

## 김함미생물에 의한 된장 중 아플라톡신 제어 및 그 품질특성

강길진 · 박종훈\* · 조정일\*\*

식품의약품안전청 광주지방청, \*전남대학교 식품공학과, \*\*조선이공대학 식품공학과

### Control of Aflatoxin and Characteristics of the Quality in Doenjang(soybean paste) Prepared with Antifungal Bacteria

Kil-Jin Kang, Jong-Hoon Park\* and Jung-Il Cho\*\*

Korea Food & Drug Administration

\*Department of Food Science and Technology, Chonnam National University

\*\*Department of Food Technology, Chosun College of Science and Technology

#### Abstract

In order to acquire microbial agents that can be utilized for control of aflatoxin produced by *Aspergillus flavus* and *Asp. parasiticus*, antifungal bacteria were isolated. Antifungal bacteria was identified as *Bacillus* spp. based on morphology and physico-biochemical characteristics. Amount of aflatoxin B<sub>1</sub> from *Doenjang*(soybean paste) prepared with *Asp. flavus*, *Asp. parasiticus*, antifungal bacteria(*Bacillus* sp.), or mixture of *Asp. flavus* and *Asp. parasiticus* was 27.2 ppb, 30.3 ppb, 3.4 ppb, and 3.7 ppb, respectively. Aflatoxin B<sub>1</sub> was not detected from *Doenjang*(control) and *Doenjang* prepared with antifungal bacteria. Content and compositions of free sugars, fatty acid, organic acid and free amino acid in *Doenjang* prepared with *Asp. flavus* and *Asp. parasiticus*, antifungal bacteria and mixture of *Asp. flavus* and *Asp. parasiticus* were not significantly different. For volatile flavor compounds of *Doenjang* prepared with antifungal bacteria, 2-pentyl furan and butanoic acid were disappeared or reduced, while octadecene compounds were produced. However, those of *Doenjang* prepared with *Asp. flavus* or *Asp. parasiticus* and *Doenjang*(control) were not significantly different. These results suggested that the antifungal bacteria(*Bacillus* sp.) inhibited production of aflatoxin and that antifungal bacteria did not effect the quality of *Doenjang*.

Key words : antifungal bacteria, aflatoxin, *Doenjang*(soybean paste)

#### 서 론

된장은 간장, 김치, 젓갈 등과 함께 우리 식탁에서 중요한 위치를 차지하는 전통 발효 식품이다. 전통채래식 된장은 메주를 주원료로 하는데, 메주는 증자된 대두를 자연상태에서 *Bacillus* sp., *Mucor* sp. 등의 세균과 *Aspergillus* sp. 등의 곰팡이, 효모 등에 의하여 발효된 것이다. 된장은 여러 미생물 등이 대두의 구성성분인 탄수화물, 단백질, 지질 등에 복합적인 관여로 이들 화합물의 분해 및 상호작용 등으로 인체에 유익한 성분이나 맛있는 성분 등을 생산할 뿐 만 아니라 인

체에 치명적인 손상을 주는 위해 성분도 생산할 수 있다.

*Aspergillus flavus*, *Asp. parasiticus*, *Asp. nomius*는 메주 등에 오염되어 그 대사 산물로서 아플라톡신을 생산한다<sup>(1)</sup>. 우리 나라에서도 된장 등 대두발효식품에서 아플라톡신이 검출되어 문제가 된 바 있는데<sup>(2)</sup> 이러한 아플라톡신은 간암을 일으킬 수 있는 강력한 발암물질로 알려져 있다<sup>(3)</sup>. 된장에서의 아플라톡신 검출은 메주를 만드는 과정에서 *Asp. flavus*나 *Asp. parasiticus*등이 오염되어 생산된 아플라톡신에 기인하는 것으로 볼 수 있다. 결국 우리 나라 사람들은 예로부터 식탁의 필수적인 된장으로 인해 발암물질에 노출되고 있는 것이다. 때문에 아플라톡신 생성 균주를 억제시키거나 아플라톡신을 감소 또는 제거시키거나 화학적, 생물학적, 물리적 방법들이 제시되어 왔다<sup>(4,5)</sup>. 그리고 몇몇 연구는 세균이나 곰팡이 등을 이용하여

Corresponding author : Kil-Jin Kang, Korea Food & Drug Administration, Woosan-dong 1582-2, Kwangsan-ku, Kwangju, 506-050 Korea  
Tel : 82-62-955-7355  
Fax : 82-62-955-7305  
E-mail : kjkang@kfda.go.kr

아플라톡신 생성균의 생육을 저지하고 또 mycotoxin의 생성을 저지시킨다고 보고하였다<sup>(7-10)</sup>.

따라서 본 연구에서는 아플라톡신 생성균의 생육을 억제시킬 수 있는 길항 미생물(*Bacillus* sp.)을 분리하고 그 미생물을 이용한 된장 제조시 된장에서의 아플라톡신 제어 효과 및 된장의 품질에 미치는 영향을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 길항미생물의 분리

각종 곡류에서 희석평판법을 이용하여 단일 균주를 분리하였다. 채취한 시료를 tris-HCl buffer solution(pH 7.5) 100 mL에 넣고 10분간 진탕 한 후 영양한천배지 [nutrient agar(NA) plate]에 농도별로 희석하여 도말하고 30°C에서 24~36시간 배양한 후 균주를 분리하였다. 분리된 미생물은 아플라톡신 생성균에 대한 길항력 실험에 사용하였다.

