

664.805655

L293A

최종보고서

생체촉매시스템과 고에너지처리에 의한 된장의 발효속성 촉진방법 개발

Accelerated aging process of soybean paste by using enzyme systems and γ -irradiation

방사선조사 청국장의 free-radical 생성 측정

Detect of Free Radicals in γ -Irradiated Soybean Paste by Electron Spin Resonance spectroscopy

방사선조사에 의한 청국장의 향미성분 변화

Changes in volatile flavor compounds in chungkukjang by γ -irradiation

생체촉매조합에 의한 된장의 향미변화

Changes in the flavor of rapid-aging Doenjang by adding enzyme systems to chungkukjang

청국장을 이용한 전통된장 속성제조법

Rapid-aging process of Doenjang by using chungkukjang

속성 된장의 소비자 수용도 조사

Consumer acceptance test of rapid-aging Doenjang

고 려 대 학 교

(참여기업 : (주)해마식품, (주)그린피아)

농 립 부



최 종 보 고 서

2001 년도 농림기술개발사업에 의하여 완료한 생체축매조합과 고에너지처리에 의한 된장의 발효숙성 촉진방법 개발에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

첨부 : 1. 최종보고서 10부

2. 최종보고서 디스켓 1매

2002 년 1월 11일

주관연구기관 : 고려대학교

총괄연구책임자 : 이철호 (인)

주관연구기관장 : 고려대학교 총장

농림부장관 귀하

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “생체축메시시스템과 고에너지처리에 의한 된장의 발효숙성 촉진방법 개발”의 최종보고서로 제출합니다.

2002 년 1 월 11 일

주관연구기관명 : 고려대학교

총괄연구책임자 : 이 철 호 (고려대학교)

세부연구책임자 : 이 철 호 (고려대학교)

연 구 원 : 이 은 주 (고려대학교)

이 숙 중 (고려대학교)

안 보 선 (고려대학교)

이 유 신 (고려대학교)

박 영 원 (고려대학교)

박 흥 욱 (고려대학교)

최 희 주 (고려대학교)

참 여 기 업 : (주) 해마식품

김 영 택, 황 보 학

(주) 그린피아

박 순 연, 김 관 수

여 백

요 약 문

I. 제 목

생체촉매시스템과 고에너지처리에 의한 된장의 발효숙성 촉진 방법 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

된장의 숙성 발효기술을 개발하기 위해 청국장 베이스에 생체촉매시스템의 사용과 방사선 조사를 병행하여 발효 숙성을 촉진하는 기술에 대하여 연구하였다.

우리의 전통 청국장 제조 공정을 대두단백질 속성분해기술로 설정하고 그 주 발효균인 *Bacillus subtilis*에 의한 대두의 신속 분해 공정을 모델화하고 여기에 *Aspergillus oryzae*를 배양한 대두 곡자와 효모 및 효모 추출물을 첨가 숙성하여 냄새를 순화함과 동시에 전통 된장의 향미를 발현시키고자 하였다. 또한 방사선 조사를 병행하여 free-radical 생성에 의한 숙성과정중의 화학 반응을 가속화 하려고 하였다. 위의 실험에서 얻어진 결과를 토대로 하여 숙성된장 제조 공정을 수립하고 그 시제품을 만들어 소비자 기호도 조사를 수행함으로써 산업화 가능성을 검토하고자 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 먼저 방사선 조사에 의한 free-radical 생성정도를 ESR (electron spin resonance)로 측정하는 기술을 확립하였으며 방사선 조사에 의하여 청국장의 향미가 어떻게 변화하는지를 GC-MS를 사용하여 측정하며 그 변화 경향을 파악하였다. 이어서 삶은 콩에 *Bacillus subtilis*를 접종하여 배양한 청국장 베이스에 *Aspergillus oryzae*를 배양한 콩곡자

와 *Saccharomyces rouxii* 또는 효모 추출물을 첨가하여 발효 숙성하는 과정에서 향미의 변화를 관능적으로 관찰하였다. 이러한 일련의 실험 결과로부터 특유의 숙성된장제조 공정을 수립하였으며 이 공정으로 만든 시제품에 대한 소비자 기호도 조사를 실시하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 본 연구에서 개발한 숙성된장 제조 방법은 Pilot plant 수준에서 시험 생산되었으며 앞으로 시장성을 검토한 후 산업화 할 수 있다.
2. 방사선 조사 청국장에서의 free-radical 측정 방법은 복합 시스템에서의 자유기 반응성을 측정할 수 있는 방법을 개발한 것으로 앞으로 이 분야의 연구에 널리 이용될 것으로 보인다. 이 결과는 J. Agricultural and Food Chemistry와 영국 Royal Society of Chemistry에 출판되었다.

- (1) Lee, Eun-Joo, Volkov, Vitaly. I. and Lee Cherl-Ho, Electron Spin Resonance studies of free radicals in γ -irradiated soybean paste, J. Agri. Food Chem., 49, 3457-3462(2001)
- (2) Eun-Joo Lee, Vitaly I. Volkov, and Cherl-Ho Lee, Detection of free radicals in γ -irradiated soybean paste by Electron Spin Resonance Spectroscopy, in Magnetic Resonance in Food Science, ed., by G.A. Webb, P.S. Belton, A.M. Gil and I. Delgadillo, The Royal Society of Chemistry, London, UK, 98-104(2001)

SUMMARY

I . Subject

Accelerated aging process of soybean paste by using enzyme systems and γ -irradiation

II . Summary

The objective of this study is the develop a rapid aging process of soybean paste by using enzyme systems and γ -irradiation. The long period (normally 6 months or longer) of soybean paste aging process is a bottleneck for the economical production of soybean paste in the industry scale.

Chungkukjang, a traditional rapid fermentation process using natural growth of *Bacillus subtilis* on cooked soybean, was used as starting material in this study. However, Chungkukjang produces strong smell which is not well accepted by the new generations in Korea. Therefor, enzyme systems containing mold (*Asp. oryzae*) and yeasts (*Saccharomycess rouxii*, or *S. cerevisiae*) were used to reduce the smell and harmonize the aroma which was resemble to traditional Korean soybean paste. In addition, the effect of γ -irradiation on the biosynthesis of volatile flavor compounds were investigated. The free radical formation in Chungkukjang by γ -irradiation was measured by Electron Spin Resonance spectroscopy under very low temperature conditions (77K~)

By the different irradiation doses, the change in free radical concentration slowed a carrilinearly increasing relationship with irradiation dose in wet samples, whereas a proportional relationship was observed with dried samples. By analysing the ESR spectra, we could identify four different carbon type free radicals together with hydroxy radicals, sulfur radicals and aldehyde radicals.

The effects of γ -irradiation on the chemical composition and volatile compounds in chungkukjang were investigated by using GC-MS. The number of peaks in GC increased significantly by the irradiation of chungkukjang, which indicated the increase in chemical reactions caused by the free radicals formed. The concentrations of oxidized hydrocarbons, hexanal and octanal, and the complex of lipid and protein hydrolyzate, such as heterocyclic, thiol and thiazole, increased significantly by γ -irradiation.

The addition of soybean koji grown with *Asp. oryzae* and yeast enhanced the aging process chungkukjang to make traditional Doenjang. However, low level (0.25-1.0kGy) γ -irradiation did not slow significant improvement of the rapid process. The rapid-aged Doenjang developed in this study and produced by Haema Co. in pilot-plant scale, was tested for consumer acceptance.

The product was well accepted by the panel of 75 people, and the acceptance level was between those of two commercial products, Sunchang Doenjang and Jangdok Doenjang.

Contents

Chapter 1. Introduction	17
--------------------------------------	----

Chapter 2. Detect of Free Radicals in γ-Irradiated Soybean Paste by Electron Spin Resonance spectroscopy	19
---	----

1. Introduction	19
2. Materials and Methods	22
1) Materials	22
2) γ -irradiation condition	22
3. Results and Discussion	31
1) Free radical changes of γ -irradiated chungkukjang	31
A. Chungkukjang	31
B. Chungkukjang powder	39
Summary	47
References	47

Chapter 3. Changes in volatile flavor compounds in chungkukjang by γ-irradiation	57
---	----

1. Introduction	57
-----------------------	----

2. Materials and Methods	60
1) Materials and γ -irradiation methods	60
2) Methods	60
A. Chemical experiments	60
a. General elements analysis	60
b. pH and acidity	60
c. Fatty acids	60
d. Volatile flavor elements	60
B. Sensory evaluation	62
3. Results and Discussion	63
1) Changes of chungkukjang elements by γ -irradiation	63
A. Changes of general elements	63
B. Changes of pH and acidity	63
C. Changes of fatty acids	64
2) Sensory evaluation	69
3) Volatile flavor components	72
Summary	92
Reference	94

Chapter 4. Changes in the flavor of rapid-aging Doenjang by adding enzyme systems to chungkukjang 107

1. Introduction	107
2. Materials and Methods	107
1) Materials	109
A. Production of Chungkukjang	109
B. Production of Doenjang	109
2) Methods	111
A. Measurement of enzyme activity	111

a. Production of enzyme solution	111
b. Amylase activity	111
c. Protease activity	111
B. Analysis of Nitrogen compounds	111
a. Total nitrogen	111
b. Soluble nitrogen	112
c. Amino-type nitrogen	112
d. Ammonia-type nitrogen	112
e. Free amino acid	113
C. Sensory evaluation	113
3. Results and Discussion	117
1) Changes of enzyme activity	117
A. Amylase activity	117
B. Protease activity	117
2) Changes of nitrogen compounds	119
A. Total nitrogen	119
B. Soluble nitrogen	119
C. Amino-type nitrogen	119
D. Ammonia-type nitrogen	119
E. Free amino acid	121
3) Result of sensory evaluation	122
Summary	124
Reference	124

Chapter 5. Rapid-aging process of Doenjang by using chungkukjang

1. Introduction	129
2. Materials and Methods	130
1) Materials	130
2) Methods	130
A. Measurements of enzyme activity	131

a. Production of enzyme solution	131
b. Protease activity	131
B. Nitrogen compounds analysis	132
a. Amino-type nitrogen	132
b. Ammonia-type nitrogen	132
C. Sensory evaluation	133
3. Results and Discussion	134
1) Changes of enzyme activity during aging of Doenjang	134
A. Changes of Protease activity	134
2) Changes of nitrogen compounds during aging of Doenjang	138
A. Changes of Amino-type nitrogen	138
B. Changes of Ammonia-type nitrogen	140
3) Result of sensory evaluation	142
Summary	145

Chapter 6. Consumer acceptance test of rapid-aging Doenjang 147

1. Introduction	147
2. Materials and Methods	147
1) Materials	148
A. Doenjang	148
2) Methods	148
A. sensory evaluation	148
3. Results and Discussion	150
1) Result of sensory evaluation	150

Appendix 151

목 차

제 1 장 서 론	17
제1절 연구개발의 목적과 범위	17
제2절 연구의 배경 및 개요	17
제 2 장 방사선조사 청국장의 free-radical 생성 측정	19
제1절 서 설	19
1. 연구목적	19
2. 연구배경 및 개요	19
제2절 재료 및 방법	22
1. 실험재료	22
가. 청국장	22
나. Model system	22
2. 방사선 조사 조건	22
가. 시료의 방사선 조사처리	22
나. 차폐율 측정	24
다. 차폐율 계산	24
라. ESR 측정 조건	27
1) ESR spectroscopy	27
2) 액체질소 온도조절 측정	29
제3절 결과 및 고찰	31
1. 방사선 조사 청국장에서 Free Radical의 변화	31
가. 청국장	31

1) 77 K에서의 ESR 측정	31
2) Microwave power의 변환 측정	34
3) 온도 변환 측정	37
나. 청국장 분말	39
1) 77 K에서의 ESR 측정	39
2) Microwave power의 변환 측정	41
3) 온도 변환 측정	41
요약	47
참 고 문 헌	49

제 3 장 방사선 조사에 의한 청국장의 향미성분 변화57

제1절 서 설	57
1. 연구목적	57
2. 연구배경 및 개요	57
제2절 재료 및 방법	60
1. 실험재료 및 방사선 조사 방법	60
2. 실험 방법	60
가. 성분 분석 방법	60
1) 일반성분 분석	60
2) pH 및 산도	60
3) 지방산 분석	60
4) 향기성분 분석	60
나. 관능검사 방법	62
제3절 결과 및 고찰	63
1. 감마선 조사에 의한 청국장의 성분 변화	63
가. 일반성분의 변화	63
나. pH와 산도의 변화	63
다. 지방산 조성의 변화	64
2. 관능 평가	69
3. 향기 성분 변화	72

1) 대두와 증자 대두의 향기성분	75
2) 청국장과 감마선 조사 청국장의 향기 성분	82
요 약	92
참 고 문 헌	94

제 4 장 생체촉매조합에 의한 된장의 향미변화 107

제1절 서 설	107
1. 연구 목적	107
2. 연구배경 및 개요	107
제2절 재료 및 방법	109
1. 실험재료	109
가. 청국장의 제조	109
1) 원료	109
2) 사용균주	109
3) 종균의 배양	109
4) 청국장의 담금	109
나. 된장의 제조	109
1) 원료	109
2) 사용균주	109
가) Fungi	109
나) Yeast	110
다) Yeast Autolyzate	110
3) 된장의 담금	110
2. 실험방법	111
가. 효소활성도 측정	111
1) 조효소액 제조	111
2) Amylase activity 측정	111
3) Protease activity 측정	111
나. 질소화합물의 분석	111
1) 총질소	111

2) 수용성 질소	112
3) 아미노태 질소	112
4) 암모니아태 질소	112
5) 유리아미노산 측정	113
다. 관능검사	113
제3절 결과 및 고찰	117
1. 된장숙성 중의 효소활성의 변화	117
가. Amylase 활성의 변화	117
나. Protease 활성의 변화	117
2. 된장숙성중의 질소화합물의 변화	119
가. 수용성 질소의 변화	119
나. 아미노태 질소의 변화	119
다. 암모니아태 질소의 변화	119
라. 된장의 유리아미노산 함량	121
3. 관능검사 결과	122
요 약	124
참고문헌	125

제 5장 청국장을 이용한 전통된장 속성제조법 129

제1절 서 설	129
1. 연구목적	129
2. 연구배경 및 개요	129
제2절 재료 및 방법	130
1. 실험재료	130
가. 원료	130
나. 사용균주	130
다. 청국장 담금	130
라. 된장 제조	130
마. 된장 담금	130
2. 실험방법	131

가. 효소활성도 측정	131
1) 조효소액 조제	131
2) Protease activity 측정	131
나. 질소화합물 분석	132
1) 아미노태 질소	132
2) 암모니아태 질소	132
다. 관능검사	133
1) 예비실험	133
2) 관능검사 본실험	133
제3절 결과 및 고찰	134
1. 된장 숙성 중의 효소활성의 변화	134
가. Protease 활성의 변화	134
1) 숙성 중 비조사구 된장의 Neutral protease activity의 변화	134
2) 숙성 중 비조사구 된장의 Alkaline protease activity의 변화	135
3) 숙성 중 방사선 조사구 된장의 Neutral protease activity의 변화	136
4) 숙성 중 방사선 조사구 된장의 Alkaline protease activity의 변화	137
2. 된장의 저장 중 질소화합물의 변화	138
가. 아미노태 질소의 변화	138
1) 비조사구의 아미노태질소 함량의 변화	138
2) 방사선 조사구의 아미노태질소 함량의 변화	139
나. 암모니아태 질소의 변화	140
1) 비조사구의 암모니아태 질소의 함량 변화	140
2) 방사선 조사구의 암모니아태 질소의 함량 변화	141
3. 관능검사 결과	142
가. 비조사구 숙성된장	142
나. 방사선 조사구 숙성된장의 관능검사 결과	144
요약	145

제 6장 속성 된장의 소비자 수용도 조사	147
------------------------------	-----

제1절 서 설	147
1. 연구목적	147
2. 연구배경 및 개요	147
제2절 재료 및 방법	148
1. 실험재료	148
가. 된장	148
2. 실험방법	148
가. 관능검사	148
1) Panel	148
2) 관능검사 방법	148
제3절 결과 및 고찰	150
1. 관능검사 결과	150

Appendix

제 1장 서론

제 1 절 연구개발의 목적과 범위

된장의 숙성 발효기술을 개발하기 위해 청국장 베이스에 생체촉매시스템의 사용과 방사선 조사를 병행하여 발효 숙성을 촉진하는 기술에 대하여 연구하였다.

우리의 전통 청국장 제조 공정을 대두단백질 숙성분해기술로 설정하고 그 주 발효균인 *Bacillus subtilis*에 의한 대두의 신속 분해 공정을 모델화하고 여기에 *Aspergillus oryzae*를 배양한 대두 곡자와 효모 및 효모 추출물을 첨가 숙성하여 냄새를 순화함과 동시에 전통 된장의 향미를 발현시키고자 하였다. 또한 방사선 조사를 병행하여 free-radical 생성에 의한 숙성과정중의 화학 반응을 가속화 하려고 하였다. 위의 실험에서 얻어진 결과를 토대로 하여 숙성된장 제조 공정을 수립하고 그 시제품을 만들어 소비자 기호도 조사를 수행함으로써 산업화 가능성을 검토하고자 하였다.

제 2절 연구의 배경 및 개요

재래식 된장에 대한 소비자 수요가 아직 대단히 큼에도 불구하고 그 산업적 대량 생산은 이루어지지 않고 있는 실정이다. 그 이유는 전통 된장 제조는 자연 발효에 의하여 만들어 지므로 제품마다 품질이 다르므로 상품성이 결여되며 균일한 제품의 대량 생산이 어렵다. 또한 장기간의 발효 숙성 기간을 거쳐야만 하므로 경제성이 낮고 기업화 생산에서 대단히 불리한 조건에 있다.

일본에서 발전시킨 공업적 된장 또는 미소 제조 방법은 황곡균(*Asp. oryzae*)을 접종하여 순수 배양하여 만든 곡자(Koji)를 사용하므로 균일한 품질의 제품이 만들어 질 수 있다. 그러나 일본식 개량 된장 제조법은 단일균에 의한 발효 숙성 공정을 거치므로 향미가 단순하고 강도가 낮아 우리의 전통 된장이 가지고 있는 독특한 깊은 맛을 내지 못한다. 이러한 이유로 소비자들은 전통 된장을 찾게 되나 그 공업적 생산시스템이 아직 만들어지지 못하여 대량 생산 공급이 되지 못하고 있다.

우리의 전통 된장은 메주를 발효스타터로 사용하는데 메주는 내부에 세균이 성장하면서 강력한 단백질 분해효소를 생산하고 외부에는 황곡균을 주로하는 곰팡이가 자라 아밀라제, 프

로테아제, 리파제 등 각종 분해효소를 생성하는 복합 생체촉매시스템을 이루고 있다. 따라서 본 연구에서는 *Bacillus subtilis*를 배양하여 만든 청국장에 곡자와 효모 및 효모 추출물들을 첨가하여 발효 숙성 함으로써 청국장의 향미를 순화시켜 전통 된장에 가까운 향미를 생산하고자 하였다. 또한 방사선 조사를 실시하여 반응성이 높은 free radical 생성을 조장시킴으로써 숙성기간 중에 일어나는 각종 화학 반응을 촉진하고자 하였다.

식품의 방사선 조사는 세계적으로 그 안전성이 인정되어 광범위하게 사용되고 있다. 말하자면, 병해충 사멸등 저장 목적으로 주로 연구되고 있다. 방사선 조사는 조사식품을 이온화하는 특징을 가지고 있으므로 다양한 화학반응을 촉진 시킬 수 있으며 이것을 발효 숙성 공정의 가속화 기술로 발전시킬 수 있다. 따라서 본 연구는 생체 촉매와 방사선 조사에 의한 발효 숙성 공정의 가속화 기술에 대한 모델 연구로 수행된 것이다.

본 연구는 먼저 방사선 조사에 의한 free-radical 생성정도를 ESR (electron spin resonance)로 측정하는 기술을 확립하였으며 방사선 조사에 의하여 청국장의 향미가 어떻게 변화하는지를 GC-MS를 사용하여 측정하며 그 변화 경향을 파악하였다. 이어서 삶은 콩에 *Bacillus subtilis*를 접종하여 배양한 청국장 베이스에 *Aspergillus oryzae*를 배양한 콩곡자와 *Saccharomyces rouxii* 또는 효모 추출물을 첨가하여 발효 숙성하는 과정에서 향미의 변화를 관능적으로 관찰하였다. 이러한 일련의 실험 결과로부터 특유의 숙성된장제조 공정을 수립하였으며 이 공정으로 만든 시제품에 대한 소비자 기호도 조사를 실시하였다.

제 2 장 방사선조사 청국장의 free-radical 생성 측정

제 1 절 서설

1. 연구목적

ESR (Electron spin resonanace)를 이용한 방사선 조사 청국장의 free-radical 측정, 수분함량 측정, 온도 및 발효 과정에 의한 free-radical 생성 현상을 규명한다.

2. 연구배경 및 개요

한국의 전통 장류인 청국장은 대두 발효식품으로서 발효숙성중에 종균인 *Bacillus sbutilis*, *Bacillus natto* 등이 생산하는 효소의 작용으로 대두의 단백질이 분해되고 끈끈한 점질물이 생성되어 그 특유의 구수한 맛과 고유의 방향을 낸다(Joo, 1971). 청국장은 제조기간이 짧고 제조방법이 간편하나, 각 지방 또는 가정마다 제조방법이 일정하지 않고 시판되고 있는 청국장 역시 주로 군소업체에서 생산되고 있어 품질이 고르지 못한 단점을 가지고 있다. 그럼에도 불구하고 청국장은 각종 필수 아미노산이 된장, 고추장보다도 많이 함유되어 있고 소화율도 높아 한국인의 식생활에 매우 중요한 장류라 할 수 있다(김경자 등, 1982).

현재 학계와 산업체에서는 조리시 강한 냄새 특성이 있는 청국장을 열처리하지 않고도 편리하게 이용할 수 있으며, 기호성이 우수한 새로운 가공식품으로의 개발을 시도하고 있다. 전통적인 방법으로 제조된 청국장의 성분, 향기 등의 단점을 보완하고 제조 공정의 표준화로 균등한 품질의 청국장을 제조하고, 무취 청국장 개발, 항산화 기능 강화, 강력한 두류 분해균 개발, 아미노산 강화 청국장 등을 제조하고자 많은 노력을 기울이고 있다. 그러나 청국장은 품질보존기간이 짧고 독특한 냄새로 인하여 그 이용이 제한되어 있으며 미생물의 농도가 높아 식품 가공 원료 특히 혼합조미료의 부원료로 사용할 때 최종제품의 총균수를 크게 높이는 문제점을 갖고 있다. 청국장을 장기 저장하기 위해서는 그 식품 특성상 기존의 살균 방법을 적용하기 어렵고 그 효과가 낮으므로 향신료의 미생물 살균방법으로서의 우수성이 이미 확인된 방사선 조사를 적용함으로써 살균효과와 함께 발효과정을 차단하는 효과를 기대할 수 있다.

이러한 식품의 방사선 조사는 지난 10년 동안 여러 나라에서 수용되었으며 현재 40여 국가들이 무조건적 또는 제한적 사용에 근거하여 100여가지 식품 항목 또는 식품군에 대한 방사선 조사를 허용하고 있다. 현재까지 FAO, IAEA, WHO, OECD를 중심으로 조사식품의

안전성에 대한 연구가 꾸준히 수행되었고 1983년 국제 식품 규격 위원회(Codex Alimentarius Commission, CAC)는 조사선량이 10 kGy 이하인 경우 독성학적, 미생물학적, 영양학적으로 문제가 없는 것으로 인정 발표하였다. 현재 UN식량농업기구(FAO), 국제 원자력기구(IAEA), 세계보건기구(WHO)가 식품조사에 허용하고 있는 이온화방사선의 종류는 ^{60}Co , ^{137}Cs 으로부터 방출되는 5 MeV이하의 γ 선과 기계장치로부터 발생되는 5 MeV이하의 X선, 10 MeV이하의 전자선이다^{19,20}. 이들 방사선을 이용하여 식품에 조사할 때 이들이 가진 높은 에너지로 인하여 이들이 지나가는 통로에 있는 모든 분자들은 즉시 이온화시켜 이온을 생성하게 한다. 그러므로 방사선 조사란 양전하와 음전하를 생성시키기에 충분한 전리방사선을 식품에 노출시키는 것이다.

X선과 γ 선은 물질을 통과하는 동안 광전효과(photoelectric effect), 콤프톤효과(compton effect), 쌍생성(pair effect)으로 불리는 이온화를 통해 에너지를 방출하게 되는데 이중 식품의 방사선 조사시 주요한 에너지 전달 과정인 Compton effect는 0.1-10 MeV의 에너지를 가진 이온화방사선을 조사시킬 때 일어나는 반응으로 광자는 궤도전자와 충돌한 후 방향이 바뀌면서 에너지가 감소된 상태로 운동을 계속하고 전자는 광자로부터 운동에너지를 얻은 상태로 배출되는 현상을 의미한다. 이렇게 배출된 전자를 특별히 compton electron이라고 하는데, 이들은 식품을 여기시키고 이온화시킬 수 있는 충분한 에너지를 갖게된다.

이와 같이 식품에 방사선 조사처리는 식품 중에 많은 자유기를 생성하게 됨으로 식품에서 방사선 조사 시 생성되는 자유기를 측정하는 연구는 매우 중요하다. 일반적으로 자유기(Free radicals)이란 짝 짓지 않은 전자를 포함한 원자 혹은 분자를 일컫는다. 이러한 자유기는 분자의 열분해, 광분해, 방사선 분해, 전자수수(電子授受) 등에 의해 화학결합이 절단되어 생성되며, 생성된 자유기는 화학적활성이 매우 빠르고 강하여 주변에 또 다른 자유기나 혹은 안정된 분자와 반응하여 변화한다. 지금까지 자유기에 관한 연구들은 지난 50년간 계속적인 발전이 있어왔고 초기의 고에너지 조사와 자유기원으로써의 독성화합물에 관한 연구로부터 최근 생명과학 분야에 있어서 질병 및 노화와 관련된 정상 세포내에서의 자유기 역할에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(Dadayli et al., 1997; Yamaguchi et al., 1999; Sünnetçiođlu, 1998; Gibella et al, 2000, Raffi et al, 2000).

자유기 연구를 수행하는데 있어서 가장 큰 문제점은 이들 자유기의 짧은 반감기, 즉 이들의 높은 반응성이다(Punchard et al., 1996). 그러므로 이러한 특성을 지닌 자유기를 측정하는 것은 매우 어렵다.

기존에 수행되어온 자유기 측정법으로는 DPPH를 이용한 적외선 분광 측정법과 Pulse radiolysis 측정법 등이 있으나 발색을 이용한 적외선 분광법에 있어서는 유도되는 radical을

정확하게 측정할 수 없는 문제점이 있으며 Pulse radiolysis 측정법에서는 측정을 위한 고비용의 문제들이 있다(Kristensen et al., 1999; McPhail et al., 1999). 현재 자유기를 측정하는 가장 유용한 방법으로 Electron spin resonance를 이용한 물리화학적 방법을 꼽을 수 있다.

Electron spin resonance(ESR) 혹은 Electron paramagnetic resonance(EPR) 이란 자기장 영역내에 존재하는 짝짓지 않은 전자가 공명흡수하는 주파수의 크기를 측정하는 물리적 측정법이다. 그러므로 이 방법은 비파괴 검사라는 장점이 있으며 즉각적으로 자유기의 존재를 확인할 수 있을뿐만 아니라 자유기의 종류 및 정량도 가능한 측정방법이다.

지금까지 식품분야에서 ESR을 이용하여 수행한 자유기의 연구로는 단일결정 상태에서의 아미노산 연구와 항산화제의 항산화 연구, 그밖에 방사선 조사식품의 검지기술훈의 연구 등이 수행되었다. 그러나 이들 연구에 있어서의 문제점은 여러 가지 성분으로 구성되어 있는 일반적 식품 내에서 생성되는 자유기를 설명할 수 없는 것과 특정한 몇몇의 자유기 특성에 국한된 trapping 물질들을 이용한 제한적인 측정의 문제, 또한 방사선 조사식품의 검지기술 연구에서와 같이 자유기의 존재 유무만을 확인하는 수준의 연구가 진행되어왔다는 문제점이 있다.

그러므로 본 연구에서는 단일성분이 아닌 복합적 구성을 이루고 있는 청국장을 방사선 조사처리로 자유기를 유도하고 이때 생성되는 자유기의 특성규명 및 정량을 하고자 청국장 및 이를 구성하는 주요 구성성분들을 대상으로 시료의 수분함량 (1-55 %), 방사선 조사의 선량 (1-70 kGy) 및 ESR의 측정 온도 (77-296 K)를 달리 하였을 때의 자유기의 특성과 종류를 관찰하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 실험재료

가. 청국장

시료로 사용된 청국장은 시중에서 판매되고 있는 P사의 제품을 구입하여 사용하였다. 청국장 분말시료의 제조를 위하여 청국장을 동결건조기(Freeze dryer, il-sin eng. Co., Korea)로 건조한 후 분쇄기로 분쇄하고 입자크기를 60 mesh로 한 후 사용하였다. 청국장 분말시료의 진공상태 측정을 위하여 청국장 분말을 ESR 측정관 (Clear Fused Quartz tube : CFQ tube, Wilmad Co., 707-SQ-250 mm, USA)에 담은 후 Vacuum Pumping System (CT-2P-KVP Co.)를 이용하여 30분 동안 1×10^{-5} torr의 크기로 측정관 내부의 공기를 빼내고 acetylene torch를 이용하여 측정관의 입구를 밀봉하였다.

나. Model system

청국장 시료의 측정결과를 뒷받침하기 위한 model system의 시료로서 3차 증류수, 10 % sodium chloride(NaCl) 용액, 수용성 청국장 분액, 불용성 청국장 분액, 탈지 대두단백(ISP), 대두유 등을 사용하였다. 수용성 및 불용성 청국장 분액을 제조하기 위해 청국장 10 g에 증류수 100 ml을 가하고 상온에서 2시간 동안 교반하였다. 원심분리기(Beckman centrifuge, Model J2-MC, Beckman Instruments Inc., USA)를 이용하여 12,000x g에서 10분간 원심분리한 후 상등액은 0.45 μ m PTFE filter(Whatman Inc., UK)로 여과하여 고형분을 제거한 후 수용성 청국장 분액으로 사용하였고 상등액을 제거한 침전물을 불용성 청국장 분액으로 사용하였다(Fig. 2-1). 대두유는 Sigma사(Sigma Chemical Co., USA)에서 판매하는 정제 대두유를 구입하여 사용하였으며 탈지 대두단백은 Bangcroft사(Bangcroft Bag.Inc., USA)에서 구입하여 사용하였다. 분말 상태인 대두단백을 청국장과 유사한 페이스트상으로 만들기 위하여 불용성 청국장의 분액 제조방법과 같은 방법으로 수행하였으며 대두단백 분말의 진공 측정 역시 진공상태의 청국장 분말 공정과 동일하게 수행하였다.

2. 방사선 조사 조건

가. 시료의 방사선 조사처리

방사선 조사를 위하여 시료는 ESR 측정관 넣은 후 액체질소가 담긴 액체질소통에 담근

상태에서 방사선 조사를 실시하였다. 방사선 조사는 한국원자력 연구소에 있는 Co^{60} 조사시설을 이용하였으며 시료를 담은 액체질소통의 차폐율을 감안하여 시간당 7.8 kGy의 선량율로 10, 40, 70 kGy의 총 흡수선량을 얻도록 조사하였다. 조사선량에 따른 free radical의 생성농도를 알아보기 위한 실험으로 청국장과 청국장 분말 시료의 경우 총 흡수선량이 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 kGy로 조사처리 하였고 조사된 모든 시료는 ceric-cerous dosimeter를 이용하여 흡수선량을 확인하였다.

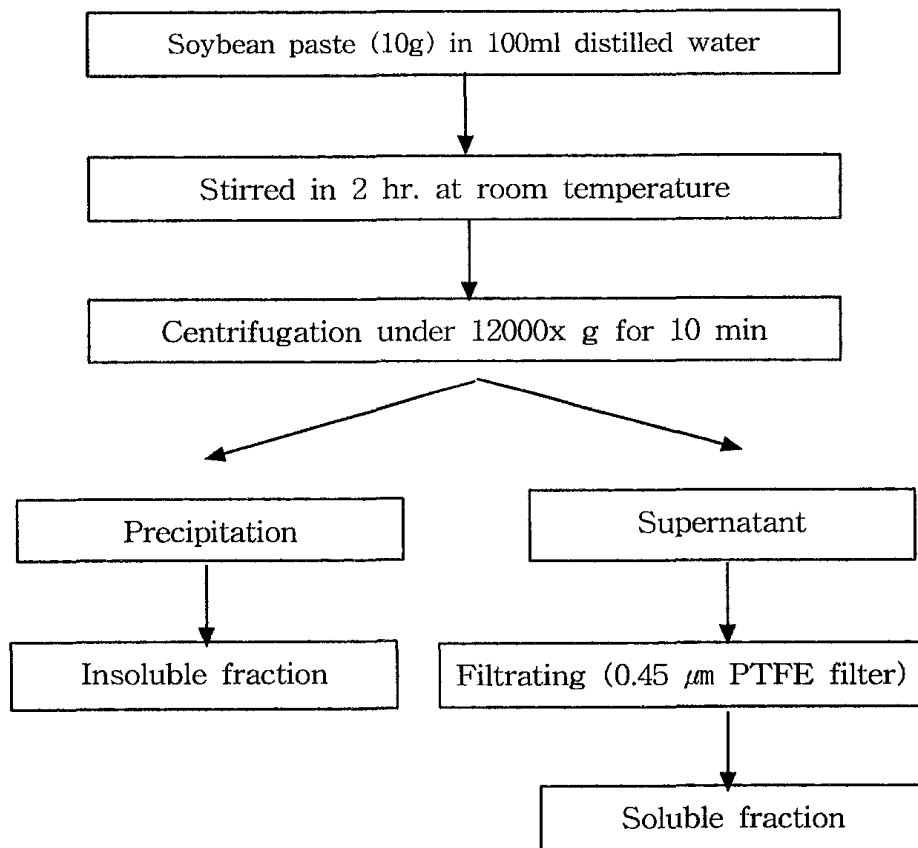


Figure 2-1. Schematic flow chart of the sample preparation of soluble and insoluble fraction in γ -irradiated soybean paste.

나. 차폐율 측정

방사선 조사시 사용된 액체 질소통에 의해 차단되는 조사선량을 측정하기 위하여 액체 질소가 가득 담긴 액체 질소통에 대한 차폐율을 측정하였다. 이때 사용된 두 개의 액체 질소통(Germany)은 직경이 20 cm, 높이가 40 cm인 진공통을 이용하였다. 사용된 조사 선원은 Co^{60} (10 μ Ci)이였으며 측정기는 Nal-Scintillator detector(2" \times 2", SPA-3)를 사용하였다. Fig. 2-2에 나타난 바와 같이 선원과 측정기를 고정하고 방사선을 계측한 후 액체 질소통을 20 cm 두께가 되도록 선원과 측정기 사이에 넣어 계측하고 흡수계수를 산출하였다. 선원별로 1분씩 3회 측정 후 평균치를 적용하였으며 측정된 결과는 Table 2-1에 나타내었다.

다. 차폐율 계산

측정된 액체 질소통의 차폐율 결과는 다음과 같은 공식에 의해 계산되었다.

$$I = I_0 \cdot e^{-\mu \cdot \chi}$$
$$I_0 / I = e^{\mu \cdot \chi}$$
$$\ln (I_0 / I) = \mu \cdot \chi$$
$$\mu = \ln (I_0 / I) / \chi$$

- * I : 액체 질소통이 있을때의 선량
- * I_0 : 액체 질소통이 없을때의 선량
- * μ : 감쇄계수 (cm^{-1})
- * χ : 두께 (cm)

위와 같은 공식에 의한 액체 질소통(I)과 (II)의 차폐율을 계산하면 다음과 같다.

액체 질소통(I) : $\ln (48.5 / 23.2) = 0.735 = \mu \cdot \chi \times 1/2 = 0.368$
(액체 질소통 중심인 10 cm 위치에 다다른 양)
 $I_0 / I = e^{-0.368} = 0.692$

액체 질소통(II) : $\ln (48.5 / 24.1) = 0.697 = \mu \cdot \chi \times 1/2 = 0.347$
(액체 질소통 중심인 10 cm 위치에 다다른 양)
 $I_0 / I = e^{-0.368} = 0.707$

그러므로 액체 질소통(I)에서는 69 %의 감마선이 투과를 하고 31 %가 차폐되었고, 액체 질소통(II)에서는 71 %가 투과를 하고 29 %가 차폐되었다.

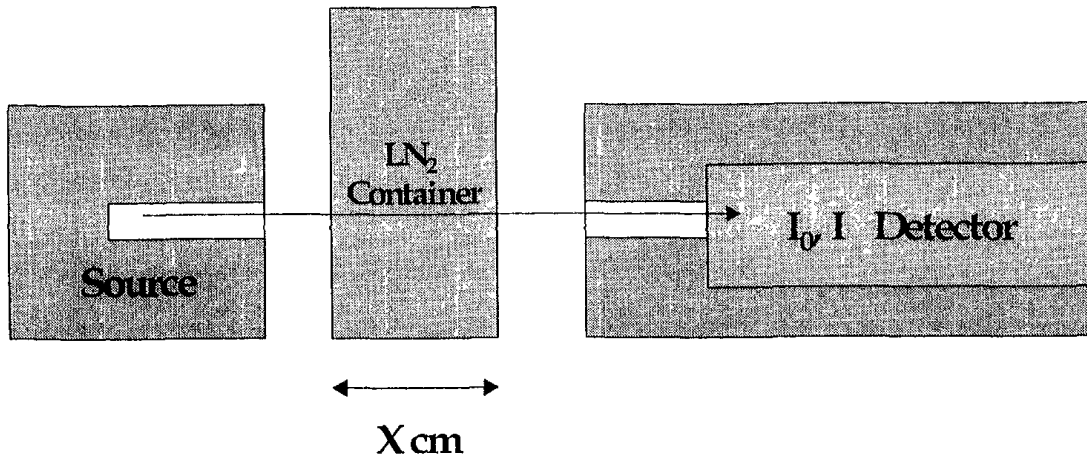


Figure 2-2. Detection of shielding efficiency of liquid nitrogen container.
(I₀: dose without LN₂ container, I: dose with LN₂ container)

Table 2-1. Result of shielding efficiency of liquid nitrogen container.

(unit: count/sec)

Detection No.	Back ground (without container)	Liquid nitrogen container (I)		Liquid nitrogen container (II)	
		Without container	With container	Without container	With container
1	45	93.5	68.4	93.5	69.4
2	45	93.3	68.6	93.3	69.2
3	44.3	93.3	67.4	93.3	68.5
Average	44.9	93.4	68.1	93.4	69.0
N.E.T	-	48.5	23.2	48.5	24.1

라. ESR 측정 조건

1) ESR spectroscopy

본 실험에서 사용한 기계는 Bruker ESP300 ESR 분광기로서 X-band(9.5 GHz)영역에서 실험을 수행하였다. ESR 분광기는 Fig. 2-3에 나타낸 바와 같이 (1) 자기장 쓸기(sweep)를 하고 조정할 수 있는 파워 공급기와 자석, (2) 공동(cavity) 형태의 공명기(resonator)와 microwave bridge, (3) 자기장의 변조 주파수(modulation frequency)에 따라 위상 감응 검출기(phase-sensitive detection, PSD)에 부과되는 신호의 애벌증폭기(preamplifier)와 검출기(detector)와 같은 data 획득을 위한 몇 가지 과정들, (4) 신호 averaging을 포함한 computer acquisition와 data 처리(process)를 위한 과정 등과 같은 요소들로 이루어져 있다. 전자 스핀 공명 신호의 검출 방법은 클라이스트론(klystron)에서 발진되는 마이크로파를 마이크로파 공동 내에 놓여있는 시료에 쏘여 주어 공동에서 반사된 신호를 기록하도록 되어 있다. 시료를 담은 ESR 측정관을 microwave resonant 공동(rectangular parallelepiped cavity, TE102 mode)안에 고정시킨 후 ESR 전이는 자기장을 sweep함에 따라 얻어진다. 공명조건 근처에서 이들 전이는 직접적으로 관측할 수 있는 것이 아니다. 공동(cavity)은 microwave bridge에 직접적으로 연결되어지는데, 이것은 공동(cavity)과 microwave bridge의 은저항(impedance)을 완벽하게 일치시키기 위함이다. 공명 근처에서의 전이와 같이 시료의 자화율은 공동(cavity)에 의해서 주어지는 Q-value의 변화에 따라 변화한다.

$$Q = \frac{2\pi(\text{energy stored in cavity})}{(\text{energy dissipated per cycle})}$$

이 공명조건은 시료에서 자기장을 변화시킴에 따라 유도된 microwave power의 변화의 증폭을 통해서 관측된다. 이것에 의해서 직접적인 흡수신호가 아니라 흡수신호의 미분형이 관측된다. 에너지의 흡수의 변화와 함께, 자화율의 성분에 대한 공동(cavity)의 공명 주파수에 비례하는 ESR 신호의 이동이 존재한다. 신호의 주파수 이동은 ESR 측정에서 관측된다. 하지만 Bruker ESP300 분광기는 공동(cavity)의 공명주파수에 대해서 ESR신호의 이동이 자동적으로 고정되어지는 회로를 사용한다. 그래서 분광기의 작동 주파수는 공동(cavity)의 공명 주파수의 이동에 따라 이동한다(Weber, 1991).

본 실험에 사용된 ESR 분광기의 측정조건으로는 magnetic field 330.0 ± 30 mT, microwave frequency 9.280 GHz, modulation amplitude 0.293 mT, gain 2500, time constant 0.03 sec. 이였고 microwave power는 1, 5, 10, 20, 50, 100, 200 mW의 크기로 변환시키며 측정하였다.

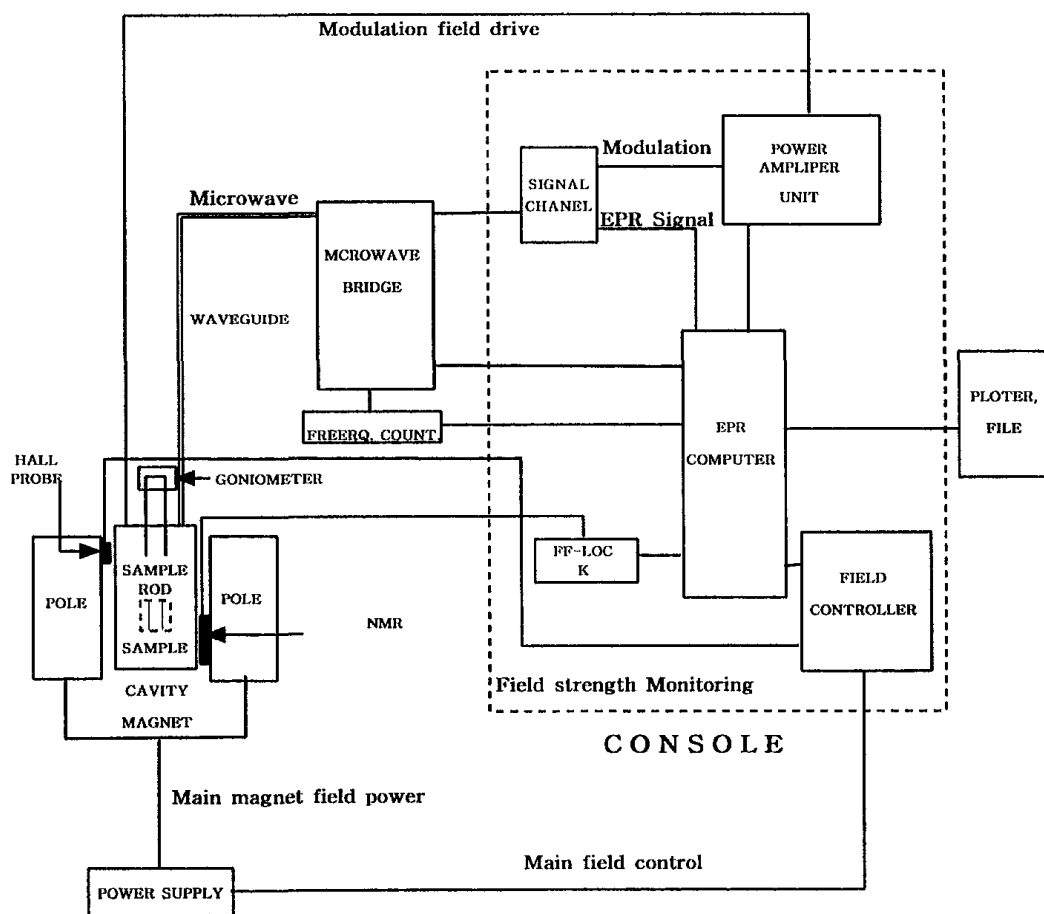


Figure 2-3. Diagram of Electron Spin Resonance(ESR) spectroscopy

2) 액체질소 온도조절 측정

77 K에서 296 K에 이르는 온도 범위에서 공명 신호를 측정하기 위하여 액체질소 온도까지의 자동 온도조절 장치로서는 Bruker사의 ER4111VT를 사용하였다. Fig. 2-4에 나타낸 바와 같이 자동 온도조절 장치를 이용하여 시료를 지나가는 질소기체의 온도를 조절함으로써 시료의 온도를 여러 온도에서 일정하게 유지시킬 수 있었다. 액체 질소통 내의 액체 질소에 집어넣은 열선으로 액체 질소를 가열하여 질소 기체가 끓어오르게 하여 이를 전송통로(transger arm)를 통하여 공동 내의 이중 유리병 내로 보낸다. 이 기체는 유리병 내의 시료를 통과한 후에 공동의 윗 부분에 있는 구멍을 통하여 대기로 방출된다. 전송통로 내에는 또 하나의 열선이 들어 있어서, 질소 기체를 가열하는데 쓰인다. 기체의 온도는 공동 내의 유리병 바닥에 있는 열전대를 이용하여 온도를 읽어 조절된다. 열전대는 공명 신호를 얻는데 방해가 되지 않는 범위 내에서 가능한 한 시료에 가까이 놓았다.

본 실험에서 측정한 측정온도는 77, 120, 150, 190, 210, 296 K이었으며 액체질소에서 보관 중인 시료를 각각의 온도에서 5분간 방치한 후 액체질소가 담긴 dewar flask를 이용하여 77 K에서 측정하였다

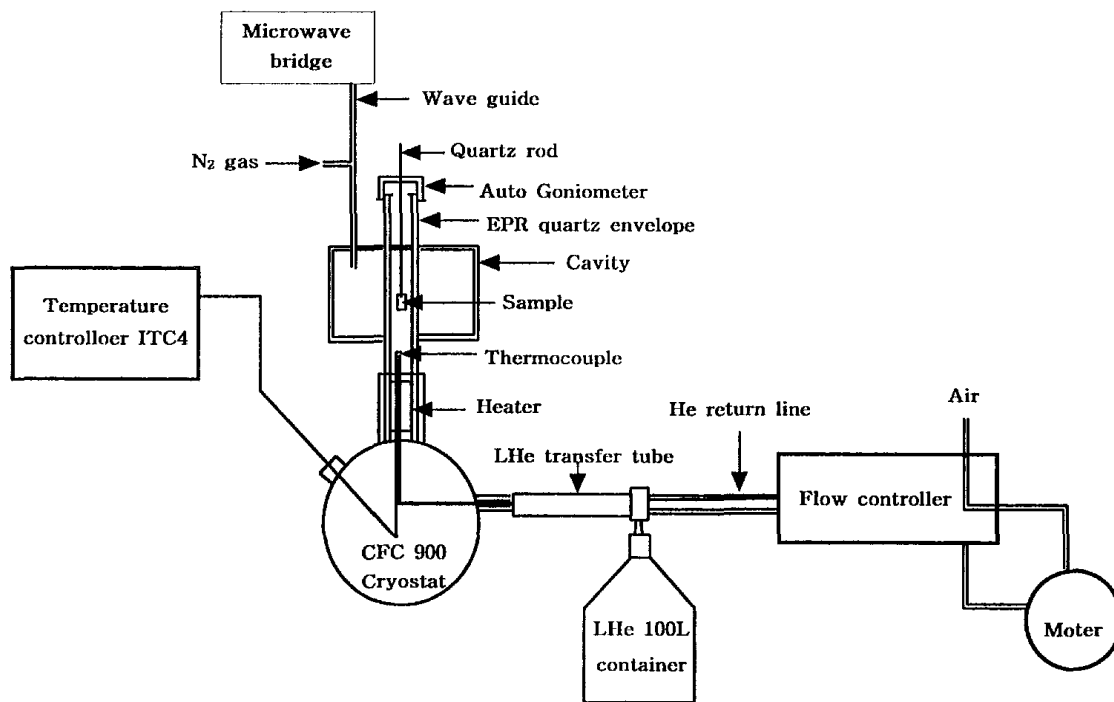


Figure 2-4. Diagram of liquid nitrogen temperature controller in Electron Spin Resonance(ESR) spectroscopy

제 3 절 결과 및 고찰

1. 방사선 조사 청국장에서의 Free Radical의 변화

가. 청국장

1) 77 K에서의 ESR 측정

액체질소 상(77 K)에서 10, 40, 70 kGy로 방사선 조사한 청국장을 동일한 온도를 유지한 상태로 ESR을 측정한 결과는 Fig. 2-5에 나타내었다. 조사선량이 다른 각각의 시료 모두 506 gauss의 크기를 갖는 전형적인 hydrogen radical과 g_e 값을 중심으로 대칭적 신호가 관찰되었다.

그러나 본 실험에서 사용한 ESR 측정관 (Clear Fused Quartz tube : CFQ tube, Wilmad Co., 707-SQ-250 mm, USA)에 시료를 넣지 않고 동일한 처리를 한 것에서도 이와같은 hydrogen radical과 free electron값 주변에서 이중 신호가 관측되었다(Fig. 2-6). 시료를 넣지 않은 ESR 공 측정관에서 hydrogen radical과 free electron값 근처의 이중신호가 나타났지만 각각의 시료에 나타난 hydrogen radical과 이 이중신호의 크기가 ESR 공 측정관의 그것보다 매우 큰 크기를 나타내 ESR 공 측정관에서 유래된 신호들과 뚜렷한 차이를 나타냈다. 그러므로 모든 시료의 ESR 측정 시, ESR의 공 측정관을 시료의 측정조건과 동일하게 맞춰 측정하고 이를 제외한 나머지 신호들을 비교하였다. 또한 hydrogen radical의 짧은 lifetime 특성을 이용하여 본 실험 수행 시 77 K에서 방사선 조사 후 ESR 측정 시까지 동일한 온도에서 안정하게 radical을 유지시켰는지를 확인하는 인자로 hydrogen radical 신호를 이용하였다.

