



## 저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



**저작자표시**, 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



**비영리**, 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



**변경금지**, 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

**저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.**

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

工學碩士 學位論文

향류식 초임계 이산화탄소를 이용한  
간장의 처리 및 천연 기능성 물질  
첨가에 따른 품질 특성



2008 年 2 月

釜慶大學校 大學院

食 品 工 學 科

李 珉 璟

工學碩士 學位論文

향류식 초임계 이산화탄소를 이용한  
간장의 처리 및 천연 기능성 물질  
첨가에 따른 품질 특성

指導教授 全 炳 秀

이 論文을 工學碩士 學位論文으로 提出함.

2008 年 2 月

釜慶大學校 大學院

食 品 工 學 科

李 珉 璟

李珉璟의 工學碩士 學位論文을 認准함.

2008年 2月 26日



主 審 農 學 博 士 梁 志 榮 印

委 員 農 學 博 士 安 東 賢 印

委 員 工 學 博 士 全 炳 秀 印

# 목 차

|                                                   |     |
|---------------------------------------------------|-----|
| Abstract .....                                    | iii |
| 서 론 .....                                         | 1   |
| 재료 및 방법 .....                                     | 8   |
| 1. 재료 및 시약.....                                   | 8   |
| 2. 실험방법.....                                      | 8   |
| 2.1 연속식 향류 초임계 이산화탄소 추출 공정을 이용한 간장의<br>처리.....    | 8   |
| 2.2 일반성분 분석.....                                  | 10  |
| 2.3 휘발성 향기 성분 분석.....                             | 12  |
| 2.4 미생물 검사 .....                                  | 12  |
| 2.5 초임계 이산화탄소를 이용한 천연 기능성 물질 추출.....              | 14  |
| 2.6 천연 기능성 물질 첨가 간장의 제조.....                      | 16  |
| 2.7 Astaxanthin 동정.....                           | 16  |
| 2.8 Fucoxanthin 동정.....                           | 16  |
| 2.9 Allyl Isothiocyanate 동정.....                  | 17  |
| 2.10. 항산화 활성 측정.....                              | 17  |
| 결과 및 고찰 .....                                     | 19  |
| 1. 연속식 향류 초임계 이산화탄소 추출에 따른 간장의 성분 분석.....         | 19  |
| 2. 간장내의 휘발성 향기 성분 분석.....                         | 27  |
| 3. 연속식 향류 초임계 이산화탄소 추출 간장의 저장 중 변화.....           | 39  |
| 3.1. 저장 기간에 따른 간장의 미생물 변화.....                    | 39  |
| 3.2. 저장 기간에 따른 간장의 일반성분 변화.....                   | 45  |
| 4. 간장 내 천연 기능성 물질의 동정.....                        | 50  |
| 4.1 Astaxanthin 첨가 간장 내의 astaxanthin 함량 동정.....   | 50  |
| 4.2 Fucoxanthin 첨가 간장 내의 fucoxanthin 함량 동정.....   | 50  |
| 4.3 AITC 첨가 간장 내의 allyl Isothiocyanate 함량 동정..... | 53  |

|                                              |        |
|----------------------------------------------|--------|
| 5. 간장 내 천연 기능성 물질의 일반성분.....                 | 53     |
| 5.1 Astaxanthin 첨가 간장의 일반성분.....             | 53     |
| 5.2 Fucoxanthin 첨가 간장의 일반성분.....             | 56     |
| 5.3 Allyl Isothiocyanate 첨가 간장의 일반성분.....    | 58     |
| 6. 천연 기능성 물질 첨가 간장의 저장 중 변화.....             | 58     |
| 6.1 Astaxanthin 첨가 간장의 저장 중 화학적 변화.....      | 58     |
| 6.2 Fucoxanthin 첨가 간장의 저장 중 화학적 변화.....      | 61     |
| 6.3 Allyl Isocyanate 첨가 간장의 저장 중 화학적 변화..... | 63     |
| 7. 천연 기능성 물질 첨가 간장의 항산화성.....                | 65     |
| 7.1 Astaxanthin 첨가 간장의 항산화성.....             | 65     |
| 7.2 Fucoxanthin 첨가 간장의 항산화성.....             | 68     |
| 7.3 Allyl Isothiocyanate 첨가 간장의 항산화성.....    | 72     |
| <br>요      약 .....                           | <br>76 |
| 참 고 문 헌 .....                                | 78     |
| 감사의 글 .....                                  | 90     |





# Quality Characteristics of Soy Sauce Treated by Countercurrent Supercritical Carbon Dioxide and Natural Functional Compounds

Min-Kyung Lee

*Department of Food Science and Technology, Graduate School,  
Pukyong National University*

## Abstract

The quality characteristics of soy sauce were studied using continuous countercurrent supercritical carbon dioxide (CC-SCO<sub>2</sub>) at various conditions. The functional compounds extracted from natural resources such as crab shell, brown seaweed and wasabi by SCO<sub>2</sub> was added to the soy sauce recovered after SCO<sub>2</sub> extraction and the soy sauce containing functional compounds were investigated for quality characteristics and antioxidative activity.

The extraction column of 1,200 mm height and 19 mm I.D. was used as a spray and packed with rasching ring modes respectively. Treatment conditions of a raw soy sauce were temperature(35, 45°C), pressure(100, 170 bar), the sort of column and the change of continuous phase. Off-flavors of soy sauce were identified at different conditions. During the storage period, the treated soy sauce was examined for chemical and micro-organisms properties such as amino nitrogen, browning, buffer action and total bacterial count, *Bacillus*. sp., yeast. And then natural functional compounds (astaxanthin, fucoxanthin and allyl isothiocyanate) extracted from the

natural resources (crab shell, brown seaweed and wasabi) by  $\text{SCO}_2$  were added to the treated soy sauce. The soy sauce containing functional compounds were examined for chemical properties and antioxidative activity.

In the treatment of soy sauce using  $\text{CC-SCO}_2$ , there are no considerable change in chemical properties, but crude lipids were decreased by the removal of lipid from soy sauce. In case of change in free amino acid, there is a little difference. The off-flavors in soy sauce were decreased by  $\text{CC-CSO}_2$  treatment. Especially, indole and butyric acid which are main off-flavor in soy sauce were removed completely. The soy sauce treated at  $45^\circ\text{C}$ , 100 bar, spray column was most effective in aspect of decreasing of flavor of soy sauce. During storage period, the soy sauce treated by the spray column was lower than that of untreated soy sauce in the microbial change, but the soy sauce treated by the packed column was higher than that of untreated soy sauce. In chemical change of the soy sauce was evaluated as improvement in quality. In the soy sauce containing large amount of natural functional compounds showed higher antioxidative activity in comparison with the that of small amount.

Resulting of quality properties in the soy sauce treated by  $\text{CC-SCO}_2$  and containing natural functional compounds, the soy sauce was slightly improved in quality. The sensory characteristics of the soy sauce treated by  $\text{SOC}_2$  was improved by removal of off-flavors. In this study, it was founded that the antioxidant activity of the soy sauce containing functional compounds was higher than non-containing soy sauce.



## 서 론

간장은 아시아에서 주로 사용하고 있는 조미료 중의 하나로 소맥을 첨가하거나 소맥 없이 콩만으로 제조된다. 일본에서는 shoyu, 중국에서는 chiang-yu(또는 chiang-yi)라고 명하고 있으며, 각 나라마다 제조방식이 조금씩 다르다. 과거에는 동남아시아에서 주로 소비되었으나, 세계화가 진행됨에 따라 사용범위가 점차 넓어지고 있다(Desmond K, 1997; Joo, 1998). 식품공전 상의 간장은 “단백질 및 탄수화물이 함유된 원료로 제국하거나 메주를 주원료로 하여 식염수 등을 섞어 발효한 것과 효소분해 또는 산분해법 등으로 가수분해하여 얻은 여액을 가공한 것을 말한다.”로 정의되고 있으며, 양조간장, 산분해간장, 혼합간장, 효소분해간장, 한식간장으로 나뉠 수 있다(한국식품공전).

우리나라의 경우 간장은 국민들의 식생활에 없어서는 안 되는 중요한 조미료로써 오랜 전통과 역사를 가지고 고대로부터 온 국민이 사용해 오고 있는 전통 대두 발효식품이다(Jo *et. al.*, 1989). 육류자원이 부족한 우리 민족에게 곡류에서 부족하기 쉬운 필수 아미노산과 필수 지방산의 주된 공급원이며 독특한 향미를 제공하여 영양적으로나 식품학적으로 매우 우수한 식품이다(Cheigh, *et. al.*, 1993; Ito, *et. al.*, 1993).

장류에 대한 정확한 기원은 알 수 없으나 이미 기원전에 장류가 이용되고 있었던 것으로 생각이 되며, 우리나라에서는 삼국사기에 ‘시(豉)’라는 기록이 있어 통일신라시대에 이미 간장과 된장이 만들어 졌을 것으로 추정하고 있다(Shin, 1972; Lee, 1978). 산림경제의 기록에 따르면 메주를 만들 때 콩, 메밀가루, 밀가루, 보릿가루 등 탄수화물을 첨가하여 장을 만들었다는 기록이 있고(Hong, 1715), 규합총서에는 콩만을 이용해 메주를 만들고 간장을 제조 했다는 기록이 있다(Lee, 1869).

장류는 원료, 지방의 기후, 환경 등 기타 요인에 의해 품질의 변화를 보이며 우리나라에서 장류가 산업적으로 생산되기 시작한 것은 일본인의 정치 침투와 더불어 시작되었으며, 해방이후 국군이 창설되면서 수

요가 급격히 증가하였다. 또한 서구화의 영향으로 사회구조가 바뀌고 인구의 도시집중화, 주택구조의 변화와 자가 제조 등의 어려움으로 공장 제품에 대한 수요가 증가하였다. 1910년 일본식 간장이 생산되기 시작한 이래 1960년대 식품위생법이 공포되면서 장류 산업도 감독을 받게 되었다. 1970년대에는 장류 산업이 급격하게 발전을 이루었으며, 1985년에 산분해간장의 유해성으로 인한 간장 파동으로 침체기를 겪었으나, 최근 품질 향상으로 인해 간장의 소비가 증가하고 있다(Jeong, 1995). 최근에는 장류는 조미료로서의 역할 이외에 영양 강화나 생리활성물질을 함유한 식품으로서 그 가치를 찾을 수 있다(Shin, 2001). 2004년 간장 생산량은 연간 43,587톤이며 출하액이 21,024,536,000원이며, 55개국에 수출되는 간장의 수출량은 7,464톤으로 이중 러시아에 가장 많은 양이 수출되고 있다(Shin, 2005).

최근 간장의 소비동향은 건강을 중요시하는 소비자의 경향이 식품 선택에 있어서 중요한 요인으로 인식되고 있는 가운데 천연 자연식품을 섭취하려고 함으로써 방부제나 사카린의 사용보다는 천연 감미료인 스테비오사이드를 이용한 무 사카린 간장과 주정을 사용한 무 방부제 간장이 생산되고 있다. 또한 소금대신에 죽염을 사용한 죽염간장, 마늘의 알리신 성분을 최대한 살린 마늘 간장, 장내 세균인 비피더스균의 생성력을 높여주는 올리고당 간장, 유해 산소제거 효소를 첨가한 제품들이 생산, 판매되고 있다. 또한 불고기 양념간장, 초간장, 회 간장, 조림간장, 무침간장의 기능별 간장과 저염간장(염분 12%), 감염간장(염분 8%)과 같은 특수 소비자를 위한 간장이 국내에서도 생산 판매되기 시작했다. 여기에 생리활성 물질을 함유하도록 하거나 건강보조식품으로 쓰이는 것을 함유한 기능성 간장이 특허를 받고 일부는 생산되고 있다(Shin, 2001).

간장을 상품으로 유통시키기 위해서는 장기적인 보존성을 확보가 필수적이나, 시중에 유통되고 있는 간장 제품은 총 질소성분(total nitrogen)의 함량이 0.7~1.2%로써 미생물 수준에서의 보존성 확보가 문제시 되고 있다. 일반적인 간장의 살균에는 가열살균 방식이 주로 사용되고 있으며 한외여과법도 일부 사용되고 있으나 두 방법 모두 내열성

미생물의 잔존, 포장시의 2차 오염 등에 의해 보존효과를 얻기 어렵다. 따라서 상업적으로 생산되고 있는 간장은 대부분 안식향산 ( $0.6 \text{ g/L}$  이하)과 파라옥시안식향산( $0.25 \text{ g/L}$  이하)의 합성보존료를 병행해서 사용하고 있는 실정이다(Lee, 1999). 또한 열 살균 방식은 한식간장을 비롯한 대두발효식품의 유용한 기능성으로 알려진 항산화효과, 면역증진효과, 혈전용해효과 등을 감소시킬 수 있다. 따라서 간장의 기능성을 낮추는 가열살균 방식이나 소비자들의 기피요인이 되고 있는 화학보존료를 사용하지 않고도 간장을 장기적으로 안전하게 보존할 수 있는 기술의 개발이 필요하다(Song et. al., 2001).

간장의 향기 성분의 특징은 원재료와 사용된 미생물의 균주의 종류뿐 아니라 생산 방법에 따라 달라진다. 또한 간장의 제조 과정 중 원재료의 가열 처리, 미생물 발효, 숙성, 살균 과정을 거치는 동안에 향기성분이 생성되게 된다.(Nunomura, et. al., 1993; Pitipong, et. al., 2003)

노화진행의 주요원인이 일반적인 산화적 대사에서 발생하는 해로운 프리라디칼의 형성 때문이라고 발표하였다(Harman, 1956). 이러한 프리라디칼들은 우선적으로 세포막 구조내의 지질과 지질분자를 우선적으로 공격하는 것으로 알려져 있다(Del Maestro, 1980) 즉, 프리라디칼은 세포내에서 거대분자, 부 세포성 성분 또는 세포, 조직에서 생성될 때 독성을 일으킴으로써 질병을 일으키거나 질병의 원인이 될 수 있다(Kim, 2004; Yoo, 2005). 이러한 산화적 스트레스로 인한 조직의 손상체계를 예방하고 치료하는 물질을 항산화물이라고 하며 항산화물의 역할은 크게 금속이온의 착염화 기능, enzyme(superoxide dismutase)활성과 enzyme 유사활성 물질에 의한 프리라디칼 포집력으로 radical 반응을 종결시키는 것으로 보고되고 있다(Babizhayev, 1994; Decker, 1992).

간장이 항산화효과를 가지고 있는 것은 많은 연구자들에 의해 밝혀졌다. 대두에서 유래하는 flavone물질, 아미노산류, 펩타이드 등에 의해 간장이 항산화 효과를 가진다는 보고가 있으나(Moon, 1987), 가장 큰 영향을 주는 물질은 간장의 흑갈색 색소인 melanoidin인 것으로 밝혀졌다(Hayes, 1977; Moon, 1989; Cheigh, 1990). 즉 carbonyl 화합물과

amino acid, peptide, protein 등의 amino 화합물을 기질로 하여 maillard 반응을 통해 생성된 melanoidin은 식품의 저장, 가공 과정에 있어서 가장 빈번하게 생성되는 검은색 색소 물질로써 색, 향 등 간장의 품질에 영향을 미친다(Kim, 1995; Jeong, 1981). 또한 이 물질의 생리 활성작용에 대한 관심이 증대되고 있다(Kawamura, 1983; Yamaguchi, 1986). Melanoidin의 항산화 효과는 여러 연구자들에 의해 보고되고 있는데, maillard 반응의 초기반응에서 생성되는 reductone 구조로 인한 환원작용과 금속 킬레이트 작용 등이 중요한 항산화 메커니즘으로 밝혀지고 있다(Krigaya, 1969). 간장의 항산화 효과에 대한 연구로 간장이 가열우육 및 리놀렌산에 대해 강력한 항산화효과를 나타낸다는 것을 보고하였다(Cheigh, *et. al.*, 1986; 1987; 1993). 또한 불포화지방산의 함량이 높은 생선을 조리 할 때 간장을 사용하면 지방 산화를 상당히 억제할 수 있다고 보고 하였다(Ryu *et. al.*, 2002).

게 껍질에는 astaxanthin (3-3'-dihydroxy- $\beta$ -carotene-4,4'-dione) 이라는 색소가 존재하는데 이는 카로테노이드 색소로서 xanthopyll류에 속하며 새우, 바다가재, 연어, 게 껍질 등에 함유되어 있다. 동물 조직 내에서 단백질과 결합하여 복합체 형태로 존재하나 가열 시에 결합하고 있는 단백질이 변성 분리되어 유리된다(Kim, 1995). Astaxanthin은 색소로서 기능 이외에 항산화력 및 면역 증진 효과를 지니며 많은 생체 기능성 물질로 부각되어지고 있다(Jyonouchi *et. al.*, 1991; 1993). 특히, 항산화제로서의 역할을 할 수 있으며(Lim *et. al.*, 1992; Palozza *et. al.*, 1992), 강력한 항산화제인  $\alpha$ -tocopherol 보다 높은 항산화 능력을 가지고 있다고 보고되고 있다(Schroeder *et. al.*, 1993; Mike, 1991).

미역과 같은 해조류의 경우 free radical과 다른 과산화물을 생성할 수 있는 빛과 산소에 노출되어 불포화지방산의 경우 광역화적인 손상을 받기 쉬움에도 불구하고 산화적 손상을 일으키지 않는 것은 해조류 내에 항산화적 기작과 항산화성분이 있다는 것을 시사한다(Matsukawa *et. al.*, 1997). 미역에 함유된 항산화성분 중에 하나인 fucoxanthin은



carotenoid계의 일종으로 chxanthophyll류에 속한다. Carotenoid계의 색소는 free radical 반응의 억제기작에 의해 발생하는 활성산소로부터 세포와 조직을 보호하는 중요한 기능을 한다고 보고되어 있다 (Giovannucci, 1999).

겨자무, 고추냉이를 비롯한 십자화과 식물에 분포하는 allyl isothiocyanate(AITC)는 소화촉진, 비타민 B1의 합성 촉진, 비타민 C의 산화억제, 식후 체내 이상발효 억제, 구충제, 항균, 항진균, 항암, 살충 등의 작용이 있는 것으로 알려져 있다(Kawakishi, 1985; Fukee, *et. al.*, 1994). AITC의 기능 중 항균력에 대해 주로 연구되어 왔으나, 항산화능도 가지는 것으로 보고되고 있다(Seo, *et. al.*, 1995; Kumagai, *et. al.*, 1994).

최근 신 분리공정 기술로써 각광받고 있는 초임계 유체 기술(SCF, supercritical fluid technology)은 최근 20년간 미국, 일본 및 독일 등 선진 외국의 화학 산업 분야에서 새로운 관심을 모으고 있다. 초임계 상태란 유체의 고유 임계점 이상의 압력과 온도에서 기체상과 유사한 확산계수, 점도 등의 전달 물성을 갖고 액체상과 비슷한 밀도를 갖도록 조절된 유체를 말한다. 이러한 특성을 가진 초임계 유체를 이용한 추출은 일반적으로 화학공정에서 물질분리 방법으로 주로 사용되고 있는 추출법이나 증류법에 의한 분리효과를 모두 이용하고 있으며, 추출 원리는 기본적인 상평형 관계와 임계점 부근에서의 열역학적 물성 및 점도와 확산계수 등의 이동특성의 변화에 의한 것이다.

초임계 유체를 이용한 혼합물의 분리는 상온 부근에서 이루어지므로 식품공업에서 열에 민감한 물질의 추출에 적합하다. 또한 물질 분리에 사용되는 에너지의 양이 적고, 용매 회수가 용이하다는 장점을 지니고 있다. 특히 식품 및 의약품 분야에 주로 이용되는 초임계 유체인 이산화탄소는 임계온도와 압력이 각각 31℃와 7.38 MPa로 다른 유체에 비해 쉽게 초임계 상태를 만들 수 있고 무색, 불연성 무독성 및 용질과의 비 반응성의 장점이 있어 널리 이용되고 있다(Gerd, 2005).

이산화탄소(CO<sub>2</sub>)가 항균 활성을 가지며, 압력을 가할 때 그 억제효

과는 증가 된다고 알려져 있다. 식품의 살균에 대안적인 방법으로써 고압 CO<sub>2</sub> 처리를 이용한 방법이 이전 연구들에 의해 실행되었다(Osman, 2000; Haas, 1989; Lin, 1994). 가압 하의 CO<sub>2</sub> 처리는 멸균, 살균 등에 이용되는 시간이나 온도를 낮출 수 있으며, 이에 따라 천연물질의 민감한 성분의 열적 변성을 최소화 할 수 있다(Ballestra, 1996). 고압 하의 CO<sub>2</sub>에 대한 기존 연구가 많이 행해졌으나 세포 비활성에 대한 메커니즘은 아직 명확하지 않다.

일반적으로 산업적 운전에서 batch 식이나 반 연속식 공정과 비교했을 때 연속식 공정에서 경제적 편의성이 더 높다. 또한 향류식 운전은 용매와 용질간의 물질 전달에 대해 더 큰 추진력을 가지므로 더 효과적인 경향이 있다. 또한 용매의 필요량이 적은 반면 원료의 처리량을 증가시킬 수 있어 효율적이며, 일반적인 초임계 유체 추출공정에 비해 용매 내에 추출물의 농도를 증가시킬 수 있고 raffinate 내에 잔류물의 양을 감소시킬 수 있는 장점을 가지고 있다. 하지만 적당한 분리를 달성하기 위해 비교적 낮은 분리 요인을 가진 두 종의 기질을 필요로 한다(Gerd, 2005).

향류식 공정을 초임계 유체 추출에 이용 한다면 유사한 특성을 지닌 성분들의 분리에 이용 가능할 것이다. 향류식 초임계 유체 추출 공정은 유리 지방산, tocochromanols, carotenoids와 같은 고순도 화학약품에 일반적으로 적용 되고 있다. 향류식 초임계 유체 공정은 n-3 지방산 에스테르의 분별, 알코올과 물의 분리, 향기성분의 분리, 또한 감귤류 오일의 분별, 가식용 오일로부터의 squalene의 회수, 가식용 오일의 탈산, carotenoids의 강화에 적용된다.

특히 초임계 이산화탄소를 이용 추출한 간장의 향기성분에 관한 연구는 보고되었으나(Kitakura, 1994), 이는 초임계 이산화탄소 추출에 의한 간장의 향기성분 제거율에 관해서만 보고했으며, 국내산 시판장류에 대한 초임계 이산화탄소 추출에 따른 향 성분 변화에 대한 연구는 아직 없다. 또한 초임계 이산화탄소 추출 간장의 항산화 활성과 저장성에 관한 연구는 아직 행해지지 않았다.



따라서 본 연구에서는 간장의 저장성 증진에 대해 연구하기 위해 연속식 향류 초임계 이산화탄소(CC-SCO<sub>2</sub>)를 이용 간장 내 지질을 제거하여 기간에 따른 간장의 화학적 및 미생물적 변화를 관찰하였으며, 처리 조건에 따른 휘발성 성분의 변화를 관찰하였다. 또한 게 껍질, 미역, 고추냉이 등의 천연물에서 항산화 물질을 추출하여 농도별로 간장에 첨가 시 화학적 변화 및 항산화 효과에 대해 연구 하였다.



## 재료 및 방법

### 1. 재료 및 시약

본 실험에 사용된 간장은 (주) 오복식품으로부터 제공받아 실험에 사용하였다. 간장 제조에 사용된 균주는 *Aspergillus oryzae*이며, 제조 공정 중 압착과정이 끝난 간장으로 살균과 배합과정 전의 생 간장을 사용하였다. 천연 향산화물질 추출을 위해 사용된 홍게(*Chionoecetes japonicus*) 껍질은 경북 영덕에 위치한 (주)금호화성에서 구입했으며, 기장지역에서 재배된 미역(*Undaria pinnatifida*)을 구입해 실험하였다. 또한 고추냉이(*Wasabia japonica matsum*)는 강원도 철원군에서 수경 재배 한 고추냉이를 사용하였다. 게 껍질, 미역, 고추냉이는 각각 3일 동안 동결건조 하여 심온 저장고(-60℃)에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

추출에 사용된 이산화탄소는 순도 99.9%의 식품용이며, HPLC 분석에 사용된 유기용매는 모두 HPLC grade(Sigma co. Ltd.)를 사용하였다. 또한 분석에 사용된 모든 시약은 1급 분석용 시약을 사용하였다.

