리에서 15일까지 미량의 tyramine만 검출되었으며 PLP와 아미노산을 둘 다 추가해준 경우 3종의 colony 모두 10일째와 15일째에 tyramine과 histamine이 검출되었다. 20°C에서 21일간 저장한 막걸리는 멸균 후 PLP만 추가해주어도 3종의 colony 모두 5일, 10일, 15일에 광량의 tyramine, histamine, putrescine, cadaverine이 검출되었다.

이런 결과로 볼 때, 막걸리를 저온 저장하지 않을 경우 막걸리 성분의 분해로 인하여 BA 양이 증가하며, 막걸리 저장 온도는 막걸리 미생물 양상에 매우 큰 영향을 미칠 수 있음을 알 수 있었다. 또한 막걸리 유산균의 우점종인 *L. plantarum*은 막걸리에서 histamine, tyramine, putrescine과 cadaverine을 생성할 수 있음을 밝혀, 이것이 막걸리 BA 생성의 주요 원인균 중 하나임을 알 수 있었다. 이후 막걸리의 BA를 낮추기 위한 조건을 탐색하는 연구가 계속 진행될 필요가 있다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 한식 세계화 및 전통식품 산업화 기술 개발 사업(과제번호: PJ006699)의 연구비 지원으로 수행된 연구 결과의 일부로 이에 감사드립니다.

References

- Chang KJ, Yu TJ. Studies on the components of *sokokju*, and commercial *yakju*. Korean J. Food Sci. Technol. 13: 307-313 (1981)
- Han EH, Lee TS, Noh BS, Lee DS. Volatile flavor components in mash of *takju* prepared by using different *nuruks*. Korean J. Food Sci. Technol. 29: 563-570 (1997)
- Jeon BY, Seo HN, Yun A, Lee IH, Park DH. Effect of glasswort (*Salicornia herbacea* L.) on *nuruk*-making process and *makgeolli* quality. Food Sci. Biotechnol. 19: 999-1004 (2010)
- Kim AR, Lee SY, Kim KBWR, Song EJ, Kim JH, Kim MJ, Ji KW, Ahn IS, Ahn DH. Effect of *Glycyrrhiza uralensis* in shelf-life and quality of *takju*. Korean J. Food Sci. Technol. 40: 194-200 (2008)
- Kim SM, Han AR. Storage properties and biogenic amines production of *makgeolli* brewed with different proportions of rice and wheat flour. Korean J. Food Sci. Technol. 44: 583-591 (2012)
- Lee SS, Kim KS, Eom AH, Sung CK, Hong IP. Production of Korean traditional rice-wine made from cultures of the single ungal isolates under laboratory conditions. Korean J. Mycol. 30: 61-65 (2002)
- Kim JO, Lee BH. Taxonomical studies of yeasts in Korea -On yeasts isolated from *takju*-. Korean J. Microbiol. 8: 77-84 (1970)
- Shin YD, Cho DH. A study on the microflora changes during *takju* brewing. Korean J. Microbiol. 8: 53-64 (1970)
- Yang JY, Lee KH. Shelf-life and microbiological study of *sansung takju*. Korean J. Food Sci. Technol. 28: 779-785 (1996)
- Yu TS, Kim HS, Hong J, Ha HP, Kim TY, Yoon IW. Bibliographical study on microorganisms of *nuruk* (until 1945). J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 25: 170-179 (1996)
- Kim TY, Yoon IW. Fermentation characteristics of traditional alcoholic beverages brewed with improved-*nuruk*. J. East Asian Soc Dietary Life 7: 399-404 (1997)
- Kim HS, Hyun JS, Kim J, Ha HP, Yu TS. Characteristics of useful fungi isolated from traditional Korea *nuruk*. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 26: 767-774 (1997)
- Yu TS, Kim J, Kim HS, Hyun JS, Ha HP, Park MK. Bibliographical study on microorganisms of traditional Korean *nuruk* (since 1945). J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 27: 789-799 (1998)
- Seo MY, Lee JK, Ahn BH, Cha SK. The changes of microflora during the fermentation of *takju* and *yakju*. Korean J. Food Sci. Technol. 37: 61-66 (2005)
- 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)
- Jo KY, Ha DM. Isolation and identification of the lactic acid bacteria from *nuruk*. Agr. Chem. Biotechnol. 38: 95-99 (1995)
- Lee JH, Yu TS. Identification and characteristics of lactic acid bacteria isolated from *nuruk*. Korean J. Biotechnol. Bioeng. 15: 359-365 (2000)
- Jin J, Kim SY, Jin Q, Eom HJ, Han NS. Diversity analysis of lactic acid bacteria in *takju*, Korean Rice Wine. J. Microbiol. Biotechnol. 18: 1678-1682 (2008)
- Kim SY, Yoo KS, Kim JE, Kim JS, Jung JY, Jin Q, Eom HJ, Han NS. Diversity analysis of lactic acid bacteria in Korean rice wines by culture-independent method using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. Food Sci. Biotechnol. 19: 749-755 (2010)
- Min JH, Baek SY, Lee JS, Kim HK. Changes of yeasts and bacterial flora during the storage of Korean traditional *makgeolli*. Korean J. Mycol. 39: 151-153 (2011)
- Kim JY, Kim D, 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)
- Coton M, Romano A, Spano G, Ziegler K, Vetrana C, Desmarais C, Lonvaud-Funel A, Lucas P, Coton E. Occurrence of biogenic amine-forming lactic acid bacteria in wine and cider. Food Microbiol. 27: 1078-1085 (2010)
- Ancn-Azpilicueta C, Gonzalez-Marco A, Jimnez-Moreno N. Current knowledge about the presence of amines in wine. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 48: 257-275 (2008)
- Jørgensen LV, Huss HH, Dalgaard P. The effect of biogenic amine production by single bacterial cultures and metabiosis on cold-smoked salmon. J. Appl. Microbiol. 89: 920-934 (2000)
- Lonvaud-Funel A. Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Lett. 199: 9-13 (2001)
- Fernandez M, Ziga M. Amino Acid Catabolic Pathways of Lactic Acid Bacteria. Crit. Rev. Microbiol. 32: 155-183 (2006)
- Herbert P, Cabrita MJ, Ratola N, Laureano O, Alves A. Relationship between biogenic amines and free amino acid contents of wines and musts from Alentejo (Portugal). J. Environ. Sci. Health B. 41: 1171-1186 (2006)
- Ten Brink B, Damink C, Joosten HM, Huis in't Veld JH. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. Int. J. Food Microbiol. 11: 73-84 (1990)
- Shalaby AR. Significance of biogenic amines to food safety and