방사선 조사를 하지 않은 청국장 시료에서는 ESR 신호가 관측되지 않았으며, 실온에서 방사선 조사되어 지고 측정된 시료에서는 폭넓은 단일 신호가 관측되었다. 그러나 77 K에서 방사선 조사되어지고 측정된 청국장시료의 ESR 신호들은 free electron위치인 g_e 값 근처에서 크기가 큰 여러개의 신호로 나타났다.

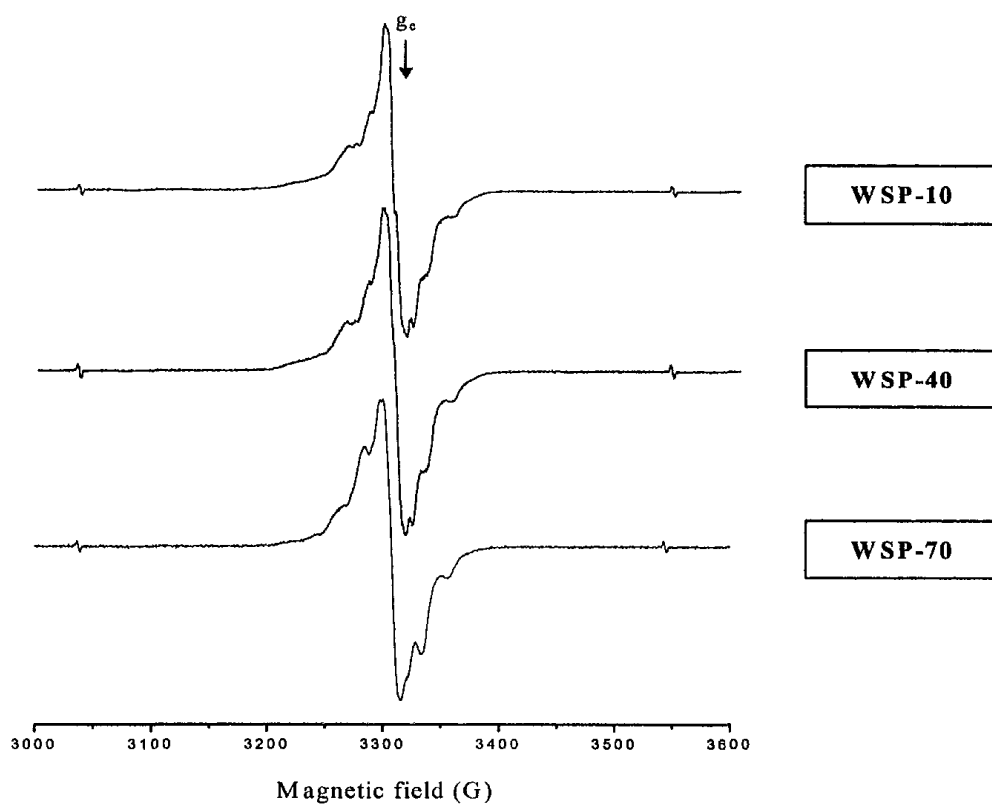


Figure 2-5. ESR spectra of wet soybean paste(WSP) irradiated to 10 (WSP-10), 40 (WSP-40) and 70 (WSP-70) kGy at 77 K. The spectra were recorded at 77 K and microwave power 5 mW.

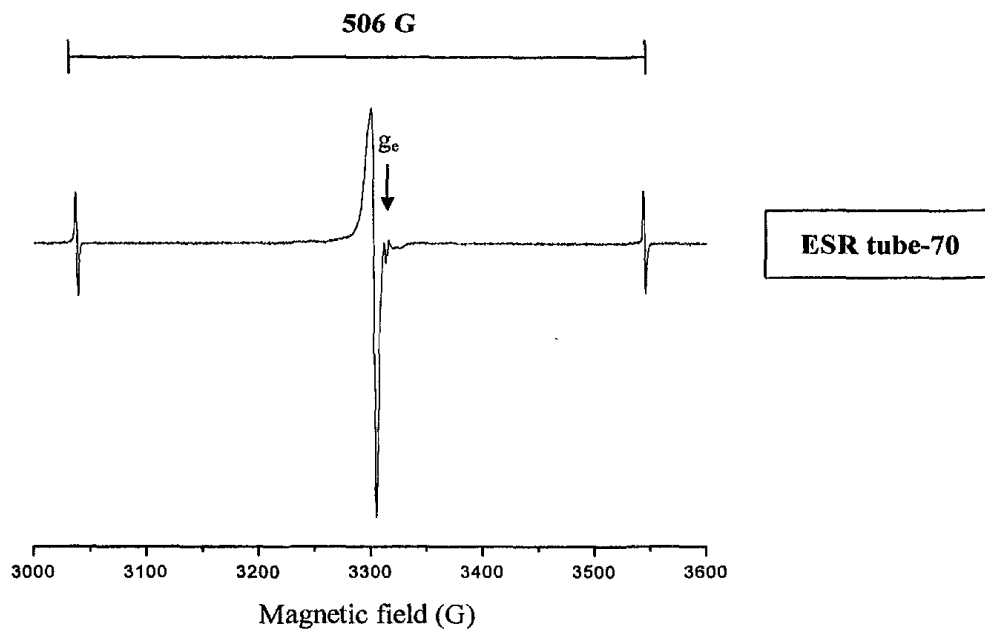


Figure 2-6. ESR spectrum of ESR sample tube (Clear Fused Quartz tube : CFQ tube, Wilmad Co., 707-SQ-250 mm, USA) irradiated to 70 kGy at 77 K. The spectrum was recorded at 77 K and microwave power 5 mW.

2) Microwave power의 변환 측정

77 K에서 측정된 청국장 시료의 ESR 신호 중 저 자장과 고 자장에 나타난 hydrogen radical을 제외한 나머지 신호들을 이용하여 마이크로파 포화방법(microwave saturation method)으로 측정한 결과는 Fig. 2-7에 나타내었다. 이와 같은 측정을 위해 ESR 측정시 microwave power의 크기를 1, 5, 10, 20, 50, 100, 200 mW로 변환시켜 각각의 시료를 측정하였다. Fig. 2-8에 나타난 바와 같이 microwave power의 크기가 변함에 따라 ESR 신호의 모양이 점차 변하는 것으로 나타났는데 이는 이들의 ESR 신호들이 모두 각기 다른 radical로 이루어졌다는 것을 의미한다. 일반적으로 각기 다른 radical의 짝짓지 않은 전자들은 각기 다른 spin-lattice(T_1)과 spin-spin(T_2) relaxation time을 갖게되므로 H_1^2 에 비례하는 microwave power의 크기가 변함에 따라 신호의 크기 비율(I)도 변하게 되는 것이다

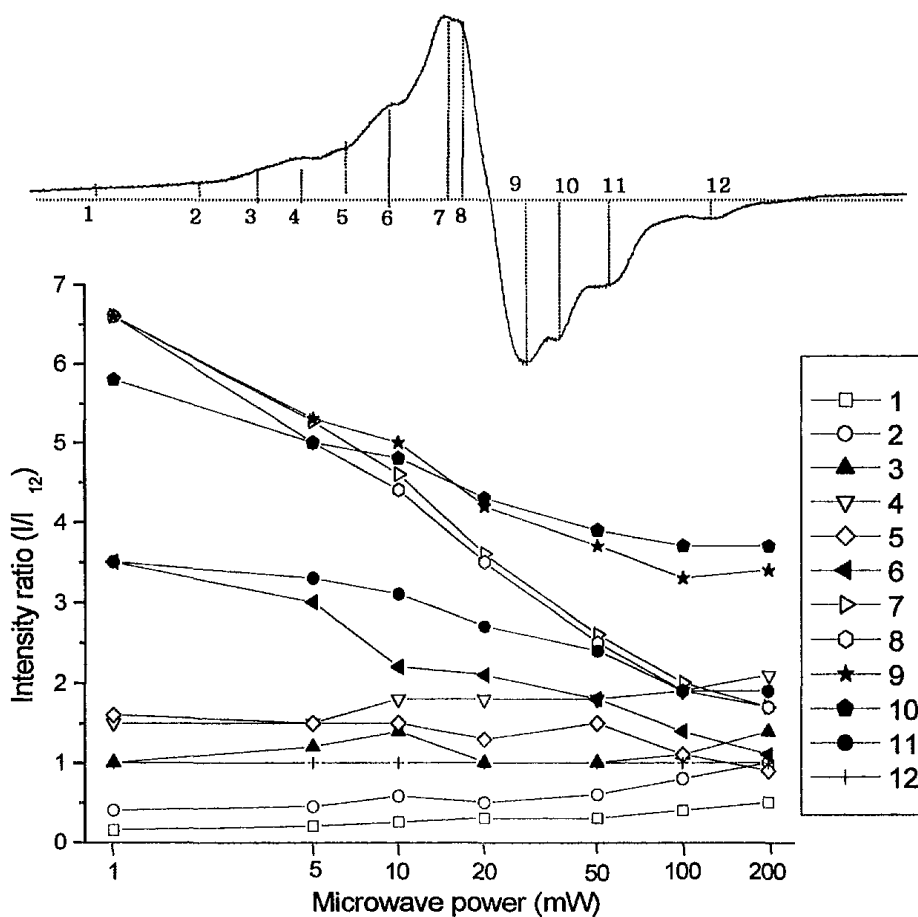


Figure 2-7. The saturation curves for different components of ESR spectra of wet soybean paste (WSP) irradiated to 40 kGy and measured by different microwave power. The temperatures of γ -irradiation and ESR spectra recording were 77 K.

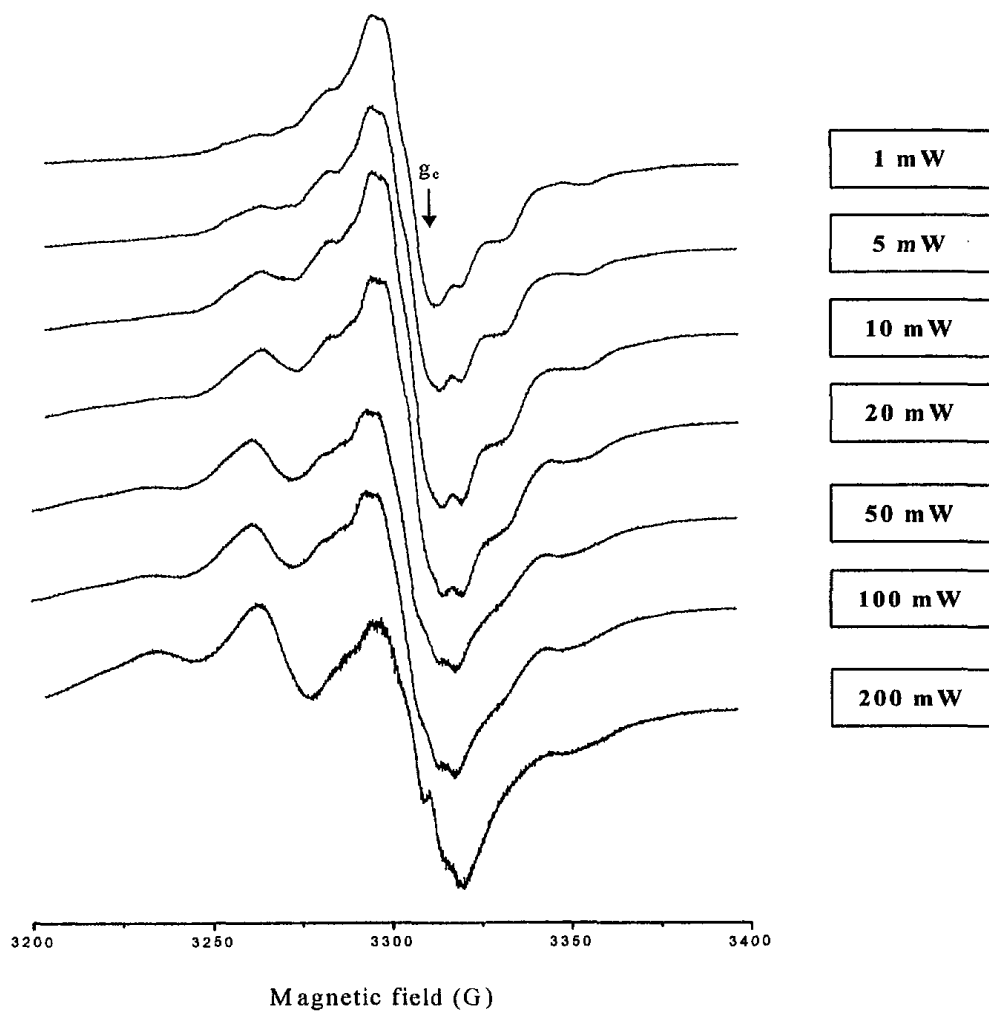


Figure 2-8. ESR spectra of wet soybean paste(WSP) irradiated to 40 kGy at 77 K by different microwave power. The spectra were recorded at 77 K.

3) 온도 변환 측정

온도변화에 따른 free radical의 변화를 측정하기 위하여 액체질소에 보관중인 시료를 77, 120, 150, 190, 210, 296 K으로 변환하여 각각의 온도에서 5분간 방치한 후 액체질소가 담긴 dewar flask를 이용하여 77 K에서 측정하였다(Fig. 2-9, 2-10).

120 K에서는 77 K에서 관측되던 hydrogen radical이 사라지는 것으로 나타나 hydrogen radical이 매우 작은 온도 변화에도 다른 물질과 쉽게 반응한다는 것을 알 수 있었다. 또한 77 K에서 나타났던 크기가 큰 여러개의 신호들은 150 K 이상에서 폭넓은 단일신호로 변환되었는데 이는 방사선 조사시 생성된 청국장 시료 내에 radical들이 150 K을 중심으로 급격히 이동하고 주변의 다른 radical들과 활발히 반응하는 것으로 추정할 수 있다.

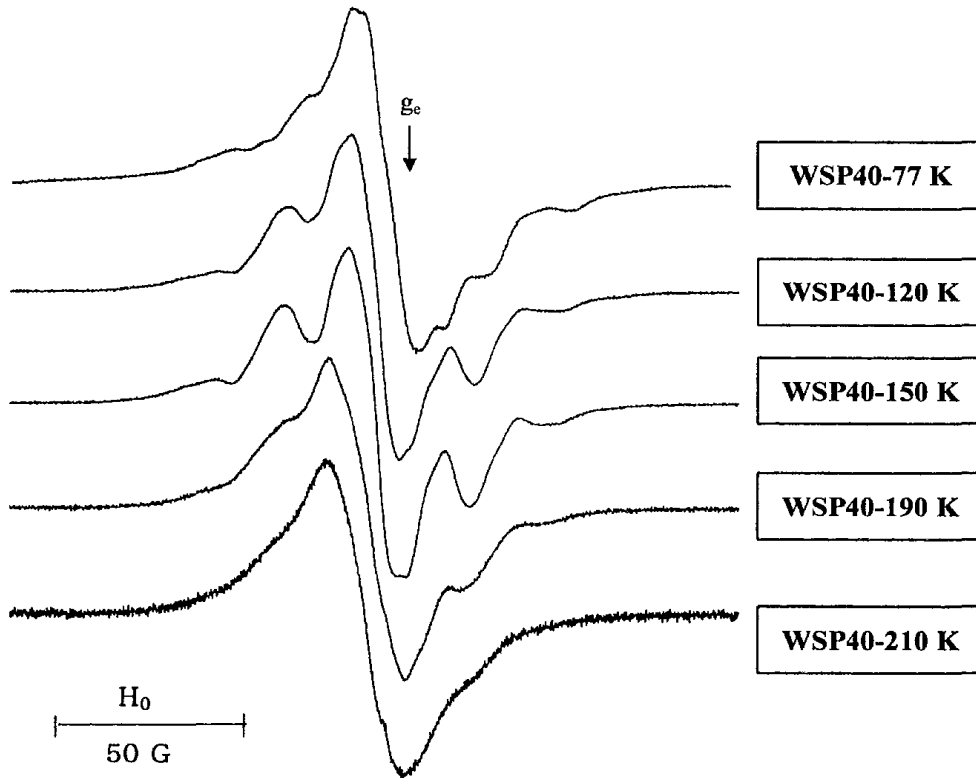


Figure 2-9. ESR spectra of wet soybean paste(WSP) exposed at different temperatures for 5 min. after irradiation to 40 kGy at 77 K. (WSP-120: wet soybean paste heated to 120 K after

irradiation, WSP-150: wet soybean paste heated to 150 K after irradiation, WSP-190: wet soybean paste heated to 190 K after irradiation, WSP-210: wet soybean paste heated to 210 K after irradiation). Microwave power was 5 mW.

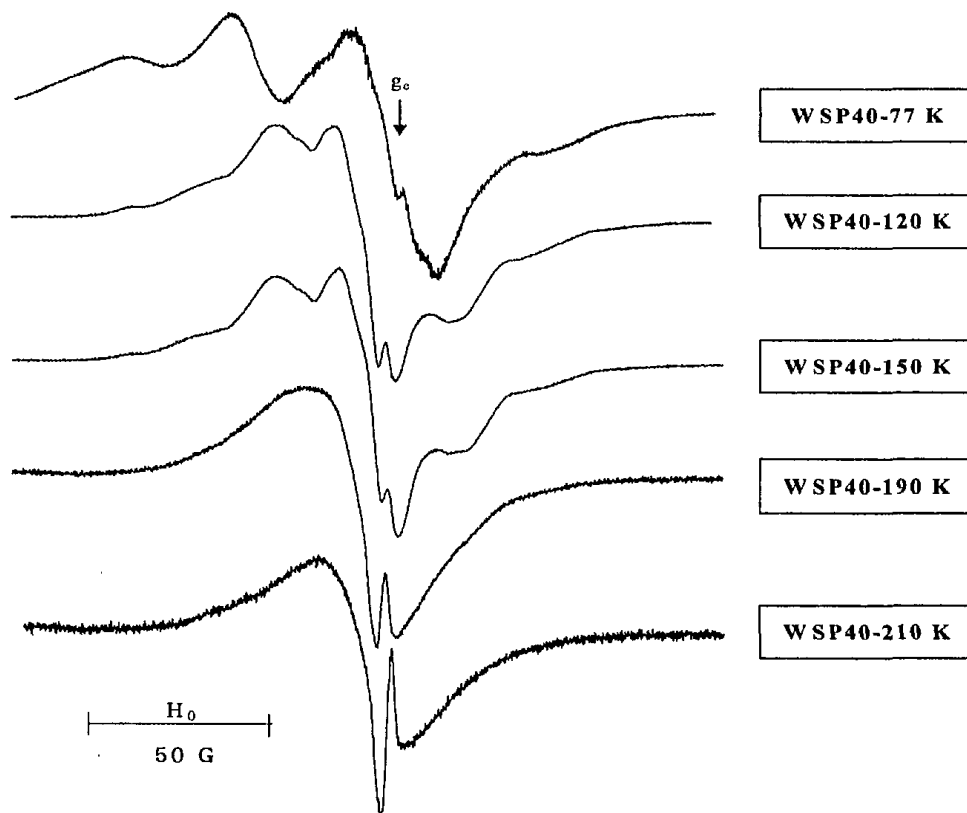


Figure 2-10. ESR spectra of wet soybean paste(WSP) exposed at different temperatures for 5 min after irradiation to 40 kGy at 77 K. (WSP-120: wet soybean paste heated to 120 K after irradiation, WSP-150: wet soybean paste heated to 150 K after irradiation, WSP-190: wet soybean paste heated to 190 K after irradiation, WSP-210: wet soybean paste heated to 210 K after irradiation). Microwave power was 200 mW.

나. 청국장 분말

1) 77 K에서의 ESR 측정

청국장과 수분함량을 달리한 청국장 분말의 ESR을 측정한 결과는 Fig. 2-11에 나타내었다. 청국장 분말시료 역시 청국장 시료에서와 마찬가지로 조사 선량이 다른 각각의 시료에서 모두 506 gauss의 크기를 갖는 전형적인 hydrogen radical과 g_e 값을 중심으로 대칭적 신호가 관찰되었다. 방사선 조사를 하지 않은 청국장 분말시료에서도 ESR 신호는 관측되지 않았으며, 77 K에서 방사선 조사되어지고 측정된 청국장 분말시료의 ESR 신호들은 청국장 신호와는 달리 free electron 위치인 g_e 값 근처에서 크기가 작은 여러개의 신호들이 합쳐진 단일신호로 나타났다. 또한 조사선량이 증가함에 따라 신호의 강도가 크게 달라지지 않던 청국장 시료와는 달리 청국장 분말시료의 경우, 조사 선량의 크기에 따라 신호의 강도가 비례하여 증가하였다.

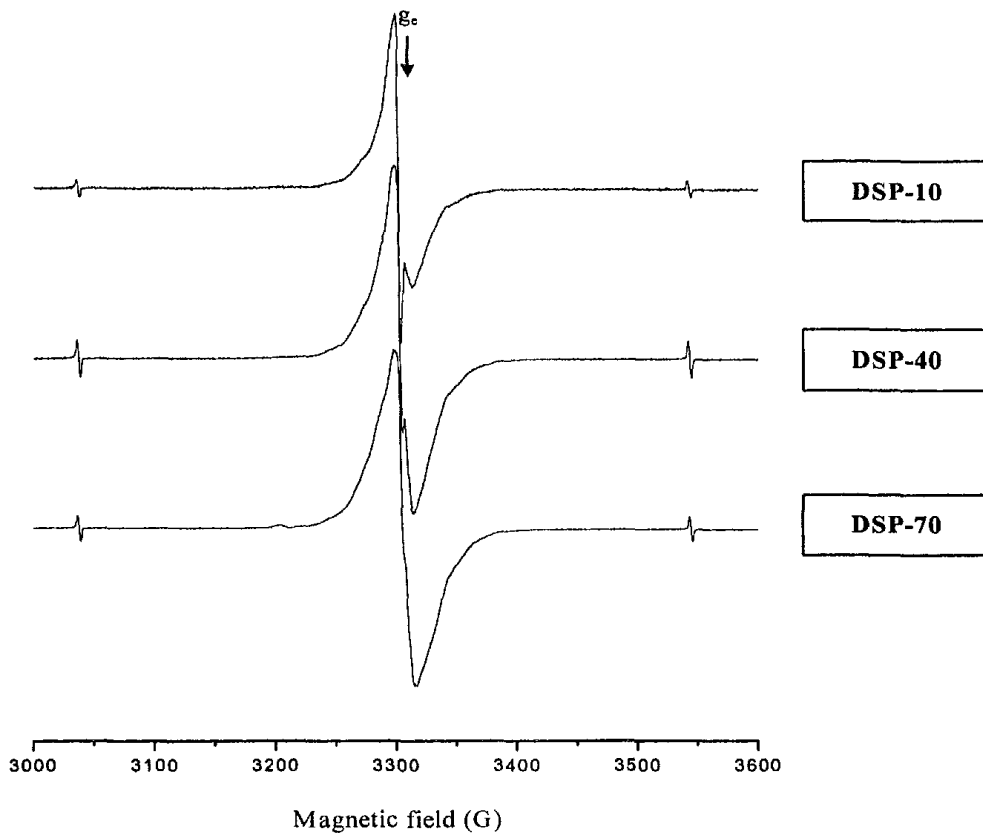


Figure 2-11. ESR spectra of dry soybean paste(DSP) irradiated to 10 (DSP-10), 40 (DSP-40) and 70 (DSP-70) kGy at 77 K. The spectra were recorded at 77 K and microwave power 5 mW.

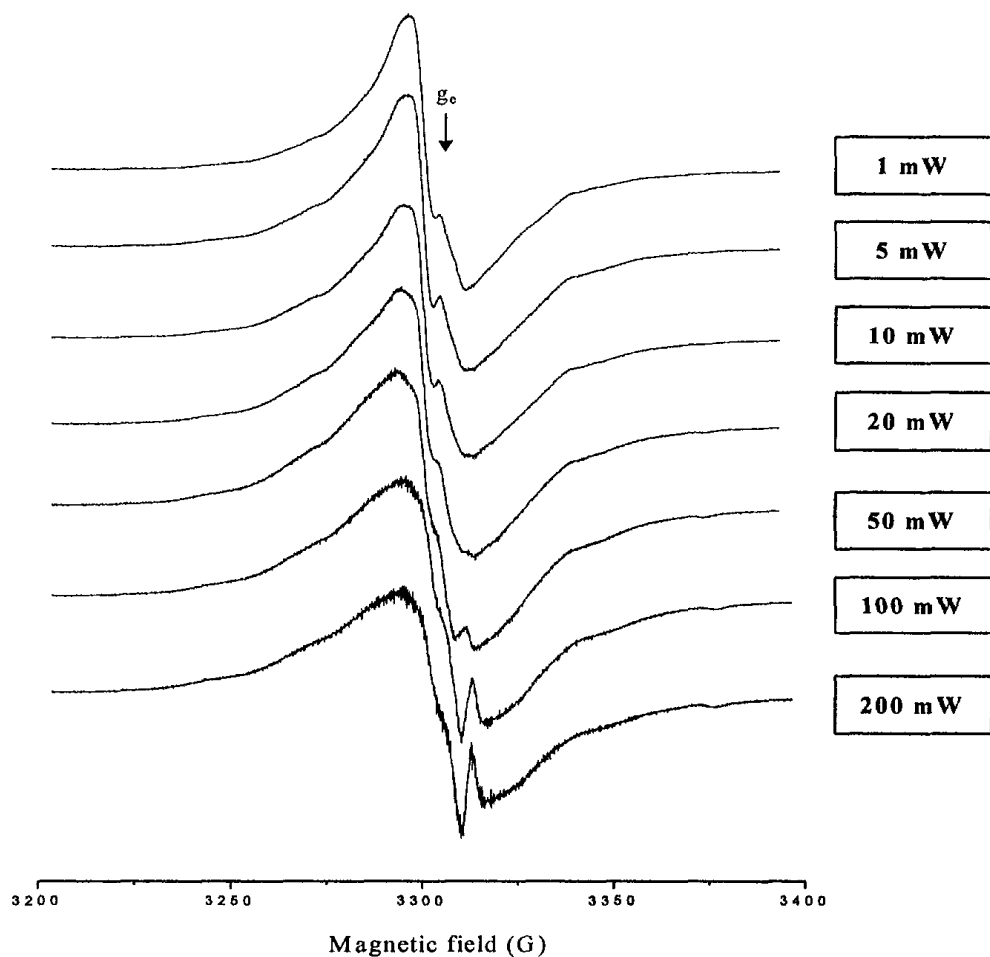


Figure 2-12. ESR spectra of dry soybean paste(DSP) irradiated to 40 kGy at 77 K by different microwave power. The spectra were recorded at 77 K.

2) Microwave power의 변환 측정

77 K에서 측정된 청국장 분말 시료의 ESR 신호 중 저 자장과 고 자장에 나타난 hydrogen radical을 제외한 나머지 신호들을 이용하여 마이크로파 포화방법(microwave saturation method)으로 측정한 결과는 Fig. 2-12에 나타내었다(Poole, 1967). 청국장 시료에서와 같이 수분함량을 달리한 청국장 분말 시료에서도 microwave power의 크기가 변함에 따라 ESR 신호의 모양이 점차 변하는 것으로 나타났는데 이 역시 이들 ESR 신호들이 모두 각기 다른 radical로 이루어졌다는 것을 의미한다.

앞서 청국장 시료에서 설명한 바와 같이 아래의 공식을 이론으로 하여 계산한 포화곡선(saturation curves)은 Fig. 2-13에 나타내었다. 여기에 예로 사용한 ESR 신호는 Fig. 2-12의 1 mW를 이용하였고 5번 변곡점의 크기를 기준으로 신호세기의 비율을 계산하였다. 청국장 분말의 포화곡선의 경우, group I (line 1,7), group II (lines 2, 6), group III (lines 4,3), group IV (lines 5) 과 같이 relaxation time이 다른 4가지 형태의 신호를 구별할 수 있었다. 이와 같이 각기 다른 group들은 각기 다른 형태의 radical에서 유래된 것을 의미하며, 청국장 분말의 청국장의 포화곡선의 경우 각 group별 relaxation time의 크기는 $T_1(I) < T_1(II) < T_1(IV) < T_1(III)$ 의 순으로 증가한다.

$$I \sim H_1^2 \cdot X_0 \cdot \omega \cdot \omega_0 [T_2/1 + T_2^2(\omega_0 - \omega)^2 + \gamma^2 H_1^2 T_1 T_2]$$

X_0 : magnetic susceptibility

ω : microwave frequency

ω_0 : resonance microwave frequency

H_1 : magnetic field amplitude

γ : electron gyro magnetic ratio

3) 온도 변환 측정

청국장 분말시료의 온도변화에 따른 free radical 측정결과는 Fig. 2-14와 2-15에 나타내었다. 청국장 시료에서와 같이 77 K에서 관측되던 hydrogen radical은 120 K에서 관측되지 않았으며 청국장 분말 시료의 경우, 77 K에서 나타났던 크기가 작은 여러 개의 신호들은 190 K 이상까지 안정하게 유지되다가 실온인 296 K에서는 모두 사라지고 폭 넓은 단일신호만이 관측되었다. 이와 같이 수분함량이 큰 청국장 시료에서는 150 K의 비교적 낮은 온도에서도 free radical의 반응이 매우 활발했으나 수분함량이 적은 청국장 분말 시료의 경우,

150 K보다 높은 온도까지도 free radical의 반응이 활발하지 않음을 알 수 있었다.

이러한 paramagnetic center 수를 현실적으로 간편하게 측정하는 방법은 이미 paramagnetic particles 수(Nst)를 알고있는 표준시료의 ESR 신호의 강도와 측정하고자 하는 시료의 ESR 신호의 강도를 비교하여 측정하는 방법이다. 시료의 paramagnetic center 수(N)와 radical concentration (C)를 계산하는 공식은 다음과 같다.

$$N = Nst B (S / Sst) \quad [3]$$

$$C = N / \text{weight of sample (g)} \quad [4]$$

$$B = [Qost \text{ g}st(T-Tc)Ast V] / [Qo \text{ g}(T-Tc)stAVst] = 1.$$

S = The area by double integration when the first derivative of the absorption signal in sample

Sst = The area by double integration when the first derivative of the absorption signal in standard

본 실험에서 사용한 표준물질로는 0.005g copper sulfate pentahydrate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) single crystal을 사용하였다. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 의 분자량이 250 g일 경우, 이때의 분자수는 아보가드로 수인 6×10^{23} 에 해당하게 되므로 실험에서 사용한 무게인 0.005 g의 경우, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 는 1.2×10^{19} 의 분자수를 갖고 있는 것이다. 이를 ESR로 측정하고 그 신호의 면적(Sst)을 계산하면 2.055×10^9 의 크기로 나타나는데, 여기에 각각의 조사선량으로 방사선 조사처리된 청국장과 청국장 분말 시료의 ESR 신호를 면적으로 환산한 후 그 값을 표준시료의 값과 비교하여 각 시료들의 radical 농도를 측정하였다. 예를 들면 5 kGy로 조사된 1 g의 청국장 시료의 ESR 신호면적이 9.11×10^8 이었으므로 이 시료의 paramagnetic center 수(N)와 radical 농도(C)는 5.32×10^{18} 이 된다.

이상과 같이 측정된 청국장과 청국장 분말 시료의 radical 농도는 Fig. 2-16에 나타내었다. Fig. 2-16에 나타낸 바와 같이 청국장과 청국장 분말 시료의 radical 농도 결과는 큰 차이를 나타내고 있다. 10 kGy이하의 낮은 선량의 경우 청국장 시료의 radical 농도가 청국장 분말 시료의 농도보다 높은 것으로 나타났으며 청국장 시료의 경우, 조사선량이 증가함에 따라 radical 농도가 곡선적으로 증가하는 경향을 나타내었다. 그러나 청국장 분말 시료의 경우, 조사선량이 증가함에 따라 radical의 농도가 직선적으로 증가하였으며 77 K에서 측정

한 청국장 분말 시료를 실온에서 15분간 방치한 후 77 K에서 재 측정된 결과 역시 직선적인 증가를 나타내었다. 이와 같은 결과로 수분함량이 큰 청국장 시료의 경우, 낮은 조사선량에서 수분으로부터 유래되는 radical의 함량이 매우 크다는 것을 알 수 있었으며, 10 kGy 이상의 조사선량에서 수분이외의 성분으로부터 radical이 생성됨을 추측할 수 있다.

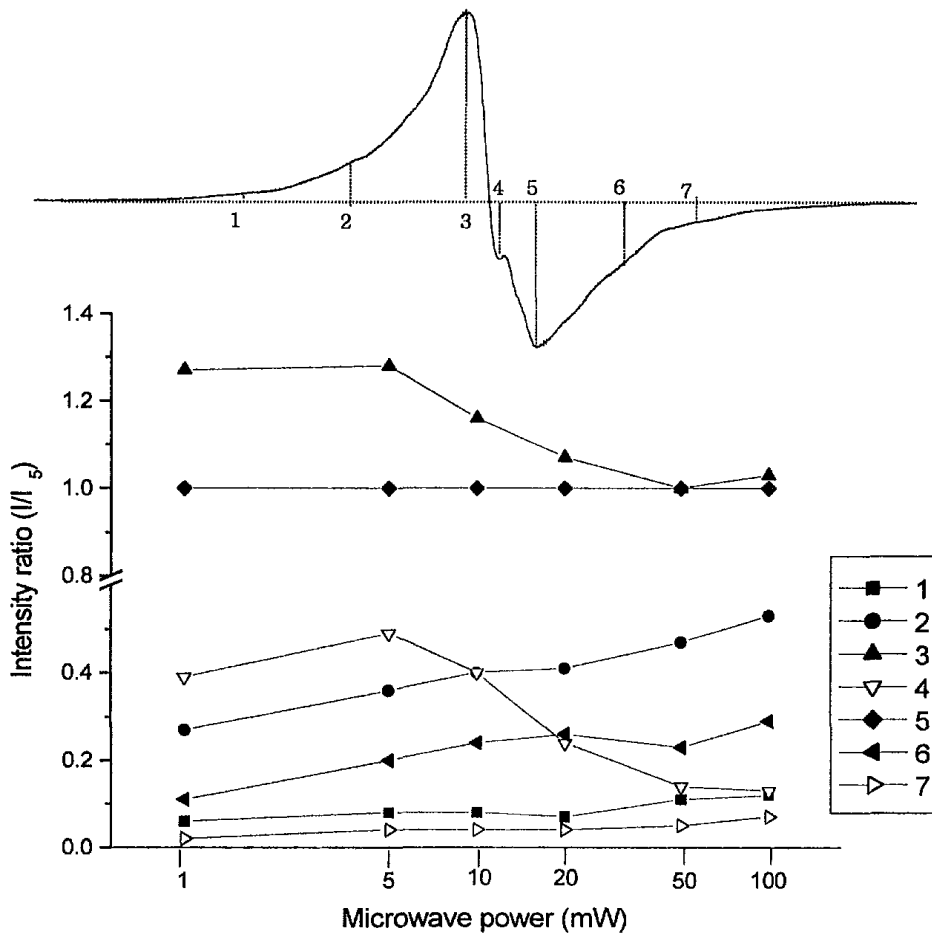


Figure 2-13. The saturation curves for different components of ESR spectra of dry soybean paste (DSP) irradiated to 40 kGy and measured by different microwave power. The temperatures of γ -irradiation and ESR spectra recording were 77 K.

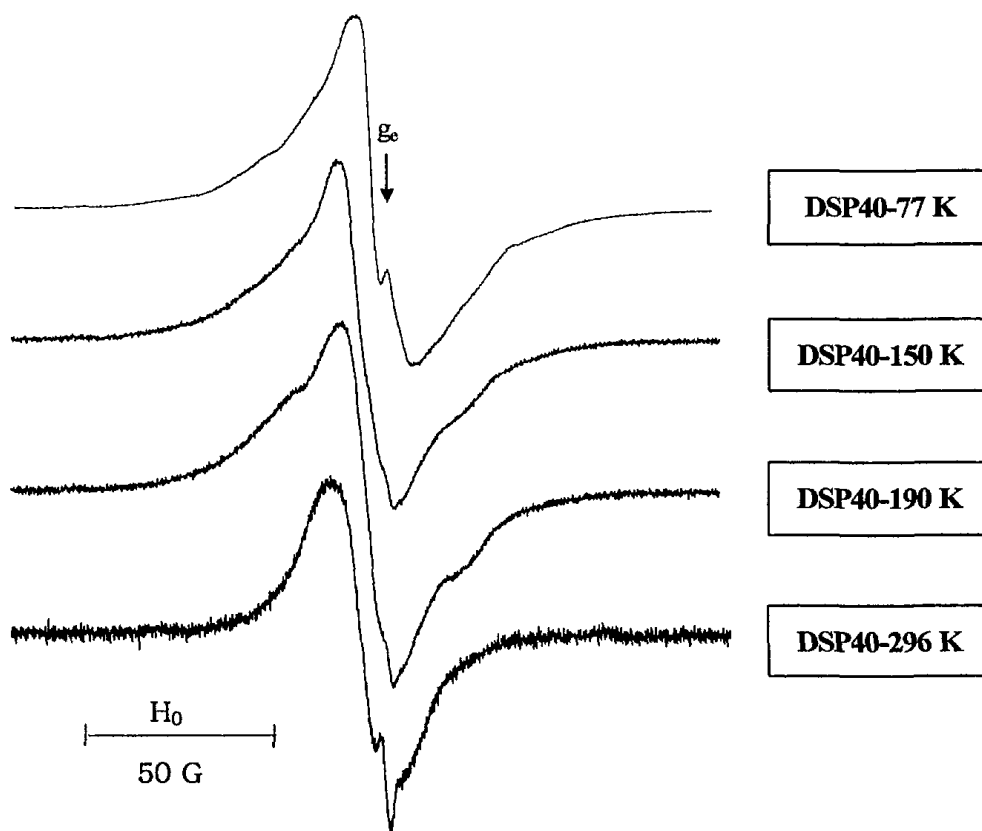


Figure 2-14. ESR spectra of dry soybean paste(DSP) exposed at different temperatures for 5 min. after irradiation to 40 kGy at 77 K. (DSP-150: dry soybean paste heated to 150 K after irradiation, DSP-190: dry soybean paste heated to 190 K after irradiation, DSP-296: dry soybean paste heated to 296 K after irradiation). Microwave power was 5 mW.

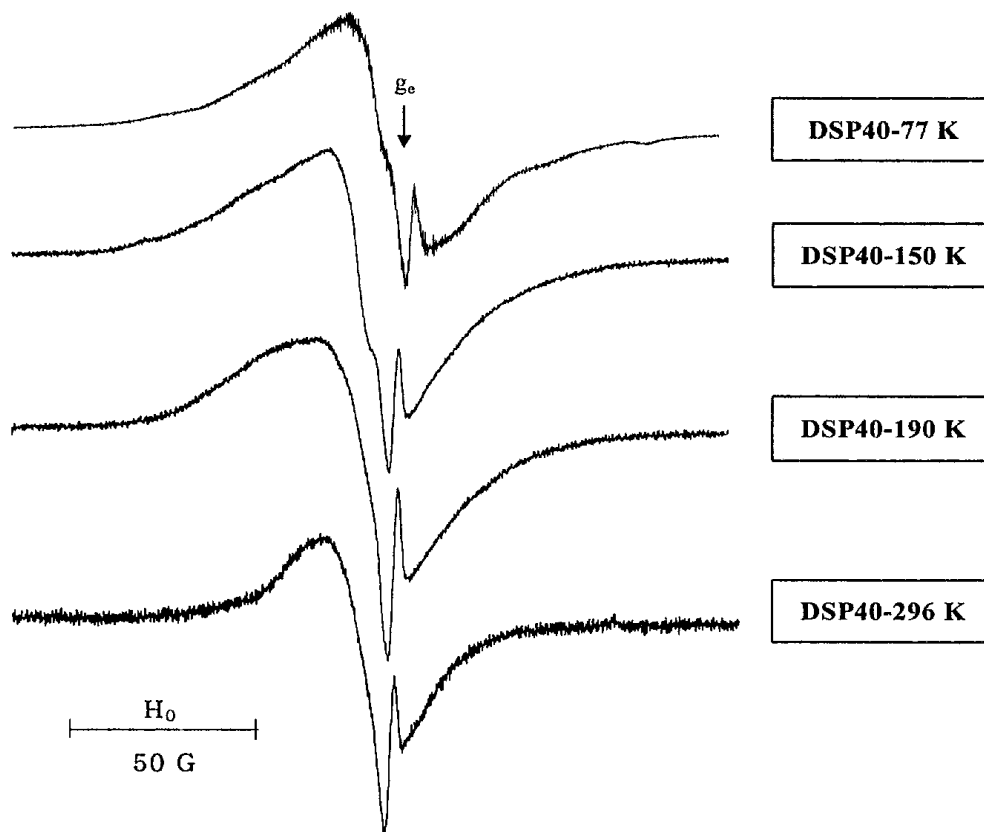


Figure 2-15. ESR spectra of dry soybean paste(DSP) exposed at different temperatures for 5 min. after irradiation to 40 kGy at 77 K. (DSP-150: dry soybean paste heated to 150 K after irradiation, DSP-190: dry soybean paste heated to 190 K after irradiation, DSP-296: dry soybean paste heated to 296 K after irradiation). Microwave power was 200 mW.

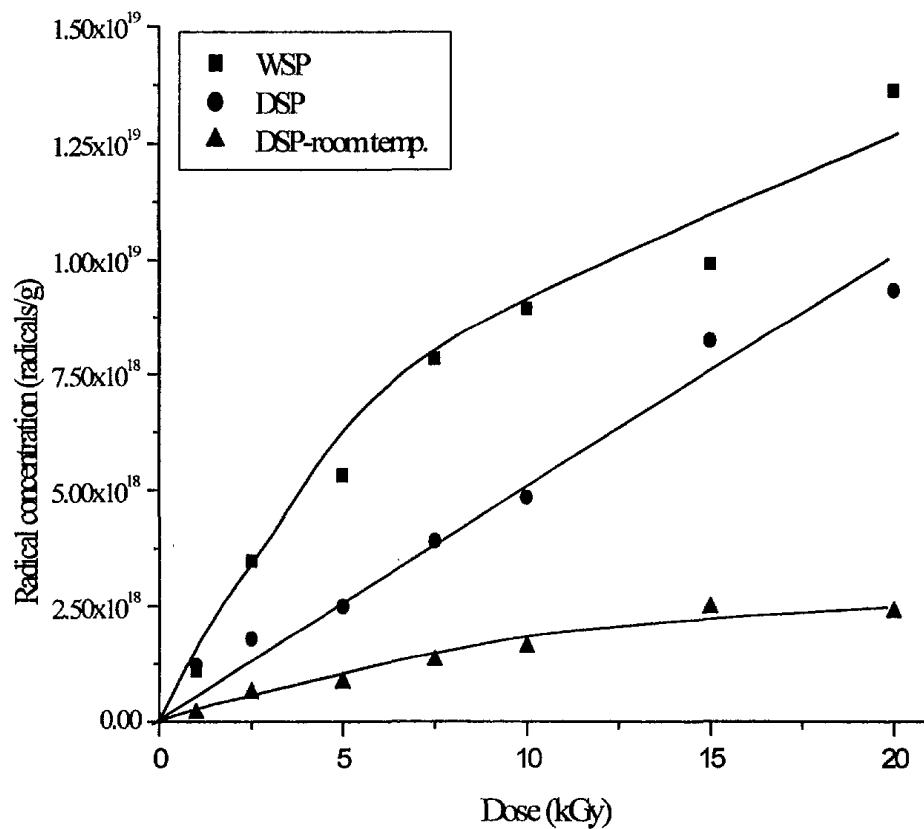


Figure 2-16. Dose dependence of average radical concentration of fermented soybean paste products irradiated and recorded at 77 K. (WSP: wet soybean paste, DSP: dried soybean paste and DSP-room temp.: dried soybean paste irradiated at 77 K and then exposed to room temperature for 15 min.) The spectra were recorded at 77 K.

요약

단일 성분이 아닌 복합적 구성을 이루고 있는 식품내에서의 free radical 연구에 ESR 측정 방법의 적용 가능성을 확인하기 위하여 청국장을 방사선 조사처리로 자유기를 유도하고, 생성된 자유기를 ESR로 측정하여 자유기의 특성을 조사하고 정량적으로 관찰하였다. 이를 위하여 액체질소 상(77 K)에서 방사선 조사한 청국장과 청국장 분말을 동일한 온도를 유지한 상태로 ESR을 측정하였다.

모든 시료에서 방사선 조사처리하지 않은 대주구의 경우, ESR 신호가 관측되지 않았으며, 실온에서 방사선 조사되고 ESR 측정된 시료에서는 폭넓은 단일 신호가 관측되었다. 그러나 77 K에서 방사선 조사되고 측정된 청국장시료의 ESR 신호들은 free electron 위치인 g_e 값 근처에서 크기가 큰 여러개의 신호로 나타났으며, 청국장 분말과 진공상태의 청국장 분말의 경우, 크기가 작은 여러개의 신호들이 합쳐진 단일신호로 나타났다.

77 K에서 측정된 청국장과 청국장 분말 시료의 ESR 신호 중 저 자장과 고 자장에 나타난 hydrogen radical을 제외한 나머지 신호들을 이용하여 microwave power의 크기를 변환 측정 한 결과, 두 시료 모두 microwave power의 크기가 변함에 따라 ESR 신호의 모양이 점차 변하는 것으로 나타났는데 이는 이들 ESR 신호들이 모두 각기 다른 radical로 이루어졌다는 것을 의미하고 이를 포화곡선(saturation curves)으로 나타내어 청국장과 청국장 분말 시료에서 각각 4가지 형태의 신호를 구별할 수 있었다.

조사선량을 달리한 청국장과 청국장 분말 시료의 ESR 신호의 세기를 이용하여 표준물질을 이용한 radical 농도 측정결과, 청국장 시료의 경우, 조사선량이 증가함에 따라 radical 농도가 곡선적으로 증가하는 경향을 나타내었고, 청국장 분말 시료의 경우에는 직선적으로 증가하였다. 이와 같은 결과로 수분함량이 큰 청국장 시료의 경우, 수분에서 일차적으로 radical이 유래되고 수분 이외의 청국장 성분에서는 이차적으로 radical들이 생성되는 것을 추측할 수 있었다. 그러나 수분함량이 적은 청국장 분말시료의 경우, 조사선량이 증가함에 따라, 즉 외부에서 주어지는 에너지의 크기가 커짐에 따라 결합과괴로 생성되는 radical이 직선적으로 증가하는 것으로 나타나나 여기된 후 organic free radical을 형성한다는 것을 추측할 수 있었다.

이상과 같은 결과로 미루어 식품과 같이 복잡한 계를 이루고 있는 물질의 방사선 조사에서는 식품내 함유된 수분함량의 크기에 따라 생성되는 radical의 종류가 크게 달라짐을 알 수 있었으며, 수분에서 유래된 radical을 제외한 청국장 시료에서 생성된 주된 radical은 단백질

에서 유래된 것을 알 수 있었다. 또한 앞선 청국장의 radical 농도측정에서 살펴본 바와 같이 직접적인 구성성분의 결합파괴가 일어나는 청국장 분말 시료와는 달리, 수분함량이 큰 청국장의 경우, 일차적으로 생성된 OH radical에 의해 간접적인 radical process가 진행됨을 알 수 있었다.

지금까지 살펴본 연구에서와 같이 체계적인 ESR 측정법을 적용함으로써 단일성분이 아닌 복합적 구성을 이루고 있는 식품에서의 자유기 연구에 ESR 측정법의 적용 가능성을 확인할 수 있었으며, 이때 생성되는 자유기의 특성규명 및 정량분석도 가능함을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

Assenheim, H.M., Introduction to Electron Spin Resonance, Plenum Press, New York, 8-51 (1996)

Atkins, R.C., Carey, F.A., Organic chemistry(2nd edition), McGraw-Hill press, (1987)

Bechmann, I. E., Comparison of the formaldehyde content found in boiled and raw mince of frozen saithe using different analytical methods. Lebensm. Wiss. u Technol. 31, 449-453 (1998)

Borowska, Z.K., Mauzerall, D.C., Efficient near ultraviolet light induced formation of hydrogen by ferrous hydroxide, Orig. Life 17, 251-259 (1987)

Box, H.C., Lilga, K.T., J. Chem. Phys. 50, 5422 (1969)

Brooke R.O., Ravesi, E.M., Gadbois, D.F., Steinberg M.A., Preservation of fresh unfrozen fishery products by low-level radiation-the effects of radiation pasteurization on amino acids and vitamins in haddock fillets. Food Technol. 20(11), 99-102 (1996)

Brown D.W., Florin R.E., Wall L.A., Formation and decay of atoms and small free radicals at low temperatures, J. Phys. Chem. 66, 2602 (1962)

Bruhn, C.M., Consumer attitudes and market response to irradiated food, J. Food Protec. 58(2), 175-181 (1994)

Cheng, K.W., Zhang, D.J., Investigation of the wholesomeness of gamma irradiated fresh prklong-term animal feeding studies, Radiat Phys. Chem. 22, 792 (1983)

Demple, B., Halbrook, B., Inducible repair of oxidative DNA damage in *Escherichia coli*,

Nature, 302, 466-468 (1983)

Demple, B., Regulation of bacterial oxidative stress genes, *Annu. Rev. Genet.* 25, 315-337 (1991)

Desrosiers, M., Gamma-irradiated seafoods: identification and dosimetry by EPR spectroscopy, *J. Agric. Food Chem.*, 37, 96-101 (1989).

