

강원도 유통 발효주 중 바이오제닉 아민류 함량 조사 및 위해도 평가

배철민[†] · 신인철 · 이 완 · 이혁화 · 최여은 · 김영주 · 이가희 · 정경진 · 최승봉
강원도보건환경연구원

Monitoring of Biogenic Amines Content in Commercial Fermented Alcoholic Beverages in Gangwon-do and Risk Assessment

Cheol-Min Bae[†], In-Cheol Shin, Woan Lee, Heok-Hwa Lee, Yeo-Eun Choi,
Young-Ju Kim, Ga-Hee Lee, Kyung-Jin Jeong, and Seung-Bong Choi
Gangwon Institute of Health and Environment

ABSTRACT

Objectives: This study was conducted to estimate the related health risk by investigating the content of biogenic amines (BAs) in commercial fermented alcoholic beverages.

Methods: Ninety-seven samples, including takjus (34), fruit wines (26), distilled liquors (20) and beers (17) were purchased in Gangwon-do (Province) in 2019. The eight BAs (putrescine, cadaverine, spermine, spermidine, tyramine, β -phenylethylamine, histamine, and tryptamine) were analyzed by high performance liquid chromatograph (HPLC) after extraction (0.4 M HClO₄), pigment removal (carbon cartridge) and derivatization (1% dansylchloride). The health risk of exposure to BAs due to ingestion of commercial fermented alcoholic beverages was estimated as the margin of exposure (MOE).

Results: Various BAs were detected in takju, fruit wine, distilled liquor and beer. Putrescine (not detected (ND)-12.60 mg/L), cadaverine (ND-5.45 mg/L), tyramine (ND-8.34 mg/L), β -phenylethylamine (ND-13.73 mg/L), histamine (ND-7.96 mg/L), and tryptamine (ND-19.00 mg/L) were found in takju. Putrescine (ND-15.34 mg/L), cadaverine (ND-7.90 mg/L), β -phenylethylamine (ND-3.06 mg/L), histamine (ND-9.68 mg/L), and tryptamine (ND-14.06 mg/L) were identified in fruit wine. Putrescine (less than limit of detection (<LOD)-1.31 mg/L), cadaverine (ND-4.21 mg/L), and tryptamine (ND-75.23 mg/L) were found in distilled liquor. Putrescine (ND-11.42 mg/L), cadaverine (ND-12.66 mg/L), β -phenylethylamine (ND-6.26 mg/L), and tryptamine (ND-4.07 mg/L) were detected in beer. On the other hand, spermine and spermidine were not detected in all samples. The risk assessment results confirmed by MOE were all greater than ten (minimum: 92, maximum: 9,191), so the health risk was deemed low.

Conclusions: The commercial fermented alcoholic beverages contained various BAs, and there was a difference in BA species and detection amount according to type. The health risk was estimated to be low given that the MOE was all greater than ten.

Key words: Biogenic amines, fermented alcoholic beverages, risk assessment, margin of exposure

I. 서 론

바이오제닉 아민(biogenic amines, BAs)은 아미노

산의 탈탄산 작용으로 또는 알데히드와 케톤의 아미노화(amination)와 아미노기 전이반응(transamination)에 의해 생성되는 저분자의 질소화합물이다. BAs는

[†]Corresponding author: Gangwon Institute of Health and Environment, 386-1 Sinbuk-ro, Sinbuk-eup, Chuncheon-si, Gangwon-do, Republic of Korea, Tel: +82-33-249-4312, E-mail: baemin73@korea.kr

Received: 1 June 2020, Revised: 15 June 2020, Accepted: 15 June 2020

화학적 구조에 따라 지방족화합물(putrescine, cadaverine, spermine, spermidine), 방향족화합물(tyramine, β -phenylethylamine), 헤테로고리화합물(histamine, tryptamine, serotonin)로 분류한다. BAs는 체내에서 호르몬 또는 신경전달물질로 작용하며, 저농도의 BAs는 위산 분비 및 체온조절 작용을 하는 등 인체 필수 요소이나, 고농도의 BAs는 인체에 부정적인 영향을 미친다. Spermine, spermidine은 아질산(nitrite)과의 반응으로 니트로사민류(nitrosamines)를 형성하여 발암물질을 형성할 수 있으며, tyramine과 histamine은 직·간접적으로 혈관 및 신경계에 영향을 미치며, 이 외에도 BAs는 고혈압, 두통 등의 증상을 유발한다. BAs는 어류, 육류, 포도주, 맥주, 음료, 과일, 견과류와 초콜릿 등을 포함하여 광범위한 식품에서 발견된다.¹⁻³⁾

BAs가 저농도로 함유된 식품 섭취 시에는 체내 아민산화효소(monoamine, diamine oxidase)에 의해 무독성화된다. 그러나 고농도로 함유된 식품이나 알코올 섭취, 위장 질환이 있거나, 모노아민 산화효소 억제제(monoamine oxidase inhibitors, MAOIs)를 복용하는 환자 등은 저농도의 BAs라도 충분한 대사가 이루어지지 않아 건강에 부정적인 영향을 나타낸다.⁴⁻⁶⁾

국외 연구에 따르면 포도주, 맥주와 같은 발효주에서 histamine, tyramine, putrescine과 같은 BAs가 검출되는데 포도주는 1차 발효 과정(alcoholic fermentation)보다는 2차 발효 과정(malolactic fermentation)에서 BAs가 생성되며, 맥주는 포도주에 비해 소량의 BAs들이 발효과정에서 생성되는 것으로 알려져 있다.⁷⁻⁹⁾

우리나라 사람들은 예로부터 쌀이나 밀과 같은 곡류에 누룩을 첨가하여 발효시켜 만든 탁주나 이를 증류하여 알코올 함량을 높인 증류식 소주를 즐겨 섭취하였다. 오늘날은 이러한 전통주뿐만 아니라 주정을 희석하여 제조한 희석식 소주와 보리 싹을 발아시킨 맥아에 효모, 홉을 넣어 발효시킨 맥주와 포도, 복분자 등 과실을 원료로 제조한 과실주 등 다양한 원료 및 발효 방식으로 제조된 주류를 음용할 수 있게 되었다. 최근 국내 주류 소비 행태는 건강에 대한 관심이 높아지면서 과다음주를 줄이고 저도주 음주 문화로 변화하여 주류 소비량은 줄고 있으나 월간 음주율은 증가하고 있으며, 소득 수준 증가로 소비자의 기호가 다양해지고 고급화되면서 수입