아플라톡신 생산균으로는 한국중균협회로부터 분양 받은 *Aspergillus flavus*(KCCM 35078)과 *Aspergillus parasiticus*(KCCM 35075)를 사용하였다.

### 길항미생물 선발 및 특성

PDA 평판배지 중앙에 아플라톡신 생성균을 접종하고 25°C에서 24시간 배양한 후 그 주변에 분리한 균주를 양쪽에 접종하여 25°C에서 7일간 배양하면서 가장 큰 저지대(inhibition zone)를 형성하는 균주를 아플라톡신 생성균에 대한 길항력이 우수한 길항미생물로 선발하였다. 분리된 길항미생물의 특성은 Bergey's manual of systematic bacteriology<sup>(11)</sup>, Microbiological method<sup>(12)</sup>, The Prokaryotes<sup>(13)</sup> 등의 방법에 의하여 미생물의 형태적 성질 및 생리 생화학적 성질 등을 검토하였다. 미생물의 편모염색 및 운동성은 Gray법과 현적슬라이드법으로 하였다. 미생물의 포자는 malachite green으로 염색하여 내생포자형성 유무와 포자위치를 현미경을 이용하여 관찰하였다. 생리적 특성으로 gelatin 가수분해, starch hydrolysis, arginin dihydrolase, 탄소원 자화성 등을 조사하였다.

### 된장제조

된장은 우리나라 전통 재래식으로 만들었다. 먼저 메주는 각 대두 10 kg씩 삶아 모형을 만들면서 아플라톡신 생성 균인 *Asp. flavus*과 *Asp. parasiticus* 포자 현탁액 각 10 mL, 길항균 배양액 10 mL씩, 길항균 배양액(NB 배지, 24시간) 10 mL+아플라톡신 생성 균 포

자현탁액 10 mL씩을 혼합하여 제조하였으며 초기에 약간 건조한 후 90일 동안 30°C 내외의 자연상태에서 발효시켜 메주를 완성하였다. 된장은 재래식으로 메주 10 kg을 23% 염수(NaCl) 2 L에 넣고 상온에서 40일간 방치한 다음 수분(염수)을 제거하고 상온에서 90일 동안 숙성하여 제조하였다.

### 아플라톡신 분석

아플라톡신 분석은 된장 25 g에 NaCl 5 g, 60% 메탄올 125 mL를 가하고 브랜더로 5분간 추출하여 immunoaffinity 칼럼에 분당 2~3 mL씩 통과시켜 흡착시킨 후 10 mL 물로 2회 수세 후 메탄올 1 mL로 아플라톡신을 용출하였다.

아플라톡신 추출액은 안전 농축 후 trifluoroacetate 0.1 mL를 가하며 유도체화한 다음 HPLC(Waters)로 분석하였다. HPLC 분석조건은 column으로 Prodigy 5 µm ODS-2(150×4.6 mm), 검출기로 형광광도계(Ex 365 nm, Em 418 nm), 이동상으로는 아세트니트릴 : 물(3 : 1), 유속은 0.9 mL/min으로 하였다<sup>(14)</sup>. 한편, 수분은 105°C 건조방법으로, 식염은 Mohr법으로 정량하였다<sup>(14)</sup>.

### 유리지방산 분석

환저 플라스크에 된장 약 30 g을 정밀히 취하고 0.5 N 메탄올성 수산화나트륨용액을 가한 다음 환류 냉각기를 설치하고 10분간 가열하였다. 그리고 14% BF<sub>3</sub>를 환류냉각기를 통해 가하고 2분 동안 계속하여 가열하였다. 마지막으로 n-헵탄 5 mL를 냉각기를 통해 가하고 1분간 가열하였다.

플라스크에서 헵탄층을 취한 후 무수 황산나트륨을 가하여 탈수시킨 것을 시험용액으로 하였다<sup>(15-16)</sup>. 시험용액은 GC(HP사, 모델 6890)을 이용하여 분석하였는데 column으로는 DB wax capillary column을, 검출기는 FID를 사용하였다. 주입구 온도는 230°C로 하고 oven 온도는 165°C에서 1분간 유지시킨 후 200°C까지 분당 2°C씩 승온시켜 분석하였으며 carrier gas는 질소로 분당 2 mL씩 흘렸다.

### 유리당 분석

된장 10 g을 물 50 mL에 잘 풀어 용해시키고 에탄올의 농도가 약 80%가 되게 에탄올 200 mL를 가한 다음 70°C 수욕상에서 1시간 동안 추출한 후 여과하였다. 여과 잔사에 80% 에탄올을 60 mL씩 가하고 1시간씩 6회 추출한 다음 다시 여과하여 여액을 모아 감압 농축하고 에탄올을 증발시킨 후 증류수에 녹여 50 mL되게 만들고, Sep pak C18로 처리한 다음 여액

20  $\mu$ L를 HPLC에 주입하여 분석하였다. 분석시 column은 Prodigy 5  $\mu$  ODS-2(150 $\times$ 4.6 mm)를, Detector는 Shodex RI-71를, mobil phase는 80% CH<sub>3</sub>CN, 20% H<sub>2</sub>O를 사용하고, flow rate는 분당 1.0 mL로 하였다.

