

감마선 조사가 된장 숙성중의 Biogenic Amine 함량에 미치는 영향

- 연구노트 -

김재현·안현주·김동호·조철훈·차보숙*·변명우[†]

한국원자력연구소 방사선 식품·생명공학기술개발팀

*수원여자대학 식품과학부

Effects of Gamma Irradiation on Biogenic Amines Levels in *Doenjang* during Fermentation

Jae-Hyun Kim, Hyun-Joo Ahn, Dong-Ho Kim, Cheorun Jo,
Bo-Sook Cha* and Myung-Woo Byun[†]

Team for Radiation Food Science & Biotechnology, Korea Atomic Energy Research Institute,
Daejeon 305-353, Korea

*Dept. of Food Science, Suwon Women's College, Suwon 441-748, Korea

Abstract

Biogenic amine levels in irradiated *doenjang*, Korean fermented soybean paste, were investigated during fermentation at 25°C for 12 weeks. Biogenic amines detected in *doenjang* were putrescine, cadaverine, tryptamine, β -phenylethylamine, spermidine, spermine, histamine, tyramine and agmatine. Agmatine showed the most highest level among biogenic amines detected in *doenjang* during fermentation. Most biogenic amines, such as putrescine, cadaverine, tryptamine, β -phenylethylamine, spermidine, histamine and tyramine, significantly decreased 20~60% by gamma irradiation during fermentation, while spermine and agmatine did not. Therefore, gamma irradiation can be applied to inhibit the biogenic amines formation in *doenjang* during fermentation.

Key words: *doenjang*, fermented soybean paste, biogenic amines, gamma irradiation

서 론

식품에서의 biogenic amine 생성은 주로 미생물 분비효소에 의한 유리아미노산의 탈탄산 반응에 의한 것으로 가공 전의 농·수·축산물과 발효식품의 숙성 및 저장 동안 생성되는 것으로 알려져 있다. Biogenic amine은 유독성 물질로서, 일반적으로 인체내의 신경 및 혈관계 등을 자극하여 식중독 증상을 유발시킬 수 있고, 휘발성 N-nitrosamine과 같은 강력한 발암 물질로의 전환 잠재성을 지니고 있다(1). 식품에서 주로 발견되면서 여러 임상병리학적 증상을 일으키는 것으로 알려진 biogenic amine으로는 putrescine, cadaverine, tryptamine, β -phenylethylamine, spermidine, spermine, tyramine 및 agmatine 등이 있다(1).

최근 sauerkraut(2), 치즈(3) 및 발효소시지(4) 등과 같은 서양의 발효식품에 상당한 양의 biogenic amine이 함유되어 있다고 보고되고 있으며, 이에 따른 다양한 식품군에 대한 함량 조사, 생성관여 미생물 탐색과 동정, 생성억제 및 분석방법 최적화에 대한 연구 등이 진행되고 있다(2-6). 하지만 아직까지

국내의 biogenic amine 관련연구는 매우 미흡한 상태로써, 어육의 화학적 선도 지표로서의 biogenic amine 함량 측정(7), 효소 reactor를 이용한 측정 방법 개발(8) 및 기타 일부 발효식품군 중의 함량조사(9) 등의 몇몇 연구만이 이루어져 있는 실정이며, 각 식품 중에 존재하는 biogenic amine의 종류, 함량 등이 아직까지 구체적으로 제시되지 못하고 있는 실정이다. 특히 전통 발효식품이 발달한 우리나라의 경우 여러 식품군 및 발효식품의 biogenic amine과 관련된 다양한 연구가 매우 중요한 것으로 보이며, 젓갈류, 장류 등을 비롯한 기타 생산 유통 중인 발효식품 중에 상당량이 함유되어 있을 것으로 사료된다. Kim 등(10)이 국내의 시판 재래식 된장 중의 biogenic amine 함량을 조사한 결과, 다양한 종류의 biogenic amine이 존재하며, 이들 중 일부는 과도한 양을 함유하고 있는 것으로 보고한 바 있다. 따라서, 된장 제조시의 biogenic amine 생성을 억제시키기 위한 방안으로서 감마선 조사기술을 이용할 때 발효초기 미생물 제어로 된장 숙성 중에 생성되는 biogenic amine 함량을 감소시킬 수 있을 것으로 사료된다. Bover-Cid 등(4)도 발효소시지 제조시 원료의 초기미생물 수준을 감소시킬 경우 bio-

[†]Corresponding author. E-mail: mwbyun@kaeri.re.kr
Phone: 82-42-868-8060, Fax: 82-42-868-8043

genic amine 생성을 억제할 수 있다고 보고하여, 본 연구의 목적을 뒷받침해 주고 있다.