맥주 시장의 규모가 확대되어 대형마트에서 유통되는 수입 맥주 비중이 점차 증가하고, 저도주 트렌드로 낮은 연령대와 여성 소비자층을 중심으로 와인을 선호하는 경향을 보이고 있다.¹⁰⁾

발효주에 대한 국외 연구로는 포도 재배지역별 또는 포도 품종별로 포도주의 BAs 함량을 조사한 연구가 있는데, Martuscelli 등,¹¹⁾ Leitao 등,¹²⁾ Anli 등¹³⁾은 포도 재배지역별 유의미한 차이가 없었다고 하였으며, Pineda 등¹⁴⁾은 포도 품종별 유의미한 차이가 없었다고 하였다. 한편 Prete 등¹⁵⁾은 7종의 포도 품종으로 제조한 포도주의 BAs의 함량을 비교한 결과 포도 품종이 BAs 생성에 영향이 있다고 하였고, Marques 등¹⁶⁾의 연구에서도 포도재배 지역, 품종에 따라 BAs의 함량에서 유의미한 차이가 있다고 하였다. Gloria 등¹⁷⁾은 브라질 시판 맥주를 발효방식에 따라 구분하여 BAs의 함량을 조사하여 보고하였는데 stout 맥주에서 tyramine과 tryptamine 함량이 다른 제품에 비해 유의하게 높았으나 그 외의 BAs 함량 차이는 유의미하지 않다고 하였다. 또한 불충분한 저온살균으로 젖산균이 병맥주에 남아 있을 경우 tyramine과 histamine이 생성될 수 있다는 Kalac 등¹⁸⁾의 연구와 맥주 발효과정의 품질관리를 위한 beer BAI (biogenic amine index)를 제안한 Loret 등¹⁹⁾의 연구 등 다수의 연구들이 있다. 그러나 국내에서는 Cho 등²⁰⁾과 Nam 등²¹⁾의 연구가 있을 뿐으로 부족한 실정이다.

이에 본 조사는 유통 발효주 중 BAs의 함량을 분석하여 실제 섭취량 자료를 활용한 노출량 계산 및 독성기준값과의 비교를 통해 위해성을 추정함으로써 발효주 섭취로 인한 BAs의 위해성에 대한 기초자료를 제공하고자 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시약 및 실험재료

분석에 사용된 표준물질인 putrescine, cadaverine, spermine, spermidine, tyramine, β -phenylethylamine, histamine, tryptamine과 내부표준물질인 1,7-diaminoheptane은 Sigma사(USA), dansyl chloride는 Wako사(Japan), perchloric acid는 Junsei사(Japan), methyl alcohol은 J.T.Baker사(USA) 제품을 구입하여 사용하였다. 그 외 일반 시약인 sodium bicarbonate,

ammonium acetate는 Sigma사(USA), ammonium hydroxide, sodium hydroxide는 Wako사(Japan) 제품을 구입하여 사용하였다. HPLC 이동상 용매로 사용된 acetonitrile은 J.T.Baker사(USA) 제품을 구입하여 사용하였다.

식품공전에는 주류를 곡류 등의 전분질 원료나 과일 등의 당질 원료를 주원료로 하여 발효시켜 제조한 발효주류(탁주, 약주, 청주, 맥주, 과일주), 곡류 등의 전분질원료나 과일 등의 당질원료를 주원료로 하여 발효시킨 후 증류하여 그대로 또는 나무통에 저장하여 제조한 증류주류(소주, 위스키, 브랜디, 일반증류주, 리큐르), 전분질원료 또는 당질원료를 발효시켜 증류한 것이나 조주정을 증류한 것으로 희석하여 음용할 수 있는 에탄올인 주정과 그 외 기타 주류로 분류하고 있다. 본 조사에서는 제조 과정에서 발효 단계를 거친 경우 발효주로 정의하여 탁주, 과일주, 증류주와 맥주를 조사 대상으로 정하였으며, 2019년 5월부터 12월까지 강원도 지역에서 유통 중인 탁주 34건(국내산), 과일주 26건(국내산 6건, 수입산 20건), 증류주 20건(국내산 8건, 수입산 12건)과 맥주 17건(국내산 5건, 수입산 12건), 총 97건을 마트에서 구매하여 분석 재료로 사용하였다.

2. 시험방법

2.1. 바이오제닉 아민류 전처리과정

발효주에서 BAs 분석 시험방법은 식품의약품안전평가원에서 발간한 「총식이조사를 위한 유해물질 분석법 안내서(2017)」²²⁾ 중 BAs 시험방법을 준용하였으며 전처리과정은 다음과 같다. 50 mL 원심분리관에 시료 5 mL와 0.4 M의 HClO₄ 5 mL를 넣어 추출(5분, 2500 rpm)한 액 2.5 mL를 취하여 미리 메탄올 5 mL와 증류수 5 mL를 차례로 흘려 활성화시킨 carbon 카트리지(Agilent, Bond Elut Carbon, 500 mg, 6 mL)에 넣어 유출액을 받고, 아세트니트릴 5 mL를 넣어 유출되는 액을 합한 후 0.4 M의 HClO₄을 이용하여 10 mL로 정용한 액을 추출액으로 하였다. 이 추출액 1 mL에 내부표준물질(1,7-diaminoheptane) 100 µL, 탄산수소나트륨 300 µL, 2 M의 수산화나트륨 200 µL를 혼합 후 1% dansylchloride (아세톤에 용해) 1 mL를 넣어 40°C에서 45분간 유도체화 하였다. 유도체 후 남아 있을 dansylchloride를 제거하기 위해 25% 수산화암모늄 50 µL를 첨가하여 어두운

곳에서 30분 간 방치하고 아세트니트릴로 최종부피가 5 mL가 되도록 정용한 것을 시험용액으로 사용하였다. 결괏값 처리 시 검출한계(limit of detection, LOD) 미란은 0.00 mg/L로 나타내었다.