#### 유기산 분석

된장 5 g을 칭량하여 미세하게 마쇄한 다음 증류수를 가하여 20 mL로 정용하였다. 이것을 원심분리하여 0.45  $\mu$ m membrane filter로 여과하고 Sep-pak C<sub>18</sub>로 색소 및 단백질 성분을 제거 한 후 그 여액을 HPLC (Waters 사)에 주입하여 분석하였으며, 그 조건은  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub>(3.9 $\times$ 30 cm) column으로 0.5% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 용매를 이용하여 1.0 mL/min 유속으로, 검출기는 UV 214 nm로 하였다.

#### 유리아미노산 분석

시료 된장에 75% 에탄올을 가하여 수욕상에서 30 분간 추출여과하고 농축하였다. 여기에 25% trichloroacetic acid(TCA) 용액 30 mL를 넣어 제 단백하고 에틸에테르 20 mL를 가하여 TCA를 제거하고 농축하였다.

농축액은 Amberlite IR20(H<sup>+</sup>) 수지가 충전된 칼럼을 통하여 아미노산을 흡착시키고 다시 암모니아로 용출하였다. 용출액을 건조시키고 구연산 완충액(pH 2.2)에 녹여 아미노산 자동분석기(Waters)로 분석하였다. Column은 3.9 $\times$ 150 mm PICO. TAG column을 사용하여 분석하였다<sup>(17)</sup>.

#### 휘발성 향기성분 분석

된장의 휘발성 향기성분 추출은 연속 증류 추출장치(Likens and Nikerson type simultaneous steam distillation and extraction apparatus, SDE)로 상압에서 2시간 동안 추출하였다. 이때 휘발성 성분의 추출용매는 n-pentan과 diethylether 혼합용매(1:1) 200 mL를 사용하였다. 추출 후 추출용매는 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 첨가하여 4°C에서 하룻밤 방치하여 수분을 제거하고 농축하여 GC/MSD(HP사, 모델 6890)로 분석하였다. GC칼럼은 HP-5MS(crosslinked 5%HP ME Siloxane)을, 유속은 헬륨을 1.0 mL/min으로 하고 오븐 온도는 40°C에서 2분간 유지한 다음, 분당 4°C씩 상승시켜 240°C에서 10분간 유지하였다. Inlet 온도는 250°C, detector 온도는 260°C, 그리고 slitless로 하였다.

### 결과 및 고찰

#### 길항미생물 분리 및 특성

아플라톡신 생산균에 대한 길항 미생물을 찾기 위

**Fig. 1. Growth inhibition of *Asp. flavus* and *Asp. parasiticus* by antifungal bacteria #19** *Asp. flavus* and *Asp. parasiticus* were grown on PDA at 24hrs and treated by antifungal bacteria and 2% benzoic acid.

*Asp. flavus*-A: Control, B: Antifungal bacteria #19, C: 2% Benzoic acid, *Asp. parasiticus*-D: Control, E: Antifungal bacteria #19, F: 2% Benzoic acid.

하여 대두, 벼, 보리 등 각종 곡류에서 500여종의 단일 균주를 분리하고 길항력 시험결과 가장 길항력이 큰 antifungal bacteria #19 균주를 선발하였다. 선발된 antifungal bacteria #19 균주에 대하여 아플라톡신 생성균에 대한 길항력을 검토한 결과는 Fig. 1과 같다. Fig. 1에서 보는바와 같이 *Asp. flavus*와 *Asp. parasiticus*는 모두 antifungal bacteria #19 균주에 의해

**Table 1. Characteristics of antifungal bacteria #19**

Characteristics	Antifungal bacteria #19
Cell diameter>1.0 $\mu$ m	-
Spores round	-
Endospore	+
Gram stain	+
Form	rod
Sporangium swollen	-
Parasporal crystals	-
Catalase	+
Anaerobic growth	-
Voges-Proskauer test	+
pH in V-P broth	
<6	d(+/-)
>7	-
Acids from	
D-Glucose	+
L-Arabinose	+
D-Xylose	+
D-Mannitol	+
Gas from glucose	-
Hydrolysis of	
Casein	+
Gelatin	+
Starch	+

Symbols -: 90% or more are negative, +: 90% or more are positive.

**Table 2. Composition of Doenjang prepared with *Asp. flavus*, *Asp. parasiticus* or antifungal *Bacillus* sp.**

	Control	<i>Asp. flavus</i>	<i>Asp. parasiticus</i>	<i>Bacillus</i> sp.		
				Control	<i>Asp. flavus</i>	<i>Asp. parasiticus</i>
Moisture(%)	52.1	52.7	53.4	51.5	53.6	53.7
Sodium Chloride(%)	13.3	14.0	13.5	14.1	13.7	14.2
Aflatoxin B <sub>1</sub> (ppb)	-	27.2	30.3	-	3.4	3.7

**Table 3. Free fatty acid of Doenjang prepared with *Asp. flavus*, *Asp. parasiticus* or antifungal *Bacillus* sp. (mg%)**