Dillard, C.R., Goldberg, D.E., *Chemistry*(2nd edition), (1987)

Dodd, N., Lea, J., Swallow, A., ESR detection of irradiated food, *Nature*, 334-387 (1988)

Emeleus, H.J., Style, D.W.G., *Free Radicals*, London Methuen press (1959)

FAO, WHO, *Food Irradiation-A Technique for preserving and improving the safety of food*, WHO, Geneva, pp 1-61, (1988)

Farrar, T.C., Becker, E.D., *Pulse and fourier transform NMR-introduction to theory and methods*, Academic press, New York (1971)

Fischer P.H., Charles S.W., McDowell C.A., Electron Spin Resonance Study of the Photolytic Decomposition of HN_3 in inert Matrices at 4.3 K, *J. Chem. Phys.* 46, 2162-2166 (1967)

Flournoy L.M., Baum L.H., Siegel S., Disappearance of trapped hydrogen atoms in gamma-irradiated ice, *J. Chem. Phys.* 36, 2229-2230 (1962)

Gibella, M.; Crurq, A-S.; Tilquin, B.; Stocker, P.; Lesgards, G.; Raffi, J. Electron spin resonance studies of some irradiated pharmaceuticals. *Radiat. Phys. Chem.* 58, 69-76 (2000)

Gray, R., Stevenson, M.H., Detection of irradiated deboned turkey meat using ESR

spectroscopy, *Radiat. Phys. Chem.*, 34, 899-902 (1989)

Henriksen, T., Sanmer, T., Pihl, A., Secondary processes in proteins irradiated in the dry state. *Radiat. Res.* 18, 147-162 (1963a)

Hill, M.I., Wyard, S.L., *J. Phys. B.*, 1, 289 (1968)

Ikeya, M., New applications of electron spin resonance-dating, dosimetry and microscopy, World Scientific press, Singapore (1993)

Josephson, D.S., Peterson, M.S., Preservation of food by ionizing radiation(II), CRC press, USA (1983)

Judeikis, H.S., Flournoy J.M., Siegel S., Isotope effects and the mechanism of atom production in gamma-irradiated ice at 4.2 K, *J. Chem. Phys.* 37, 2272-2279 (1962)

Kevan L. Moorthy P.N., Weiss J.J., *Nature* 199, 689 (1963)

Khattak, A.B., Klopfenstein, C.F., Effect of gamma irradiation on the nutritional quality of grains and legumes.II. changes in amino acid profiles and available lysine, *Cereal Chem.* 66(3), 171-172 (1989)

Koehnein W., Schulte-Frohlin D., *Radiat. Res.* 38, 1105 (1969)

Kristensen, D.; Skibsted, L. H. Comparison of three methods based on electron spin resonance spectrometry for evaluation of oxidative stability of processed cheese. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3099-3104 (1999)

Lambert, A.D., Smith, J.P., Dodds, K.L., Physical, chemical and sensory changes in irradiated fresh pork packaged in modified atmosphere, *J. Food Science.* 57(6), 1294-1299 (1992)

Lee, C.H., Fermentation technology in Korea, Korea University press (2001)

Livingston R., Weinberger A.J., J. Chem. Phys. 33, 499 (1960)

Long M.A., Willard J.E., Properties of trapped H and D atoms produced by the photolysis of HI in 3MP-d₁₄ Glass, J. Phys. Chem. 74, 1207-1213 (1970)

McLauchlan, K.A., Magnetic resonance, Clarendon press (1972)

McMurray, C.H., Stewart, E.M., Gray, R., Pearce, J., Detection methods for irradiated foods-current status, The Royal Society of Chemistry press (1996)

McPhail, D. B; Gardner, P. T.; Dutie, G. G.; Steele, G. M.; Reid, K. Assessment of the antioxidant potential of scotch whiskeys by electron spin resonance spectroscopy: relationship to hydroxyl-containing aromatic components. J. Agric. Food Chem. 47, 1937-1941 (1999)

Monk, J.D., Beuchat, L.R., Doyle, M.P., Irradiation inactivation of food borne microorganism, J. Food Protec., 58(2), 197-208 (1994)

Naismith, W.E.F., Ultracentrifuge studies on soya bean protein, Biochem. Biochem. Biophys. Acta 16, 203-210 (1955)

Ogawa S., Fessenden R.W., On the g factor of hydrogen atoms trapped in phosphates, J. Chem. Phys. 41, 1516-1517 (1964)

Perkins, M.J., Radical Chemistry, Ellis Horwood press, New York (1994)

Pohlman, A. J., Wood, O.B., Mason, A.C., Influence of audiovisuals and food samples on consumer acceptance of food irradiation, Food Technology, 12, 46-48 (1994)

Poole C.P., Electron Spin Resonance: A Comprehensive Treatise on Experimental Techniques, John Wiley & Sons press. (1967)

Pryor, W.A., Free radicals, McGraw-Hill book company, New York, (1966)

Pshezhetskii, S. Y.; Kotov, A. G.; Milinchuk, V. K.; Roginskii, V. A.; Tupikov, V. I. EPR of Free Radicals in Radiation Chemistry. *Halsted press*, New York. (1972)

Punchard, N. A.; Kelly, F. J. Free Radicals-A Practical Approach, Ed.; Oxford University Press; New York, U.S.A., pp 1-8 (1996)

Raffi, J., A후디, J.P., ESR of crustacea as an example of identification of ionized food, *Sci. Alim.*, 10, 387-391(1990)

Raffi, J., Yordanow, N., Chabane, S., Douifi, L., Gancheva, V., Ivanova, S., Detection of irradiated aromatic herbs and spices by ESR and TL, *Spectrochimica Acta (A)*, 56(2), 409-416 (2000)

Ralthch, S.S, A chronic toxicity and reproductive performance study in beagle dogs (FDA docket nl. 84F-0230). NTIS Order Number PB84-187020 (1983)

Rebello, C.A., Schaich, K.M., Extrusion chemistry of wheat flour proteins (II)-sulfhydryl-disulfide content and structural changes, *Cereal Chem.* 86, 756-763 (1999)

Rosen, G.M., Britigan, B.E., Halpern, H.J., Pou, S., Free radicals-biology and detection by spin trapping, Oxford University Press, 140-141 (1999)

Schaich, K. M., Rebello, C. A., Extrusion chemistry of wheat flour proteins: I. Free radical formation. *Cereal Chem.* 76(5), 748-755 (1999)

Schaich, K. M., Chemical changes during extrusion-physical forces in food systems, Accomplishments of the Center for Advanced Food Technology, Rutgers University, New brunswick, NJ. 70-75 (1990)

Shotwell, M.A., Larkins, B.A., The biochemistry and molecular biology of seed storage proteins-the biochemistry of plants, Academy press, New York, Vol. 15, 297-345 (1989)

Siegel S., Folurnoy J.M., Baum L.H., Irradiation yields of radicals in gamma-irradiated at 4.2 and 77 K. J. Chem. Phys. 34, 1782-1788 (1962)

Spinks, J.W.T., Woods, R.J., An introduction to radiation chemistry(2nd ed.), John Wiley&Sons press, New York (1976)

Swallow, A.J., Need and role of identification of irradiation food, Radiat. Phys. Chem., 35, 311-316 (1990).

Sünnetçiođlu, M. M., Dadayli, D., Çelik, S., Köksel, H., Application of the electron paramagnetic resonance spin probe technique for detection of irradiated wheat. Cereal Chem. 75(6), 875-878 (1998)

Wall L.A., Brown D.W., Florin R.E., Atoms and free radicals by γ -irradiation at 4.2 K, J. Phys. Chem. 63, 1762-1769 (1959)

Whang, K., Peng, I.C., Electron paramagnetic resonance studies of the effectiveness of myoglobin and its derivatives as photosensitizers in singlet oxygen generation, J. Food Sci. 53(6), 1863-1893 (1988a)

Whang, K., Peng, I.C., Detection of singlet oxygen generation by chlorophyll usin electron paramagnetic resonance spectroscopy, J. Food Sci. 53(6), 1918-1919 (1988b)

WHO, IAEA, FAO, 식품조사에 관한 실상, 그린피아(주), 1-42 (1994)

Yamaguchi, F., Youshihiro, Y., Nakazawa, H., Ariga, T., Free radical scavenging activity of grape seed extract and antioxidants by electron spin resonance spectrometry in an $H_2O_2/NaOH/DMSO$ system. J. Agric. Food Chem. 47, 2544-2548 (1999)

권중호, 김광수, 식품의 저장 및 품질개선을 위한 감마선 에너지의 이용과 실용화 전망, 식품과 영양, 37-48 (1996)

김경자, 유명기, 김상순, 벧짚을 이용한 청국장 제조에 관한 연구, 한국식품과학회지, 14(4), 301-308 (1982)

김영곤, 김영표, 프리라디칼-유해 활성산소를 중심으로, 여문각 (1997)

서정숙, 이상건, 유명기, 균주를 달리한 청국장의 제조에 관한 연구(II), 한국식품과학회지, 14(4), 309-314 (1982)

안보선, 고선량 감마선 조사 청국장의 휘발성 성분에 관한 연구, 고려대학교 박사학위 논문, 5-8 (2000)

양재승, 김충기, 이해정, 닭고기, 돼지고기 및 쇠고기의 방사선 조사 유무 판별을 위한 ESR Spectroscopy의 활용, 식품과학회지, vol. 31, No. 3, pp 606-611 (1999)

윤승기, 식품조사처리에 관하여, 식품공업, 45-55 (1993)

이무하, 전자선을 이용한 신선근육식품의 저수준 방사선 조사, 식품과학화산업, 28, 13-22 (1995)

이서래, 한국의 발효식품, 이화여자대학교 출판부 (1992)

이철호, 조사식품의 안정성과 국제교역, 고려대학교 출판부, 27-32 (1998)

이현자, 서정숙, 균주를 달리한 청국장의 제조에 관한 연구 (I), 한국영양학회지, 14(2),

84-97 (1981)

조성호, 자기공명방법, 대우학술총서(자연과학), (1985)

주현규, 청국장 제조에 관한 연구, 한국식품과학회지, 3, 64 (1971)

최용규, 손동화, 지원대, 임무혁, 최종동, 정영진, *Bacillus subtilis* DC-2를 이용한 청국장 발효과정 중 맛성분 및 기호도의 변화. 한국식품과학회지, 27(5), 840 (1998)

한찬수, 자기공명의 소개, 순천향대학교 자연과학대학 물리학회지, 1-23 (1996)

허준, 방사선생물학, 신광출판사, (1979)

제 3 장 방사선 조사에 의한 청국장의 향미성분 변화

제 1 절 서설

1. 연구목적

HPLC 및 GC-MS에 의한 지방산 및 아미노산 유도체 생성 검출, 방향성 유기화합물 함량 분석 숙성중의 지방산 및 아미노산 유도체 (pyrazines derivatives) 및 향기성분의 변화를 관찰한다.

2. 연구배경 및 개요

그동안 국내에서는 청국장에 관한 연구로 질소 화합물 및 향기 성분에 관한 연구⁶⁻⁸⁾, 균주를 달리 한 청국장 제조에 관한 연구⁹⁻¹¹⁾, 유지성분의 변화에 관한 연구¹²⁾, 청국장 점질물에 관한 연구¹³⁾, 즉석 청국장 찌개의 품질 특성에 관한 연구¹⁴⁾와 청국장의 기능성에 관한 보고들^{15,16)}이 있다.

청국장에는 방사선에 민감한 지질성분이 10.0%¹⁴⁾ 존재하고 있어, 방사선 조사 중 지질성분의 변화가 일어나면서 청국장의 색, 맛, 향 등이 달라질 것이 예측된다.

유지 및 유지 함유 물질에 대한 방사선 조사의 연구는 주로 형성된 최종 산화물을 측정하는 방법으로 수행되어 왔다. Polister²¹⁾는 methyl linoleate에 첨가한 항산화제와 비타민의 파괴, Lavinge²²⁾는 safflower oil의 탈색에 관한 연구를 하였고 Chipault등²³⁻²⁶⁾은 corn oil과 methylester의 조사생성 물질인 peroxides, carbonyl 화합물과 flavor, odors와의 관계²⁵⁾, 조사에 의한 peroxides와 carbonyl 화합물의 축적²⁴⁾, 항산화제의 파괴에 대한 영향¹⁹⁾, 진공 조사 후 저장 중의 유지의 안전성에 관한 결과²⁶⁾를 발표하였다. 또 Merritt²⁷⁾는 butter fat의 방사선 조사에 의하여 생성되는 휘발 물질의 분리 동정, Dubravic²⁸⁾은 단순지방의 방사선 분해 기작을 제안하였으며, Kavalam²⁹⁾은 식물성 유지의 방사선 분해 산물과 유지지방산 조성과의 관계 등을 보고하였다. Kinoshita³⁰⁾는 미강에 70 kGy 로 조사하여 산가 상승을 억제하였고 동시에 유지 추출율의 증대, 추출속도의 촉진, 탈색효과를 얻었다고 보고하였으며 이는 방사선 특유의 효과가 방사선 조사된 물질에 강력한 작용을 일으키므로 미강내에 함유된 색소, 단백질, 섬유질, lipase의 파괴에 기인한 것으로 추측하였다.

한³¹⁾등은 용매 추출한 미강유에 항산화제를 첨가한 후 공기존재 하에서 20 kGy와 70

kGy의 두가지 선량으로 조사 후 저장하면서 산가, peroxide value (POV)와 carbonyl가를 측정하여 본 결과 산가와 POV의 변화만으로 방사선 조사 된 유지의 산패 정도를 논할 수 없으며, POV는 1주서부터 급격히 상승하여 산패한 유지의 특성을 나타낸다고 하였으며, 유지의 산패의 감정은 산가, POV, carbonyl가의 3 factor 로서 결정하여야 한다고 하였다. 임과 안³²⁾은 대두에 10 kGy 감마선을 조사한 후 유지를 추출하여 유전항수, 점도, 유도기간을 측정하였으나 방사선량의 증가에 따라 큰 변화는 보이지 않았으며 조성 지방산량은 palmitic acid, oleic acid, linoleic acid가 무처리에 비해 증가한 반면 stearic acid, linolenic acid는 감소하였다고 보고하며 산가는 변화가 없고 과산화물가는 방사선 처리시가 무처리 시보다 월등히 낮았다고 보고하였다.

식품의 독특한 풍미가 방사선 살균시 어떻게 영향을 받는가는 중요한 문제이다. 오랫동안 많은 연구자들은 지질의 반응산물들을 연구하였다. 그 연구들은 형성된 방사선 분해산물과 지질의 유형 및 선량사이에 관계가 있음을 증명하였으며 조사된 육류에서 생성된 악취와 관련이 있는 화학물질인 휘발성물질에 관심이 모아졌다. 주요 화학물질의 유형은 탄화수소, 알데히드, 케톤, 메틸에스테르, 유리지방산이다. 지질의 분해 즉 산화와 열분해에 의해서 생성된 aldehyde류는 유리 amino acid와 strecker 반응을 일으켜 향기성분을 생성하고, maillard 반응의 초기 carbonyl compound이며, 반응의 중간 생성물과 함께 반응하므로 더 다양한 향기성분을 생성하게 된다¹⁶¹⁾.

Kavalam 등²⁹⁾은 safflower, soybean, coconut, corn, olive oil 등의 5가지 식물성유를 25°C에서 60 kGy로 조사하였을 때 n-alkanes, 1-alkanes, internally unsaturated alkenes, alkadienes, alkatrienes, alkanals, methyl/ethyl esters of fatty acids 등의 산물이 검출되었으나, 주요 방사선 분해 산물은 몇가지였으며 지방산조성에 크게 의존하였다고 보고하였다. 감마선 조사시 고등어유의 지질 분획물의 휘발성분 조사(3, 20, 60 kGy)하여 56 성분을 분리 하였다. Alkane C₁-C₁₇, 1-alkene C₂-C₁₇, alkadienes C₁₂-C₂₁, unsaturated alkenes C₁₄-C₂₁, triene C₁₇, C₁₁ alkyne, C₁₆, C_{16:1}, C_{18:1} normal aldehyde 등을 정량 분석하였으며 이들을 지방산의 카보닐기 근처의 radiolytic cleavage로 인한 것이라 하였다. Mattison 등¹⁶⁰⁾에 의하면 sterilization 수준의 조사는 향, 조직감, 색에 바람직하지 않은 변화를 일으키고, 지질에는 off-odor가 생기고 oxidative rancidity가 증가한다고 하였다.

Bachman 등¹³³⁾은 향신료의 풍미변화를 일으키는 조사선량을 구명하였는데, 일반적으로 미생물의 살균선량 이하(7.5 kGy - 15 kGy)로 나타났다. 또한 향신료의 휘발성 및 비휘발성 성분에 대한 γ 선 조사구와 gas 처리구의 비교실험의 결과를 보면 γ 선 조사구는 비조사구와 큰 변화가 없었으나 gas 처리한 것은 상당한 감소를 보였고, 특히 휘발성 성분의 양

은 비처리구보다 50%이상의 감소를 나타냈다¹³⁴⁻¹³⁵⁾.

그동안 국내에서 발표된 감마선 조사 식품에 관한 연구는 10 kGy 이하의 선량을 적용하여 주로 홍삼, 인삼, 고춧가루 등 건조식품의 품질개선³³⁾, 미생물 살균효과³⁴⁾, 분리균의 생육양상³⁵⁾과 관능적인 특성에 관한 연구³⁶⁾가 주를 이루었으며, 발효식품인 탁주에 감마선을 조사하여 미생물 살균효과와 구성물질의 생화학적 소장³⁷⁾을 연구하고, 감마선 조사한 대두의 발효에 의한 성분변화에 관한 연구³⁸⁻³⁹⁾가 보고된 바 있어 감마선을 우리나라의 전통발효식품에 도입하는 시도를 하고 있다. 최근에는 방사선 조사에 의한 참깨박 단백질의 용출 및 기능성 변화⁴⁰⁾, 감마선 조사가 쇠고기의 조직감 연화에 미치는 효과⁴¹⁾, 감마선 이용 저염 오징어 젓갈 제조시 미생물적, 관능적 품질 변화⁴²⁾, 감마선과 phosphine 처리가 백삼의 지방질 관련 성분에 미치는 영향⁴³⁾, 감마선 조사가 soy protein isolate와 whey protein concentrate의 이화학적 성질에 미치는 영향⁴⁴⁾ 등의 다양한 연구가 보고되고 있어 여러 식품에 감마선을 적용하여 식품을 제조하거나 기능성을 향상시키는 연구가 많아지고 있고 감마선 처리를 한 식품의 검지방법에 관한 연구도 많이 보고되고 있다⁴⁵⁻⁴⁹⁾.

본 연구는 고에너지 조사가 청국장의 향미 변화에 어떻게 영향을 미치는지를 관찰하기 위하여 다양한 선량 (0-120kGy)의 감마선을 청국장에 조사한 후 GC-MS로 휘발성 성분을 분리 동정하고 관능검사와 연관하여 평가 분석하였다.

제 2 절 재 료 및 방 법

1. 실험재료 및 방사선 조사 방법

청국장은 시중에서 구입한 C사의 청국장제품으로 제조 후 7일 된 것을 진공포장(PE/NY)하여 시료로 사용하였다. 포장된 시료를 Co^{60} 감마선 조사시설 (대전 한국원자력연구소, 100,000 Ci)을 이용하여 시간당 2 kGy의 선량율로 1, 5, 10, 20, 40, 80, 120 kGy의 총 흡수 선량을 얻도록 조사하였고, ceric-cerous dosimeter를 이용하여 흡수선량을 확인하였다. 이때 흡수선량의 오차범위는 ± 0.12 kGy였다.

대두는 1998년산 국산대두였으며, 증자대두는 원료대두 일정량을 24시간 물에 담근 후 물을 뺀 다음 50 g씩 달아서 비이커에 담아 autoclave를 이용하여 30분간 증자하여 사용하였다. 대두와 증자대두를 진공포장한 후 청국장과 같은 조건으로 방사선 조사를 하였다. 방사선 조사 시료들은 비조사 대조시료와 함께 $-18^{\circ}C$ 로 냉동저장하면서 실험에 사용하였다.

2. 실험 방법

가. 성분 분석 방법

1) 일반성분 분석

청국장의 일반성분은 수분은 $105^{\circ}C$ 상압건조법, 조단백은 semi-Kjeldahl법, 조지방은 Soxhlet추출법, 조회분은 직접회화법으로 분석하였다¹⁰³⁾.

2) pH 및 산도

pH는 시료를 10배 희석하여 pH meter (Mettler toledo 320)로 측정하였고, 산도는 청국장 5 g을 증류수 40 ml을 첨가하여 진탕 후 여과지로 여과한 여액 10 ml에 0.1 N NaOH로 pH 8.3까지 적정된 ml를 젖산으로 환산하여 표시하였다.

3) 지방산 분석

시료의 지방산 조성을 살펴보기 위해 동결건조한 시료와 원료콩, 가압증자한 콩을 각각 100 ml round flask에 0.5 g을 취한 다음 0.5 N NaOH/methanol 용액을 10 ml 가하였다.

플라스크 위에 환류냉각기를 설치하고 50분간 수욕상에서 가열한 후 14% BF₃를 10 ml 가하고 10분 후에 hexane 5 ml을 가하였다. 반응 후 냉각수를 틀어 flask를 냉각, 분리하여 hexane층이 flask의 목부분까지 올라오도록 NaCl 포화용액을 가하였다. 윗부분의 hexane 층에서 1 ml을 취하여 시험용액으로 하였다. 분석에 사용한 용매는 HPLC 등급을 사용하였으며 표준지방산 메틸에스터 혼합액은 Sigma (St.Louir, USA)에서 구입하였다.

지방산 분석은 FID (flame ionization detector, Hewlett Packard Co., USA)가 장착된 Hewlett Packard 6890 GC(Hewlett Packard Co., Little Flaas, USA)를 사용하였으며 HP-INNOWAX column (crosslinked polyethylene glycol, 30 m×0.25 mm×0.25 μm)을 사용하였다. Carrier gas는 N₂ (1.0 ml/min)로서 주입부에서 분할비는 11.2 : 1로 하였다. 오븐 온도는 160℃에서 5분 머무른 후 10℃/min의 비율로 255℃까지 상승시킨 후 7분간 유지하였다. 주입부와 검출기의 온도는 각각 260℃와 280℃로 하였으며, injection volume은 1 μl였다¹⁰⁴⁾.

4) 향기성분의 분석

50 ml 수기에 시료 약 2g을 정확히 달아 내부 표준물질(n-heptane)을 gastight syringe를 이용하여 1μl를 정확히 넣고 purge & trap(Tekmar, Cincinnati, USA)장치에 장착하였다. Helium gas(20ml/min)를 이용하여 산소등을 제거하는 “prepurge”를 실시하고 80℃에서 5min동안 helium gas로 향기성분을 추출하여 tenax column에 흡착시켰다. Cryofocusing module을 액체 질소를 이용하여 -100℃로 냉각한 다음 tenax column에 흡착된 compounds를 180℃에서 3min 열탈착시켜 cryofocusing module에 응축시키고 이어서 -100℃에서 180℃까지 가열하여 GC에 주입하여 분리하였다.

GC는 Hewlett-Packard 5890 SeriesII(little Flaas, USA)를 사용하였다. MSD는 Hewlett-Packard 5972 MSD(Sanfrancisco, USA)를 사용하였으며 시료의 이온화는 electron impact ionization(EI)방법으로 행하였다. GC/MSD의 분석조건은 electron volts를 70 eV로 하였으며, 분석할 분자량의 범위는 33-400 m/e(mass/charge)으로 분석하였다. Column은 DB-5((5% phenyl)95% methylsilxane, length 25m, ID 0.25mm, film thickness 0.25μm)를 사용하였고, 온도 program은 35℃에서 3min 유지한 후 2℃/min으로 100℃까지 상승시킨 후 14.5분을 유지시켜 분리하였다. Mass transfer line은 250℃를 유지시켜 사용하였다. Injector의 온도는 150℃, detector는 250℃이며 carrier gas는 helium을 사용하여 flow rate는 0.9ml/min으로 하였다. Make-up gas는 helium을 사용하였으며 flow rate는 25ml/min로 하였고 split ratio는 1:20으로 하였다.

GC/MSD의 분석에 의하여 Total ion chromatogram을 얻고 data를 해석하기 위하여 HP-UX Chemstation system software (Ver. 5.02, Hewlett packard,U.S.A)를 사용 하였고, 정성분석은 Wiley database(1986 John Wiley & Sons, Inc.)를 이용하였다. 시료 중 각 휘발성분들의 함량 계산은 표준물질인 n-heptane peak의 면적과 각 성분 peak 면적과의 비로부터 얻어진 상대적인 면적비(Relative abundance)로 비교하였다.

나. 관능 검사 방법

감마선 조사 청국장장의 관능적 품질 변화를 측정하기 위하여 고려대학교 대학원생 10명을 패널로 선정하여 9점 척도 채점시험을 실시하였다. 각 시료의 표시된 값을 약하다 "0"에서 부터 강하다 "9"의 척도로 하여 구하였다. 냄새에 관한 관능적 품질요소들은 기존 시판되고 있는 청국장류를 대상으로 한 예비묘사 실험결과에서 얻은 냄새에 관한 항목에 근거하여 짠 냄새, 콩비린내, 간장 냄새, 구수한 냄새, 불쾌취, 신 냄새, 비린내, 이취로 나누어 평가하였다. 맛의 관능적 요소들로는 구수한 맛, 짠 맛, 단 맛, 비린 맛, 텁텁한 맛, 신 맛, 이미를 제시하여 10 kGy 이하의 조사 선량 시료만 평가하였다. 그리고 색의 관능적 요소로는 갈색도를 평가하였다. 관능검사의 결과는 분산분석과 Duncan의 다범위 검정을 통하여 각 시료들간의 유의적인 차이를 분석하였다.

제 3절 결과 및 고찰

1. 감마선 조사에 의한 청국장의 성분 변화

가. 일반성분의 변화

청국장의 수분함량은 조사선량이 커질수록 조금 감소하는 경향을 나타내었다. 비조사구의 경우 53.2% 이었고, 20 kGy의 경우 50.8%로 나타났다. 그리고 조지방의 경우는 모든 시료가 1.8~3.3% 범위내에 들었으며 조사선량에 따라 일정하게 증가하거나 감소하는 경향은 보이지 않았다. 조단백의 경우에도 조지방의 경우와 마찬가지로 조사선량에 관계없이 16.7~19.7%범위에 속하였다. 탄수화물과 회분의 경우 각각 19.1~22.5%, 6.0~7.6%의 값을 보였다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 조사량이 증가하여도 청국장의 일반성분에는 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 이 결과는 대두에 20 kGy의 감마선 조사 시 일반성분 함량의 변화가 비조사군과 유의적인 차이를 보이지 않았다는 이¹¹¹⁾등의 보고와 같았다.

변³⁵⁾에 의하면 고추장분말을 감마선 조사한 경우 전당과 환원당이 비조사구보다 약간 증가하였을 뿐 일반성분에는 차이가 없다고 하였다. 또한 대두에 5-15 kGy의 감마선을 조사시켜 청국장을 발효시켰을 때 수분과 조단백질, 조지방은 변화가 없었으며, 총당은 발효시간 경과에 따라 감소하였는데, 조사구의 감소가 더 컸으며, 섬유질의 함량은 조사구와 비조사구간의 차이를 보이지 않았다고 하였다⁴²⁾. Farag⁹⁷⁾는 대두를 60 kGy 조사 후 영양적인 가치평가를 했을 때 일반성분은 조사 대두와 비조사 대두가 유사하였으며 lysine, trypsin inhibitor activity, ureaseactivity는 감소하였고 total protein efficiency (TPE)는 증가하였다고 보고하였다. 식품 조사는 영양소에서의 변화를 유발할 수는 있지만 이런 변화들은 미미한 것이며 오히려 조리나 가열과 같은 일반적인 식품 가공방법이 조사보다 더 크게 영양소의 손실을 가져오는 것으로 보고되었다¹⁵⁰⁾.

나. pH와 산도의 변화

청국장에 감마선을 조사한 후 pH와 산도를 측정하였다. 비조사 시료의 pH는 7.28이었으며 10 kGy 이하의 저선량구에서는 7.26-7.28, 20 kGy 이상의 고선량 조사 시료구에서도 7.25-7.27로 나타나 감마선 조사에 따른 청국장의 pH 변화는 크지 않았다. 한편 김¹¹²⁾에 의

하면 우리나라 전통 청국장을 지역별로 수집하여 pH를 측정하였을 때 평균치가 7.21 (5.89-7.95)이었다. 비조사구의 산도는 0.72%로서 10 kGy 이하의 조사구는 0.70-0.75%로 나타났고 20 kGy 이상의 조사구는 0.61-0.65%로 나타나 조사선량이 높아질수록 약간 감소하는 경향을 보였다. 감마선 조사에 의한 pH의 변화에 관한 보고는 다양하다. 쇠고기에 감마선이 조사되었을 때 단백질의 수소결합이 끊어져 basic유리 아미노산이 증가하므로 pH 상승이 일어날 수 있으나, 조사선량이 높아지면 유리 아미노산의 decarboxylation으로 인하여 pH의 증가가 일어날 수 있다고 하였다¹¹³⁾.

다. 지방산 조성

식품의 방사선 조사가 영양성분의 변화에 미치는 영향으로는 식품성분중 수용성과 지용성 물질의 부분적인 변화를 들 수 있는데 이 때 일어나는 변화는 주로 조사선량과 관계가 있다⁶¹⁻⁶²⁾. 현재까지 밝혀진 조사생성물(radiolytic products) 가운데 가장 주목을 받고 있는 영양소는 지방질이며⁶⁰⁻⁶²⁾ 지방성분의 조사생성물로는 autoxidation에 의해 생기는 화합물과 유사한 과산화지질과 free radical compound 및 volatile compound 등을 들 수 있다. 이들은 특히 불포화지방산(polyunsaturated fatty acid, PUFA)을 많이 함유하고 있는 식품에서 생성되기 쉬운데 이는 방사선 조사에 의해 생성된 전자가 부족한 전자를 메우기 위해서 불포화지방산의 산소원자 위치나 이중결합 위치를 공격하여 free radical을 형성하기 쉽기 때문이다. 이 과정에서 산소의 존재는 hydroperoxyl radical과 hydroperoxide의 형성을 유도하게 된다

감마선 조사 청국장의 지방산 조성을 분석한 결과는 Fig. 3-1와 Table 3-1에 나타내었다. 청국장의 지방산은 12종이 확인되었으며, 원료 대두와 증자 대두의 지방산 조성은 거의 유사하여 삶음 과정에서 지방산 조성의 큰 변화는 없는 것으로 보인다. 대두를 autoclave로 삶는 과정에서 주요 지방산과 소량의 기타 지방산 조성은 변화하지 않았으나, 탄소원소가 20개 이상인 고급지방산의 감소와 linoleic acid와 linolenic acid의 증가가 나타났다. 그러나 청국장 발효 후에는 지방산 조성에 다소 차이를 보이고 있다. 청국장에서는 콩이나 삶은 콩에서 나타나지 않는 C11:0, C13:0, C14:1, C15:0, C15:1 등의 지방산들이 확인되었다.

주요 지방산류의 변화를 보면 청국장 발효과정에서 oleic acid와 palmitic acid는 감소하였으나, linoleic acid와 linolenic acid는 각각 2%, 12% 정도 증가한 것으로 나타났다. 한편 stearic acid를 비롯한 포화지방산류와 기타의 지방산들은 감소하였으며 전체적으로 불포화지방산류는 증가하는 경향이였다.

비조사 청국장의 주 지방산은 linoleic acid 48.03%, oleic acid 25.32%, palmitic acid 12.6%, linolenic acid 7.36% 였으며, 1, 5, 10, 20 kGy 조사구의 경우에는 linoleic acid 48.43-48.62%, oleic acid 24.56-25.05%, palmitic acid 12.56-12.75%, linolenic acid 7.37-7.57% 였다. 그리고 고도불포화지방산(PUFA)이 비조사구는 55.39%, 조사구는 55.25-56.19% 수준으로 나타났다. 감마선 조사에 의하여 지방산 조성 변화가 상당히 일어날 것으로 예측되었으나, 20kGy 이하 조사구의 지방산 조성은 비조사구와 크게 다르지 않았다. 이 결과는 이¹¹⁰⁾등의 감마선 조사된 대두에서 추출된 총 지방질의 지방산 조성이 비조사구와 다르지 않았다는 보고와 일치하였다. Katta¹¹⁴⁾ 등에 의하면 3 kGy로 조사한 닭고기에서 palmitic acid의 유의한 감소를 보였으며 oleic acid는 증가하였다고 보고하였으며, 10 kGy 조사시 oleic acid 등 단일불포화지방산(cis-monoene)은 증가하였다고 보고하였다. 한편 임³²⁾에 의하면 대두에 2, 5, 10 kGy의 방사선 조사 후 기름을 추출하였을 때 palmitic, stearic, oleic acid는 방사선 조사량이 증가하면서 함량이 약간 증가하였으며 linoleic, linolenic acid는 5 kGy 조사 시 약간 감소하였으나, 10 kGy 조사구에서는 약간 증가하는 것으로 나타났다.

그러나 40, 80, 120 kGy를 조사한 고선량 처리구에서는 조사선량이 증가함에 따라 palmitic acid와 stearic acid는 계속 증가하였다. 조사 선량이 증가하면서 linoleic acid와 linolenic acid함량이 감소하였는데 특히 linolenic acid는 80, 120 kGy 조사구의 경우에서 10% 정도 감소된 값을 나타냈다. 한편 oleic acid는 조사선량의 증가에 관계없이 불규칙한 양상을 나타냈다. GC chromatogram에서 확인된 지방산중 miristic acid와 palmitoleic acid는 120 kGy로 감마선 조사 선량이 증가하여도 일정하게 유지되었고, palmitic acid, stearic acid와 arachidonic acid 함량은 조사선량과 함께 증가하는 경향이었으며, oleic acid, linoleic acid와 linolenic acid는 감소하는 것으로 나타났다. 전체적으로 10 kGy 이상의 감마선 조사구는 비조사구에 비하여 포화지방산류는 조사선량이 커짐에 따라 증가하는 경향이었으며, 불포화지방산류는 감소하는 경향이었고 기타 지방산류(others)는 증가하였다. 이러한 경향은 대두에 20, 40, 60, 80, 100 kGy 조사 시 linolenic acid함량이 조사선량이 증가함에 따라 유의하게 감소되었다는 Hafez¹¹⁶⁾등의 결과와 일치하였다. 한편 Kavalm²⁹⁾은 대두유를 60 kGy 조사 시 지방산 조성과 iodine value가 조사처리에 의해 달라지지 않았다고 보고하였으며, Lesgards¹¹⁸⁾에 의하면 50 kGy로 조사한 avocado에서 oil을 추출하였을 때 감마선 조사 처리 전과 처리 후에 지방산 조성의 차이가 없었다고 하였다. 육단백질과 난백단백질에 100 kGy를 조사한 시험에서 방사선 조사로 손상받기 쉬운 아미노산으로 알려진 methionine이나 lysine, histidine등의 함량 변화가 없었다는 육¹¹⁹⁾과 임¹²⁰⁾의 결과와 비교해볼 때 지방

산 조성의 변화도 그 이상의 선량에서 생기는 것으로 생각할 수 있다. 120 kGy까지는 청국장 전체적인 지방산 조성이 조사 선량에 따라 크게 달라지지 않았는데, 자동산화 되기 쉬운 불포화지방산이 대부분이었는데도 그 조성이 안정한 것은 청국장 발효 과정에서 생성된 갈색화반응 생성물들¹⁵⁶⁾과 대두 중에 함유되어 있던 phenolic 화합물의 항산화 작용에 기인할 수도 있다¹²¹⁾. 또한 식품속의 지방질은 단백질, 탄수화물 등의 다른 성분들의 보호작용으로 감마선 조사 시 model system의 경우보다 안정한 형태로 존재할 수 있다¹²²⁾. Diehl¹¹²⁾은 실제로 복잡한 조성의 다성분 식품에서 단성분 식품보다 조사 효과가 완화된다고 하였다.

청국장의 원료가 된 대두, 증자 대두와 청국장의 각각의 지방산에 대한 상대적인 비율을 살펴볼 때 원료콩과 autoclave 콩은 큰 차이를 보이지 않으나 청국장은 stearic acid에 대한 linoleic acid 비율(L/S)이 원료콩보다 높게 나타났다. 이는 청국장에 linoleic acid가 콩에 비해 상대적으로 많은 반면 stearic acid는 적기 때문에 나타나는 결과로 생각된다.

청국장의 상대적인 지방산 조성비를 보면 stearic acid에 대한 palmitic acid의 비율(P/S)이 3.7이었으며 김⁹⁷⁾등의 연구 결과와 비슷하였다. 10 kGy 이상 조사한 시료에서는 감소하는 현상을 보였으며 120 kGy에서 3.5로 가장 낮은 비율이었다. 이는 조사선량이 증가함에 따라 stearic acid와 palmitic acid 가 조금씩 증가하는 추세였는데 그 양을 비교해볼때 stearic acid가 palmitic acid보다 더 많이 증가하는데 기인한 것으로 생각된다. 그리고 콩과 삶은 콩에서의 P/S비율은 두 구 모두 3.6으로 청국장과 비슷한 값을 보였다.

Stearic acid에 대한 oleic acid의 비율(O/S)은 조사선량이 커짐에 따라 대체적으로 감소하는 경향이었으며 P/S값보다 그 감소폭이 컸다. 원료 대두는 7.7, 삶은 콩의 경우 7.5, 청국장의 경우 7.4로 나타났으나, 120 kGy 조사한 청국장은 6.8의 값을 보였다. 이는 원료콩에 oleic acid가 청국장보다 많이 존재하고, 감마선 조사 청국장의 경우 stearic acid가 조금씩 증가했기 때문에 일어나는 현상으로 생각할 수 있다.

Stearic acid에 대한 linoleic acid의 비율(L/S)은 O/S와 달리 청국장에서의 값이 콩이나 autoclaved 콩의 값보다 높았다. 120 kGy 조사 청국장을 제외한 시료 모두에서 콩의 값보다 높은 13.2~14.0의 값으로 감마선 조사 선량이 커짐에 따라 감소하였다. 또한 palmitic acid에 대한 oleic acid의 비율(O/P)과 palmitic acid에 대한 linoleic acid의 비율(L/P)도 감마선 조사 선량이 커짐에 따라 조금씩 감소하였으며 O/P의 경우는 O/S처럼 대두나 증자 대두의 값이 청국장보다 높은 값을 가지는 것으로 나타났다.

대두의 주요 지방산인 oleic acid에 대한 linoleic acid의 비율(L/O)은 P/S, L/S, L/P와 같이 콩이나 삶은 콩의 값보다 청국장 시료에서 높게 나타났으며, 1~40 kGy 조사한 청국장에서는 L/O값이 조사하지 않은 청국장보다 약간 커졌으며, 80 kGy 이상으로 조사할 경우

조금 감소하는 경향을 보여 비교적 감마선 조사에 안정한 것으로 나타났다.

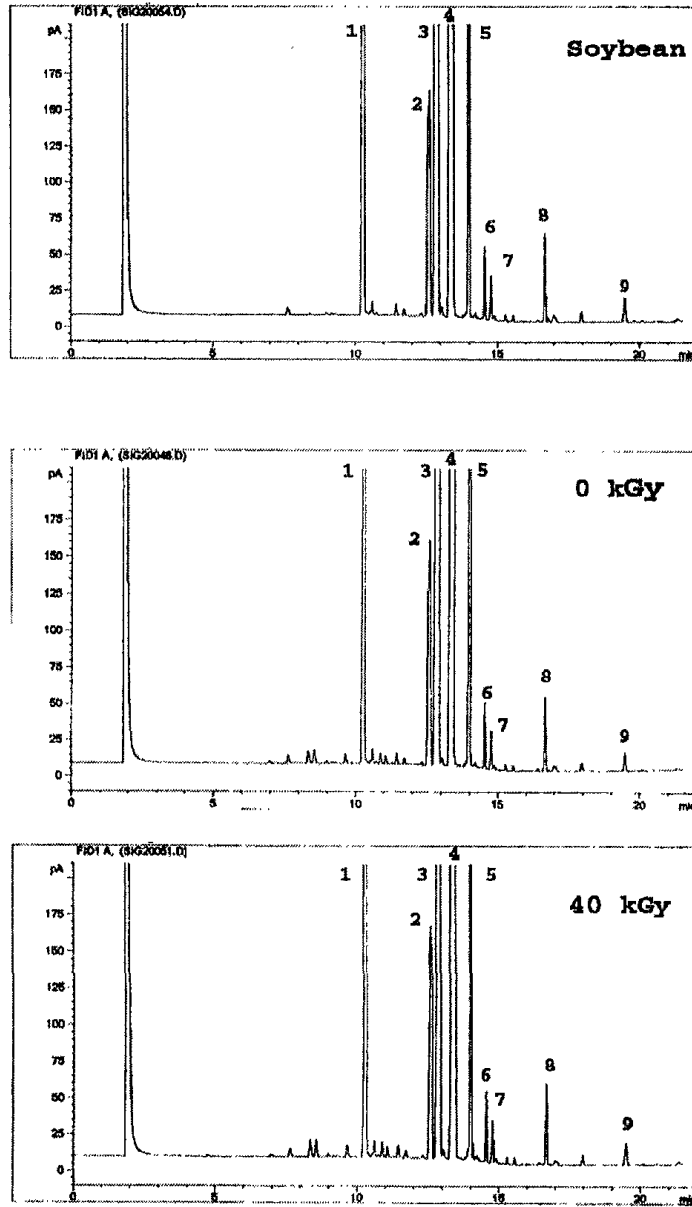


Fig. 3-1. GC chromatogram of soybean, nonirradiated *chungkukjang* and 40 kGy irradiated *chungkukjang*.

- 1: Palmitic acid, 2: Stearic acid, 3: Oleic acid, 4: Linoleic acid,
- 5: Linolenic acid, 6: Arachidic acid, 7: Arachidonic acid,
- 8: Behenic acid, 9: Lignoceric acid

Fatty acids	Soybean	Cooked soybean	<i>chungkukjang</i>							
			0 kGy	1 kGy	5 kGy	10 kGy	20 kGy	40 kGy	80 kGy	120 kGy
14:0	0.09	0.09	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.09	0.10	0.10
16:0	12.89	12.85	12.60	12.56	12.59	12.70	12.75	12.72	12.86	13.11
16:1	0.14	0.14	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.16	0.15
17:0	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
18:0	3.56	3.58	3.43	3.41	3.39	3.56	3.49	3.55	3.58	3.71
18:1	27.42	27.00	25.32	24.67	24.90	25.05	24.56	24.72	25.63	25.26
18:2	46.64	47.17	48.03	48.62	48.54	47.88	48.43	48.15	47.39	46.71
18:3	6.49	6.55	7.36	7.57	7.46	7.37	7.45	7.23	6.83	6.60
20:0	0.42	0.41	0.38	0.37	0.36	0.40	0.39	0.39	0.40	0.42
20:1	0.32	0.31	0.28	0.27	0.27	0.28	0.28	0.29	0.30	0.31
22:0	0.71	0.67	0.60	0.57	0.57	0.63	0.59	0.63	0.65	0.68
24:0	0.27	0.26	0.22	0.21	0.20	0.24	0.22	0.24	0.25	0.25
others	0.95	0.87	1.43	1.4	1.37	1.54	1.49	1.74	1.75	2.6
TSFA ¹⁾	18.04	17.96	17.43	17.32	17.31	17.73	17.64	17.72	17.94	18.37
TUFA ²⁾	81.01	81.17	81.14	81.28	81.32	80.73	80.87	80.54	80.31	79.03
PUFA ³⁾	53.13	53.72	55.39	56.19	56.0	55.25	55.88	55.38	54.22	53.31

Table 3-1. Fatty acid compositions(%) of soybean and irradiated *chungkukjang*

¹⁾ Total saturated fatty acids

²⁾ Total unsaturated fatty acids

³⁾ Polyunsaturated fatty acids(18:2+18:3)

2. 관능 평가

감마선 조사 선량에 따른 관능평가의 분석 결과는 Table 3-2와 같다. 시중에서 유통되는 청국장 5종을 비교하여 얻은 관능검사 평균값을 기준값(R)으로 하여 시료 청국장과 방사선 조사한 청국장에서 느껴지는 색, 맛과 향의 강도를 표시하도록 하였다.

갈색도(R:6)는 청국장의 경우 6.0 이었으며 120 kGy 조사한 청국장은 5.8로 평가되었으며 조사선량에 따라 유의하게 감소한 것으로 나타났다($p < 0.05$). 조¹⁹⁶⁾에 의하면 감마선 조사 선량에 따른 시료의 색도 변화는 5-7.5 kGy 정도의 선량에서 차이가 없었으며 비조사군과 감마선 조사군 사이에는 유의적인 차이가 없다고 하였다. 한편 한우육에 대한 조사선량이 증가함에 따라 명도, 황색도, 적색도 값이 감소하였다고 육¹⁵⁷⁾은 보고하였으며 Lambert¹⁵⁸⁾에 의하면 1 kGy 조사한 돼지고기의 명도가 상승되었다고 하였다. 이런 상반된 현상은 식품의 종류에 따른 식품 자체의 특성, 즉 함유 색소에 따른 차이인 것으로 생각된다. 저장중 식품의 갈변현상은 2가지 요인에 기인한다고 본다. 하나는 비효소적 갈변인 마이알 반응에 의한 melanoidin계 색소 형성과 다른 하나는 지질의 산화에 의한 갈변물질 생성이다¹⁵⁹⁾. 청국장의 경우는 식품 자체의 색이 갈색이 진하여 감마선 조사로 인한 차이가 고선량 조사구에서만 약간의 차이를 보인 것으로 생각된다.

냄새의 경우에 짠 냄새(R:6), 간장 냄새(R:5), 발효취(R:7), 비린내(R:6), 이취(R:6) 등은 감마선 조사 시료가 조사하지 않은 청국장에 비해 조사선량이 증가함에 따라 냄새 강도가 강해진 것으로 나타났으며, 유의성 검증에서는 발효취($p < 0.01$), 생선 냄새($p < 0.001$), 이취($p < 0.001$), 수용성 항목($p < 0.001$) 등이 조사 선량에 따른 유의차를 나타냈다. 그리고 콩비린내는 1 kGy와 5 kGy 조사된 청국장들이 조사하지 않은 청국장보다 낮은 값을 보였으며, 구수한 냄새의 경우에는 방사선 조사 시료 모두가 조사하지 않은 시료보다 낮은 값을 나타내었다. 특히 80 kGy 조사 청국장에서 가장 낮은 값을 보였는데, 이는 이취가 강해짐에 따라 상대적으로 구수한 맛이 덜 느껴졌기 때문으로 생각된다. 신 냄새는 1, 5, 10 kGy 조사 시료의 경우에 비조사 시료의 값보다 낮은 값을 보였다. 이상의 결과를 종합하여 보면 청국장의 감마선 조사로서 10 kGy 이하의 저선량을 조사한다면 조사하지 않은 청국장과 관능적으로 차이를 식별할 수 없으나, 20 kGy 선량에서는 짠 냄새와 구수한 냄새를 감소시키며, 40 kGy이상의 고선량에서는 간장냄새, 구수한 냄새를 제외하고 모든 냄새 항목의 값이 증가하였으며 뚜렷한 이취 증가 현상을 보였다. 냄새에 따른 기호도 값은 조사 선량이 증가함에 따라 감소하는 경향을 보였으나 통계적 유의차는 인정되지 않았다.

맛 항목의 경우에 구수한 맛, 짠 맛, 단 맛, 비린 맛, 텁텁한 맛, 신 맛, 이며, 기호도를 조

사선량에 따라 어느 정도 다른지 평가하였다. 1, 5, 10 kGy 조사 청국장의 맛은 전체적으로 원래 청국장 맛과 크게 다르지 않았고 특히 텁텁한 맛과 신 맛 항목을 제외한 관능평가에서 10 kGy 조사 시료가 1 kGy 조사 시료보다 원료 청국장에 더 가까운 맛을 나타냈다. 이상의 관능 검사 결과를 종합하여 보았을 때 10 kGy 조사 선량은 청국장의 맛에 유의적인 변화를 초래하지 않는 것으로 판단된다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 청국장의 멸균을 위해서는 40 kGy 이상의 조사량이 필요하나, 20-40kGy 정도의 조사 선량으로 청국장에 미생물수를 10^2 이하로 충분히 낮출 수 있고 효소의 파괴와 다가불포화지방산의 감소를 방지하면서 청국장 고유의 관능적 특성을 유지할 수 있을 것으로 판단되었다.

Table 3-2. Sensory color and odor evaluation of irradiated *chungkukjang*

Sample	Brown*	Salty odor	Beany odor	Soy sauce odor	Meaty odor	Un-acceptable odor**	Sour odor	Fish odor***	Off-flavor***	Accept-ance***
0 kGy	6.0±0.9 ^{ab}	5.7±1.4	4.6±1.5	5.4±1.5 ^{ab}	3.7±1.3	6.8±0.8 ^b	3.1±1.0	6.2±0.9 ^{bc}	6.0±0.4 ^c	5.5±1.3 ^a
1 kGy	6.2±0.4 ^a	5.9±1.1	4.2±1.4	5.1±1.2 ^b	3.0±1.0	6.8±1.1 ^b	3.0±1.0	6.1±0.8 ^c	6.2±0.4 ^c	5.1±0.9 ^{ab}
5 kGy	5.9±0.6 ^{abc}	5.9±1.4	4.3±1.1	5.3±1.2 ^{ab}	3.6±1.2	6.5±1.2 ^b	3.0±0.8	5.7±1.3 ^c	6.2±0.6 ^c	5.0±1.1 ^{ab}
10 kGy	5.4±0.8 ^c	5.7±1.4	4.7±1.6	5.6±0.9 ^{ab}	3.4±0.9	7.1±0.8 ^b	2.9±0.8	6.2±0.6 ^{bc}	6.3±0.7 ^c	5.2±0.8 ^{ab}
20 kGy	5.9±0.5 ^{bac}	5.4±1.4	4.6±1.1	5.7±1.4 ^{ab}	3.1±1.8	6.9±0.7 ^b	3.2±1.3	6.3±0.7 ^{bc}	6.7±0.7 ^{bc}	4.2±0.9 ^{bc}
40 kGy	5.5±0.8 ^{bc}	5.9±1.6	4.9±1.4	6.2±1.2 ^{ab}	3.1±1.6	7.3±0.6 ^{ab}	3.2±1.4	7.1±0.9 ^a	6.9±0.9 ^b	4.2±1.3 ^{bc}
80 kGy	5.6±0.5 ^{bc}	5.7±1.5	4.9±1.5	5.9±1.7 ^{ab}	2.7±2.2	7.3±0.9 ^{ab}	3.4±1.6	6.9±1.1 ^{ab}	7.0±1.2 ^b	3.9±1.3 ^{bc}
120 kGy	5.8±0.7 ^{bac}	6.0±2.0	5.4±2.1	6.4±1.7 ^{ab}	3.0±2.5	7.9±1.0 ^a	3.3±1.5	7.4±0.9 ^a	8.0±0.9 ^a	3.6±1.7 ^{bc}

There are significant difference among the values within the same column.

(* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001)

3. 감마선 조사에 의한 청국장의 휘발성 향기 성분 분석

Huber 등⁷⁸⁾은 조사를 이용해 살균한 고기에서 metallic, sulfide, wet dog, wet grain, brunt로 표현되는 특징적인 냄새들이 생성된다고 보고하고 그 원인은 조사과정에서 생성되는 유리 라디칼이 반응한 결과라고 가정하였다. Patterson 등⁷⁹⁾은 dimethyltrisulfide가 가장 유력한 이취(off-odor) 화합물이고 산화된 고기의 warmed-over flavor와 확연히 다르며 조사에 따른 변화로 생긴 것이라고 보고하였다, Heath 등⁸⁰⁾은 2-3 kGy로 조사된 비조리된 닭고기는 요리 후에도 남아있는 hot fat, burned oil, burned feather's odor를 낸다고 보고하였으며, Hashim 등⁸¹⁾도 조사된 비조리 고기는 특징적인 bloody, sweet aroma를 낸다고 보고하였다.

Ahn 등⁸²⁾도 조사 고기는 포장방법과 상관없이 비조사 고기패티보다 휘발성분을 더 많이 생산하고 조사 후에 특징적인 aroma가 생긴다고 지적하고, 생고기는 그것이 가열되고, 변성되고 산화촉진제가 첨가되지 않는 한 매우 강한 항산화효과를 가지고 있다고 보고하였다. Chen 등⁸³⁾은 조리전의 조사는 저장중 조리된 고기의 지질산화에 영향을 주지 않으나, 조리 후 조사된 고기는 조리과정에서 항산화성분이 변하고 세포구조가 손상되고 환경에 지질이 노출되므로 지질산화에 매우 민감하다고 하였다⁸⁴⁾. 한편 조사선량은 조리된 돼지 소세지의 휘발성분의 생성에 영향을 주나 2-thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)에 대한 효과는 아주 작으며⁸⁵⁾, 고기의 단백질성 분획 조사시 다양한 황 화합물과 일부 alkyl benzenes(다양한 아미노산의 방사선 분해산물)이 확인되고, 지질 획분은 C₁-C₁₇ n-alkanes, 1-alkenes, alkadienes, alkyne 등의 방사선 산물을 형성하나, aliphatic hydrocarbons과 sulfur 화합물로 구성된 lipoprotein fraction에서만 방사선 조사 냄새가 난다고 하였다¹¹⁷⁾.

고기의 지질의 방사선분해와 고기에서 분리된 지질의 분해는 단백질과 달리 크게 차이가 난다. Tributyrin과 유리 아미노산의 혼합물이 조사될 때 특이한 방사선 산물(butyramide)이 생기는데 이는 지질과 단백질의 상호작용에 기인한 것이다⁵⁵⁾. 한편 단백질과 단백질-탄수화물의 상호작용으로 선량 증가와 함께 항산화 효과를 발휘하여 고기의 lipid를 보호한다. 단백질 조사 시 상반되는 현상이 생겨 peptide

bond가 분해되어 분자량이 감소되거나, 분자내의 cross-linking 반응으로 분자량이 증가한다. 분자량이 증가하면 용해성이 감소하고 점도와 인장 강도는 증가한다. Dry fibrillar protein (건조근원섬유 단백질)이 조사될 때에는 분자량 감소 효과가 우세한 것으로 보이고 고기의 수용성 베지에서는 분자의 cross-linking 반응 효과가 우세하게 나타난다. pH, sarcoplasmic protein과 myofibrillar proteins의 용해성, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis에서 band의 강도, 조직의 SH groups의 수와 관련하여 50 kGy의 선량으로 조사 받은 beef/pork는 70°C 이하로 가열처리한 것과 유사하다.

16 kGy 또는 5 kGy 조사 쇠고기에서 creatinine nitrogen이 비조사 sample보다 25-12% 높았으며 creatine 질소, 수용성 단백질 질소, 비단백 질소 및 합황화합물은 일관된 영향을 미치지 않았다. 50 kGy 조사한 돼지고기에서 총 sulfhydryl 함량이 변화하지 않았으며, 40 kGy 쇠고기 근육 조사 시에도 actin의 SH함량에는 변화가 없었다. 대조적으로 Grunewald⁸⁷⁾가 50 kGy로 조사한 쇠고기에서 cysteine이 cystine으로 산화한 것을 지적하고 SH-group의 감소와 disulfide group의 증가를 보고하였는데 이러한 불일치의 이유는 알려지지 않았다.

생선과 해산물은 고기보다 방사선 조사에 의한 변화가 더 민감한 것으로 알려져 있다⁵⁵⁾. 공기하에서 4.5 kGy로 조사시 이들 volatile carbonyls의 농도는 최대한 증가하나, 조리이 의해 저분자 aldehydes의 양은 감소한다. 대합의 저장이나 조사의 효과에서 volatile C₂-C₇ carbonyls은 중요한 역할을 하지 않고 dimethylsulfide가 가장 우세하고 전형적인 대합냄새의 원인이었다. 60 kGy 조사한 생선에서 동물사료 연구에 참고할만한 효과를 일으키지 않았고 고도불포화지방산의 일부는 보다 민감하게 변화하였으나, 포화지방산과 monoene acid는 상당히 안정하였다. 한편 관능적으로 감지되는 산패와 TBA (thiobarbituric acid) 값과의 관계는 아주 빈약하였으나, 이것은 생선에서의 산패 발달과만 관련된다.

미생물수의 감소를 목표로 3-10 kGy 조사하였을 때, whole egg magma는 3 kGy 선량에서 off-flavor 현상이 관찰되었다. Fossum과 Underdal⁸⁸⁾은 난백의 trypsin 저해제에 관한 연구에서 6 kGy로 난백용액을 조사할 경우 즉시 카보닐 화합물이 증가하지는 않는다고 하였다.

모든 식품 중 우유와 유제품이 가장 방사선 조사에 의한 향미 변화 감수성이 커 0.2 kGy에서 탈지 분유, 0.07 kGy에서 우유에 향미 변화가 나타난다. 선량반응은 non-linear 하며 5 kGy에서는 다소 부가적인 향미가 느껴진다. Grunewald⁸⁹⁾는 훈련된 패넬은 0.03 kGy 조사된 초콜릿을 구별한다고 보고하였다. 우유 농축물의 조사에 의한 TBA값 변화와 off-flavor 사이에는 직접적인 상관관계를 보이지 않는다. 방사선 조사에 의한 고기의 pH 증가와는 대조적으로 유당의 경우에는 방사선 조사에 의한 산의 형성으로⁹⁰⁻⁹¹⁾ pH가 저하되며, 탈지분유는 실험 조건에서 방사선 조사에 의한 total-SH group의 증가가 꾸준히 관찰되었다. 산소의 존재/부존재하에서 60 kGy 조사한 무수 butter fat의 경우 carbon dioxide가 많은 양 생산되고 남아있는 화합물 중 aliphatic hydrocarbon이 수적, 양적으로 우세하였으며 휘발성분의 성질과 양은 산소의 존재나 부존재하에 의해 크게 영향받지 않았다²⁷⁾. 자동산화된 지방에는 carbonyls (n-alkanals)의 농도가 높고 hydrocarbon의 양이 적은 양인 반면에 조사된 지방에 n-alkanes 함량이 높고 carbonyls은 거의 없다⁹²⁾.

Dubois 등⁹³⁾에 의하면 사과주스를 신선한 것, 조사한 것, 열처리한 것에 의하여 head space 가스를 GC 분석한 결과 5 kGy 조사 주스에서 발견된 화합물은 furan을 제외하고는 열처리 주스와 동일하였다. 사과주스에서 furan이 조사의 지표처럼 보였으며 같은 방법으로 hydroxymethylfurfural이 열처리의 지표이다. 그러나 furan은 방사선 off-odor에 영향을 주지 않고 mercuric chloride, sulfide때문이라고 생각하였다. Dimethylsulfide가 사과주스보다 고단백질을 함유한 포도주스의 상층부에서 사실상 발견되었으며 off-flavor 형성 역치는 사과주스의 경우는 2-3 kGy, 포도 주스는 1 kGy로 나타나고, 여과에 의해 단백질을 제거한 후 분리된 단백질과 사과주스를 실험한 결과 단백질이 방사선유도 off-flavor 화합물의 원천이라는 것을 발견하였다.

여섯 종류의 분말 향신료가 미생물적 살균을 달성하기 위한 선량(6-14 kGy)으로 조사될 때, 휘발성, 비휘발성 oil에 영향이 거의 없는 것이 Farkas 등⁹⁴⁾에 의해 관찰되었으며, 대조적으로 ethylene oxide fumigation을 이용할때는 두 향신료에서 휘발성 oil이 감소하거나 전 향신료에서 비휘발성 oil이 감소하였다⁹⁵⁾.

네가지 다른 식물성유를 동일하게 조사 처리한 (진공, 25°C, 60 kGy) 결과를 비교

하면 1-alkenes, alkadienes, alkatrienes alkanals; 지방산의 methyl/ethyl ester가 동정되고 주요 방사선 산물은 지방의 지방산 조성에 의존하여 옥수수 기름의 경우에는 16:3 alkatriene 과 17:2 alkadiene이 가장 높은 농도로 확인되었으며, 그 다음 18:2 aldehyde로 나타났다²⁹⁾.

가. 대두와 증자 대두의 향기성분

대두, 증자 대두와 청국장에서 GC/MSD로 분리동정한 휘발성 성분을 Table 3-3 에 나타냈다. 대두에서 동정된 향기성분은 27종으로 증자 대두의 23종보다 많았으나, 각각의 향기성분의 relative abundance는 증자 대두에 비하여 아주 낮은 것으로 나타났다. 건조 대두를 갈아서 향기성분을 검출하였을 때, 2-butenal, 2-propanone, 2-butanol등의 relative abundance가 다른 향기성분보다 높게 나타났으며, 증자 대두와 청국장에서 검출되지 않은 성분인 fruity flavor와 alcoholic odor를 내는 1-propanol이 검출되었다.

대두의 향기성분은 청국장에 존재하는 양을 기준으로 상대적인 함량을 비교해 볼 때 증자 콩이나 청국장에 비해 아주 적은 양으로 나타났다. 대두, 증자 대두와 청국장에 동시에 존재하는 향기성분은 18종이었으며, ethylbenzene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-benzene, 1-methyl-5-(1-methylethyl)-cyclohexane 등은 대두에 가장 많았으며, 강한 매운(acrid) 냄새 특성을 가진 3-methylbutanal은 대두에 가장 적게 존재하였다. 그리고 2-butenal, 2-methyl-1-propanol, 1,4-dimethylbenzene, octanal, tridecane 등 8성분은 대두와 청국장에 존재하였는데, 이들 성분은 모두 청국장보다 대두에 많은 양이 존재하는 것으로 나타났으며 특히 아몬드 냄새와 과일향의 특성을 가진 2-butenal과 2-methyl-1-propanol이 청국장에 비하여 각각 113배, 126배 이상 존재하였다. 한편 ether와 같은 냄새를 내는 ethylacetate와 alcoholic odor를 내는 2-propanol은 낮은 함량을 나타냈다. 이와같이 강한 향기 특성을 지니는 향기성분의 양이 적으므로 대두에서는 beany, green odor 특성을 가진 hexanal, 4-methylthiazole과 2-pentylfuran 등이 그 양은 적어도 대두냄새에 기여하는 정도가 커서 콩비린내, 날콩냄새와 풀냄새를 인지할 수 있다고 사료된다(Table 3-4). 증자 대두에서 relative abundance가 높게 나타난 주요 휘발성분은 2-propanone, 2-methyl-1-butanol, 3-methyl-2-pentanone, 3-methyl-2-butanone, 2-butanol, 3-methyl-1-butanol, methyl-2-methylbutanoate, ethyl-2-methyl-butanoate, methylbenzene, 2-pentylfuran 등이었으며 다른 시료에는 없는 benzene과 methyl-2-methylbutanoate가 확인되었다. 이 성분들 중 2-propanone과 2-methyl-1-butanol, 3-methyl-2-butanone, 2-butanol,

3-methyl-1-butanol은 대두와 청국장에도 존재하는 성분이었으며, 청국장 대비 함량이 1,359배에서 9배로 증자콩에 가장 많은 양이 존재하고 있었다. 그리고 증자 대두와 청국장에 동시에 존재하는 3-methyl-2-pentanone, ethyl-2-methyl-butanoate과 3,3'-thiobis-1-propene도 청국장의 6,851배에서 105배 존재하는 것으로 나타났다. Sugawara¹⁰¹⁾는 대두를 5.5-8시간 증자하면 hexanal, 2-pentylfuran과 같은 저분자 풀냄새물질이 감소되거나 제거되고 4-ethyl-2-methylthiazole, 3,5-dimethyl-1,2,4-trithiolane 등의 황화합물이 형성된다고 하였다.

증자 대두의 향기 성분 중에는 강한 방향성의 냄새(aromatic odor) 특성을 가진 2-propanone과 2-methyl-1-butanol 등이 주요 성분이며, 대두단백이나 탈지단백을 가열시에 생성되는 benzene, 낮은 농도에서도 매운 과일 향(pungent, fruity odor)을 내는 methyl-2-methylbutanoate 등으로 인하여 증자콩의 특징적인 냄새 (구수하지만 자극적이고 쏘는 듯한 단내)가 인지된다고 볼 수 있다.

3-methyl-1-butanol은 탄소골격이 L-leucine와 유사하므로 대두중에 함유된 leucine을 전구체로 하여 대두의 가공 및 저장중에 어떤 효소의 작용에 의하여 생합성되는 것으로 추측되고 있다¹³⁸⁻¹⁴⁰⁾. 또한 3-methyl-1-butanol과 같은 alkylalcohol류는 생대두뿐만 아니라 탈지대두, 대두단백등과 이들의 headspace gas중에도 존재하는 특징적인 대두취를 형성하는 물질이며 가열에 의하여 감소¹⁴¹⁾한다고 하나 본 실험에서는 대두, 증자대두와 청국장에 동시에 존재하였다. 이는 향기성분 분리 방법의 차이로 인한 것이라 사료된다. 손¹³⁶⁾에 의하면 청국장의 휘발성분을 SDE 및 Tenax GC 흡착법으로 추출하여 비교하였을 때, SDE 추출법에서 많은 종류의 휘발성분이 검출되었으나, 저비점 휘발성분은 Tenax GC 흡착법에서 그 함량이 더 많았으며, indole과 palmitic acid와 같은 물질들은 SDE 추출법에서만 검출이 되었다고 하였다. 본 실험에서는 purge & trap법을 이용하여 저비점 휘발성분이 많이 검출되어 retention time 5분 이내에 25종, 15분 이내에 56종의 휘발성분이 검출되었다.

Table 3-4. Volatile compounds identified from soybean, cooked soybean and irradiated *chungkukjang*

Peak No.	R.T. (min.)	Volatile compounds	Soybean	Cooked soybean	0 kGy	1 kGy	5 kGy	10 kGy	20 kGy	40 kGy	80 kGy	120 kGy	
Ketones													
1	2.06	2-propanone	3.108	575.191	0.428	5.264	0.245	12.194	1.558	7.665	0.525	5.774	
9	2.77	2,3-butanedione	—	—	—	—	—	—	—	—	0.764	—	
10	2.79	3-methyl-2-butanone	0.160	4.833	0.060	0.088	0.161	5.852	0.432	0.238	—	—	
12	2.86	2-butanone	—	—	—	—	0.138	5.771	0.633	1.238	2.834	2.752	
26	5.36	3-hydroxy-2-butanone	—	—	0.013	0.031	0.041	0.688	0.282	—	—	—	
31	6.38	3-methyl-2-pentanone	—	24.519	0.004	0.034	0.014	0.269	0.119	—	0.069	0.063	
44	10.93	2-methyl-3-heptanone	—	—	0.003	0.008	—	0.438	0.268	0.098	0.124	0.068	
51	12.21	5-methyl-2-hexanone	—	—	—	0.003	—	—	—	—	—	0.022	
53	12.34	4-hydroxy-2,5-dimethyl-3-hexanone	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.038	
63	21.35	5-methyl-3-heptanone	—	—	—	—	—	—	—	—	0.099	0.055	
71	25.67	tricyclo(4,2,0,2,4)oct-7en-5-one	—	—	—	—	0.003	—	—	—	—	—	
73	29.11	1,7-dihydro-6H-purin-6-one	—	—	0.006	0.009	0.006	0.517	0.486	0.157	0.140	0.043	
77	35.47	hexylcyclopentenone	0.619	0.773	0.021	0.015	0.005	0.306	0.063	0.030	—	—	
Number of compounds detected			13	3	4	7	8	8	8	8	6	7	8
Alcohols													
2	2.23	2-propanol	0.118	—	0.016	0.069	0.035	0.579	0.521	0.177	0.135	0.395	
5	2.52	1-propanol	0.103	—	—	—	—	0.046	—	—	0.045	—	
13	2.96	2-butanol	1.006	14.969	0.045	—	—	—	0.481	0.674	0.142	0.764	
18	3.27	3-methyl-1-pentanol	—	—	—	—	—	—	—	—	0.050	—	
19	3.30	2-methyl-1-propanol	0.530	—	0.004	0.032	0.018	0.403	0.248	0.078	0.081	0.108	
29	6.10	3-methyl-1-butanol	0.382	0.678	0.017	0.013	0.103	2.762	0.676	0.148	0.359	0.320	
30	6.24	2-methyl-1-butanol	0.512	29.355	0.022	0.109	0.022	0.728	0.748	0.082	0.184	0.170	
41	8.84	tetrahydro-2H-pyran-2-ol	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.038	
60	18.56	2,6-dimethyl-4-heptanol	—	—	—	0.006	0.014	—	—	—	—	—	
75	30.39	2-dodecen-1-ol	—	—	—	—	—	—	—	0.029	—	—	
Number of compounds detected			10	6	3	5	5	5	5	5	6	7	6

Peak No.	R.T. (min.)	Volatile compounds	Soybean	Cooked soybean	0 kGy	1 kGy	5 kGy	10 kGy	20 kGy	40 kGy	80 kGy	120 kGy	
Aldehydes													
3	2.42	2-methylpropanal	0.017	—	0.014	0.028	0.021	0.695	0.249	0.101	0.041	0.152	
11	2.82	2-butenal	4.093	—	0.036	0.108	—	—	—	—	—	—	
20	3.71	3-methylbutanal	0.014	8.413	0.083	0.146	0.069	2.746	1.491	0.239	0.194	0.445	
21	3.88	2-methylbutanal	0.062	0.800	0.052	0.182	0.027	0.789	2.379	—	—	0.063	
40	8.80	hexanal	0.291	0.577	0.011	—	—	0.419	0.082	0.035	—	—	
62	19.21	benzaldehyde	—	—	0.016	0.035	0.012	0.701	0.252	0.070	0.077	0.076	
67	22.59	octanal	0.190	—	0.012	—	—	1.074	1.294	0.345	0.323	0.127	
76	30.44	nonanal	0.304	0.409	0.027	0.018	0.004	0.511	0.102	—	—	—	
Number of compounds detected			8	7	4	8	6	5	7	7	5	4	5
Heterocyclic compounds													
7	2.64	tetrahydro-3-methyl-furan	—	—	—	—	—	—	—	—	0.035	—	
14	3.01	2-methylfuran	—	—	—	—	—	0.176	0.168	0.118	0.289	—	
46	11.04	5-methyl-2(5H)-Furanone	—	—	—	—	—	—	0.051	0.050	0.075	0.055	
57	15.72	2,5-dimethylpyrazine	—	—	0.058	0.131	0.062	2.135	0.549	0.245	0.152	—	
66	21.75	2-pentylfuran	0.267	1.157	0.014	0.023	0.009	0.326	0.131	0.037	0.054	0.050	
Number of compounds detected			5	1	1	2	2	2	3	4	4	5	2
Esters													
15	3.06	ethylacetate	0.082	—	0.037	0.448	0.053	0.785	0.157	—	—	—	
32	7.05	ethyl-2-methyl-propanoate	—	—	0.006	0.032	—	0.064	0.202	—	0.050	—	
33	7.05	ethylbutanoate	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.027	
35	7.82	methyl-2-methylbutanoate	—	2.560	—	—	0.007	0.123	0.122	—	0.027	0.019	
45	10.95	S-propylpentanethioate	—	—	—	—	0.011	—	—	—	—	—	
47	11.78	ethyl-2-methyl-butanoate	—	3.059	0.006	0.033	0.005	0.079	0.241	0.039	0.052	—	
48	12.01	ethyl-3-methyl-butanoate	—	—	0.003	0.038	—	0.100	0.095	—	—	—	
61	19.02	hexyl-2-butenate	—	—	—	—	0.008	0.410	0.304	0.119	0.144	0.080	
Number of compounds detected			8	1	2	4	4	5	6	6	2	4	3

Peak No.	R.T. (min.)	Volatile compounds	Soybean	Cooked soybean	0 kGy	1 kGy	5 kGy	10 kGy	20 kGy	40 kGy	80 kGy	120 kGy	
Thiol compounds													
25	4.71	3-(methylthio)-1-propene	—	—	—	—	0.019	0.474	0.239	0.113	0.132	0.107	
50	12.12	3,3'-thiobis-1-propene	—	0.481	0.005	—	0.020	0.530	0.109	—	—	—	
59	18.22	Thiophene-di	—	—	—	0.007	0.010	0.505	0.352	0.139	—	—	
Number of compounds detected			3	0	1	1	1	3	3	3	2	1	1
Acids													
36	8.23	2-ethylbutanoic acid	—	—	0.002	—	—	—	—	—	—	0.018	
39	8.78	dimethylpropandioic acid	—	—	—	—	0.029	—	—	—	—	—	
55	13.55	pentanoic acid	—	—	0.007	0.036	0.030	—	—	0.082	0.098	t	
56	14.25	2-methyl-butanoic acid	0.115	0.290	0.014	0.009	0.031	0.995	0.379	—	0.028	—	
Number of compounds detected			4	1	1	3	2	3	1	1	1	2	2
Hydrocarbons													
Alkanes													
42	8.85	2,4-dimethyl-heptane	—	—	—	—	—	—	—	—	0.039	—	
58	18.11	4,4-dimethyl-undecane	—	—	—	—	—	—	—	—	0.173	0.106	
78	37.93	Tridecane	0.062	—	0.003	—	—	—	—	—	—	—	
Number of compounds detected			3	1	0	1	0	0	0	0	2	1	
Cycloalkanes													
24	4.56	1,2-dimethyl-cyclopentane	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.276	
28	5.50	methyl cyclohexane	—	—	0.005	—	0.007	0.153	0.274	0.080	0.123	—	
70	24.50	1-methyl-5-(1-methylethyl)-cyclohexane	0.313	0.212	0.024	0.007	0.004	0.493	0.106	0.030	—	—	
Number of compounds detected			3	1	1	2	1	2	2	2	1	1	
Alkenes													
8	2.76	2,3-butanediene	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.328	
16	3.23	2-methyl-1-pentene	—	—	—	—	—	0.172	0.131	0.045	—	—	
17	3.24	1-hexene	—	—	0.001	—	0.006	—	—	—	—	—	
22	3.88	benzene	—	0.871	—	—	0.028	1.024	—	0.359	0.292	0.124	
23	4.56	1-heptene	—	—	—	—	—	0.133	0.190	0.084	0.201	—	
34	7.24	methylbenzene	0.396	1.690	0.054	0.199	0.097	1.939	1.050	0.427	0.928	0.639	

Peak No.	R.T. (min.)	Volatile compounds	Soybean	Cooked soybean	0 kGy	1 kGy	5 kGy	10 kGy	20 kGy	40 kGy	80 kGy	120 kGy
38	8.41	1-octene	—	—	—	—	—	—	—	—	0.018	0.028
43	9.62	3-ethyl-2-methyl-2-pentene	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.025
52	12.32	1,4-dimethylbenzene	0.128	—	0.004	0.015	0.008	0.344	0.215	0.040	0.087	—
54	12.90	ethylbenzene	0.302	0.242	0.011	0.033	0.003	0.108	0.197	0.060	0.069	—
68	23.04	alpha-pinene	0.056	0.386	0.002	0.004	0.054	0.686	—	—	—	—
69	24.19	1-methyl-4-(1-methylethyl)-benzene	0.099	0.084	0.010	0.006	0.002	0.210	—	0.011	—	—
Number of compounds detected		12	5	5	6	5	7	8	5	7	6	5
Alkynes												
65	21.50	4-octyne	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.008
Number of compounds detected		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Number of compounds detected		19	7	6	9	6	9	10	7	9	9	8
Others												
4	2.47	2-fluoro-1-propene	—	—	0.002	—	0.001	0.036	—	—	—	—
6	2.63	1-propanamine	—	—	0.003	—	0.002	0.120	0.089	—	—	—
27	5.35	(2-methylpropyl)hydrazine	—	—	—	—	—	—	—	0.211	—	—
37	8.32	1-ethoxy-propane	—	—	—	—	—	—	—	0.082	0.018	—
49	12.11	di-1-propenyl-sulfide	—	—	—	—	—	—	—	0.032	—	—
64	21.40	4-methylthiazole	0.011	0.555	0.013	0.036	0.012	0.334	0.226	0.074	—	—
72	28.36	2,5-dimethylthiazole	—	—	0.005	0.016	0.013	0.413	—	—	—	—
74	29.33	4-methoxy-phenol	—	—	—	—	—	0.121	0.195	0.048	—	—
Number of compounds detected		8	1	1	4	2	4	5	3	5	1	0
Total		78	27	23	43	36	44	48	44	40	40	35

'-': not detect

Relative abundance = Peak area of volatile compounds / Peak area of internal standard(n-heptane).

Table 3-4. Some important changes in the relative abundance of volatile compounds by cooking of soybean.

Peak No.	Volatile compounds	Soybean	Cooked soybean	Characteristic odor
1	2-propanone	3.108	575.191	Pungent sweet taste, light ethereal,nauseating
2	2-propanol	0.118	—	Alcoholic, somewhat unpleasant odor, burning taste
29	3-methyl-1-butanol	0.382	0.678	fruity, unpleasently irritating
30	2-methyl-1-butanol	0.512	29.355	Sweet, valeric
3	2-methylpropanal	0.017	—	Apple aroma, Pleasantly fruity, pungent
11	2-butenal	4.093	—	Almond odors
20	3-methylbutanal	0.014	8.413	Powerful, penetrating acrid odor
21	2-methylbutanal	0.062	0.800	When diluted, pleasant fruity-fermented odor(roasted cocoa, coffee odor)
40	hexanal	0.291	0.577	Green, Unripe apples, fatty, beany
67	octanal	0.190	—	Pungent, sweet, caramel like, burnt
66	2-pentylfuran	0.267	1.157	Off-flavor in soybean (fruity odor, green bean, metallic, vegetable)
15	ethylacetate	0.082	—	Fruity, pineapple aroma, brandy-like
56	2-methyl-butanoic acid	0.115	0.290	pungent, acrid odor, reminiscent of cheese, acrid-acid odor
22	benzene	—	0.871	grassy
68	alpha-pinene	0.056	0.386	pine:terpentine-like;oxidized material
64	4-methylthiazole	0.011	0.555	Nutty,green odor

'—': not detect

Relative abundance = Peak area of volatile compounds / Peak area of internal standard(n-heptane).

나. 청국장과 감마선 조사 청국장의 향기 성분

청국장에 존재하는 향기 성분은 각 성분들의 관능기별로 살펴보면 hydrocarbon 9종, alcohol 5종, aldehyde 8종, heterocyclic compound 2종, ester 4종, thiol compound 1종, acid 3종, ketone 7종, 기타 4종으로 총 43종이 동정되었다.

Margalith¹⁴³⁾에 의하면 발효에 의하여 형성되는 향은 ester류, acid류, carbonyl류, alcohol류, lactone류 등이며, 본 실험에서도 증자 대두에 비하여 청국장에서 검출된 향기성분중 ketone류, acid류와 ester류가 많이 확인되었으며 2-propanone, 3-methylbutanal, 3-methyl-2-butanone, 2,5-dimethylpyrazine 등의 relative abundance가 다른 성분에 비하여 높은 경향이였다. 대두와 청국장이 공통으로 함유하는 향기 성분은 26종이며, 증자대두와 겹치는 향기성분은 21종이었으나, 이들 성분들은 대부분 청국장에는 적은 양이 함유되어 있었다.

청국장에 특징적으로 존재하는 성분은 2-fluoro-1-propene, 1-propanamine, 1-hexene, 3-hydroxy-2-butanone, methyl cyclohexane, ethyl-2-methyl-propanoate, 2-ethylbutanoic acid, 2-methyl-3-heptanone, ethyl-3-methyl-butanoate, pentanoic acid, 2,5-dimethylpyrazine, benzaldehyde, 2,5-dimethylthiazole, 1,7-dihydro-6H-purin-6-one 으로 14 성분이었다. 이들 중 몇 가지 향기성분들의 특징을 살펴보면, 3-hydroxy-2-butanone은 향긋한 버터냄새를 내고 분리대두단백이나 탈지대두단백을 가열시 형성되며¹⁴⁴⁾, pentanoic acid은 자극취⁹⁹⁾, ethyl-2-methyl-propanoate는 과일냄새, 2,5-dimethylpyrazine은 potato chip과 같은 향과 볶는 냄새, benzaldehyde는 bitter 아몬드와 유사한 방향성 맛을 가진다고 하였다¹⁴⁵⁾. 증자대두와 청국장에서 검출된 향기성분중 관능적인 특성이 밝혀진 성분을 Table 3-5에 나타냈다.

청국장과 대두 및 증자대두에 공통으로 존재하는 성분들은 청국장에 가장 적은 양으로 존재하므로, 청국장에만 있는 여러 향기성분들이 복합적으로 증자대두와 구별되는 청국장의 특징적인 냄새(쫄는듯한 자극취와 구수한 냄새, 산패취 등)를 내는 것으로 사료된다.

Maillard 반응과 지질의 상호반응에 의해 생성되는 휘발성 성분은 하나 혹은 두 개 또는 그 이상의 nitrogen이나 sulfur 분자를 함유하는 heterocyclic compounds이고, 4개 이상의 carbon 분자를 가지는 long chain alkyl substitute를 가진다. 이런 long chain alkyl substituted heterocyclic compounds는 가열식품, 즉 튀긴 것, 구운 것, 볶은 식품에 중요한 미량의 향기성분이다¹⁶²⁾.

Maillard 반응의 가수분해 산물인 acetol과 ammonium acetate와의 반응 또한 지방의 분해산물인 pentanal과 hexanal을 반응시켜서 2, 5-dimethylpyrazine, 2,

6-dimethylpyrazine, 2, 3, 5-trimethylpyrazine, 2, 5-dimethyl-3-ethylpyrazine, 2, 3, 5-trimethyl-6-pentylpyrazine 등의 alkyipyrazine 류가 생성되었다는 보고가 있다. 이런 alkyipyrazine들은 식품의 바람직한 냄새 성분을 발현시키는 작용을 하고 있다고 알려져 있다¹⁶³⁾.

황을 함유하는 아미노산 혹은 peptide들은 aldehyde류 등과 반응을 통하여 heterocyclic sulfur-containing compounds를 생성하는데, 2, 4-decadienal과 cysteine, glutathione과의 반응에서 furan 류, thiophene 류, thiazole 류 이외 3, 5-dimethyl-1, 2, 4-trithiolane 등 여러 종류의 향기성분이 생성되었다. 이들은 fried chicken, alliums 중, 삶은 고기, beef 수프의 주요 향기성분이 된다. 이 때 생성되는 향기성분 중에 alkyipyrazines, alkylfurans, alkylthiophenes, alkylthiazoles의 양은 감소를 하였으나 2-pentylpyridine, alkylthiophenes 등을 lecithine의 추가에 의해서만 생성되었다¹⁶¹⁾. 불포화, 포화지방산을 함유한 유지의 산화와 열분해에 의해 식품내 함유된 수많은 성분들이 상호 작용하여 같은 반응이나 냄새 성분을 생성시키는데 이 때 형성되는 성분들은 반응시의 출발 물질들에 의하여 많은 차이를 나타내게 된다.

같은 반응과 냄새 성분에 중요한 역할을 하는 당과 아미노산의 반응에 있어서는 아미노산의 종류에 따라 생성되는 pyrazine의 종류가 다양하다고 보고하였는데 glycine-glucose 반응에서는 2, 3, 5-trimethylpyrazine이, arginine-glucose 반응에서는 2-methylpyrazine이 많이 생성되며, 2, 5-dimethylpyrazine은 histidine-glucose 반응에서, 2-methylpyrazine은 lysine-glucose 반응에서 대부분 생성된다고 밝혔다¹⁶⁴⁾.

Wong 등¹⁶⁵⁾은 glucose-nitrogen source의 실험적 혼합물에서 질소 원소의 종류에 따라 생성되는 pyrazine 함량을 비교하였는데, glutamic acid와 glucose 반응에서는 2, 5-dimethylpyrazine이 glycine을 반응시켰을 때 tetramethylpyrazine과 2-ethyl-3, 5-dimethylpyrazine이 더 많이 생성되었다고 보고하였다. Sugawara는 증자대두를 발효시켰을 때 pyrazine이 형성되며 황화합물과 pyrazine이 natto 향의 특징적인 주요 성분이며 존재하고 있는 대두냄새 성분을 마스킹한다고 하였다¹⁰¹⁾. Pyrazine류는 pyrrole류와 pyridine류와 마찬가지로 Maillard 반응 말기에 aldol 축합반응과 aldehyde-amino 중합반응으로 형성되며 가열식품의 roasted, bready 및 nutty flavor들과 관련이 있다¹⁴⁶⁾. Pyrazine의 종류와 함량은 대두의 증자조건, 사용균주, 발효조건 및 분석방법등에 따라 큰 영향을 받으며, 새우젓 숙성중에도 생성되어 발효식품중에 관여하는 미생물에서 유래한 것과 가열에 의한 것이라고 생각되어진다¹⁴⁷⁾. 그리고 증자대두에 존재하는 황화합물은 cysteine, cystine, glutathione, thiamine등과 탄화수소나 carbonyl과의 가열반응에서 형성된다¹⁴⁸⁾. 북¹²¹⁾과 최

와 지⁹⁹⁾는 청국장 향기의 주성분을 alkylpyrazine류라고 보고하였으며 최 등¹⁰⁰⁾도 pyrazine류가 청국장의 좋은 방향에 기여한다고 하였다. 본 실험에서도 확인된 성분 중 2,5-dimethylpyrazine이 비교적 높은 함량으로 검출되었으므로 이 성분이 청국장의 냄새에 기여하는 주요 성분의 일종이라고 판단된다.

Table 3-6은 청국장과 비교해 감마선 조사 청국장에서 새롭게 검출된 향기성분을 관능기 별로 나타낸 결과이며, Table 3-7는 청국장과 감마선 조사 청국장에서 검출된 향기성분중 관능적인 특성이 밝혀진 화합물을 나타낸 것이다. 감마선을 1 kGy 조사한 청국장에서는 2-propanone, ethylacetate, methylbenzene, 2-methylbutanal 3-methylbutanal, 2,5-dimethylpyrazine, 2-methyl-1-butanol, 2-butenal 순으로 비교 농도가 다른 향기성분보다 높았으며, 이들은 비조사 청국장에서 주요 성분으로 확인되었던 화합물들이었다. 한편 5-methyl-2-hexanone, Thiophene-dl, 2,6-dimethyl-4-heptanol이 새롭게 검출되었으며 총 35종의 성분이 확인되었다. 비조사 청국장에 비하여 함량이 크게 증가한 성분은 2-propanone, ethylacetate, ethyl-3-methyl-butanoate등으로 12배이상 증가한 것으로 나타났다. 1 kGy 조사구의 휘발 성분중에서 새로 생긴 성분들의 relative abundance가 아주 낮았으며 비조사 청국장의 주요 성분들이 여전히 중심이 되고 있으므로 1 kGy 조사구의 향기특성은 비조사구와 비슷한 것으로 보인다.

5 kGy 조사 청국장에서는 2-propanone, 3-methyl-2-butanone, 2-butanone, 2-methyl-1-butanol 등의 비교농도가 높게 나타났으며, 2-butanone, dimethylpropandioic acid, 3-(methylthio)-1-propene, S-propylpentanethioate, hexyl-2-butenate와 tricyclo(4,2,0,2,4)oct-7en-5-on이 새롭게 동정되었다. 새로 확인된 성분중 2-butanone은 아세톤과 비슷한 대두의 off-flavor 특성을 가졌으며, hexyl-2-butenate은 바나나, 대두, 콩, 커피 등에 존재한다고 보고되었다¹⁴⁵⁾. 비조사 청국장에 비하여 5 kGy 조사구에서 함량이 증가한 성분은 α -pinene, 3-methyl-1-butanol, 1-hexene, 3,3'-thiobis-1-propene으로 23-5 배 증가하였으며, 다른 성분들은 대부분 비조사 청국장에 비하여 함량이 감소하였으며, 특히 2-methylpropanal을 제외한 aldehyde류는 감소하는 경향이였다.

10 kGy 조사 청국장에서는 동정된 향기성분이 48종으로 전 시료중 가장 많았으며 2-propanone, 3-methyl-2-butanone, 2-butanone, 3-methyl-1-butanol, 3-methylbutanal, 2,5-dimethylpyrazine, methylbenzene, octanal, benzene 순으로 비교농도가 높았다. 10 kGy 조사구에서 새롭게 확인된 성분은 2-methylfuran, 2-methyl-1-pentene, 1-heptene, 4-methoxy-phenol로서 2-methylfuran은 카라멜과 같은 탄 냄새를 내는 특성을 가졌으며 1-heptene은 Jo¹⁶⁷⁾에 의해 방사선 조사시 조사선량에 의존적으로 생성된다고 보고된 휘

발물질이다. 특히 증자대두에서 많은 양이 나타났던 hexanal이 확인되었는데, 유지 산화과정 중 oleic acid의 10-hydroperoxide로부터 유래된 것으로 보인다¹⁵³⁾. 비조사 청국장에 비하여 10 kGy 조사구에서 함량이 증가한 성분은 3-methyl-1-butanol, 2-methyl-3-heptanone, 2-butenal, 2-methyl-1-pentene으로서 165-141배 이상 증가하였다.

20 kGy 조사 청국장에서는 2-methylbutanal의 relative abundance가 가장 높았으며 비조사구에 존재한 양보다 2-methyl-1-pentene이 107배, octanal이 104배, 1,7-dihydro-6H-purin-6-one이 88배, 2-methyl-3-heptanone이 98배, methyl cyclohexane이 60배, 2-propanol이 32배 증가하였다. 40 kGy 조사 청국장에서는 2-propanone, 2-butanone과 2-butanol의 relative abundance가 다른 성분에 비하여 높게 나타났으며, 40 kGy 조사구에서 비조사청국장에 비하여 많이 증가한 향기 성분은 2-methyl-1-pentene, 2-methyl-3-heptanone, octanal, 1,7-dihydro-6H-purin-6-one으로서 27-37배 증가하였다. King¹⁵⁴⁾ 등에 의하면 대구에 65 kGy 조사 시 비조사구의 향기성분인 acetaldehyde, acetone, butene, diethylether, dimethyldisulfide, dimethylsulfide, toluene과 13 kGy에서 확인된 benzene, n-butane, 2-butane thiol, carbon disulfide, 2,3-dithiohexane 등의 향기성분과 함께 추가로 ethanal, 2-methylpropanal, butanal, butanone, methanol, methyl mercaptan이 확인되었다.

80 kGy 조사구에서는 2-butanone, methylbenzene, 2,3-butanedione 순으로 비교농도가 높았으며, 2,3-butanedione, tetrahydro-3-methyl-furan, 3-methyl-1-pentanol, 1-octene, 2,4-dimethylheptane이 새롭게 확인되었다. 그 중 2,3-butanedione은 희석하면 버터와 같은 강한 냄새를 내고, 농축되면 chlorine quinone과 같은 냄새를 내는 특성이 있으며 3-methyl-1-pentanol은 과일냄새(fruity, green)가 나면서 얼얼한 냄새를 낸다고 한다. 80 kGy 조사구에서 비조사청국장에 비하여 다른 성분보다 많이 증가한 향기 성분은 2-methyl-3-heptanone (45배), thiophene-d1 (26배), octanal (26배), 1,7-dihydro-6H-purin-6-one (25배)로 나타났다.

120 kGy 조사구에서는 2-propanone, 2-butanone, 2-butanol, methylbenzene, 3-methylbutanal, 2-propanol, 2,3-butanediene 순으로 비교농도가 높았으며 120 kGy 조사구에서 비조사청국장에 비하여 다른 성분보다 많이 증가한 향기 성분은 2-butanone 76배, 2-methyl-1-propanol 26배, 2-methylpropanal 11배, methyl cyclohexane 11배로 나타났다.

이상 1 kGy에서 120 kGy까지 조사한 청국장에서 확인된 향기성분 중 모든 시료구에서 나온 성분은 2-methylfuran, 1-heptene, 3-(methylthio)-1-propene, 5-methyl-2(5H)-furanone, di-thiophene이었으나 조사선량과는 관계가 없었다.

Table 3-8는 감마선 조사 청국장에서 존재하는 것으로 나타난 휘발성분중 Jo¹⁶⁷⁾의 아미노산과 oil emulsion을 조합한 실험에서 검출된 성분을 기준으로 하여 지질과 단백질의 분해산물로 구분한 것이다. 2-propanone 과 1-hepten은 단백질과 지질분해산물이 결합하여 나타난 것으로 볼 수 있다. 감마선 조사 시 탄수화물로부터 산이나 환원당이 생성되며 지질에서는 산소가 없을 때는 수소가스, 메탄, 알칸, 탄산이 발생되며 산소 존재 시에는 hydroperoxide, peroxide, aldehyde와 ketones, 절단된 저분자물의 산화물이 생성되는 것으로 보고되고 있다¹⁴⁹⁾. 살균선량이상의 고선량으로 조사 시 단백질의 변성, 향미의 변화, 암모니아, 유효화합물, 이산화탄소가 방출되고, 탈아미노 반응이 일어난다¹⁴⁹⁾. 식품에 방사선 조사 시 생기는 이취는 지방산화에 관련된 것이며⁷⁴⁾ Merritt^{59, 166)}는 조사가 단백질, 지방 분자에 영향을 주고 이것이 이취를 생기게 한다고 하였으나 어떤 휘발성분이 조사 고기의 이취에 책임이 있는지 그리고 휘발성분이 어떻게 생기는지 아직 명확하지 않다¹⁵⁰⁾. Chen 등⁷⁴⁾은 조사된 고기의 지질산화의 시작은 hydroxyl radical이며 radical과 여러 반응산소종이 lipid와 반응하여 lipid hydroxides를 형성하고, 이러한 hydroperoxides의 분해가 volatiles을 형성하여 고기의 냄새에 기여한다고 하였다. Jo 등¹⁵¹⁾은 돼지 소시지에 4.5 kGy를 조사하면 조사와 지방함량에 따라 지방산화, 색, 휘발성분이 유의한 영향을 받는다고 하였다. 한편 Ahn과 Olson¹⁵²⁾은 10 kGy로 조사한 고기의 이취에 주로 기여하는 것은 지방산화가 아니라 함황아미노산의 방사선 조사 분해에 기인하는 것이라 하였으며, 포장지의 산소투과 여부가 조사나 fat 함량보다 더 큰 영향을 준다고 하였다. 본 실험에서도 1 및 5 kGy 감마선 조사구에서 thiophene-dl, S-propylpentanethioate, 3-(methylthio)-1-propene 등의 함황화합물이 확인되었으므로 비교적 저선량에서 lipolysis로 인한 탄화수소류의 생성과 함께 아미노산 분해로 인한 함황화합물이 생성된 것으로 보인다. Maillard 반응의 Strecker 분해과정으로 생성되는 aldehyde의 향기성분은 반응개시 시기에 작용한 아미노산 종류에 따라 달라지는데 glycine은 formaldehyde를 alanine은 acetaldehyde를 phenylalanine에서는 benzaldehyde가 생성되었다¹⁶¹⁾. Maillard 반응 생성물과 지질과의 반응에서 생성된 향기성분은 지질이 매개체로 작용하는 지방산의 종류에 따라서 다양하게 나타났다고 보고되었다. Whitfield¹⁶¹⁾는 oleic acid에 의해 주로 생성되는 향기성분은 octanal과 nonanal이고, linoleic acid에 의하여서는 주로 hexanal, decenal 그리고 2, 4-decadienal이 생성되었으며 linolenic acid에서는 pentenal, heptenal, 2, 4-heptadienal 등이 생성되어졌으며 arachidonic acid가 반응하였을 때는 hexanal과 2, 4-decadienal 등이 생성되었다고 보고하였다.

청국장의 향기성분을 조사선량별로 분석했을 때 비조사청국장에서 나타나지 않았던 향기성분들의 수가 조사선량과 비례하여 증가하였고 더불어 hydrocarbon 화합물의 수도

증가하는 경향을 보였다. 120 kGy 조사 청국장에서는 특히 hydrocarbon 성분이 80 kGy에서 보다 2배로 증가하였다. 이들 향기성분들의 함량차가 감마선 조사 청국장의 각각 다른 향미를 내는 요인이라고 생각된다.

하¹⁵⁵등은 볶은 헤바라기씨의 기름을 dynamic headspace법으로 분석 시 pentane, 2-propanone, hexane, butanal, 3-methyl pentene, 2-methyl butanal의 relative abundance가 높았으며 2-propanone, 2-butanone, 2-methyl butanal, hexanal, alpha-pinene, 2,5-dimethyl pyrazine 성분이 검출되었다고 보고하였는데, 이 성분들은 감마선 조사 청국장의 휘발성분으로 검출된 화합물이었다. 이는 감마선 조사에 의해 지질산화가 촉진되어 조사에 의해 생성되는 휘발성분과 가열에 의해 생성되는 휘발성분이 크게 다르지 않다는 것을 보여주는 결과이었다. 사실상 현재까지 고선량 조사된 식품에서 발견된 모든 방사선 조사 분해산물은 자연적으로 식품에 존재하거나 가열처리 식품에서 볼 수 있으며, 방사선조사에 일어나는 반응은 가공조건에 크게 의존하는 것으로 보고되고 있다. 저장기간의 경과에 따른 풍미의 감소는 포장재료의 선택에 좌우되므로 조사시 청국장의 포장재료의 선택이 충분히 고려되어야 한다. 단백질, 단백질-탄수화물 상호작용산물이 선량증가와 함께 항산화 효과를 발휘하여 방사선에 의해 유도되는 산화변화에 대해 지방산화를 억제하나 감마선 조사를 고선량으로 한 경우 2,3-butanedione(쏘는 냄새), 2-butanone(아세톤과 유사한 냄새), 3-methylpentanol(매운 냄새), 2-methylfuran(탄 냄새)과 methyl-2-methylbutanoate(얼얼한 냄새) 등의 화합물이 동시에 존재하였다. 5kGy 이상의 조사시 검출된 3-(methylthio)-1-propene, 20kGy 이상 조사시 검출된 5-methyl-2(5H)-furanone과 80kGy 이하의 조사시 검출된 thiophene-di의 농도는 조사선량 의존성을 나타내지 않았다.

이상의 결과를 종합하면 청국장에 감마선을 적용시 조사 선량이 커짐에 따라 지방의 자동산화 촉진과 단백질이나 지방성분의 분해와 중합으로 휘발성분에 변화가 생겨 hydrocarbon, ketone, heterocyclic과 thiol 화합물 등이 새롭게 검출됨에 따라 독특한 냄새를 형성하나 20kGy 이하의 적정 살균 선량 조사로는 청국장의 풍미에 큰 영향을 주지 않는다고 볼 수 있다.

Table 3-5. Some important changes in the relative abundance of volatile compounds of cooked soybean during fermentation of *chungkukjang*.

Peak No.	Volatile compounds	Cooked soybean	<i>chungkukjang</i>	Characteristic odor
1	2-propanone	575.191	0.428	Pungent sweet taste, light ethereal, nauseating
26	3-hydroxy-2-butanone	—	0.013	Pleasant, butter-like odor and flavor
2	2-propanol	—	0.016	Alcoholic, somewhat unpleasant odor, burning taste
29	3-methyl-1-butanol	0.678	0.017	Fruity, unpleasently irritating
30	2-methyl-1-butanol	29.355	0.022	Sweet, valeric
3	2-methylpropanal	—	0.014	Apple aroma, Pleasantly fruity, pungent
11	2-butenal	—	0.036	Almond odors
20	3-methylbutanal	8.413	0.083	Powerful, penetrating acrid odor
21	2-methylbutanal	0.800	0.052	When diluted, pleasant fruity-fermented odor(roasted cocoa odor)
40	hexanal	0.577	0.011	Green, Unripe apples, fatty, beany
62	benzaldehyde	—	0.016	Smokey, wood bark, almond
67	octanal	—	0.012	Pungent, sweet, caramel like, burnt
57	2,5-dimethylpyrazine	—	0.058	Nutty, roasted, smoked peanut
66	2-pentylfuran	1.157	0.014	Off-flavor in soybean (fruity odor, green bean, metallic, vegetable)
15	ethylacetate	—	0.037	Fruity, pineapple aroma, brandy-like
55	pentanoic acid	—	0.007	Sour-caramellic taste sweet after taste
56	2-methyl-butanoic acid	0.290	0.014	Pungent, acrid odor, reminiscent of cheese, acrid-acid odor
22	benzene	0.871	—	Grassy
68	alpha-pinene	0.386	0.002	Pine:terpentine-like;oxidized material
64	4-methylthiazole	0.555	0.013	Nutty, green odor

'-': not detect

Relative abundance = Peak area of volatile compounds / Peak area of internal standard(n-heptane).

