

## 재래식 간장의 제조조건이 ethyl carbamate 생성에 미치는 영향

정현정 · 권훈정

서울대학교 생활과학대학 식품영양학과

### Dependence of Ethyl Carbamate Formation on the Fermentation Variables in Korean Traditional Soysauce

Hyun-Jung, Chung and Hoonjeong Kwon

Department of Food and Nutrition College of Human Ecology, Seoul National University

#### Abstract

Ethyl carbamate is an animal carcinogen and a by-product of fermentation. Since the highest level of ethyl carbamate was found in a traditional soy sauce sample in the previous study, soysauce was prepared in varying experimental conditions with three kinds of *meju* originated from different area of the country to investigate the factors affecting ethyl carbamate formation. The sample analysis methods included a semi-purification with solid-phase extraction and detection by GC-MS at SIM mode using m/z 62 fragment ion. Among the investigated factors, which includes source *meju*, brining length, salt content, irradiation of visible light during brining or storage, and storage length, source *meju* and storage length showed most profound effect on the formation of ethyl carbamate. Irradiation of visible light for 12 hours a day during storage lowered the concentration of ethyl carbamate compared to the soysauce kept in the dark. Meanwhile irradiation during the brining as well as the degree of salt contents showed no effect.

Key words: ethyl carbamate, fermentation, carcinogen, soysauce, GC-MS-SIM

#### I. 서 론

식품에서 검출되어 보고된 발암원/변이원성은 그 종류가 매우 다양하다. 이들 중 섭취 빈도가 매우 낮은 식품도 있지만, 우리가 매일 섭취하는 음식물에 존재하는 발암원들도 상당수에 이른다<sup>1)</sup>. 특히, 특정 발암원의 식품 내 농도가 낮더라도, 식품의 섭취량과 빈도가 높으면 그 화합물이 인체에 미치는 영향은 상대적으로 증가하게 된다.

Ethyl carbamate (EC, Urethane,  $\text{NH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$ , CAS No. 51-79-6)는 carbamic acid의 ethyl ester로 동물 발암원이다. 1976년에 알코올 음료에서뿐만 아니라 빵과 같은 발효 식품에서 ppb 단위의 EC가 발표되었을 때 세계 보건 기구는 인체에 영향이 없는 농도로 간주하였으나<sup>2)</sup>, sake에서 100~600 ng/ml가 검출되면서 많은 관심을 갖게 되었다<sup>3)</sup>. 알코올 음료에서의 EC는 매우 넓은 범위에 걸쳐 존재하는데, 영국, 캐나다, 미국, 독일, 스위스에서의 조사에 의하면 가장 높은 농도의 EC는 과일주에서 발견되었고, 현재, 캐나다와 미국에서는 주류내의 EC 농도가 규제되고 있다<sup>4)</sup>. EC에 대한

연구는 주류에 대한 연구가 대다수를 차지하나 외국에서 시판되는 일본식 간장과 된장에서도 검출되어 보고된 바 있다. Canas 등<sup>5)</sup>은 여러 종류의 발효 식품에서 EC 농도를 조사하였는데 치즈, 차, 요구르트, 사이타에서는 최고 3 ppb, 빵과 맥아 음료에서는 최고 13 ppb, 간장에서는 최고 84 ppb가 검출되었다. Hasegawa 등<sup>6)</sup>은 일본의 발효 식품에서 EC의 농도를 측정했으며 14가지의 miso에서는 최고 5 ppb, 9가지의 natto에서는 최고 5 ppb, 5가지의 moromi에서는 최고 10 ppb, 9가지의 sake에서는 최고 100 ppb, 10가지의 soy sauce에서는 최고 50 ppb가 존재함이 보고되었다.

EC 형성에 영향을 주는 인자는 식품에 따라 다르나, 식품 내의 ethanol과 carbamyl compound의 반응으로 합성되므로 발효 부산물로 많이 생성된다고 믿어진다<sup>8)</sup>. 한국 상용식품 중에는 김치에 최고 4.6 ppb, 탁주에 2 ppb의 ethyl carbamate가 검출되었다고 보고되었다<sup>9)</sup>. 그러나 다량의 단백질을 함유하고 있는 대두를 발효시킨 식품의 경우 다량의 carbamyl compound가 생성되므로 무시할 수 없는 수준의 EC가 생성될 것이라고 예측된다. 본 연구에서는 발효 식품에서 주로 검출되