### 2. 실험방법

#### 2.1. 연속식 향류 초임계 이산화탄소 추출 공정을 이용한 간장의 처리

초임계 유체로 이산화탄소를 사용하여 간장내의 지질 및 이취성분을 제거하는 장치는 Fig. 1에 나타내었다. 추출탑(Separation column)은 길이 1,200 mm, 내경 19 mm 크기로 stainless steel을 사용하여 고압 하에서 추출이 수행되도록 설계되었고, 공정에 연결되는 pipe는 stainless steel (SS-316)을 사용했다. 시료인 간장은 추출탑의 상부에서 펌프를 이용하여 탑 내부로 유입되고, 추출 용매인 액체 상태의 이산화탄소는 탑의 하부를 통해 탑 내부로 유입되도록 설계되었다. 액체 이산화탄소로부터 용매를 초임계 압력으로 변환시키는 펌프는 약 500 bar까지 유지할 수 있는 액체 형 고압펌프를 사

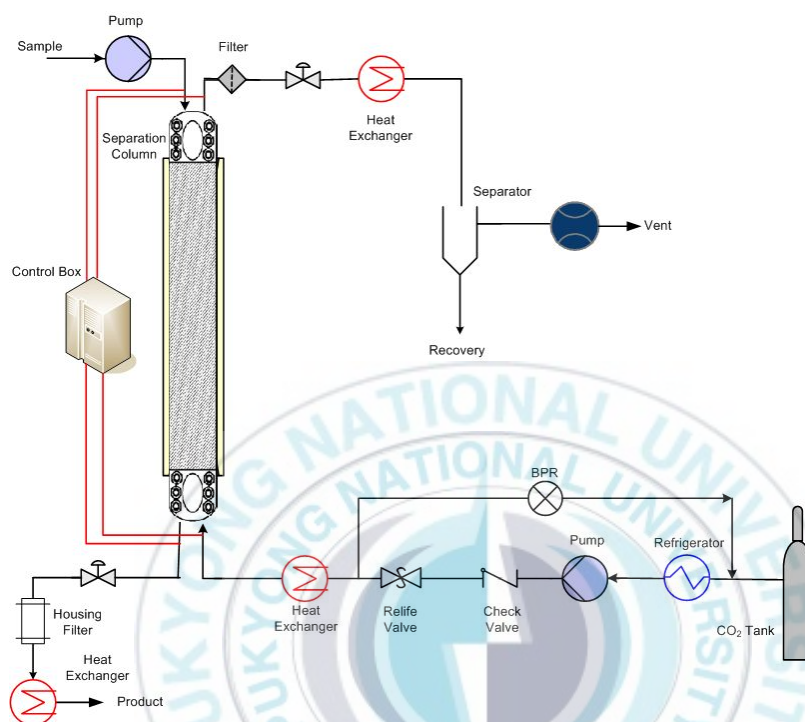


Fig. 1. Diagram of continuous countercurrent extraction apparatus using supercritical carbon dioxide.

용했다. 액체 상태로 추출탑에 들어가고 나오는 초임계 이산화탄소의 온도는 센서를 사용하여 측정되었고 추출탑, 분리조, 펌프에서의 압력은 센서를 이용한 압력변환장치 또는 압력 gauge를 사용하여 측정했다. 추출공정내의 압력은 back pressure regulator로 조절하고 초임계 이산화탄소와 분리된 지질 및 이취성분은 탑의 상부를 통해 나와 분리조(separator)에서 분리되었고, 사용된 초임계 이산화탄소의 양은 습식 flow meter로 측정된다. 지질 및 이취가 제거된 간장은 탑의 하부를 통해서 housing filter를 거쳐 회수된다. 추출탑 내부를 채우는 충전물은 rasching ring 을 사용하였으며, 충전물의 공극률은 62%였다. 간장은 분당 12.8 mL가 추출탑 내부로 유입되고 이산화탄소의 유량은 분당 15 mL로 도입되었다. 간장내의 지질 및 이취성분 제거를 위한 CC-SCO<sub>2</sub> 실험 조건은 Table 1에 나타내었다. 즉, 조건 변수로는 온도(35,45℃), 압력(100, 170 bar), 이동상과 고정상의 변화, 충전물의 유무에 따라 추출조건을 설정하였다.

## 2.2. 일반성분 분석

SCO<sub>2</sub> 처리 전과 처리 후의 간장의 일반성분은 총질소, 아미노산성 질소, 갈색도, 식염, 완충능, 조지방을 측정하였다. Buchi distillation unit(Germany ; B-324) 장치를 이용해 총질소 함량을 구했다. 아미노산성 질소는 Sorensen formal titration법에 의해 (Sorensen, 1907), 갈색도는 여과액의 흡광도(O.D. 500 nm)로 구했다(Park. et. al.,1989). 식염은 Mohr법에 의해 측정하였으며 (Chung, et. al. 1992), 완충능은 간장 시료 원액 10 mL를 pH meter(Delta350, Mettler, USA)를 이용하여 측정하고, 0.1 N NaOH 6 mL를 넣은 후 pH 값의 차이를 완충능으로 하였다. 조지방은 soxhlet법에 의해 실험하였다(Joo et. al., 1992).

또한 SCO<sub>2</sub> 처리에 따른 간장의 저장 중 변화를 살펴 보기위해 각 조건에 따라 처리된 간장을 37℃, 암소에서 밀봉 상태로 저장하면

Table 1. The treatment conditions of soy sauce using CC-SCO<sub>2</sub>

| Parameters         | Conditions                  |
|--------------------|-----------------------------|
| Solute             | Soy sauce                   |
| Solvents           | Carbon dioxide              |
| Temperature        | 35, 45℃                     |
| Pressure           | 100, 170 bar                |
| Height of column   | 1.2 m                       |
| Diameter of column | 19 mm                       |
| Sort of packing    | Rasching ring               |
| Continuous phase   | CO <sub>2</sub> , soy sauce |
| Dispersed phase    | soy sauce, CO <sub>2</sub>  |
| Sort of column     | spray column, packed column |



서 경시적으로 일반성분 검사를 행하였다.

시판간장,  $\text{SCO}_2$  처리 전의 간장 원액,  $\text{SCO}_2$ 를 이용 처리된 간장 2종(온도:  $35^\circ\text{C}$ , 압력: 170 bar, 연속상: 간장, 분산상:  $\text{CO}_2$ , 컬럼의 종류: spray column, packed column)의 총 4종의 시료를 이용 유리 아미노산의 함량을 분석하였다. 시료인 간장을 희석하고 여과한 후에 S433 Amino acid analyzer (Sykam, Gilching, Germany)를 이용하여 유리아미노산의 함량을 분석하였으며, column size는 4 mm i.d.  $\times$  150 mm, resin lithium form, analysis cycle time 160 min, reactor size 15 m, reactor temperature  $130^\circ\text{C}$ , flow rate(buffer: 0.45 mL/min, ninhydrin: 0.25 mL/min)의 조건으로 분석하였다.

### 2.3. 휘발성 향기 성분 분석

추출 전과 후의 휘발성 성분의 동정을 위해 자동 열 탈착 시스템(ATD; automatic thermal desorber, ATD-400, Perkin Elmer, USA)과 GC/MS(HP 6890/QP 2010A, Shimadzu, Japan)를 이용했다. 간장 1 mL을 500 mL 갈색병에 넣어  $50^\circ\text{C}$  건조기에서 30분 동안 휘발성 성분을 발생시켜 흡착튜브(Tenax-TA)에 흡착시켰다. 흡착튜브를 ATD에 장착해 휘발성 성분을 탈착 후 탈착된 휘발성 성분이 GC/MS내로 도입되도록 했으며, GC/MS의 분석 조건은 Table 2와 같다.

### 2.4. 미생물 검사

연속식 향류 초임계 이산화탄소 처리에 따른 간장의 저장 중 변화를 살펴 보기위해 각 조건에 따라 처리된 간장을  $37^\circ\text{C}$ , 암소에서 밀봉 상태로 저장하면서 경시적으로 미생물 검사를 행하였다. 간장 1 mL를 멸균 식염수(NaCl, 1.0%)로 1/10씩 연속 희석하여 총균수, *Bacillus*. sp., 효모의 선택배지에 pour plating method로 접종 배양하여 미생물 검사를 실시하였다. 이때, 총균수(Difco, 10th, a)는

Table 2. The condition of analysis of volatile compounds in soy sauce

| Parameter                  | Condition                 |
|----------------------------|---------------------------|
| ATD-400(Perkin Elmer, USA) |                           |
| Tube type                  | Tenax-TA                  |
| 2nd split ratio            | 7:1                       |
| 1st desorption             | 320℃(3 min)               |
| 2nd desorption             | 340℃(1 min)               |
| 25t cryo temp              | -30℃                      |
| GC/MS(QP-2010, Shimadzu)   |                           |
| Oven temperature           | 35℃(10 min)               |
|                            | 8 °C/min - 120℃(10 min)   |
|                            | 12 °C/min - 180℃(7 min)   |
|                            | 15 °C/min - 230℃(10 min)  |
| Column                     | AT-1(60 m×0.32 m ×1.0 μm) |
| Column flow                | 0.62 mL/min               |
| Interface temperature      | 250℃                      |
| Mass range                 | 20~350 m/z                |
| Column pressure            | 15.7 psi                  |
| MS detector temperature    | 250℃                      |
| Carrier gas                | He(99.9999%)              |

Nutrient agar (Difco), 효모(Difco, 10th, b)는 potato dextrose agar(difco)에 각각 시료를 접종하여 30℃에서 3일간 배양하여 생성된 colony를 계수 하였으며, *Bacillus*. sp.(Colins, 1989)는 dextrose tryptone agar (Difco)에 접종 한 다음 50℃에서 3일간 배양해 colony를 계수하였다.

## 2.5. 초임계 이산화탄소를 이용한 천연 기능성 물질 추출

천연물로부터 기능성 물질의 추출은 초임계 이산화탄소 추출 장치를 이용하여 추출하였으며 추출 공정도는 Fig. 2와 같다. 실험 방법은 포화압력 상태인 이산화탄소가 실린더로부터 냉각기(-20℃)를 통과하여 이산화탄소 내에 존재하는 기포가 제거된 후 고압 metering pump에 의해 일정한 유량으로 유입되어 시스템내의 설정 압력까지 수행되었다. 고압 펌프로부터 추출조에 유입되는 에탄올을 설정된 추출 온도에 따라 항온조에 의해 예열되도록 설계되었다. 추출조 내의 온도는 thermocouple에 의해 감지되어 추출 온도를 조절하게 되며 추출조 외부에 heating jacket을 설정하여 추출조 내부의 온도를 일정하게 유지시켰다. 시스템내의 전체 압력은 back pressure regulator valve를 부착시켜 순간 압력변화로 인한 시스템내의 추출조건 변화를 방지하였다. 고압 pump와 압력 조절기 앞에 7 micron filter를 설치하여 추출이 진행되는 동안 용매 이산화탄소와 고체 시료의 입자에 의한 시스템의 흐름이 중단되는 것을 방지시켰으며 safety valve를 부착시켜 시스템내의 excess pressure를 제거하였다. 또한 실험 종료 후 system 내의 고압으로 인한 압력의 역류로 고압펌프의 손상을 방지하기 위해 고압펌프 출구에 check valve를 설치하였다. 초임계 이산화탄소는 추출조 내의 시료로부터 지질을 추출하여 낮은 압력 상태로 분리조 내에 유입되어 용제와 용매를 쉽게 분리시키며 이 때 휘발성 정유성분의 손실을 최소화하기 위하여 cold trap을 설치하였다. 이 때 추출공정 동안 사용된 이산화탄소의 양은

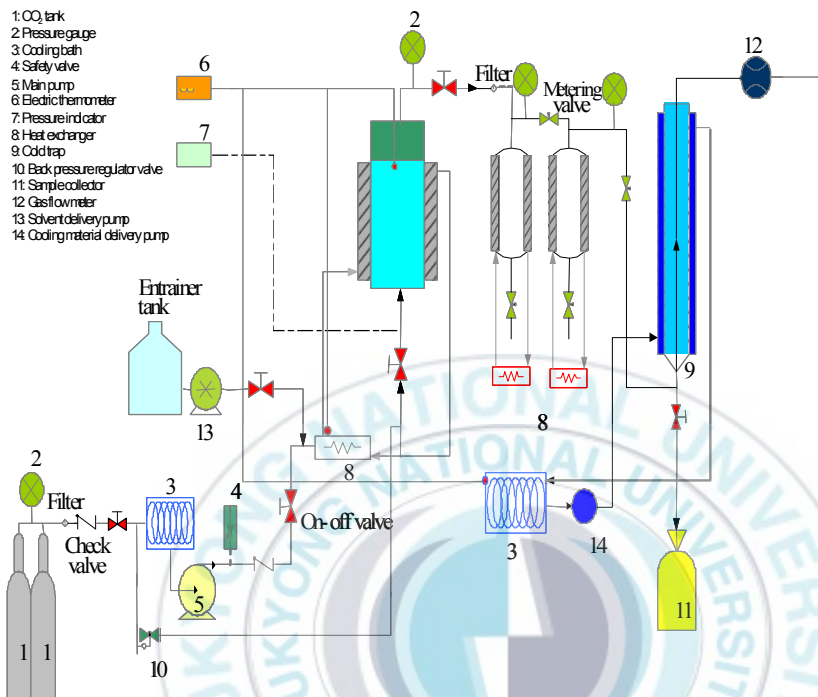


Fig. 2. Diagram of S-CO<sub>2</sub> extraction apparatus for natural functional materials extraction.

이산화탄소가 gas meter를 통과함으로 측정하였다. Astaxanthin은 35℃, 100 bar에서, fucoxanthin은 35℃, 200 bar, AITC는 40℃, 80 bar에서 추출하였다.

## 2.6. 천연 기능성 물질 첨가 간장의 제조

간장의 추출조건 중 저장성에 있어 가장 효과적이라고 판단된 조건인 35℃, 170bar, 충전물이 없는 상태(spray column), 연속상을 간장으로 했을 때 추출한 간장에 기능성을 증진시키기 위한 목적으로 게 껍질, 미역, 고추냉이로부터 추출한 기능성 물질인 astaxanthin, fucoxanthin, AITC를 발효주정에 용해된 상태로 각각 0.1%, 0.3%, 0.5% 및 1%를 첨가하였다.

## 2.7. Astaxanthin 동정

간장 내 함유되어 있는 astaxanthin을 동정하기 위해 HPLC 분석을 실시하였다. methanol : hexane (1:2, v/v) 혼합용액 30 mL에 astaxanthin이 함유된 간장 1 mL를 혼합 후 원심분리(3000 rpm, 3 min)하여 중간층을 필터 후 Injection하였다. Aglient C18 column(4.6 mm × 250 mm, U.S.A)이 장착된 Waters 600E(U.S.A) 장치를 이용하여 분석 하였으며, 검출기는 waters 484 tunable absorbance detector(UV/Vis Detector, U.S.A)를 이용하여, 485 nm에서 분석하였다. 분석을 위한 용출 용매는 acetonitrile : methanol ( 70: 30, v/v)로 용출하였으며, 시료의 주입량은 20  $\mu$ L이고, 유속은 1.0 mL/min이었다. Astaxanthin standard(99.9%, Sigma-Aldrich Co.)를 300, 500, 700 및 1000 ppm으로 제조하여 검량곡선을 얻어 함량을 구하였다.

## 2.8. Fucoxanthin 동정

간장 내 함유된 fucoxanthin을 동정하기 위해 HPLC 분석을 실시하였다. methanol : hexane (1:2, v/v) 혼합용액 30 mL에



fucoxanthin이 함유된 간장 1 mL를 혼합 후 원심분리(3000 rpm, 3 min)하여 중간층을 필터 후 Injection하였다. ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6× 250 mm, 5-Micron)이 장착된 Waters 600E(U.S.A) 장치를 이용하여 분석 하였으며, 검출기는 waters 484 Tunable Absorbance Detector (UV/Vis Detector, U.S.A)를 이용하여, 420 nm에서 분석하였다. 분석을 위한 용출 용매는 methanol, acetone과 ammonium acetate solution (1 M)을 이용하였으며, 시료의 주입량은 20  $\mu$ l이고, 유속은 1.0 mL/min이었다(Zapata, *et. al.*, 1987). Fucoxanthin standard (99.9%, DHI Water and Environment, Denmark)를 1, 0.9 및 0.8 ppm으로 제조하여 검량곡선을 얻어 함량을 구하였다.

## 2.9. AITC 동정

간장에 함유된 AITC의 동정하기 위해 자동 열 탈착 시스템(ATD-400, Perkin Elmer, USA)과 GC/MS(HP 6890/QP 2010A, Shimadzu, Japan)를 이용했다. AITC가 농도별로 함유된 간장 100  $\mu$ l를 500 mL 갈색병에 넣어 50°C 건조기에서 30분 동안 휘발성 성분을 발생시킨 후 발생한 휘발성 성분을 흡착튜브(Tenax-TA)에 흡착시킨다. 흡착튜브를 ATD에 장착해 휘발성 성분을 탈착 후 탈착된 휘발성 성분이 GC/MS내로 도입되도록 했으며, GC/MS의 분석 조건은 Table 2와 같다. AITC standard(98.0%, Fluke co, Germany)를 10, 50 및 100 ppm으로 제조하여 검량곡선을 얻어 함량을 구하였다.

## 2.10. 항산화 활성 측정

연속식 향류 초임계 이산화탄소 추출 조건에 따라 추출한 각 간장과 천연 기능성 물질인 astaxanthin, fucoxanthin, AITC를 각 농도별로 첨가한 간장에 대해 항산화성을 평가하였다. 실험의 대조구로써 합성 항산화제인 BHT(butylated hydroxytoluene)을 사용하였다.

Superoxide dismutase(SOD) 유사활성능은 각 시료액 0.2 mL에 tris-HCl의 완충용액(50 mM tris+ 10 mM EDTA, pH 8.5) 3.0mℓ와 7.2 mM pyrogallol 0.2 mL를 가하여 25℃에서 10분간 반응시킨 후 1.0N HCl 0.1mℓ를 가하여 반응을 정지시킨 후 반응액 중 산화된 pyrogallol의 양을 420 nm에서 측정하였다(Marklund *et. al.*, 1974). SOD-유사활성능은 시료 첨가구와 첨가하지 않은 경우의 흡광도 감소율로 나타내었다.

DPPH radical 소거활성은 시료용액 0.2 mL에  $2 \times 10^{-4}$  M DPPH (in Methanol) 0.8 mL을 넣고 vortex후에 30 min 동안 실온에서 방치 후에 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구로써 시료 대신 같은 양의 ethanol을 가하여 흡광도를 측정하였다( Blois, 1958).

자동산화 억제능을 측정하기 위해 linoleic acid를 기질로 하여 POV를 측정하였다. 삼각플라스크에 linoleic acid (Fluka, 50%) 1 g와 ethanol 20 mL, 시료 1 mL을 혼합하여 0.2 M phosphate buffer(pH 7.0) 25 mL를 가하여 잘 혼합한 후에 37℃에서 보관하면서 경시적으로 POV를 측정하였다(Hayase and Kato, 1984).

## 결과 및 고찰

### 1. 연속식 향류 초임계 이산화탄소 처리에 따른 간장의 성분 분석

SCO<sub>2</sub>처리에 따른 간장의 일반성분 변화를 관찰하기 위해 시판간장과 살균과 배합과정을 거치지 않은 원액 간장을 비교하였다. 간장의 일반성분은 조단백, 조지방, 식염, 아미노산성 질소, 갈색도, 완충능을 실험하였으며, 그 결과는 Table 3과 4와 같았다.

SCO<sub>2</sub>를 이용하여 간장을 처리 할 때 시료의 밀도보다 초임계 상태의 이산화탄소의 밀도가 증가하게 되어 계면이 형성되지 않는 flooding point가 형성되게 되는데, 간장을 시료로 사용하여 처리 시 45℃, 170 bar, packed column, 연속상을 간장으로 할 경우 flooding point가 형성되어 간장의 처리 되지 않았다.

간장에서의 질소 성분은 원료로 사용된 대두에서 유래하는 것으로 매주 중에 존재하던 단백질이 간장의 담금 기간 중에 미생물이 생산하는 효소에 의해 분해되어 생성되는데 이는 간장의 정미성에 영향을 미친다(Park *et. al.*, 1997). 시중에 유통되고 있는 간장 제품의 총질소 함량은 0.7~1.2%라고 보고되고 있다(Lee, 1976). 총질소 함량의 경우 처리 전 간장과 시판간장의 경우보다 작게 나왔다. 모든 처리 조건별 간장에서는 총질소 함량의 차이가 없어 처리조건에 따라 큰 차이를 보이지는 않았다. 현재 우리나라의 시판간장의 규격 상 1급 간장의 경우 총질소의 함량이 1.0% 이상으로 규정하고 있으며 본 연구에서 SCO<sub>2</sub>를 이용하여 처리한 간장의 경우 총질소 함량이 1.7%대로 간장 규격 상 1등급에 해당한다고 볼 수 있다(Kim, *et. al.*, 2001).