2.2. 색소제거

과실주와 증류주는 고유의 색을 가지고 있으며 이러한 색소들은 시료 전처리과정에서 간섭물질로 작용하므로 제거할 필요가 있다. 색소성분의 하나인 폴리페놀 성분을 제거하는데 사용된²³⁾ C₁₈ 카트리지(Agilent, Bond Elut C₁₈, 1 g, 6 mL)와 색소 제거 시 일반적으로 선택하는 carbon 카트리지(Agilent Bond Elut Carbon, 500 mg, 6 mL)를 사용하여 회수율(recovery)을 비교 검토하였다. C₁₈ 카트리지를 사용했을 때는 탁주와 증류주에서 histamine의 회수율(각각 31.13, 50.38%)이 낮았으나, carbon 카트리지를 사용했을 때는 전체적으로 양호한 회수율(79.20~109.78%)을 보였기 때문에 본 조사에서는 carbon 카트리지를 이용하여 색소를 제거하였다.

2.3. 기기분석 조건

BAs 8종 동시분석을 위해 분석기기는 high performance liquid chromatograph-photo diode array (HPLC-PDA, Shiseido HPLC NASCA I, ThermoFisher Scientific Accela PDA)를 사용하였다. 분석 칼럼은 C₁₈ 칼럼(OSAKA SODA, CAPCELL PAK C₁₈, UG120, 3.0 mm×250 mm, 3 µm), 칼럼 오븐 온도는 40°C, 유속은 0.25 mL/min, 광다이오드배열(photo diode array, PDA) 검출기 측정 파장은 254 nm, 이동상은 0.1 M의 아세트산암모늄과 아세트니트릴 용액을 이용하여 (5:95)~(38:62) 사이에서 농도구배로 분석하였다(Table 1).

2.4. 분석방법 검증

표준원액은 표준물질 일정량을 취하여 0.4 M의 HClO₄에 녹여 1,000 µg/mL으로 조제하였다. 검량선 작성을 위한 표준용액은 표준원액 일정량을 취하여 유도체화 과정에 따라 조제하여 최종 농도가 0.02~6.00 µg/mL가 되도록 하여 검량선을 작성하였으며 검량선의 결정계수(determination coefficient, R²)는 모두 0.999 이상임을 확인하였다(Fig. 1). 검출한계(LOD)와 정량한계(limit of quantification, LOQ)는

Table 1. HPLC conditions for determination of biogenic amines in commercial fermented alcoholic beverages

Instrument	Shiseido HPLC, NASCA I		
Detector	ThermoFisher Scientific Accela PDA		
Column	OSAKA SODA Capcell Pak C ₁₈ , UG120, 3.0 mm×250 mm, 3 μm		
Mobile Phase	Time (min)	0.1 M Ammonium Acetate (%)	Acetonitrile (%)
	0.0	38	62
	8.0	38	62
	12.0	25	75
	15.0	20	80
	20.0	20	80
	22.0	5	95
	25.0	5	95
	26.0	38	62
	35.0	38	62
Injection Volume	5 μL		
Wavelength	254 nm		
Oven Temperature	40 °C		
Flow Rate	0.25 mL/min		
Run Time	35 min		

크로마토그램의 BAs 피크에 대하여 신호대비 잡음비 3배와 10배로 계산하였다. LOD는 최소 0.03 mg/L (putrescine, cadaverine, spermine)에서 최대 0.17 mg/L (spermidine), LOQ는 최소 0.09 mg/L (cadaverine)에서 최대 0.56 mg/L (spermidine) 범위였다. 회수율 (recovery)은 BAs의 표준물질 일정량(0.13~0.30 mM)을 시료에 첨가하여 3회 반복 분석 후 첨가 농도 대비 회수된 농도를 백분율로 계산하였으며, 정밀도 (precision)는 BAs 피크 면적의 상대표준편차(% RSD)로 나타내었다(Table 2).

2.5. 위해도 확인

발효주 섭취로 인한 BAs의 위해성은 노출량(μg/kg b.w./day)과 독성기준값의 비교로 확인하였다. 노출량 계산을 위한 식품 섭취량은 식품의약품안전평가원의 「식품섭취량 산출 및 오염도 모니터링 표준화 가이드라인(2018)」²⁴⁾에서 제시한 값을 사용하였다. 이 가이드라인은 질병관리본부에서 매년 실시하

는 국민건강영양조사 중 식이조사 자료를 이용하여 실제 섭취자의 일일 섭취량을 식품공전의 식품유형 별로 제시하고 있다. 평균 체중은 국민건강영양조사의 전 연령 평균 체중인 55 kg으로 계산하였으며, 발효주 중 BAs의 함량은 노출량이 과소 추정되지 않도록 유형별로 최댓값을 적용하였다.

$$\begin{aligned} & \text{BAs 노출량}(\mu\text{g/kg b.w./day}) \\ & = (\text{발효주 중 BAs의 함량}(\mu\text{g/mL}) \\ & \quad \times \text{일일 발효주 섭취량}(\text{g/day})) / (\text{평균 체중}(\text{kg})) \end{aligned}$$

위해도는 유럽식품안전청(European Food Safety Authority, EFSA)에서 유전독성과 발암독성 물질의 위해도 평가 방법으로 권고한 노출안전력(Margin of Exposure, MOE)으로 확인하였다.²⁵⁾ MOE는 최대무독성량(No Observed Adverse Effect Level, NOAEL)이나 벤치마크용량(Benchmark dose, BMD) 등과 같이 독성이 관찰되지 않는 기준값을 노출량으로 나누어 위해도를 확인한다. Histamine을 제외한 BAs는 제안된 독성기준값이 없으며, histamine의 위해성이 가장 많이 알려져 있는 점을 고려하여, BAs의 독성 기준값으로 CODEX에서 제안한 histamine의 벤치마크용량하한값(benchmark dose lower confidence limit, BMDL₁₀)인 36,920 μg/kg b.w./day을 적용하여 위해성을 추정하였다.²⁶⁾

$$\begin{aligned} & \text{MOE} \\ & = \text{BMDL}_{10}(\mu\text{g/kg b.w./day}) / \text{BAs 노출량}(\mu\text{g/kg b.w./day}) \end{aligned}$$

III. 결 과

1. 발효주 중 BAs 함량

BAs의 주류별 검출 결과는 Table 3과 같다. Putrescine은 탁주 23제품(평균 검출량: 2.37 mg/L, 검출률: 67.6%), 과실주 중 포도주 14제품(평균 검출량: 5.69 mg/L, 검출률: 66.7%), 포도주 외 과실주 2제품(평균 검출량: 1.82 mg/L, 검출률: 40.0%), 증류주 1제품(평균 검출량: 0.06 mg/L, 검출률: 5.0%), 맥주 15제품(평균 검출량: 4.99 mg/L, 검출률: 88.2%)에서 검출되었으며 BAs 중 검출률(56.7%)이 가장 높았다.