는 EC를 한국 고유의 발효 식품에서의 존재 유무를 확인한 결과 간장의 EC 농도가 매우 높게 검출되었으므로<sup>11)</sup>, 재래식 간장을 선택하여 제조 조건에 따른 EC 생성에 대해 알아보하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시약

외부표준물질로 사용한 Ethyl carbamate는 Merck에서 내부표준물질로 사용한 propyl carbamate는 ICN Biochemical(Aurora, CO)에서 구입하였다. Aluminum oxide(activated, neutral, 50~200 micron for column chromatography)는 Janssen Chimica(Geel, Belgium)에서 구입하여 건조법으로 수분 함량을 측정 한 후 최종 수분 함량이 10.0%(w/w)가 되도록 증류수를 첨가하고 격렬하게 흔들어 불활성화시켰다. Celite 545(not acid washed, S.P.C GR Reagent)는 Shinyo Pure Chemicals (Osaka, Japan)에서 구입하여 700°C에서 16시간 이상 건조시켰다. Florisil(60~100 Mesh)은 Mallinckrodt Specialty Chemicals Co.(Paris, KY)에서 구입하였다. 이 외의 모든 시약은 특급을 사용하였다.

### 2. 시료간장의 제조

실험에 사용되는 메주는 전라북도 상서, 경상북도 자인, 충청북도 청풍의 세 지역에서 생산된 메주를 농협에서 구입하여 사용하였으며 염류로는 순도 99%의 정제염을 사용하였다. 간장에 사용되는 물은 수도물을 끓여서 식힌 후 사용하였다. 간장의 식염농도는 각 메주별로 15%, 20%이며 메주:물=1:4의 비율로 제조하였다.

위의 3가지 메주로 2가지 염농도에 맞춰 지름이 15 cm의 중간 크기의 항아리에 간장을 담았으며, 소금물에 침지 후 30일균과 60일균으로 나누고 명암에 따른 차이를 관찰하기 위해 빛조건과 압소에서 침지, 숙성시켰다. 빛조건의 경우, 기존의 자연채광과 조명용 형광 등 이외에 150 cm의 높이에 4 항아리당 60 w의 백열전구를 하나씩 설치하여 매일 12시간의 빛을 조사하였다.

침지 30일과 60일 후, 각 간장으로부터 메주를 건져내고 망이 고운 체에 한 번 거른 후, 끓기 시작한 후부터 30분간 달여서 식힌 후 간장을 멸균시킨 투명한 유리병에 넣어 이 점을 저장 0일로 잡고 명시된 저장 기간에 시료 일정량을 채취하여 분석에 사용하였다.

### 3. 실험방법

#### (1) Ethyl carbamate 부분 정제와 정량

Ethyl carbamate의 추출, 정제, 측정법은 이 화합물이 인체에 미치는 영향을 고려하여 표준화에 대한 연구가 진행되고 있으나, EC가 존재하는 식품이 다양하므로 아직 표준화되지 못하고 1996년 AOAC 표준화 작업 추천 명단에 들어 있다<sup>12)</sup>. 간장은 한국발효식품 중 비교적 그 구성이 단순하므로 김치와 같은 복잡한 정제과정을 거치지 않고<sup>9)</sup> Matsudo 등<sup>13)</sup>의 방법을 기초로 하여 부분정제하였다. 유리칼럼(3×15 cm)에 불활성화시킨 aluminum oxide 10 g, 무수황산나트륨 40 g을 순차적으로 충전시켜 준비해 놓은 뒤, propyl carbamate를 내부표준물질로 첨가한 간장 15 g을 celite 15 g과 섞어 맨 윗층에 충전하였다. Methylene chloride 100 ml를 흘려서 얻어진 용출액을 30°C 이하에서 감압 농축하였다. 유리칼럼(0.9×8.8 cm)에 florisil 10 g을 충전시킨 후 methylene chloride 60 ml로 미리 세척시키고, 농축액을 칼럼에 흡착시켜 methylene chloride 45 ml로 씻어내고, 7% methanol/methylene chloride 45 ml로 EC를 용출시켜 30°C 이하에서 감압 농축시켰다. 플라스크를 methylene chloride로 씻어 2 ml vial에 옮긴 후 질소 가스를 이용하여 건조상태까지 농축한 후 0.1 ml methylene chloride에 재용해시킨 후 최종 정제액을 가스크로마토그래피-질량분석법(GC/MS)으로 정량하였다.