본 연구는 감마선 조사에 의한 된장 숙성 중의 biogenic amine 생성억제를 관찰하여, 화학적 안전성을 증진시킨 된장을 개발하기 위한 조건을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

된장 제조 및 감마선 조사

재래식 된장은 증자대두, 재국대두(메주)(11), 소맥분, 코오지, 정제염, 및 정제수를 사용하여 제조하였으며, 혼합비 및 수분함량은 Table 1과 같다. 제조된 된장(20 kg)은 직경 12 cm, 부피 2 L의 원형 유리용기에 균일하게 나누어 담아 대조구 및 감마선 조사구로 사용하였다.

감마선 조사는 한국원자력연구소 내에 위치한 선원 10만 Ci의 Co-60 감마선 조사시설을 이용하여 실온($12 \pm 0.5^\circ\text{C}$)에서 시간당 5 kGy의 선량율로 각각 5, 10 및 15 kGy의 총 흡수선량을 얻도록 하였으며, 균일한 감마선 조사를 위해 시료가 담긴 용기를 모터회전판(irradiation rotation plate, Eastern Engineering Co., Daejeon, Korea)위에 위치시킨 후 2 rpm의 속도로 회전하며 조사되도록 하였다. 흡수선량의 확인은 dosimeter (alanine dosimeter, Bruker Instruments, Rheinstetten, Germany)를 사용하였고, 총 흡수선량의 오차는 ± 0.2 kGy였다. 감마선 조사 후 된장은 25°C 에서 12주간 발효시키면서 분석에 사용하였다.

Biogenic amines의 분석

저장기간 동안 된장 중의 biogenic amines(BAs)의 함량은 García-García 등(12) 및 Hwang 등(13)의 방법을 약간 변형하여 측정하였다. Biogenic amine의 표준시약으로 putrescine, cadaverine, tryptamine, β -phenylethylamine, spermidine, spermine, histamine, tyramine 및 agmatine(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)을 각각 1000 mg%의 농도로 조제하여 stock solution으로 냉동보관하며 실험에 사용하였다. 각 시료 20 g을 5% trichloroacetic acid(TCA)를 가하여 100 g으로 정용하고 약 3분간 균질기(DIAX 900, Heidolph, Schwabach,

Germany)로 추출한 후 여과하여 실험에 사용하였다. 표준시약 및 TCA 추출시료 2 mL에 2 M NaOH 1 mL와 benzoyl chloride 10 μL 를 가하여 30°C 에서 40분간 반응(benzoylation)을 시킨 후, 포화 NaCl 2 mL로 반응을 정지시키고, diethyl ether 3 mL를 가하여 vortex mixer(G-560, Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA)를 이용, 3분간 추출한 후 2500 rpm에서 20분간 원심분리를 실시하였다. 상등액 1.5 mL를 분취한 후 질소 가스를 사용하여 diethyl ether를 모두 건조시키고, methyl alcohol 1 mL에 용해하여 HPLC system으로 분석하였다.

BAs 함량 측정에 사용한 HPLC system은 Separations module(2690, Waters Co., Milford, MA, USA), Photodiode array detector(996, waters), Millennium 32 chromatography manager(System Software, Workstation version 3.0, Waters), Symmetry[®] C18 - 3.9×150 mm, particle size; 5 μm column (Waters)을 사용하였으며, 이때 HPLC의 분석조건은 이동상 methyl alcohol : water(gradient composition; 50, 70, 85, 100%)를 0.9 mL/min의 유속으로 사용하였고, injection volume은 20 μL , column 온도는 25°C 로 고정하여 검출파장 225 nm에서 분석하였다. 모든 측정은 전과정을 3회 반복하여 시행하였다.