아미노산성 질소는 총질소와 함께 간장 보존 기간 중 품질 평가의 지표중의 하나이다. 즉 간장의 제조와 숙성 과정 중에 콩 단백질이 효소 작용으로 가수분해 되어 맛을 내는 아미노산을 생성하게 되며, 일반적으로 아미노산성 질소의 함량이 높은 장류가 성분 면에서도 좋은 것으로

Table 3. The comparison of general ingredients(total nitrogen, amino nitrogen, crude lipid) of soy sauce by  $\text{SCO}_2$  treatment

| Condition                                           |                                                                  | Total nitrogen (%) | Amino nitrogen (%) | Crude lipid (%) |
|-----------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|--------------------|--------------------|-----------------|
| Commercial soy sauce                                |                                                                  | 2.59               | 0.72               | 7.76            |
| Untreated soy sauce                                 |                                                                  | 2.42               | 0.89               | 6.73            |
| Treated soy sauce with $\text{SCO}_2$ <sup>1)</sup> | 35℃-170 bar-SC <sup>2)</sup> -S.S <sup>4)</sup> /CO <sub>2</sub> | 1.74               | 0.95               | 1.60            |
|                                                     | 35℃-170 bar-SC-CO <sub>2</sub> /S.S                              | 1.69               | 0.99               | 1.04            |
|                                                     | 35℃-170 bar-PC <sup>3)</sup> -S.S/CO <sub>2</sub>                | 1.76               | 1.00               | 1.43            |
|                                                     | 35℃-170 bar-PC-CO <sub>2</sub> /S.S                              | 1.63               | 0.97               | 1.86            |
|                                                     | 35℃-100 bar-SC-S.S/CO <sub>2</sub>                               | 1.70               | 0.98               | 2.87            |
|                                                     | 35℃-100 bar-SC-CO <sub>2</sub> /S.S                              | 1.45               | 0.82               | 2.04            |
|                                                     | 35℃-100 bar-PC-S.S/CO <sub>2</sub>                               | 1.71               | 0.97               | 1.16            |
|                                                     | 35℃-100 bar-PC-CO <sub>2</sub> /S.S                              | 1.71               | 0.93               | 1.20            |
|                                                     | 45℃-170 bar-SC-S.S/CO <sub>2</sub>                               | 1.76               | 0.98               | 1.30            |
|                                                     | 45℃-170 bar-SC-CO <sub>2</sub> /S.S                              | 1.64               | 1.20               | 1.32            |
|                                                     | 45℃-170 bar-PC-S.S/CO <sub>2</sub>                               | 1.72               | 1.00               | 1.95            |
|                                                     | 45℃-170 bar-PC-CO <sub>2</sub> /S.S                              | Flooding point     |                    |                 |
|                                                     | 45℃-100 bar-SC-S.S/CO <sub>2</sub>                               | 1.72               | 1.01               | 2.70            |
|                                                     | 45℃-100 bar-SC-CO <sub>2</sub> /S.S                              | 1.67               | 0.98               | 1.20            |
|                                                     | 45℃-100 bar-PC-S.S/CO <sub>2</sub>                               | 1.73               | 0.96               | 1.97            |
|                                                     | 45℃-100 bar-PC-CO <sub>2</sub> /S.S                              | 1.75               | 1.01               | 2.60            |

<sup>1)</sup>Extraction condition of soy sauce using  $\text{SCO}_2$  : temperature(℃) -pressure(bar) -sort of column- dispersed phase/continuous phase

<sup>2)</sup> Spray column    <sup>3)</sup> Packed column    <sup>4)</sup> Soy sauce

Table 4. The comparison of general ingredients (saltiness, browning, buffer action) of soy sauce by  $\text{SCO}_2$  treatment

| Condition                                           |                                                                   | Saltiness (%)  | Browning (O.D. at 500 nm) | Buffer action |
|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|----------------|---------------------------|---------------|
| Commercial soy sauce                                |                                                                   | 12.87          | 8.85                      | 0.69          |
| Untreated soy sauce                                 |                                                                   | 14.21          | 5.27                      | 0.74          |
| Treated soy sauce with $\text{SCO}_2$ <sup>1)</sup> | 35°C-170 bar-SC <sup>2)</sup> -S.S <sup>4)</sup> /CO <sub>2</sub> | 12.97          | 5.77                      | 0.75          |
|                                                     | 35°C-170bar-SC-CO <sub>2</sub> /S.S                               | 13.01          | 6.03                      | 0.70          |
|                                                     | 35°C-170bar-PC <sup>3)</sup> -S.S/CO <sub>2</sub>                 | 12.04          | 5.15                      | 0.67          |
|                                                     | 35°C-170bar-PC-CO <sub>2</sub> /S.S                               | 12.32          | 4.59                      | 0.77          |
|                                                     | 35°C-100bar-SC-S.S/CO <sub>2</sub>                                | 12.71          | 5.23                      | 0.70          |
|                                                     | 35°C-100bar-SC-CO <sub>2</sub> /S.S                               | 12.51          | 5.10                      | 0.84          |
|                                                     | 35°C-100bar-PC-S.S/CO <sub>2</sub>                                | 12.43          | 5.26                      | 0.70          |
|                                                     | 35°C-100bar-PC-CO <sub>2</sub> /S.S                               | 12.53          | 5.14                      | 0.70          |
|                                                     | 45°C-170bar-SC-S.S/CO <sub>2</sub>                                | 13.01          | 5.92                      | 0.80          |
|                                                     | 45°C-170bar-SC-CO <sub>2</sub> /S.S                               | 12.90          | 5.89                      | 0.72          |
|                                                     | 45°C-170bar-PC-S.S/CO <sub>2</sub>                                | 12.85          | 6.22                      | 0.63          |
|                                                     | 45°C-170bar-PC-CO <sub>2</sub> /S.S                               | Flooding point |                           |               |
|                                                     | 45°C-100bar-SC-S.S/CO <sub>2</sub>                                | 13.14          | 5.86                      | 0.70          |
|                                                     | 45°C-100bar-SC-CO <sub>2</sub> /S.S                               | 12.85          | 5.73                      | 0.69          |
|                                                     | 45°C-100bar-PC-S.S/CO <sub>2</sub>                                | 12.98          | 5.62                      | 0.64          |
|                                                     | 45°C-100bar-PC-CO <sub>2</sub> /S.S                               | 12.43          | 5.34                      | 0.65          |

<sup>1)</sup>Extraction condition of soy sauce using  $\text{SCO}_2$  : temperature(°C) -pressure(bar) -sort of column- dispersed phase/continuous phase

<sup>2)</sup> Spray column    <sup>3)</sup> Packed column    <sup>4)</sup> Soy sauce



평가되고 있다(Kim, 2004). 양조간장의 아미노산성 질소는 0.70%, 전통간장의 경우는 0.5-0.7% 정도라고 보고되고 있다(Lee, 1976; Song, 2001). 본 실험에서 시판간장의 아미노산성 질소의 함량은 0.72%이고, 원액 간장의 경우 0.89%로써 시판간장 보다 함량이 더 높았다. 또한 CC-SCO<sub>2</sub>를 이용하여 처리한 간장의 경우는 0.82-1.20% 범위로 처리 전의 간장 원액보다 높았다.

간장의 지질은 시판간장의 경우 7.7%, 처리 전 간장의 경우에는 6.7%였으나, 초임계 이산화탄소 처리를 통해 지질이 제거됨에 따라 지질의 농도가 약 1% 대로 감소하여 약 80%의 지질 제거율을 보였다. 35℃, 170bar, spray column의 조건에서 처리한 간장에서 가장 낮은 지질이 함유되어 있어 약 84.5%의 제거율을 나타내었으며, 반대로 가장 낮은 지질 제거율을 보인 조건은 45℃, 100bar, spray column의 조건으로 약 59.8%의 제거율을 나타내었다. 초임계상태의 이산화탄소는 비극성인 물질을 선택적으로 처리하여 지질이 제거되고 이때 일정한 온도 일 때 압력이 증가할 수 록 지질의 처리 효율은 증가한다고 일반적으로 보고되고 있다(Peter, 1999).

간장에 있어서 식염의 농도는 Aw를 변화시켜 발효에 유용한 균을 선택적으로 자라게 하며(Mary, *et. al.*, 1988), 식염의 농도가 29% 이상 일 때 미생물의 생육이 억제된다는 보고가 있다(Joo *et. al.*, 1997). 전통 간장의 염도는 28.9~30.96%이고, 시판간장의 염도는 18.17%인데 이는 전통간장 맛의 특성이라고 할 수 있다. 하지만 식염을 과도하게 섭취할 시에는 고혈압, 심장병 등을 유발 할 수 있어 최근에는 식단에서 식염의 섭취량을 줄이려는 노력이 증가하고 있다. 일반적으로 식염의 농도가 높은 간장의 식염 농도를 낮춘 저염간장이 생산되고 있으며, 이때의 식염농도는 12%이다. 본 연구에서 사용된 시판간장과 원액 간장의 식염 농도는 12.87%와 14.21%로 시판간장이 식염 농도가 더 낮았다. 이는 간장 원액에 맛을 내기 위해 다른 첨가물들을 함유시킴에 따라 염 농도가 상대적으로 감소하였을 것으로 생각되어 진다. SCO<sub>2</sub>를 이용하여 간장을 처리 시에는 11.26~13.85%로써 간장 원액에 비해 식염 농도가



감소했다. 동일한 압력일 때 낮은 온도(35℃)에서 처리 시에 식염의 농도가 더 낮았고, 압력이나 column의 종류 및 이동상의 변화에 대해서는 차이를 보이지 않았다.

간장의 색은 소비자들의 관능성에 미치는 요인으로 고유의 갈색은 바람직한 것이다. 하지만 저장 동안에 점차 암갈색으로 변하게 되고 시간이 지날수록 색은 짙어져 제품의 품질을 나쁘게 하는 요인으로 지적되고 있다(海老根 英雄, 1980). 간장의 색은 maillard reaction의 산물인 melanoidin 물질에 의한 것으로(Kim 1995), 간장의 갈변은 색과 향을 좋게 하여 간장을 품질을 향상 시키나 지나친 갈변은 영양성분을 감소시키고 맛이나 향을 나쁘게 한다(Jeong, 1981). 간장을 10배 희석 후 500 nm에서 흡광도를 측정한 결과 원액 간장의 경우 5.27, 시판간장의 경우 8.85로 시판 간장이 원액 간장보다 높았다. 이는 원액 간장에 여러 종류의 첨가제를 첨가하고 살균하는 과정을 거치면서 간장의 색이 짙어 진 것으로 보인다. 또한 CC-SCO<sub>2</sub> 처리 후 간장의 갈색도는 5.10~6.22 범위로 처리 전 원액 간장에 비해 증가 하였는데, 이는 처리 시 온도를 가해줌에 따라 간장의 농축 된 결과로 보이며, 35℃보다 45℃에서 갈색도가 더 높았다. 압력에 따라서는 큰 영향이 없는 것으로 보인다.

완충능은 1/10N NaOH 6 mL을 첨가했을 때 pH 변화로 시판간장의 경우 0.69, 처리 전 간장의 경우 0.74로써 시판간장이 낮은 값을 나타내었다. 또한 초임계 유체 처리 후에 완충능은 0.6~0.8의 범위로써 처리 전 생 간장에 비해 낮은 값을 나타내는 것으로 보였다. 하지만 처리 조건에 따라서는 차이를 보이지 않았다. 즉, 간장의 완충능에 있어서 초임계 이산화탄소 처리는 영향을 미치지 않는 것으로 보인다. 간장내의 glutamic acid와 aspartic acid 등의 아미노산과 젖산의 양이 많아지면 완충능이 낮아지게 되며, 순고형분 함량과 완충능에 기여하는 성분이 많을수록 완충능은 높아진다고 보고되고 있다(Lee 2002). 간장의 품질이 우수 할수록 완충작용이 높게 나타나며 시판간장의 경우 1.6 이하의 완충능을 가진 간장을 1등급 간장으로 판단하고 있으며, 초임계 상태의 이산화탄소로 처리한 간장의 경우 이보다 낮은 값을 가지고 있어 1등급간

장에 포함된다(Kim, *et. al.*, 2001).

시판간장, 초임계 이산화탄소 처리 전 생간장, 초임계 이산화탄소 처리 간장 2종 (조건: 45℃, 170 bar, spray and packed column)의 유리 아미노산을 분석한 결과는 Table 5와 같았다. 시판간장의 경우 시료에 함유되어 있는 유리 아미노산의 총 함량이 6.86%이고 간장 원액의 경우 7.95%로써 시판간장보다 간장 원액에 유리 아미노산의 함량이 높았다. 간장 원액과 처리 후 간장을 비교해 보면 원액(7.95%)에 비해 처리 후 간장(7.41%, 7.64%)에 유리 아미노산 총 함량이 감소했으며, packed column의 경우(7.639%)가 spray column(7.407%)에 비해 높은 값을 나타내었다. 이는 총질소 함량의 변화 양상과 비슷한 결과이다. 가다랑어 내장의 유리 아미노산을 SCO<sub>2</sub> 처리에 따른 변화를 연구한 보고에 의하면 SCO<sub>2</sub> 처리 시 일부 아미노산의 유실에 의해 무처리구에 비해 처리구에서 유리 아미노산의 함량이 더 낮다고 하였다(Chun, *et. al.*, 2001). 본 연구의 결과도 SCO<sub>2</sub> 처리에 의해 유리 아미노산의 함량이 감소한 것도 이 때문으로 보인다.

유리 아미노산과 핵산 관련 물질은 단백질 분해 산물로써 간장의 맛을 결정짓는 맛인 맛난 맛을 낸다(Park, *et. al.*, 1997). 일반적으로 glycine, hydroxyproline, lysine, proline, threonine은 단맛, methionine, valine, isoleucine, phenylalanine, leucine은 쓴맛, glutamic acid, aspartic acid는 맛난 맛을 내는 것으로 알려져 있다(Im, 1990; Nishimura, *et. al.*, 1988).

시판간장의 아미노산을 분석한 보고에 따르면 glutamic acid의 함량이 가장 많이 함유되어 있다고 하였으며(Ko, *et. al.*, 1986) 이는 본 연구의 결과와 일치하였다. 유리 아미노산 중 맛난 맛의 성분인 glutamic acid와 aspartic acid의 함량을 비교해보면, glutamic acid의 경우 간장 원액에 비해 SCO<sub>2</sub>로 처리 시 적은 양을 나타낸 반면,

Table 5. Free amino acid composition of commercial and untreated soy sauce and treated soy sauce using SCO<sub>2</sub>

| Amino acid \ Sample           | Commercial soy sauce | Untreated soy sauce | Treated soy sauce <sup>2)</sup> |               |
|-------------------------------|----------------------|---------------------|---------------------------------|---------------|
|                               |                      |                     | Spay column                     | Packed column |
| Phosphoserine                 | 0.006(0.09)          | 0.007(0.09)         | 0.007(0.09)                     | 0.012(0.16)   |
| Taurine                       | 0.002(0.03)          | 0.002(0.03)         | 0.008(0.11)                     | 0.003(0.04)   |
| Phosphoethanolamine           | ND <sup>1)</sup>     | ND                  | ND                              | ND            |
| Urea                          | ND                   | ND                  | ND                              | ND            |
| L-Aspartic acid               | 0.217(3.16)          | 0.294(3.70)         | 0.412(5.56)                     | 0.360(4.71)   |
| L-Threonine                   | 0.251(3.36)          | 0.281(3.54)         | 0.298(4.02)                     | 0.290(3.80)   |
| L-Serine                      | 0.339(4.94)          | 0.412(5.18)         | 0.430(5.81)                     | 0.425(5.56)   |
| Asparagine                    | ND                   | ND                  | ND                              | ND            |
| L-Glutamic acid               | 1.411(20.56)         | 1.667(20.98)        | 1.350(18.23)                    | 1.543(20.20)  |
| L- $\alpha$ -Aminoadipic acid | ND                   | ND                  | ND                              | ND            |
| L-Proline                     | 0.351(5.12)          | 0.364(4.58)         | 0.365(4.93)                     | 0.358(4.69)   |
| L-Glycine                     | 0.211(3.07)          | 0.211(2.66)         | 0.234(3.16)                     | 0.220(2.88)   |
| L-Alanine                     | 0.564(8.22)          | 0.547(6.88)         | 0.454(6.13)                     | 0.481(6.30)   |
| L-Cytrulline                  | ND                   | ND                  | ND                              | ND            |
| L- $\alpha$ Aminobutyric acid | ND                   | ND                  | ND                              | ND            |
| L-Valine                      | 0.357(5.20)          | 0.436(5.49)         | 0.433(5.85)                     | 0.418(5.47)   |
| L-Cystine                     | ND                   | ND                  | ND                              | ND            |
| L-Methionine                  | 0.105(1.53)          | 0.094(1.18)         | 0.097(1.31)                     | 0.101(1.32)   |
| L-Isoleucine                  | 0.360(5.25)          | 0.428(5.39)         | 0.415(5.60)                     | 0.423(5.54)   |
| L-Leucine                     | 0.570(8.31)          | 0.693(8.72)         | 0.647(8.73)                     | 0.675(8.84)   |

(Continued)

|                                   |              |              |              |              |
|-----------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| L-Tyrosine                        | 0.069(1.01)  | 0.069(0.87)  | 0.073(0.99)  | 0.051(0.67)  |
| L-Phenylalanine                   | 0.347(5.06)  | 0.444(5.59)  | 0.409(5.52)  | 0.408(5.34)  |
| $\beta$ -alanine                  | 0.034(0.50)  | 0.043(0.54)  | 0.041(0.55)  | 0.033(0.43)  |
| DL- $\beta$ -Aminoisobutyric acid | 0.030(0.44)  | 0.022(0.28)  | 0.012(0.16)  | 0.006(0.08)  |
| $\gamma$ -Aminobutyric acid       | 0.013(0.19)  | 0.011(0.14)  | 0.014(0.19)  | 0.010(0.13)  |
| L-Ornithine                       | 0.837(12.20) | 0.914(11.50) | 0.834(11.26) | 0.895(11.72) |
| L-Lysine                          | 0.232(3.38)  | 0.270(3.40)  | 0.134(1.81)  | 0.208(2.72)  |
| 1-Methyl-L-histidine              | 0.475(6.92)  | 0.588(7.40)  | 0.575(7.76)  | 0.575(7.53)  |
| L-Histidine                       | 0.082(1.19)  | 0.150(1.89)  | 0.165(2.23)  | 0.143(1.87)  |
| 3-Methyl-L-histidine              | ND           | ND           | ND           | ND           |
| L-Carnosine                       | ND           | ND           | ND           | ND           |
| L-Arginine                        | ND           | ND           | ND           | ND           |
| Total                             | 6.862(100)   | 7.947(100)   | 7.407(100)   | 7.639(100)   |

Values means amounts of each amino acid in soy sauce and values of parenthesis means percentage of amounts of each amino acid in amounts of total amino acid

<sup>1)</sup> ND means quantity not detected.

<sup>2)</sup> Classification according to sort of column

aspartic acid의 경우 오히려 증가하였다. 쓴맛을 내는 성분인 leucine, isoleucine, phenylalanine의 함량은  $\text{SCO}_2$  처리에 따라 차이를 나타내지 않았고, 단맛을 내는 glycine, alanine 역시 차이가 나지 않았으나, lysine의 경우는  $\text{SCO}_2$  처리 시에 감소하였다.  $\text{SCO}_2$ 로 간장을 처리할 경우 유리 아미노산의 성분에 변화가 있으나 차이가 적어 간장의 맛에는 큰 영향을 미치지 않을 것으로 생각된다.

## 2. 간장내의 휘발성 향기 성분 분석

간장의 휘발성 향기 성분을 GC/MS를 이용해 분석하였으며, Table 6은 시판간장 및 처리 전 간장의 휘발성 향기 성분을 나타낸 표이다.  $\text{SCO}_2$ 로 처리하기 전인 간장 원액에서 확인된 휘발성 향기 성분은 총 34종이며, 시판 간장에서는 31종이었다. 간장 원액의 휘발성 향기 성분의 경우 alcohol류 11종, aldehyde류 6종, acid류 6종, ketone류 4종, hydrazine류 3종, furan등 기타 화합물 5종이 분석되었고, 시판 간장의 경우 alcohol류 10종, aldehyde류 5종, acid류 7종, ketone류 2종, hydrazine류 3종, furan등 기타 화합물 4종으로 분석되었다. 분석된 화합물 중 alcohol류가 가장 많았으며, area%로써는 acetic acid가 가장 높은 비율을 차지하고 있는 것으로 나타났다.

간장을  $\text{SCO}_2$ 로 처리하였을 때 각 처리 조건에서 동정된 휘발성 향기성분의 면적의 합을 비교한 Fig. 3을 보면 처리 전 간장에 비해  $\text{SCO}_2$ 를 이용하여 간장을 처리 시 간장 내의 휘발성 향기성분이 감소되었다. 이는 사탕수수 음료에서  $\text{SCO}_2$ 를 이용하여 향기 성분을 추출한 보고(Gracia, *et. al.*, 2007)에서 추출물에는 향이 남아 있지 않고 추출물에 진한 향이 분리된다고 했으며, 이는 향기 성분은 적당한 조건에서 이산화탄소에 쉽게 녹을 수 있기 때문이라고 보고한 연구로 설명될 수 있다(Senoras, *et. al.*, 2001).

초임계 이산화탄소 처리에 의한 간장 내의 휘발성 향기 성분의 제거율을 살펴보면, 45℃, 100 bar, spray column, 연속상을 이산화탄소로



Table 6. Volatile compounds of untreated soy sauce and commercial soy sauce

| Compound name               | R.T   | Area%               |                      |
|-----------------------------|-------|---------------------|----------------------|
|                             |       | Untreated soy sauce | Commercial soy sauce |
| Acetaldehyde                | 3.33  | 4.555               | 15.674               |
| Methyl-hydrazine            | 4.45  | 12.525              | 0.839                |
| Isopropyl alcohol           | 4.94  | 0.209               | 2.611                |
| Acetic acid, methyl ester   | 5.24  | 0.545               | 0.277                |
| Isobutyraldehyde            | 5.85  | 1.442               | 3.558                |
| Propylalcohol               | 6.28  | 1.585               | ND                   |
| 1-Propanol                  | 6.65  | ND                  | 0.044                |
| 2,3-Butanedione             | 6.72  | 0.343               | ND                   |
| Hydrazine                   | 6.94  | 0.015               | 0.011                |
| 2-Ethyl-butyraldehyde       | 7.15  | 0.931               | ND                   |
| 2-Butanone                  | 7.28  | ND                  | 2.132                |
| Ethylhydrazine              | 8.04  | 3.465               | 5.463                |
| Ethanol                     | 8.04  | 2.328               | 5.463                |
| Acetic acid, ethyl ester    | 8.19  | 51.964              | 53.439               |
| 2-Methyl-1-propanol         | 9.29  | 7.339               | 2.026                |
| Pentanal                    | 10.23 | 1.600               | 2.537                |
| 2-Methyl-butanal            | 11.07 | 1.322               | 1.982                |
| 1-Butanol                   | 11.47 | 2.236               | 1.315                |
| 2,3-Pentanedione            | 12.60 | 0.073               | 0.200                |
| Isopropyl alcohol           | 13.16 | 0.139               | ND                   |
| 2-Pentanol                  | 13.44 | 0.031               | ND                   |
| 2-Methyl-3-pentanone        | 13.95 | 0.098               | ND                   |
| Propanoic acid, ethyl ester | 14.01 | ND                  | 0.117                |

(Continued)

|                                       |       |       |       |
|---------------------------------------|-------|-------|-------|
| Dihydro-2-methyl-3(2H)-furanone       | 14.88 | 0.273 | 0.101 |
| 3-Methyl-1-butanol                    | 15.19 | 2.940 | 0.858 |
| 2-Methyl-1-butanol                    | 15.37 | 1.404 | 0.089 |
| Isobutyric acid, ethyl ester          | 16.32 | 0.097 | 0.060 |
| Methylbenzene                         | 16.61 | 0.270 | 0.198 |
| 2-hydroxy-propanoic acid,ethyl ester  | 18.39 | 0.697 | ND    |
| 3,4-Dimethyl-2-hexanol                | 18.46 | 0.978 | 0.005 |
| Hexamethyl-cyclotrisiloxane           | 19.31 | 0.259 | 0.327 |
| 2-Methyl-butanoicacid, ethyl ester    | 19.86 | 0.024 | 0.021 |
| Pentanoic acid, ethyl ester           | 19.94 | 0.010 | 0.041 |
| 5-Methyl-5-nonanol                    | 20.82 | 0.120 | 0.476 |
| 2-Ethyl-butanal                       | 21.61 | 0.036 | 0.030 |
| Nonane                                | 22.00 | 0.135 | ND    |
| 4-Nonanol                             | 22.02 | ND    | 0.064 |
| Butanedioic acid, dibutyl ester       | 24.64 | ND    | 0.002 |
| 2-Phenyl-1-(trimethylsilyl)-1H-indole | 25.87 | 0.012 | 0.041 |

<sup>D)</sup>ND : Not Detect

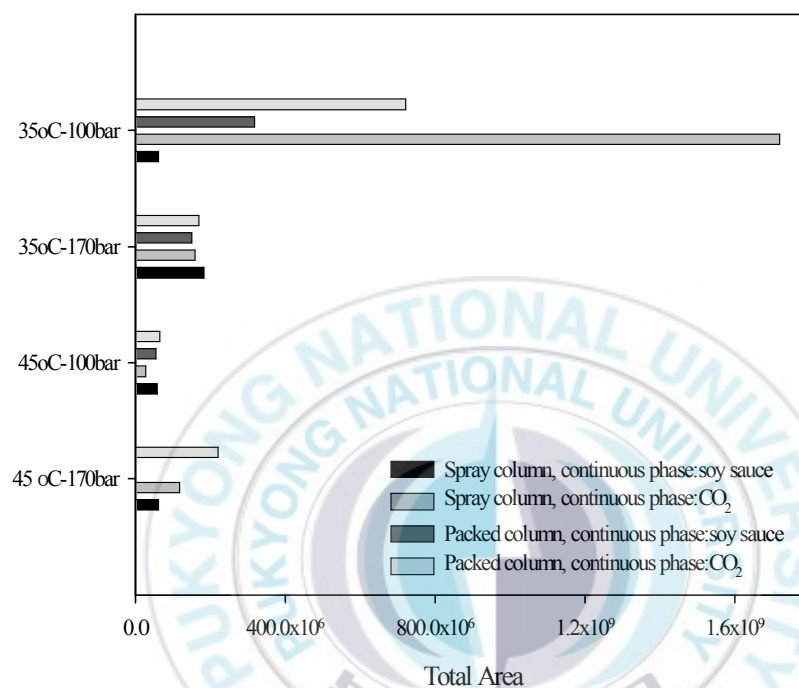


Fig. 3. The comparison of total area according to each treatment condition of soy sauce using SCO<sub>2</sub>

했을 때 가장 작은 총면적을 보이는 것을 알 수 있었고 반면 가장 많은 면적을 나타낸 처리 조건은 35℃, 100 bar, spray column, 연속상을 이산화탄소로 한 조건이었다. 즉, 본 연구에서는 높은 온도(45℃)와 낮은 압력(100 bar)에서 휘발성 향기성분의 제거율이 높은 것으로 나타났다.