GC/MS 분석을 위해서 과학기술원 기초과학지원센터 서울 분소의 Hewlett Packard FFAP(50 m×0.2 mm×0.33 m) 칼럼을 장착한 Hewlett Packard 5890 Series II GC와 Hewlett Packard 5988 MS를 임차하여 사용하였다. 분석 오븐 온도는 100°C에서 4분 유지한 후 10°C/min으로 240°C까지 가열시켰으며, 주입구 온도 220°C, 검출구 온도 240°C를 사용하였다. 시료주입은 Splitless법을 사용했으며, 70 eV의 에너지로 전자이온화 방법을 사용할 때의 이온화온도의 온도는 150°C였다. GC/MS의 주사법으로 표준 용액과 대표 시료의 총이온 크로마토그램을 얻은 뒤 분리된 EC 피크를 머무름 시간과 토막내기방식을 이용하여 성분을 확인하고, 선택이온 측정법(GC/MS/SIM)로 질량대 전하비율 62에서 내부표준물질로 첨가한 PC 봉우리와 시료내의 EC 봉우리의 비를 측정하여 농도를 분석하였다. 이 때 ethyl carbamate의 농도를 내부 표준 물질과의 비 및 외부 표준 곡선을 사용하여 동시에 측정하여 부분정제 과정의 회수율을 계산하였다.

#### (2) 산도 측정

숙성 90일의 자인간장 시료에서 산도를 측정하였으며 phenolphthalein을 지시약으로 하여 50배 희석한 간

장 시료를 0.1 N NaOH를 이용하여 보라색이 될 때까지 적정하였다<sup>18)</sup>.

### (3) 염도 측정

산도 측정과 같은 시료를 가지고 간장 시료를 50배 희석한 뒤 지시약으로는 2% Potassium Chromate ( $K_2CrO_7$ )을 사용하여 0.1 N  $AgNO_3$ 로 적갈색 침전이 나타나는 지점을 반응 종말점으로 적정하였다<sup>18)</sup>.

### (4) Urea 측정

Matsudo 등<sup>19)</sup>의 방법을 수정하여 비색법으로 urea 함량을 측정하였다. 간장 시료 1 g에 증류수 50 ml를 첨가한 뒤 DOWEX 50W-X8 Cation exchanger column (1.5×4 cm)에 흘리고 증류수 50 ml로 용출시킨 다음 수집액을 진공 농축 원심분리기를 이용하여 0.5 ml로 농축하였다. Acid reagent(SIGMA, BUN acid reagent) 1.5 ml와 color reagent(SIGMA, BUN color reagent) 1.0 ml를 취하여 교반하여 준비해 둔 다음, 다양한 농도의 urea 표준 용액과 각 농축액을 50  $\mu$ l씩 취하여 준비해 둔 발색 시약과 교반하여 100°C 항온 수조에서 10분 반응시키고 수돗물에서 3-5분 냉각시켰다. 발색된 용액을 UV-spectrophotometer(HITACHI U-1000, Japan)를 사용하여 535 nm에서 흡광도를 측정하였고 urea 표준 곡선에 의해 urea 양으로 환산하였다.

## 4. 통계처리

모든 자료는 SAS에 의해 통계처리하여 분석하였다. 각 조건당 시료의 수가 작아 이론적 정규분포를 가질할 수 없으므로 각 제조조건에 따른 영향 검정을 위해 비모수 순위 검정법을 사용하였다. 유의성 검증을 위해서는 비교군이 2일 경우 Wilcoxon 2 sample parameter의 Z 값을 비교군이 3 이상일 경우에는 Kruskal-Wallis의 Chi-Square 값을 사용하였다. 각 조건간의 교락효과를 확인하기 위해서는 순위화 후 일 반선형모형을 사용하였다<sup>14)</sup>.

## III. 결과 및 고찰

### 1. 간장 숙성에 따른 ethyl carbamate 생성

Ethyl carbamate의 존재 유무는 질량 대 전하비율 89, 74, 62 모든 토막이온의 존재를 전제로 하였으며, 선택이온 측정법으로 가장 감도가 좋은 질량대 전하비율 62 토막이온을 정량에 사용하였다. 충청북도 청풍, 경상북도 자인, 전라북도 상서메주를 15%, 20% 염도의 소금물로 간장을 담아 침지 30일군과 침지 60일군으로 나누고 빛조건에서 하루 12 시간 빛을 조사한 군과 암소에서 보관하는 군으로 나누어 발효시

**Table 1. Sample names and their preparation schemes**

	Brining Length (Days)	Brining Ir-radiation	Salt Used	Storage Ir-radiation	Sample Name
Meju: Jaln SangSeo Chung-Poong	30	Light	15%	Light	30L15L
				Dark	30L15D
				Light	30L20L
		Dark	20%	Dark	30L20D
				Light	30D15L
				Dark	30D15D
	60	Light	15%	Light	30D20L
				Dark	30D20D
				Light	60L15L
		Dark	20%	Dark	60L15D
				Light	60L20L
				Dark	60L20D
	Dark	15%	Light	60D15L	
			Dark	60D15D	
			Light	60D20L	
			20%	Dark	60D20D

켰다.