통계분석

BAs 함량 측정 결과는 SAS, Version 5 edition(14)를 이용하여 ANOVA 분석 후 Duncan's multiple range test로 5%에서의 유의차 검정을 하였다.

결과 및 고찰

Biogenic amines 함량

발효기간에 따른 된장 중의 BAs 함량은 Table 2와 같다. 된장에 존재하는 BAs는 총 9종류로서, putrescine(PUT), cadaverine(CAD), tryptamine(TRP), β -phenylethylamine(PHE), spermidine(SPD), spermine(SPM), tyramine(TYR) 및 agmatine(AGM) 등이 저장기간 동안 검출되었는데, 이 중 AGM이 모든 시험구에서 가장 높은 함량을 갖는 것으로 나타났다.

PUT의 경우 감마선 조사에 의해 유의적으로 감소하였으며, 특히 발효기간 동안 15 kGy의 감마선 조사에 의해 대조구보다 40~60% 가량 감소하는 것으로 나타났다. 또한, PUT의 함량 감소는 발효 2주째부터 5 kGy 이상의 감마선 조사구에서 유의적인 차이를 관찰할 수 있었다. CAD의 경우 발효 6주까지 대조구 및 감마선 조사구에서 유의적 함량변화가 나타나지 않았으며, 발효 8주 이후 10 및 15 kGy 감마선 조사구의 함량이 대조구보다 유의적으로 낮게 나타났는데 이어 12주째에는 5 kGy 이상의 모든 감마선 조사구에서 대조구보다 낮은 함량을 보였다. TRP는 대조구가 발효 2주째까지 약 두배 가량 함량이 증가되었다가 발효기간에 따라 점차 감소하는 경향을 보였으며, 감마선 조사구는 12주의 발효기간 동안 대조구보다 유의적으로

Table 1. Ingredients and specifications of raw mixture for manufacturing doenjang samples

Ingredients	Ingredient ratio (%)	Moisture contents (%)
Cooked soybean	30	58.2
Fermented soybean (meju) ¹⁾	15	18.6
Fermented flour	18	25.3
Salt (NaCl 95%)	12	0
Water	25	100
Total	100	49.8

¹⁾Fermented soybean (meju): The soybean was fermented at 30°C for 45 hours with *Asp. oryzae* (0.05%) as a starter and the sample was dried at 40°C , then ground.

Table 2. Biogenic amine contents in *doenjang* during fermentation at 25°C

(unit: mg%)

Fermen- tation periods (week)	Putrescine				Cadaverine				Tryptamine			
	0 ¹⁾	5	10	15	0	5	10	15	0	5	10	15
0	125.6±12.33 ²⁾	132.9±14.21 ^a	109.2±9.38 ^b	129.3±14.21 ^a	4.8±1.25	4.7±0.72	3.9±0.88	4.2±0.21	76.5±2.31 ^a	77.0±1.76 ^a	74.9±1.81 ^a	69.2±1.01 ^b
2	243.0±16.17 ^b	183.9±10.92 ^b	180.8±12.26 ^b	145.1±15.33 ^c	5.2±0.86	4.8±0.81	4.2±0.39	4.1±0.40	134.3±5.31 ^a	85.9±3.21 ^b	79.4±1.96 ^c	78.6±1.37 ^c
4	254.5±10.56 ^a	190.1±12.33 ^b	173.0±14.32 ^{bc}	135.2±20.10 ^f	4.9±0.95	4.2±1.27	4.0±0.47	4.0±0.26	102.7±3.26 ^a	77.2±2.21 ^b	76.1±1.39 ^b	73.2±1.44 ^b
6	262.0±21.98 ^a	180.0±17.29 ^b	145.4±17.65 ^c	123.6±12.31 ^c	5.1±0.42	4.9±0.93	4.2±0.52	3.9±0.32	85.2±3.21 ^a	76.1±1.08 ^b	64.2±1.26 ^{bc}	58.8±1.41 ^c
8	296.4±15.14 ^a	188.0±10.60 ^b	144.2±18.31 ^{bc}	120.0±10.69 ^f	5.8±1.01 ^a	4.8±0.66 ^a	3.9±0.26 ^b	3.9±0.11 ^b	62.1±2.00 ^a	61.8±2.12 ^a	51.5±1.28 ^b	52.3±2.13 ^b
12	207.0±16.37 ^a	132.8±15.90 ^b	130.6±11.25 ^b	105.2±10.23 ^c	5.0±1.39 ^a	3.1±0.45 ^b	3.3±0.21 ^b	2.6±0.37 ^b	51.3±1.36 ^a	44.7±0.98 ^b	31.6±1.13 ^c	36.1±0.77 ^c