Cadaverine은 탁주 3제품(평균 검출량: 0.40 mg/L, 검출률: 8.8%), 과실주 중 포도주 6제품(평균 검출

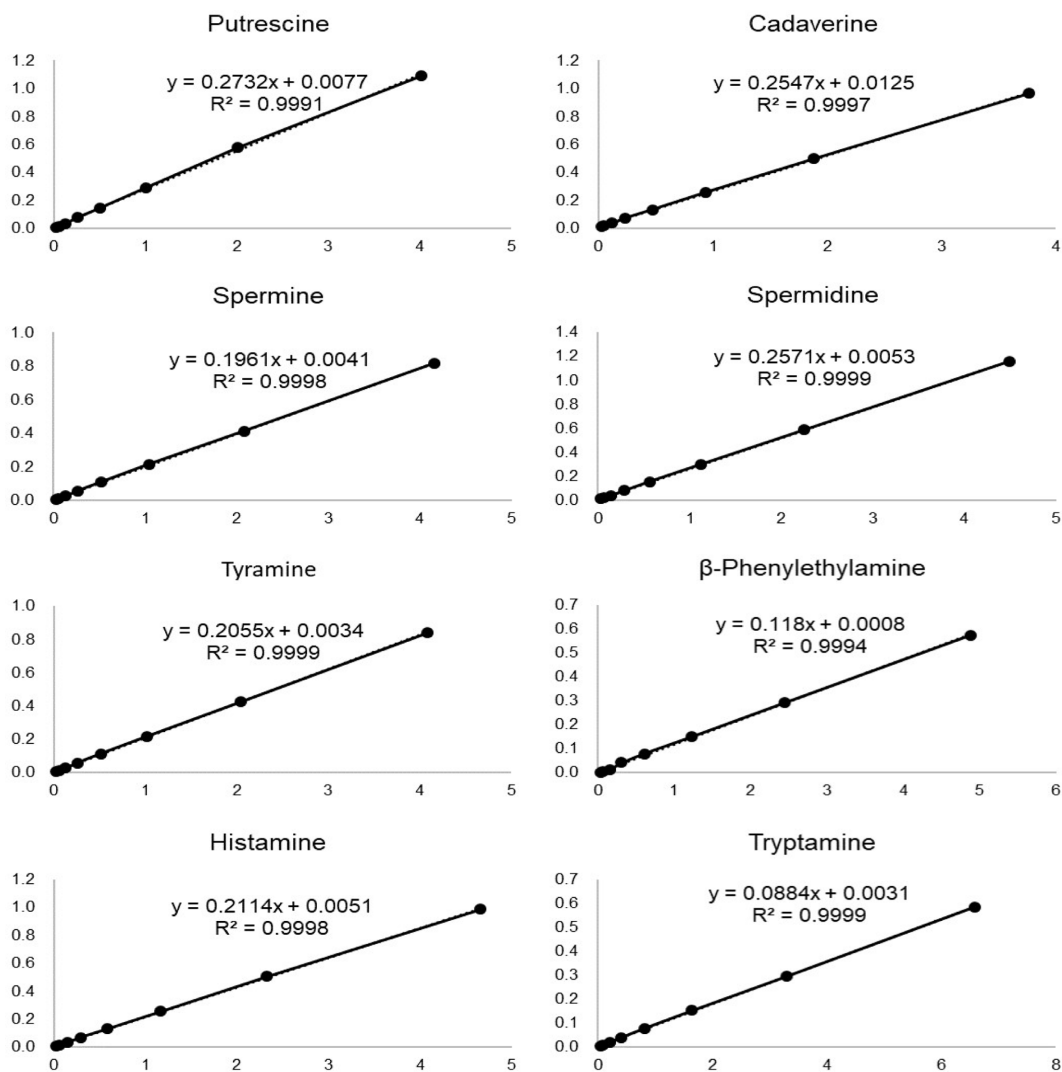


Fig. 1. Calibration curve of biogenic amines. x-axis: standard solution concentration ($\mu\text{g/mL}$), y-axis: peak area ratio

량: 1.45 mg/L, 검출률: 28.6%), 포도주 외 과실주 1 제품(평균 검출량: 0.30 mg/L, 검출률: 20.0%), 증류주 2제품(평균 검출량: 0.30 mg/L, 검출률: 10.0%), 맥주 2제품(평균 검출량: 0.84 mg/L, 검출률: 11.8%)에서 검출되었다. Tyramine은 탁주 1제품(평균 검출량: 0.25 mg/L, 검출률: 2.9%)에서 검출되었고 과실주, 증류주, 맥주에서는 검출되지 않았다.

β-Phenylethylamine은 탁주 5제품(평균 검출량: 1.34 mg/L, 검출률: 14.7%), 과실주 중 포도주 3제품(평균 검출량: 0.37 mg/L, 검출률: 14.3%), 맥주 2제품

(평균 검출량: 0.48 mg/L, 검출률: 11.8%)에서 검출되었고 증류주에서는 검출되지 않았다. Histamine은 탁주 2제품(평균 검출량: 0.40 mg/L, 검출률: 5.9%), 과실주 중 포도주 4제품(평균 검출량: 0.72 mg/L, 검출률: 19.0%), 포도주 외 과실주 4제품(평균 검출량: 5.21 mg/L, 검출률: 80.0%)에서 검출되었고 증류주와 맥주에서는 검출되지 않았다. Tryptamine은 탁주 22제품(평균 검출량: 3.84 mg/L, 검출률: 64.7%), 과실주 중 포도주 10제품(평균 검출량: 3.66 mg/L, 검출률: 47.6%), 포도주 외 과실주 3제품(평균 검출량

Table 2. Precision and recovery of biogenic amines in the HPLC analysis by commercial fermented alcoholic beverages