먼저, 상서, 자인, 청풍 메주로 담은 간장을 각각의 조건에서 숙성시키면서 숙성 30일과 숙성 90일에 분석하여 EC의 생성여부를 조사한 결과, 3가지 간장 시료 중 자인간장의 EC 농도가 전반적으로 높았으므로 자인간장은 전 숙성기간동안 EC 농도를 측정하였으며, 상서와 청풍간장은 20% 염도군보다 15% 염도군에서 더 높은 농도의 EC가 검출되었으므로 숙성 180/150일(침지 60일군은 숙성 150일)에서는 15%군에서만 EC 농도를 측정하였다. 또한 180일 분석 결과 전반적으로 숙성시간에 따라 EC의 농도가 증가하는 양상을 나타내었으며, 가정에서 간장의 사용량이 일반적으로 1년이므로 숙성 1년시점에서는 모든 시료의 ethyl carbamate 함량을 분석하였다(Table 2~4).

각 간장의 숙성일에 따른 EC 생성을 비교하면 표들과 같이 3 종류의 간장 모두 숙성 30일에는 대부분이 검출되지 않거나 생성이 되어도 미량으로 검출되었으나, 이후 숙성 90일부터는 검출 한계 이상의 EC가 뚜렷이 존재하는 것이 관찰되었으며, 1년 숙성을 거치는 동안 대체로 증가하는 경향을 보였다(Fig. 1). Fig. 1에서 쉽게 관찰할 수 있듯이 저장기간 이외에 EC 형성

**Table 2. Formation of ethyl carbamate in soysauce prepared with SangSeo *meju* in various experimental conditions**

Sample	Brining Length (days)	Brining Irradiation	Salt (%)	Storage Irradiation	Ethyl carbamate at various storage point* (ppb)				
					30 days	90 days	150 days	180 days	1 year
30L15L	30	○	15	○	0.6	0	-	4.7	9.3
30L15D	30	○	15	×	0.6	4.4	-	7.4	11.7
30L20L	30	○	20	○	trace	0	-	-	7.2
30L20D	30	○	20	×	trace	5.2	-	-	5.6
30D15L	30	×	15	○	trace	0	-	5.1	5.5
30D15D	30	×	15	×	0.6	26.7	-	7.7	12.0
30D20L	30	×	20	○	trace	trace	-	-	11.7
30D20D	30	×	20	×	0.1	4.3	-	-	13.1
60L15L	60	○	15	○	0	trace	0.6	-	11.0
60L15D	60	○	15	×	0	0.1	3.1	-	15.6
60L20L	60	○	20	○	trace	0.1	-	-	17.6
60L20D	60	○	20	×	trace	0.3	-	-	7.9
60D15L	60	×	15	○	0	0.1	14.4	-	5.1
60D15D	60	×	15	×	0	0.1	2.1	-	5.9
60D20L	60	×	20	○	0	1.5	-	-	8.9
60D20D	60	×	20	×	0	0.1	-	-	22.9

\*single determination. - : not determined. 0: not detected. trace: peak shown but too small to be integrated.

**Table 3. Formation of ethyl carbamate in soysauce prepared with ChungPoong *meju* in various experimental conditions**

Sample	Brining Length (days)	Brining Irradiation	Salt (%)	Storage Irradiation	Ethyl carbamate at various storage points* (ppb)				
					30 days	90 days	150 days	180 days	1 year
30L15L	30	○	15	○	trace	1.2	-	1.0	5.7
30L15D	30	○	15	×	trace	27.5	-	26.1	39.4
30L20L	30	○	20	○	trace	1.3	-	-	80.8
30L20D	30	○	20	×	0.5	42.5	-	-	16.4
30D15L	30	×	15	○	0	2.0	-	1.2	30.7
30D15D	30	×	15	×	0	21.4	-	30.1	23.3
30D20L	30	×	20	○	0.2	0.6	-	-	165.4
30D20D	30	×	20	×	0	36.1	-	-	29.7
60L15L	60	○	15	○	trace	0.3	77.0	-	56.3
60L15D	60	○	15	×	0	1.4	54.8	-	181.6
60L20L	60	○	20	○	0	49.5	20.4	-	11.6
60L20D	60	○	20	×	0	0.2	-	-	35.5
60D15L	60	×	15	○	trace	2.2	62.4	-	27.3
60D15D	60	×	15	×	0.1	1.1	47.1	-	32.7
60D20L	60	×	20	○	0	2.1	-	-	11.0
60D20D	60	×	20	×	0.1	0.8	-	-	22.3

\*single determination. - : not determined. 0: not detected. trace: peak shown but too small to be integrated.