¹⁾Gamma irradiation dose (kGy).

²⁾Mean±standard deviation. Different letters within a same row with the same biogenic amine differ significantly (p<0.05).

Table 2. continued

(unit: mg%)

Fermen- tation periods (week)	β-Phenylethylamine				Spermidine				Spermine			
	0 ¹⁾	5	10	15	0	5	10	15	0	5	10	15
0	14.1±0.92 ²⁾	14.6±1.23 ^a	16.4±1.08 ^a	9.7±0.79 ^b	26.4±1.20	27.2±1.16	25.1±1.00	27.0±0.95	22.8±1.34	21.7±0.77	23.5±1.21	24.4±1.02
2	13.2±1.10 ^a	12.0±0.81 ^a	12.1±0.76 ^a	8.8±0.52 ^b	30.7±1.42 ^a	31.1±1.97 ^a	25.7±1.13 ^b	28.3±1.20 ^b	13.7±0.72 ^a	15.2±1.03 ^a	11.6±0.92 ^b	17.5±1.11 ^a
4	6.6±0.24 ^a	5.2±0.26 ^b	5.2±0.53 ^b	5.6±0.49 ^{ab}	27.1±1.27 ^a	24.4±0.85 ^a	25.1±0.78 ^a	22.3±0.23 ^b	15.7±1.12	18.8±0.79	14.7±0.75	17.2±0.74
6	6.9±0.37	5.9±0.68	5.9±0.67	6.3±0.56	26.0±1.56 ^a	26.1±0.99 ^a	22.2±0.93 ^{ab}	20.3±0.70 ^b	15.1±0.43 ^a	18.2±0.87 ^a	13.5±0.78 ^a	11.9±0.87 ^b
8	5.9±0.41	7.1±0.91	7.1±0.34	6.0±0.81	27.7±0.79 ^a	25.0±1.03 ^a	20.7±0.84 ^b	20.6±1.09 ^b	14.5±0.62	15.5±0.53	11.7±0.48	11.4±0.92
12	6.8±0.56	6.0±0.43	6.0±0.50	5.8±0.41	21.1±0.99 ^a	19.8±0.69 ^{ab}	16.2±0.58 ^b	16.2±0.69 ^b	15.4±0.73	13.1±1.01	12.2±0.76	12.8±0.99

¹⁾Gamma irradiation dose (kGy).

²⁾Mean±standard deviation. Different letters within a same row with the same biogenic amine differ significantly (p<0.05).

Table 2. continued

(unit: mg%)