CC-SCO<sub>2</sub> 공정을 사용하여 간장의 향기성분의 제거율을 측정한 보고에서는 20℃보다 40℃와 60℃에서 제거율이 높고, 높은 압력에서 제거율이 높다고 하였는데(Kitakura, *et. al.*(1994), 이는 본 연구결과와 온도조건에서의 제거율과는 일치 하였으나, 압력조건에서는 일치하지 않았다.

간장에 이취와 관련되는 성분으로는 3-methyl-butanol, indole, butyric acid등이 있는데, 3-methyl-butanol은 대두 풋냄새에 관계되는 물질(Sugawara, *et. al.*, 1985)인 동시에 간장에 서식하는 효모에 의해 생성되며 간장 내에 불쾌취를 나타내며(Ahn, *et. al.*, 1988; Ji, *et. al.*, 1992), Indole은 극미량일 때 상쾌한 향기를 내지만, 함량이 많아지면 고린내를 내어 간장에 불쾌한 풍미를 낸다고 보고되어 있다(Seo, *et. al.*, 1996). Butyric acid 또한 간장의 이취성분으로 보고되어 있다(Kim, *et. al.*, 1990; Ji, *et. al.*, 1992).

Table 7~10은 각 처리 조건에 따른 간장의 휘발성 향기 성분을 area%로 나타낸 표이다. 각 조건에서 처리한 간장의 휘발성 성분 중 간장의 이취에 영향을 미치는 3-methyl-butanol과 indole이 감소되었거나 완전히 제거된 것을 알 수 있다. 위에서 언급한 간장 내 이취성분(3-methyl-butanol, Indole, Butyric acid)은 SCO<sub>2</sub> 처리에 의해 그 양이 감소하였는데 특히 간장에 불쾌한 향기를 내는 indole의 경우는 45℃, 170 bar, spray column, 연속상 이산화탄소인 조건과 35℃, 100 bar, spray column, 연속상 이산화탄소인 조건에서 미량 검출되었을 뿐 다른 조건에서는 완전히 제거되었으며, butyric acid는 모든 실험구에서 완전히 제거되었다. 3-methyl-butanol은 모든 실험구에서 동정되었으나 그 함량이 감소되어 간장의 이취성분을 감소되었다.

Table 7. Volatile compounds of soy sauce using CC-SCO<sub>2</sub> at 45°C,  
170bar

| Compounds name            | R.T   | Area %                           |                          |                          |
|---------------------------|-------|----------------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                           |       | Spray column                     |                          | Packed column            |
|                           |       | C.P <sup>2)</sup> :<br>Soy sauce | C.P :<br>CO <sub>2</sub> | C.P :<br>CO <sub>2</sub> |
| Acetaldehyde              | 3.35  | 7.32                             | 1.75                     | 7.02                     |
| Methyl-hydrazine          | 3.92  | ND <sup>1)</sup>                 | 80.22                    | 85.19                    |
| Dimethyl ketone           | 4.37  | ND                               | 0.35                     | 1.49                     |
| Isopropyl alcohol         | 4.75  | 9.89                             | ND                       | 0.07                     |
| Propanoic acid            | 4.95  | 6.09                             | ND                       | ND                       |
| 2-Ethoxy-ethanol          | 5.50  | 0.11                             | ND                       | ND                       |
| 2-Methyl-propanal         | 5.82  | 4.21                             | 0.18                     | 0.99                     |
| 1-Propanol                | 6.04  | 4.60                             | 0.05                     | 0.24                     |
| Acetic acid ethenyl ester | 6.68  | 1.01                             | 0.06                     | 0.45                     |
| 2-Butanone                | 7.08  | 2.33                             | 0.08                     | 0.39                     |
| Ethanol                   | 8.03  | 3.28                             | 0.29                     | 0.71                     |
| Acetic acid, ethyl ester  | 8.17  | 35.89                            | 0.34                     | 1.05                     |
| 2-Methyl-1-propanol       | 9.08  | 9.16                             | 0.05                     | 0.26                     |
| 3-Methyl-butanal          | 10.22 | 3.39                             | 0.16                     | 0.91                     |
| 2-Methyl-butanal          | 10.89 | 3.87                             | 0.11                     | 0.54                     |
| 1-Butanol                 | 11.53 | 3.56                             | ND                       | ND                       |
| Paraldehyde               | 13.21 | 0.25                             | ND                       | ND                       |
| n-Heptane                 | 13.97 | 0.14                             | ND                       | ND                       |
| 3-Methyl-1-butanol        | 15.18 | 1.92                             | 0.12                     | 0.05                     |
| 2-Methyl-1-butanol        | 15.40 | 1.07                             | ND                       | ND                       |

(Continued)



|                                       |       |      |      |      |
|---------------------------------------|-------|------|------|------|
| Methylbenzene                         | 16.63 | 1.06 | 0.26 | 0.22 |
| Octane                                | 18.51 | 0.06 | ND   | ND   |
| Hexamethyl-cyclotrisiloxane           | 19.34 | 0.66 | 0.28 | 0.13 |
| 3-Chloro-2-methyl-2-pentanol          | 20.23 | ND   | 0.07 | ND   |
| Nonane                                | 22.03 | 0.12 | ND   | ND   |
| 2-Phenyl-1-(trimethylsilyl)-1H-indole | 25.92 | ND   | 0.06 | ND   |
| 2-Propyl-1-pentanol                   | 26.89 | ND   | 0.10 | ND   |
| Thieno[2,3-c]pyridine                 | 34.15 | ND   | 6.57 | ND   |
| 2-(2-butoxyethoxy)-ethanol            | 34.71 | ND   | 0.27 | ND   |
| n-Decaldehyde                         | 35.38 | ND   | 0.16 | ND   |
| Benzothiazole                         | 36.03 | ND   | 5.27 | ND   |
| 3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-phenol     | 45.65 | ND   | 0.10 | ND   |
| 2-Ethyl-2-hexen-1-ol                  | 46.11 | ND   | 0.22 | ND   |
| n-Tetradecane                         | 48.18 | ND   | 1.57 | ND   |
| Diphenylamine                         | 48.45 | ND   | 1.33 | ND   |

<sup>1)</sup>ND : Not Detect

<sup>2)</sup>C.P : Continuous Phase

Table 8. Volatile compounds of soy sauce using CC-SCO<sub>2</sub> at 35°C,  
170bar

| Compound Name                                 | R.T   | Area%              |                          |                    |                          |
|-----------------------------------------------|-------|--------------------|--------------------------|--------------------|--------------------------|
|                                               |       | spay column        |                          | Packed column      |                          |
|                                               |       | C.P :<br>soy sauce | C.P :<br>CO <sub>2</sub> | C.P :<br>soy sauce | C.P :<br>CO <sub>2</sub> |
| Acetaldehyde                                  | 3.35  | 22.25              | 6.12                     | 3.79               | 4.14                     |
| Pentanal                                      | 3.75  | 0.09               | ND                       | ND                 | ND                       |
| Methyl-hydrazine                              | 4.79  | 66.70              | 86.21                    | 92.04              | 87.77                    |
| Dimethyl ketone                               | 4.40  | ND                 | 0.87                     | 0.56               | 0.77                     |
| Isopropyl alcohol                             | 5.08  | 0.33               | 0.09                     | 0.62               | 0.35                     |
| 4-Heptyn-2-ol                                 | 5.25  | 0.04               | ND                       | ND                 | ND                       |
| 2-Methyl-propanal                             | 5.88  | 0.50               | 0.22                     | 0.21               | 0.40                     |
| 2-Methyl-2-propenal                           | 6.21  | 0.12               | ND                       | ND                 | ND                       |
| 1-Propanol                                    | 6.42  | 0.86               | 0.14                     | 0.14               | 0.30                     |
| <i>Bis</i> [1-(methylthio)ethyl]<br>disulfide | 6.60  | ND                 | ND                       | ND                 | 0.05                     |
| Acetic acid ethenyl ester                     | 6.67  | ND                 | ND                       | 0.12               | 0.12                     |
| 2,3-Butanedione                               | 6.76  | 0.16               | ND                       | 0.13               | ND                       |
| Butyraldehyde                                 | 6.92  | 0.90               | ND                       | ND                 | ND                       |
| 2-Butanone                                    | 7.19  | 0.47               | 0.11                     | ND                 | 0.13                     |
| Ethyl alcohol                                 | 8.04  | 0.16               | 0.45                     | 0.64               | 1.06                     |
| Chloroform                                    | 8.18  | ND                 | ND                       | 0.42               | ND                       |
| Acetic acid, ethyl ester                      | 8.26  | 2.69               | 0.62                     | ND                 | 2.67                     |
| 3-Methyl-1-propanol                           | 9.43  | 0.77               | ND                       | 0.21               | ND                       |
| 2-Methyl-1-propanol                           | 9.43  | 0.77               | 0.21                     | ND                 | 0.41                     |
| 2-Butenal                                     | 9.77  | 0.58               | ND                       | ND                 | ND                       |
| 3-Methyl-butanal                              | 10.28 | 0.78               | 0.18                     | 0.26               | 0.47                     |
| 2-Methyl-butanal                              | 10.94 | 0.40               | 0.11                     | 0.13               | 0.27                     |
| 1-Butanol                                     | 11.62 | 0.39               | 4.10                     | 0.18               | 0.19                     |

(Continued)

|                             |       |      |      |      |      |
|-----------------------------|-------|------|------|------|------|
| 2,2-Dimethyl-butane         | 13.97 | ND   | ND   | 0.03 | ND   |
| 2-Ethyl-furan               | 14.08 | 0.10 | ND   | ND   | ND   |
| Phenol                      | 14.68 | 0.06 | ND   | ND   | ND   |
| 3-Methyl-1-butanol          | 15.28 | 0.21 | 0.08 | 0.04 | 0.06 |
| 2-Methyl-1-butanol          | 15.45 | 0.09 | ND   | 0.03 | 0.03 |
| Methylbenzene               | 16.62 | 0.44 | 0.14 | 0.19 | 0.51 |
| 2,4-Dimethylhexane          | 18.47 | ND   | ND   | 0.06 | ND   |
| n-Octane                    | 18.47 | ND   | ND   | ND   | 0.15 |
| Hexamethyl-cyclotrisiloxane | 19.33 | ND   | 0.25 | 0.19 | 0.11 |
| Styrene                     | 21.31 | 0.03 | ND   | ND   | ND   |
| 1,2-Dimethyl-benzene        | 21.47 | 0.12 | ND   | ND   | ND   |

---

<sup>1)</sup>ND : Not Detect                      <sup>2)</sup>C.P : Continuos Phase



Table 9. Volatile compounds of soy sauce using CC-SCO<sub>2</sub> at 45°C, 100bar

| Compound name                | R.T   | Area%              |                          |                    |                          |
|------------------------------|-------|--------------------|--------------------------|--------------------|--------------------------|
|                              |       | Spay column        |                          | Packed column      |                          |
|                              |       | C.P :<br>soy sauce | C.P :<br>CO <sub>2</sub> | C.P :<br>soy sauce | C.P :<br>CO <sub>2</sub> |
| Acetaldehyde                 | 3.32  | 15.43              | 43.59                    | 72.72              | 35.42                    |
| Methyl-hydrazine             | 4.54  | 38.15              | 9.33                     | 3.63               | 52.78                    |
| Acetone                      | 4.41  | ND <sup>1)</sup>   | ND                       | ND                 | 3.10                     |
| Furan                        | 4.64  | ND                 | ND                       | ND                 | 1.85                     |
| Ethyl ether                  | 4.85  | ND                 | ND                       | ND                 | 0.17                     |
| Isopropyl alcohol            | 4.88  | 22.25              | 1.09                     | 0.97               | ND                       |
| 2-Methyl-propanal            | 5.85  | 2.51               | 4.54                     | 2.62               | 0.70                     |
| 2-Methyl-2-propenal          | 6.18  | ND                 | ND                       | 0.29               | ND                       |
| 1-Propanol                   | 6.28  | 1.19               | 1.74                     | 0.04               | 0.29                     |
| Acetic acid ethenyl ester    | 6.66  | ND                 | 1.17                     | ND                 | 0.34                     |
| 2,3-Butanedione              | 6.72  | ND                 | ND                       | 1.09               | ND                       |
| Butyraldehyde                | 6.89  | ND                 | ND                       | 0.49               | ND                       |
| 2-Butanone                   | 7.13  | 1.31               | 1.86                     | 1.68               | 0.32                     |
| Ethanol                      | 7.99  | 4.03               | 6.10                     | 2.09               | 0.93                     |
| Acetic acid, ethyl ester     | 8.21  | 6.36               | 14.68                    | 4.44               | 1.13                     |
| 2-Methyl-1-propanol,         | 9.33  | 1.83               | 2.07                     | 0.00               | 0.30                     |
| 2-Butenal                    | 9.63  | ND                 | ND                       | 1.82               | 0.22                     |
| 3-Methyl-butanal             | 10.24 | 2.03               | 5.01                     | 3.75               | 0.87                     |
| 2-Methyl-butanal             | 10.90 | 1.39               | 3.00                     | 2.03               | 0.50                     |
| 1-Butanol                    | 11.54 | 0.62               | 1.39                     | 0.51               | 0.13                     |
| 2-Ethylfuran                 | 14.07 | ND                 | ND                       | 0.39               | ND                       |
| Phenol                       | 14.66 | ND                 | ND                       | 0.49               | ND                       |
| Paraldehyde                  | 13.21 | 0.39               | ND                       | ND                 | ND                       |
| 3-Methyl-1-butanol           | 15.24 | 0.14               | 0.91                     | 0.19               | 0.09                     |
| 2-Methyl-1-butanol           | 15.41 | ND                 | ND                       | 0.08               | 0.09                     |
| Methylbenzene                | 16.61 | 0.68               | 2.11                     | 0.67               | 0.43                     |
| Hexamethyl- cyclotrisiloxane | 19.32 | 1.32               | 1.05                     | ND                 | 0.34                     |

<sup>1)</sup>ND : Not detect

<sup>2)</sup>C.P : Continuos phase

Table 10. Volatile compounds of soy sauce using CC-SCO<sub>2</sub> at 35°C, 100bar

| Compound name                    | R.T   | Area%              |                          |                    |                          |
|----------------------------------|-------|--------------------|--------------------------|--------------------|--------------------------|
|                                  |       | spay column        |                          | Packed column      |                          |
|                                  |       | C.P :<br>soy sauce | C.P :<br>CO <sub>2</sub> | C.P :<br>soy sauce | C.P :<br>CO <sub>2</sub> |
| Acetaldehyde                     | 3.35  | 10.74              | 0.08                     | 1.47               | 1.66                     |
| Methanethiol                     | 3.74  | ND                 | 0.02                     | ND                 | ND                       |
| Methyl-hydrazine                 | 4.39  | 44.18              | 92.94                    | 93.40              | 96.78                    |
| Isopropyl alcohol                | 4.84  | 3.30               | ND                       | ND                 | 0.30                     |
| 2-Methyl-propanal                | 5.84  | 2.30               | 0.09                     | 0.05               | 0.09                     |
| 1-Propanol                       | 6.18  | 2.04               | 0.12                     | 0.10               | 0.04                     |
| 2,3-Butanedione                  | 6.73  | 0.72               | ND                       | ND                 | ND                       |
| Acetic acid ethenyl ester        | 6.79  | ND                 | 0.02                     | 0.05               | 0.03                     |
| 2-Butanone                       | 7.10  | 1.16               | 0.07                     | 0.03               | 0.03                     |
| Ethanol                          | 8.00  | 3.50               | 0.09                     | ND                 | 0.12                     |
| Acetic acid,ethyl ester          | 8.18  | 16.59              | 0.52                     | 0.12               | 0.28                     |
| Acetic acid                      | 8.64  | 0.52               | 0.00                     | ND                 | ND                       |
| 2-Methyl-1-propanol              | 9.20  | 4.23               | 0.13                     | 0.04               | 0.03                     |
| 2-Butenal                        | 9.44  | ND                 | ND                       | 0.03               | ND                       |
| 3-Methyl-butanal                 | 10.24 | 2.88               | 0.08                     | 0.04               | 0.09                     |
| 2-Methyl-butanal                 | 10.89 | 2.29               | 0.08                     | 2.17               | 0.05                     |
| Carbon tetrachloride             | 11.39 | ND                 | 0.46                     | ND                 | ND                       |
| 1-Butanol                        | 11.45 | 1.52               | 0.05                     | 2.17               | ND                       |
| 2-Propenoic acid,<br>ethyl ester | 13.65 | ND                 | 0.09                     | ND                 | ND                       |
| 1-Methyl-1H-pyrrole              | 15.18 | ND                 | 0.19                     | ND                 | ND                       |
| 3-Methyl-1-butanol               | 15.18 | 0.97               | 0.05                     | 0.02               | 0.01                     |
| 2-Methyl-1-butanol               | 15.38 | 0.51               | ND                       | 0.02               | ND                       |
| Pyridine                         | 15.36 | ND                 | 0.01                     | ND                 | ND                       |
| Pyrrole                          | 15.73 | ND                 | 1.93                     | ND                 | ND                       |
| Methylbenzene                    | 16.61 | 0.81               | 0.33                     | 0.09               | 0.12                     |

(Continued)

|                                       |       |      |      |      |      |
|---------------------------------------|-------|------|------|------|------|
| 1-Ethyl-1H-pyrrole                    | 18.46 | ND   | 0.03 | ND   | ND   |
| 2-Hydroxy-propanoic acid, ethyl ester | 18.36 | ND   | 0.04 | ND   | ND   |
| Octane                                | 18.46 | 0.23 | 0.01 | ND   | 0.02 |
| 2-Methyl-pyridine                     | 18.46 | ND   | 0.03 | ND   | ND   |
| 2-Methyl- 1H-pyrrole                  | 19.06 | ND   | 0.33 | ND   | ND   |
| Hexamethyl-cyclotrisiloxane           | 19.32 | 1.51 | 0.02 | 0.12 | 0.04 |
| 2-Methyl-1H-pyrrole                   | 19.50 | ND   | 0.07 | ND   | ND   |
| 3-Methyl-butanoic acid                | 19.50 | ND   | 0.07 | ND   | ND   |
| 2-Methyl-butanoic acid                | 19.94 | ND   | 0.06 | ND   | ND   |
| Ethylbenzene                          | 20.34 | ND   | 0.06 | ND   | ND   |
| Styrene                               | 21.28 | ND   | 0.15 | ND   | ND   |
| 1,3-Dimethyl-benzene                  | 21.32 | ND   | ND   | 0.02 | ND   |
| Isooctanol                            | 21.47 | ND   | ND   | 0.02 | ND   |
| 2,5-Dimethyl-1H-pyrrole               | 22.01 | ND   | 0.19 | ND   | ND   |
| 2,4-Dimethyl-pyridine                 | 22.50 | ND   | 0.02 | ND   | ND   |
| 3-Ethyl-1H-pyrrole                    | 22.50 | ND   | 0.02 | ND   | ND   |
| Benzaldehyde                          | 23.49 | ND   | 0.10 | ND   | ND   |
| Phenol                                | 24.24 | ND   | 0.32 | ND   | ND   |
| 2-Ethyl-pyridine                      | 26.44 | ND   | 0.14 | ND   | ND   |
| 4-Methyl-phenol                       | 28.93 | ND   | 0.37 | ND   | ND   |
| 3,4-Dimethyl-benzenamine              | 32.76 | ND   | 0.21 | ND   | ND   |
| Indole                                | 37.89 | ND   | 0.29 | ND   | ND   |
| 3-Methyl-1H-indole                    | 41.36 | ND   | 0.10 | ND   | ND   |

<sup>1)</sup>ND : Not Detect

<sup>2)</sup>C.P : Continuous Phase



### 3. 연속식 향류 초임계 이산화탄소 처리 간장의 저장 중 변화

#### 3.1. 저장 기간에 따른 간장의 미생물 변화

멸균과정을 거치지 않은  $\text{SCO}_2$  처리 간장을  $37^\circ\text{C}$ , 암소에서 저장하면서 경시 적으로 총균수, 효모, *Bacillus* sp.을 측정하였다.

간장은 발효과정을 거치는 동안 원료 중의 단백질과 전분질은 미생물이 생육하면서 분비하는 효소에 의해 가수분해되고, 이에 의해 생성된 저분자 물질은 효모와 세균에 의해 알코올 발효와 산 발효가 일어나는 동시에 여러 가지 향미성분이 합성된다. 이처럼 간장에 포함된 미생물에는 유익한 것이 있고 다른 한편으로는 간장 품질의 변질, 혼탁의 원인이 되어 혼입을 가급적 억제해야 한다고 보고되어 있다(Lee, 1997; Lee, 1975). 하지만 시중에 유통되고 있는 간장의 경우 총질소 성분의 함량이 0.7~1.2%정도에 이르고 있어 미생물 수준에서의 보존성 확보가 문제시 되고 있다(Lee, 1999).

먼저 간장의  $\text{SCO}_2$  처리 온도( $35^\circ\text{C}$ ,  $45^\circ\text{C}$ )에 따른 저장 기간 동안의 총균수 변화는 Fig. 4와 같았다. 저장 기간에 따라 간장내의 총균수는 증가하였으며, 간장의  $\text{SCO}_2$ 를 이용해  $35^\circ\text{C}$ 에서 처리한 경우 처리 전 간장과 비교해 볼 때 spray column의 경우 총균수가 0.5 log cycle 정도 적었으며, packed column의 경우에는 총균수가 1 log cycle 정도 많은 것으로 나타났다. 간장의  $\text{SCO}_2$ 를 이용해  $45^\circ\text{C}$ 에서 처리 시에도  $35^\circ\text{C}$ 에서 처리한 결과와 비슷한 경향을 나타내었다.

저장 기간 동안의 간장의 각 처리 온도( $35^\circ\text{C}$ ,  $45^\circ\text{C}$ )에 따른 효모의 변화는 Fig. 5와 같다. 효모는 간장에서 가스 생성과 관능저하로 인한 변패의 원인이 되는 균으로 상품적 가치를 저하시키므로 생육을 가급적 억제해야 한다(Lee, et. al., 1996; Chu, et. al., 1976). 먼저  $35^\circ\text{C}$ 의 경우 처리 전 간장과 비교해 볼 때 spray column의 경우 두 압력 조건에서 효모가 0.5 log cycle 적었으나, packed column의 경우 100 bar로 처리 시에는 처리 전과 비슷한 수를 보

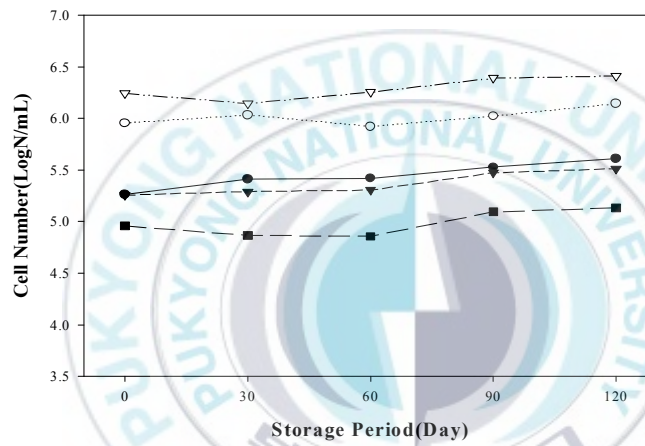
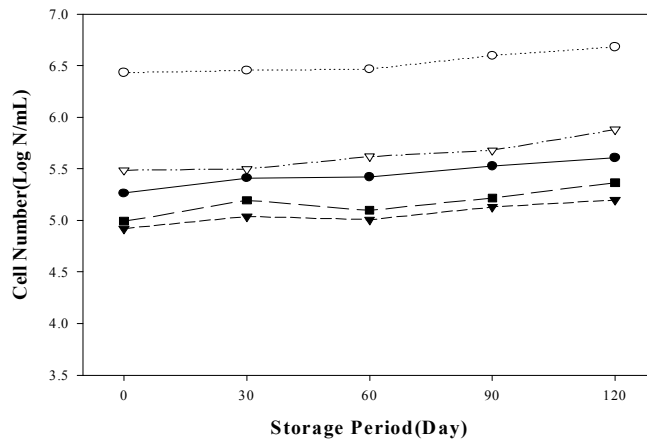


Fig. 4. The change of total bacterial count during storage period for treated soy sauce using CC-SCO<sub>2</sub> at 35°C(top) and 45°C(bottom).