에 가장 큰 영향을 미치는 인자는 원료 메주인 것으로 나타났다(Kruskal-Wallis test, 유의확률 0.0082). 원료 메주의 영향은 실험조건에 포함된 염도, 침지기간, 침 지나 저장시의 빛의 영향 어느것 보다 크게 나타났으며, 이들과의 교락효과는 없는 것으로 관찰되었다.

**2. 가시광선의 조사에 따른 ethyl carbamate 생성 비교**

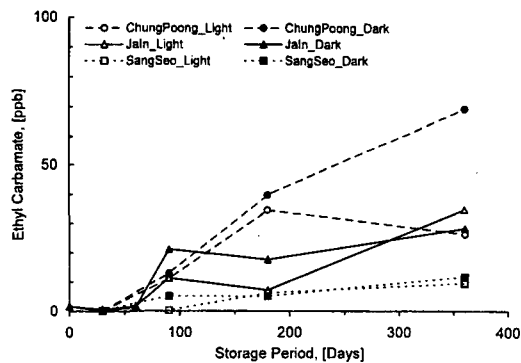
같은 메주로 담근 간장 중에는 숙성기간에 빛을 조

사한 시료들이 숙성기간 전반에 걸쳐 낮은 양의 EC 형성을 보이고 있다. Fig. 1의 평균치 대신 각 조건을 match시킨 시료 쌍에서 빛의 영향을 살펴보면, 상서간장 12군중 9군, 청풍간장의 13군중 9군, 자인간장 13군중 8군에서 암소에서 숙성시킨 군들에서 더 높은 양의 EC가 생성되었고 3간장 중 생성된 EC 농도는 청풍간장에서 가장 높았다. 빛의 영향을 비모수집단에 대한 Wilcoxon의 순위합 검정법을 사용하여 비교

**Table 4. Formation of ethyl carbamate in soysauce prepared with JaIn *meju* in various experimental conditions**

Sample	Brining Length (Days)	Brining Irrad.	Salt (%)	Storage Irrad.	Ethyl carbamate at various storage points* (ppb)							
					Before boil	After boil	30 Days	60 Days	90 Days	150 Days	180 Days	1 year
30L15L	30	○	15	○			0.5	1.2	28.2	-	9.8	25.0
30L15D	30	○	15	×	1.5	1.7	trace	1.3	1.6	-	18.4	16.7
30L20L	30	○	20	○			2.0	2.2	24.2	-	6.3	40.0
30L20D	30	○	20	×	1.4	1.4	trace	1.3	16.7	-	23.4	50.7
30D15L	30	×	15	○			0	3.3	2.7	-	1.9	25.1
30D15D	30	×	15	×	1.5	1.4	1.0	1.4	87.4	-	26.0	27.2
30D20L	30	×	20	○			0.4	1.5	31.4	-	29.4	87.7
30D20D	30	×	20	×	1.3	1.2	0	1.3	6.9	-	15.7	21.7
60L15L	60	○	15	○			0	1.4	1.1	1.6	-	28.7
60L15D	60	○	15	×	2.0	1.5	0	1.4	52.6	5.9	-	31.2
60L20L	60	○	20	○			0	1.3	0.7	1.3	-	26.2
60L20D	60	○	20	×	1.5	1.6	0	1.3	1.3	15.1	-	28.4
60D15L	60	×	15	○			0	1.3	0.7	1.2	-	24.7
60D15D	60	×	15	×	1.3	1.2	0	1.2	1.9	18.9	-	30.4
60D20L	60	×	20	○			0	1.7	0.4	5.8	-	21.6
60D20D	60	×	20	×	1.3	2.3	0	1.3	0.7	17.5	-	20.9

\*single determination. - : not determined. 0: not detected. trace: peak shown but too small to be integrated.

**Fig. 1. Concentration of ethyl carbamate in soysauce during storage.**

Each point represents the mean of ethyl carbamate concentration in soysauce prepared with different *meju* at specified storage points regardless of experimental condition except irradiation during storage. Closed and open symbols represent samples stored under dark and light respectively.