Fermen- tation periods (week)	Histamine			Tyramine				Agmatine				
	0 ¹⁾	5	10	15	0	5	10	15	0	5	10	15
0	58.8±3.29 ²⁾	57.0±6.21 ^a	58.0±5.32 ^a	42.7±5.08 ^b	11.8±1.32	14.2±1.02	14.2±0.87	11.9±0.95	838.2±21.34 ^a	848.4±38.92 ^a	834.3±27.53 ^a	630.1±33.90 ^b
2	56.0±5.90 ^a	49.1±4.00 ^b	50.3±5.20 ^b	49.8±3.73 ^b	11.7±0.76	12.9±0.86	13.8±1.21	12.3±0.93	428.7±19.32 ^a	519.9±20.33 ^a	370.4±16.34 ^b	679.2±20.12 ^a
4	52.7±5.65 ^a	41.4±4.78 ^b	40.3±3.92 ^b	46.1±4.30 ^b	12.4±0.99	12.0±0.94	11.9±0.82	11.6±1.02	378.6±15.52 ^b	474.3±19.78 ^b	411.7±20.11 ^b	672.7±25.20 ^a
6	44.8±4.78	39.3±2.95	37.2±4.55	39.4±4.87	13.2±1.26	13.2±0.76	12.1±0.89	11.5±1.00	374.1±23.41	432.6±18.87	432.0±19.21	497.7±15.22
8	36.0±2.71 ^a	30.7±4.67 ^{ab}	24.6±2.75 ^b	20.1±2.45 ^b	10.6±0.82 ^a	11.1±1.14 ^a	8.7±0.47 ^a	7.1±0.96 ^b	308.0±18.45	326.1±20.02	301.0±21.32	380.0±11.76
12	33.5±2.12 ^a	26.3±2.99 ^{ab}	15.5±2.34 ^b	17.6±0.93 ^b	10.2±1.01 ^a	10.1±0.67 ^a	7.9±0.68 ^b	6.7±0.35 ^b	370.0±19.32	338.5±19.88	299.0±10.56	352.7±19.71

¹⁾Gamma irradiation dose (kGy).

²⁾Mean±standard deviation. Different letters within a same row with the same biogenic amine differ significantly (p<0.05).

낮은 함량을 보였다. PHE의 경우 15 kGy의 감마선 조사에 의해 발효 0 및 2 주째에 유의적으로 낮은 함량을 보였으나, 이후 발효기간 동안 유의적인 함량 차이가 관찰되지 않았다. SPD의 경우 발효 2주 이후 10 kGy 이상 감마선 조사구에서 대조구 및 5 kGy 감마선 조사구에 비해 낮은 함량을 보였다. SPM은 감마선 조사에 의한 생성억제 효과가 관찰되지 않았다. HIS의 경우 발효기간에 따라 모든 시험구에서 그 함량이 점차 감소하는 경향을 보였는데, 발효 12주째에는 감마선 조사구가 대조구에 비해 약 21~54%가량 함량이 감소하는 것으로 나타났다. TYR의 경우 발효 6주까지 대조구 및 감마선 조사구간의 함량 차이를 보이지 않았으나, 8주째부터 감마선조사구의 TYR함량이 약간 감소하는 경향을 나타내었다. 발효 후반기에는 10 및 15

kGy 감마선 조사구가 대조구 및 5 kGy 감마선 조사구보다 18~34%가량 낮게 나타났다. AGM은 본 연구에서 제조한 된장에서 가장 높은 함량을 나타냈으나 감마선 조사에 의한 영향을 받지 않는 것으로 나타났다.

Shalaby(1), Stratton 등(15) 및 Yen(16) 등의 연구보고에 의하면 발효 대두식품에서 PUT, CAD, HIS 및 TYR 등의 다양한 종류와 높은 수준(400~3500 mg%)의 BAs가 검출되었다고 보고한 바 있다. 우리나라 재래식 된장 중의 BAs는 앞서 언급한 기존의 연구보고에서처럼 여러 종류의 BAs가 검출되었으나, 그 함량은 다소 낮은 것으로 나타났다.

이상의 결과를 볼 때 된장발효시 다종의 BAs가 생성되는 것으로 나타났으며, 감마선 조사에 의해 SPM 및 AGM을 제외

한 BAs의 함량을 대조구에 비해 감소시킬 수 있는 것으로 나타났다. 따라서 된장 제조시 감마선 조사기술을 이용하여 발효·숙성 중의 BAs생성을 효과적으로 억제할 수 있었다. 또한, Park 등(17)은 감마선 조사기술을 이용할 때 미생물학적으로 품질특성이 안정한 저염 된장을 제조할 수 있었다고 보고하여 감마선 조사기술은 식품의 미생물학적 안전성 뿐만 아니라 화학적 위해 요소에 대한 안전성 또한 보장해 줄 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