● : Untreated soy sauce, ○: 170 bar-packed column, ▼: 170 bar-spray column, ▽: 100 bar-packed column, ■: 100 bar-spray column

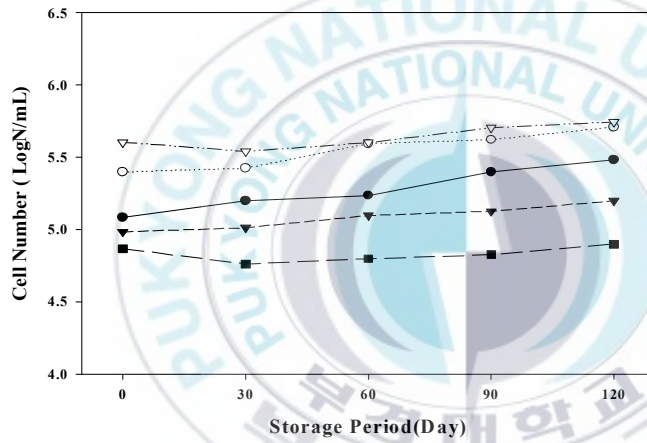
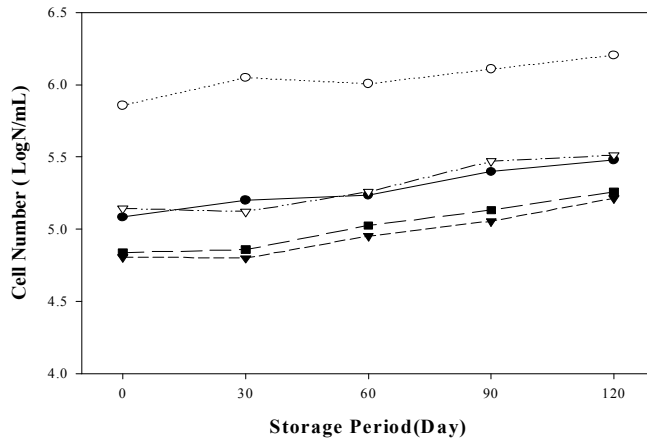


Fig. 5. The change of yeast during storage period for treated soy sauce using CC-SCO<sub>2</sub> at 35°C(top) and 45°C(bottom).

● : Untreated soy sauce, ○: 170 bar-packed column, ▼: 170 bar-spray column, ▽: 100 bar-packed column, ■: 100 bar-spray column

였으며, 170 bar의 경우에는 1 log cycle 정도 더 많은 것으로 나타났다.

45℃의 처리 시도 35℃의 처리와 마찬가지로 spray column의 경우가 packed column의 경우보다 효모가 적은 것으로 나타났다. 그리고 같은 column 상태일 때 packed column의 경우는 낮은 압(100 bar)에서 spray column의 경우는 높은 압(170 bar)에서 효모가 많은 것으로 나타내었다.

저장 기간 동안의 간장의 각 처리 온도(35℃, 45℃)에 따른 *Bacillus* sp.의 변화는 Fig. 6과 같다. *Bacillus* sp.는 장류 자체에 미치는 영향은 적으나 조미식품으로 첨가 시 포자의 발아와 미생물 생장에 의한 2차 오염을 유발하므로 *Bacillus* sp.의 효율적인 살균이 필요하다고 보고되어 있다(Song, et. al. 2001). 먼저 35℃의 경우 처리 전 간장과 비교해 볼 때 spray column의 경우 *Bacillus* sp.가 작았으나 packed column의 경우에는 *Bacillus* sp.가 많은 것으로 나타났다. 그리고 같은 column 상태일 때 packed column의 경우는 높은 압(170 bar)에서 *Bacillus* sp.가 많은 것으로 나타났으나, spray column의 경우는 압에 따라서 큰 차이가 나타나지 않았다.

45℃의 처리 시에도 35℃의 처리와 마찬가지로 spray column의 경우가 packed column의 경우보다 *Bacillus* sp.가 적은 것으로 나타났다. 그리고 같은 column 상태일 때 packed column의 경우와 spray column의 경우 모두에서 높은 압(170 bar)에서 *Bacillus* sp.가 많은 것으로 나타났다.

고압(31.5 Mpa)과 긴 시간(120-180 min)의 처리를 통해 파쇄육에서의 *Staphylococcus aureus*의 미생물 활성을 감소된다고 보고되고 있으며(Sirisee et. al., 1998), CO<sub>2</sub>를 낮은 압력(6.1 Mpa)에서 긴 시간동안 반응시키면 *Brocothrix thermosphacta*의 생존 균수를 약 5 log 만큼 감소시킬 수 있다고 보고하였다(Erkmen, 2000). 이처럼 고압상태의 이산화탄소가 다양한 종류의 미생물의 활성을 감소

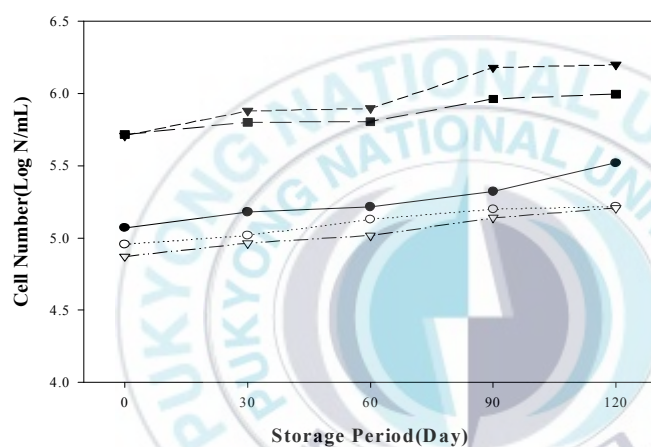
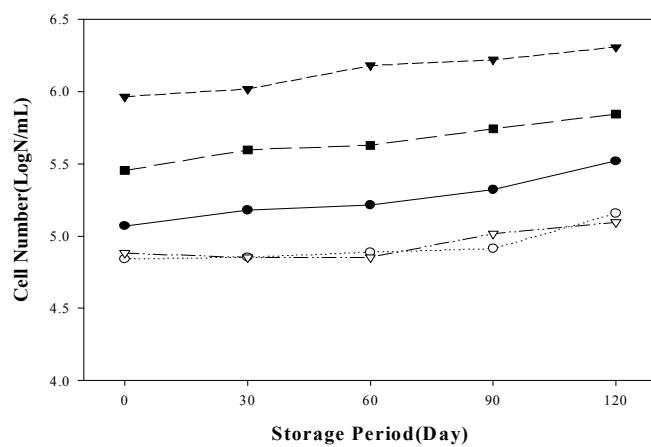


Fig. 6. The change of *Bacillus*. sp during storage period for treated soy sauce using CC-SCO<sub>2</sub> at 35°C(top) and 45°C (bottom).

● : Untreated soy sauce, ○: 170 bar-spray column, ▼: 170 bar-packed column, ▽: 100 bar-spray column, ■: 100 bar-packed column

시킬 수 있다는 것은 보고되어 있으며, 특히 본 연구에서 중점을 두고 있는 *Bacillus*종과 효모에 대한 초임계 상태의 이산화탄소의 살균효과에 관해서도 보고되어 있다(Spilimbergo *et. al.*, 2003; Isenschmid *et. al.*, 1995). 연구에 따르면 90 bar, 60℃에서 *Bacillus subtilis*를 초임계 상태의 이산화탄소에 6시간의 처리 시에 불활성화가 가능하다고 했다(Spilimbergo *et. al.*, 2003). 이러한 불활성의 메커니즘을 이산화탄소는 유동성과 침투성의 증가와 그들의 필수적인 영역의 파괴함에 따라 쉽게 세포막을 통해 관통할 수 있고(Isenschmid, A *et. al.*, 1995), 동시에 압력 하에서 과다한 이산화탄소는 변경된 세포막을 통과해 지나가고 cell pool의 완충능이 pH 구배와 proton motive force의 실패에 의해 충분히 초과됨에 따라 내부의 pH를 낮추기 때문이라고(Hong, 1999) 설명하고 있다. 본 연구에서 *Bacillus* sp.의 초임계 상태의 이산화탄소 처리에 의해 완전한 멸균은 되지 않았다. 이는 이전 연구에서 행한 조건보다 낮은 온도와 짧은 처리 시간 때문이라고 생각되어 지며(Spilimbergo *et. al.*, 2003), 간장의 완전한 멸균 효과를 위해 초임계 이산화탄소의 멸균 처리 조건 확립을 위한 깊은 연구가 요구될 것으로 보인다.

본 실험에서 spray column에서 보다 packed column의 경우가 총균수, 효모, *Bacillus* sp. 모두에서 더 높은 균수를 가지는 것으로 보였다. 이는 각 처리 조건에 따른 간장의 총질소 함량과 식염의 농도로 설명될 수 있는데 총질소 함량은 미생물이 자라는 영양원으로 이용될 수 있어 미생물의 증식을 촉진 시키고, 식염의 농도가 높으면 미생물의 생육이 억제된다고 보고되어 있다(Lee, *et. al.*, 1975). Table 3에서 보듯이 각 처리 조건 별 총질소 함량에는 뚜렷한 차이가 없으나 spray column을 이용 할 때보다 packed column을 이용해 간장을 처리 시 염 농도가 더 낮은 것으로 나타나 spray column으로 처리 시 염 농도에 의해 미생물의 생육이 억제된 것이다. 하지만 packed column을 이용하여 처리 한 간장의 미생물 균수가 많지만 간장을 섭취하기에 문제가 되지 않는 정도 이므로 간장의 품질에



는 영향을 주지 않는다.

### 3.2. 저장 기간에 따른 간장의 일반성분 변화

여러 조건에서  $\text{SCO}_2$  처리를 통해 지질이 제거된 간장을  $37^\circ\text{C}$ , 암소에서 저장하면서 경시적으로 아미노산성 질소, 갈색도, 완충능의 변화를 측정하였다.

여러 조건에서 간장을  $\text{SCO}_2$  처리하였을 경우 아미노산성 질소 변화 경향을 나타낸 Fig. 7을 보면 저장 기간에 따라 감소하는 경향을 보였으며, 저장 60일째에 급격한 감소를 보였다. 이러한 경향은 한국 전통 간장의 숙성 기간 중에 아미노산성 질소가 감소하는 경향을 나타낸다는 보고와 일치하는 결과이다(Kim, 2004). 하지만 숙성 기간 중에 아미노산성 질소는 증가한다는 보고도 있다(Song, *et. al.*, 2001; Lee, *et. al.*, 2002; Park, *et. al.*, 1996; Chou, *et. al.*, 1998; Park, *et. al.*, 1997).

아미노산성 질소는 간장의 숙성 정도 및 보존기간 중 품질평가의 지표가 되며, 아미노산성 질소의 함량이 높은 장류가 성분 면에서도 좋은 간장으로 판정된다. 처리 전의 원액 간장의 경우보다는  $\text{SCO}_2$ 로 처리된 간장이 높은 값을 나타내었으며, 저장 기간 동안에도 높은 값을 나타내었는데 이로써  $\text{SCO}_2$  처리 간장이 아미노산성 질소 면에서 볼 때 우수한 간장이라고 보여진다(Song, *et. al.*, 2001). 각 처리 조건 변화에 따라서는 큰 차이를 나타내지 않았으나,  $35^\circ\text{C}$ 에서 처리한 간장에 비해  $45^\circ\text{C}$ 에서 처리한 간장이 저장 기간 중에 더 높은 아미노산성 질소 값을 나타내었다. 또한 100 bar 처리구보다 170 bar 처리구에서 높은 값을 보였다.

간장의 색은 메주 중에 함유된 색소가 침지기간 중 간장으로 용출되거나 간장내의 carbonyl 화합물과 amino acid, peptide, protein 등의 amino 화합물을 기질로 하는 maillard reaction의 산

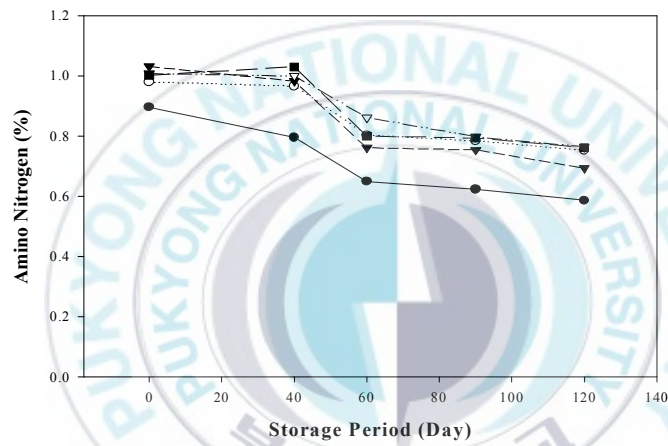
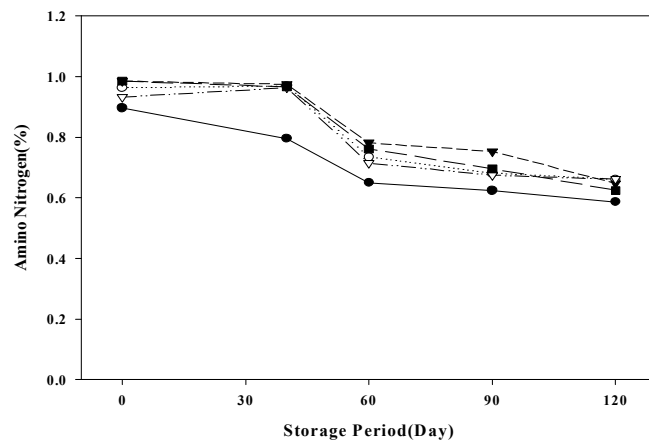


Fig. 7. The change of amino nitrogen during storage period for treated soy sauce using CC-SCO<sub>2</sub> at 35°C(top) and 45°C (bottom).

● : Untreated soy sauce, ○: 100 bar-spray column, ▼: 170 bar-spray column, ▽: 100 bar-packed column, ■: 170 bar-packed column

물인 melanoidin 물질에 의해 형성된다(Kim, 1995; Jeon, et. al., 2002).  $\text{SCO}_2$ 를 이용하여 여러 조건에서 처리한 간장의 저장기간에 따른 갈색도의 변화를 처리 전 원액 간장과 비교하기 위해 500 nm에서 흡광도를 처리한 결과는 Fig. 8과 같았다. 모든 처리구의 간장이 저장 기간에 따라 증가하는 경향을 보였으며, 특히 저장 60일부터 급격한 증가를 보였다. 이는 숙성기간에 따른 간장의 갈색도에 대한 연구에서 숙성 기간이 길어질수록 흡광도가 증가한다는 연구결과와 일치하였다(Jeon, 2002).

저장 초기에는 원액 간장의 흡광도와  $\text{SCO}_2$  처리구의 흡광도가 비슷한 값을 나타냈으나, 저장기간이 증가함에 따라  $\text{SCO}_2$  처리구에 비해 흡광도가 높아졌다. 처리 조건에 따른 변화를 보면 35℃일 경우, 170 bar, spray column의 경우에 가장 큰 증가를 보였고, 100 bar, spray column의 경우가 가장 낮은 증가를 보였다. 일정한 압력 100 bar에서는 Packed column이 170 bar에서는 spray column이 갈색도가 높았으며, spray column의 경우에는 높은 압일 경우(170 bar)에서 packed column의 경우는 낮은 압(100 bar)에서 높은 갈색도를 나타내었다. 45℃일 경우, 170 bar, packed column의 경우에 가장 큰 증가를 보였고, 170 bar, spray column의 경우가 가장 낮은 증가를 보였다. 일정한 압력 100 bar에서는 spray column이 170 bar에서는 Packed column이 갈색도가 높았으며, spray column의 경우에는 낮은 압(100 bar)에서 packed column의 경우는 높은 압일 경우(170 bar)에서 높은 갈색도를 나타내었다.

본 연구에서는 간장을  $\text{SCO}_2$ 로 처리 하였을 경우 갈색도의 차이점만을 연구 했을 뿐  $\text{SCO}_2$ 처리에 따른 간장의 색변화에 대한 기작은 밝히지 못했다. 상세한 기작을 밝히기 위해서는 model system에 대해 연구할 필요가 있을 것으로 여겨진다.

$\text{SCO}_2$ 를 이용하여 각 조건에서 처리 한 간장의 저장 기간에 따른 완충능의 변화를 측정한 결과는 Fig. 9와 같았다.

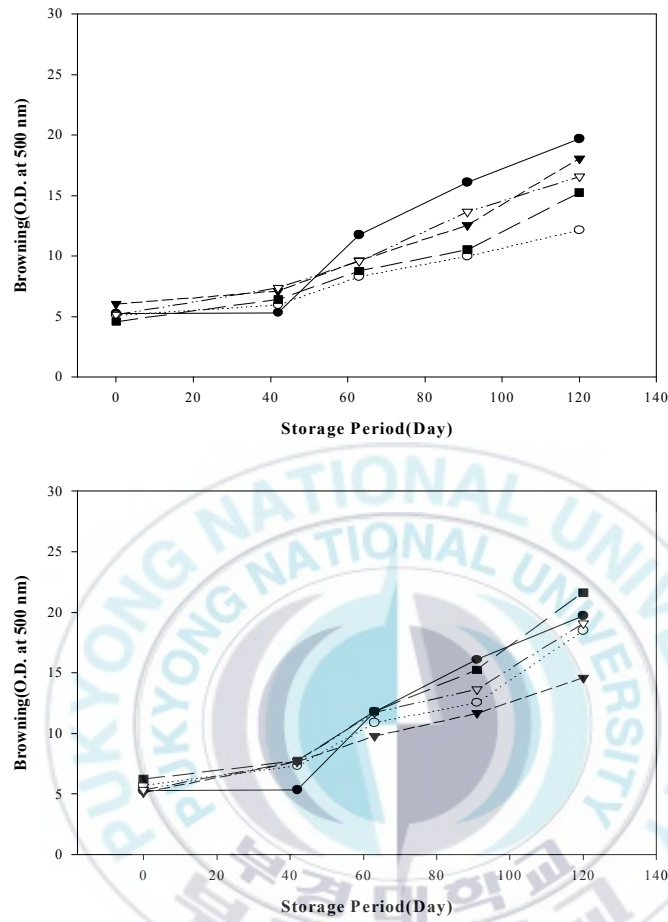


Fig. 8. The change of browning during storage period for treated soy sauce using CC-SCO<sub>2</sub> at 35°C(top) and 45°C(bottom).

● : Untreated soy sauce, ○: 100 bar-spray column, ▼: 170 bar-spray column, ▽: 100 bar-packed column, ■: 170 bar-packed column

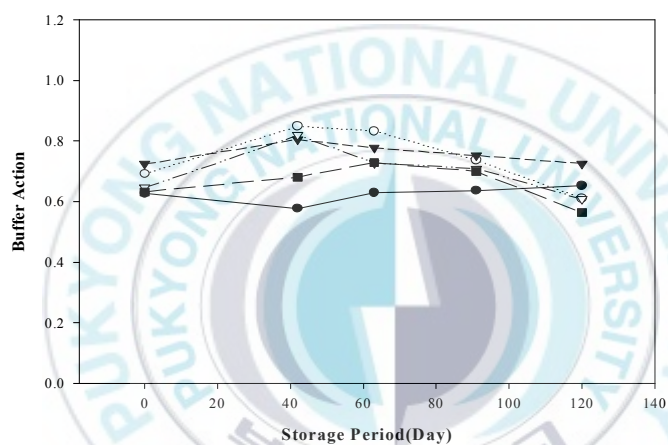
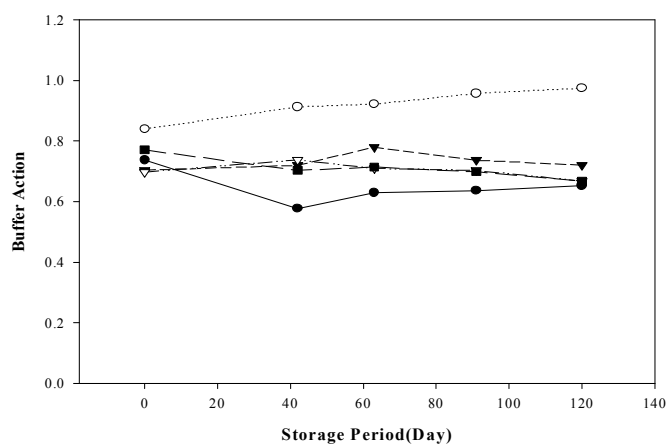


Fig. 9. The change of buffer action during storage period for treated soy sauce using CC-SCO<sub>2</sub> at 35°C(top) and 45°C (bottom).

● : Untreated soy sauce, ○: 100 bar-spray column, ▼: 170 bar-spray column, ▽: 100 bar-packed column, ■: 170 bar-packed column

완충능은 1/10N NaOH 6 mL을 첨가했을 때 pH 변화로  $\text{SCO}_2$ 로 처리된 간장이 처리 전의 원액 간장에 비해 높았다. 저장 기간 동안의 간장의 완충능변화를 살펴보면,  $35^\circ\text{C}$  100 bar, spray column을 이용하여 처리한 간장을 제외하고는 모두 감소했다. 간장의 숙성이 진행됨에 따라 glutamic acid, aspartic acid 등의 아미노산과 젖산 함량이 증가하여 완충능이 낮아진다는 보고와 일치하였다 (Joo, 1997). 하지만 처리 조건에 따라서는 거의 유사한 값을 보여 처리조건에 따른 차이는 없었다.

완충능은 양조간장과 화학간장 판별의 한 지표로서 간장의 중요한 규격으로 설정되어 있으며 완충능이 낮을수록 우량 간장으로 평가되는데(Lee *et. al.*, 1976), 본 실험 결과에서 완충능 수치만으로 볼 때  $\text{SCO}_2$  처리에 의해 간장의 질을 향상시키지는 못하였다.

#### 4. 간장 내 천연 기능성 물질의 동정

##### 4.1 Astaxanthin 첨가 간장 내의 astaxanthin 함량 동정

간장 내의 astaxanthin의 함량을 분석하기 위해 standard를 300, 500 및 700 ppm 농도로 제조하여 그린 검량선은 Fig. 10과 같다. 구해진 검량선 식을 기본으로 하여 게 껍질 추출물 첨가 간장 내의 astaxanthin의 함량을 구하면, 0.1% 와 0.3% 첨가 간장에서는 함량이 작아 정량이 되지 않았고, 0.5%와 1.0%의 첨가 간장에서의 astaxanthin 함량은 간장 1 mL당 각각 509, 581 ppm이다.

##### 4.2 Fucoxanthin 첨가 간장 내의 fucoxanthin 함량 동정

간장 내의 fucoxanthin의 함량을 분석하기 위해 standard를 0.8, 0.9 및 1 ppm 농도로 만들어 그린 검량선은 Fig. 11과 같다. 미역 추출물 첨가 간장 내의 fucoxanthin의 함량을 구하면 0.1, 0.3, 0.5, 1.0% 첨가 간장의 fucoxanthin 함량은 각 간장 1 mL 당 8.77, 11.17, 51.94, 88.09 ppm의 양으로 함유되어 있었다.