	Control	<i>Asp. flavus</i>	<i>Asp. parasiticus</i>	<i>Bacillus</i> sp.		
				Control	<i>Asp. flavus</i>	<i>Asp. parasiticus</i>
Palmitic acid	10.8	9.8	10.1	9.6	10.3	10.8
Stearic acid	5.3	6.1	4.8	6.3	5.8	6.9
Oleic acid	21.3	20.8	21.5	23.5	22.9	21.8
Linoleic acid	51.2	52.1	53.4	49.3	50.3	51.4
Linolenic acid	8.6	7.1	6.8	7.9	8.5	8.4
Arachidonic acid	0.4	0.2	0.3	0.3	0.4	0.4

생육 저지되었으며 2% benzoic acid보다도 저지효과가 훨씬 좋았다. 따라서 본 연구에서 분리한 길항미생물은 *Asp. flavus*나 *Asp. parasiticus*의 오염으로 인한 식품 등에서 생성될 수 있는 아플라톡신 생성억제를 위하여 사용될 수 있었다.

한편 분리된 길항균 antifungal bacteria #19번에 대한 형태학적 및 생리학적 성질을 검토한 결과는 Table 1과 같다. Antifungal bacteria #19는 약간의 유동성을 갖는 호기성 및 혐기성 단간균으로 4°C와 42°C에서 생육하지 않고 포자를 형성하는 Gram 양성균으로서 젤라틴 용고기능과 전분 분해능이 있었고 catalase 양성이었다. VP 반응은 약하게 나타났으며, 당 분해능은 glucose, xylose, mannitol, arabinose가 양성으로 나타났다. 이러한 특성을 토대로 Bergey's manual of systematic bacteriology 등에 기술된 분리기준과 비교 검토한 결과 *Bacillus* sp.인 것으로 판단되었다.

**된장중 아플라톡신 생성에 대한 영향**

메주 제조시 아플라톡신 생성균인 *Asp. flavus*나 *Asp. parasiticus*, 또는 길항균(antifungal bacteria #19, *Bacillus* sp.)을 첨가한 메주로 된장을 제조하고 그 특성을 조사하였다. 길항균을 첨가한 된장의 아플라톡신 및 일반성분에 대한 결과는 Table 2와 같다.

아플라톡신은 균 무처리 대조구(전통 재래식 된장)와 길항균만을 처리한 된장에서는 전혀 검출되지 않았으나 *Asp. flavus*를 처리한 된장에서 27.2 ppb, *Asp. parasiticus*를 처리한 된장에서 30.3 ppb가 검출되었다.

그러나 *Asp. flavus*와 길항균으로 처리한 된장은 아플라톡신 B<sub>1</sub>이 3.4 ppb로서 길항균 처리결과, 아플라톡

신 생성이 87.5% 억제되었으며, *Asp. parasiticus*와 길항균을 처리한 된장도 아플라톡신 B<sub>1</sub>이 3.7 ppb로서 길항균 처리결과, 아플라톡신 생성이 87.8% 억제되었다. 따라서 본 연구에서 분리한 길항균은 아플라톡신 생성을 평균 88% 정도 억제시킬 수 있었다. 그리고 길항균과 아플라톡신 생성균을 함께 처리한 된장의 아플라톡신 수준은 우리나라 허용기준인 10 ppb 이하였다.

길항균과 아플라톡신 생성균을 처리한 된장의 수분은 51.5~53.7%, 염분(NaCl)은 3.3~14.2%로서 각 처리구마다 비슷하였다.

**된장중의 유리지방산에 대한 영향**

아플라톡신 생산균과 길항균을 함께 처리한 된장의 유리지방산 함량은 Table 3과 같다. 된장의 유리지방산은 linoleic acid(51.2 mg%), oleic acid(21.3 mg%), palmitic acid(10.8 mg%), linolenic acid(8.6 mg%), stearic acid(5.3 mg%), arachidonic acid(0.4 mg%) 순으로 많이 분포하고 있었다. 이 등<sup>(18)</sup>은 된장의 지방산으로 palmitic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid, linolenic acid등을 분리하였고 이중 linoleic acid가 가장 많았고 다음으로 oleic acid가 많다고 보고하였다.

*Asp. flavus*나 *Asp. parasiticus*를 처리하여 된장중의 유리지방산에는 큰 변화가 없었다. 또한 길항균을 처리하였을 때도 유리지방산은 대조구와 큰 차이는 보이지 않았으나 oleic acid는 약간 증가하였다.

**된장중의 유리당에 대한 영향**

아플라톡신 생산균과 길항균 처리에 따른 된장의 유

**Table 4. Free sugar of Doenjang prepared with *Asp. flavus*, *Asp. parasiticus* or antifungal *Bacillus* sp.** (mg%)

	Control	<i>Asp. flavus</i>	<i>Asp. parasiticus</i>	<i>Bacillus</i> sp.		
				Control	<i>Asp. flavus</i>	<i>Asp. parasiticus</i>
Glucose	340.5	341.5	327.3	344.3	335.7	347.3
Galactose	85.4	83.3	83.9	84.7	84.9	85.3
Arabinose	1.3	1.1	1.1	1.0	1.2	1.4