발효기간 동안 된장에서 검출된 biogenic amine은 putrescine, cadaverine, tryptamine, β -phenylethylamine, spermidine, spermine, histamine, tyramine 및 agmatine 등으로 총 9가지 종류이며, 검출된 biogenic amine 중 agmatine의 함량이 가장 높은 것으로 나타났다. 된장의 발효기간에 따른 biogenic amine 함량은 종류에 따라 증가 혹은 감소하는 경향을 보였다. 감마선 조사에 의해 발효기간 중 대부분의 biogenic amine 함량이 20~60% 가량 유의적($p < 0.05$)으로 감소하였는데, 이 중 spermine 및 agmatine은 대조구와 유의적인 차이를 보이지 않아 감마선 조사에 의한 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 따라서, 감마선 조사기술은 된장숙성 중의 biogenic amine 생성을 억제시킬 수 있는 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부의 원자력 연구개발사업의 일환으로 수행되었으며, 그 지원에 감사드립니다.

문 헌

- Shalaby AR. 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research Int* 29: 675-690.
- Kalač P, Špička J, Křížek M, Pelikánová T. 2000. Changes in biogenic amine concentrations during sauerkraut storage. *Food Chem* 69: 309-314.
- Valsamaki K, Michaelidou A, Polychroniadou A. 2000. Biogenic amine production in Feta cheese. *Food Chem* 71: 259-266.
- Bover-Cid S, Izquierdo-Pulido M, Vidal-Carou MC. 2000. Influence of hygienic quality of raw materials on biogenic amine production during ripening and storage of dry fermented sausages. *J Food Prot* 63: 1544-1550.
- Fernández-García E, Tomillo J, Núñez M. 1999. Effect of added proteinases and level of starter culture on the formation of biogenic amines in raw milk Manchego cheese. *Int J Food Microbiol* 52: 189-196.
- Bover-Cid S, Schoppen S, Izquierdo-Pulido M, Vidal-Carou MC. 1999. Relationship between biogenic amine contents and the size of dry fermented sausages. *Meat Sci* 51: 305-311.
- Kim DK, Park IS, Kim NS. 1998. Determination of chemical freshness indices for chilled and frozen fish. *Korean J Food Sci Technol* 30: 993-999.
- Park IS, Kim DK, Shon DH, Cho YJ, Kim NS. 1999. Measurement of biogenic amines with a chitopearl enzyme reactor. *Korean J Food Sci Technol* 31: 593-599.
- Mah JH, Han HK, Kim EJ, Hwang HJ. 2001. Determination of biogenic amines in Korean traditional fermented food products. Proceedings of 11th World Congress of Food Sci Technol P10-4, p 230.
- Kim JH, Ahn HJ, Yook HS, Park HJ, Byun MW. 2001. Biogenic amines content in commercial Korean traditional fermented soybean paste. *Korean J Food Sci Technol* 33: 682-685.
- Kim DH, Lee KH, Yook HS, Kim JH, Shin MG, Byun MW. 2000. Quality characteristics of gamma irradiated grain shape improved meju. *Korean J Food Sci Technol* 32: 640-645.
- García-García P, Brenes-Balbuena M, Hornero-Méndez D, García-Borrego A, Garrido-Fernández A. 2000. Content of biogenic amines in table olives. *J Food Prot* 63: 111-116.
- Hwang DF, Chang SH, Shiua CY, Chai TJ. 1997. High-performance liquid chromatographic determination of biogenic amines in fish implicated in food poisoning. *J Chromatography B* 693: 23-30.
- SAS. 1985. Statistical Analysis System User's Guide Statistics. Version 5th ed. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Stratton JE, Hutkins WR, Taylor SL. 1991. Biogenicamines in cheese and other fermented foods. *J Food Prot* 54: 460-470.
- Yen GC. 1986. Studies on biogenic amines in foods. I. Determination of biogenic amines in fermented soybean foods by HPLC. *J Chin Agric Chem Soc* 24: 211-217.
- Park BJ, Jang KS, Kim DH, Yook HS, Byun MW. 2002. Changes of microbiological and physicochemical characteristics of doenjang prepared with low salt content and gamma irradiation. *Korean J Food Sci Technol* 34: 79-84.

(2002년 4월 15일 접수; 2002년 7월 8일 채택)