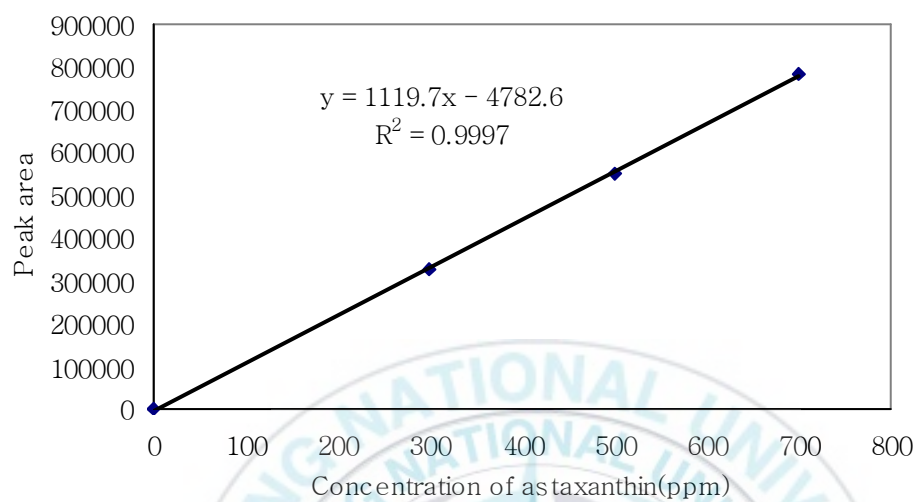


Fig. 10. The calibration curve of astaxanthin standard.

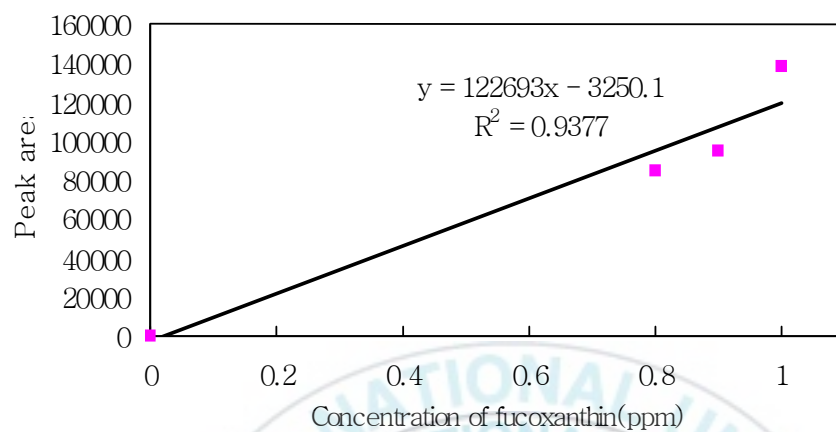


Fig. 11. The calibration curve of fucoxanthin standard.

#### 4.3 AITC 첨가 간장 내의 AITC 함량 동정

간장 내의 AITC의 함량을 분석하기 위해 AITC standard를 10, 50 및 100 ppm 농도로 제조해 구한 검량선은 Fig. 12와 같다. 검량선 식을 바탕으로 하여 고추냉이 추출물 첨가 간장 내의 AITC의 함량을 구하면, 고추냉이 추출물 0.1, 0.3, 0.5 및 1.0% 첨가 간장 내에 AITC의 함량은 모든 첨가구에서 높지 않았으며, 각 간장 1 mL 당 11.7, 14.5, 14.7 및 16.4 ppm의 양으로 함유되어 있었다.

### 5. 간장 내 천연 기능성 물질의 일반성분

#### 5.1 Astaxanthin 첨가 간장의 일반성분

폐기물로 버려지거나 이용 용도가 제한적인 게 껍질로부터  $\text{SCO}_2$ 를 이용하여 항산화성 등의 기능성을 가진 astaxanthin을 처리하여 간장에 일정 농도(0.1%, 0.3%, 0.5%, 1.0%)로 첨가 시 간장의 일반성분 변화를  $\text{SCO}_2$ 를 이용하여 처리한 간장(treatment condition : 35°C, 170 bar, spray column, 연속상 (간장), 분산상( $\text{CO}_2$ ))과 비교한 결과는 Table 11과 같았다.

총질소 함량과 식염 농도는 대조군에 비해 큰 차이를 나타내지 않았다. 아미노산성 질소의 함량은 대조구가 0.99%인데 비해 첨가구는 농도에 따라 0.68~0.86%의 함량을 나타내었다. 지질의 함량은 대조군의 경우가 1.04%였으나 농도별 첨가구에서 1.68~1.72%로 증가하였다. 지질의 함량이 증가한 이유는  $\text{SCO}_2$ 를 이용하여 astaxanthin을 추출하는 과정에서 게 껍질 내의 지질도 함께 추출되어 간장에 첨가되어 그 함량이 증가된 것으로 보인다. 갈색도는 대조군이 6.03이었으나 첨가구에서는 이보다 작은 값을 보였으며 첨가 농도가 높을수록 높았다. 완충능의 경우는 대조군이 0.7이었으나 실험구는 이보다 증가하였으며 첨가 농도가 높을수록 높은 값을 나타냈다.

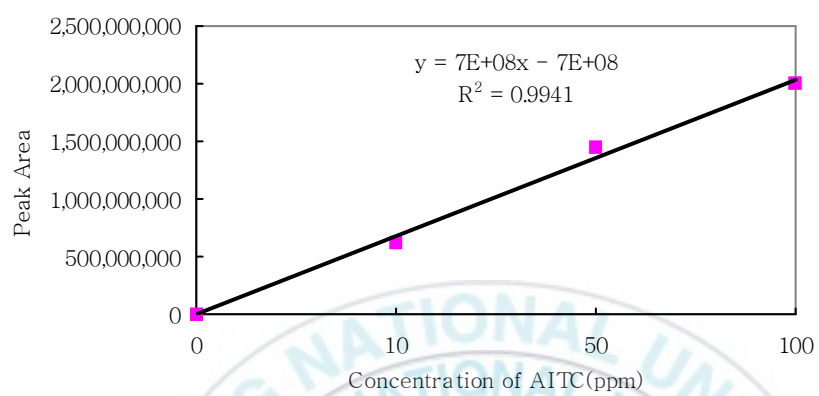


Fig. 12. The calibration curve of allyl isothiocyanate standard.

Table 11. The comparison of general ingredients of soy sauce containing astaxanthin extracted from crab shell using  $\text{SOC}_2$

|                              | Control <sup>1)</sup> | Soy sauce containing astaxanthin |       |       |       |
|------------------------------|-----------------------|----------------------------------|-------|-------|-------|
|                              |                       | 0.1%                             | 0.3%  | 0.5%  | 1.0%  |
| Total nitrogen (%)           | 1.69                  | 1.71                             | 1.70  | 1.70  | 1.72  |
| Amino nitrogen (%)           | 0.99                  | 0.68                             | 0.69  | 0.74  | 0.86  |
| Crude lipid (%)              | 1.04                  | 1.68                             | 1.70  | 1.71  | 1.74  |
| Saltiness (%)                | 13.01                 | 13.24                            | 13.34 | 13.25 | 13.76 |
| Browning<br>(O.D. at 500 nm) | 6.03                  | 4.57                             | 4.83  | 5.19  | 5.61  |
| Buffer action                | 0.70                  | 0.79                             | 0.81  | 0.81  | 0.82  |

<sup>1)</sup> Soy sauce extracted using  $\text{SCO}_2$  at 35°C, 170 bar, Spray column, continuous phase(soy sauce)/ dispersed phase( $\text{CO}_2$ )

## 5.2 Fucoxanthin 첨가 간장의 일반성분

미역을  $\text{SCO}_2$ 를 이용하여 항산화성 등의 기능성을 가진 fucoxanthin을 추출하여 간장에 일정 농도(0.1%, 0.3%, 0.5%, 1.0%)로 첨가 시 간장의 일반성분 변화를  $\text{SCO}_2$ 를 이용하여 처리한 간장 (Treatment condition : 35℃, 170 bar, spray column, 연속상 (간장), 분산상( $\text{CO}_2$ ))과 비교한 결과는 Table 12와 같았다.

총질소의 함량은 대조구와 큰 차이를 나타내지 않았으며, 첨가 농도에 따라서도 차이를 나타내지 않았다. 아미노산성 질소는 0.1% 첨가구의 경우 0.87%로 대조구 간장에 비해 낮은 값을 나타내었으나 이를 제외하고는 대조구와 비슷한 값인 0.92~0.97%를 나타내었다. 간장의 질소 성분은 간장의 정미성에 주요한 영향을 미치는 성분 (Park, *et. al.*, 1997; Lee, *et. al.*, 1976)으로 본 실험에서는 대조구와 차이가 없어 fucoxanthin첨가에 따른 간장의 맛에는 영향을 끼치지 않을 것으로 판단된다.

실험구의 지방 함량은 대조구에 비해 높은 값을 나타내었으나 첨가 농도에 따라서는 큰 차이가 나지 않았다. 또한 지방 함량의 증가는 미역으로부터 fucoxanthin을 추출하는 과정에서 지질성분도 추출되어 간장에 첨가되었기 때문으로 보인다. Fucoxanthin 첨가 간장의 갈색도는 0.1%와 0.3% 첨가구에서 각각 5.17과 5.91로 대조구의 6.03에 비해 낮았으나, 0.5% 및 1.0% 첨가구에서는 각각 6.15와 6.66로 높은 값을 나타내었다. 간장의 갈변은 색과 향을 좋게 하여 간장의 품질을 향상시키나 지나친 갈변현상은 오히려 간장의 품질을 저하시키는 원인이 된다(Jeong, *et. al.*, 1891).

완충능의 경우는 0.70%인 대조군에 비해 각 농도별 첨가 간장의 0.80~0.82로 fucoxanthin 첨가구가 높았으나 첨가 농도에 따른 차이는 없었다. 식염의 경우 대조군에 비해 높은 값을 나타내었으며, 1.0% 첨가구에서 가장 높은 값을 나타내었다.



Table 12. The comparison of general ingredients of soy sauce containing fucoxanthin extracted from brown seaweed using  $\text{SOC}_2$

|                              | Control <sup>1)</sup> | Soy sauce containing fucoxanthin |       |       |       |
|------------------------------|-----------------------|----------------------------------|-------|-------|-------|
|                              |                       | 0.1%                             | 0.3%  | 0.5%  | 1.0%  |
| Total nitrogen (%)           | 1.69                  | 1.71                             | 1.66  | 1.75  | 1.71  |
| Amino nitrogen (%)           | 0.99                  | 0.87                             | 0.92  | 0.93  | 0.97  |
| Crude lipid (%)              | 1.04                  | 1.91                             | 1.93  | 1.92  | 1.95  |
| Saltiness (%)                | 13.01                 | 13.67                            | 13.25 | 13.07 | 14.03 |
| Browning<br>(O.D. at 500 nm) | 6.03                  | 5.17                             | 5.91  | 6.15  | 6.66  |
| Buffer action                | 0.70                  | 0.81                             | 0.80  | 0.81  | 0.82  |

<sup>1)</sup> Soy sauce extracted using  $\text{SCO}_2$  at 35°C, 170 bar, spray column, continuous phase(Soy Sauce)/ dispersed phase( $\text{CO}_2$ )

### 5.3 Allyl Isothiocyanate 첨가 간장의 일반성분

고추냉이로부터  $\text{SCO}_2$ 를 이용하여 AITC를 추출하여 간장에 일정 농도(0.1%, 0.3%, 0.5%, 1.0%)로 첨가 시 간장의 일반성분 변화를  $\text{SCO}_2$ 를 이용하여 처리한 간장(treatment condition : 35℃, 170 bar, spray column, 연속상 (간장), 분산상( $\text{CO}_2$ ))과 비교한 결과는 Table 13과 같았다.

AITC 첨가에 따른 간장의 총질소 함량은 첨가 농도에 따라 차이를 나타내지 않았고 아미노산성 질소의 경우 대조구의 0.99%에 반해 첨가구는 그 양이 감소하였다. 지질은 다른 기능성 물질의 첨가한 경우와 동일하게 2.55-3.01% 범위로 증가하였으며, 첨가 농도가 높아짐에 따라 지질의 함량이 증가했다. 식염 농도는 대조구와 비슷한 함량을 나타냈으며 AITC 첨가에 따른 식염의 변화는 없었다. 갈색도는 대조구에 비해 감소했으며 첨가 농도가 높을수록 높았다. 완충능의 경우는 대조구에 비해 첨가 농도가 높을수록 높은 값을 나타냈다.

## 6. 천연 기능성 물질 첨가 간장의 저장 중 변화

### 6.1 Astaxanthin 첨가 간장의 저장 중 화학적 변화

Astaxanthin을 첨가 한 간장의 아미노산성 질소의 기간별 변화는 Fig. 13과 같았다. 대조구(astaxanthin 무첨가 간장; 35℃, 170 bar, spray column, 연속상 (간장), 분산상( $\text{CO}_2$ ))의 경우 저장 기간에 따라 0.9~0.7% 범위를 나타냈으며, astaxanthin 첨가 농도가 높아짐에 따라 저장 초기의 아미노산성 질소의 값이 증가 했다. 간장을 저장함에 따라 아미노산성 질소의 함량이 감소했다. 간장의 발효기간 중 미생물에 의해 분해된 원료(탈지대두와 소맥)의 아미노산 질소는 간장의 숙성도를 결정하는 중요한 성분이며, 간장 고유의 조미료적 성질을 부여함과 동시에 영양학적 가치를 부여한다고 보고된바 있다(Jang et. al., 2003). 보리등겨를 첨가해 제조한 간장과 표고버섯을 첨가한 간장의 경우의 기간에 따른 아미노산성 변화를 연구와는 다른 결과를

Table 13. The comparison of general ingredients of soy sauce containing allyl isothiocyanate extracted from wasabi using  $\text{SOC}_2$

|                              | Control <sup>1)</sup> | Soy sauce containing allyl isothiocyanate |       |       |       |
|------------------------------|-----------------------|-------------------------------------------|-------|-------|-------|
|                              |                       | 0.1%                                      | 0.3%  | 0.5%  | 1.0%  |
| Total nitrogen (%)           | 1.69                  | 1.69                                      | 1.89  | 1.76  | 1.65  |
| Amino nitrogen (%)           | 0.99                  | 0.71                                      | 0.89  | 0.92  | 0.70  |
| Crude lipid (%)              | 1.04                  | 2.33                                      | 2.55  | 2.53  | 3.01  |
| Saltiness (%)                | 13.01                 | 13.61                                     | 14.21 | 13.30 | 11.35 |
| Browning<br>(O.D. at 500 nm) | 6.03                  | 4.75                                      | 5.04  | 5.47  | 5.69  |
| Buffer action                | 0.70                  | 0.82                                      | 0.80  | 0.78  | 0.79  |

<sup>1)</sup> Soy sauce extracted using  $\text{SCO}_2$  at 35°C, 170 bar, spray column, continuous phase(Soy Sauce)/ dispersed phase( $\text{CO}_2$ )

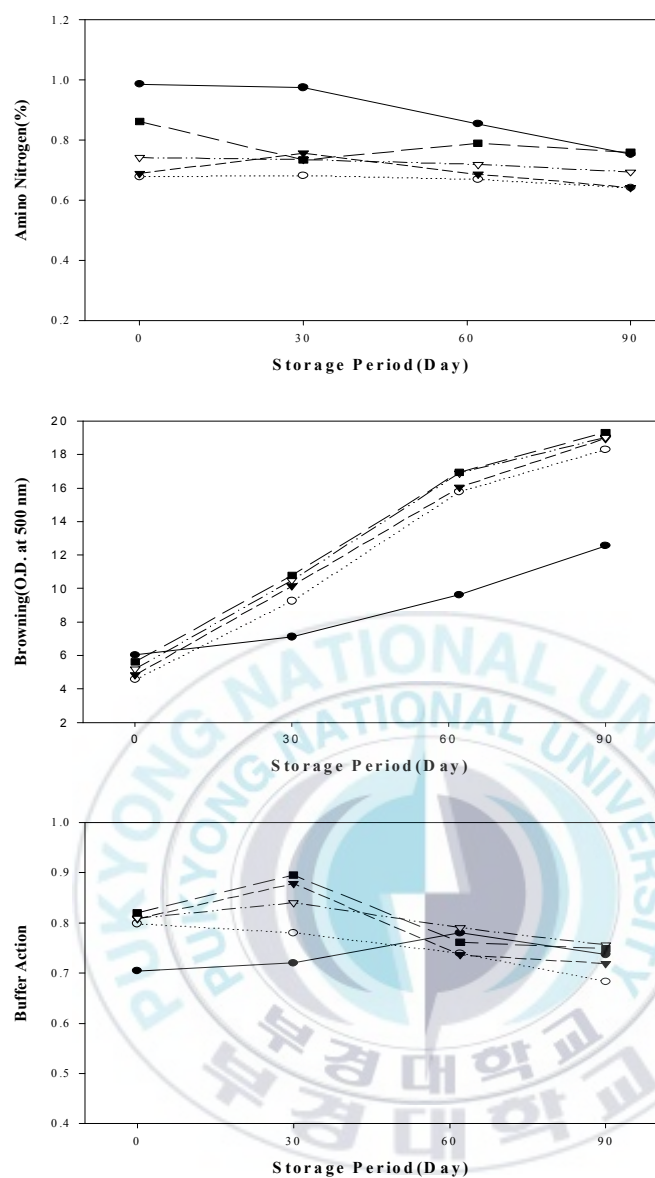


Fig. 13. The change of amino nitrogen(top), browning(middle), buffer action(Bottom) during storage period for soy sauce containing astaxanthin.

●: Non-contained soy sauce, ○: astaxanthin 0.1%, ▼: astaxanthin 0.3%, ▽: astaxanthin 0.1%, ■: astaxanthin 1.0%

보였다(Lee, *et. al.*, 2002; Jang, *et. al.*, 2003).

Astaxanthin을 첨가 한 간장의 저장 기간에 따른 갈색도 변화를 대조구와 비교 조사하기 위해 500 nm에서 흡광도를 측정한 결과는 Fig. 13과 같았다. 저장 초기 각 농도별 처리구의 갈색화 정도 (4.5~5.6)는 대조구(6.0)에 비해 낮았으나 저장 기간이 증가함에 따라 각 농도 별 처리구의 갈색화 정도가 증가하여 저장 90일째는 대조구에 비해 높아졌다. 90일째의 astaxanthin 각 농도별 첨가 간장의 경우 갈색도가 18.2~19.3의 범위로 농도가 증가 할수록 갈색화 정도도 증가 하였다. 이는 간장에 첨가하는 astaxanthin의 색이 간장에 영향을 준 것으로 사료된다.

간장에 게 껍질로부터 추출한 astaxanthin을 첨가 했을 때 간장의 품질 변화를 관찰하기 위해 0.1 N NaOH를 넣었을 때의 pH 변화로써 완충능을 평가한 결과는 Fig. 13과 같았다. Astaxanthin을 첨가 하지 않은 간장에 비해 농도 별로 첨가한 간장이 초기에는 완충능의 높은 값을 나타내다가 저장의 후반기에는 거의 유사한 값을 나타냈다. Astaxanthin의 첨가 농도별로는 큰 차이가 나타나지 않았으나, 1.0% 농도에서 가장 높은 값을 나타내었다. 이로써 1.0% 첨가구의 간장 품질이 가장 좋으나 이는 저장 기간이 증가함에 따라 대조구와 차이를 나타내지 않았다.

## 6.2 Fucoxanthin 첨가 간장의 저장 중 화학적 변화

미역 추출물을 첨가한 간장의 아미노산성 질소의 변화는 Fig. 14와 같았다. 저장 기간이 길어질수록 감소하였으며, fucoxanthin 추출물을 첨가하지 않은 간장에 비해 fucoxanthin 추출물을 농도 별로 첨가한 간장의 경우의 아미노산성 질소가 낮았다. 첨가 농도에 따라서는 큰 차이는 나타내지 않았다.

Fucoxanthin 추출물을 첨가한 간장의 갈색도의 기간별 변화는 Fig. 14와 같았다. 저장 기간이 길어질수록 갈색도가 증가하였으며,

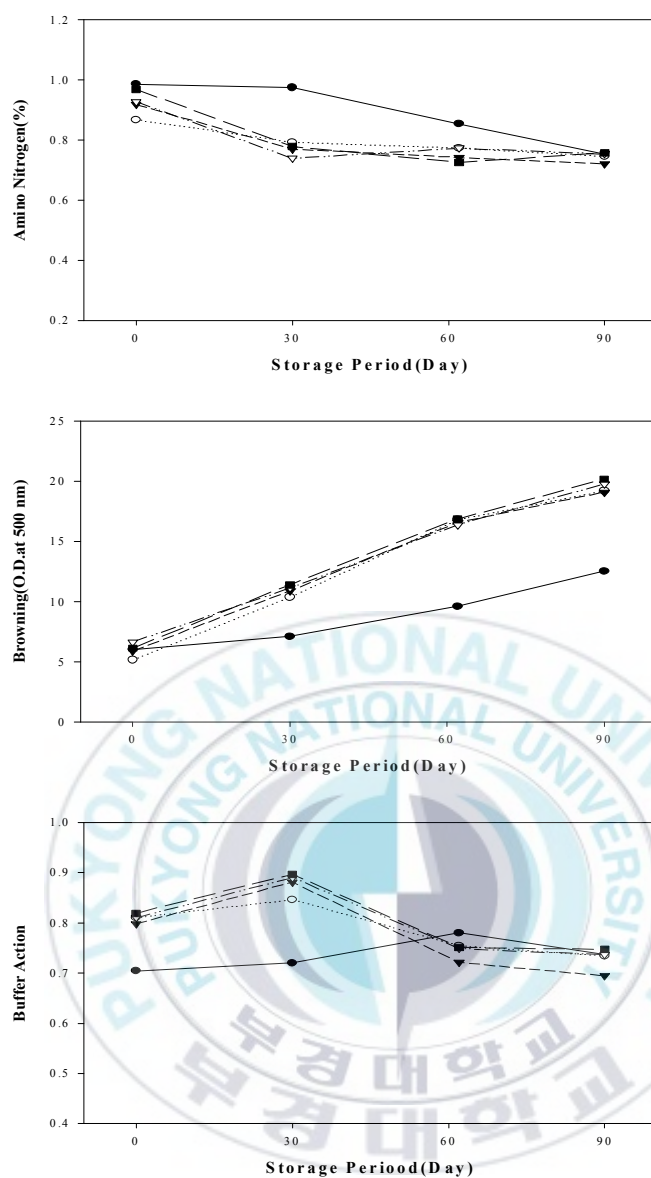


Fig. 14. The change of amino nitrogen(top), browning(middle), buffer action(Bottom) during storage period for soy sauce containing fucoxanthin.

●: Non-contained soy sauce, ○: fucoxanthin 0.1%, ▼: fucoxanthin 0.3%, ▽: fucoxanthin 0.1%, ■: fucoxanthin 1.0%



fucoxanthin 추출물을 첨가하지 않은 간장에 비해 fucoxanthin 추출물을 농도 별로 첨가한 간장의 경우가 높은 값을 나타내었다. 첨가 농도에 따라서는 큰 차이는 나타나지 않았다. Fucoxanthin 추출물을 첨가한 간장의 완충능의 기간별 변화는 Fig. 14와 같다. 저장 기간이 길어질수록 완충능은 감소하였으며, fucoxanthin 추출물을 첨가하지 않은 간장에 비해 fucoxanthin 추출물 농도 별로 첨가한 간장의 경우가 높은 값을 나타내었다. 첨가 농도에 따라서는 큰 차이는 나타나지 않았다.

### 6.3 AITC 첨가 간장의 저장 중 화학적 변화

AITC를 첨가한 간장의 아미노산성 질소의 기간별 변화는 Fig. 15와 같았다. 저장 기간이 길어질수록 아미노산성 질소가 감소하였으며, AITC를 첨가하지 않은 간장에 비해 AITC를 농도 별로 첨가한 간장의 경우가 낮은 값을 나타내었다. 첨가 농도별로는 0.5% 첨가 시에 가장 높았다.

AITC를 첨가한 간장의 갈색도의 기간별 변화는 Fig. 15와 같았다. 저장 기간이 길어질수록 갈색도가 증가하였으며, AITC를 첨가하지 않은 간장에 비해 AITC를 농도 별로 첨가한 간장의 경우가 높은 값을 나타내었다. 첨가 농도별로는 큰 차이를 나타내지 않았으나 1.0% 첨가 시에 가장 높은 값을 나타내었다. AITC를 첨가한 간장의 완충능의 기간별 변화는 Fig. 15와 같았다. 저장 기간이 길어질수록 완충능이 감소하였으며, AITC를 첨가하지 않은 간장에 비해 AITC를 농도 별로 첨가한 간장의 경우가 초기에는 높은 값을 나타내다가 저장의 후반기에는 거의 유사한 값을 나타냈다. 첨가 농도별로는 큰 차이를 나타내지 않았다.