Biogenic amines	Precision (% RSD)				Recovery (%)							
					Carbon cartridge				C ₁₈ cartridge			
	Takju	Fruit wine	Distilled liquor	Beer	Takju	Fruit wine	Distilled liquor	Beer	Takju	Fruit wine	Distilled liquor	Beer
Putrescine	0.47	1.01	2.12	1.04	88.10	95.63	89.72	94.51	104.13	102.97	93.11	98.99
Cadaverine	1.07	0.94	2.37	0.91	94.89	109.78	82.74	97.97	98.53	93.82	88.46	95.27
Spermine	2.86	1.80	3.28	1.48	84.03	80.44	79.20	90.08	101.62	91.36	93.92	99.78
Spermidine	1.54	1.80	3.47	1.40	80.36	94.95	79.70	88.31	98.07	97.23	94.36	101.43
Tyramine	0.48	0.20	1.91	0.99	89.21	99.54	89.38	98.02	96.18	100.86	93.35	106.77
β-Phenylethylamine	1.05	1.12	2.12	1.89	88.82	106.74	89.94	96.86	94.54	99.58	88.42	122.25
Histamine	0.23	0.55	1.99	2.82	90.19	99.09	93.59	96.61	31.13	98.15	50.38	95.63
Tryptamine	1.63	0.36	1.67	0.82	86.06	97.75	84.69	96.81	93.46	107.58	90.83	103.00

: 3.56 mg/L, 검출률: 60.0%), 증류주 12제품(평균 검출량: 21.22 mg/L, 검출률: 60.0%), 맥주 4제품(평균 검출량: 0.74 mg/L, 검출률: 23.5%)에서 검출되었다.

이를 정리하면 putrescine은 맥주, 탁주, 포도주, 포도주의 과실주, 증류주 순으로, cadaverine은 포도주, 포도주의 과실주, 맥주, 증류주, 탁주 순으로, β-phenylethylamine은 탁주, 포도주, 맥주 순으로, histamine은 포도주의 과실주, 포도주, 탁주 순으로, tryptamine은 탁주, 포도주의 과실주, 증류주, 포도주, 맥주 순으로 높은 검출률을 보였다. 다만 spermine과 spermidine은 모든 제품에서 검출한계 미만으로 검출되었고 tyramine은 탁주 1제품에서만 검출되었다. 즉, 본 조사 결과 발효주에서는 주로 putrescine, cadaverine, tryptamine이 검출되며, histamine, β-phenylethylamine, tyramine은 일부 제품에서 검출되어 유형별로 검출되는 BA의 종류와 함량에 차이가 있었다. 검출된 BA의 발효주별 함량 차이를 확인하고자 t-test와 일원배치 분산분석(one-way analysis of variance)을 하였다. 유의수준 0.05, 95% 신뢰구간(confidence interval, CI)에서 putrescine은 탁주와 과실주(95% CI=0.3838~4.7678, p=0.01), 탁주와 맥주(95% CI=0.1227~5.1213, p=0.04), 과실주와 증류주(95% CI=-7.3829~ -2.3779, p<0.00), 증류주와 맥주(95% CI=2.1510~7.7022, p<0.00)에서 유의미한 함량 차이가 있었고, tryptamine은 탁주와 증류주(95% CI=10.2523~26.6224, p<0.00), 과실주와 증류주(95% CI=9.9945~27.2721, p<0.00), 증류주와 맥주(95% CI=-31.1153~ -11.9521, p<0.00)에서 유의

미한 함량의 차이가 있었으나 이 외 검출된 BA의 발효주별 함량 차이는 통계적으로 유의미하지 않았다. 통계 분석은 R (version 3.6.2) 프로그램을 사용하였다.

2. 위해도 확인

발효주 섭취로 인한 BA의 위해성 추정을 위해 노출량과 MOE를 산출하였다. 노출량 계산에 사용된 발효주의 일일 섭취량은 실제 섭취자의 평균 섭취량인 탁주 761.42 g, 과실주 72.20 g, 증류주 291.91 g, 맥주 699.42 g을 사용하였다. 이 값에 본 조사 결과인 발효주 각각의 BA 최대 함량을 적용하여 노출량을 계산하였다. 현재 BA 중 histamine을 제외하고는 독성기준값이 설정되어 있지 않아, CODEX에서 제안한 histamine의 독성기준값(BMDL₁₀, 36,920 µg/kg b.w./day)을 histamine의 BA에도 적용하여 MOE를 계산하였다. MOE 계산 결과는 최소 92 (증류주의 tryptamine)에서 최대 9,191 (과실주의 β-phenylethylamine)로 나타났다. 일반적으로 유전독성이 없다고 판단되는 물질 중 인체 역학시험에서 확인된 독성기준값을 활용한 경우 노출안전력이 10 이상 확보되면 위해우려가 낮다고 판단²⁷⁾하므로 위해성은 낮은 것으로 추정되었다(Table 4). 본 조사에서는 위해도 추정이 과소평가 되지 않도록 발효주별 검출된 BA의 최대값과 실제 섭취자의 평균 섭취량을 적용하여 위해도를 추정하였으므로 BA의 검출 평균값과 전국민 평균 섭취량을 적용하면 노출량이 낮아져 위해성은 더 낮게 추정된다.