**Table 5. Organic acid of Doenjang prepared with *Asp. flavus*, *Asp. parasiticus* or antifungal *Bacillus* sp.** (mg%)

	Control	<i>Asp. flavus</i>	<i>Asp. parasiticus</i>	<i>Bacillus</i> sp.		
				Control	<i>Asp. flavus</i>	<i>Asp. parasiticus</i>
Oxalic acid	124.6	112.3	110.2	100.1	103.1	108.3
Malic acid	89.5	90.2	88.8	91.1	87.6	88.3
Lactic acid	19.3	18.7	19.5	19.8	21.1	20.3
Acetic acid	17.5	18.3	18.7	17.5	17.9	19.1
Citric acid	33.6	32.7	31.5	35.8	34.1	34.4

**Table 6. Free amino acid of Doenjang prepared with *Asp. flavus*, *Asp. parasiticus* or antifungal *Bacillus* sp.** (mg%)

	Control	<i>Asp. flavus</i>	<i>Asp. parasiticus</i>	<i>Bacillus</i> spp.		
				Control	<i>Asp. flavus</i>	<i>Asp. parasiticus</i>
Asp	224.3	166.8	161.8	162.3	175.8	151.3
Glu	316.1	227.1	192.8	263.9	248.0	262.7
Ser	11.8	19.1	15.6	15.4	31.5	32.2
Asn	26.5	25.4	21.7	29.2	19.4	28.1
Gly	51.4	33.4	28.1	38.9	34.6	38.5
Gln	31.2	23.3	14.2	29.2	14.1	25.5
His	17.8	13.9	15.3	15.2	20.8	17.1
Thr	54.5	58.3	52.1	62.4	54.6	63.8
Ala	128.2	94.9	85.3	109.1	116.2	105.0
Arg	12.7	8.3	4.9	6.7	8.9	6.4
Pro	72.0	52.3	43.4	58.7	69.4	65.8
Tyr	34.2	26.7	20.2	29.9	55.1	26.4
Val	96.0	79.7	70.8	82.0	96.3	91.7
Met	41.5	39.9	33.4	37.5	49.0	35.0
Cys	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Ile	97.1	76.8	66.9	83.1	98.6	80.9
Leu	132.3	113.6	92.8	119.3	132.5	82.0
Phe	58.4	55.4	43.860.4	66.7	53.9	
Try	184.2	162.7	131.3	168.6	173.5	92.9
Lys	88.6	64.0	49.1	74.0	75.9	136.8
Total	1678.7	1341.6	1143.6	1445.9	1541.1	1406.0

리당 함량 변화는 Table 4와 같다. 된장의 유리당은 glucose가 340.5 mg%, galactose가 85.4 mg%, arabinose가 1.3 mg%였다. 박 등<sup>(19)</sup>은 90일 숙성 전통된장에서 glucose와 galactose가 많았고 arabinose가 소량이었다고 보고하였다. 아플라톡신 생성균이나 길항균 처리로 된장의 유리당 조성이나 함량에 큰 차이를 보이지 않았다.

#### 된장중의 유기산에 대한 영향

아플라톡신 생성균과 길항균 처리에 의한 된장의 유기산 함량은 Table 5와 같다. 된장의 유기산 함량은 oxalic acid 104.6 mg%로 가장 많았고 그 다음으로

malic acid, citric acid, lactic acid, acetic acid 순이었다. 양 등<sup>(20)</sup>은 재래식 된장에서 산기를 나타내는 유기산으로는 oxalic acid, succinic acid, fumarate, citric acid 순으로 많이 함유하고 있다고 보고하였으며 정 등<sup>(21)</sup>은 시판중인 재래식 된장에서 유기산은 oxalic acid가 130.1 mg%로 가장 많고 malic acid, citric acid, succinic acid 순으로 함유하고 있다고 하였다.

된장중 유기산은 아플라톡신 생성균이나 길항균 처리로 큰 변화를 일으키지 않았으나 길항균 처리로 oxalic acid가 약간 감소하였으며 citric acid는 약간 증가 하였다.

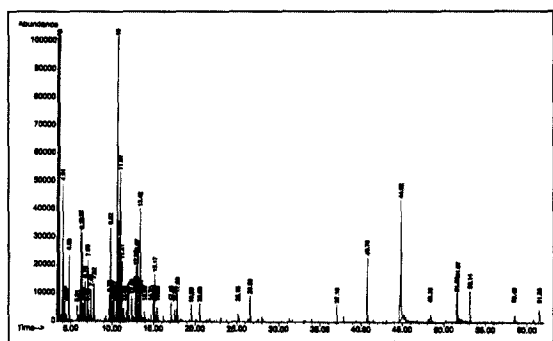


Fig. 2. GC chromatogram of volatile flavor compounds from Doenjang.

Capillary column: HP-5MS (crosslinked 5%HP ME siloxane), Flow rate: Helium (1.0 mL/min), GC-oven Tem.: 40°C(2 min) → 4°C/min → 240°C(10 min), Inlet Tem.: 250°C, Splitless, Detector Tem.: 260°C

### 된장중의 유리아미노산에 대한 영향

일반적으로 된장의 주된 유리아미노산은 glutamic acid, aspartic acid, leucine, cystine 등으로 알려져 있다<sup>(22-23)</sup>. 시료 된장의 유리 아미노산 함량을 측정한 결과는 Table 6과 같다. 대조구 된장의 유리아미노산은 glutamic acid가 316.1 mg%, aspartic acid가 224.3 mg%, tryptophan가 184.2 mg%, leucine이 132.3 mg%의 순으로 많았으며 총 1678.7 mg%였다.