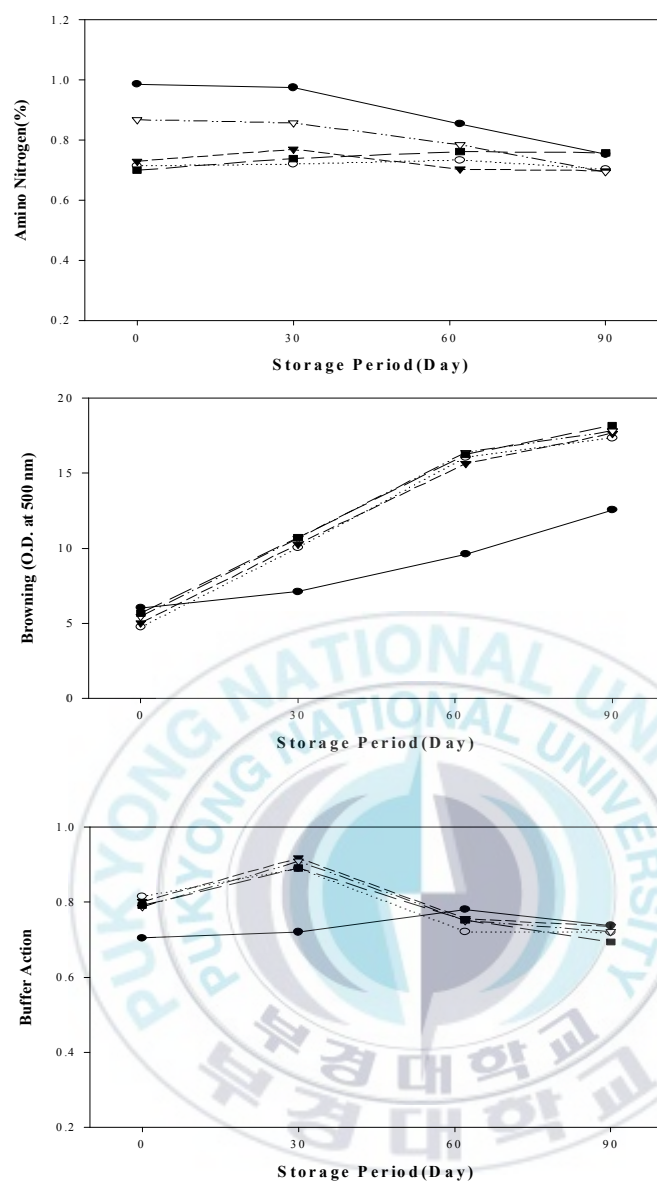


Fig. 15. The change of amino nitrogen(top), browning(middle), buffer action(Bottom) during storage period for soy sauce containing AITC.

●: Non-contained soy sauce, ○: AITC 0.1%, ▼: AITC 0.3%, ▽: AITC 0.1%, ■: AITC 1.0%

## 7. 천연 기능성 물질 첨가 간장의 항산화성

### 7.1 Astaxanthin 첨가 간장의 항산화성

기능성 물질 첨가에 따른 간장의 항산화성을 평가하기 위해 SOD 유사활성, 전자공여능, POV 자동산화 억제능을 합성 항산화제인 BHT와 비교하여 실험하였다.

간장의 SOD 유사활성은 과산화수소( $H_2O_2$ )로 전환시키는 반응을 촉매하는 pyrogallol의 생성량을 측정하여 나타내었으며, 그 결과는 Fig. 16과 같았다. SOD 유사활성 측정 결과 대조구인 간장에서는 32%였고, 0.1% astaxanthin 추출물 첨가 시에는 이보다 조금 작은 30%였다. astaxanthin 추출물의 첨가 농도가 높아질수록 SOD 유사활성이 증가하여 1% 첨가 시에 약 60%를 나타내었다. 이는 실험의 BHT 0.1%에 비해 낮은 수치이나, BHT 0.01%에 비해 약 36% 높은 값이다.

기능성물질인 astaxanthin을 간장에 농도별로 첨가하였을 때 DPPH에 대한 전자공여능을 측정한 결과는 Fig. 16과 같다. 0.1%와 0.3% 첨가구에서는 무첨가 간장의 전자공여능과 차이를 나타내지 않았으나, 0.5%와 1.0% 첨가구에서는 무첨가 구에 비해 높은 항산화능을 보였다. 특히 1.0% 첨가구(45%)는 무첨가구(22%)에 비해 약 2배 높은 값을 나타내었다. 합성 항산화제인 BHT를 0.01% 첨가한 경우 보다는 높은 값을 나타내었으나 0.1% 첨가구에 비해서는 낮은 값을 나타내었다.

기능성 물질 첨가 간장의 자동산화 억제능을 알아보기 위해 linoleic acid를 기질로 하여 과산화물가를 측정한 결과는 Fig. 17과 같았다. 반응 시간 2일째는 모든 구에서 비슷한 과산화물가를 나타내었으나 반응시간 7일째부터 다른 경향을 보였다. 즉, 무첨가 간장과 0.1%첨가 간장의 경우 높은 과산화물가를 나타내는 동시에 반응시간 15일이 경과했을 때 까지 증가 하였다. 0.3%, 0.5%, 1.0% 첨가구에서는 과산화물의 증가가 억제되었다. 특히 1.0% 첨가구의 경우 과산화물가가

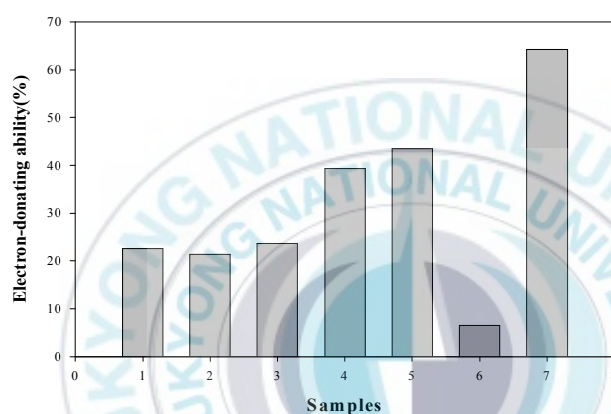
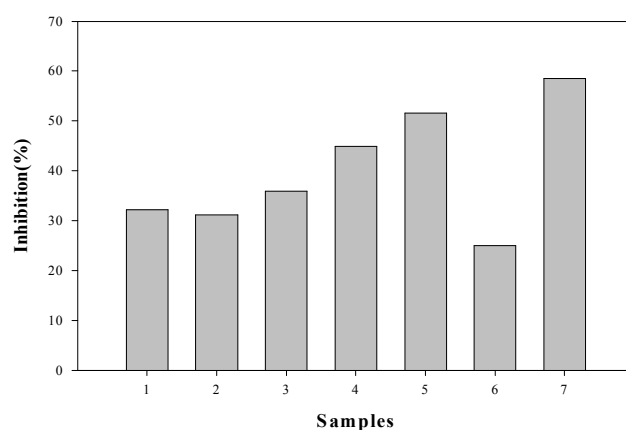


Fig. 16. Inhibition of pyrogallol autoxidation(top) and electron-donating ability(bottom) of five different soy sauce containing astaxanthin and BHT. Symbols are as follows: 1. soy sauce(control), 2. astaxanthin 0.1% soy sauce, 3. astaxanthin 0.3% soy sauce, 4. astaxanthin 0.5% soy sauce, 5. astaxanthin 1.0% soy sauce, 6. BHT 0.01% 7. BHT 0.1%.

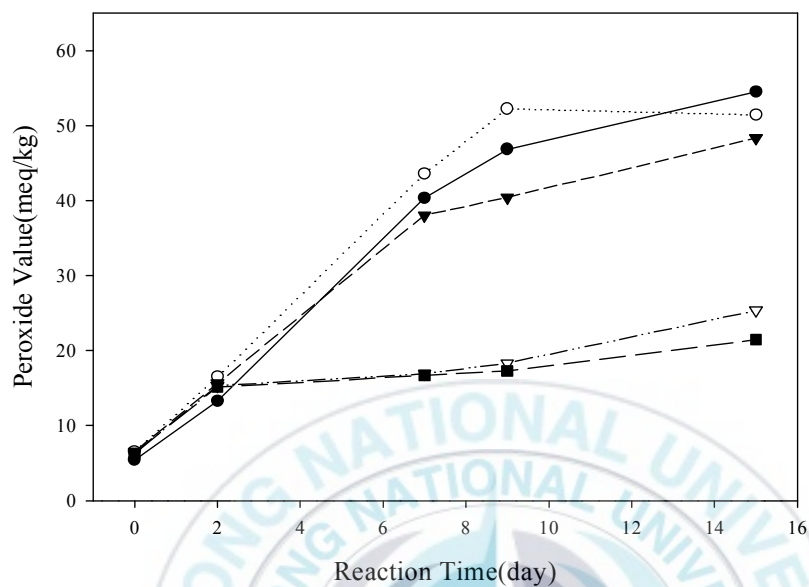


Fig. 17. Change of peroxide value of linoleic acid mixture with the addition of soy sauce containing astaxanthin during oxidation reaction time at 37°C.

●: Non-contained soy sauce, ○: astaxanthin 0.1%, ▼: astaxanthin 0.3%, ▽: astaxanthin 0.1%, ■: astaxanthin 1.0%

가장 낮았다.

SCO<sub>2</sub>를 이용하여 처리한 간장에 astaxanthin 첨가하였을 때의 항산화능을 알아보기 위해 SOD 유사활성, 전자공여능, POV 자동산화 억제능을 실험하였다. 각 실험 결과를 HPLC를 이용해 구한 각 농도별 astaxanthin 첨가 간장내의 astaxanthin의 함량과 연관하여 살펴야 한다. 0.1%와 0.3% 첨가구에서는 astaxanthin이 미량 함유되어 검출이 되지 않았는데 항산화능 실험에서도 무첨가구와 비슷한 결과를 나타내었다. 0.5%와 1.0% 첨가구의 경우 무첨가구에 비해 높은 항산화능을 가진다는 결과가 나타났다. 이로써 astaxanthin추출물을 0.5%이상 첨가 시 간장에 항산화능을 증가시킬 수 있을 것으로 보인다.

간장은 강한 항산화성과 free radical scavenging 활성을 가진다고 알려져 있으며, 간장내의 질소 화합물이 간장의 항산화성에 크게 기여하는 요소 중의 하나라고 알려져 있으나, maillard 반응의 최종산물인 melanoidin이라고 알려진 갈색물질이 간장의 항산화 물질에 기여하는 가장 중요한 물질로 보고되어 있다(Yamaguchi, *et. al.*, 1974). Astaxanthin은 항산화제로서의 역할을 할 수 있으며(Lim, *et. al.*, 1992; Palozza, *et. al.*, 1992), 강한 항산화제로 알려진  $\alpha$ -tocopherol 보다 높은 항산화 능력을 가지고 있다고 보고되어 있다(Schroeder, *et. al.*, 1993; Miki, 1991). 간장과 astaxanthin 자체만이 가지는 항산화능에 비해 천연 항산화물질로 알려진 astaxanthin을 첨가해 항산화능을 측정 시 높은 항산화능을 지니고 있는 것으로 관찰되었다. 간장 자체가 가지는 항산화능에 astaxanthin이 가지는 항산화능의 작용으로 인해 상승작용이 일어난 것이다(Cheigh, *et. al.*, 1993).

## 7.2 Fucoxanthin 첨가 간장의 항산화성

SOD 유사활성 측정과 DPPH에 대한 전자 공여능의 결과는 Fig. 18과 같았고, 대조구인 간장에서는 32%였고, 0.1% fucoxanthin추출



물 첨가 시에는 이보다 조금 작은 30%였다. Fucoxanthin 추출물의 첨가 농도가 높아질수록 SOD 유사활성이 증가하여 1% 첨가 시에 약 45%를 나타내었다. 이는 실험의 BHT 0.1%에 비해 낮은 수치이나, BHT 0.01%에 비해 높은 값을 나타내었다.

DPPH에 대한 전자 공여능의 경우 0.1%와 0.3% 첨가구에서는 무첨가 간장의 경우보다 낮은 값을 나타내었으며 두 농도의 첨가구에서는 값이 20%로 차이가 없었다. 0.5%와 1.0% 첨가구에서는 무첨가구에 비해 높은 항산화능을 보였다. 특히 1.0% 첨가구는 39%를 나타내었다. 합성 항산화제인 BHT를 0.01% 첨가한 경우보다는 높은 값을 나타내었으나 0.1% 첨가구에 비해서는 낮은 값을 나타내었다.

Linoleic acid를 기질로 하여 과산화물가를 측정한 결과는 Fig. 19와 같으며, 반응 시간 2일째부터 농도에 따라 차이를 보이기 시작해 반응 시간 7일째부터는 확연한 차이를 보였다. 즉, 무첨가 간장과 0.1% 및 0.3% 첨가 간장의 경우 높은 과산화물가를 나타내는 동시에 반응시간 15일이 경과했을 때 까지 증가 하였다. 0.5%와 1.0% 첨가구에서는 과산화물의 증가가 억제되었다. 특히 1.0% 첨가구의 경우 과산화물가가 가장 낮았다.

각 실험 결과를 HPLC를 이용해 구한 각 농도별 fucoxanthin 첨가 간장내의 fucoxanthin의 함량과 연관하여 살펴야 한다. 0.1%와 0.3% 첨가구에서는 astaxanthin이 미량 함유되어 있어 항산화능 실험에서도 무첨가구와 비슷한 결과를 나타내었다. 0.5%와 1.0% 첨가구의 경우 무첨가구에 비해 높은 항산화능을 가진다는 결과가 나타났다. 이로써 astaxanthin추출물을 0.5%이상 첨가 시 간장에 항산화능을 증가시킬 수 있을 것으로 보였다.

Fucoxanthin은 carotenoid계 색소로써, carotenoid계 색소는 free radical 반응의 억제기작에 의해 발생하는 활성산소로부터 세포와 조직을 보호하는 중요한 기능을 한다고 보고되어 있다

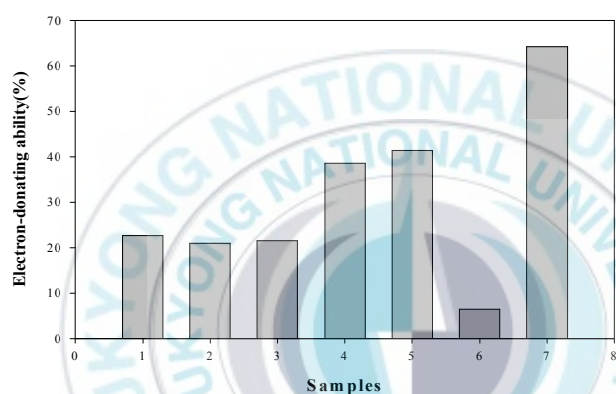
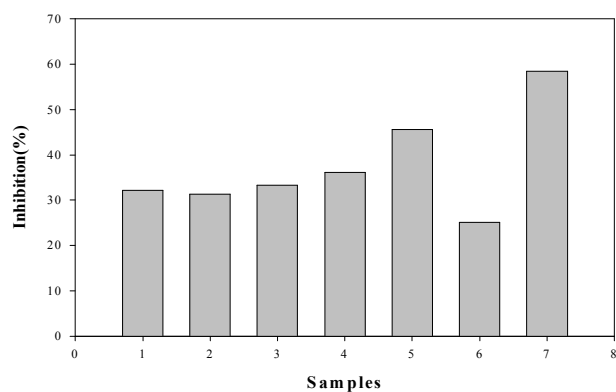


Fig. 18. Inhibition of pyrogallol autoxidation(top) and electron-donating ability(bottom) of five different soy sauce containing fucoxanthin and BHT. Symbols are as follows: 1. soy sauce(control), 2. fucoxanthin 0.1% soy sauce, 3. fucoxanthin 0.3% soy sauce, 4. fucoxanthin 0.5% soy sauce, 5. fucoxanthin 1.0% soy sauce, 6. BHT 0.01% 7. BHT 0.1%.

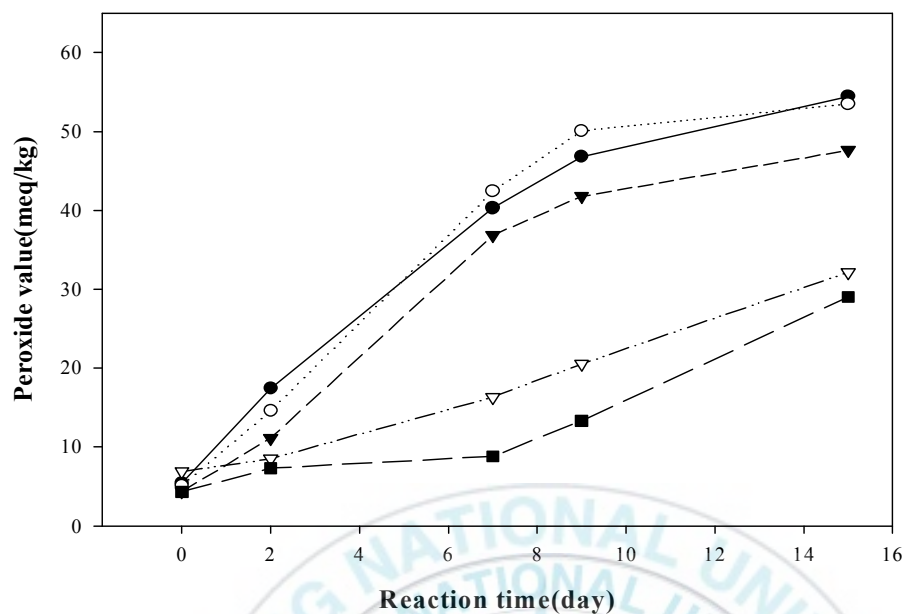


Fig. 19. Change of peroxide value of linoleic acid mixture with the addition of soy sauce containing fucoxanthin during oxidation reaction time at 37°C.

●: Non-contained soy sauce, ○: fucoxanthin 0.1%, ▼: fucoxanthin 0.3%, ▽: fucoxanthin 0.1%, ■: fucoxanthin 1.0%

(Giovannucci, 1999). 이러한 fucoxanthin의 항산화능이 간장의 항산화 활성과 상승효과를 나타내어 fucoxanthin 첨가 간장이 무첨가 간장에 비해 높은 항산화 활성을 나타낸 것이다.

### 7.3 Allyl Isothiocyanate 첨가 간장의 항산화성

첨가된 AITC 추출물 농도에 따른 간장의 항산화능을 측정하였다. SOD 유사활성과 DPPH에 의한 전자공여능의 측정 결과는 Fig. 20과 같았다. SOD 유사활성의 경우 무첨가 간장과 0.1%, 0.3% 첨가 간장이 32%로 비슷한 활성을 나타내었으며, 0.5% 첨가 간장의 경우 46%, 1.0% 간장의 경우 50%의 활성을 나타내었다. 합성 항산화제인 BHT 0.01%의 SOD 유사활성도보다는 높은 값이나 0.1% 첨가구의 경우보다는 낮은 활성을 나타내었다.

DPPH에 의한 전자공여능 역시 SOD 유사활성과 유사한 경향을 나타내었는데 0.5% 첨가구와 1.0% 첨가구에서 무첨가구보다 높은 전자공여능을 보였으며, 강력한 항산화제로 알려진 BHT 0.1% 용액에 비해서는 낮은 전자공여능을 보였다.

Linoleic acid를 기질로 하여 과산화물가를 측정한 결과는 Fig. 21과 같으며, 다른 첨가제에 비해 항산화능이 낮은 것으로 보였는데 무첨가구와 0.1% 첨가구는 과산화물가가 비슷한 경향을 보였으며, 첨가한 AITC 추출물의 양이 많을수록 과산화물가 억제능이 큰 것으로 보였다.

AITC는 주로 향균성 물질로써의 기능이 알려지면서 이에 관한 연구가 많이 행해지고 있으나 산화를 억제하는 기능도 가진 것으로 알려지고 있다(Seo, *et. al.*, 1995; Kumagai, *et. al.*, 1994). 본 연구에서 간장에 고추냉이 추출물을 1.0% 첨가 시 AITC가 17 ppm이 함유되어 있었고 이에 따라 항산화활성을 나타내는 것으로 연구되었다. AITC를 첨가한 간장에서의 산막효모 생육 저하 효과를 실험한 보고의 결과에 의하면 살균 전 생 간장에 AITC 20 ppm을 첨가하여 30℃에서

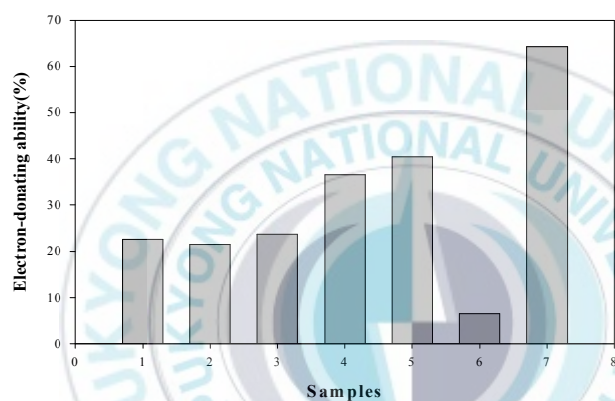
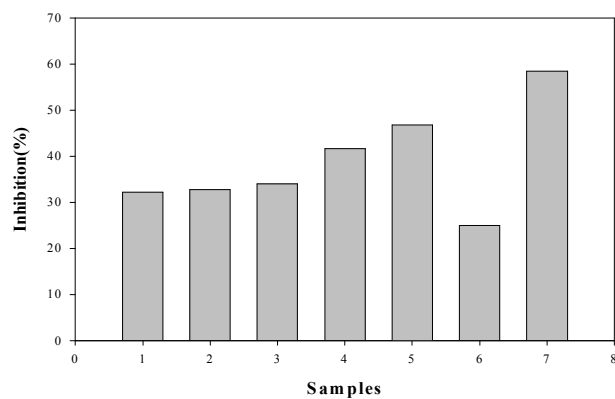


Fig. 20. Inhibition of pyrogallol autoxidation(top) and electron-donating ability(bottom) of five different soy sauce containing AITC and BHT.

Symbols are as follows: 1. soy sauce(control), 2. AITC 0.1% soy sauce, 3. AITC 0.3% soy sauce, 4. AITC 0.5% soy sauce, 5. AITC 1.0% soy sauce, 6. BHT 0.01% 7. BHT 0.1%.

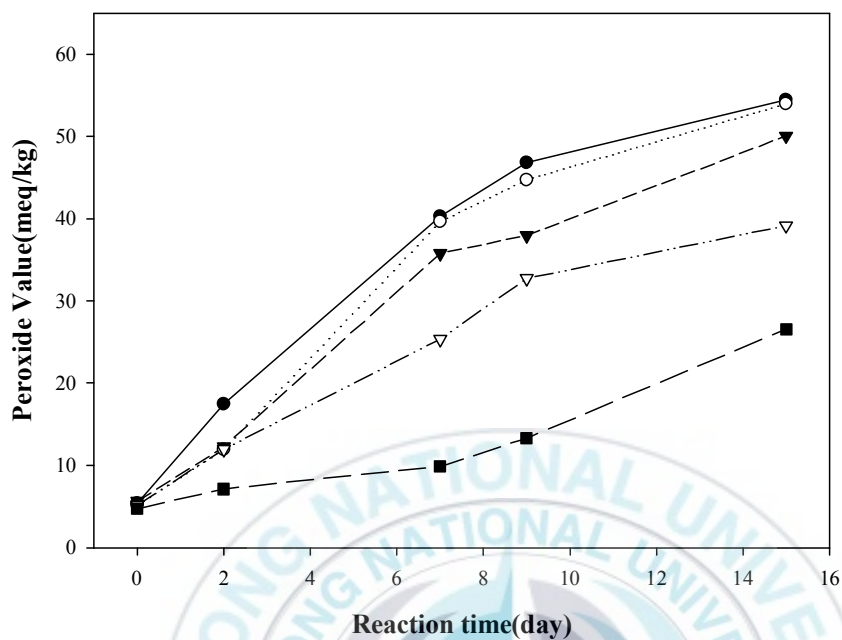


Fig. 21. Change of peroxide value of linoleic acid mixture with the addition of soy sauce containing AITC during oxidation reaction time at 37°C.