Table 3-6. Volatile compounds identified from irradiated *chungkukjang*

Peak No.	Volatile compounds	Peak No.	Volatile compounds
Ketones		Acids	
9	2,3-butanedione	39	dimethylpropandioic acid
12	2-butanone	<u>Number of compounds detected 1</u>	
51	5-methyl-2-hexanone	Hydrocarbons	
53	4-hydroxy-2,5-dimethyl-3-hexanone	Alkanes	
63	5-methyl-3-heptanone	42	2,4-dimethyl-heptane
71	Tricyclo(4,2,0,2,4)oct-7en-5-one	58	4,4-dimethyl-undecane
<u>Number of compounds detected 6</u>		Cycloalkanes	
Alcohols		24	1,2-dimethyl-cyclopentane
18	3-methyl-1-pentanol	Alkenes	
41	tetrahydro-2H-pyran-2-ol	8	2,3-butanediene
60	2,6-dimethyl-4-heptanol	16	2-methyl-1-pentene
75	2-dodecen-1-ol	23	1-heptene
<u>Number of compounds detected 4</u>		38	1-octene
Heterocyclic compounds		43	3-ethyl-2-methyl-2-pentene
7	tetrahydro-3-methyl-furan	Alkynes	
14	2-methylfuran	65	4-octyne
46	5-methyl-2(5H)-Furanone	<u>Number of compounds detected 9</u>	
<u>Number of compounds detected 3</u>		Others	
Esters		27	(2-methylpropyl)hydrazine
33	ethylbutanoate	37	1-ethoxy-propane
45	S-propylpentanethioate	49	di-1-propenyl-sulfide
61	hexyl-2-butenate	74	4-methoxy-phenol
<u>Number of compounds detected 3</u>		<u>Number of compounds detected 4</u>	
Thiol compounds			
25	3-(methylthio)-1-propene		
59	thiophene-di		
<u>Number of compounds detected 2</u>			

Table 3-7. Characteristic volatile compounds of soybean, cooked soybean and irradiated *chungkukjang*.

peak No.	compounds	Characteristic odor	sample*				High concentration
			S	CS	C	IC	
Ketones							
1	2-Propanone	Pungent sweet taste, light ethereal, nauseating	o	o	o	o	CS
9	2,3-Butanedione	Penetrating, very strong odor				o	80 kGy
12	2-Butanone	Off-flavor in soybean				o	10 kGy
		acetone-like, smoked peanut					
26	3-Hydroxy-2-butanone	Pleasant, butter-like odor and flavor			o	o	10 kGy
Alcohols							
2	2-Propanol	Alcoholic, somewhat unpleasant odor, burning taste	o		o	o	10 kGy
5	1-propanol	Fruity, Ripe	o			o	10, 80 kGy
18	3-Methyl-1-pentanol	Fruity, green, slightly pungent odor				o	
29	3-Methyl-1-butanol	fruity, unpleasantly irritating	o	o	o	o	10 kGy
30	2-Methyl-1-butanol	Sweet, valeric	o	o	o	o	CS
Aldehydes							
3	2-Methylpropanal	Apple aroma, Pleasantly fruity, pungent	o		o	o	10 kGy
11	2-butenal	Almond odors	o		o	o	
20	3-Methylbutanal	Powerful, penetrating acrid odor	o	o	o	o	CS
21	2-Methylbutanal	When diluted, pleasant fruity-fermented odor(roasted cocoa, coffee odor)	o	o	o	o	20 kGy
40	Hexanal	Green, Unripe apples, fatty, beany	o	o	o	o	CS
62	Benzaldehyde	Smokey, wood bark, almond			o	o	10 kGy
67	Octanal	Pungent, sweet, caramel like, burnt	o		o	o	20 kGy
Heterocyclics							
14	2-Methylfuran	Furan derivatives, caramel like, burnt				o	80 kGy
57	2,5-Dimethylpyrazine	Nutty, roasted, smoked peanut			o	o	10 kGy
66	2-Pentylfuran	Off-flavor in soybean	o	o	o	o	CS
		Fruity odor, green bean, metallic, vegetable					
Esters							
15	Ethylacetate	Fruity, pineapple aroma, brandy-like	o		o	o	10 kGy
35	Methyl-2-Methylbutanoate	Pungent, fruity odor				o	10 kGy
Acids							
55	Pentanoic acid	Sour-caramellic taste sweet after taste			o	o	80 kGy
56	2-Methyl butanoic acid	pungent, acrid odor, reminiscent of cheese, acrid-acid odor	o	o	o	o	10 kGy
Hydrocarbon							
22	Benzene	grassy			o	o	10 kGy
68	alpha-pinene	pine:terpentine-like:oxidized material	o	o	o	o	10 kGy
Others							
64	4-Methylthiazole	Nutty, green odor	o	o	o	o	CS

sample*:

S: soybean

CS: cooked soybean

C: *chungkukjang*

IC: irradiated *chungkukjang*

Table 3-8. Volatile compounds in irradiated oil emulsion containing amino acids and irradiated *chungkukjang*.

Peak No.	Volatile compounds	Lipid	Protein
Ketones			
1	2-propanone	o	o
Aldehydes			
3	2-methylpropanal		o
20	3-methylbutanal		o
21	2-methylbutanal		o
40	Hexanal	o	
62	Benzaldehyde		o
67	Octanal	o	
76	Nonanal	o	
Alkenes			
23	1-heptene	o	o

요 약

청국장에 고에너지 조사를 하였을 때 일어나는 성분 변화와 관능적 품질 변화를 측정 한 거 로가 를 요약 하면 다음과 같다.

1. 시중에서 판매 중이 청국장에 Co^{60} 의 감마선을 0-120kGy의 선량으로 조사한 후 일반성 분은 조사량이 증가하여도 변화가 없는 것으로 나타났으며 pH는 조사구와 비조사구간에 차 이가 없었으나, 산도는 조사구가 비조사구에 비하여 감소하는 경향을 보였다. 청국장의 지방 산 조성은 콩이나 증자 콩과 유사하게 12종이 확인되었다. 청국장의 주요 지방산 양은 콩이 나 증자콩에 비해 oleic acid와 palmitic acid는 적고, linoleic acid와 linolenic acid는 더 많은 것으로 나타났다. 감마선 조사 청국장의 지방산 조성은 1, 5, 10, 20 kGy 조사구는 비조사구 와 크게 다르지 않았으나 40 kGy 이상의 조사 청국장의 경우에는 linoleic acid와 linolenic acid가 감소하였다. 감마선 조사 청국장을 관능검사한 결과 비조사구에 비하여 갈색도 ($p < 0.05$), 발효취 ($p < 0.01$), 생선 냄새 ($p < 0.001$), 이취 ($p < 0.001$), 수용성 ($p < 0.001$) 항목이 유의적 차이를 보여 감마선 조사 선량이 커질수록 비조사구와 색이나 냄새에서 차이가 있는 것으로 나타났다. 안전성을 고려하여 1, 5, 10 kGy 조사구를 대상으로 실시한 맛 관능검사 의 결과는 비조사구와 비슷한 수준이었다.

2. 청국장을 감마선 조사하였을 때 생성되는 향기성분을 분석하기 위하여 purge & trap 장 치를 이용하여 휘발성 성분을 추출하고, GC/MSD로 분석 동정된 향기화합물을 비교농도로 나타내었다. 대두, 증자 대두와 청국장에서는 총 46피크의 휘발성분이 동정되었는데, 대두는 27종, 증자 대두에는 23종, 청국장에는 43종의 향기성분들이 분리되었다. 대두에서는 2-butenal, 2-propanone과 2-butanol 등이 높은 함량을 나타내었고, 증자 대두에서는 2-propanone, 2-methyl-1-butanol과 3-methyl-2-pentanone의 함량이 높게 나타났다. 청국 장에서는 2-propanone, 3-methylbutanal, 3-methyl-2-butanone, 2,5-dimethylpyrazine등의 비교 농도가 높았으며, 2,5-dimethylpyrazine, benzaldehyde, 3-hydroxy-2-butanone, pentanoic acid를 비롯한 14성분이 새롭게 확인되었다. 감마선 1kGy 조사구는 2-propanone, ethylacetate와 methylbenzene, 5, 10 kGy 조사구는 2-propanone, 3-methyl-2-butanone과 2-butanone, 20 kGy 조사구는 2-methylbutanal, 2-propanone과 3-methylbutanal, 40, 120kGy 조사구는 2-propanone, 2-butanone과 2-butanol, 80kGy 조사구는 2-butanone, methylbenzene과 2,3-butanedione이 relative abundance가 높아 해당 시료에 가장 많은 양 이 존재하는 향기성분으로 나타났다. 감마선 조사된 청국장에서 동정된 향기성분중 비조사 구와 비교하여 새롭게 나타난 성분은 32종이었다. 이를 관능기별로 살펴보면 hydrocarbon 8

종, acids 1종, alcohols 4종, esters 3종 ketones 6종, heterocyclic compounds 3종, thiol compound 2종, cycloalkane 1종, 기타 4종이었다. 이상의 향기성분 분석 결과를 종합해볼 때, 청국장 주 향기성분은 방사선 조사를 하였을 때 2-propanone, 3-methylbutanal, 3-methyl-2-butanone, 2,5-dimethylpyridine 등의 성분이 그대로 존재하나, 방사선 조사 선량이 커질수록 지질산화가 촉진되어 hexanal, octanal, nonanal 등의 지질산화물과 hydrocarbon이 많은 종류가 생성되고, 지질 분해물과 단백질 분해물이 결합하여 heterocyclic, thiol과 thiazole 화합물을 비롯한 다양한 성분들이 생성되면서 독특한 방사선 조사 냄새를 형성한다고 할 수 있다.

참 고 문 헌

1. Joo, H. K. : Studies on the manufacturing Chungkukjang. *Korean. J. Food Sci. Technol.*, 3(2), 64-67, 1971
2. 김경자, 유명기, 김상순 : 벗짚을 이용한 청국장 제조에 관한 연구. *한국식품과학회지*, 14(4), 301-308, 1982
3. 김상순 : 한국 전통 식품의 과학적 고찰, 수학사, 1985
4. 서정숙, 이영남 : 균주를 달리한 청국장 제조에 관한 연구. *Annual Bulletin of Seoul College of Health Junior College*, 3, 13-22, 1983
5. 이진하 : 기능성 청국장 제조법. Poster C마49-3
6. Sung, N. J., Ji, Y. A. and Chung, S. Y.: Changes in nitrogenous compounds of soybean during *Chungkukjang* koji fermentation, *J. Korean Soc., Food Nuty.*, 13, 275-284, 1984
7. 박계인 : 청국장 매주 발효과정 중 질소 화합물의 소장에 관한 연구(I). *한국농화학회지*, 15(2), 93-109, 1972
8. Choe, J. S., Yoo, S. M., Kim, H. R., Kim, J. S. and Chang, C. M. : Volatile compounds of *Chonggugjang* prepared by different fermentation methods and soybean cultivars, *Hanguk Nongwhahak Hoechi*, 42(2), 111-115, 1999
9. 이현자, 서정숙 : 균주를 달리한 청국장의 제조에 관한 연구(I). *한국영양학회지*, 14(2), 97-84, 1981
10. 서정숙, 이상건, 유명기 : 균주를 달리한 청국장의 제조에 관한 연구(II). *한국식품과학회지*, 14(4), 309-314, 1982
11. Suh, J. S., Ryu, M. K. and Hur, Y. H. : Effect of *Bacillus* strains on the *Chungkookjang* processing(III). *Korean J. Food Sci. Technol.*, 15(4), 385-391, 1983
12. 이숙희, 김선기, 최홍식 : 한국 장류 식품의 유지성분에 관한 연구. *한국식품과학회지*, 15(4), 399-403, 1983
13. Lee, B. Y., Kim, D. M. and Kim, K. H. : Physico-chemical properties of viscous substance extracted from *Chungkookjang*. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 23(5), 599-604, 1991
14. 이옥숙, 홍대광, 구민선, 신동빈, 정진섭 : 즉석 청국장찌개의 저장 중 품질 특성 변화,

- Korean J. Food Sci. Technol.*, **26**(3), 250-254, 1994
15. Kim, Y. T., Kim, W. K. and Oh, H. I. : Screening and identification of the fibrinolytic bacterial strain from *Chngkookjang*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 1-5, 1995
 16. Kim, W. K., Choi, K. H., Kim, Y. T., Park, H. H., Choi, J. Y., Lee, Y. S., Oh, H. I., Kwon, I. B. and Lee, S. Y. : Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK 11-4 screened from *Chungkookjang*. *Appl. & Envir. Microbiol.*, **62**, 2482-2488, 1996
 17. 조한옥 : 방사선조사에 의한 식품저장의 산업화 필요성과 위생적 효과. *한국식품위생안전성학회지*, **1**(1), 107-112, 1986
 18. Lee, C. H. : Acceptance and Trading on Irradiated Foods. Korea University Press, 1998
 19. WHO, IAEA, FAO : 식품조사에 관한 실상. 그린피아(주), pp. 1-42, 1994
 20. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization, Food Irradiation : A Technique for Preserving and Improving the Safety of Food. World Health Organization, Geneva, pp. 1-61, 1988
 21. Polister, B. H. and Mead, J. F. : Effect of certain vitamins and antioxidants on irradiation-induced autoxidation of methyl linoleate. *J. Agric. Food Chem.*, **2**, 199, 1954
 22. Lavinge, J. B. : *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **35**, 117, 1958
 23. Chipault, J. R., Prevett, O. S., Mizuno, G. R., Nichell, E. C and Lundberg, W. O. : Effects of Ionizing Radiations on Fatty Acid Esters. *Ind. Eng. Chem.*, **49**(10), 1713-1720, 1957
 24. Chipault, J. R. and Mizuno, G. R. : Effect of ionizing radiations on Fat. II Accumulation of peroxides and other chemical changes. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **41**, 468, 1964
 25. Chipault, J. R. and Mizuno, G. R. : *J. Agric. Food Chem.*, **14**, 221, 1966
 26. Chipault, J. R. and Mizuno, G. R. : Effects of ionizing radiations on stability of fats. *J. Agric. Food Chem.*, **14**, 225, 1966
 27. Merritt, C., Jr., Forss, D. A., Angelini, P. and Bazinet, M. L. : Volatile compounds produced by irradiation of butterfat. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **44**, 144-146, 1967

28. Dubravic, M. F. and Nawar, W. W. : Radiolysis of lipids : Mode of cleavage in simple triglycerides. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **45**, 656, 1968
29. Kavalam, J. P. and Nawar, W. W. : Effects of Ionizing Radiations on Some vegetable Fats. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **46**(7-12), 387-390, 1969
30. 木下商策, 加藤智雄 : 米糖に對する放射線照射の景響. 食品照射, 2(1), 118-125, 1967
31. Han, D. B., Suck, H. G. and Yoo, Y. J. : Effects of ^{60}Co -gamma Radiation on Ricebran Oil. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **5**(2), 129- 135, 1973
32. Yim, K. Y. and Ahn, M. S. : Changes of the Physico-chemical Characteristics of oils treated by the γ -ray irradiation(I)-The Extracted soybean oil. *대한가정학회지*, **30**(4), 77-88, 1992
33. 변명우, 육홍선, 권중호, 김정옥 : 감마선 조사에 의한 건고추의 위생화와 장기 안전저장. *한국식품과학회지*, **28**(3), 482-489, 1996
34. 육홍선, 김성애, 변명우, 권중호 : 감마선 조사를 이용한 홍삼분말의 오염미생물 제거. *한국식품과학회지*, **28**(2), 366-370, 1996
35. Byun, M. W., Kwon, J. H. and Cho, H. O. : Sterilization and Storage of Spices by Irradiation I. Sterilization of Powdered Hot Pepper Paste. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **15**(4), 359-369, 1983
36. 권중호, 변명우, 이수정 : 살균 및 저장조건을 달리한 백삼분말의 색 특성. *Korean J. Ginseng Sci.*, **18**(2), 128-133, 1994
37. Lee, K. B. and Kim, J. H. : Studies on radiation preservation of fermented Korean rice-wine(Tak Joo and Yak Joo). *Kor. Jour. Microbiol.* **7**, 45-56, 1969
38. Hur, Y. H., Lee, S. G. and Suh. J. S. : Studies on the changes in Components of γ -irradiated Soybean during Fermentation. *Annual Bulletin of Seoul Health Junior College.*, **5**, 19-31, 1985
39. Suh, J. S. and Hur, Y. H. : Studies on the change in amino acid of γ -irradiated Soybean during Fermentation. *Annual Bulletin of Seoul Health Junior College.*, **7**, 7-14, 1987
40. Cho, Y. J., Kim, J. K., Cha, W. S., Park, J. H., Oh, S. L., Byun, M. W., Chun, S. S. and, Kim, S. H. : Changes of Physical Properties and Extraction of Sesame Mael protein by Gamma Irradiation. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **31**(4), 924-930, 1999
41. Yook, H. S., Lee, J. W., Lee, K. H., Kim, D. J., Shin, H. K. and Byun, M. W. :

- Effect of Gamma Irradiation on the Improvement of Beef Tenderness. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **31**(4), 1005-1010, 1999
42. Kim, J. H., Lee, K. H., Ahn, H. J., Cha, B. S. and Byun, M. W. : Effects of Gamma Irradiation on Microbiological and Sensory Qualities in Processing of Low Salted and Fermented squid. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **31**(4), 1050-1056, 1999
 43. Kwon, J. H., Lee, J. E., Jeong, S. W. and Choi, K. J. : Comparative Effects of Gamma Irradiation and Phosphine Fumigation on Lipid-Related Components of White Ginseng During Post-Treatment Period. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **31**(6), 1447-1452, 1999
 44. Cho, Y. S. and Song, K. B. : Effect of γ -irradiation on the Physicochemical Properties of Soy Protein Isolate and Whey Protein Concentrate. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **31**(6), 1488-1494, 1999
 45. Choi, C. R. and Hwang, K. T. : Detection of hydrocarbons in irradiated and roasted sesame seeds. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **74**, 469-473, 1997
 46. 황금택, 박준영, 김충기 : 수입 육류 및 어류의 방사선 조사 여부 판별을 위한 marker로 검출되는 hydrocarbon 의 활용. *한국식품영양과학회지*, **26**, 1109-1115, 1997
 47. 황금택, 박준영, 권용주 : 방사선 조사한 대두에서 검출되는 hydrocarbon류. *한국식품과학회지*, **30**, 517-522, 1998
 48. 황금택, 박준영: 라면 건조 스프 재료의 방사선 조사 검지를 위한 hydrocarbon류 검출. *한국식품과학회지*, **30**(5), 1018-1023, 1998
 49. Kim, E. A., Lee, H. J., Yang, J. S. and Kim, K. S. : Quantitative Analysis of Radiation-induced Hydrocarbons in Irradiated Chicken at Various Dose Levels. *J. Food Sci. Nutr.*, **3**(4), 339-343, 1998
 50. 권중호, 김광수 : 식품의 저장 및 품질 개선을 위한 감마선 에너지의 이용과 실용화 전망. *식품과 영양*, 37-48, 1996.
 51. 윤승기 : 식품조사처리에 관하여. *식품공업*, 45-55, 1993
 52. 이무하 : 전자선을 이용한 신선근육식품의 저수준 방사선 조사. *식품과학과산업*, **28**, 12-22, 1995
 53. 배무, 이영록 : 최신미생물학, 아카데미서적, 1994
 54. 허준 : 방사선생물학, 신광출판사, 1979.
 55. Josephson, E. S. and Peterson, M. S. : Preservation of Food by Ionizing Radiation.

Vol. II, CRC Press, Florida, 1982

56. Hammer, C. T. and Wills, E. D. : The effect of ionising radiation on the fatty acid composition of natural fats and oil lipid peroxide formation. *International J. of Radiation Biology*, 35(4), 323-332, 1979
57. Wills, E. D. : Studies of lipid peroxide formation in irradiation of synthetic diets and the effects of storage after irradiation. *International J. of Radiation Biology*, 37(4), 383-401, 1981
58. Elias, P. S., Cohen, A. J. Radiation chemistry of major food components. Elsevier Scientific Publishing Company Amsterdam-Oxford-New York
59. Merritt, C. Jr. : Radiolysis compounds in bacon and chicken, USDA Report PB 187084-187095, 1985
60. Fiszer, W., Zabielski, J. and Mroz, J. : Radurization of poultry meat. Proceedings of the European Meeting of Meat Research Workers I (26) E-22, 248-251, 1980
61. de-Groot, A. P., van der Mijll, L. P., Mekk, P. S., Vos, H. J. and Willems, J. J. L. : "Consumption and nutritive value of radiation-pasteurized chicken." Central Institute for Nutrition and Food Research, The Netherlands. Report No. R-3787, 1972
62. de-Groot, A. P. : Information relating to the wholesomeness of irradiated food, IV. *Chicken Food Irradiation Information*. 5, 85-86, 1975
63. 변명우, 권중호, 조한옥, 이미경, 김종균 : 감마선 조사에 의한 닭고기의 이화학적 특성변화, *한국식품과학회지*, 17(3), 186-191, 1985
64. Ronning D. C., Christopher, J. P., Cuca, G. C., Dahltren, R. R., Israelson, E. L., Lepp, R. S., Miranti, R. A., Monti, K. L., Perlain, L. A., Reutzel, L. F. and Thomson, G. M. : Hamster, mouse, rabbit and rat teratology studies of irradiation sterilized chicken products. USDA 53-3K06-1-29 : ERRC-ARS 65-69, 1982
65. Wierbicki, E. : Technological and irradiation conditions for radappertization of chicken products used in the United States Army Raltech toxicology study. IAEA-SM-271/73, 73-79, 1985
66. Hannan, R. S. and Shepherd, H. J. : An after-effect in butter-fat irradiated with high-energy electrons, *Nature(London)*, 170, 1021, 1954
67. Greene, B. E. and Watts, B. M. : Lipid oxidation in irradiated cooked beef. *Food Technol. (Chicago)*, 20(8), 111, 1966

68. Tipples, K. H. and Norris, F. W. : Some effects of High level gamma-irradiation on the lipids of wheat. *Cereal Chem*, **42**, 437, 1965
69. Mochalina, A. S. and Klimova, T. P. : Radiolysis of unsaturated fatty acids. *Radiobiologiya*, **13**, 430, 1973
70. Luck, H. and Kohn, R. : The effect of ionizing radiations on fats. III. Changes in the physico-chemical properties. *Fette, Seifen, Anstrichm.*, **63**, 812, 1961
71. Newton, A. S. : Note on the helium-ion radiolysis products of liquid acetic and propionic acids. *J. Chem. Phys.*, **26**, 1764, 1957
72. Beke, H., Tobback, P. P. and Maes, E. : Effect of gamma-irradiation on free fatty acids. *Food Sci. Technol.*, **7**, 291, 1974
73. Vajdi, M. : Identification of Radiolytic Compounds from Beef. Ph. D. thesis, University of Massachusetts, Amherst, 1976
74. Drawert, F. and Beck, B. : Gaschromatographisch-massenspektrometrische Untersuchungen von bestrahlten bzw. erhitzten Fetten, Ölen und Modellsubstanzen. II. Kohlenwasserstoffe aus Schweinefett, Kokostett, Sonnenblumenöl, Olivenöl und Linolsäuremethylester, *Z. Lebensm.-Unters. Forsh.*, **155**, 282, 1974
75. Chang, S.S. Peterson, R.J. and Ho, C. T., Chemistry of deep fat fried flavor. In *Lipids as a Source of Flavors*. M.K. Supran Ed. ACS Symp. Ser. 75 Washington DC p.18, 1978
76. Nawar, W.W. Brandly, S.J. Lomanno, S.S. Richardson, G.C. and Whiteman, R.C., Volatile from frying fats, A comparative study, In *Lipids as a Source of Flavors*. M.K. Supran Ed. ACS Symp. Ser. 75 Washington DC p.42, 1978
77. LeTellier, P. R. and Nawar, W. W. : Primary radiolytic fragmentation in tricaproin, *J. Agric. Food Chem.*, **20**, 129-134, 1972
78. Huber, W., Brash, A. and Waly, A. : Effect of processing condition on organoleptic changes in foodstuffs sterilized with high intensity electrons. *Food Technology*, **7**, 109-115, 1953
79. Patterson R. L. S. and Stevenson, M. H. : Irradiation-induced off-odor in chicken and its possible control. *British Poultry Science*, **36**, 425-441, 1995
80. Heath, J. L., Owens, S. L., Tesch, S. and Hannah, K. W.: Effect of processing conditions on organoleptic changes in foodstuffs sterilized with high intensity

- electrons. *Food Technology*, **7**, 109-115, 1990
81. Hashim, I. B., Resurreccion, A. V. A. and MaWatters, K. H. : Disruptive sensory analysis of irradiated frozen or refrigerated chicken. *Journal of Food Science*, **60**(4), 664-666, 1995
 82. Ahn, D. U., Olson, D. G., Jo, C., Chen, X., Wu, C. and Lee, J. I. : Effect of muscle type, packaging, and irradiation on Lipid oxidation, volatile production and color in raw pork patties. *Meat Science*, **49**, 27-39, 1998
 83. Chen, X., Jo, C., Lee, J. I., and Ahn, D. U. : Lipid Oxidation, volatiles and color changes of irradiated pork patties as affected by antioxidants. *Journal of Food Science*, **64**(1), 16-19, 1999
 84. Ahn, D. U., Olson, D. G., Lee, J. I., Jo, C., Chen, X. and Wu, C.: Packaging and irradiation effects on lipid oxidation and volatiles in pork patties. *Journal of Food Science*, **63**(1), 15-19, 1998
 85. Gadbois, D. F., Mendelson, J. M. and Ronsivalli, L. J. : Effect of radiation, heating and storage on volatile carbonyl compounds in clam meats. *Journal of Food Science*, **32**, 511, 1967
 86. Bruaux, P., Bugyaki, L., Claeys, F., Lafontaine, A. and van der stichelen-Rogier, M. : Electro-phorese et immunoelectrophorese des proteines de la viande, 여 poisson et de Ioeuf irradiies. *Atom-praxis*, **16**, 390, 1970
 87. Grunewald, Th. : Untersuchungen uber den Einfluß der Temperatur auf die Bestrahlungsverluste von Cystin und in Lebensmitteln. *Kaltetechnik*, **21**, 336, 1969
 88. Fossum, K. and Underdal, B. : Irradiation of chicken sgg while. I. Effect on proteinase inhibitors. *Acta Vet. Scand.*, **14**, 118, 1973
 89. Grunewald, Th. : Die Bestrahlung von schokolade und Schokoladeprodukten. *Z., Lebensm-Unters. Forsch*, **151**, 13, 1973
 90. Day, E. A., Forss, D. A. and Patton, S. : Flavor and odor defects of gamma-irradiated skimmilk. I. Preliminary observation and the role of volatile carbony compounds. *J. Dairy Sci.*, **40**, 922, 1957
 91. Day, E. A., Forss, D. A. and Patton, S., Flavor and odor defects of gamma-irradiated skmmilk. II. Identification of volatile components by gas chromatography and mass spectrometry. *J. Dairy Sci.*, **40**, 932, 1957

92. Forss, D. A., Angelini, P., Bazinet, M. L. : Volatile compounds produced by copper-catalyzed oxidation of butterfat. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **44**, 141, 1967
93. Cubois, P., Zenz, H., Stehlik, G. and Kaindl, K. : Analuse des constituants volatiles des jus de pommes irradiées, in Food Irradiation. IAEA, STI/PUB/127, Viena, 219, 1966
94. Farkas, J., Beczner, J. and Incze, K. : Feasibility of irradiation of spices with special reference to paprika, in Radiation Preservation of Food. IAEA, STI/PUB/317, Vienna, 389, 1973
95. Vajdi, M., Pereira, R. R. and Gallop, R. A. : How gamma irradiated and ethylene oxide treated spices affect the microbial quality, shelf, life, and flavor of garlic sausage. *Food Prod. Dev.*, **7(7)**, 91, 1973
96. Report of a Joint FAO/IAEA/WHO Study Group, High-dose Irradiation : Wholesomeness of Food Irradiated with Doses Above 10 kGy. WHO. 1999
97. M. Diaa EI-Din H. Farag, : The nutritive value for chicks of full-fat soybeans irradiated at up to 60 kGy. *Animal Feed Science and Technology*, **73**, 319-328, 1998
98. 이서래 : 한국의 발효 식품. 이화여자대학교 출판부, 1992
99. Choi, S. H. and Ji, Y. A. : Changes in Flavor of Choongkookjang During Fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **21(2)**, 229-234, 1989
100. Choi, U. K., Ji, W. D. and Chung, Y. G. : Characteristics of Chunggugjang Produced by *Bacillus subtilis* DC-2. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **27(5)**, 846-851, 1998
101. Sugawara, E., Ito, T., Odagiri, S., Kubota, K. and Kobayashi, A. : Comparison of compositions of Odor Components of Natto and Cooked Soybeans. *Agric. Biol. Chem.*, **49(2)**, 311-317, 1985
102. IAEA : "Training Manual on Food Irradiation Technology and Techniques". Technical Reports Series Second Edition, 114, 43-60, 1982
103. AOAC : "Method of Analysis". 13th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington, D. C., 1980
104. 김종규 : 기체 크로마토그래피의 원리와 실제, 11, 대지출판사, 서울, 1992
105. CEN/CS, CEN/TC 275/WG 8 N 46 : "Food analysis-Horizontal methods-Irradiated foodstuffs". 1995

106. Kim, M. S., Oh, J. A., Kim, I. W., Shin, D. H. and Han, M. S. : Fermentation Properties of Irradiated Kochujang. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **30**(4), 934-940, 1998
107. Cho, H. O., Byun, M. W., Kwon, J. H., Lee, J. W. and Yang, J. S. : Comparison of Ethylene Oxide(E.O.) and Irradiation Treatment on the Sterilization of Spices. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **18**(4), 283-287, 1986
108. Kwon, J. H., Byun, M. W., Cha, B. S., Yang, J. S. and Cho, H. O. : Improvement of Hygienic Quality of Vegetable Mixed Condiments Using Gamma-Irradiation. *Kor. J. Food Hygiene*, **3**(4), 233-239, 1988
109. Cho, H. O., Kwon, J. H., Byun, M. W., Yang, J. S. and Kim, Y. J. : Effects of Ethylene Oxide Fumigation and Gamma Irradiation on the Quality of Dried Agricultural Products. *Kor. J. Food Hygiene*, **1**(2), 133-141, 1986
110. Byun, M. W. : Radurization and Radicidation of Spices. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **17**(4), 311-318, 1985
111. Lee, H. J., Kim, J. O., Yook, H. S. and Byun, M. W. : Physicochemical Properties of Gamma-Irradiated Soybeans. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **28**(3), 558-565, 1996
112. 김진숙, 유선미, 최정숙, 박홍주, 홍선표, 장창문 :전통청국장의 이화학적 특성, *Agricultural Chemistry and Biotechnology*, **41**(5), 377-383, 1998
113. J. F. Diehl: Radiolytic effects in foods, Preservation of Food by Ionizing Radiation. Vol. I, CRC Press, Florida, 1982
114. Katta, S. R., Rao, D. R., Sunki, G. R. and Chawan, C. B. : Effect of gamma irradiation of whole chicken carcasses on bacterial load and fatty acids. *Journal of Food Science*, **56**(2), 371-372, 1991
115. Lien, Y. C. and Nawar, W. W. : Thermal decomposition of tricaproin, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **56**, 76, 1973
116. Hafez, Y. S., Mohamed, A. I., Sin^호, G. and Hewedy, F. M. : Effects of gamma irradiation on proteins and fatty acids of soybean. *Journal of Food science*, **50**(5), 1271-1274, 1985
117. Merritt, C. Jr. : Qualitative and quantitative aspects of trace volatile components in irradiated foods and food substances, *Radiat. Res. Rev.*, **3**, 353, 1972
118. Lesgards, G., Raffi, J., Pouliquen, I., Chaouch, A. A., Ciamarchi, P. and Prost, M.

- :Use of Radiation-Induced Alkanes and Alkenes to Detect Irradiated Food Containing Lipids. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **70**(2), 179-185, 1993
119. Yook, H. S., Kim, M. R., Kim, J. O., Lim, S. I. and Byun, M. W. : Effect of γ -Irradiation on meat, Protein. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **30**(2), 407-412, 1998
120. Lim, S. I., Yook, H. S., Yoon, H. H., Kim, Y. J. and Byun, M. W. : Effects of Gamma Irradiation on Egg White Protein. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **27**(2), 291-295, 1998
121. 복진영 : 청국장 메주 발효과정 중의 화학성분 및 숙성 중 Alkylpyrazine류의 변화, 중앙대, Ph. D., 1994
122. Yasumoto, K., Ueda, M. and Suzuki, T. : Evaluation of γ -irradiation on nutritional quality of protein foods. The Food Irradiation Research Committee, The Japan Radioisotope Association, p. 51, 1992
123. McMurray, C. H., Stewart, E. M., Gray, R., Pearce, J. : Detection Methods for Irradiated foods. The Royal Society of Chemistry, 1994
124. Schreiber, G. A., Schulzki, G., Spiegelberg, A., Helle, N. and Bogl, K.W. : Evaluation of a gas chromatographic method to identify irradiated chicken, pork, and beef by detection of volatile hydrocarbons. *JAOCS International*, **77**, 1202-1217, 1994
125. Spiegelberg, A., Schulzki, G., Helle, N., Bogl, K. W. and Schreiber, G. A. : Methods for routine control of irradiated food : optimization of a method for detection of radiation-induced hydrocarbons and its application to various foods. *Radiat. Phys. Chem*, **43**, 433, 1994
126. Schulzki, G., Spiegelberg, A. and Schreiber, G.A. : On-line coupled LC-LC-GC for irradiation detection in complex lipid matrices. *Food Sci. & Technol. Today*, **8**(2), 113, 1994
127. Sjoberg, A. M., Tuomnen, J. P., Kiütamo, T. and Luukkonen, S. M. : Evaluation of a gas chromatographic method for detection of irradiation of chicken and a chicken meat product. *J. Sci. Food Agric*, **59**, 65, 1992
128. Stevenson, M. H. : Introduction to chemical methods for the identification of irradiated food, Leonardi, M., Raffi, J. J., Belliardo, J. J., Ber(Community Bureau of Reference) Information, ECSC-EEC-EAEC, Brussels · Luxembourg, 1993
129. Nawar, W. W. : Volatiles from food irradiation, *Food Review International*, **2**(1), 45,

1986

130. Morehouse, K. M., Ku, Y., Albrecht, H. L. and Yang, G. C. : Chromatographic and electron spin resonance investigation of gamma-irradiated frog legs. *Radiat. Phys. Chem.*, **38**, 61, 1991
131. Vaj^oף, M. and Nawar, W. W. : Identification of radiolytic compounds from beef. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **56**, 611-615, 1979
132. Schulzki, G., Spiegelberg, A., Bogl, K. W., and Schreiber, G. A. : Detection of radiation-induced hydrocarbons in Camembert irradiated before and after the maturing process-comparison of florisil column chromatography and on-line coupled liquid chromatography-gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 372-376, 1995
133. Bachman, S. and Geiseczynska, J. : Factors Influencing the Economical Application of Food Irradiation. IAEA-PL-581/5, 33, 1973
134. Wetzel, K., Huebner, G. and baer, M. : International Symposium on Food Irradiation Processing. IAEA-SM-271/16, Washington, D. C., USA, 4-8, March, 1985
135. 변명우, 권중호, 조한옥 : 방사선 조사가 후추가루의 살균에 미치는 영향. 한국식품과학회지, 16(3), 139-141, 1984
136. 손동화 : Bacillus sp. CS-17에 의해 생산된 청국장 특성, Ph. D. 영남대, 1997
137. Kim, G. E., Kim, M. H., Choi, B. D., Kim, T. S. and Lee, J. H. : Flavor compounds of Domestic Meju and Doenjang. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **21**(5), 557-565, 1992
138. Dalal, K. B., Olson, L. E., Yu, M. H. and Salunkhe, D. K. : Gas Chromatography of the field, glass-green house-grown, and artificially ripened tomatoes(*Lycopersicon esculentum* Mill). *Phytochemistry*, **6**, 155, 1967
139. Yu, M. H., Salunkhe, D. K. and Oloson, L. E. : Production of 3-methylbutanol from L-leucine by tomato extract. *Plant Cell Physiol.*, **9**, 633, 1968
140. Yu, M. H., Olson, L. E., and Salunkhe, D. K. : Precursors of volatile compounds in tomato fruit II. Enzymatic production of carbonyl compounds. *Phytochemistry*, **7**, 555, 1968
141. Doi, Y., Tsugita, T., Kunata, T. and Kato, H. : Changes of headspace volatile components of soybeans during roasting. *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 1043, 1980
142. Choi, S. H., Kobayashi, A. and Yamanishi, T. : Odor of cooked small shrimp, *Acetes japonicus* kishinouye. *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 337, 1983

143. Margalith, P. Z. : Flavor Microbiology, Charles C. Thomas, Springfield, 1981
144. 주세경 : 탈지대두박과 분리대두박을 이용한 효소 가수분해물의 휘발성 성분 비교, 석사, 고려대 자연자원대학원, 1999
145. George A. Burdock, Ph.D. : Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients, 3rd edition, CRC Press, 1995
146. Hodge, J. E. : Chemistry of browning reaction in model systems. *J. Agric. Food Chem.*, **20**, 129, 1972
147. Choi, S. H. and Kato. H. : Volatile components of *sergia lucens* and its fermented product. *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 1479, 1984
148. Chang, Y. K., Lee, J. W. and Kim, T. J : A study on quality changes of domestic frying oils by thermal oxidation. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **10**(2), 112, 1978
149. 김병록 : 식품저장학, 진로연구소, 285, 1999
150. WHO : Review of the safety and nutritional adequacy of irradiated food, pp. 9, 1992
151. Jo, C., Lee, J. I. and Ahn, D. U. : Lipid oxidation, color changes and volatiles production in irradiated pork sausage with different fat content and packaging during storage. *Meat Science*, **51**, 355-361, 1999
152. Ahn, D. U., Jo, C. and Olson, D. G. : Analysis of volatile components and sensory characteristics of irradiated raw pork. *Meat Science*. **54**, 209-215, 2000
153. Frankel, E. N., Neff, W. E. and Selke, E. : Analysis of autoxidized fats by gas chromatography-mass spectrometry, VII. Volatile thermal decomposition products of pure hydroperoxides from autoxidized and photosensitized oxidized methyl oleate, linoleate and linolenate. *Lipids*, **16**, 279, 1981
154. King, F. J., Mendelsohn, J. M., Gadbois, D. F. and Bernsteinas, J. B. : Some chemical changes in irradiated sea foods. *Radiat. Res. Rev.*, **3**, 399, 1972
155. Ha, J. H., Hawer, W. D. and Hwang, J. B. : Analysis of the volatile compounds in the oil from roasted sunflower kernel by dynamic headspace method. *Foods and Biotechnology*, **2**(2), 152-153, 1993
156. 이기동, 김정숙, 권중호 : Maillard 반응생성물이 *Bacillus* sp의 생육특성에 미치는 영향, *한국식품과학회지*, **29**(2), 309-313, 1997
157. Yook, H. S., Lee, J. W., Lee, K. H., Kim, S. and Byun, M. W. : Effects of Gamma

- Irradiation on Pigments of Beef. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **30**(5), 1184-1188, 1998
158. Lambert, A. D., Smith, J. P. and Dodds, K. L. : Physical, chemical and sensory changes in irradiated fresh pork packaged in modified atmosphere. *Journal of Food Science*, **57**(6), 1294-1299, 1992
159. Schoebel, T., Tannenbaum, S. K. and Labuza, T. P. : *Journal of Food Science*, **34**, 324, 1969
160. Mattison, M. L., Kraft, D. G., Walker, R. E., Rust, R. E. and James, D. B. : Effect of low dose irradiation of pork loins on the microflora, sensory characteristics and fat stability. *Journal of Food Science*, **51**(2), 284-287, 1986
161. Whitfield, F. B. : Volatiles from Interactions of Maillard Reaction and Lipids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **31**(1/2), 1, 1992
162. Ho, C. T. and Chen, Q. : Lipids in food flavors. Lipid in Food Flavors, *American Chemical Society*, 1-13, 1994
163. Zhang, Y., Ritter, W. J., Barker, C. C., Traci, P. A. and Ho, C. T. : Volatile formation by lipid-mediated Maillard Reaction in model system. Lipid in Food Flavor, *American Chemical Society*, 49-60, 1994
164. Haung, T. C., Bruechert, L. J. and Ho, C. T. : Kinetics of pyrazine formation in amino acid-glucose system. *Journal of Food Science*, **54**(6), 1611-1614, 1989
165. Wong, J. M. and Bernhard R. A. : Effect of nitrogen source on pyrazine formation. *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 123, 1988
166. Merritt, C. Jr., Vajdi, M. and Angelini, P. : A quantitative comparison of the yields of radiolysis products in various meat and their relationship to precursors, *J. Am Oil Chem. Soc.*, **62**, 708-713, 1993
167. Jo, C. : Lipid oxidation and production of off-odor in irradiated meat. Ph. D. Iowa State University, 1999

제 4 장 생체촉매조합에 의한 된장의 향미변화

제 1 절 서설

1. 연구 목적

청국장을 베이스로 한 숙성된장 제조법을 개발하기 위하여 청국장에 세균 및 곰팡이 유래 효소 및 효모를 첨가하여 생체촉매조합에 의한 숙성효과를 시험한다. 생체촉매조합으로 *Aspergillus oryzae*, *Zygosacharomyces rouxii* 및 유산균에서 유래된 효소를 사용하여 청국장의 맛을 순화시키고 전통된장의 숙성기간을 단축시킨다.

2.. 연구배경 및 개요

된장과 청국장은 각종 필수 아미노산이 골고루 함유되어 있어 영양가치가 높은 단백질의 급원으로서 한국인의 중요한 식량자원이다.

지금까지 된장에 대한 연구로는 국내 된장의 성분분석에 관한 연구, 원료 대체에 관한 연구, 향미개선에 대한 연구, 미생물과 효소활성에 관한 연구, 재래식 된장의 맛성분 조성에 관한 연구 등이 보고되고 있다. 이처럼 여러방면에서 된장이 연구되고 있고 미생물을 달리 하여 된장을 제조하고 그 향미성분을 개선하려는 연구는 계속되었지만 재래식 된장의 향미를 재현함과 동시에 그 제조기간을 단축하여 산업화에 이용하는 연구가 제대로 이루어지지 않고 있다.

재래 된장의 독특한 미생물인 세균은 삶은 콩에 쉽게 서식하는 *Bacillus*속의 균들로 이들을 이용하여 2~3일 발효시킨 것이 청국장이다. 청국장은 *Bacillus subtilis*의 강력한 단백질 분해 효소에 의해 분해되므로 전통적으로 숙성된장 제조법으로 이용되어 왔다.

재래식 메주의 표면에 존재하는 곰팡이인 *Aspergillus oryzae*는 탄수화물 분해효소인 amy lase, maltase, glucoamylase, invertase, inulinase, cellulase등을 분비하고 단백질 분해효소로서 pepsin, trypsinereptase등을 생산하는데 작용 최적 pH에 따라 알칼리성, 중성, 산성 protease를 생산하게 된다. 중성 및 알칼리성 protease는 단백질을 peptide까지만 분해하고 직접 아미노산을 유리시키지는 못하고 산성 protease는 단백질을 분해하여 아미노산과 저분자의 peptide를 생산한다. 된장제조에서 *A. oryzae*를 이용하는 것은 기질에 존재하는 단백질, 당류 등을 세포외 분비효소들로 분해하면서 다른 곰팡이의 성장을 막는 것이다.

또한 된장숙성 중 향미생성에 주로 관여하는 미생물인 효모로는 *Zygosaccharomyces rouxi*가 알려져 있다. 효모는 당질 분해효소로 maltase, lactase, melibiase, trehalase, glycogenase 등을 내며 단백질 분해효소로는 protease, peptidase를 내고 그 밖에 esterase나 amidases를 내지만 혐기적 환경에서 발효를 통해 유기산과 알코올을 생성하여 된장의 풍미형성에 관여하게 된다.

효모 세포내에 있는 효소를 적극적으로 이용하기 위해 자기소화법(autolyzate)에 의하여 효소를 추출 분리하는 공법이 사용되고 있다. 효모의 자가소화법은 ethyl acetate, toluene등을 세포에 작용시켜 원형질막에 변화를 일으키고 이때 세포내의 각종 분해효소가 작용을 시작하여 구조단백질이나 지질을 파괴하므로 결합된 효소를 가용화시킬 수 있다.

본 실험에서는 재래식 된장의 세균과 곰팡이 그리고 효모의 복합적인 효소 시스템을 이용하여 그 맛과 향을 재현하고 제조기간의 단축을 위해 청국장을 베이스로 이용하였다.

앞에서 재래식 메주의 내부에 *Bacillus*가 콜고루 분포하며 이것이 된장의 맛에 크게 기여한다고 하였으므로 대두의 신속한 분해를 위해 *Bacillus*에 의한 발효식품인 청국장을 기본 소재로 하고 *Aspergillus oryzae*와 *Zygosaccharomyces rouxii*, yeast autolyzate를 단용 혹은 혼용으로 첨가하여 된장을 제조하였으며 이를 30℃에서 30일간 저장하면서 숙성기간에 따른 품질변화를 조사하고 그 특성을 고찰하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 실험재료

가. 청국장 제조

1) 원료

청국장 제조에 사용된 대두(수분 10.4%, 조단백질 30.9%, 조지방 15%, 회분 7%)는 1998년에 강원도 원주에서 생산된 것을 사용하였으며 정제염 (염도 88% 이상)을 사용하였다.

2) 사용균주

선문대로부터 분양 받은 *Bacillus subtilis*를 주로하는 청국장 제조용 균주를 사용하였다.

3) 종균의 배양

Nutrient broth에 포도당 0.5%를 첨가한 배지 100 ml에 균을 접종하여 37℃에서 24시간 배양하고 원료 대두를 24 시간 물에 담근 후 물을 뺀 다음 50 g씩 달아서 petridish에 넣어 가압살균 (121℃, 20 분)하고 40℃로 냉각시킨 후 배양액 1%를 접종하여 36~37℃의 항온기에서 48 시간 배양한 것을 종균으로 하였다.²⁵⁾

4) 청국장의 담금

대두를 24 시간 물에 담구어 불린 다음 물빼기 후에 petridish에 담아 autoclave에서 20 분간 (121℃)증자한 후 40℃정도로 냉각하고 배양종균을 원료 무게의 약 2%정도로 각각 접종하여 항온기에서 72 시간 발효시켰다.

나. 된장의 제조

1) 원료

위의 방법으로 제조한 청국장에 식염을 8%로 가한 후 chopper를 사용하여 분쇄하였다.

2). 사용균주

가) Fungi

본 실험실에 보관중인 *Aspergillus oryzae* MHK001균주를 potato dextrose agar에서

activation시킨후 증자한 대두에 접종하여 30℃의 항온기에서 2 일간 배양하여 연녹색의 포자를 형성하였을 때 vacuum dry oven으로 20%정도의 수분을 함유하도록 건조²⁶⁾시킨 후 분말화하였다.

나) Yeast

*Zygosaccharomyces rouxii*를 선택연구실에서 분양받아 potato dextrose broth에 접종하고 2회 이상 계대배양²⁷⁾한 후 30℃의 항온기에서 24시간 배양하여 원심분리하여 상등액을 제거하고 균체만을 모아 이용하였다.

다) Yeast Autolyzate

상법으로 얻은 균체에 증류수와 3%의 식염, 3%의 에탄올을 가하고 55℃에서 4시간동안 shaking (300 rpm)하여 Yeast Autolyzate를 제조²⁸⁾하였다,

3) 된장의 담금

원료배합은 Table 1과 같이 이루어졌으며 이에 따라 조제된 시료는 30℃의 항온기에서 30 일간 발효시키면서 정기적으로 시료를 채취하여 분석에 사용하였다.

Table 4-1. The composition of raw materials of *Doenjang*

Sample notation	Raw materials (g)			
	<i>Chungkookjang</i>	<i>A. oryzae</i>	<i>Zygo. rouxii</i>	Yeast Autolyzate
C	1,000	-	-	-
A	950	50	-	-
Y	980	-	20	-
E	980	-	-	20
AY	965	25	10	-
AE	965	25	-	10
AYE	955	25	10	10

C : *Chungkookjang*

A : Soybean *Gokja* grown with *A. oryzae*

Y : Wet cell mass of *Zygo. rouxii*, E : Autolyzate of Y (70%)

2. 실험방법

가. 효소활성도 측정

1) 조효소액 조제

시료 10 g에 증류수 90 ml을 가하고 30℃의 shaking incubator에서 2 시간 동안 추출한후 5000 rpm으로 30 분간 원심분리하여 상등액을 취해 이를 다시 Whatman No. 2 여과지로 여과한 액을 조효소액으로 하였다.³⁶⁾

2) Amylase activity 측정

Amylase 활성은 α -amylase, β -amylase, glucoamylase의 amylase 효소군에 의하여 생성된 총 환원당의 정량분석을 통하여 측정하였다. 효소활성의 측정은 1% soluble starch 용액 (in 50 mM phosphate buffer, pH 7.0) 0.9 ml에 조효소액 원액 0.1 ml을 첨가하여 30℃에서 1 시간 동안 반응시킨 후 생성된 총 환원당량을 Somogyi-Nelson법으로 측정하였다.³⁷⁾ 환원당의 표준곡선은 maltose를 이용하여 계산하였으며 1 ml의 효소가 1 분간 생성하는 product의 μ g수로 정의하였다.

3) Protease activity 측정

Protease 활성은 Jenson법³⁸⁾에 의해 측정하였다. 효소활성의 측정은 0.5% casein용액 (in 50 mM phosphate buffer, pH 7.0) 3 ml을 37℃의 항온수조에서 예열한 후 조효소액 원액 0.1 ml을 넣어 1 시간 반응시켰다. 반응후 TCA 용액 (1.8% trichloroacetic acid, 1.8% sodium acetate, 1.98% acetic acid) 5 ml을 첨가하여 반응을 종결시켰다. 이 반응액을 Whatman No. 5 여과지로 여과한 후 여액의 흡광도를 275 nm에서 측정하였다. 또한 공시험에서는 casein용액에 TCA용액을 먼저 첨가하고 여기에 같은 양의 효소액을 넣었다. 이때 효소의 unit는 tyrosine을 표준물질로 하여 1 ml의 효소가 1 분간 생성하는 product의 μ g수로 정의하였다.³⁹⁾

나. 질소화합물의 분석

1) 총질소

시료 일정량을 Kjeldahl병에 취하여 H₂SO₄로 분해한 후 Micro Kjeldahl법³²⁾에 의해 총질소 함량을 측정하였다. 시료 0.3 g을 분해관에 취한 후 분해촉진제와 황산을 가하여 분해장치를 이용하여 분해하였다. 분해 후에 40%의 NaOH를 가한 후 증류장치를 이용하여 4%의

boric acid용액에 암모니아 가스를 흡수시킨 다음 0.05 N HCl로 적정한 후 다음식을 이용하여 총질소 함량을 측정하였다.

$$\text{시료의 질소(\%)} = \frac{(V_1 - V_2) \times 0.7 \times F \times D}{S \times 1000} \times 100$$

F : 0.05 N 산표준용액의 factor

D : 희석배수 (정용량/취량)

V₁ : 0.05 N 산표준용액의 적정치 (ml)

V₂ : blank test에서 소비된 0.05 N 산표준용액의 적정치 (ml)

S : sample (g)

조단백질 함량은 위의 방법으로 구한 총질소량에 5.71을 곱하여 측정하였다.