아플라톡신 생성균 처리시 된장의 유리아미노산 총량은 대조구에 비해 337.1~535.1 mg%가 낮았는데, *Asp. parasiticus*를 처리한 된장에서 가장 많이 감소되는 경향을 보였다. Glutamic acid, aspartic acid, tryptophan 등이 모두 감소하는 현상을 보였다. 비록 다른 된장에서는 유리아미노산이 대조구에 비하여 감소하였지만 길항균만을 처리한 된장에서는 큰 변화가 없었다.

### 된장중의 휘발성 향기 성분에 대한 영향

Fig. 2에 나타낸 시료 된장(대조구)의 GC-MS 크로마토그램으로부터 mas spectrum과 retention time을 비교 분석하여 휘발성 화합물을 동정한 결과는 Table 7과 같다. 된장의 휘발성 향기성분은 총 47종 동정되었으며 주된 화합물로는 1-octen-3-ol, 2-methyl butanol, 9,12-octadecadienal, hexadecanoic acid, isobutyl isopentanoic acid ester, 2-pentylfuran, 3-octanone, benzaldehyde, methyl benzene 등의 함량이 높게 나타났다.

아플라톡신 생성균이 처리된 된장의 향기성분은 대조구와 큰 차이 없었으며 아플라톡신 생성균은 된장의 향기 성분에는 아무런 영향을 미치지 않았다. 그리

나 길항균 *Bacillus* sp.을 처리한 된장의 향기성분은 대조구와 약간의 차이를 보였다. 길항균 처리로 2-methyl ester, dimethyl trisulfide, 2-pentylfuran, butanoic acid, 2-methyl butyl ester, 2-methyl-5-isopropyl pyrazine, acetate 2-phenylethyl ester, 9,12-octadecadienal, 2-octyldodecan-1-ol의 향기 성분이 검출되지 않았으며 butanoic acid ethyl ester, 2,4-decadienal, hexadecanoic acid ethyl ester, 9-octadecenoic acid, 9-octadecenal, 9,17-octadecadienal의 향기 성분은 길항균 처리로 생성되었다. 또한 길항균 처리로 2-heptenal과 benzaldehyde O-ethyl ester는 다소 증가한 반면 3-methyl butanoic acid ethyl ester는 감소하였다.

2-pentylfuran은 대두유의 변향 원인물질인데 길항균 처리로 생성되지 않았다. 또한 불쾌취로 알려진 butanoic acid류는 길항균 처리로 없어지거나 감소하였는데 2-methyl butanoic acid methyl ester는 없어졌으며, 2-methyl butanoic acid ethyl ester와 3-methyl butanoic acid ethyl ester는 감소하였다. 된장 향기 성분에서 중요한 역할을 할 alkane류인 octadecane 화합물은 길항균 처리로 오히려 증가하였는데 대조구에서는 3.54%였던 9,12-octadecadienal이 길항균 처리로 없어지고 9-octadecenoic acid가 4.61%, 9-octadecenal이 2.12%, 9,17-octadecadienal이 3.17%로 생성되었다. 김 등<sup>(24)</sup>은 숙성된 재래식 된장의 주된 휘발성 향기성분으로 3-methyl-1-butanol, 2-furancarboxyl aldehyde, 1-octen-3-ol, benzeneacetaldehyde, methyl octadecadienoic acid, methyl octadecenoic acid, dimethyl pyrazine 등을 보고하였다.

## 요 약

본 연구는 아플라톡신 생성균의 생육을 억제시킬 수 있는 길항 미생물을 분리하고 그 길항 미생물을 이용한 된장 제조시 아플라톡신 제어 효과와 된장의 품질에 미치는 영향을 조사하였다. 아플라톡신 생성균인 *Asp. flavus*와 *Asp. parasiticus*에 대해 길항력이 가장 강력한 균을 분리하였으며 그 균은 *Bacillus* 속의 특성을 보였다. 분리한 길항균과 아플라톡신 생성균을 처리하여 제조한 된장의 아플라톡신 함량은 *Asp. flavus*를 처리하였을 때 아플라톡신 B<sub>1</sub>이 27.2 ppb에서 길항균과 함께 처리로 87.5% 감소한 3.4 ppb였으며 *Asp. parasiticus*를 처리하였을 때 아플라톡신 B<sub>1</sub>이 30.3 ppb에서 길항균과 함께 처리로 87.8% 감소한 3.7 ppb였다. 길항균과 아플라톡신 생성균을 처리한 된장의 유리 지방산, 유리당, 유기산함량은 대조구와 큰 차이 없이

Table 7. Volatile compounds identified from Doenjang prepared with *Asp. flavus*, *Asp. parasiticus*, *Bacillus spp.*