- human health. Food Res. Int. 29: 675-690 (1996)
30. Han GH, Cho TY, Yoo MS, Kim CS, Kim JM, Kim HA, Kim MO, Kim SC, Lee SA, Ko YS, Kim SH, Kim DB. Biogenic amines formation and content in fermented soybean paste (*cheonggukjang*). Korean J. Food Sci. Technol. 39: 541-545 (2007)
 31. Silla Santos MH. Biogenic amines: their importance in foods. Int. J. Food Microbiol. 29: 213-231 (1996)
 32. Smit AY, Du Toit WJ, Du Toit M. Biogenic amines in wine: understanding the headache. S. Afr. J. Enol. Vitic. 29: 109-127 (2008)
 33. 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)
 34. Kwon SJ, Ahn TY, Sohn JH. Analysis of microbial diversity in *makgeolli* fermentation using PCR-DGGE. J. Life Sci. 22: 232-238 (2012)
 35. 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. Mycobiol. 40: 138-141 (2012)
 36. Landete JM, Ferrer S, Polo L, Pardo I. Biogenic amine in wines from three spanish regions. J. Agr. Food Chem. 53: 1119-1124 (2005)
 37. 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)
 38. Tang T, Shi T, Qian K, Li P, Li J, Cao Y. Determination of biogenic amines in beer with pre-column derivatization by high performance liquid chromatography. J. Chromatogr. B 877: 507-512 (2009)
 39. Kirby KS. A new method for the isolation of deoxyribonucleic acids: evidence on the nature of bonds between deoxyribonucleic acid and protein. Biochem. J. 66: 495-504 (1957)
 40. Xueliang R, Xiaoyang Z, Warndorff M, Bucheli P, Qingyao S. DNA extraction and fingerprinting of commercial rice cereal products. Food Res. Int. 39: 433-439 (2006)
 41. Ros-Chumillas M, Egea-Cortines M, Lopez-Gomez A, Weiss J. Evaluation of a rapid DNA extraction method to detect yeast cells by PCR in orange juice. Food Control 18: 33-39 (2007)
 42. Soufleros E, Barrios, ML, Bertrand A. Correlation between the content of biogenic amines and other wine compounds. Am. J. Enol. Vitic. 49: 266-278 (1998)
 43. Marcobal A, Martin-Alvarez PJ, Polo MC, Munoz R, Moreno-Arribas MV. Formation of biogenic amines throughout the industrial manufacture of red wine. J. Food Prot. 69: 397-404 (2006)
 44. Forsythe WI, Redmond A. Two controlled trials of tyramine in children with migraine. Dev. Med. Child Neurol. 16: 794-799 (1974)
 45. Straub BW, Kicherer M, Schilcher SM, Hammes WP. The formation of biogenic amines by fermentation organisms. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 201: 79-82 (1995)
 46. Kek M, KalaP. Biogenic amines in foods and their roles in human nutrition. Czech J. Food Sci. 16: 151-159 (1998)
 47. Maijala R, Eerola S. Contaminant lactic acid bacteria of dry sausages produce histamine and tyramine. Meat Sci. 35: 387-395 (1993)
 48. Halsz A, Barth, Simon-Sarkadi L, Holzapfel W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. Trends Food Sci. Tech. 5: 42-49 (1994)
 49. Ogawa H, Tsuji H, Seto A, Hara S, Totani Y. Synergistic effect of spermine on antioxidation of polyunsaturated oil. J. Japan Oil Chem. Soc. 45: 1327-1332 (1996)
 50. Chang HW, Kim KH, Nam YD, Roh SW, Kim MS, Jeon CO, Oh HM, Bae JW. Analysis of yeast and archaeal population dynamics in kimchi using denaturing gradient gel electrophoresis. Int. J. Food Microbiol. 126: 159-166 (2008)
 51. Kim TW, Lee JH, Kim SE, Park MH, Chang HC, Kim HY. Analysis of microbial communities in *doenjang*, a Korean fermented soybean paste, using nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. Int. J. Food Microbiol. 131: 265-271 (2009)
 52. Martin-Alvarez PJ, Marcobal A, Polo C, Moreno-Arribas MV. Influence of technological practices on biogenic amine contents in red wines. Eur. Food Res. Technol. 222: 420-424 (2006)
 53. Maijala RL, Eerola SH, Aho MA, Hirn JA. The effect of GDL-induced pH decrease on the formation of biogenic amines in meat. J. Food Protect. 56: 125-129 (1993)
 54. Bardcz S. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. Trends Food Sci. Tech. 6: 341-346 (1995)
 55. Karovicova J, Kohajdova Z. Biogenic Amines in Food. Chem. Pap. 59: 70-79 (2005)