하여 보면, 유의 확률 0.1226에서 암소에서 저장한 간장의 EC 생성이 높음을 알 수 있다. 이는 일반적으로 사용하는 유의 수준 5%에서는 차이가 나지 않는 값이나, 여러 다른 제조 조건의 영향을 받아 상대적으로 편차가 큰 시료의 특성을 감안하면, 저장 기간동안 빛은 무시할 수 없는 인자라 사료된다.

반면, 침지기간 동안 빛에 의한 영향을 살펴보면, 침지일수, 염도, 숙성시 빛조건을 갈게 하고 침지시의 빛조건만 다르게 했을 경우에는 상서간장의 경우, 암소

**Table 5. Selected fermentation indices and urea for the soysauce prepared with JaIn *meju* measured at 90 days of storage**

Sample	Ethyl carbamate* (ppb)	Salt content (% w/v)	Total acidity (% w/v)	urea (ppm)	pH
30L15L	18.34	15.40	1.48	136.40	6.20
30L15D	1.04	18.18	1.62	25.32	6.90
30L20L	15.74	32.63	2.84	52.36	5.07
30L20D	10.82	27.85	2.61	105.76	5.01
30D15L	1.74	26.21	4.71	87.56	5.13
30D15D	56.74	25.88	2.48	152.47	6.33
30D20L	20.38	27.94	2.61	55.45	5.15
30D20D	4.45	30.46	1.42	176.43	5.20
60L15L	0.71	24.89	1.96	304.64	5.80
60L15D	34.17	32.58	3.87	50.75	5.72
60L20L	0.46	33.58	2.25	337.20	5.36
60L20D	0.84	36.95	4.37	97.73	5.22
60D15L	0.46	28.01	3.78	400.87	5.2
60D15D	1.26	33.96	3.83	307.99	5.25
60D20L	0.27	31.62	1.94	165.58	5.62
60D20D	0.44	29.69	3.26	348.14	5.85

에서 침지시킨 경우에 더 높은 농도의 EC가 생성되었으나, 청풍간장과 자인간장의 경우 청풍 1 시료와 자인 2 시료를 제외하고는 빛조건하에서 침지시켰을 경우에 생성된 EC 양이 더 많았다. 그러므로 Table 6의 결과에서도 나타나듯이 침지기간의 가시광선 조사는 EC 생성에 큰 영향을 주지 못하는 것으로 판단된다. 이는 화학적으로 빛의 영향이 전혀 없었다기 보다는 침지 중 생성되는 EC의 농도는 상대적으로 매우 낮아

**Table 6. Statistical analysis of the factors which affect ethyl carbamate formation in soysauce<sup>a</sup>**

Classes	Wilcoxon 2-sample test		Kruskal Walis Test		
	Z value	Pr >  Z	Chi-Sq	Pr > Chi Sq	
Source ( <i>Meju</i> )	C/J/S <sup>b</sup>		9.61	0.0082	
Brining Length	30/60 days	1.1524	0.2492	1.331	0.2486
Brining Irradiation	Dark/Light	-0.1031	0.9179	0.0109	0.9168
Salt	15%/20%	-0.5828	0.5600	0.3412	0.5592
Storage Irradiation	Dark/Light	-1.54391	0.1226	2.3877	0.1223
Storage Length	30/60/90/150/180/360			126.09	0.0001

<sup>a</sup>Analyzed by nonparametric oneway procedure (Proc NPAR1WAY of SAS system).

<sup>b</sup>C, J, and S represent *meju* originated from ChungPoong, Jaln, and SangSeo, respectively.

짧은 기간의 영향이 뒤에 큰 영향을 주는 저장기간과 저장중 빛에 의한 영향에 가려지는 것으로 판단된다.