Retention time	Compounds	Peak area(%)					
		C	AF	AP	BC	BAF	BAP
3.57	2- Methyl butanol	4.92	5.10	5.03	5.17	4.87	5.25
4.04	Methyl benzene	1.78	1.58	1.84	1.51	1.61	1.84
4.30	2-Methyl butanoic acid, methyl ester	0.32	0.42	0.37	-	-	-
4.80	n-Hexanal	0.82	0.61	0.77	0.93	0.94	0.87
4.86	Butanoic acid, ethyl ester	-	-	-	0.48	0.50	0.37
6.22	2-Methyl butanoic acid, ethyl ester	1.06	0.90	1.14	0.69	0.81	0.74
6.32	3-Methyl butanoic acid, ethyl ester	0.98	0.72	1.05	0.33	0.47	0.51
6.50	Ethyl benzene	0.19	0.42	0.18	0.36	0.25	0.29
6.74	1,3-Dimethyl benzene	0.51	0.32	0.54	0.63	0.58	0.67
7.05	Isoamyl acetate	0.68	0.71	0.60	0.54	0.61	0.74
7.48	1,2-Dimethyl benzene	0.41	0.61	0.54	0.39	0.48	0.52
7.82	1-Octyn-3-ol	0.41	0.33	0.47	0.39	0.50	0.37
9.73	2-Heptenal	0.33	0.47	0.39	0.81	0.94	0.79
9.82	Benzaldehyde	1.47	1.58	1.30	1.62	1.58	1.49
10.10	Dimethyl trisulfide	0.27	-	0.31	-	-	-
10.27	Ethyl propyl disulfide	0.36	0.47	0.39	0.39	0.41	0.35
10.65	1-Octen-3-ol	5.02	5.60	5.37	4.72	5.21	4.49
10.85	3-Octanone	1.02	1.34	1.25	0.72	1.10	0.87
11.01	2-Pentylfuran	1.70	1.57	1.80	-	-	-
11.21	3-Octanol	0.75	0.83	0.60	0.21	0.41	0.62
11.83	Butanoic acid, 3-methylbutyl ester	0.10	0.21	-	-	-	-
12.89	Butanoic acid, 2-methylbutyl ester	0.61	0.44	0.57	0.63	0.70	0.57
12.95	1-Heptene	0.40	0.50	0.48	0.39	0.47	0.35
13.07	Buthyl isovalerate	0.76	0.87	0.80	0.39	0.57	0.60
13.25	2-Methyl-5-isopropyl pyrazine	0.17	0.24	0.15	-	-	-
13.42	Isobutyl isopentanoic acid ester	1.48	1.31	1.08	1.76	1.81	1.64
13.50	Butanoic acid pentyl ester	0.28	-	-	0.63	0.10	0.08
13.98	1-Octanol	0.13	0.24	0.20	-	-	-
15.04	Isoamyl-2-methyl butylate	0.26	-	0.18	-	-	-
15.16	Nonanal	0.55	0.51	0.57	0.69	0.57	0.64
15.49	Benzeneethanol	0.24	0.34	0.40	-	-	-
17.16	2-Docecen-1-al	0.20	0.31	0.73	0.33	0.25	0.18
17.63	1-Nonanol	0.14	0.24	0.11	-	-	-
17.90	Azulene	0.44	0.34	0.33	0.38	0.45	0.50
19.59	Carbamic acid, O-methyl ester	0.18	-	0.20	-	0.17	0.15
20.59	Acetate, 2-phenylethyl ester	0.23	0.41	0.21	-	-	-
22.57	2,4-Decadienal	-	0.21	-	0.36	0.41	0.35
25.15	Benzene acetate, 2-phenylethyl ester	0.09	-	-	-	-	-
26.59	Propanoic acid, 2-phenylethyl ester	0.37	0.41	0.35	0.41	0.45	0.31
37.11	Hexadecanol	0.18	0.24	0.19	-	-	-
40.76	Hexadecanoic acid	1.14	1.51	1.24	1.65	1.50	1.24
41.46	Hexadecanoic acid, ethyl ester	-	-	-	0.21	0.30	0.27
44.82	9,12-Octadecadienal	3.54	4.01	3.75	-	-	-
45.06	9-Octadecenoic acid	-	-	-	4.61	4.57	3.89
48.38	2-Octyldodecan-1-ol	0.11	0.21	-	-	-	-
51.58	Benzaldehyde O-ethyl ester	0.44	0.41	0.54	1.23	1.50	1.47
51.68	9- Octadecenal	-	-	-	2.12	2.65	2.47
53.14	1,2-Benzenedicarboxylic acid, diisoactyl ester	0.52	0.31	0.57	0.60	0.57	0.71
56.81	9,17-Octadecadienal	-	-	-	3.17	3.57	2.80
61.50	Farnesol	0.40	0.45	0.38	0.60	0.61	0.45

C: Control, AF: *Asp. flavus*, AP: *Asp. parasiticus*, BC: *Bacillus spp.*, BAF: *Bacillus spp.+Asp. flavus*, BAP: *Bacillus spp.+Asp.parasiticus*

비슷하였다.

유리아미노산 총 함량은 길항균과 아플라톡신 생성 균 처리로 다소 낮아지는 경향을 보였으나 큰 영향을

미치지 못하였다. 주로 glutamic acid, aspartic acid, tryptophan이 감소하였다.

된장의 향기성분은 아플라톡신 생성균을 처리하였을

때 대조구에 비하여 큰 변화가 없었다. 그러나 길항균 처리로 변형인 2-pentyl furan와 불쾌취인 butanoic acid 류가 소멸되거나 감소하고 octadecene 화합물은 생성되었다.