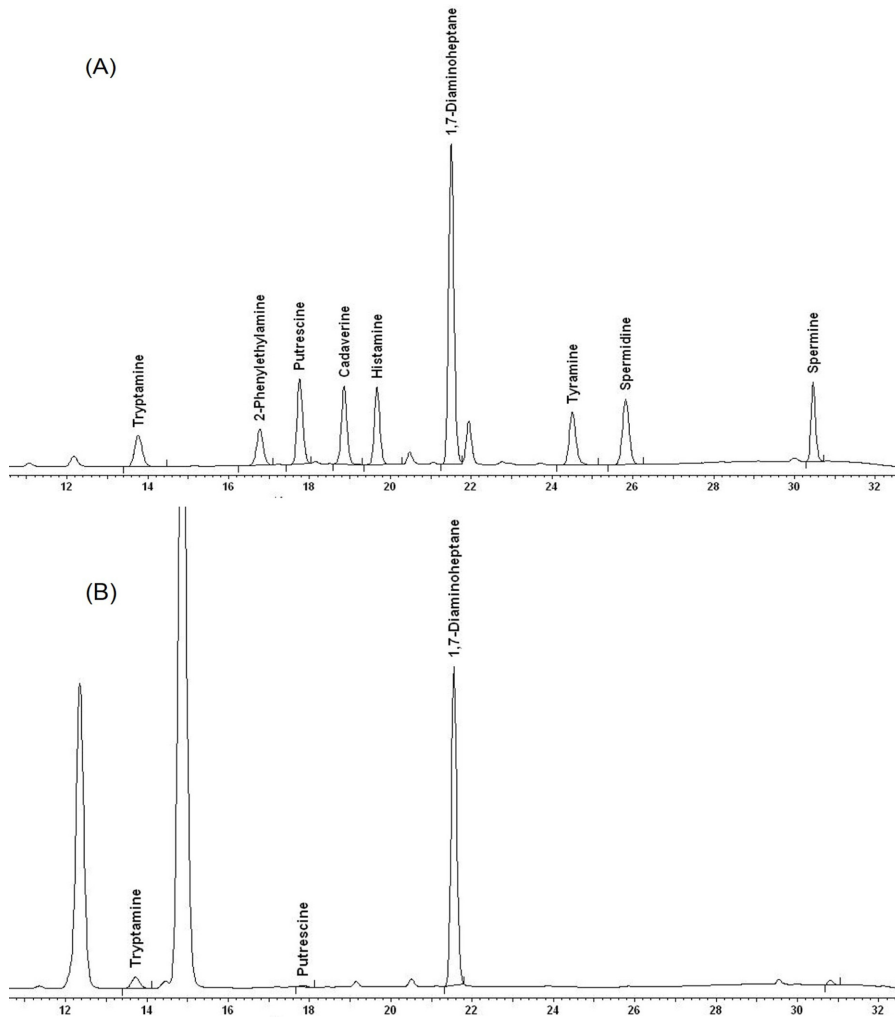


Fig. 2. HPLC chromatograms of standard (A) and sample (B)

IV. 고 찰

시험법 검증 과정에서 포도주와 과일주 시료에서 내부표준물질(1,7-diaminoheptane)의 회수율이 낮아진 것으로 확인되었다. 원인은 전처리과정 중 시료의 색소들이 간섭물질로 작용하기 때문으로 판단하여, 색소 제거를 위해 C₁₈ 카트리지와 carbon 카트리지를 비교실험 하였다. 각각의 카트리지에 표준물질을 첨가한 시료를 전처리 후 HPLC로 분석하여 회수율을 비교하였으며, carbon 카트리지를 사용했을 때 전체적으로 양호한 결과의 회수율을 얻을 수 있었다.

분리 칼럼은 일반적으로 HPLC에서 사용하는 칼럼보다 내경과 충전재 입자 크기가 작은 것(3.0 mm, 3 μm)을 사용하였다. 내경 4.6 mm, 충전재 입자 크기 5 μm를 사용했을 때보다 BAs 각각의 피크 분리가 향상되었으며, 적은 이동상 사용(0.25 mL/min)으로 경제적인 분석이 가능하였다.²⁸⁾

본 조사를 통해 강원도 유통발효주 유형별로 검출되는 BAs의 종류와 함량의 차이가 있음을 확인하였다. Nam 등²¹⁾은 맥주에서 0.16 ppm, 소주에서 0.14 ppm, 백포도주에서 0.07 ppm의 histamine이 검출되었다고 하였는데, 본 조사에서는 맥주, 소주를 포함한 증류주에서는 histamine이 검출되지 않았고, 포도

Table 3. Mean values, detection range and detection rate for biogenic amines in commercial fermented alcoholic beverages

Biogenic Amines									
Fermented alcoholic beverages	Putrescine	Cadaverine	Spermine	Spermidine	Tyramine	β -Phenyl ethylamine	Histamine	Tryptamine	
Takju (n=34)	2.37±0.44* (ND [†] -12.60) [‡] 67.6 [§]	0.40±0.23 (ND-5.45) 8.8	(ND-<LOD)	(ND-<LOD)	0.25±0.25 (ND-8.34) 2.9	1.34±0.61 (ND-13.73) 14.7	0.40±0.28 (ND-7.96) 5.9	3.84±0.68 (ND-19.00) 64.7	
Fruit wine (n=21)	5.69±1.12 (ND-15.34) 66.7	1.45±0.61 (ND-7.90) 28.6	(ND-<LOD)	(ND-<LOD)	(ND-<LOD)	0.37±0.20 (ND-3.06) 14.3	0.72±0.33 (ND-4.02) 19.0	3.66±1.08 (ND-14.06) 47.6	
Others** (n=5)	1.82±1.51 (ND-7.78) 40.0	0.30±0.30 (ND-1.48) 20.0	(ND-<LOD)	(ND-<LOD)	(ND-<LOD)	<LOD)	5.21±1.76 (ND-9.68) 80.0	3.56±1.51 (ND-7.41) 60.0	
Sum (n=26)	4.95±0.99 (ND-15.34) 61.5	1.23±0.50 (ND-7.90) 26.9	(ND-<LOD)	(ND-<LOD)	(ND-<LOD)	0.30±0.17 (ND-3.06) 11.5	1.58±0.54 (ND-9.68) 30.8	3.64±0.91 (ND-14.06) 50.0	
Distilled Liquor (n=20)	0.06±0.07 (<LOD-1.31) 5.0	0.30±0.23 (ND-4.21) 10.0	(ND-<LOD)	(ND-<LOD)	(ND)	(ND-<LOD)	(ND-<LOD)	21.22±5.23 (ND-75.23) 60.0	
Beer (n=17)	4.99±0.63 (ND-11.42) 88.2	0.84±0.74 (ND-12.66) 11.8	(ND-<LOD)	(ND-<LOD)	(ND-<LOD)	0.48±0.38 (ND-6.26) 11.8	(ND-<LOD)	0.74±0.35 (ND-4.07) 23.5	

*Mean values±standard error (mg/L), [†]ND=Not detected, [‡]Detection range (minimum-maximum) (mg/L), [§]Detection rate (%), ^{||}LOD=limit of detection
[†]With 20 imported and 1 domestic, putrescine (3.12 mg/L) was detected in domestic product, and other BAs were detected with less than LOD.
^{**}3 maesil (*Prunus mume*) wines and 2 bokbunja (*Rubus coreanus Miquel*) wines