2) 수용성 질소

시료 1 g에 29 g의 증류수를 넣어 2 시간 동안 교반하여 수용성 성분을 용출시킨 후 원심분리하여 상등액의 무게를 측정한 후 상등액 중의 질소함량은 Micro-Kjeldahl법에 의해 측정하였다. 측정된 수용성질소함량과 총질소함량을 이용하여 Nitrogen Solubility Index를 구하였다.³³⁾

3) 아미노태 질소

시료 10 g에 증류수를 90 ml을 가하여 0.1 N NaOH용액으로 pH 8.5로 조절한 후 중성 formalin 5 ml을 넣고, 다시 0.1 N NaOH용액으로 pH 8.5까지 적정하여 이 때 소비된 0.1 N NaOH용액 ml수를 아래의 계산식에 대입하여 그 함량을 산출하였다. 여기에서 상수 1.4는 0.1N NaOH용액 1 ml에 해당하는 포르몰태 질소의 mg수이다.

$$\text{formol태 질소 (mg\%)} = \frac{(\text{시료적정 ml} - \text{공시험 ml}) \times 1.4 \times F}{\text{시료 (g)}} \times 100$$

F : 0.1 N NaOH용액의 factor

이렇게 측정된 formol태 질소에서 암모니아태 질소를 뺀값을 아미노태 질소로 계산하였다.³⁴⁾

4) 암모니아태 질소

시료 10 g에 90 ml의 증류수를 가하고 진탕·추출후 증류법³⁵⁾에 의하여 측정하였다. 10 ml

의 상등액을 Micro Kjeldahl flask에 넣고 0.2 g의 MgO를 가한 후 증류장치를 이용하여 4%의 boric acid용액에 암모니아 가스를 흡수시킨 다음 0.05 N HCl로 적정한후 총질소의 식과 같은 방법으로 암모니아태 질소 함량을 측정하였다.

다. 유리아미노산 측정

시료 0.5 g에 10 ml의 3차 증류수를 가하고 원심분리 후 상등액중 300 μ l를 취해 105 $^{\circ}$ C dry oven에서 충분히 건조시켰다. 여기에 0.2 N sodium citrate buffer (pH 2.2) 9 ml을 가하여 녹이고 0.2 μ m membrane filter로 여과²⁹⁾시킨 후 amino acid analyzer (SYKAM, Germany)를 이용하여 측정하였는데 이는 ion exchange column에서 분리된 아미노산들이 detector에서 검출되기 전에 ninhydrin시약과 반응되어 검출하는 방법이며 분석조건은 Table 4-2와 같다.

Table 4-2. Operating conditions of HPLC assay of free amino acid in Doenjang

Instrument : SYKAM Amino Acid Analyzer, Germany

Column : Cation Separation Column(150 \times 4mm)

Sample volume(μ l) : 100

Detector : UV/Vis detector(570nm)

Flow rate(ml/min) : buffer soln. 0.5
ninhydrin soln. 0.25

Mobile phase : buffer A soln. (pH 3.4)
buffer B soln. (pH 10.8)

Column temperature : 51~85 $^{\circ}$ C

Reaction coil temperature : 120 $^{\circ}$ C

라. 관능검사

된장의 향과 맛에 대한 묘사분석을 하기 위해 10 명의 고려대학교 대학원생을 선정하여 시판 제래식된장 3종 (순창, 농협 두리, 농협 용기독), 개량식된장 2종 (청정원, 샘표), 청국

장 2종 (순창, 청호)을 제시하여 된장에서 느낄수 있는 단어들을 나열하도록 하고 향과 맛을 본후 연상되는 용어들을 서술하도록 하였다. 그 후 원탁토론을 통하여 된장에서 표현할 수 있는 용어들을 결정하여 관능 검사 항목을 정하였다. 정해진 항목으로 시판 장류에 대한 관능검사를 통해 표준된장으로 순창 재래식 된장을 선택하였다. 장류의 중요한 관능적 특성인 조직감과 후미는 예비 실험의 결과 시료 간의 유의차가 거의 없었기 때문에 관능검사의 항목에서 제외 시켰다. 훈련된 10 명의 panel을 선정하여 질문지에 9점 척도법으로 표현하도록 하였는데 이때 시료에서 오는 선입견을 없애기 위해 세자리 숫자의 난수표 번호 방식을 이용하였다. 관능검사에 사용된 설문지는 Table 3과 같았으며 검사 결과는 Statistical Analysis System (SAS) package를 사용하여 분산분석 (ANOVA)을 실시하였고 Duncan's multiple range test로 시료간의 차이정도를 검증⁴⁰⁾ 하였다.

Table 4-3. Example of answer sheet for sensory evaluation

관능검사

일시 :

이름 :

1. 우선 색상을 보시고 기준시료와 비교하여 평가를 하십시오.
2. 색상을 끝낸 후 냄새를 맡으신 후 순간적으로 느껴지는 감각을 기준시료와 비교하여 바로 sheet에 표기하십시오. (주의사항 : 냄새의 경우는 오래 맡으면 감각이 무디어 지므로 냄새를 바로 맡은 후 그때 느껴진 감각을 바로 표기하십시오.)
3. 냄새를 다 맡은 후 다음 시료의 냄새를 맡기까지 1분간 휴식한 후 다음 시료의 냄새를 맡으십시오.
4. 냄새를 다 맡은 후 물로 입안을 헹군 후 준비된 시료를 입안에 넣은 후 혀를 천천히 돌려 맛을 음미한 후 그 때 느낀 감각을 sheet에 표기하십시오.(시료는 벨는 것을 원칙으로 합니다.)
5. 한 시료 당 맛을 보는 횟수는 한번이며 한 시료의 맛을 본 후 느끼는 감각을 바로 sheet에 표기하십시오.
6. 기호도의 결과는 상대적인 비교가 아니라 절대적인 값으로 나타내시오.

1	2	3	4	5	6	7	8	9
---	---	---	---	---	---	---	---	---

가장 약하다

가장 강하다

		시료									비고
		R	289	527	438	169	915	843	761	394	
냄새	황색↔갈색	3									가장 약하다(1)↔가장 강하다(9)
	간장냄새	2									
	메주냄새	7									
	짬냄새	2									
맛	신냄새	1									가장 약하다(1)↔가장 강하다(9)
	간장맛	2									
	삶은콩맛	7									
	단맛	2									
	짬맛	3									
	신맛	1									

기호도 : 해당항목에 V로 표시하십시오.

289

- _____ 가장 나쁘다
- _____ 대단히 나쁘다
- _____ 보통으로 나쁘다
- _____ 약간 나쁘다
- _____ 보통이다
- _____ 약간 좋다
- _____ 보통으로 좋다
- _____ 대단히 좋다
- _____ 가장 좋다

438

- _____ 가장 나쁘다
- _____ 대단히 나쁘다
- _____ 보통으로 나쁘다
- _____ 약간 나쁘다
- _____ 보통이다
- _____ 약간 좋다
- _____ 보통으로 좋다
- _____ 대단히 좋다
- _____ 가장 좋다

915

- _____ 가장 나쁘다
- _____ 대단히 나쁘다
- _____ 보통으로 나쁘다
- _____ 약간 나쁘다
- _____ 보통이다
- _____ 약간 좋다
- _____ 보통으로 좋다
- _____ 대단히 좋다
- _____ 가장 좋다

761

- _____ 가장 나쁘다
- _____ 대단히 나쁘다
- _____ 보통으로 나쁘다
- _____ 약간 나쁘다
- _____ 보통이다
- _____ 약간 좋다
- _____ 보통으로 좋다
- _____ 대단히 좋다
- _____ 가장 좋다

527

- _____ 가장 나쁘다
- _____ 대단히 나쁘다
- _____ 보통으로 나쁘다
- _____ 약간 나쁘다
- _____ 보통이다
- _____ 약간 좋다
- _____ 보통으로 좋다
- _____ 대단히 좋다
- _____ 가장 좋다

169

- _____ 가장 나쁘다
- _____ 대단히 나쁘다
- _____ 보통으로 나쁘다
- _____ 약간 나쁘다
- _____ 보통이다
- _____ 약간 좋다
- _____ 보통으로 좋다
- _____ 대단히 좋다
- _____ 가장 좋다

843

- _____ 가장 나쁘다
- _____ 대단히 나쁘다
- _____ 보통으로 나쁘다
- _____ 약간 나쁘다
- _____ 보통이다
- _____ 약간 좋다
- _____ 보통으로 좋다
- _____ 대단히 좋다
- _____ 가장 좋다

394

- _____ 가장 나쁘다
- _____ 대단히 나쁘다
- _____ 보통으로 나쁘다
- _____ 약간 나쁘다
- _____ 보통이다
- _____ 약간 좋다
- _____ 보통으로 좋다
- _____ 대단히 좋다
- _____ 가장 좋다

제 3절 결과 및 고찰

1. 된장숙성 중의 효소활성의 변화

가. Amylase 활성의 변화

된장의 Amylase 활성을 측정한 결과는 Fig.4-1와 같다. *A. oryzae* 첨가구와 *A. oryzae*, *Zygo. rouxii*, Yeast Autolyzate 혼용구의 경우 숙성 20 일까지 점차 그 활성이 증가하다가 그 이후에 급격히 감소했으며 나머지는 숙성기간에 큰 변화를 보이지 않았다. 시험구중 *A. oryzae* 단용구가 345 unit/ml로 가장 높은 활성을 보였으며 큰 차이는 아니지만 *A. oryzae*, Yeast Autolyzate 혼용구와 *A. oryzae*, *Zygo. rouxii* 혼용구, *A. oryzae*, *Zygo. rouxii*, Yeast Autolyzate 혼용구가 대조구보다 높은 활성을 나타내었다. 된장의 숙성제조시 전분을 dextrin으로 분해할 수 있도록 *B. subtilis*에서 분비되는 α -amylase를 이용하기도 한다고 한다. 따라서 본실험의 원료인 청국장 제조시 *Bacillus*의 증식으로 amylase의 생성이 증가되고 여기에 *A. oryzae* 첨가로 그 활성이 더욱 높아진 것으로 보인다.

나. Protease 활성의 변화

된장중의 protease 활성은 단백질 분해 특유의 구수한 맛 성분을 생산하고 된장의 숙성도를 나타내는 유리 아미노산 함량에 크게 영향을 준다. 된장 발효 과정 중 protease 활성을 측정한 결과는 Fig. 4-2과 같다. 시험구별로는 *A. oryzae* 첨가구와 *Zygo. rouxii* 첨가구 *A. oryzae*, Yeast Autolyzate 혼용구가 발효초기부터 발효 10일까지는 14.26~21.36unit/ml로 증가하는 경향을 보였고 나머지 시험구는 발효 5일까지 17.30~18.90unit/ml로 증가하는 경향을 보였으나 전 시험구가 발효 20일에는 9.02~12.34unit/ml로 감소하였으며 다시 발효 30일까지는 *A. oryzae*, *Zygo. rouxii*, Yeast Autolyzate 혼용구를 제외한 시험구들에서 활성이 약간 증가하는 경향을 나타내었다. Yeast Autolyzate 첨가구는 Yeast가 가지고 있는 protease와 peptidase가 세포외로 방출되어 단백질 분해력이 높으리라 기대되었는데 본 실험의 결과에서는 *Zygo. rouxii*와 protease를 최대로 분비하는 시기의 차이만을 보일뿐 효소 활성의 뚜렷한 차이는 볼 수 없었다.

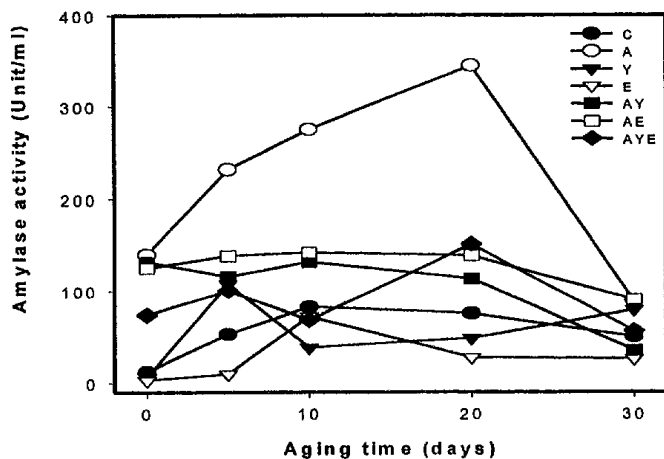


Fig. 4-1 Changes in amylase activity of rapid-Doenjang by different treatments.

C : *Chungkookjang*
 A : Soybean gokja grown with *A. oryzae*
 Y : Wet cell mass of *Zygo. rouxii*
 E : Autolyzate of Y (70%)

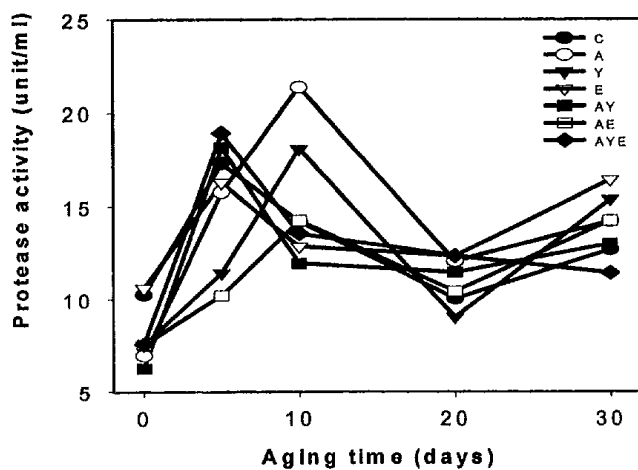


Fig. 2 Changes in protease activity of rapid-Doenjang by different treatments.

C : *Chungkookjang*
 A : Soybean gokja grown with *A. oryzae*
 Y : Wet cell mass of *Zygo. rouxii*
 E : Autolyzate of Y (70%)

2. 된장숙성중의 질소화합물의 변화

가. 수용성 질소의 변화

단백질수용도(NSI= 수용성 질소/ 총질소×100)는 Table 4와 같이 담금 직후 50.42~58.29% 였던 것이 담금 후기에 60.79~67.98%로 나타났는데 이는 담금 후기에 38.77~60.10%의 단백질 수용도에 도달하였다. 이것은 주의 실험에서와 같이 koji만을 이용한 숙성이 아닌 본 실험 초기에 작용시킨 *Bacillus*가 단백질을 수용성 질소로 분해하는데 크게 기여했기 때문이라 사료된다.

Table 4-4. Changes in protein solubility ratio during the aging of *Doenjang*

Sample	Aging time(days)			
	0	10	20	30
C	52.55	63.46	66.55	65.50
A	51.98	55.0	67.84	66.48
Y	52.23	61.33	62.23	67.98
E	53.29	62.18	66.59	66.12
AY	58.10	61.80	67.87	67.58
AE	50.42	65.12	66.55	60.79
AYE	52.16	56.8	66.72	63.92

Control : *Chungkookjang* A : Soybean *Gokja* grown with *A.oryzae*

Y : Wet cell mass of *Zygo.rouxii* E : Autolyzate of Y(70%)

나. 아미노태 질소의 변화

본 실험에서의 아미노태 질소는 formol태 질소의 값에서 암모니아태 질소의 값을 제한 것인데 숙성 10일까지 암모니아태 질소가 급격히 생성되므로 상대적으로 감소한 것으로 생각된다. 10일에서 20일까지는 protease의 활발한 작용으로 급격한 증가를 보였으며 그 후에는 완만한 증가를 보였다.

다. 암모니아태 질소의 변화

암모니아태 질소는 아미노태 질소가 분해되어 생성되는 성분으로 장류의 맛과 향을 불량하게 하는 원인이 되기도 하나 전통 장류의 강한 향미를 갖게 하는 성분이기도 하다. 담금초

기에 250 mg%~281 mg%이던 암모니아태 질소가 담금 30일에는 387~454 mg%로 증가하는 추세(Fig. 4-3)를 보였는데 담금 10일까지 급격한 증가를 보이다가 그후에는 완만한 증가를 나타냈다. 시험구 중 대조구가 가장 낮았고 나머지 시험구는 비슷한 경향을 보였다.

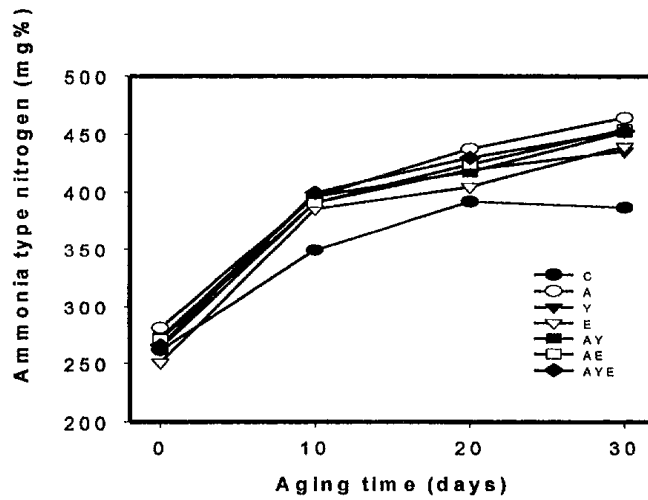


Fig. 4-3 Changes in ammonia nitrogen content of rapid-Doenjang by different treatments.

C : Chungkookjang
A : Soybean gokja grown with *A. oryzae*
Y : Wet cell mass of *Zygo. rouxii*
E : Autolyzate of Y (70%)

라. 된장의 유리아미노산 함량

유리 아미노산은 구수한 맛 성분으로 특히 중요하며 일반적으로 Gly., Lys., Ala.은 단맛을 Leu., Ile., Phe., Val.은 쓴맛을 제공하고 Glu.와 Asp.는 구수한 맛을 낸다. 발효 30일 된장의 유리아미노산의 함량을 측정한 결과는 Table 4-5 같았다.

17종의 유리아미노산이 숙성 30일 된장에서 검출되었다. 총 유리아미노산 함량은 청국장이 2,865 mg%였고 대조구는 4,876 mg%로 발효기간중 약 2 배정도 증가하였다. *A. oryzae*첨가구는 5,868 mg%로 가장 높았으며 나머지구들은 5,181 mg%~5,462 mg%로 큰 차이를 보이지 않았다. 각 유리아미노산 함량을 보면 *A. oryzae*첨가구에서는 Glu.이 1,239 mg%, Pro.이 703 mg%로 많은 함량을 나타내었고 Cys.과 Arg.함량이 낮았다. 또 Asp., Thr., Ser., Val., Met., Ile., leu., Tyr., Phe., His. 등 10종의 유리아미노산 함량은 타시험구보다 높게 나타났다. 타시험구들도 양은 조금씩 다르지만 비슷한 경향을 보였다.

Table 4-5. The content of free amino acid in *Doenjang* (m g %)

Amino acid	Sample							
	CH	C	A	Y	E	AY	AE	AYE
Asp	95	229	410	278	225	365	366	332
Thr	86	138	185	142	141	160	172	152
Ser	43	71	109	84	87	94	89	104
Glu	667	979	1239	1086	1039	1137	1116	1047
Pro	244	634	703	762	707	589	590	713
Gly	74	149	150	142	138	164	165	151
Ala	110	307	344	375	278	339	321	313
Cys	1	4	5	3	2	4	7	6
Val	218	352	440	406	375	419	417	394
Met	107	128	144	126	153	128	122	131
Ile	131	259	312	303	275	299	290	277
Leu	261	486	554	534	516	525	527	483
Tyr	132	169	187	162	206	185	174	153
Phe	220	349	419	383	385	402	392	357
His	133	172	213	178	181	180	166	132
Lys	247	367	412	407	441	405	398	380
Arg	97	83	42	72	55	69	50	58
Total	2,865	4,876	5,868	5,444	5,203	5,462	5,359	5,181

CH : *Chungkookjang* (storage at 4°C) C : *Chungkookjang* E : Autolyzate of Y (70%)
 A : Soy bean *gokja* grown with *A. oryzae* Y : Wet cell mass of *Zygo.rouxii*

3. 관능검사 결과

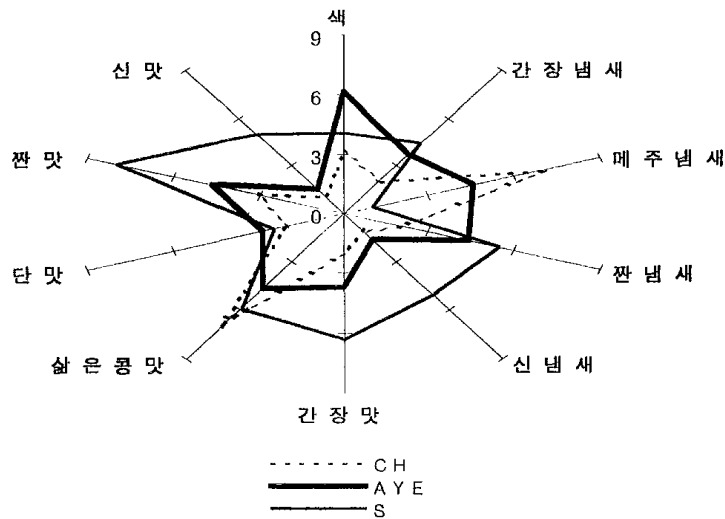
본 실험의 원료인 청국장을 기준시료로 하여 30 일 동안 숙성시킨 된장에 대하여 관능검사를 실시하였다. 색, 냄새, 맛 등 10 가지 용어를 선정하여 실시하였으며 관능검사에 대한 분석결과는 Table 4-6와 같다. 시료와 시료간의 유의성 검정(significance test)에서 색, 냄새에서는 메주냄새와 신냄새가 유의적으로 차이를 나타냈으며, 맛에서는 유의적으로 차이를 나타내지 않았다. 각 된장의 관능적 특성을 살펴보면 대조구는 간장냄새가 가장 약하며 메주냄새가 가장 강하고 짠냄새, 간장맛은 매우 약했으며 삶은콩맛은 강했다. *A. oryzae* 첨가구는 색이 가장 진하였고 짠냄새는 가장 강하였으며 삶은콩맛이 강하고 신맛과 짠맛이 가장 약하게 나타났다. *Zygo. rouxii* 첨가구는 신냄새와 간장맛이 강하였고 색과 단맛은 가장 약하였다. Yeast Autolyzate 첨가구는 간장냄새와 짠맛, 신맛이 가장 강하고 전체적으로 낮은 기호도를 보였다. *A. oryzae*, *Zygo. rouxii* 혼용구는 두드러진 특징을 나타내지 않았고, *A. oryzae*, Yeast Autolyzate 혼용구는 신냄새가 가장 약했으며 단맛이 가장 강하였다. *A. oryzae*, *Zygo. rouxii*, Yeast Autolyzate 혼용구는 메주냄새와 삶은콩맛이 가장 약하고 단맛이 강하였으며 높은 기호도를 보였다. 또한 시판 된장중에 기호도가 가장 우수한 것으로 선택된 표본된장의 특징은 색이 가장 연하였고 메주냄새는 약했으나 짠냄새는 매우 강하며 신냄새도 강하게 나타났다. 한편 맛에서는 간장맛, 짠맛, 신맛이 매우 강했고 종합적 기호도에서는 타시험구에 비해 낮게 평가되었다.

색, 향, 맛을 종합한 시험구의 기호도는 *A. oryzae*, *Zygo. rouxii*, Yeast Autolyzate 혼용구가 가장 우수하였고 그 다음은 *A. oryzae*, *Zygo. rouxii* 혼용구였으며 Yeast Autolyzate 첨가구가 가장 낮게 나타났으나 그 유의성은 인정되지 않았다. 혼용시료의 기호도가 높은 것은 효모나 곰팡이, 세균의 동시 첨가로 자연 발효와 유사한 조건에서 숙성을 촉진시킬 수 있는 주요 미생물이 생육한 효과라고 사료된다. Fig. 4-5은 청국장과 기호도가 가장 우수하게 평가된 *A.oryzae*, *Zygo.rouxii*, Yeast Autolyzate 혼용구와 시판중인 표본된장의 특징을 알아보기 쉽도록 QDA 도표로 나타낸 것이다. 색에서는 *A. oryzae*, *Zygo. rouxii*, Yeast Autolyzate 혼용구가 청국장에 비해 많이 진해졌고 시판 된장에 비해서도 진했으며 간장냄새와 짠냄새, 짠맛은 청국장에 비해 강하나 시판된장보다는 약했다. 메주냄새는 청국장에 비해 많이 약해졌으나 시판된장에 비해 강한 편이었다. 신냄새, 간장맛, 신맛은 청국장과 큰 차이를 보이지 않았으며 시판된장에 비해서는 상당히 약했다. 단맛은 모두 비슷한 경향을 나타내었다.

Table 4-6. The results of ANOVA in each sensory characteristics of *Doenjang*

구분 \ 시료	C	A	Y	E	AY	AE	AYE	S
색 황색***	6.00 ^b ±0.82	7.30 ^a ±0.67	5.50 ^b ±1.51	6.25 ^b ±1.04	6.38 ^b ±0.92	6.25 ^b ±0.89	6.13 ^b ±0.99	4.10±0.57
간장냄새	3.30 ^b ±1.25	3.90 ^{ab} ±1.37	4.00 ^{ab} ±1.33	4.38 ^a ±1.60	3.88 ^{ab} ±1.64	3.50 ^{ab} ±1.51	3.63 ^{ab} ±1.06	4.30±2.63
냄 메주냄새**	6.10 ^a ±1.37	5.60 ^{ab} ±1.84	5.20 ^{bc} ±2.15	5.13 ^{bc} ±1.46	5.63 ^{ab} ±1.60	5.00 ^{bc} ±2.27	4.50 ^c ±1.92	4.00±2.98
새 짠냄새	3.70±1.34	4.90±1.20	4.20±1.62	4.38±1.69	4.13±1.64	4.13±1.72	4.38±1.77	5.40±2.32
신냄새*	1.30 ^b ±0.48	1.70 ^{ab} ±0.82	2.40 ^a ±1.65	1.38 ^b ±0.74	1.38 ^b ±0.74	1.13 ^b ±0.35	1.63 ^{ab} ±1.19	5.00±3.13
간장맛	3.40±1.07	3.70±1.77	4.50±1.35	4.13±1.46	4.25±1.49	4.25±1.83	3.63±1.31	6.30±2.26
살은콩맛	5.90 ^a ±1.20	5.90 ^a ±1.79	5.20 ^{ab} ±1.69	5.13 ^{ab} ±1.25	4.75 ^{ab} ±1.58	4.75 ^{ab} ±1.83	4.63 ^b ±1.69	5.90±1.79
맛 단맛	2.60±0.97	2.80±0.14	2.20±0.79	2.75±1.03	2.63±0.74	2.88±1.13	2.88±1.13	2.50±1.72
짠맛	4.50±0.71	4.40±1.17	4.60±1.26	5.25±1.39	4.63±1.51	5.00±1.60	4.63±1.60	8.00±1.33
신맛	1.40 ^{ab} ±0.52	1.30 ^b ±0.48	1.40 ^{ab} ±0.52	1.88 ^a ±0.99	1.50 ^{ab} ±0.76	1.63 ^{ab} ±0.92	1.50 ^{ab} ±0.76	4.90±3.07
종합적 기호도	5.50±1.18	5.00±1.15	5.10±4.52	4.75±1.58	5.63±1.51	5.13±1.46	5.75±0.89	4.10±2.08

1) Score ; 1- extremely weak
9- extremely strong



Significant level ; * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$

Fig. 4-5 QDA diagram of sensory quality of rapid-*Doenjang* compared to that of *Chun gkookjang* and Commercial *Doenjang*

CH : *Chungkookjang* (storage at 4°C)

AYE : *A.oryzae* + *Zygo.rouxii* + Yeast Autolyzate

S : Commercial *Doenjang*

요 약

재래식 된장의 향미를 가지는 숙성된장을 만들기 위하여 청국장 발효과정을 통해 대두 단백질을 신속하게 분해하고 *A. oryzae*, *Zygo. rouxii* 그리고 Yeast Autolyzate를 단용 혹은 혼용 첨가한 후 30℃에서 30일간 숙성시키면서 그 성분변화를 측정하고 그 품질특성을 비교 평가한 결과는 다음과 같다.

1. 시료 된장의 수분함량은 숙성기간이 증가함에 따라 52.7~55.7%로 숙성기간동안 큰 변화를 보이지 않았다. pH는 초기 7.4~7.6에서 숙성 후기 7.0~7.1로 다소 감소하였으나 일반 전통된장에 비해 상당히 높았다. 적정산도는 증가하는 경향을 나타내고 환원당 함량은 숙성 5일까지는 16.7~22.0 mg%로 증가하다가 10일까지는 8.8~17.8 mg%로 감소하였으며 그 후로는 증가하였다.
2. 총질소함량의 변화는 거의 없었으나, 수용성 질소는 담금 초기 1.59~1.68%에서 후기에 1.96~2.20%로 증가하였고, 숙성을 판정하는데 중요한 성분인 아미노태 질소는 전시험구가 모두 600 mg%이상이었으며 암모니아태 질소는 증가하는 경향이었는데 그 담금 후기의 함량이 250 mg%~450mg%로 높은 수준이었다.
3. 효소활성 중 amylase 활성은 *A. oryzae*단용구가 가장 높았고 대체로 *A. oryzae*첨가구가 높았으며 20 일부터는 감소하는 경향이었고, protease활성은 담금 초기에 증가하다가 20 일까지는 감소하고 다시 30 일까지 다소 증가하였다.
4. 숙성된 된장의 유리아미노산함량은 Glu., Pro., Leu., Lys.이 높았고 Cys.과 Arg.이 대체적으로 낮았다. 유리 아미노산의 총량은 *A. oryzae*단용구가 가장 높았고 Glu., Pro., Val.의 함량이 높게 나타났으며 *Zygo. rouxii*단용구에서는 Ala., Yeast Autolyzate 단용구에서는 Tyr.과 Lys.이 높게 나타났다.
5. 청국장을 이용한 숙성된장제조는 숙성기간을 단축하는데 효과적이었으며, 시판재래된장에 비해 메주냄새가 강하고 신냄새와 신맛이 약했으나, 종합적 기호도에서 전반적으로 양호하였으며 그중 *A. oryzae*, *Zygo. rouxii*, Yeast Autolyzate 혼용구가 가장 우수하였다.

참고문헌

1. 이갑상, 정동효: *Bacillus natto*가 된장에 미치는 영향, 한국식품과학회지, 5(3), 163~168. (1973)
2. 허선희: 식품산업, 17(7), 100~113. (1999)
3. 이서래: 한국의 발효식품, 이화여자대학교 출판부. (1986)
4. 김영만, 임무현: 최신발효공학, 유림문화사. (1997)
5. 서정숙, 한은미, 이택수: *Bacillus*속과 *Aspergillus oryzae*로 만든 메주가 개량식 된장의 성분에 미치는 영향, 한국식품영양과학회지, 15(4), 1~9. (1986)
6. 이부용, 김동만, 김길환: 청국장 점질물의 이화학적 특성, 한국식품과학회지, 23(5), 599~604. (1991)
7. 김종규: 식품기술, 한국식품개발연구원, 8(4), 43~53. (1995)
8. 김상순: 한국전통식품의 과학적 고찰, 숙명여자대학교 출판부. (1985)
9. 이병일: 쌀전분의 호화도에 따른 국균의 효소 활성 변화에 관한 연구, 고려대학교 석사학위논문. (1997)
10. 유태중, 홍재훈, 김영배, 이호 외 4인: 최신식품미생물학, 문운당. (1997)
11. 정동효: 효소학개론, 대광서림. (1993)
12. Norman W. Desrosier: The technology of food preservation, AVI, forth edition. (1977)
13. 주현규, 김동현, 오권택: 된장 koji 및 그 혼합에 따른 된장 숙성 과정중의 화학성분 변화, 한국농화학회지, 35(5), 351~360. (1992)
14. 윤일섭, 김현오, 윤세억, 이갑상: 한국된장의 발효과정에 따른 N-Compounds의 소장에 관한 연구, 한국식품과학회지, 9(2), 131~137. (1977)
15. 하덕모: 개정발효공학, 신광출판사. (1998)
16. 박정숙, 이명렬, 김정수, 이택수: 미생물 급원을 달리한 숙성 된장의 질소성분과 아미노산 조성, 한국식품과학회지, 26(5), 609~615. (1994)
17. 이택수, 신보규, 주영하, 유주현: 된장 및 고추장의 원료 대체에 관한 연구. 한국산업미생물학회지, 1(2), 79~87. (1973)
18. 신순영, 김영배, 유태중: *Bacillus licheniformis*와 *Saccharomyces rouxii*첨가에 의한 된장의 풍미향상, 한국식품과학회지, 17(1), 8~14. (1985)
19. 박정숙, 이명렬, 김경수, 이택수: 균주를 달리한 된장의 향기 성분, 한국식품과학회지, 26(3), 255~260. (1994)

20. 지원대, 이은주, 김종규: 재래식 메주와 개량식 메주로 제조한 된장의 휘발성 향기성분, 한국농화학회지, **35**(4), 248~253. (1992)
21. 이종수, 권수진, 정성원, 최영준, 유진영, 정동효: 한국 재래식 된장과 고추장의 숙성 중 미생물, 효소활성 및 주요 성분의 변화, 한국산업미생물학회지, **24**(2), 247~253. (1996)
22. 유승구, 조원희, 강수민, 이선희: 전통된장 및 간장의 숙성기간별 생육 미생물의 분리 및 동정, 한국산업미생물학회지, **27**(2), 113~117. (1999)
23. 정재홍, 김종생, 이상덕, 최성현, 오만진: 시판 된장의 유리아미노산, 유기산 및 Isoflavone의 함량에 관한 연구, 한국식품영양과학회지, **27**(1), 10~15. (1998)
24. 양성호, 최영락, 김종규, 정영건: 한국 재래식 된장의 맛성분 조성의 최적화, 한국식품영양과학회지, **21**(4), 449~453. (1992)
25. 최성희, 지영애: 청국장 숙성중의 향기성분 변화, 한국식품과학회지, **21**(2), 229~234. (1989)
26. 김동호, 김승호: *Mucor*, *Rhizopus*속 균류를 이용한 콩알메주 발효의 생화학적 특성, 한국식품과학회지, **31**(1), 176~182. (1999)
27. 최홍식, 김현영, 여경목, 김복남: 김치 젖산균과 효모의 혼합배양 방법에 의한 과채류즙의 발효양상, 한국식품영양과학회지, **27**(6), 1059~1064. (1998)
28. 이철호, 박장열, 정경식: 자기소화 시간에 따른 효모 Extract의 성분과 풍미의 변화에 관한 연구, 한국식품과학회지, **13**(3), 181~187. (1981)
29. 보건복지부: 식품공전. (1999)
30. 全國みそ 技術會: 基準みそ 分析法, 東京. (1986)
31. Nelson. N.: A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem*, **153**, 375. (1944)
32. A.O.A.C.: Official methods of analysis 15th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C. (1990)
33. A.A.C.C.: Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists, Volume II, 46-23. (1983)
34. 유주현, 양한철 외 2인: 식품공학실험서, 탐구당. (1990)
35. 농업기술연구소: 토양화학분석법, 산미출판사. (1988)
36. 신동화, 김동한, 최웅, 임대관, 임미선: 전통 고추장의 품질특성, 한국식품과학회지, **28**(1), 157~161. (1996)
37. 김동호, 임대원, 배석, 전순배: *Bacillus*속 세균 4종을 이용한 콩알메주 model system의

- 발효특성, 한국식품과학회지, 29(5), 1006~1015. (1997)
38. Jensen, D. E.: Continuous production of extracellular protease by *Bacillus subtilis* in a two-stage fermenter, *Biotechnol. Bioeng.* 14, 647. (1972)
39. 조성준: 수용성 액상 2상계에 의한 메주 *Bacillus sp.* protease의 정제 및 특성, 고려대학교 석사학위논문. (1999)
40. 이철호, 채수규, 이진근, 박태상: 식품공업품질관리론, 송림문화사. (1984)
41. 최용규, 지원대, 정영진: *Bacillus subtilis* DC-2로 제조한 청국장 특성의 특성, 한국식품영양과학회지, 27(5), 846~851. (1998)
42. 서정숙, 이상건, 유명기: 균주를 달리한 청국장 제조에 관한 연구, 한국식품과학회지, 14(4), 309~314. (1982)
43. 서정숙, 이택수: 메주의 형상에 따른 재래식 간장의 유리아미노산, 한국식문화학회지, 7(4), 323~328. (1992)
44. 한국표준협회: 한국산업규격, KS H 2119. (1994)
45. 김재욱, 최준봉, 방찬식: 두유박을 이용한 쌀 된장 제조, 한국농화학회지, 32(2), 98~103. (1989)
46. 유진영, 김현규, 권동진: 효모첨가에 의한 재래식 간장 제조공정 개선, 한국식품영양과학회지, 27(3), 268~274. (1998)
47. 김재욱: 콩코오지 제조중의 peptide에 관한 연구, 한국농화학회지, 6(1), 79~87. (1965)
48. 주현규, 김남대, 윤기석: *Aspergillus spp.*에 의한 콩된장 발효 과정중의 효소활성 변화, 한국농화학회지, 32(3), 295~302. (1989)
49. 이철호: 장류제품의 아미노산 조성과 그 단백질 품질평가에 관한 연구, 한국식품과학회지, 5(4), 210~214. (1973)
50. 박현경, 손경희, 박옥진: 한국전통간장의 맛과 향에 관여하는 주요 향미인자의 분석(I), 한국식문화학회지, 12(1), 53~61. (1997)
51. 정수현, 서형주, 홍재훈 외 2인: 홍국 코오지를 이용한 고추장의 특성, 한국식품영양과학회지, 28(1), 61~66. (1999)
52. 주명숙, 손경희, 박현경: 숙성 기간에 따른 전통 간장의 맛 특성 변화(I), 한국식문화학회지, 12(2), 183~188. (1997)

여 백

제 5 장 청국장을 이용한 전통된장 속성제조법

제 1 절 서설

1. 실험목적

생체촉매조합과 방사선 조사를 병행한 속성발효 된장의 제조 및 산업화 적용 시험을 한다. 생체촉매조합에 의하여 발효 촉진되는 된장의 발효 과정에서의 대사산물(pyrazine derivatives)을 분석하여 발효 촉진 현상을 분석하고, 방사선 조사시 생성되는 물질을 분석하여 발효 촉진 효과를 비교, 분석한다. 공정 최적화 방법을 도입하여 전통 된장과 방사선 조사를 병행한 속성발효 된장의 제조 및 산업화 적용 시험을 한다.

생체촉매조합에 의한 발효 촉진 된장의 속성 발효속성 공정을 수립한다. 새로운 공정을 산업화 pilot-scale에서 생산시험을 수행한다. 연구된 산업화 공정을 (주)해마식품의 생산공장에서 확인시험 한다

2. 연구 배경 및 개요

앞선 연구들을 토대로 전통 된장의 발효촉진 공정을 수립하고자 청국장을 starting material로 하여 여기에 삶은 콩에 곰팡이(*Asp. oryzae*)를 접종시켜 만든 콩곡자를 혼합하여 발효 촉진정도로 보고자 하였다. 재래된장 제조에 이용하는 메주의 균 분포가 세균과 곰팡이가 대부분인 점을 고려하여 세균과 곰팡이의 적합한 배합비율을 찾고자 청국장과 콩곡자를 다양한 조합비율로 혼합 속성하여 된장을 제조하였다. 제조한 된장을 속성하면서 질소성분의 함량 변화와 효소활성의 변화 그리고 속성후 관능검사를 통하여 가장 최적의 조합비율을 찾았다. 최적 조합비율로 선택된 것으로 새로 된장을 제조하여 방사선 조사를 하고 관능검사를 실시하여 방사선 조사한 효과를 관능검사를 토대로 평가해 보고자 하였다. 방사선 조사에 의한 효소활성도, 질소성분의 변화를 알아보고자 동일한 실험을 행하였다. 방사선 조사는 고선량인 경우 불쾌취 유발이 우려되므로 저선량(1kGy이하)을 조사하여 속성 중에 형성되는 된장의 향기성분의 합성에 미치는 방사선 조사의 영향을 알아보고자 하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 실험재료

가. 원료

청국장 제조에 사용된 대두(수분 10.4%, 조단백질 30.9%, 조지방 15%, 회분 7%)는 2000년에 강원도 원주에서 생산된 것을 사용하였으며 식염은 정제염 (염도 88%이상)을 사용하였다.

나. 사용균주

- 1) 청국장 담금용 *Bacillus*는 메주에서 분리한 균 중에서 청국장이 가장 잘되는 균주로 본 실험실에서 분리 동정한 *Bacillus amylolichefaciens KU68*를 이용하였다.
- 2) Fungi는 본 실험실에서 보관중인 *Aspergillus oryzae* MHK001균주를 potato dextrose agar에서 activation시킨후 증자한 대두에 접종하여 30℃의 항온기에서 3일간 배양하여 연녹색 포자를 형성하였을 때 콩곡자로 이용하였다.

다. 청국장 담금

대두를 24시간 물에 담그어 불린 다음 1시간 동안 물빼기 후에 petridish (직경18cm)에 담아 autoclave에서 30분간 (121℃) 증자한 후 40℃정도로 냉각하고 배양한 *Bacillus*를 원료무게의 약 1%정도로 접종하여 40℃ 항온기에서 48시간 발효시켰다.

라. 된장 제조

위의 방법으로 제조한 청국장과 콩곡자에 식염을 10%가한 후 chopper를 사용하여 혼합 분쇄하여 된장을 제조하였다.

마. 된장 담금

원료 배합은 Table 5-1과 같이 이루어졌으며 이에 따라 조제된 시료는 25℃의 항온기에서 15일간 숙성시키면서 매 3일마다 시료를 채취하여 분석에 사용하였다. 관능검사에 사용한 시료는 15일간 숙성시킨 된장을 사용하였다.

Table 5-1. The composition of raw materials of *Doenjang*

Sample notation	Raw materials (g)	
	Chungkookjang	A. oryzae
C	500	-
K	-	500
1:1	250	250
2:1	335	165
1:2	165	335
3:1	375	125
1:3	125	375
4:1	400	100

위의 방법으로 제조된 된장을 관능검사하여 기호도 면에서 가장 좋은 수치를 얻은 샘플 2개를 선택하여 방사선 조사를 하였다. 방사선 조사선량은 0, 0.25, 0.5, 1kGy로 저선량 조사하였다.

2. 실험방법

가. 효소활성도 측정

1) 조효소액 조제

시료 10g에 증류수 90ml을 가하고 30℃의 shaking incubator에서 2시간 동안 추출한 후 5000rpm으로 30분간 원심분리하여 상등액을 취해 이를 다시 Whatman No.2 여과지로 여과한 액을 조효소액으로 하였다.

2) Protease activity 측정

Protease 활성은 Jenson법에 의해 측정하였다. 효소활성 측정은 0.5% casein 용액 (Neutral protease의 경우에는 50mM phosphate buffer, pH 7.0을 사용하였고, alkaline protease의 경우에는 50mM borate buffer, pH 10.0을 사용하였다.) 3ml을 37℃의 항온수조에서 예열한 후 조효소액 원액 0.1ml을 넣어 1시간 반응시켰다. 반응후 TCA 용액 5ml을 첨가하여 반응을

종결시켰다. 이 반응액을 Whatman No. 5 여과지로 여과한 후 여액의 흡광도를 275nm에서 측정하였다. 또한 공시험에서는 casein용액에 TCA용액을 먼저 첨가하고 여기에 같은 양의 효소액을 넣었다. 이때 효소의 unit는 tyrosine을 표준물질로 하여 1ml의 조효소액이 1분간 생성하는 product의 μg 수로 정의하였다.

위의 조건으로 alkaline protease와 neutral protease를 각각 나누어 측정하였다. alkaline protease의 측정시에 EDTA를 조효소액에 $50\mu\text{l/ml}$ 첨가하고, neutral protease 측정시에는 PMSF를 $50\mu\text{l/ml}$ 첨가하였다.

나. 질소화합물 분석

1) 아미노태 질소

시료 10g에 증류수 90ml를 가하여 1시간동안 교반한 후 원심분리하여 얻은 상등액을 시료액으로하여 그 시료액 10ml를 0.1N NaOH로 pH 8.5로 조절한 뒤 중성포르말린 5ml을 넣고 다시 0.1N NaOH로 pH 8.5까지 적정하여 이때 소비된 0.1N NaOH ml를 아래의 계산식에 대입하여 그 함량을 산출하였다.

$$\text{Formol태 질소(mg\%)} = (\text{시료적정ml} - \text{공시험ml}) \times 1.4 \times F / \text{시료무게(g)} \times 100$$

F : 0.1N NaOH의 factor

상수 1.4는 NaOH용액 1ml에 해당하는 formol태 질소의 mg수 이다. formol태 질소에서 암모니아태 질소를 뺀 값을 아미노태 질소로 나타내었다.

나) 암모니아태 질소

청국장 10g에 증류수 90ml을 혼화한 후 원심분리하여 얻은 상등액을 시료액으로 하여 그 시료액 20ml를 취하여 산화 마그네슘(MgO)으로 알칼리 조건을 만든 후 Kjeldahl 증류해서 암모니아태 질소를 수기 (Boric acid)에 포집한 후 지시약 (Methyl Orange + Bromo cresol green) 0.2ml를 가하여 0.05N 황산 표준용액으로 적정하였다.

$$\text{암모니아태 질소 함량 (\%)} = (V1 - V2) \times 0.7 \times F / (\text{시료 } 20\text{ml} \times 1000) \times 100$$

V1 = 적정시 들어간 0.05N 황산 표준용액의 양

V2 = Blank에 들어간 0.05N 황산 표준용액의 양

F = 황산 용액의 factor

다. 관능검사

1) 예비실험

청국장 맛과 향에 대한 묘사분석을 하기 위해 10명의 고려대학교 대학원생을 선정하여 관능검사 항목을 선정하였다. 10명의 panel들이 이 용어들이 포함된 질문지를 15점 척도법을 이용하여 각기 다른 비율로 제조된 숙성된장과 시중에서 구입한 된장, 총 8개의 시료에 대하여 상대적인 수치를 기록하도록 하였다. Standard로 청국장과 콩곡자를 1:1의 비율로 섞은 것을 사용하여 이것을 R값, 즉 중간값으로 하여, 순간적으로 느끼는 맛과 향을 바로 질문지에 표현할 수 있도록 하였다. 시료의 번호에서 오는 선입관을 없애기 위해 세자리 숫자의 난수표 번호 방식을 이용하였고, 많은 시료에 의한 피로와 오차를 줄이기 위해 총 시료 8개중에 Panel당 4가지씩 테스트 하였다. 검사 시 입안에 남는 잔미를 없애기 위해 시료와 시료 사이에 식빵과 물로 입안을 행구는 것을 원칙으로 하였다. 본실험에 사용한 관능검사 Sheet는 본 보고서의 맨 뒷면에 첨부하였다.

2) 관능검사 본실험

위의 실험을 통해서 나온 데이터 중에서 기호도 면에서 가장 높은 점수를 얻은 두 개의 Sample을 택하여 된장을 새로 제조한 후 방사선 조사하여 같은 항목으로 관능검사를 실시하였다. 이때는 같은 방법으로 Standard로 청국장과 콩곡자를 1:1로 섞은 것을 이용하였으며, 관능검사 시료에 시판된장(순창 콩된장)과 재래식으로 제조된 된장(순창 재래된장)을 포함하여 실시하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 된장 숙성 중의 효소활성의 변화

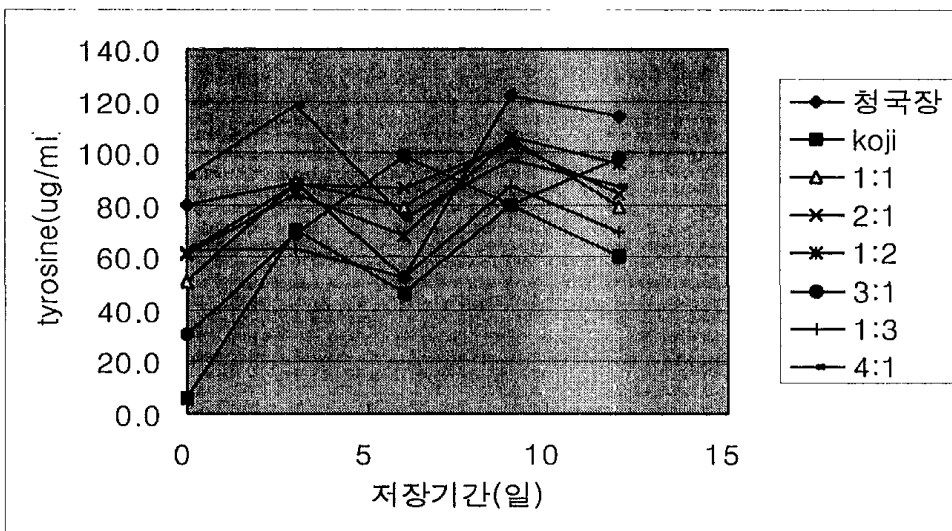
가. Protease 활성의 변화

된장중의 Protease 활성은 단백질 분해 특유의 구수한 맛 성분을 생산하고 된장의 숙성도를 나타내는 유리 아미노산 함량에 크게 영향을 준다.

1) 숙성중 비조사구 된장의 Neutral protease activity의 변화

발효 초기에 청국장 단독구가 koji 단독구보다 활성이 월등히 높은 것으로 나타나 neutral protease의 활성이 청국장의 bacillus에 의한 것임을 알 수 있었다. 발효가 진행됨에 따라 조사구에 따라 숙성 기간 중 공통적으로 증가하는 경향을 나타냈다.