EC 생성에 대한 빛의 영향에 대해서는 많은 논란이 있어 왔는데 Riffkin 등은 whisky에서 빛은 EC 생성에 아무런 영향을 주지 않는다고 하였으며 Tegmo-Larson 등도 wine에서 빛은 큰 영향을 주지 않는다고 하였다<sup>15,16</sup>. 그러나 Battaglia 등은 stonefruit brandy들에서는 증류후에 빛조건하에서 대부분의 EC가 생성된다고 하였으며 Mildau 등, Bauman과 Zimmerli는 시료의 종류와 ethanol의 농도에 따라 빛에 의해 유도된 EC의 생성속도는 시간에 따라 감소하며 일정한 시간이 지난 후에는 plateau value에 도달하는 것을 관찰하였고, Bauman과 Zimmerli, Christoph 등은 빛이 제거된 암소에서 계속 생성되는 것을 확인하였으며, Fauhl과 Hasegawa의 실험에 의하면, 에탄올을 5% 첨가한 간장의 경우 40°C, 어두운 곳에 저장하였을 때 EC 생성량이 첨가 전보다 증가하였다<sup>4,7,17</sup>. 이와 같이 시료와 조건에 따라 여러 상반된 결과가 보고되었으나, 종합하여 보면 전구체가 존재하는 한 빛과 관계없이 EC 합성은 계속 일어나는 것으로 사료된다. 그러나 본 실험 결과 간장에 있어서는 빛에 의해 생성이 감소 또는 생성된 EC의 파괴가 일어나는 것으로 판단된다.

**3. 그외의 조건에 따른 ethyl carbamate 생성 비교**

다른 조건들을 모두 같게 한 후 침지일수만 30일, 60일로 나누어 비교했을 때, Table 5에서와 같이 유의 수준은 높지 않으나 침지 기간에 의해 영향을 받았음을 알 수 있다. 침지일수에 따른 EC 생성의 차이는 세 지방의 메주를 종합해 볼 때 30일 침지군의 경우 EC 생성량이 약간 높음을 알 수 있다. 염도에 따른 EC 생성은 빈도를 고려하였을 때는 큰 차이를 관찰 할 수 없었다.

이상에서 볼 때 각 숙성일에 따른 비교와 침지기간 동안의 빛조건, 숙성기간 동안의 빛조건, 염도, 침지일

수에 따른 EC 생성을 비교한 결과, 3가지 간장에서 공통적으로 암소에서 저장한 경우가 가시광선 조사하에 저장 시킨 경우 보다 높은 농도의 EC가 생성되었다. 또한 30일 침지시킨 군에서 더 높은 농도의 EC가 관찰되었으나, 유의 확률이 20%선에 머무르므로 큰 영향이라 보기 어렵고 전체적으로 침지 기간 중 변화시킨 조건 보다는 저장기간 동안의 조건에 따른 영향이 큰 것으로 나타났다. 이는 침지기간에 비해 저장기간이 길기 때문에 누적된 결과과 관찰되는 것이라 사료되나, 실제 간장의 소비형태가 1년간의 저장기간을 거치기 때문에 이동간의 효율적인 관리가 매우 중요하다고 사료된다.

실제 각 가정에서 소비하고 있는 재래간장을 수집하여 조사한 결과, 다른 재래식 간장들과는 달리 달인 후 수십년 간을 계속 보충해가며 숙성시킨 한 간장 시료에서 다른 여러 재래식 간장들보다 수십배나 높은 농도가 검출되었고, 이는 오랜기간을 암소에서 숙성시키며 저장했을 때 EC 생성이 증가한다는 본 연구결과와 일치한다<sup>11</sup>.

한국 가정에서는 전통적으로 간장을 담아 침지기간 동안에는 가끔 빛을 쬐여주지만 침지기간이 지난 후에는 달여서 항아리에 담아두거나 암소에서 보관하는 경우가 많다. 본 실험에 근거하여 볼 때, 암소에서 오래 보관한 경우에는 숙성기간과 함께 EC 생성이 억제되지 않고 어느 정도까지는 계속 증가하리라 예상되며 특히 다량의 대두를 발효시켜 만든 간장에서 EC 생성이 불가피하다면 침지, 저장기간 동안을 계속하여 빛이 쬐이는 곳에 보관하여 EC 생성을 억제하는 것도 한 방법이라 할 수 있겠다.

EC 농도에 가장 큰 영향을 미치는 인자로 원료 메주가 관찰되었으므로, 간장에서 Ethyl carbamate를 생성하는 데 기여할 것이라고 생각되는 전구체와 산도, 염도, pH 등을 측정하여 EC 생성과의 상관관계를 찾아보고자 90간 숙성시킨 자인간장에서 생성된 EC와

urea, salt contents, pH, total acidity 함량을 측정하였으나, EC와의 상관관계는 찾아볼 수 없었다(Table 5).