결국 분리된 길항균은 아플라톡신 생성을 억제시켰으며 된장의 품질에는 그다지 영향을 미치지 않았다.

### 감사의 글

이 논문은 1998년 한국학술진흥재단의 학술연구비(1998-024-G00098)에 의하여 수행된 연구 결과의 일부이며, 지원에 감사 드립니다.

### 문헌

1. Kurtzman, C.d., Horn, B.W. and Hesselstine, C.W. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamari*. J. of Microbiol. 53: 147-158 (1987)
2. Bae, J.W. and Park, W.J. Korean J. Food Sci. Technol. 1: 78-85 (1969)
3. Van Rensburg, S.J., Cook-Mozuffai, P., Van Schalkwyk, D.J., Van Der Watt, J.J., Vincent, T.J. and Prurchase, I.F. Hepatocellular carcinoma and dietary aflatoxin in Mozambique and Transkei. Br. J. Gen. Microbial. 44: 209-220 (1966)
4. Alvarez-Barrea, Pearson, V.A.M., Price, J.F., Gray, Y.I. and Aust, S.D. Some factors influencing aflatoxin production in fermented sausages. J. Food Sci. 47: 1773-1775 (1982)
5. Koltun, S.P., Rayner, E.T., Wadsworth, J.I. and Jr. Gardner, H.K. Inactivation of aflatoxins in cottonseed meal by ammoniation. I. Reaction Studies. J. Am. Oil Chem. Soc. 56: 803-808 (1979)
6. Timothy, E.Lawlor, Steve R.Haworth, Errol Zeiger, Douglas, L. Park and Louise, S. Lee. Mutagenic potential of ammonia-related aflatoxin relation products in cottonseed meal. J. Am. Oil Chem. Soc. 62: 1136-1142 (1985)
7. Hurst, A. Biosynthesis of the antibiotic nisin by whole *Streptococcus lactis* organisms. J. Gen. Microbial. 44: 209-220 (1966)
8. Karunataten, A., Wenzenberg, E. and Bullerman, L.B. Inhibition of mold growth and aflatoxin production by *Lactobacillus* spp. J. Food Prot. 53: 230-236 (1990)
9. Wiseman, D.W. and Marth, E.H. Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* when in the presence of *Streptococcus lactis*. Mycopathologia 73: 49-56 (1981)
10. Kim, J.G. and Roh, W.S.: Changes of aflatoxins during the ripening of korean soy paste and soy sauce and the characteristics of the changes-part 1. effect of *Bacillus subtilis* on the growth and aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus*. J. Fd. Hyg. Safety 13: 313-317 (1998)
11. Krieg, N.R. and J.G. Holt. Bergey's manual of systematic bacteriology, Williams and Wilkins, Baltimor (1984)
12. Collins, C.H. and P.M. Lyne. Microbiological method (5th ed), Butterworths, London (1984)
13. Starr, M.P., H. Stolp, H.G. Truper and H.G. Schlegel. The prokaryotes, A handbook and identification of bacteria. Springer-Verag, Berlin, Heidelberg, New York (1981)
14. A.O.A.C. Official method of Analysis, 16th ed., The Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA, Chapter 49, p.20 (1995)
15. Metcalfe, L.D., Schmitz, A.A. and Pelka, J.R. The rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatographic analysis. Anal. Chem. 38: 514-521 (1966)
16. Luddy, F.E., Barford, R.A., Herb, S.F. and Magidman, P.A. Rapid and quantitative procedure for the preparation of methyl esters of butter oil and fats. J. Am. Oil Chem. Soc. 45: 549-555 (1968)
17. Park, J.S., Lee, M.Y., Kim, J.S., and Lee, T.S. Composition of nitrogen compound and amino acid in soy bean paste (Doenjang) prepared with different microbial sources. Korean J. Food Sci. Technol. 26: 609-615 (1994)
18. Lee, S.H. and Choi, H.S. Change in lipid during aging of soybean paste. J. Korean Soc. Food Nutr. 14: 67-72 (1985)
19. Park, J.S., Lee, M.Y. and Lee, T.S. Compositions of sugars and fatty acid in soybean paste(Doenjang) prepared with different microbial sources. J. Korean Soc. Food Nutr. 24: 917-924 (1995)
20. Yang, S.Y., Choi, M.R. Kim, J.K. and Chung, Y.G. Characteristics of the taste in traditional korean soybean paste. J. Korean Soc. Food Nutr. 21: 443-488 (1992)
21. Jeoung, J.G., Kim, J.S., Lee, S.D., Choi, S.H. and Oh, M.J. Studies on the contents of free amino acids, organic acids and isoflavones in commercial soybean paste. J. Korean Soc. Food Nutr. 27: 10-15 (1998)
22. Seo, J.S., Han, E.M. and Lee, T.S. Effect of *meju* shapes and strains on the chemical composition of soybean paste. J. Korean Soc. Food Nutr. 15: 1-9 (1986)
23. Lee, C.H. Studies on the amino acid composition of Korean fermented soybean *meju* products and the evaluation of the quality. Korean J. Food Sci. Technol. 5: 210-214 (1973)
24. 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: 557-565 (1992)