Table 4. Margine of Exposure of biogenic amines in commercial fermented alcoholic beverages

Biogenic Amines									
Fermented alcoholic beverages	Putrescine	Cadaverine	Spermine	Spermidine	Tyramine	β -Phenyl ethylamine	Histamine	Tryptamine	Total
Takju	212	489	-	-	320	194	335	140	1115
Fruit wine	1,833	3,560	-	-	-	9,191	2,905	2,000	879
Distilled Liquor	5,310	1,652	-	-	-	-	-	92	92
Beer	254	229	-	-	-	464	-	713	229

주에서 평균 0.72 mg/L가 검출되었다. Cho 등²⁰⁾은 맥주에서 putrescine (3.0-12.9 mg/kg), cadaverine (0.4-3.0 mg/kg), spermidine (0.5-3.6 mg/kg), spermine (ND-1.4 mg/kg), histamine (ND-3.3 mg/kg), tyramine (1.1-3.3 mg/kg)이, 포도주에서 putrescine (2.1-30.0 mg/kg), cadaverine (0.7-3.9 mg/kg), spermidine (ND-2.8 mg/kg), spermine (0.4-2.3 mg/kg), histamine (0.5-8.5 mg/kg), tyramine (ND-7.7 mg/kg)이 검출되었고, tryptamine과 β -phenylethylamine은 맥주와 포도주에서 모두 검출되지 않았다고 하였는데, 본 조사에서는 맥주에서 spermine, spermidine, tyramine, histamine이, 포도주에서는 spermine, spermidine, tyramine이 불검출 또는 검출한계 미만이었으며, β -phenylethylamine과 tryptamine은 맥주에서 각각 2건, 4건이, 포도주에서는 각각 3건, 10건이 검출되었다. Preti 등²⁹⁾은 이탈리아 적포도주에서 histamine (ND-1.02 mg/L), β -phenylethylamine (0.22-1.07 mg/L), putrescine (3.76-11.13 mg/L), cadaverine (0.49-1.58 mg/L), tyramine (0.67-1.97 mg/L), spermidine (Not quantified-0.67 mg/L), spermine (ND-1.07 mg/L), agmatine (ND-1.08 mg/L), methylamine (ND-1.41 mg/L), ethylamine (0.67-1.87 mg/L)이 검출된다 하였으며, Martuscelli 등¹¹⁾은 이탈리아 Abruzzo 지역의 적포도주에서 putrescine (7.88 mg/L(평균값)), cadaverine (0.11 mg/L), histamine (2.91 mg/L), tyramine (5.22 mg/L)이 검출되었으나, β -phenylethylamine, spermidine, spermine은 검출되지 않았다고 하였다.

이와 같이 발효주에서 검출되는 BAs의 종류와 함량 차이가 발생하는 원인은 제조 공정, 시간 및 저장 조건, 원료 품질 및 제조과정 중 관여하는 미생물 종류가 다르기 때문³⁰⁾으로 생각된다. Marques 등¹⁶⁾은 포도재배 지역의 기후 조건과 품종별 아미노산의 구성 및 양에 따라 BAs 함량 차이가 나타나며, 원료에 항균제 처리를 한 경우와 제조과정 중 malolactic 배양액을 첨가한 경우에는 현저히 BAs 함량이 낮아졌다고 하였다. Comuzzo 등³¹⁾은 유럽 5개국(독일, 오스트리아, 스페인, 프랑스, 이탈리아)에서 유기농으로 재배된 포도를 원료로 한 포도주 조사에서 국가별로 BAs (histamine, putrescine, tyramine)의 함량 차이를 확인하고 그 원인으로 지역별 기후 조건과 포도주 제조기술의 차이로 설명하였는데, 불완전

발효와 높은 pH는 박테리아 성장을 통제할 수 없게 되어 상당한 농도의 BAs가 생성될 수 있다고 하였다. Gloria 등¹⁷⁾은 브라질 시판 맥주를 하면발효맥주 (lager, bock), 상면발효맥주(stout), 아이스맥주, 무알콜맥주로 구분하여 BAs 함량을 조사하였는데 stout 맥주에서 tyramine과 tryptamine 함량이 다른 맥주들에 비해 더 많이 검출되었다고 하였다.

식품의약품안전처는 일부 수산물에 한하여 histamine 기준(200 mg/kg 이하)을 설정하여 관리하고 있으나 그 외 식품에 대한 기준은 설정되어 있지 않으며, 미국, 유럽에서도 수산물에 한하여 각각 50, 100 mg/kg으로 규제⁴⁾하고 있다. 독일, 벨기에, 프랑스의 포도주 수입업체들은 histamine의 권고기준으로 각각 2, 5-6, 8 mg/L를 제시하고 있다.⁸⁾ 본 조사에서 포도주의 histamine 함량은 평균 0.72 mg/L, 검출 범위는 ND-4.02 mg/L로 유럽 국가들의 권고기준을 만족하는 수준이었다.

실제 발효주 섭취자의 섭취량을 고려하여 MOE로 추정된 위해성 추정 결과는 최소 92, 최대 9,191로 산출되어 위해성은 낮은 것으로 추정되었다. 식품의약품안전평가원(2016)은 국내 식품 섭취로 인한 BAs 인체 노출은 안전한 수준이나 식습관이나 환경변화에 따라 노출 수준이 안전 영역을 벗어날 수 있어 지속적인 모니터링이 필요하며, 노출 수준이 높은 식품에 대해서는 저감화 대책 조치 등으로 노출을 줄여나가는 방안이 필요하다고 하였다.³²⁾

V. 결 론

본 조사 결과 다양한 BAs가 발효주에서 검출됨이 확인되었으며, 그 종류나 검출량은 제품에 따라 차이가 있음을 확인하였다. MOE 산출로 확인한 결과, 발효주 섭취로 인한 BAs 위해성은 낮은 것으로 추정되었다. 그러나 알코올은 BAs 분해효소 작용을 방해하여 건강한 사람이라도 과도한 음주는 알코올과 BAs 상호작용으로 건강에 위해한 영향을 미칠 수 있어 적절한 음주 습관이 필요하겠다. 향후 발효주 외 BAs를 함유하는 것으로 알려진 다빈도 섭취식품인 치즈, 발효음료, 장류, 젓갈 등의 발효식품을 대상으로 지속적인 조사가 요구되며, 식습관 변화를 반영한 BAs의 노출수준 추정이 필요할 것으로 사료된다.