#### IV. 요약

본 연구에서는 식품내의 ethyl carbamate 전구체와 그 형성에 영향을 주는 인자들을 규명하고자 하였다. 일반적으로 제조조건 보다는 원료 메주가 간장의 ethyl carbamate 형성에 기여도가 크나, 같은 메주로 제조한 간장의 경우, 저장 기간에 따라 생성이 증가하며 빛에 의해 그 농도가 감소하는 것이 관찰되었다. 따라서, 가정에서 간장을 담을 경우 전통적인 방법인 빛을 쬐어 주며 보관하는 주의가 필요하다고 사료된다. 원료 메주에 따른 차이는 원료 콩의 화학적 조성도 관여를 하겠으나, 발효에 관여하는 미생물의 종류와 그에 따른 대사과정, 대사량의 차이에 의한 영향도 무시할 수 없으리라 사료된다. 따라서 이러한 기전들을 밝혀 내기 위하여 앞으로 연구가 계속 진행되어야 할 것으로 사료된다.

#### 감사의 글

본 연구는 한국과학재단에서 지원한 핵심전문과제(941-0600-057-2) 결과의 일부로서 이에 감사드립니다.

#### 참고문헌

1. Pariza, M.W., Aeschbacher, H.U., Felton, J.S. and Sato, S.: *Mutagens and carcinogens in the diet*. Wiley-Liss, New York, (1990).
2. Ough, C.S.: Ethyl carbamate in fermented beverages and foods. I. Naturally occurring ethyl carbamate. *J. Agric. Food Chem.*, **24**: 323 (1976).
3. Zimmerli, B. and Schlatter, J.: Ethyl carbamate: analytical methodology, occurrence, formation, biological activity and risk assessment. *Mutation Res.*, **259**: 325 (1991).
4. Battaglia, R., Conacher, H.B.S. and Page, D.: Ethyl carbamate (urethane) in alcoholic beverages and foods: a review. *Food Add. Contam.*, **7**: 477 (1990).
5. Diachenko, G.W., Canas, B.J., Joe, F.L. and Dinovi, M.: Ethyl carbamate in alcoholic beverages and fermented foods. in *Food Safety Assessment* (eds. Finley, J.W., Robinson, S.F. and Armstrong, D.J.), 419 American Chemical Society, Washington, DC, (1992).
6. Canas, B.J., Harver, D.C., Robinson, L.R., Sullivan, M.P., Joe, F.L., Jr. and Diachenko, G.W.: Ethyl carbamate levels in selected foods and beverages. *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, **72**: 873 (1989).
7. Hasegawa, Y., Nakamura, Y., Tonogai, Y., Terasawa, S., Ito, Y. and Uchiyama, M.: Determination of ethyl carbamate in various fermented foods by selected ion monitoring. *J. Food Prot.*, **53**: 1058 (1990).
8. Hara, S., Yosizawa, K. and Nakamura, K.: Formation of ethyl carbamate in the model alcoholic beverages containing urea or its related compounds. *J. Brew. Soc. Jpn.*, **83**: 57 (1988).
9. 고은미, 권훈정: 김치에서 발효식품의 고유발암원 Ethyl carbamate 검출. *한국식품과학회지*, **28**: 421 (1996).
10. Kim, E.-J., Kim, D.-K., Lee, D.-S. and Noh, B.-S.: Application of acid urease to prevent ethyl carbamate formation in *Takju* processing. *Food Biotech.*, **4**: 34 (1995).
11. 정현정: 제조조건을 달리한 재래식 간장에서의 Ethyl carbamate 생성. 서울대학교 석사학위논문 (1996).
12. Dugar, S.M.: Committee on additives, beverages, and food process related analytes. *J. Ass. Offic. Anal. Chem. Int.*, **79**: 195 (1996).
13. Matsudo, T., Aoki, T., Abe, K., Fukuta, N., Higuchi, T., Sasaki, M. and Uchida, K.: Determination of ethyl carbamate in soy sauce and its possible precursor. *J. Agric. Food Chem.*, **41**: 352 (1993).
14. Ray, A.: *SAS user's guide: Statistics*. SAS Institute, Cary, NC, (1982).
15. Riffkin, H.L., Wilson, R., Howie, D. and Muller, S.B.: Ethyl carbamate formation in the production of pot still whisky. *J. Inst. Brew.*, **95**: 115 (1989).
16. Tegmo-Larsson, I.M. and Spitter, T.D.: Temperature and light effects on ethyl carbamate formation in wine during storage. *J. Food Sci.*, **55**: 1166 (1990).
17. Fauhl, C., Catsburg, R. and Wittkowski, R.: Determination of ethyl carbamate in soy sauces. *Food Chem.*, **48**: 313 (1993).
18. 주현규: 식품분석법. 유림출판사, (1992).

(1997년 3월 18일 접수)