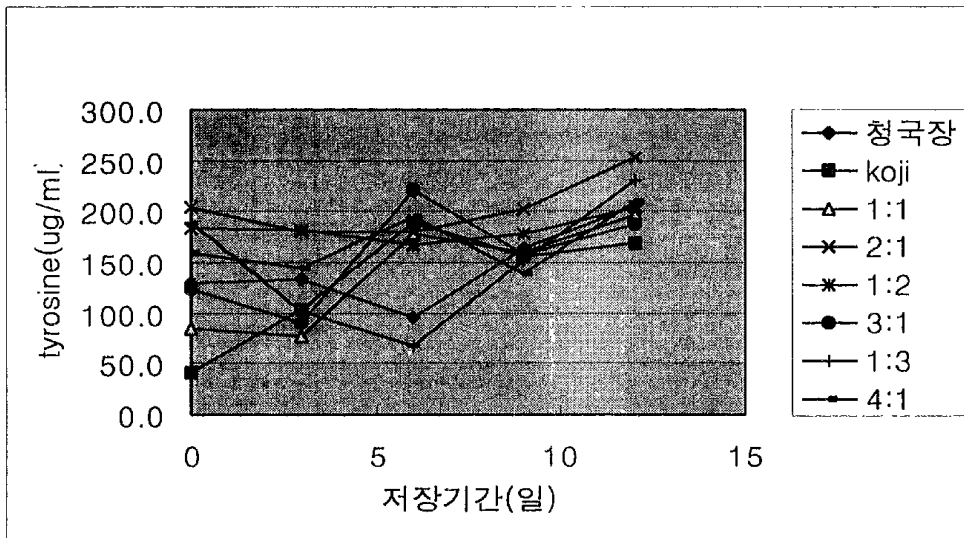
Fig. 5-1 저장중 비조사구 된장의 Neutral protease activity의 변화



2) 숙성중 비조사구 된장의 Alkaline protease activity의 변화

전체적으로 발효가 진행됨에 따라 Alkaline protease 활성이 점차적으로 증가하는 경향을 나타냈다. koji 단독구의 경우 초기에 50ug/ml에서 발효 후기에는 160ug/ml로 증가하여 가장 큰 증가를 보였고 다른 구의 경우에는 증가율은 작지만 전체적으로 증가하는 경향을 보였다. 전체적으로 활성은 neutral protease 보다는 높은 값을 나타내었다.

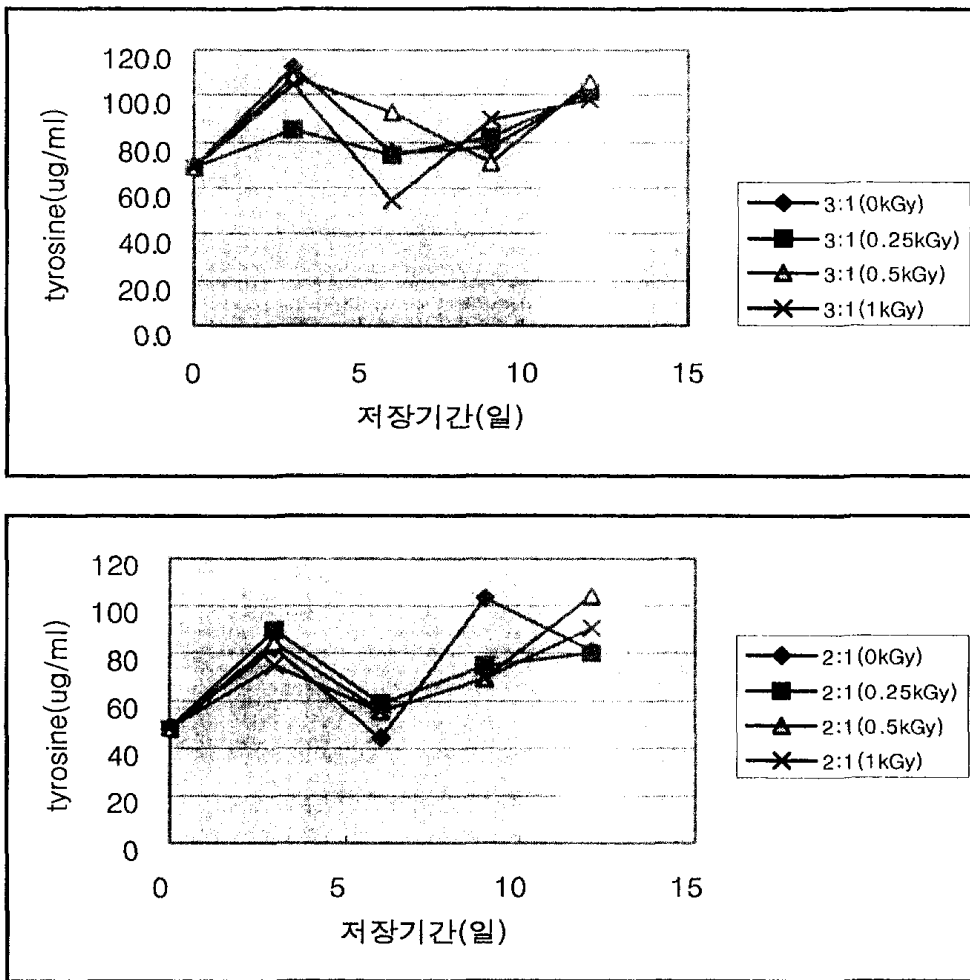
Fig. 5-2 저장 중 비조사구 된장의 Alkaline protease activity의 변화



3) 숙성중 방사선 조사구 된장의 Neutral protease activity의 변화

발효 초기에는 50~70 $\mu\text{g/ml}$ 에서 발효가 진행 됨에 따라 전체적으로 증가하는 경향을 나타냈다. 3:1구가 2:1 구보다 높은 것으로 나타나 청국장이 많이 포함될수록 neutral protease의 활성이 큰 것을 알 수 있었다. 그러나 조사선량 별로는 뚜렷한 차이를 보이지 않아 방사선 조사가 단백질 분해효소에는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 확인 되었다.

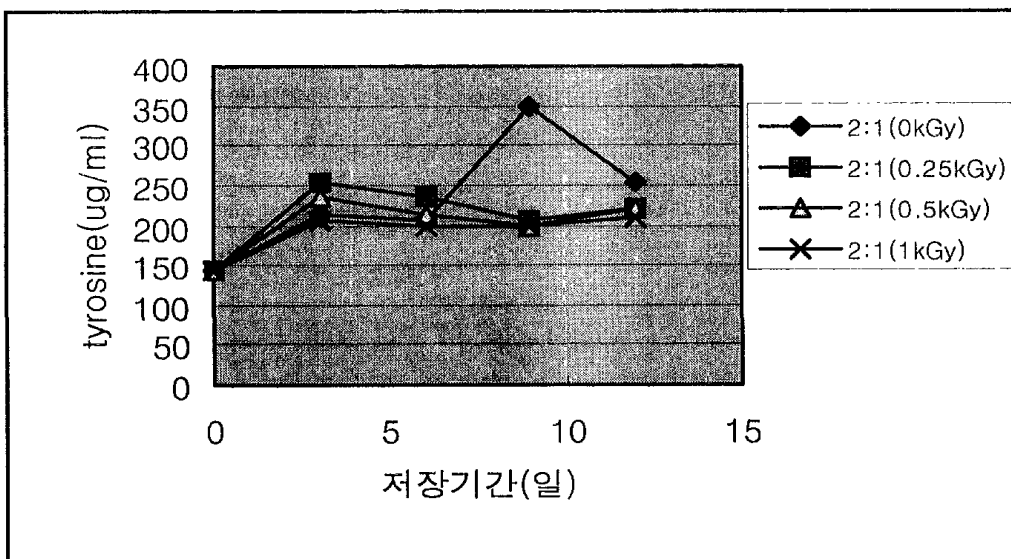
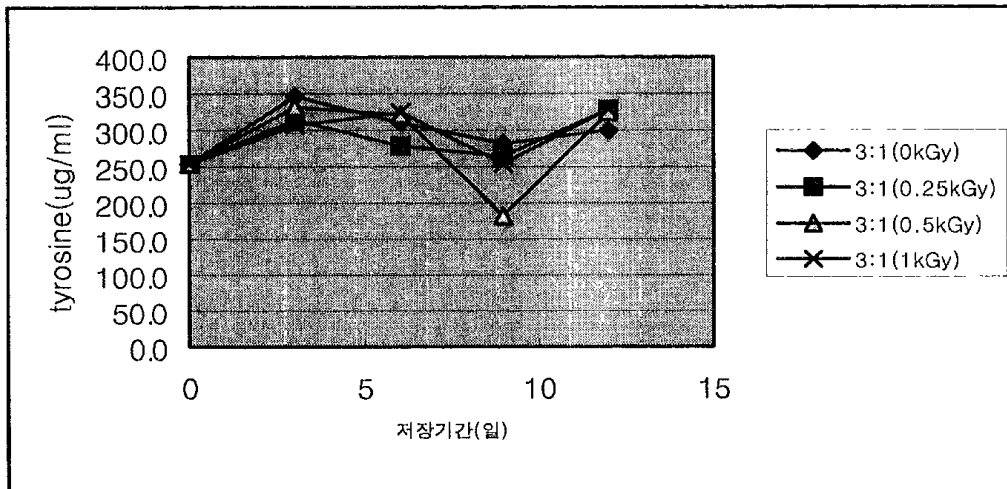
Fig. 5-3 저장중 방사선 조사된 된장의 Neutral protease activity의 변화



4) 숙성중 방사선 조사구 된장의 Alkaline protease activity의 변화

발효초기에 발효구 별로 150~250 $\mu\text{g/ml}$ 에서 발효후기에는 200~300 $\mu\text{g/ml}$ 로 점차적으로 증가하는 경향을 나타내었다. 그러나 방사선 조사에 의한 효소활성의 변화는 관찰되지 않았다. 방사선 조사가 저선량 1kGy이하였기 때문에 단백질 분해효소에는 큰 영향을 미치지 않은 것으로 판단된다.

Fig. 5-4 저장 중 방사선 조사된 된장의 Alkaline protease activity의 변화



2. 된장의 저장 중 질소화합물의 변화

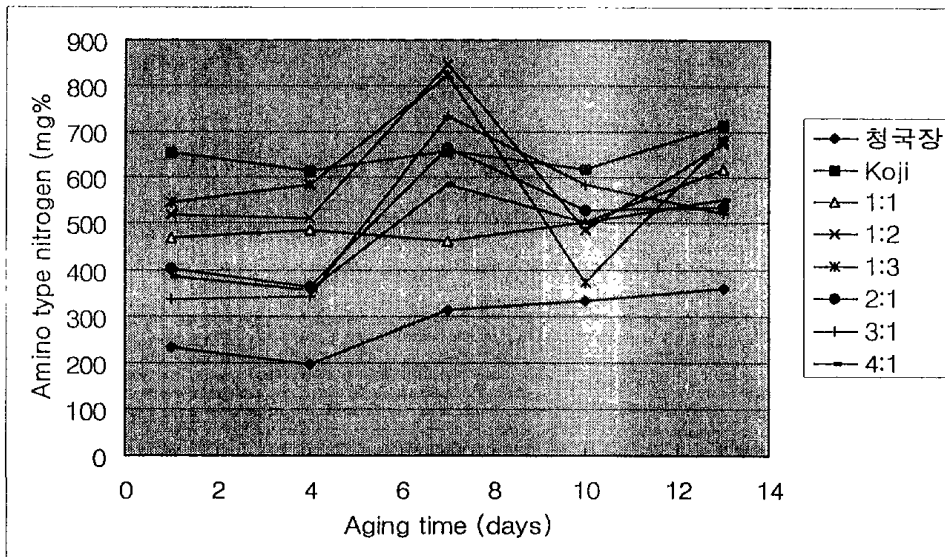
가. 아미노태 질소의 변화

1) 비조사구의 아미노태질소 함량의 변화

아미노태 질소는 발효식품의 숙성도를 판정하는 중요한 성분이다. 발효 과정 중에 콩 중의 단백질이 효소작용으로 가수분해되어 구수한 맛인 아미노산을 생성하게 되는데 숙성기간 중의 아미노태 질소의 함량이 높은 된장이 관능적 품질에서도 좋은 것으로 평가된다.

발효 초기에는 청국장보다는 콩곡자의 아미노태 질소 함량이 더 큰 것으로 나타났다. 그리고 청국장과 콩곡자의 조합에 따라서 초기 아미노태 질소 함량이 300~600mg%사이에서 나타났다. 발효 후기에는 300~700mg%정도로 전체적으로 증가하는 경향을 나타냈다.

Fig 5-5. 비조사구 된장의 저장기간 중 아미노태 질소함량의 변화

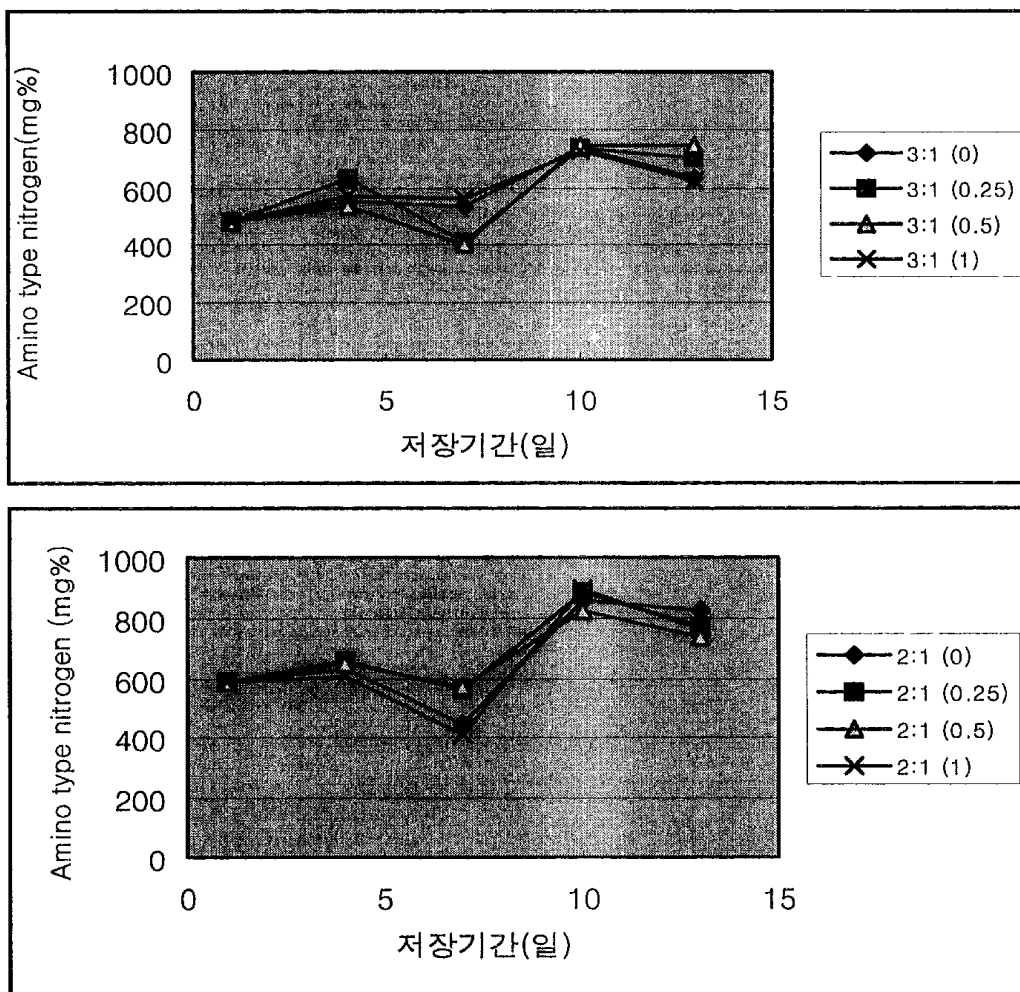


2) 방사선 조사구의 아미노태질소 함량의 변화

방사선 조사구의 경우에는 발효 초기에 500~600mg%에서 발효 후기에는 600~900mg% 정도 나타냈다. 전체적으로 증가하는 경향을 나타냈으며, koji가 보다 많이 포함된 2:1구가 청국장이 많이 포함된 3:1 구보다 초기 아미노태질소 함량도 많고 후기의 아미노태질소의 함량도 많으 것으로 나타났다. 이는 koji균인 *Aspergillus oryzae*에 의한 단백질 분해효소들의 작용이 청국장의 균인 *Bacillus spp.*의 단백질 분해효소보다 단백질 가수분해 작용이 컸던 것으로 생각된다.

방사선 비조사구의 숙성된장과 비교했을 때, 방사선 조사구의 아미노태 질소함량의 증가폭이 더 큰 것으로 나타났다.

Figure 5-6. Changes in amino type nitrogen content of rapid-Doenjang by different irradiation treatments

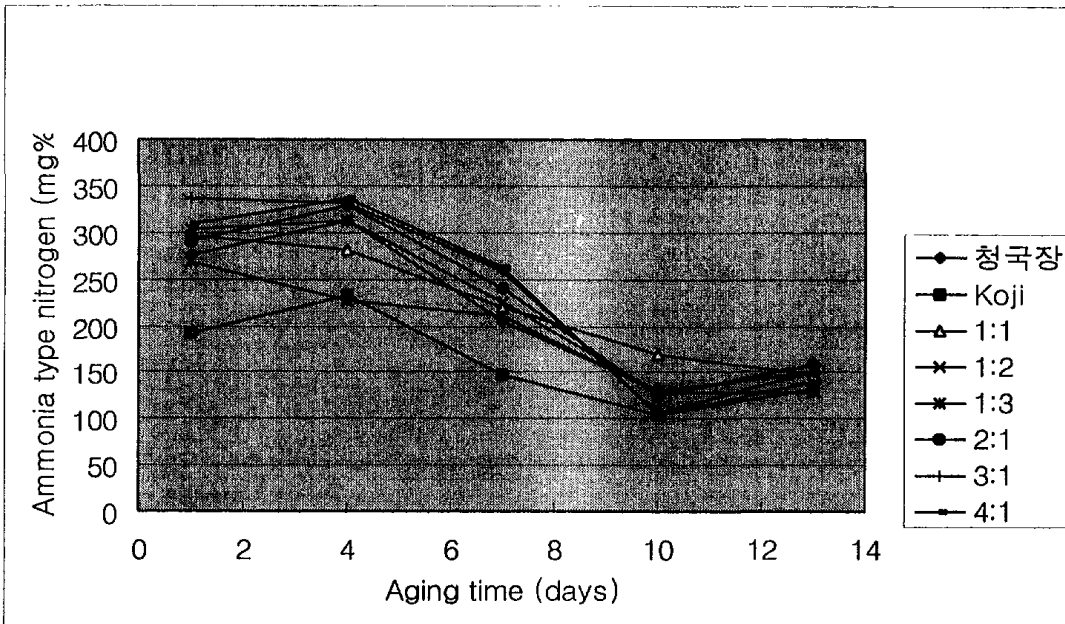


나. 암모니아태 질소의 변화

1) 비조사구의 암모니아태 질소의 함량 변화

암모니아태 질소는 아미노태 질소가 분해되어 생성되는 성분으로 장류의 맛과 향을 불량하게 하는 원인이 되기도 하나 전통 장류의 강한 향미를 갖게 하는 성분이기도 하다. 또한 청국장 특유의 발효취의 가장 큰 원인이 되기도 한다. 본 실험결과에서는 전체적으로 암모니아태 질소의 함량이 발효 숙성이 진행됨에 따라 점차적으로 감소하는 것으로 나타났다. 초기에 각 구별로 200~350mg%에서 발효 후기에는 약 150mg%로 전체적으로 감소하는 경향을 나타냈다. 박¹⁾등은 고오지와 *Bacillus natto* 메주의 혼합배양 된장에서 암모니아태 질소의 함량이 점차적으로 증가하였다는 보고를 하여 본 실험 결과와는 상이하였다.

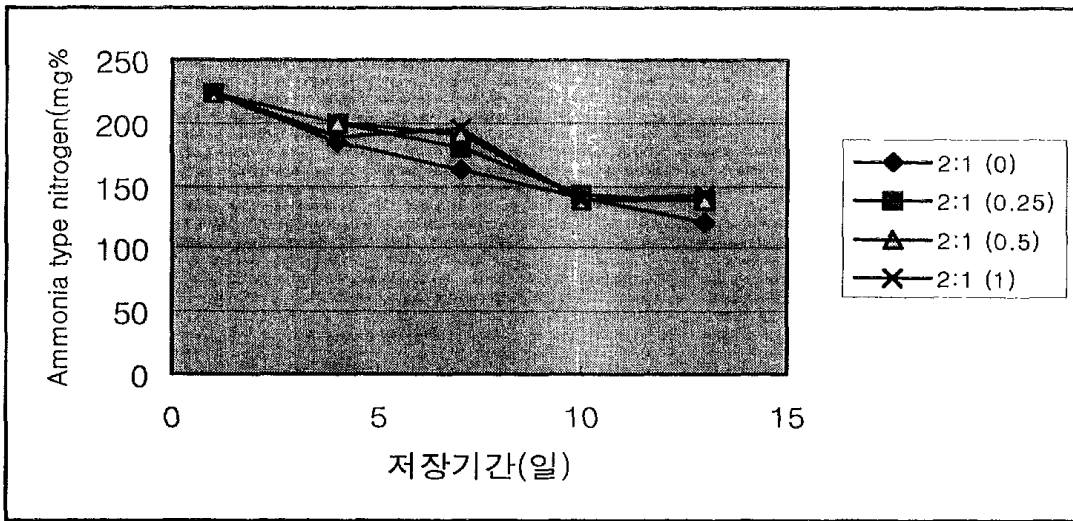
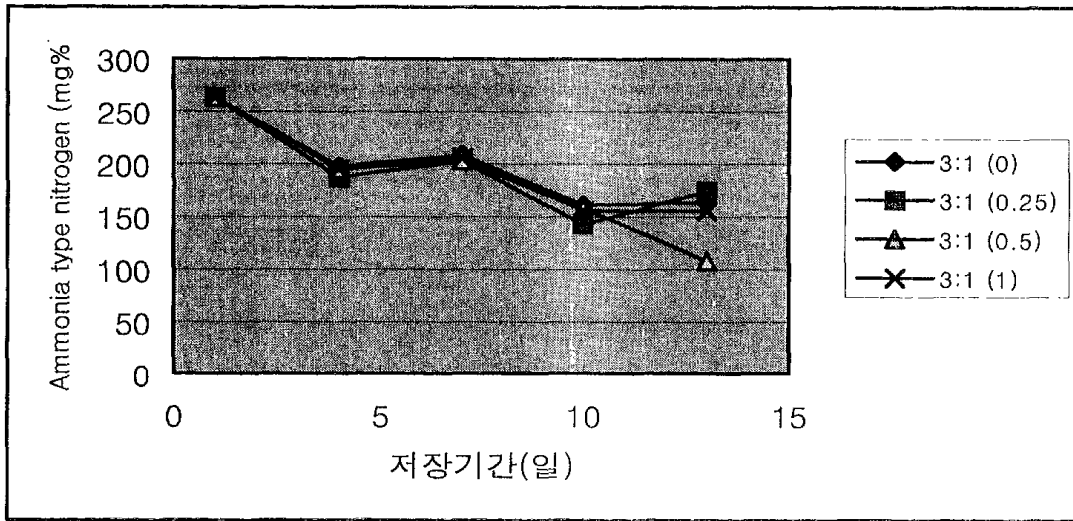
Fig 5-7. Changes in ammonia nitrogen content of rapid-*Doenjang* by different treatment



2) 방사선 조사구의 암모니아태 질소의 함량변화

방사선 조사구의 경우에는 역시 발효 초기에는 약 250mg%였다가 발효 후기에는 약 150mg%로 감소하는 경향을 나타냈다. 이는 방사선 비조사구와 동일한 경향을 나타낸 것으로 암모니아태 질소 감소 정도도 비슷했다.

Fig. 5-8 Changes in ammonia nitrogen contents of rapid-Doenjang by different treatments



3. 관능검사 결과

가) 비조사구 속성된장

방사선 비조사구 속성된장의 관능검사 결과는 Table 5-2. 과 같다.

갈색은 시판된장과 콩꼭자가 높은 값을 나타냈고, 전체적으로 koji를 많이 함유한 것일수록 진한 갈색을 나타냈다. 청국장을 가장 많이 함유한 4:1구는 7.9로서 가장 낮은 값을 보여 청국장을 많이 함유할수록 발효가 진행됨에 따라 갈색도는 낮은 값을 나타냈다. 짠냄새는 시판된장이 가장 높은값 (11.2)를 나타냈고, koji가 6.6으로 가장 낮은 값을 나타냈다. 그밖의 시료는 비슷한 값을 보였다. 콩 비린내는 청국장구와 koji구가 9.5, 9.8로서 가장 높은 값을 나타냈고 다른 구는 거의 비슷한 값을 나타냈다. 간장냄새는 시판된장이 가장 높은 값을 나타냈고 koji구가 가장 낮은 값을 나타냈다. 구수한 냄새는 1:1구가 가장 높은 값을 나타냈고 koji구가 가장 낮은 값을 나타냈다. 전체적으로는 koji를 많이 함유한 구보다는 청국장을 많이 함유한 구가 구수한 맛이 높은 값을 나타내었다. 꼬린내는 청국장구가 가장 높은 값을 나타냈고 다른 구들은 거의 비슷한 값을 나타냈다. 신냄새는 시판된장구가 가장 높은 값을 나타냈고 koji를 많이 함유한 구가 높은 값을 나타낸 것을 알수 있었다. 비린내는 koji구가 가장 높은 값을 나타냈고 다른 구들은 거의 비슷한 값을 나타냈다. 짠맛은 시판된장이 높은 값을 나타냈고 다른 구들은 거의 비슷한 값을 나타냈다. 단맛은 전체적으로 큰 차이가 없는 가운데 시판된장구가 가장 높은 값을 나타냈다. 비린맛은 koji구가 가장 높은 값을 나타냈고 전체적으로 koji를 많이 함유한 구가 높은 값을 나타냈다. 텁텁한 맛은 koji구와 청국장 구가 가장 높은 값을 나타냈고 다른구들은 비슷한 값을 나타냈다. 신맛은 청국장구와 시판된장구가 가장 높은 값을 나타냈고 다른 구들은 비슷한 값을 나타냈다. 이미는 koji구와 청국장구가 가장 높았고 koji를 많이 함유한 구일수록 높은 값을 나타냈다. 전체적인 기호도에서는 2:1과 3:1 구가 가장 높은 값을 나타냈다.

전체적인 실험결과를 분석해본 결과 청국장과 koji를 단독으로 제조하여 발효 숙성한 구보다는 적절한 배합을 이룬 2:1, 3:1 구가 전체적인 관능검사 항목에서 높은 값을 나타냈고 이는 시판된장보다 전체적인 관능적 기호도면에서 높은 것으로 판단되어 속성된장 제조시에는 청국장과 koji의 적절한 배합이 중요함을 관능검사에서 확인할 수 있었다.

Table 5-2. Sensory evaluation of Doenjang

	청국장	Koji	1:1	2:1	1:2	3:1	1:3	4:1	Com.
갈색**	7.4e	11.4ba	9.6dc	9.6ed	10.2bc	8.0e	10.4bac	7.9e	11.6a
짬냄새**	8.6b	6.6d	6.9cd	8.2cb	7.4cbd	8.6b	8.2cb	8.0cbd	11.2a
콩비린내*	9.5ba	9.8a	8.2bc	7.6c	7.7c	8.5bac	8.1bc	8.1bc	7.8c
간장냄새**	8.6b	6.2d	6.5d	8.0bc	7.0cd	8.4cb	7.6cbd	8.2cb	11.7a
구수한냄새**	7.9ba	5.5c	8.7a	8.1ba	7.6ba	8.2ba	7.0b	8.3ba	7.5ba
꼬란내	9.3a	8.8ba	7.6b	7.6b	7.6b	8.5ba	8.4ba	8.3ba	8.0ba
신냄새**	8.3ba	5.8d	6.3d	7.1bcd	5.8d	8.0bc	6.0d	6.8cd	9.4a
비린내(생선)	8.6ba	9.3a	7.7b	7.7b	7.5b	7.6b	8.2ba	7.3b	8.6ba
이취(off-odor)*	9.2a	9.3a	7.5b	7.0b	7.3b	7.5b	8.3ba	7.7b	8.5ba
구수한맛**	7.6ba	5.5c	7.8ba	7.4ba	7.3ba	7.8ba	6.7bc	8.2ba	8.7a
짬맛**	9.0b	9.5b	9.2b	8.7b	9.0b	8.9b	8.7b	8.4b	11.2a
단맛	7.0ba	5.9b	7.7a	7.6a	7.2ba	6.9ba	7.5a	7.3ba	8.0a
비린맛*	8.3bac	9.3a	8.6ba	6.9c	8.1bac	7.1bc	7.7bc	7.2bc	7.7bc
텃텃함맛	8.5ba	8.9a	7.8bac	7.1bc	7.2bc	7.1bc	7.3bc	6.9c	7.4bc
신맛**	9.2a	7.3b	7.4b	7.3b	6.9b	7.1b	6.3b	6.8b	9.2a
이미(off-taste)**	9.3ba	10.1a	8.4bdec	7.5de	8.0bdec	7.0e	9.1bac	7.7dec	8.9bdac
기호도**	5.4b	3.7c	6.5ba	7.0ba	6.7ba	7.8a	5.3b	6.8ba	6.0b

(* p<0.05, ** p<0.01)

There are significant difference among the values within the same column

나. 방사선 조사 속성된장의 관능검사 결과

방사선 조사한 속성된장의 관능검사 결과는 table. 5-3 과 같다.

갈색과 짠냄새에서는 시판된장과 재래된장이 가장 높은 값을 나타내었고 다른 구들은 비슷한 값을 나타내었다. 콩비린내는 전통된장구가 높은 값을 나타내었으나 유의성이 없는 것으로 나타났다. 구수한 냄새는 3:1구가 가장 높은 값을 나타냈고 조사선량 별로 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 시판된장과 재래된장은 가장 낮은 값을 나타내 대조적인 현상을 보였다. 이는 청국장베이스를 이용한 된장제조에 의해 강한 발효취에 의한 것으로 사료된다. 꼬린내, 비린내, 이취는 시판된장과 재래된장이 가장 높은 값을 나타냈고 다른구들은 비슷한 값을 나타냈다. 구수한 맛은 2:1구와 3:1구가 비슷한 값을 보여 가장 높았고 시판된장과 재래된장은 낮은 값을 보였다. 짠맛은 상대적으로 높은 염농도를 지닌 시판된장과 재래된장이 높은 값을 나타냈다. 비린맛과 텃텃한 맛, 그리고 이미는 재래된장과 시판된장이 가장 높은 값을 나타내었고 다른 구들은 비슷한 경향을 보였다. 기호도 면에서는 2:1, 3:1 구가 유의적인 차이가 없는 가운데 비슷한 값을 보였고 시판된장과 재래된장은 낮은 값을 나타냈다.

전체적으로 2:1, 3:1 구가 전체적인 관능적 평가에서 좋은 경향을 나타내었고 시판된장과 재래된장은 전체적이 기호도 면에서 낮은 경향을 나타내었다.

Table. 5-3 Sensory evaluation of irradiated Deonjang

	2:1(0)	2:1(0.25)	2:1(0.5)	2:1(1)	3:1(0)	3:1(0.25)	3:1(0.5)	3:1(1)	Com.	Trad.
갈색**	8.5cb	9.1cb	8.7cb	9.1cb	8.3c	8.3c	8.3c	8.5c	9.5b	10.4a
짠냄새**	7.7b	6.9b	7.2b	6.8b	7.7b	7.1b	7.6b	7.0b	10.1a	9.4a
콩비린내	7.5ba	7.2ba	7.5ba	7.0b	6.9b	6.9b	7.5ba	7.2ba	7.8ba	8.1a
구수한 냄새**	7.2ba	7.1ba	7.2ba	7.2ba	7.5a	7.6a	8.0a	7.9a	5.5c	6.3bc
꼬린내(끓끓)**	7.1b	7.3b	7.0b	7.1b	7.7b	7.0b	6.9b	7.0b	9.0a	9.2a
비린내(생선)**	7.0b	7.2b	7.3b	7.3b	7.2b	7.2b	7.2b	7.0b	8.6a	8.7a
이취(off-odor)**	7.1b	7.0b	7.4b	7.0b	7.4b	7.3b	7.3b	7.0b	10.3a	10.3a
구수한맛**	8.1a	8.0a	7.9a	8.5a	8.1a	8.7a	8.3a	8.3a	5.8b	6.4b
짠맛**	8.2bcd	8.3bc	8.4bc	9.1ba	7.6cd	7.2d	8.4bc	8.2bcd	10.1a	9.5a
비린맛*	7.7b	7.8b	7.5b	7.7b	7.5b	7.3b	8.0b	7.5b	9.1a	8.1ba
텃텃한맛**	6.6b	7.1b	7.5b	7.4b	6.5b	6.9b	7.6b	7.0b	9.0a	9.2a
이미(off-taste)**	7.2b	7.5b	7.6b	8.0b	7.4b	7.5b	8.2b	7.5b	11.2a	10.5a
기호도**	7.8a	7.8a	7.9a	7.9a	7.8a	8.1a	7.4a	8.5a	4.3b	4.9b

(* p<0.05, ** p<0.01)

There are significant difference among the values within the same column

요약

본 실험에는 단백질 분해력이 강한 *Aspergillus oryzae*와 역시 단백질 분해력이 강하고 청국장 제조에 가장 적합한 것으로 실험결과 나타난 *Bacillus amylolichefaciens* KU68 를 이용하여 koji와 청국장을 제조하고 여러가지 배합비율에 따라 숙성 된장을 제조하고 방사선 조사를 병행하여 된장의 발효 촉진정도를 분석하였다. 또한 숙성 후 관능검사를 실시하여 시판개량된장, 재래된장과 비교를 통해 관능적인 기호도를 조사했다. 이를 통해 숙성된장 최적의 조건을 찾아내어 숙성된장 제조의 최적 공정을 설정해 보고자 하였다. 발효 촉진정도를 알아보기 위한 실험에서 단백질 분해효소활성은 숙성기간 중 점차적으로 증가하는 경향을 보였다. 효소 종류에 따른 활성 정도는 neutral protease보다는 alkaline protease의 활성이 더 큰 것으로 나타났다. 발효 숙성의 중요한 지표인 아미노태 질소 함량에 있어서는 점차적으로 증가하는 경향을 나타내어 숙성 촉진효과가 있음을 알 수 있었다. 관능검사 결과에서는 청국장과 koji의 2:1, 3:1 배합구가 시판된장이나 청국장, koji단독구보다 전체적인 기호도가 높게 나타나 청국장과 koji의 적절한 배합이 관능적으로 좋은 결과를 나타냄을 알 수 있었다. 저선량 방사선 조사의 효과를 알아보기 위한 실험에서는 효소활성에는 방사선 저선량 조사가 영향을 미치지 않는 것으로 나타났고, 질소 성분의 함량 변화에도 유의성이 있는 효과는 보이지 않았다. 또한 관능검사에서도 유의성 있는 효과를 보이지 않았다. 이로써 방사선 조사에 의한 효과는 저선량(1kGy)이하에서 본 실험 결과를 통해서는 유의성 있는 효과를 보이지 않아 차후 보다 다양한 선량별로 된장의 숙성 효과를 알아보는 실험이 필요하겠다.

숙성 된장의 제조를 위한 최적의 공정은 실험 결과 *Bacillus*를 이용한 청국장과 *Aspergillus*를 이용한 koji의 2:1, 3:1 비율이 최적의 조합인 것으로 나타났다. 관능적인 평가를 해 본 결과 시판 된장보다 청국장취가 많은 점과 점액질 물질이 입안에서 주는 부정적인 감각이 해결해야할 과제로 나타났다.

여 백

제 6 장 속성 된장의 소비자 수용도 조사

제 1 절 서설

1. 실험목적

속성 발효 된장의 소비자 기호도 조사 및 시장성, 경제성 조사를 위해 생체촉매조합에 의해 발효 촉진된 된장을 약 100명의 소비자를 대상으로 시판 된장과 함께 기호도 조사를 실시하고, 동시에 원가계상을 통하여 경제성을 조사한다.

2. 연구배경 및 개요

현대 사회는 산업화, 도시화로 인하여 식생활 패턴에 있어서도 많은 변화를 보이고 있다. 현재 장류시장은 소비자의 직접제조에 의한 소비가 급격하게 감소되고 있는 시점으로서 대량생산에 의한 공장단위의 장류 제조가 가속화 되고 있다. 이러한 현시점에서 기존의 일본식 개량된장 제조법은 소비자들의 기호도 면에서 한계가 있다. 점점 소비자들도 맛과 향 면에서 우수한 고급 전통재래된장을 선호하기 때문에 된장의 제조법에 대한 보다 많은 연구가 필요한 시점이다.

본 연구에서 적용한 발효시스템은 재래된장의 발효시스템을 최대한으로 재현한 것으로서 재래메주의 발효과정 중에 일어나는 변화와 유사한 발효시스템을 도입해 보고자하였다. 재래된장은 제조기간이 길어서 산업화에는 어려움이 있기 때문에 대량생산에 적합한 속성발효 시스템을 개발하였고 각종 실험을 통하여 속성발효의 효과를 입증하였다. 또한 본 연구에서 실시한 생체촉매시스템에 의해 제조한 된장의 관능검사 결과 기존의 시판된장보다 기호도나 각종 관능검사 항목에서 우수한 결과를 나타내었다. 이와 더불어 본 실험에서는 산업화 적용을 위한 소비자 검증을 위하여 100여명의 패널들을 대상으로 관능검사를 실시함으로써 산업화의 가능성을 타진해보고자 하였다.

2001년도에 확대 허용 예정이던 조사식품 18종에 대한 추가 허가가 보류됨에 따라 방사선 조사 후 속성시킨 된장 시료의 소비자 기호도 검사는 시행할 수 없었다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 실험재료

가. 된장

앞선 연구들의 제조방법을 토대로 청국장과 콩꼭자를 제조하여 기호도 면에서 가장 좋은 결과를 나타낸 2:1과 3:1 혼합 비율을 적용하여 속성발효된장의 시제품을 해마식품에서 pilot-plant scale로 만들었다. 제조된 속성 된장은 30℃에서 30일간 숙성한 것을 사용하였다. 이와 함께 시판중인 재래적인 방법으로 제조된 된장 2개(장독 전통된장; 양평 지제농협, 재래식 순창된장; 순창 농협)를 함께 시료로 사용하였다.

2. 실험방법

가. 관능검사

1) Panel

고려대학교 생명과학부, 생명공학원 재학생 40명과 (주)해마식품의 직원 35명, 총 75명을 관능검사 패널로 선정하였다. 선정 인원을 연령별로 살펴보면 고려대학교 생명과학부, 생명공학원 학생은 주로 20대 중·후반이 대부분이고, 해마식품의 직원은 주로 30대이다.

2) 관능검사 방법

4개의 시료에 대한 기호도 조사를 위해 다음과 같은 관능검사 기호도 조사 sheet(Table 6-1)를 작성하였다. 제시된 sheet에 나타난 대로 각 된장을 맛을 본 후 각 된장의 기호도 항목에 대해 9가지 척도로 나누어 표시하도록 하였다. 시료의 번호에서 오는 선입견을 없애기 위해 각각의 시료번호는 3자리 난수표를 사용하였다.

Table 6-1. Sheet for Sensory Evaluation

기호도 검사(Acceptance test)

성명 :

일시 :

품명 :

설명 : 제시된 각 시료의 맛을 보아 그 시료에 대하여 귀하가 느끼는 좋다, 싫다의 정도를 가장 잘 묘사하는 9단계 기호척도의 해당 위치를 표시하십시오.

점수	시료기호 892	시료기호 238	시료기호 726	시료기호 109
9	___가장 좋다	___가장 좋다	___가장 좋다	___가장 좋다
8	___대단히 좋다	___대단히 좋다	___대단히 좋다	___대단히 좋다
7	___보통 좋다	___보통 좋다	___보통 좋다	___보통 좋다
6	___약간 좋다	___약간 좋다	___약간 좋다	___약간 좋다
5	___좋지도 싫지도 않다	___좋지도 싫지도 않다	___좋지도 싫지도 않다	___좋지도 싫지도 않다
4	___약간 싫다	___약간 싫다	___약간 싫다	___약간 싫다
3	___보통 싫다	___보통 싫다	___보통 싫다	___보통 싫다
2	___대단히 싫다	___대단히 싫다	___대단히 싫다	___대단히 싫다
1	___가장 싫다	___가장 싫다	___가장 싫다	___가장 싫다

제 3 절 결과 및 고찰

1. 관능검사 결과

청국장 베이스로 제조한 속성된장 두 종류 (2:1, 3:1)와 시판 된장에 대한 관능검사 결과는 Table 6-2과 같다.

일반 소비자 75명을 대상으로 한 소비자 기호도 조사에서는 순창재래된장이 6.2로 가장 높은 값을 나타냈고, 다음으로 속성제조법으로 만든 2:1, 3:1 된장이 5.5로 비슷한 기호도 값을 나타냈다. 그리고 장독 전통된장은 4.7로서 가장 낮은 기호도 값을 나타내었다. 순창재래된장, 속성된장, 장독전통된장 사이에는 1%수준의 유의차가 인정되었다. 이와 같은 결과로 볼 때 속성제조법에 의해 제조된 된장이 재래적 방법으로 제조한 된장과 기호도 면에서 큰 차이가 없는 것으로 나타났다.

조사 대상 소비자가 미래 장류 시장의 주요 소비층이 될 젊은 층임을 감안하고, 앞의 관능검사 결과를 토대로 분석했을 때, 생체축매조합에 의한 속성 된장 제조법이 앞으로의 공장 단위의 대량 생산 시스템에 적용 될 수 있을 것으로 판단된다.

Table 6-2. Sensory evaluation for rapid-*Doenjang*

	3:1 된장	순창 재래된장	2:1 된장	장독 전통된장
기호도	5.5 ^b	6.2 ^a	5.5 ^b	4.7 ^c

There are significant difference among the values within the same column ($p < 0.01$)

Appendix

Electron Spin Resonance Studies of Free Radicals in γ -Irradiated Soybean Paste

Eun-Joo Lee, Vitaly I. Volkov, and Cheri-Ho Lee

Graduate School of Biotechnology, Korea University, 1, 5-ka, Anam-dong, Sungbuk-ku, Seoul 136-701, Korea and Institute of Crystallography of Russian Academy of Science, Leninsky pr., 59, 117333, Moscow, Russia

**Journal of
Agricultural
and Food
Chemistry®**

Reprinted from
Volume 49, Number 7, Pages 3457–3462

Electron Spin Resonance Studies of Free Radicals in γ -Irradiated Soybean Paste

Eun-Joo Lee,[†] Vitaly I. Volkov,[‡] and Cherl-Ho Lee^{*,†}

Graduate School of Biotechnology, Korea University, 1, 5-ka, Anam-dong, Sungbuk-ku, Seoul 136-701, Korea and Institute of Crystallography of Russian Academy of Science, Leninsky pr., 59, 117333, Moscow, Russia

Free radicals in γ -irradiated soybean paste were investigated by electron spin resonance (ESR) spectroscopy to determine the effect of temperature (77–296 K) and moisture content (1–54%) of samples irradiated at high dose (1–40 kGy). The samples were kept in liquid nitrogen (77 K) during irradiation and subsequent ESR measurements. The spectra shown at 77 K consisted of the hydrogen atom lines at low and high field and complicated symmetric spectrum. By increasing the microwave power, the line shape of ESR spectra altered, which indicated the detection of different paramagnetic centers at different microwave powers. In saturation curves, it was possible to select four types of spectra components which were different in their relaxation times. By the different irradiation doses, the change in free radical concentration showed a curvilinearly increasing relationship with irradiation dose in wet samples, whereas a proportional relationship was observed with dried samples. This might indicate that the indirect process of free radical formation was involved with the existence of free water radicals in the wet samples.

Keywords: Free radicals; γ -irradiation; soybean paste; ESR

INTRODUCTION

The measurements of free radical concentration and its composition are important for the understanding of chemical reactions in food and biological systems, as well as for the understanding of physiological phenomena including the aging process (1–4). The difficulty of the measurement arises from the unstable (even nanosecond lifetime) nature of free radicals in food systems (5). The spin trap method and spin labeling techniques have been applied to capture free radicals in reaction (6–7). However, the dynamic of free radical formation in food systems is less understood and the methodology is not properly established.

The free radical nature may be more clearly understood if the irradiation treatment is done at low temperature, usually that of liquid nitrogen (8). In this case the radical transformation can be slow, and it may be possible to investigate the transformation by heating the sample after irradiating it at low temperature.

We have studied the radiation of fermented soybean products to improve the microbial and sensory quality of the products as raw ingredients for instant soup and condiments production (9).

On the basis of the previous results of irradiated soybeans (10–15), we have investigated ESR spectra of fermented soybean paste irradiated at 77 K to determine the effect of temperature (77–296 K) and moisture content (1–54%) on the free radical composition of samples irradiated at high doses (1–40 kGy). These

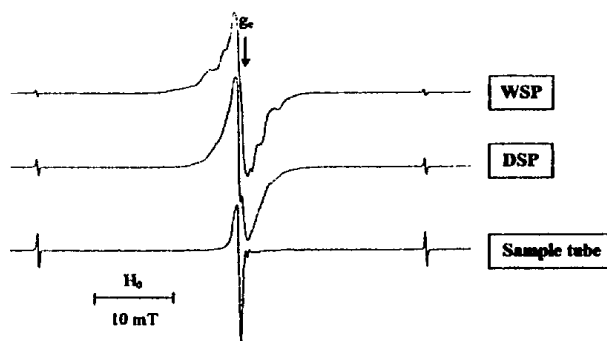


Figure 1. ESR spectra of wet soybean paste (WSP), dried soybean paste (DSP), and sample tube irradiated to 40 kGy at 77 K. The spectra were recorded at 77 K and microwave power of 5 mW.

observations could illustrate specifically the effect of enzymatic hydrolysis of soybean components by fermentation on the free radical formation during irradiation. The influences of irradiation dose, moisture content, and heating after irradiation on the free radical concentration and species of fermented soybean were examined.

MATERIALS AND METHODS

Sample Preparation. A traditional Korean fermented soybean paste, *chongkukjang*, was obtained from Pulmuone Co. in Seoul. It was made by growing *Bacillus subtilis* on cooked soybean for 2 days and mashed by adding salt. The approximate chemical composition was water (54.0%), protein (15.7%), lipid (9.0%), carbohydrate (16.1%), and ash (5.2%). For dry soybean paste (DSP), wet soybean paste (WSP) was freeze-dried, ground by a hammer mill to pass through 60 mesh screen, and stored at -20°C . To eliminate oxygen from the dry soybean paste, the sample tube was evacuated with 1×10^{-5} Torr by a vacuum pumping system (CT-2P, KVP Co., Korea) for 30 min. and then sealed by an acetylene torch.

* To whom correspondence should be addressed. Telephone (+82-2) 3290-3414. Fax (+82-2)927-5201. E-mail chlee@mail.korea.ac.kr.

[†] Korea University.

[‡] Institute of Crystallography of Russian Academy of Science.

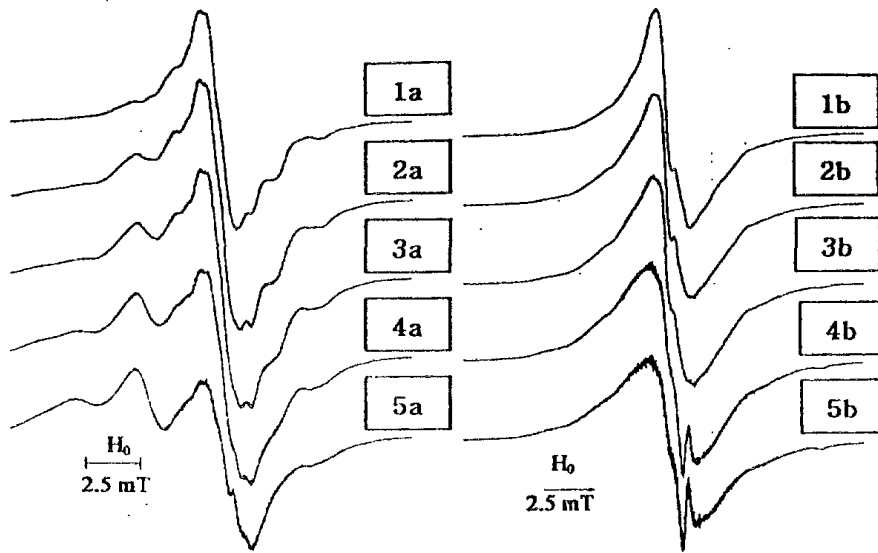


Figure 2. Central part of ESR spectra of wet soybean paste (WSP, spectrum a) and dry soybean paste (DSP, spectrum b) γ -irradiated at 77 K with the dose 40 kGy by different microwave powers; spectrum 1, 1 mW; spectrum 2, 10 mW; spectrum 3, 20 mW; spectrum 4, 100 mW; and spectrum 5, 200 mW. (Spectra recorded at 77 K.)

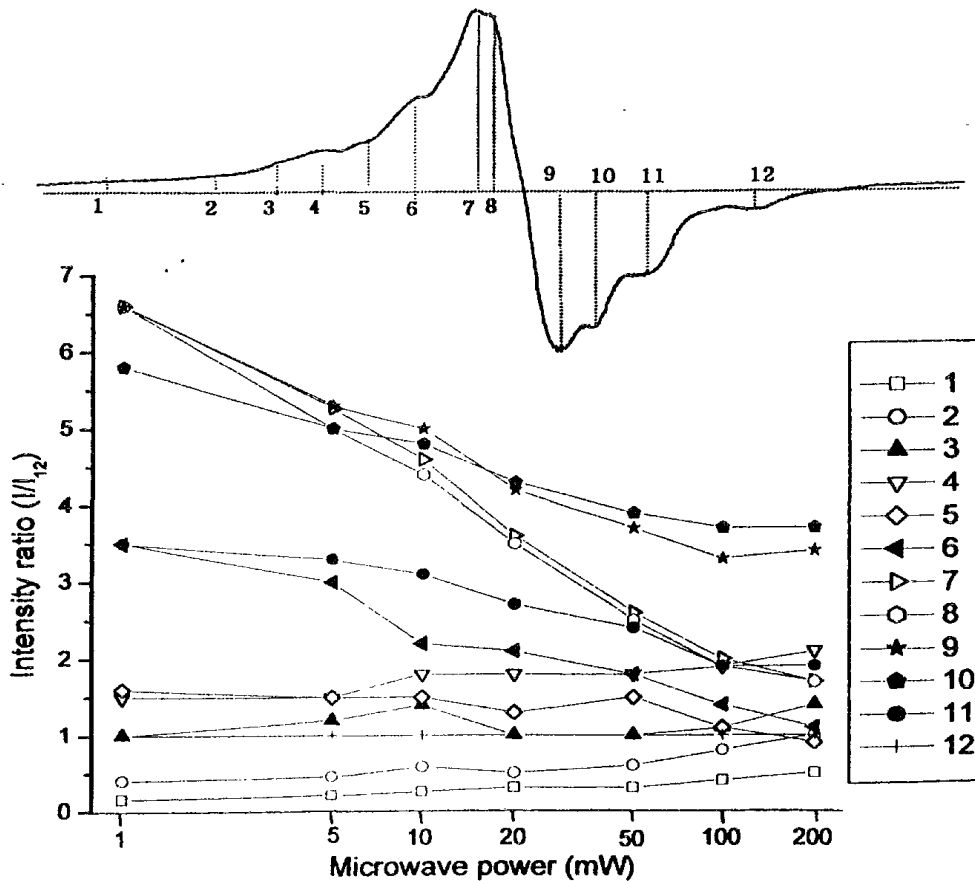


Figure 3. Saturation curves for different components of ESR spectra of wet soybean paste (WSP) γ -irradiated to 40 kGy and measured by different microwave powers. (The temperatures of γ -irradiation and ESR spectra recording were 77 K.)