References

1. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA Journal*. 2011; 9(10): 2393.
2. Dong H, Xiao K. Modified QuEChERS combined with ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry to determine seven biogenic amines in Chinese traditional condiment soy sauce. *Food Chemistry*. 2017; 229: 502-508.
3. Silla Santos MH. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 1996; 29(2-3): 213-231.
4. Biji, KB, Ravishankar CN, Venkateswarlu R, Mohan CO, Gopal TKS. Biogenic amines in seafood: a review. *Journal of Food Science and Technology*. 2016; 53(5): 2210-2218.
5. Shalaby AR. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*. 1996; 29(7): 675-690.
6. Onal A. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*. 2007; 103(4): 1475-1486.
7. Wang YQ, Ye DQ, Zhu BQ, Wu GF, Duan CQ. Rapid HPLC analysis of amino acids and biogenic amines in wines during fermentation and evaluation of matrix effect. *Food Chemistry*. 2014; 163: 6-15.
8. Ordóñez JL, Troncoso AM, García-Parrilla MDC, Callejon RM. Recent trends in the determination of biogenic amines in fermented beverages-A review. *Analytica Chimica Acta*. 2016; 939: 10-25.
9. Mo Dugo G, Vilasi F, La Torre GL, Pellicano TM. Reverse phase HPLC/DAD determination of biogenic amines as dansyl derivatives in experimental red wines. *Food Chemistry*. 2006; 95(4): 672-676.
10. Korea Agro-Fisheries and Food Trade Corporation. 2015 Status of processed food segment market-liquor market. Naju: 2016. p.65-83.
11. Martuscelli M, Arfelli G, Manetta AC, Suzzi G. Biogenic amines content as a measure of the quality of wines of Abruzzo (Italy). *Food Chemistry*. 2013; 140(3): 590-597.
12. Leitao MC, Marques AP, San Romao MV. A survey of biogenic amines in commercial Portuguese wines. *Food Control*. 2005; 16(3): 199-204.
13. Anli RE, Vural N, Yilmaz S, Vural YH. The determination of biogenic amines in Turkish red wines. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2004; 17(1): 53-62.
14. Pineda A, Carrasco J, Pena Farfal C, Henriquez Aedo K, Aranda M. Preliminary evaluation of biogenic amines content in Chilean young varietal wines by HPLC. *Food Control*. 2012; 23(1): 251-257.
15. Prete VD, Costantini A, Cecchini F, Morassut M, Garcia Moruno E. Occurrence of biogenic amines in wine: The role of grapes. *Food Chemistry*. 2009; 112(2): 474-481.
16. Marques AP, Leitao MC, San Romao MV. Biogenic amines in wines: Influence of oenological factors. *Food Chemistry*. 2008; 107(2): 853-860.
17. Gloria MBA, Izquierdo Pulido M. Levels and significance of biogenic amines in Brazilian beers. *Journal of Food Composition and Analysis*. 1999; 12(2): 129-136.
18. Kalac P, Savel J, Krizek M, Pelikanova T, Prokopova M. Biogenic amine formation in bottled beer. *Food Chemistry*. 2002; 79(4): 431-434.
19. Loret S, Deloyer P, Dandrifosse G. Levels of biogenic amines as a measure of the quality of the beer fermentation process: Data from Belgian samples. *Food Chemistry*. 2005; 89(4): 519-525.
20. Cho TY, Han GH, Bahn KN, Son YW, Jang MR, Lee CH, et al. Evaluation of biogenic amines in Korean commercial fermented foods. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 2006; 38(6): 730-737.
21. Nam HW, Lee KW, Myung CO, Rhee JS, Lee YC, Hong CS. Analysis on the contents of histamine in Korean foods. *Korean Journal of Food and Cookery Science*. 1996; 12(4): 487-492.
22. Korea institute of food and drug safety evaluation. Guide to harmful substance analysis for total dietary study, Cheongju: 2017. p.157-187.
23. Busto O, Miracle M, Guasch J, Borrull F. Determination of biogenic amines in wines by high-performance liquid chromatography with on-column fluorescence derivatization. *Journal of Chromatography A*. 1997; 757(1-2): 311-318.
24. Korea institute of food and drug safety evaluation. Standardization guidelines for food consumption calculation and pollution monitoring, Cheongju: 2018.
25. European Food Safety Authority (EFSA). Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to a harmonised approach for risk assessment of substances which are both genotoxic and carcinogenic. *EFSA Journal*. 2005; 3(10): 282.
26. FAO. On estimating the risk of developing histamine poisoning from the consumption Thai fish

- saucers. Available: http://www.fao.org/tempref/codex/Meetings/CCFFP/ccffp31/CRD/CRD_18_Thailand.pdf (accessed 4 October 2019).
27. Korea institute of food and drug safety evaluation. Common guidelines for risk assessment of human applied products. Cheongju: 2019.
 28. Simat V, Dalgaard P. Use of small diameter column particles to enhance HPLC determination of histamine and other biogenic amines in seafood. *LWT-Food Science and Technology*. 2011; 44(2): 399-406.
 29. Preti R, Antonelli ML, Bernacchia R, Vinci G. Fast determination of biogenic amines in beverages by a core-shell particle column. *Food Chemistry*. 2015; 187: 555-562.
 30. Papageorgiou M, Lambropoulou D, Morrison C, Klodzinska E, Namiesnik J, Plotka-Wasyłka J. Literature update of analytical methods for biogenic amines determination in food and beverages. *Trends in Analytical Chemistry*. 2018; 98: 128-142.
 31. Comuzzo P, Rauhut D, Werner M, Lagazio C, Zironi R. A survey on wines from organic viticulture from different European countries. *Food Control*. 2013; 34(2): 274-282.
 32. Korea institute of food and drug safety evaluation. Risk Assessment of Biogenic Amines. Cheongju: 2016.

<저자정보>

배철민(보건연구사), 신인철(보건연구관),
이 완(보건연구관), 이혁화(보건연구사),
최여은(보건연구사), 김영주(보건연구사),
이가희(보건연구사), 정경진(보건연구관),
최승봉(환경연구관)