Irradiation Conditions. Samples were put into ESR sample tubes (clear fused quartz, Wilmad Co., 707-SQ-250 m, Buena, NJ) and kept in liquid nitrogen throughout the irradiation process and collection of ESR measurements. Gamma irradiation was carried out with a cobalt-60 irradiator equipped with 100 kCi activity and operated at a dose rate of 7.8 kGy/hr. The absorbed dose was monitored with a ceric cerous dosimeter, and the actual dose levels, 0, 1, 2.5, 5, 7.5,

10, 15, 20, 25, 30, 35 and 40 kGy, were achieved by considering the shielding effect (30%) of the liquid nitrogen container. Because the ESR sample tube also was irradiated and an ESR signal was induced in the quartz, we irradiated the control ESR sample tube at the same conditions in order to separate the sample signals from those of the ESR sample tube.

Electron Spin Resonance (ESR) Measurements. ESR spectra were recorded on a Bruker ESP300S X band spec-

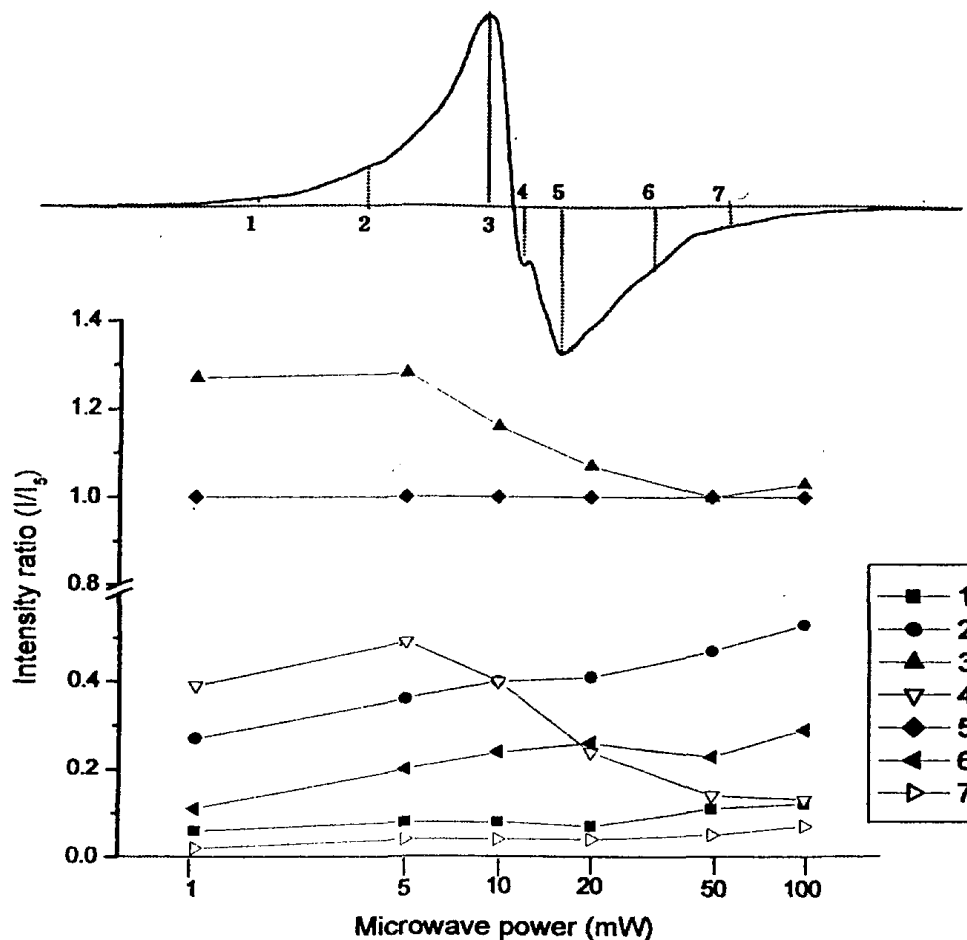


Figure 4. Saturation curves for different components of ESR spectra of dry soybean paste (DSP) γ -irradiated to 40 kGy and measured by different microwave powers. (The temperatures of γ -irradiation and ESR spectra recording were 77 K.)

trometer (Germany) at 77 K and equipped with a rectangular parallel-piped (TE102 mode) microwave cavity. The microwave frequency was 9.28 GHz. Microwave power varied from 1 mW (unsaturated ESR signal condition) to 200 mW. To investigate the thermo evolution of radicals, samples were heated to 120, 150, 190, 210, and 296 K for 5 min, and then cooled to liquid nitrogen temperature for ESR measurement.

RESULTS AND DISCUSSION

The ESR spectra of wet soybean paste irradiated to 40 kGy (WSP-40) and dry soybean paste powder irradiated to 40 kGy (DSP-40) at 77 K are shown in Figure 1. The spectra consisted of the hydrogen (H) atom lines at low and high field. The main spectra of WSP-40 and DSP-40 were near free electron position. WSP-40 showed multiplet structure, whereas DSP-40 showed mainly a singlet line with very low intensity of multiplet lines. Although the sample tube spectrum showed the doublet line of H atoms and some doublet lines near free electron position at the bottom, it was possible to propose that the H atom also stabilized in samples because the ratios of central and hydrogen signal intensities in samples were significantly higher than that of the sample tube.

Figure 2 shows the spectra at different microwave power from 1 to 200 mW. The line shape of spectra changed by microwave power, meaning that these spectra consist of different radicals. Unpaired electrons of these radicals possess different spin-spin (T_2) and spin-lattice (T_1) relaxation times. Alternated magnetic

field amplitude, H_1 is determined by microwave power, which is proportional to H_1^2 . For this reason, the relative ratio of line intensities (I) will be changed by the microwave power according to eq 1 (16):

$$I \sim H_1^2 \chi_0 \omega \omega_0 [T_2/1 + T_2^2(\omega_0 - \omega)^2 + \gamma^2 H_1^2 T_1 T_2] \quad (1)$$

where χ_0 = magnetic susceptibility, ω = microwave frequency, ω_0 = resonance microwave frequency, H_1 = magnetic field amplitude, and γ = electron gyro magnetic ratio.

The saturation curves are shown in Figures 3 and 4. The line positions shown in the figures are those indicated on spectra 1a and 1b in Figure 2. As shown in Figures 3 and 4, it was possible to select four types of spectra components which differed in their relaxation times: group I (lines 1, 2, 4, and 12); group II (lines 6 and 11); group III (lines 7 and 8); and group IV (lines 9 and 10) in WSP, and group I (lines 1 and 7); group II (lines 2 and 6); group III (lines 4 and 3); and group IV (line 5) in DSP. The different groups may indicate that they belong to the different types of radicals. The relaxation times increased as $T_1(\text{I}) < T_1(\text{II}) = T_1(\text{IV}) < T_1(\text{III})$ in WSP and $T_1(\text{I}) < T_1(\text{II}) < T_1(\text{IV}) < T_1(\text{III})$ in DSP. It shows that lines 6 and 11, and 9 and 10 in WSP may belong to the same type radicals.

Figure 5 shows the spectra obtained with 1 mW (panel a) and 200 mW (panel b) of microwave power. In wet paste (WSP-40), the $\cdot\text{OH}$ radical was properly observed

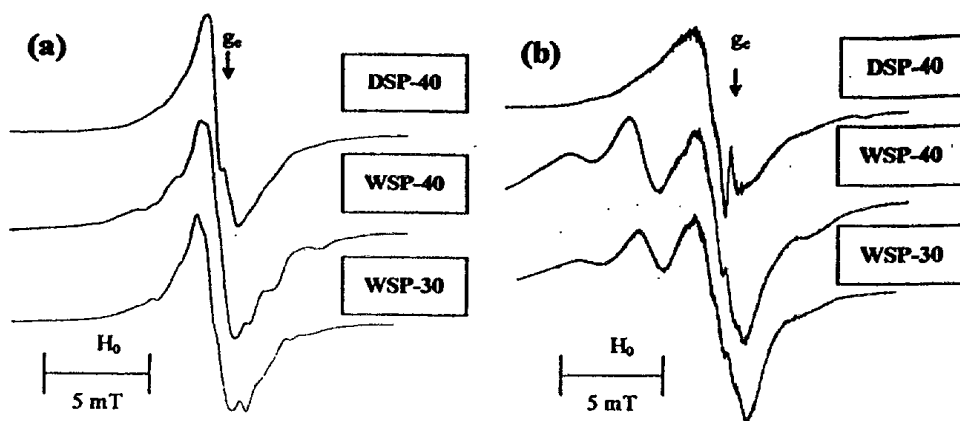


Figure 5. ESR spectra of samples measured at different microwave powers: (a), 1 mW; and (b), 200 mW. (WSP-40, wet soybean paste irradiated to 40 kGy at 77 K; WSP-30, wet soybean paste irradiated to 30 kGy at 77 K; and DSP-40, dried soybean paste irradiated to 40 kGy at 77 K). The spectra were recorded at 77 K.

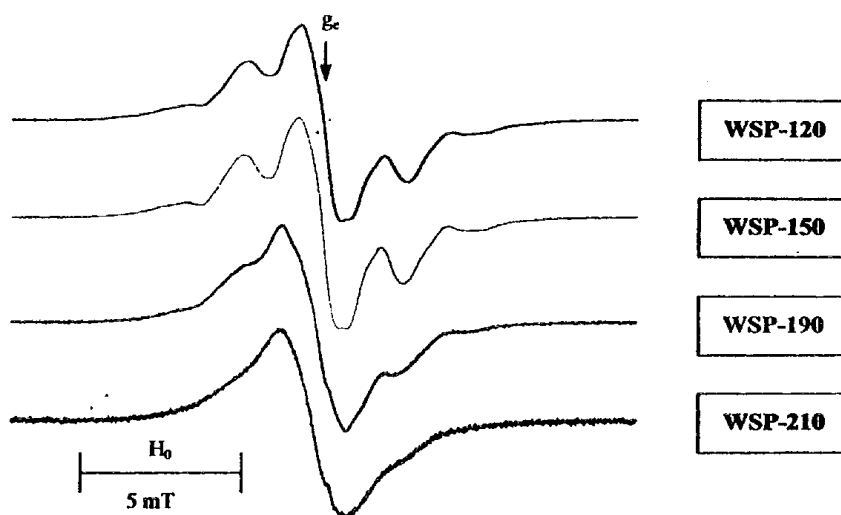


Figure 6. ESR spectra of the samples exposed at different temperatures for 5 min after irradiation to 40 kGy at 77 K. (WSP-120, wet soybean paste heated to 120 K after irradiation; WSP-150, wet soybean paste heated to 150 K after irradiation; WSP-190, wet soybean paste heated to 190 K after irradiation; and WSP-210, wet soybean paste heated to 210 K after irradiation). Microwave power was 5 mW.

with 200 mW of microwave power, because this radical has short spin relaxation time when compared to that of other paramagnetic centers, which were determined by the spectrum at low microwave power. In the dry sample (DSP-40) the water radical ($\cdot\text{OH}$) spectrum was absent. Among the multiplet lines, WSP-30 showed clearly the doublet line near the free electron position with the splitting about 2 mT that usually obtained in irradiated amino acids (17).

By heating after irradiation the $\cdot\text{OH}$ radicals disappeared and the multiplet line shape was symmetrical as shown in Figure 6. By the variation of microwave power we could see that ESR spectra are determined by three types of radicals which have different relaxation times. The relative intensities of three lines: singlet, triplet, and eight component lines, changed independently with increasing microwave power and temperature variation. Triplet and octet lines were symmetrical near $g = 2.005$ which is typical for the radicals in which the unpaired electron is localized on carbon (16). It is very important to know what part of soybean paste these lines belong to. At the elevated temperature above 0 °C some stable radicals remained

in dry sample, whereas they disappeared completely in wet samples (18).

To understand the influence of oxygen and water on the radical processes, the DSP evacuated at 1×10^{-5} Torr was tested. As shown in Figure 7, the ESR spectra of dry soybean paste (DSP) in air and in a vacuum were identical at 77 K, demonstrating that the induced radicals during irradiation were the same. By heating, however, the ways of radical recombination were different from each other. At 120 K, the ESR spectra of DSP in air and in a vacuum were similar, but the intensity of the central line in DSP in air was less than DSP in vacuum. The change in ESR line shape due to elevated temperature was aggravated by the existence of oxygen. The free radical concentration in DSP in a vacuum was not only decreased, but also transformed.

The number of paramagnetic centers in a sample may be calculated according to eq 2 (16):

$$N = \alpha[S(T - T_c)V]/[\omega g Q P_o^{1/2} A \eta] \quad (2)$$

where α = numerical coefficient ($\alpha = 3k/\pi^2\beta h S(S + 1)$); S = area under the absorption curve; T = temperature

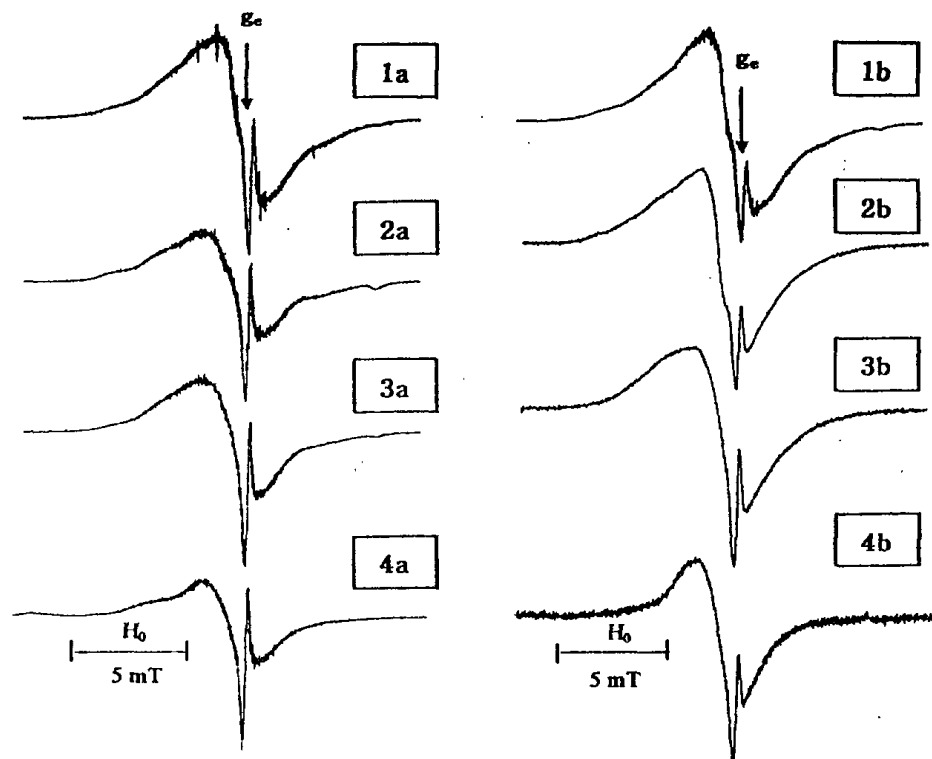


Figure 7. ESR spectra of dry soybean paste in a vacuum (a) and in air (b) measured with high (200 mW) microwave power. Samples were kept at 77 K (1), 150 K (2), 190 K (3), and 296 K (4) for 5 min respectively after irradiation at 77 K. The spectra were recorded at 77 K.

of the sample; T_c = curie temperature; V = volume of the sample; ω_o = the resonance absorption frequency in a uniform magnetic field; Q_o = quality factor of the resonator; A = saturation factor; P_o = power of the klystron; and $A\eta$ = filling factor of the resonator.

However, in practice this is impossible to calculate because of the inaccurate determination of a whole series of parameters. The radical concentration is usually measured by comparing the intensities of the ESR signals of the substance being studied with a standard with a known number of paramagnetic particles (N_{st}). The paramagnetic particles number (N) and radical concentration (C) of sample were calculated from the approximate formula shown in eqs 3 and 4 (16).

$$N = N_{st} B (S/S_{st}) \quad (3)$$

$$C = N / \text{weight of sample (g)} \quad (4)$$

where $B = [Q_o^2 t g^2 (T - T_c) A_{st} \eta V] / [Q_o g (T - T_c)_{st} A V_{st} \eta] = 1$.

The areas S and S_{st} were found by double integration when the first derivative of the absorption signal was recorded. We used 0.005 g of copper sulfate pentahydrate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) single crystal for standard material. When the molecular weight of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ was 250 g, the molecule number was Avogadro's number, 6×10^{23} . Therefore the molecule number (N_{st}) of 0.005 g of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ was calculated to 1.2×10^{19} and the signal area (S_{st}) of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ was 2.055×10^9 . For example, when the signal area (S) of 1 g of WSP at 5 kGy was 9.11×10^8 , the number of paramagnetic particles (N), and thus the radical concentration (C), was calculated to 5.32×10^{16} .

Figure 8 shows the free radical concentrations calculated by means of double integration of the ESR

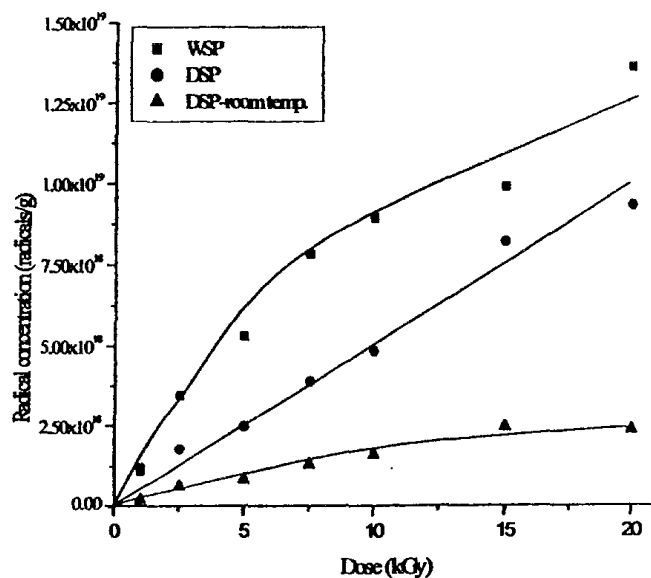


Figure 8. Dose dependence of average radical concentration of fermented soybean paste products irradiated and recorded at 77 K (WSP, wet soybean paste; DSP, dried soybean paste; and DSP-room temp., dried soybean paste irradiated at 77 K and then exposed to room temperature for 15 min). The spectra were recorded at 77 K.

spectrum of wet soybean paste (WSP), dry soybean paste (DSP), and DSP exposed to room temperature for 15 min after irradiation.

The free radical concentration in WSP was much higher than that of DSP at the lower irradiation doses. In wet sample, the changes in free radical concentration showed curvilinear relation with irradiation dose; the free radical concentrations increased rapidly by the

irradiation to 1–5 kGy, but slowly by the high dose. On the other hand, the free radical concentration in the dry sample was much lower than that of the wet sample and showed a proportional relationship with irradiation dose. This may indicate that the indirect process of free radical formation was involved with the existence of free water radicals in the wet sample (19). A large number of free radicals disappeared by heating to room temperature for 15 min. So we could expect direct process in dry samples and indirect processes in wet samples to occur.

ACKNOWLEDGMENT

We thank the Korea Atomic Energy Research Institute (KAERI) for irradiation and the Korea Basic Science Institute (KBSI) for ESR measurements. We are grateful to Dr. M. W. Byun in KAERI and Dr. I. W. Park in KBSI for their excellent technical assistance.

LITERATURE CITED

- (1) Yamaguchi, F.; Yoshihiro, Y.; Nakazawa, H.; Ariga, T. Free radical scavenging activity of grape seed extract and antioxidants by electron spin resonance spectrometry in an H₂O₂/NaOH/DMSO system. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 2544–2548.
- (2) Dadayli, D.; Sünnetçioğlu, M. M.; Köksel, H.; Çelik, S. Detection of irradiated wheat using the electron paramagnetic resonance. *Cereal Chem.* **1997**, *74* (4), 375–378.
- (3) Sünnetçioğlu, M. M.; Dadayli, D.; Çelik, S.; Köksel, H. Application of the electron paramagnetic resonance spin probe technique for detection of irradiated wheat. *Cereal Chem.* **1998**, *75* (6), 875–878.
- (4) Raffi, J.; Identifying irradiated foods. *Trends Anal. Chem.* **1998**, *17* (4), 226–233.
- (5) Punchard, N. A., Kelly, F. J., Ed. *Free Radicals – A Practical Approach*; Oxford University Press: New York, 1996; pp 1–8.
- (6) Kristensen, D.; Skibsted, L. H. Comparison of three methods based on electron spin resonance spectrometry for evaluation of oxidative stability of processed cheese. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 3099–3104.
- (7) McPhail, D. B.; Gardner, P. T.; Dutie, G. G.; Steele, G. M.; Reid, K. Assessment of the antioxidant potential of scotch whiskeys by electron spin resonance spectroscopy: relationship to hydroxyl-containing aromatic components. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 1937–1941.
- (8) Wasik, R. J.; Bushuk, W. Free radicals in flour, starch and gluten produced by ball-milling, electric discharge and gamma-irradiation. *Cereal Chem.* **1973**, *50*, 654–660.
- (9) Ahn, B. S. Studies on the volatile compounds in *chungkukjang* irradiated with high-dose gamma irradiation. Ph.D. Thesis, Korea University, Korea, 2000; pp 26–28.
- (10) Hafez, Y. S.; Mohamed, A.; Singh, G.; Hewedy, F. M. Effects of gamma irradiation on proteins and fatty acids of soybean. *J. Food Sci.* **1985**, *50*, 1271–1274.
- (11) Byun, M. W.; Kwon, J. H.; Mori, T. Improvement of physical properties of soybean by gamma irradiation. *Radiat. Phys. Chem.* **1993**, *42*, 313–317.
- (12) Byun, M. W.; Kang, I. J.; Kwon, J. H.; Hyashi, Y.; Mori, T. Physicochemical properties of soybean oil extracted from γ -irradiated soybeans. *Radiat. Phys. Chem.* **1995**, *46*, 659–662.
- (13) Byun, M. W.; Kang, I. J.; Mori, T. Effect of γ -irradiation on the water-soluble components of soybeans. *Radiat. Phys. Chem.* **1996**, *47*, 155–160.
- (14) Farag, M.; Diaa El-Din H. The nutritive value for chicks of full-fat soybeans irradiated at up to 60 kGy. *Anim. Feed Sci. Technol.* **1998**, *73*, 319–328.
- (15) Hwang, K. T.; Park, J. Y.; Kwon, Y. J. Hydrocarbons detected in irradiated soybeans. *Korean J. Food Sci. Technol.* **1998**, *30*, 517–522.
- (16) Pshchetskii, S. Y.; Kotov, A. G.; Milinchuk, V. K.; Roginskii, V. A.; Tupikov, V. I. *EPR of Free Radicals in Radiation Chemistry*. Halsted Press: New York, 1972.
- (17) Neta, P.; Fessenden, R. W. Electron Spin Resonance study of Deamination of Amino Acids by Hydrated Electrons. *J. Phys. Chem.* **1970**, *74*, 2263–2266.
- (18) Lee, E. J.; Volkov, V. I.; Byun, M. W.; Lee, C. H. Detection of free radicals in γ -irradiated soybean paste and model system by electron spin resonance spectroscopy. *Radiat. Phys. Chem.* **2001**, (in press).
- (19) Henriksen, T.; Mela, T. B.; Saxebel, G. *Free Radical in Biology*. Academic Press: London, 1976.

Received for review February 20, 2001. Revised manuscript received May 8, 2001. Accepted May 9, 2001. This study was partially supported by the Agricultural R&D Promotion Center (ARPC, project no. 19990401) and the Korea Institute of Science & Technology Evaluation and Planning (KISTEP).

JF010227T

Magnetic Resonance in Food Science

A View to the Future

Edited by

G. A. Webb

University of Surrey, Guildford, UK

P. S. Belton

AFRC Institute of Food Research, Norwich, UK

A. M. Gil

University of Aveiro, Portugal

I. Delgadillo

University of Aveiro, Portugal

Magnetic Resonance in Food Science

A View to the Future

Edited by

G. A. Webb

University of Surrey, Guildford, UK

P. S. Belton

AFRC Institute of Food Research, Norwich, UK

A. M. Gil

University of Aveiro, Portugal

I. Delgadillo

University of Aveiro, Portugal

Contents

A View Towards the Next Century

- Recent Advances in Solid-State NMR 3
R. K. Harris
- Characterisation of Meat Structure by NMR Imaging at High Field 17
J. M. Bonny, W. Laurent and J. P. Renou
- MRI Indicators for Measuring pH and Redox in Food 22
S. D. Evans and L. D. Hall
- Rheo-NMR of Carrageenan Gels and Sols 29
P. T. Callaghan and A. M. Gil
- An Insight into the Structure of Foods Using ^{13}C and ^1H Magic Angle Spinning (MAS) NMR: Application to Wheat Dough 43
A. M. Gil, E. Alberti and D. Santos
- Hyphenated Methods in NMR 54
M. Spraul, V. Braumann, M. Godejohann and M. Hofmann
- Relationships between Sensory Texture of Soft Cheese and MRI Measurements 67
F. Mariette, G. Collewet, P. Fortier and J. M. Soulie
- Mannitol Production by a Genetically Modified *Lactococcus Lactis* Strain Studied by ^{13}C NMR *In Situ* 75
A. R. Neves, A. Ramos and H. Santos

Food Safety and Health

- MRI of Gastric Function 85
P. A. Gowland, L. Marciani, A. Fillery-Travis and R. C. Spiller
- Detection of Free Radicals in γ -Irradiated Soybean Paste by Electron Spin Resonance Spectroscopy 98
E. J. Lee, V. I. Volkov and C. H. Lee
- Suppression Effects of Spice Plants on Free Radical Formation 105
B. L. Milic, S. M. Djilas and N. B. Milic

Eun-Joo Lee, Vitaly I. Volkov¹ and Cherl-Ho Lee

Graduate School of Biotechnology, Korea University
¹Institute of Crystallography of Russian Academy of Science

1 INTRODUCTION

The measurement of free radicals in food and biological systems by ESR spectroscopy are widely used in the fields of food irradiation, lipid oxidation, antioxidants and food processing. The difficulty of the measurement arises from the unstable, even nanosecond lifetime, nature of free radicals in food system¹. Spin trap method and spin labeling techniques has been applied to capture free radicals in reaction^{2,3}. However, the dynamic of free radical formation in food systems is less understood and the methodology is not properly established. Some approaches have been reported recently by using irradiated wheat⁴ and extruded flour⁵.

The free radical nature may be more clearly understood if the irradiation treatment is done at low temperature (usually liquid nitrogen temperature). In this case the radical transformation may be investigated by heating after irradiation at low temperature.

We have investigated ESR spectra of fermented soybean paste irradiated at 77 K and compared with those of soybean protein isolate and soybean oil. This set of objects gave the possibility of investigating the effect of enzymatic hydrolysis of soybean components by fermentation on the free radical formation during irradiation. The influences of irradiation dose, moisture content and heating after irradiation on the free radical concentration and species were examined.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Sample preparation

A traditional Korean fermented soybean paste, Chongkukjang, was obtained from Pulmuone Co. in Seoul. It was made by growing *Bacillus subtilis* on cooked soybean for two days and mashed by adding salt. The proximate chemical composition was water (54.0%), protein (15.7%), lipid (9.0%), carbohydrate (16.1%) and ash (5.2%).

The wet soybean paste (WSP) was freeze dried to make dried soybean paste powder (DSP). WSP was mixed with same amount of water and centrifuged at 1,2000x g for 15 min to make soluble fraction (SSF) and insoluble residue (ISF). Soybean protein isolate (SPI) and soybean oil (SOI) were used as reference samples.

2.2 Irradiation conditions

Samples were put in ESR sample tube (Clear Fused Quartz, William Co., 707-SQ-250m, USA) and kept in liquid nitrogen throughout irradiation process and ESR measurements. Gamma irradiation was carried out with a cobalt-60 irradiator equipped with 100 kCi activity and operated at a dose rate of 7.8 kGy/hr. The absorbed dose was monitored with a ceric cerous dosimeter, and the actual dose levels, 0, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 and 70 kGy, were achieved by considering the shielding effect (30%) of the liquid nitrogen container.

2.3 Electron Spin Resonance (ESR) measurements

ESR spectra were recorded on a Bruker ESP300S X band spectrometer. The microwave frequency was 9.28 GHz. Microwave power varied from 1 mW (unsaturated ESR signal condition) to 200 mW. In order to investigate the thermo evolution of radicals, samples were heated to 120, 150, 190, 210 and 296 K for 5 min respectively, and then cooled down to liquid nitrogen temperature for ESR measurement.

3 RESULTS AND DISCUSSION

Figure 1 shows the free radical concentrations calculated by means of double integration of ESR spectrum of wet soybean paste (WSP), dried soybean paste (DSP) and DSP exposed to room temperature for 15 min after irradiation. The free radical concentration in WSP was much higher than that of DSP at low irradiation dose. In wet sample, the change in free radical concentration shows curvilinear relation with irradiation dose, while a proportional relationship was observed with dried sample. This may indicate that the indirect process of free radical formation was involved with the existence of free water radicals in wet sample. A large number of free radicals disappeared by heating to room temperature for 15 min.

Figure 2 compares the ESR spectra of wet soybean paste irradiated to 40 kGy (WSP-40) and dry soybean paste powder irradiated to 40 kGy (DSP-40) at 77 K. At the bottom, the sample tube spectrum shows the doublet lines of H atoms and also some doublet lines near free electron position. The main spectra of WSP-40 and DSP-40 were near free electron position. WSP-40 showed some multiplet structure, while DSP-40 showed mainly singlet line with very low intensity of multiplet lines.

Figure 3 shows the spectra obtained with 1 mW and 200 mW of microwave power. In wet paste (WSP-40), the \bullet OH radical was properly observed with 200 mW microwave power, because this radical has short spin relaxation time compare to other paramagnetic centers, which were determined by the spectrum at low microwave power. In dry sample (DSP-40) the water radical (\bullet OH) was absent. So we could expect direct process in dry sample and indirect processes in wet samples to occur. Among the multiplet lines, WSP-30 shows clearly the doublet line that usually obtained in irradiated amino acids in the form of radical (FR1) in Table 1.

By heating after irradiation the \bullet OH radicals disappeared and the multiplet lines shape was symmetrical as shown in Figure 4. By the variation of microwave power we could see that the ESR line in WSP was the superposition of singlet, triplet and eight component lines. Triplet and octet lines were symmetrical near $g = 2.005$ what was typical for the radicals where unpaired electron is localized on carbon⁶. It is very important to know what part of soybean paste these lines are belong to.

In order to understand the origin of multiplete lines, the spectra of soybean protein isolated (SPI), soybean oil (SOI) and soluble fraction of WSP were investigated. Soluble fraction (SSF) spectrum consists of triplet and octet lines mainly, same as WSP. Dried soybean protein show same line shape with WSP but the component position was little bit differ. It may be arisen by the different structure of proteins. Soybean protein contains mainly globular protein, while fermented soybean proteins are peptides and hydrolyzed proteins in random coil. In case of soybean oil, the spectra were far differ from those of WSP. From these results, we can conclude that the multiplete lines indicate the free

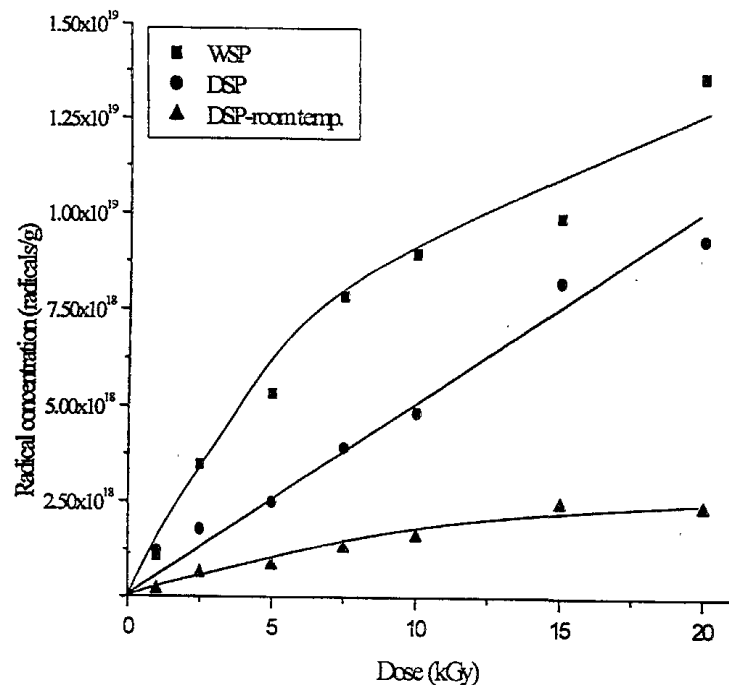


Figure 1 Dose dependence of average radical concentration of fermented soybean paste products irradiated and recorded at 77 K. (WSP: wet soybean paste, DSP: dried soybean paste and DSP-room temp.: dried soybean paste irradiated at 77 K and then exposed to room temperature for 15 min.) The spectra were recorded at 77 K

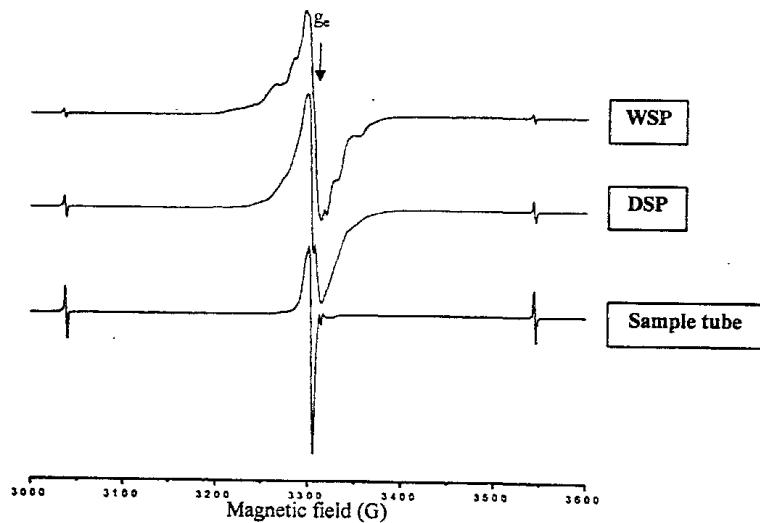


Figure 2 ESR spectra of wet soybean paste (WSP), dried soybean paste (DSP) and sample tube irradiated to 40 kGy at 77 K

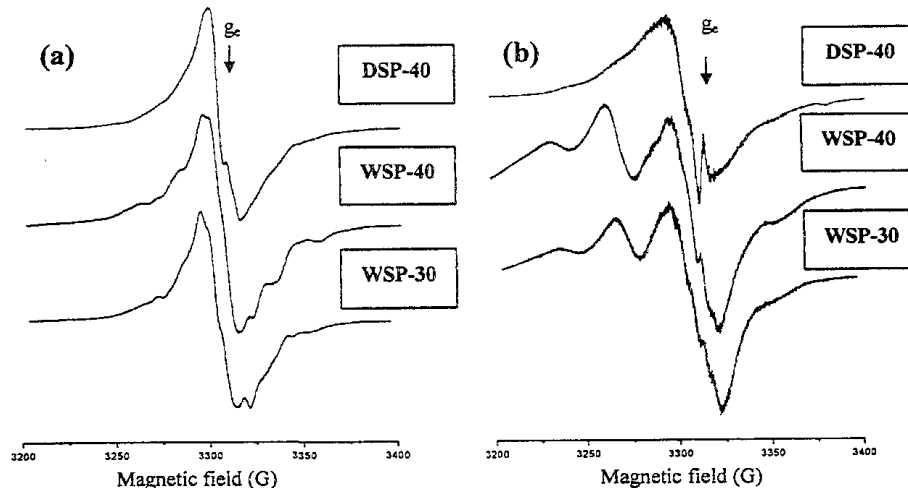


Figure 3 ESR spectra of sample measured at different microwave power: (a) - 1 mW, (b) - 200 mW. (WSP-40: wet soybean paste irradiated to 40 kGy at 77 K, WSP-30: wet soybean paste irradiated to 30 kGy at 77 K, and DSP-40: dried soybean paste irradiated to 40 kGy at 77 K) The spectra were recorded at 77 K.

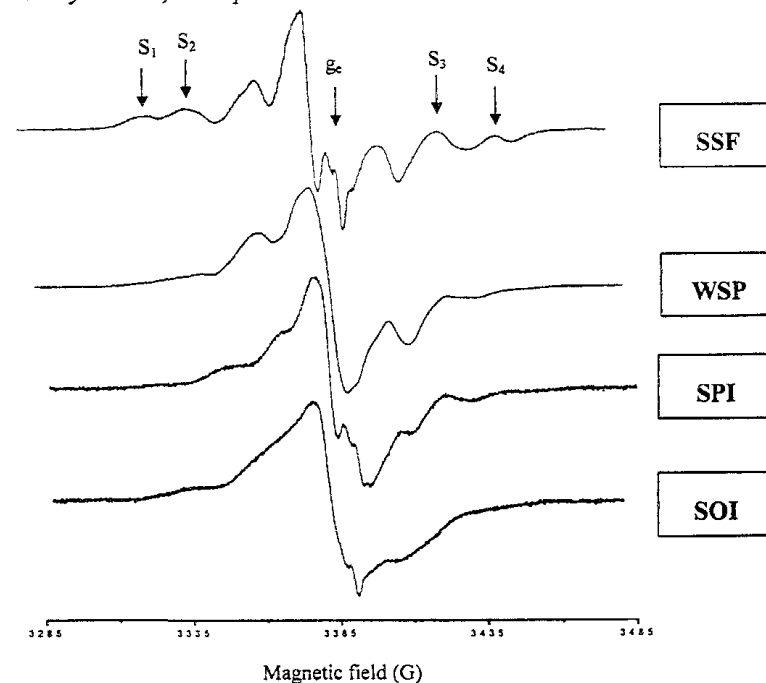


Figure 4 ESR spectra of the samples heated to 120 K for 5 min after irradiation to 40 kGy at 77 K (WSP: wet soybean paste, SSF: soluble fraction of WSP, SPI: air dried

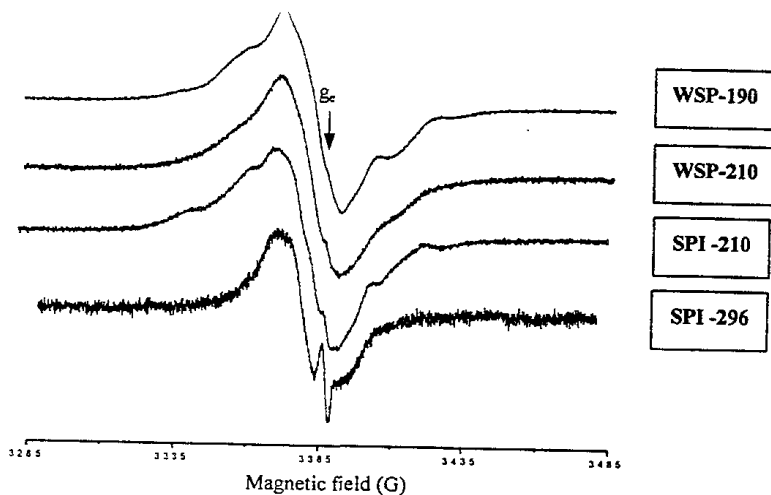


Figure 5 ESR spectra of the samples exposed at different temperatures for 5 min. after irradiation to 40 kGy at 77 K. (WSP-190: wet soybean paste heated to 190 K after irradiation, WSP-210: wet soybean paste heated to 210 K after irradiation, SPI-210: soybean protein isolate heated to 210 K after irradiation and SPI-296: soybean protein isolate heated to 296 K after irradiation.)

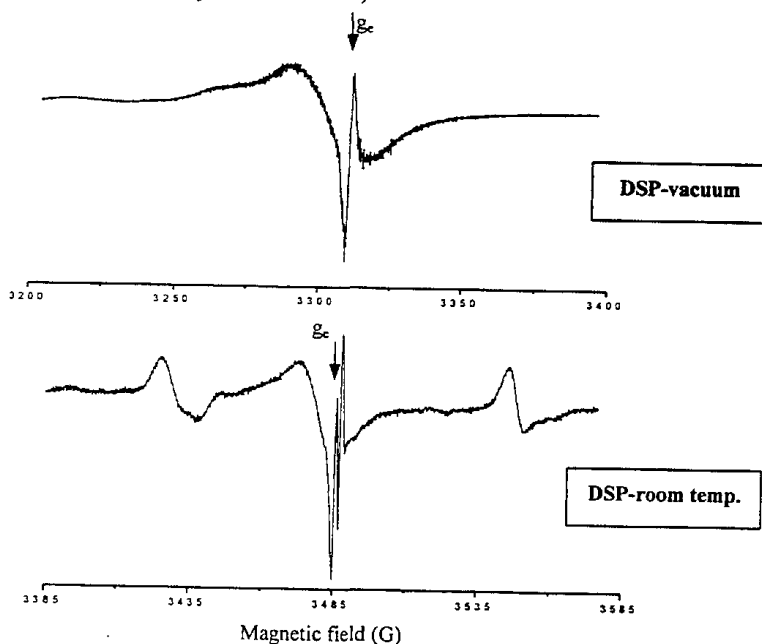


Figure 6 ESR spectra of dried soybean paste treated with different conditions. (DSP-vacuum: dried soybean paste packed with vacuum sealing and then irradiated to 40 kGy at 77 K, and ESR spectrum was measured at 77 K after heating at room temperature for 5 min, DSP-room temp.: dried soybean paste packed in open tube and irradiated to 1 kGy at 77 K and measured at room temperature after heating at room temperature for 45 min.) Microwave power was 200 mW.

Table 1 Free radicals in irradiated soybean paste proposed by the analysis of ESR spectra.

Radical type (supposing structure)	Amount of lines	ESR parameter	Wet		Dry	
			Amount	Disappearing temp. (K)	Amount	Disappearing temp.(K)
FR1 $\text{H}_3\text{NCHCOO}^{\cdot-}$ R •	2	$g=2.0035$ $\alpha=18-20\text{G}$	Middle	120 150	Small	150
FR4 $\begin{matrix} \text{H} \\ \\ \bullet\text{C} - \left[\text{NH}_2^+ \right] \\ \\ \text{R} \quad \left[\text{COO}^- \right] \end{matrix}$	5	$g=2.004$ $\alpha_{\text{H}} = \alpha_{\text{H}}^{\text{H}(1)} =$ $1/2 \alpha_{\text{H}}^{\text{H}(2)} =$ 22G	Middle	210	Small	210
FR2 $\text{H}_3\text{N}-\text{C}-\text{COO}^{\cdot-}$ R •	3	$g=2.005$ $\alpha=21\text{G}$	Large	190	Small	210
FR3 $\text{H}_3\text{N}-\text{CH}-\text{COO}^{\cdot-}$ •R	8	$g=2.004$ $\alpha_{\text{H}} = 18\text{G}$ $\alpha_{\text{H}}^{\text{H}(1)} = 1/2 \alpha_{\text{H}}^{\text{H}(2)}$ $= 22\text{G}$	Middle	150	Very small	—
-S•	3 asymme- trical line	$g_1=2.003$ $g_2=2.005-2.028$ $g_3=2.062-2.064$	Very small	300	Middle more in vacuum	300
•CHO	2 doublet lines	$g_1=2.0035$ $\alpha=120\text{G}$	Not detected		Middle	300
•OH	3 asymme- trical line	$g_1=2.049$ $g_2=2.030$ $g_3=2.010$	Very large	77-120	Not detected	

radicals formed in the protein part by irradiation. The triplet line may indicate the radical FR2^{6,7} and octet lines represents radical FR3^{6,7} in Table 1.

As shown in Figure 5, the spectrum consist of a singlet line and five line mutiplet, which is possibly identified as FR4^{6,7} radicals formed by deamination and decarboxylation of amino acids. The symmetrical multiplet lines were first apparent at the elevated temperature from 77 K to 190 K in case of WSP and to 210 K in case of SPI. The symmetrical multiplet lines belonged to the free radicals where the unpaired electrons were located on carbon atom.

At the elevated temperature above 0°C some stable radicals remained in dry sample, while they disappeared completely in wet samples. Figure 6 shows a line found after heating at 296 K of dried soybean protein (SPI) in vacuum. This asymmetric triplet line was identified as sulfur radical having g values, $g_1=2.003$, $g_2=2.025-2.028$ and $g_3=2.062-2.064$. This radical is due to moving free electron on the long distance, even from one amino acid to the neighbor ones. So sulfur is functioning as amino acid - electron catcher. In vacuum the maximal intensity was observed because O₂ existence gave rise to the unpaired electron recombination.

Another radical identified at the elevated temperature of 296 K was aldehyde radical^{8,9,5} in dried soybean paste, as shown in Figure 6. The hyperfine constant was 120 G, and the isotropic g-value 2.0035 which were comparable to those of aldehyde radical^{10,11}.

Table 1 summarizes the important radicals supposed to be identified in this study. Four different carbon type free radicals, FR1 - FR4, were identified as the product of amino acid decomposition. In case of FR1, the doublet line arises from the hydrogen atom on the β -carbon adjacent to carbonyl free radical. It disappeared at 150 K. FR2 was most abundant and disappeared at 190 K in WSP and at 210 K in DSP respectively. The radical FR4 originated from decarboxylation and deamination of amino acids, it disappeared at 210 K in both WSP and DSP. FR3 was formed by the damage of amino acid side chains. The radical \bullet OH was originated from water molecules, and was not observed in dry system. Sulfur radical was stable even at room temperature observed in both wet and dry systems. Aldehyde radical must be originated from the chemical reactions of enzymatic hydrolysates of soybean. It is often observed in processed foodstuff, like dried squid and steamed frozen fish¹².

References

1. N.A. Punchard and F.J. Kelly, in *Free Radicals-A Practical Approach*, Oxford University Press, 1996, Chapter 1, p 6.
2. D.Kristensen and L.H. Skibsted, *J.Agric. Food Chem.*, 1999, 47, 3099.
3. D.B.McPhail, P.T.Gardner, G.G.Dutie, G.M.Steele and K.Reid, *J.Agric. Food Chem.*, 1999, 47, 1937.
4. M.Korkmaz and M.Polat, *Radiat. Phys. Chem.*, 2000, 58, 169.
5. K.M.Schaich and C.A. Rebello, *Cereal Chem.*, 1999, 76(5), 748.
6. S.Y.Pshezhetskii, A.G.Kotov, V.K.Milinchuk, V.A.Roginskii, and V.I.Tupikov, in *EPR of Free Radicals in Radiation Chemistry*, a Halsted press, 1972.
7. T. Henriksen, T.B. Mela and G. Saxebel, in *Free radical in Biology*, Vol.2, ed Academic Press, 1976.
8. T. Henriksen, T.Sanner and A.Pihl., *Rad. Research*, 1963, 18, 163.
9. T. Henriksen, T.Sanner and A. Pihl, *Rad research*, 1963, 18 147.
10. R.W. Holmberg, *J. Chem. Phys.*, 1969, 51, 3255
11. G.V. Pukhalskaya, A.G. Kotov and S.Y. Pshezhetsky, *Khimia Vysokih Energij*, 1969, 3, 340
12. I.E. Bechmann, *Lebensm. Wiss. u Technol.*, 1998, 31, 449

SUPPRESSION EFFECTS OF SPICE PLANTS ON FREE RADICAL FORMATION

Božidar Lj. Milić, Sonja M. Djilas and Nataša B. Milić

Organic Chemistry Department, Faculty of Technology,
University of Novi Sad, 21000 Novi Sad, Yugoslavia

1 INTRODUCTION

The use of spices has been highly valued from prehistorical times not solely because of their flavour, but also because of their food-preserving power, antioxidative activity, as well as their antiseptic activity. The knowledge that has been gained through experience.

First, Dubois and Tressler¹, then, Chipault *et al.*² showed effective antioxidative activity of solvent extracts of rosemary, sage, mace, black pepper and thyme on the preservation of frozen meat and lard. Other similar studies also indicated that ether soluble fractions of oregano, allspice, red-pepper, basil, black pepper, rosemary, sage, mace and parsley were effective as butylhydroxyanisole on lipid peroxidation³, reactive free radical species, and that they have suppressive effects on large a number of mutagens found in food and environmental systems.⁴

Several articles on the formation of free radicals in the Maillard reaction, very often reaction in food chemistry, between aldoses and amino acids in water solutions, under conditions of base catalysis and high temperature, have been published by Namiki and Hayashi⁵ and Milić *et al.*⁶. Recently published results by Milić *et al.*⁷ showed that the pyrazine and pyridine derivatives were an integral part of the mechanism of formation of amino-imidazoarenes. Milić and coworkers⁷ examined the formation pyrazine and pyridine free radicals, as intermediates, in the initial step, and pyrazine and pyridine derivatives in the steady-state reaction between D(+)-glucose and 2-, 3- and 4-aminobutanoic acid, respectively.

The phenolic compounds, as antioxidants, may react with pyrazine free radicals form the Maillard reaction and retard their reactivity.⁸ Although the methods for the prevention of the Maillard reaction have been extensively studied by Labuza and Schmidl⁹, information concerning the utilization of naturally occurring phenolic compounds is scarce.

Many authors, Fujita *et al.*¹⁰, Kikuzaki and Nakatani¹¹, Miura and Nakatani¹², Cilliers and Singleton¹³, have reported that some naturally occurring antioxidant compounds, such as flavones and polyphenoles or phenolic compounds, isolated from seeds (coffee, sesame and soya), leaves (oregano, thyme and rosemary), and those in foods, had significant suppression influence on the development of cancer when this food were consumed. Due to such binding, the nature of different free radical species, their systems to study the mechanism of diseases and aging.

An excellent and critical review by Namiki,⁴ referring the chemistry of antioxidants as antimutagens, concluded that the induction of mutations occurred mainly through damage to DNA as a result of active free radical species formation from various types of mutagens and carcinogens.