●: Non-contained soy sauce, ○: AITC 0.1%, ▼: AITC 0.3%, ▽: AITC 0.1%, ■: AITC 1.0%



30일간 저장 시 산막효모의 생육이 저해되어 막이 형성되지 않았다 (Kim, *et. al.*, 2000). 따라서 간장에 약 20 ppm의 AITC를 첨가할 경우 산막효모 생성을 저해할 뿐 아니라 항산화능도 증진 시킬 수 있을 것으로 기대되어 진다.

이상에서 살펴본 세 가지 종류의 기능성 물질을 첨가한 간장의 항산화능을 비교한 결과 가장 높은 항산화 활성을 나타내는 기능성 물질 첨가 간장은 astaxanthin을 첨가한 간장으로 밝혀졌다. Astaxanthin은 강력한 항산화제로 알려진  $\alpha$ -tocopherol보다 항산화 능이 강하다고 알려져 간장에 첨가 했을 때도 가장 강한 항산화 활성을 나타낸 것으로 나타났다.



## 요 약

본 연구에서는 간장을 연속식 향류 초임계 이산화탄소를 이용하여 처리 시의 특성 변화 및 천연 원료로부터 초임계 이산화탄소를 이용하여 추출한 기능성 물질을 첨가한 간장의 항산화성에 대해 실험하였다. 간장의 초임계 이산화탄소 처리 시에 영향을 주는 실험변수로 온도, 압력, packing의 유무(packed column, spray column), 연속상 및 고정상의 변화시켜 처리하였을 때의 간장의 성분 및 품질 변화를 고찰하였다. 또한 처리된 간장을 일정기간 동안 저장하면서 간장의 품질 및 미생물 변화를 살펴보았다. 간장에 기능성 물질인 astaxanthin, fucoxanthin 및 AITC를 첨가하였을 때의 간장의 품질 변화 및 항산화 활성과 이를 일정기간 저장 하면서 간장의 품질변화에 대해 연구하여 얻은 결과는 다음과 같았다.

1. 초임계 이산화탄소 처리에 따른 간장은 처리 전 간장에 비해 지질의 함량이 확연하게 감소하였으며, 간장의 품질을 좌우하는 단백질이나 완충능은 처리 전 원액간장과 비슷한 값을 유지하였으며, 식염 농도의 경우 감소하였다.
2. 간장을 초임계 이산화탄소를 이용하여 처리시에 많은 휘발성 성분이 제거되었으며, 각 처리 조건 중 45℃, 100 bar, spray column, 연속상을 이산화탄소로 했을 때 가장 높은 제거율을 보였다. 또한 간장의 이취로 작용하는 indole과 butyric acid는 모든 조건에서 완전히 제거되었다.
3. 초임계 이산화탄소를 이용해 처리한 간장의 저장기간에 따른 미생물 변화에 있어서 저장을 오래할 수록 미생물의 수가 증가하였으며, 온도와 압력에 따라서는 큰 차이가 없었으나, spray column의 경우 미생물의 감소효과가 뛰어났다. 일반성분의 경우 처리 조건에 따른 차이는 없었으나, 원액 간장에 비해서는 품질이 증가하였다.
4. 일반성분 및 저장성 면에서 각 기능성 물질을 첨가한 간장의 품질은

저 농도(0.1%)에서는 차이가 없었으나, 고 농도(1.0%) 첨가시에 무 첨가구에 비교해 품질이 향상되었다.

5. 기능성 물질을 함유한 간장의 항산화 활성의 경우 첨가하지 않은 간장에 비해 높은 활성을 나타내었으나, 첨가 농도가 낮은 0.1, 0.3%의 경우는 간장과 비슷한 활성을 나타내었다. 세 가지 기능성 물질 중 astaxanthin 첨가 간장이 가장 높은 활성을 나타내었다.



## 참 고 문 헌

- Ahn ,B. H., H. S. Kang and Shin, H. K., 1988, Aroma Compounds Produced by the Yeast *Hansenula saturnus* var . *saturnus* Isolated from Soil, *Korean J. Food Sci. Thechnol.*, 20(5), 718-723.
- Babizhayev, M. A., M. C. Seguin, J. Gueyne, R. P. Evstigneeva, E. A. Ageyeva and Zheltukhina, G. A., 1994, L-carnosine( $\beta$ -alanyl-L-histidine) and carcinine ( $\beta$ -alanylhistamine) act as natural antioxidants with hydroxyl radical-scavenging and lipid-peroxidase activities. *Biochem. J.* 304, 509-516.
- Ballestra, P., A. A. D. Silva and Cuq, J. L., 1996, Inactivation of *Escherichia coli* by carbon dioxide under pressure *J. Food Sci.* 61, 829-836.
- Blosi M. S. 1958, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
- Cheigh H. S. and Moon, G. S., 1990, Separation and chracteristics of antioxidative substance in fermented soybean sauce, *J. Food Sci Technol.*, 22, 461-465.
- Cheigh H. S. and Moon G. S.. 1986, Antioxidative effect of soybean sauce on the lipid oxidation of cooked meat. *Korean J. Food Sci. Technol.* 18, 313-318.
- Cheigh H. S. and Moon G. S.. 1987 Antioxidative characteristics of soybean sauce in lipid oxidation process, *J. Food Sci. Technol.* 19, 537-541.
- Cheigh H. S., J. S. Lee, G. S. Moon and Park K. Y., 1993, Antioxidative activity of browning products fractionated from fermented soybean sauce. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 22

- 565-569.
- Cheigh, H. S., J. S. Lee and Lee, C. Y. 1993, Antioxidative Characteristics of melanoidin related products fractionated from fermented soybean sauce, *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 22(5), 570-575.
- Cheigh, H. S., J. S. Lee, G. S. Moon and Park, K. Y., 1993, Antioxidative activity of browning products fractionated from fermented soybean sauce, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 22, 565-569.
- Chou, C. C. and Ling, M. Y., 1998, Biochemical changes in soy sauce prepared with extruded and traditional raw materials, *Food Research International*, 31(6-7), 487-492.
- Chu, Y. H., Yu, T. J. and Yu, J. H., 1976, Studies on the film forming yeasts isolated from commercial soy sauce, *Korean J. Food Sci. Technol.* 7, 61-68.
- Chun, B. S., S. O. Yoon and Lee, S. J., 2001, Processing of Protein Concentrate and Fatty Acid Extraction from Tuna Viscera using Supercritical Carbon Dioxide, *J. Korean Fish. Soc.*, 34(3), 207-212.
- Chung, D. H. and Chang, H. K. 1992, Food Analysis. Jinro Publishing Co., Seoul, Korea. 214.
- Collins, C. H., Lyne, P. M. and Grange, J. M., 1989, Microbiological methods, 6th ed. Butterworths, London, Great Britain, 330-334.
- Decker, E. A., A. D. Crum and Calvert, J. T., 1992, Differences in the antioxidant mechanism of carnosine in the presence of copper and ion. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 756-759.
- Del Maestro, R. F., H. H. Thaw, J. Bjork, M. Planker and Arfors, K. E. 1980. Free radicals and mediators of tissue injury. *Acta*

- Physiol Scand(Suppl)*, 492, 43-57.
- Desmond K. O'Toole, 1997, The role of microorganisms in soy sauce production, *Advanced in Applied Microbiology*, 45, 87.
- Difco Laboratories a. Difco Manual 10<sup>th</sup>ed., Detroit Michigan 48232 U.S.A. 404-405.
- Difco Laboratories b. Difco Manual 10<sup>th</sup>ed.,Detroit Michigan 48232 U.S.A. 689.
- Erkmen, O., 2000, Antimicrobial effects of pressurized carbon dioxide on *Brocothrix thermosphacta* in broth and foods. *Journal of the science of food agriculture*, 80, 1365-1370.
- Fukee, Y., Y. Ohishi, K. Iwashita, H. Ono, and Shinohara, K. 1994, Growth suppression of mkt-28 human stomach cancer cells by wasabi(*Euterna wasabi maxim*), *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 23(7), 324-326.
- Gerd Brunner, 2005, Supercritical Fluids:technology and application to food processing, *J. Food Engnieering*, 67, 21-33.
- Giovannucci, E., 1999, Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer. *J. National Cancer Institute*, 91, 317-331.
- Gracia, I., J. F. Rodriguez, M. T. Garcia, A. Alvarez and Garcia, A., 2007, Isolation of aroma compounds from sugar cane spirits by supercritical CO<sub>2</sub>, *J. of Supercritical Fluids*, *In Press*.
- Haas, G. J., H. E. Prescott, E. Dudley Jr, R. Dik, C. Hintlian and Keanc, L., 1989, Inactivation of microorganisms by carbon dioxide under pressure. *J. Food Safety*, 9, 253-265.
- Harman, D., 1956, Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.*, 11, 298-300.
- Hayase, F. and Kato, H. 1984, Antioxidative components of sweet potatoes. *J. Nut. Sci. Vitaminol.*, 30, 37.



- Hayes, R. E., G. N. Bookwalter and Bagley, E. B., 1977, Antioxidant activity of Soybean flour and derivatives-A review, *J. Food Sci.*, 42, 1527-1531.
- Hong, M. S., 1983, Sanlimkyongjae. cf. Sanlimkyoungjae (korean translated ed.) vol. II, Minjokmoonhwachujinhoe, Seoul, 235-238.
- Hong, S. I. and Pyun, Y. R., 1999, Inactivation kinetics of *Lactobacillus plantarum* by high pressure carbon dioxide, *Journal of Food Science*, 64, 728-733.
- Im, B. S., 1990, The present condition of seasoning industry in korea, *Korean J. Dietary Culture*, 5(3), 399-414.
- Isenschmid, A., Marison, I. and von Stockar, U., 1995, The influence of pressure and temperature of compressed CO<sub>2</sub> in the survival of yeast cells, *Journal of Biotechnology Netherlands*, 39, 229-237.
- Ito, A., H. Watanabe and Basaran, N., 1993, Effects of soy products in reducing risk of spontaneous and neutron induced liver tumors in mice, *Int. J. Oncol.*, 2, 773-775.
- Jang, D. K., K. L. Woo and Lee, S. C. 2003. Quality characteristics of soy sauce containing shiitake mushroom (*Lentinus edodes*), *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.*, 46(3), 220-224.
- Jeon, M. S., Sohn, K. H., Chae, S. H., Park, H. K. and Jeon, H. J., 2002, Color characteristics of Korean traditional soy sauces prepared under different processing conditions, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 31(1), 32-38.
- Jeong, K. M., J. W. Kim and Jo, S. H., 1981, A study on the color change of soysauce. *J. Agric. Food Chem.*, 24, 200-206.
- Jeong, K. S., 1995, The present condition and reserch and

- development of soysauce industry, *Korean J. Appld Microbiol. Bioeng.*, 8(2), 2013-2015.
- Jeong, K.M., Kim, J. W. and S. H. Jo, 1981, A study on the color change of soy sauce, *J. Agric. Food Chem.*, 24, 200-206.
- Ji, W. D., E. J. Lee, S. Y. Kim and Kim, J. K., 1992, Characteristic volatile components of traditional Korean soy sauce, *J. Korean Agric. chem. soc.*, 35(5), 346-350.
- Jo, J. S., H. Y. Yoo and kim, Y. M., 1993, The present condition and prospects of traditional fermented food industry, *Korean J. Appld Microbiol. Bioeng.*, 6(1), 1011-1015.
- Joo, H. K. and Jo, G. H., 1992, The Methods of Food Analysis, Yoorim Press Co., Seoul, Korea.
- Joo, H. K. 1998, Current trends and problems of fermented soysauce products. Lecture 1, 1st Symposium and Expo for Soybean Fermentation Foods, The Research Institute of Soybean Fermentation Foods, Yeungnam Univ. Korea.
- Jyonouchi, H., L. Zhang, and Tomita,Y. 1993. Studies of immunomodulating actions of carotenoids. II. Astaxanthin enhances invivoantibody production to T-dependent antigens without facilitating polyclonal B-cellactivation., *Nutr. Cancer.* 19, 269-280.
- Kawakishi, 1985, Glucosinolates their enzymatic degradation and reactivity and toxicity of degradation products, *Nippon shokuhin kogyo Gakkaishi.* 32(11), 836-846.
- Kawamura S. 1983, Seventy years of the Maillard reaction. In The Maillard reaction in foods and nutrition. waller GR and Feather MS, eds. American chemical society, Washington DC. 3.
- Kim, D. H. 1995 Food Chemistry, Tamgudang, seoul, Korea, 64-65.

- Kim, D. H., 1995, Food Chemistry: Maillard reaction. Tamgudang, Seoul, 403-416.
- Kim, J. G., 2004, Change of components affecting organoleptic quality during the ripening of Korean traditional soy sauce - Amino nitrogen, amino acids, and color, *Kor. J. Env. Hlth.*, 30(1), 22-28.
- Kim, J. K., S. K. Jang, S. Y. Kim, S. M. Park and Kim, K. S., 1990, Distribution of volatile organic acids in traditional Korean soy sauce and microorganisms producing the organic acids. *J. of Resource Develop. of Yeungnam Univ.*, 9, 63-69.
- Kim, Y. K., 2004, Antioxians, Ryo Moon Gak. P. Co., Seoul, Korea, V. Free radicals and disease, 233.
- Kim, Y. M., 2001, Fermentation engineering; Chap. 4. Soy Sauce, Urim Press, Korea, 288-305.
- Kim, Y. S., K. H. Kyung and Kim, Y. S., 2000, Inhibition of soy sauce film yeasts by allyl isothiocyanate and horse-radish powder, *Korean J. Food & Nutr.*, 13(3), 263-268.
- Kirigaya N. Kato H. Fujimaki M. 1969. Studies on antioxidant activity of nonenzymatic browning reaction products. Part2. Antioxidant activity of nondialyzable browning reaction products. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi* 43, 484-491.
- Kitakura, Y., H. Imamura, S. Hayakawa, M. Hamano and Hashimoto, S., 1994, Separation of aroma components from soy sauce by continuous supercritical CO<sub>2</sub> extraction, Developments in food engineering: proceedings of the 6th International congress on Engineer Food. International Congress on Engineer and Food.
- Ko, Y. S. and Chun, M. J., 1986, Studies on the chemical and amino acid components of commercial and homemade soy

- sauce, *J. Korean Home Economics Association*, 24(4), 105-116.
- Kumagai, H., N. Kashima, T. Seki, H. Sakurai, K. Ishii, and Ariga, T., 1994, Analysis of volatile components in essential oil of upland wasabi and their inhibitory effects on platelet aggregation, *Department of Agricultural Chemistry*, 58(12), 2131-2135.
- Lee, B. 1869 Kyuhabchongseo. cf. Kyuhabchongseo. Korean translated ed. of Dong chi gi sa maeng chun shin gan, Shingwang moonhwasa, Seoul, 19-21.
- Lee, C. J. and Koh, H. S., 1976, Standardization of korean soy sauce, *Korean J. Food Sci. Technol.* 8(4), 247-252.
- Lee, E. J., D. H. Son, U. Ky. Choi, S. I. Lee, M. H. Im, D. G. Kim, O . J. Kwon and Chung, Y. G., 2002, Chemical change of Kanjang made with barley bran, *Korean J. Food Sci. Technol.*, 34(5), 751-756.
- Lee, H. C., 1999, Fermentation food. Sinkwang Press Co., Seoul, Korea, 28-65.
- Lee, N. S. and Oh, N. S., 1996, Distribution and gas producing characteristics of yeasts in fermentation process of Doenjang, *Korean J. Agricul. Chem. and Biotechnol.*, 39, 255-259.
- Lee, S. K. and Lee, T. S. 1976. Studies on the effect of seed koji for the soysauce qualities, *J. Korean Agricultural Chemical Society*, 19(3), 155-161.
- Lee, S. R., 1997, Soybean Fermented food, In : Fermented Food of Korea, University of Ewha Press Co., Seoul, Korea, 87-88.
- Lee, S. W., 1978, The Study of Korea food dietary life in Goryeo, *Korean J. Food Sci. Technol.*, 11(1), 26.
- Lee, T. S., Y.H. Chu, B. K. Shin and Yu, J. H., 1975, Studies on

- the preservation of soy sauce : Part 1. The periodical change of chemical composition and microflora, *Korean J. Food Sci. Technol.*, 7(4), 200-207.
- Lim, B. P., A. Nagao, J. Terao, K. Tanaka, T. Suzuki, and Takama, K. 1992, Antioxidant activity of xanthophylls on peroxy radical-mediated phospholipid peroxidation. *Biochem. Biophys. ACTA. Int. J. Biochem. Biophys.*, 1126(2), 178.
- Lin, H. M., N. Cao and Chen, L. F., 1994, Antimicrobial effect of pressurized carbon dioxide on *Listeria monocytogenes*. *J. Food Sci.*, 59, 657-659.
- Joo, M. S., K. H. Sohn and H. K. Park, 1997, Change in taste characteristics of traditional Korean soy sauce with ripening period(I)-Analysis of general compounds and sugar, *Korean J. Dietary Culture*, 22(2), 183-188.
- Marklund, S. and Marklund, G. 1974, Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem*, 47, 469-474.
- Mary An Godshall, 1988, The role of carbohydrates in flavor development, *Food Technol.*, 11, 71.
- Matsukawa, R., Z. Dubinsky, E. Kishimoto, K. Masaki, Y. Masuda and Takeuchi, T. 1997. A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. *J. Appl. Phycol.*, 9, 29-35.
- Miki, W. 1991, Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure Appl. Chem.* 63, 141-146.
- Moon, G. S. and Cheigh, H. S., 1987, Antioxidative Characteristics of Soybean sauce in Lipid Oxidation Process, *Korean J. Food Sci. Technol.*, 19(6), 537-542.



- Moon, G. S., 1989, Separation of antioxidative substances in fermented soybean sauce using ion exchange resin, *Inje J Inje Univ Korean*, 5, 119-127.
- Nishimura, T. and Kato, H., 1988, Taste of free amino acids and peptides, *Food Rev. Int.*, 4, 175-194.
- Nunomura, N. and Sasaki, M., 1993, The shelf life of soy sauce. In G. Charalambous (Ed.). Shelf life studies of foods and beverages: chemical, biological, physical and nutritional aspects, The Netherlands: Elsevier Science, 391-408.
- Osman Erkmen, 2000, Effect of carbon dioxide pressure on *Listeria monocytogenes* in physiological saline and foods, *Food Microbiology*, 17, 589-596.
- Palozza, P. and Krinsky, N. I., 1992, Astaxanthin and canthaxanthin are potent antioxidants in a membrane model. *Archives of biochemistry and biophysics*, 297(2), 291.
- Park, C. K., Nam, J. H., Song, H. I. and Park, H. Y., 1989, Studies on the shelf-life of the grain shape improved Meju. *Korean J. Food Sci. Technol.* 21, 876-883.
- Park, H. K. and Sohn, K. H., 1997, Analysis of significant factor in the flavor of traditional Korean soy sauce(II) - Analysis of Nitrogen compounds, free amino acids and nucleotides and their related compounds, *Korean J. Dietary Culture*, 12(1), 63-69.
- Park, O. J., K. H. Sohn and Park, H. K., 1996, Analysis of taste compounds in traditional Korean soy sauce by two different fermentation jars, *Korean J. Dietary Culture*, 11(2), 229-233.
- Peter C. K. Cheung, 1999, Temperature and pressure effects on supercritical carbon dioxide extraction of n-3 fatty acids from red seaweed, *Food Chemistry*, 65, 399-403.



- Pitipong, W. and Sittiiwat, L., 2003, Comparison of determination method for volatile compounds in Thai soy sauce, *Food Chemistry*, 83, 617-629.
- Ryu S. H., Y. S. Lee and Moon, G. S., 2002, Effects of salt and soysauce condiment on lipid oxidation in broiled mackerel(*Scomber japonicus*). *Korean J. Food Sci. Technol.* 34, 1030-1035.
- Schroeder, W. A and Johnson, E. A. 1993, Antioxidant role of carotenoids in *Phaffia rhodozyma*, *J. Gen. Microbiol.*, 139, 907-912.
- Senorans, F. J., A. R. Rodriguez, E. Ibanez, J. Tabera and Reglero, G., 2001, Optimization of countercurrent supercritical fluid extraction conditions for spirit fractionation, *J. Supercrit. Fluids*, 21, 41.
- Seo, J. S., H. G. Chang, W. D. Ji, E. J. Lee, M. R. Choi, H. J. Kim and Kim, J. K., 1996, Aroma components of traditional Korean soy sauce and soybean paste fermented with the same meju, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 6(4), 278-285.
- Seo, K. L., D. Y. Kim, and Yang, S. I. 1995, Studies on the antimicrobial effect of wasabi extracts, *Korean J. nutrition.* 28(11), 1073-1077.
- Shin, D. H., 2005, The present condition and products developments of Korean soysauce industry, *Food Preservation and Processing Industry*, 5(1), 31-46.
- Shin, H. K., 1972, Origin and Importance of Protein and Oil of Korean Soybean, *Korean J. Food Sci. Technol.*, 4(2), 158-161.
- Shin, M. S., 2001, The present condition and developments of commercial soy sauce, *Korean J. Soc. Food Cookery Sci.*, 17(3), 102-112.

- Sirisee, U., Hsieh, F., and Huff, H. E., 1998, Microbial safety of supercritical carbon dioxide process. *Journal of Food Processing and Preservation*, 22, 387-403.
- Song, T. H., D. H. Kim, B. J. Park, M. G. Shin and Byun, M. W., 2001, Changes in microbiological and general quality characteristics of gamma irradiated Kanjang and Shoyu, *Korean J. Food Sci. Technol.*, 33(3), 338-344.
- Sorensen, S.P.L., 1907. *Biochem.* 7. 45.
- Spilimbergo, A., I. W. Marison and Von Stockar, U., 1995, The influence of pressure and temperature of compressed CO<sub>2</sub> on the survival of yeast cells, *Journal of Biotechnology*, 39, 229-237.
- Spilimbergo, S., . Bertucco, F. M. Lauro, Bertoloni, G., 2003, Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by supercritical CO<sub>2</sub> treatment, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 4, 161-165.
- Sugawara, E., T. Ito, S. Odagiri, K. Kubota and Kobayashi, A., 1985, Comparison of compositions of odor components of natto and cooked soybeans, *Agric. Biol. Chem.*, 49(2), 311-317.
- T. H. Song, D. H. Kim, B. J. Park, M. G. Shin and M. W. Byun, 2001, Changes in Microbiological and general quality characteristics of gamma irradiated kanjang and shoyu, *Korean J. Food Sci. Technol.*, 33(3), 338-344.
- Yamaguchi N, 1986. Antioxidative activity of the oxidation products prepared from melanoidins. In Aminocarbonyl reactions in food and biological systems. *Fujimaki M, Namiki M, Kato H, eds. Elsevier, Tokyo.* 291-299.
- Yamaguchi, N. and Fujimaki, M. 1974 Studies on browning

reaction products from reducing sugars and amino acids: Part 14. Antioxidative activities of purified melanoidin and their comparison with those of legal antioxidants, *Journal of Food Science and Technology (Japan)*, 21, 6.

Yoo, M. Y., 2005, Isolation and Identification of antioxidative compound from sporophyll of *Undaria pinnatifida*, Master's Thesis, Dept. of Food Science and Technology, Pukyong National University, Korea.

Zapata, M., A. M. Ayala, J. M. Franco and Garrido, J. L. 1987  
*Chromatographia* 23, 26.

한국 식품 공전, 식약청, 14-1

海老根 英雄, 1980, みその樂色. 日本醸協誌, 75, 145.



## 감사의 글

부족한 논문이 완성되기까지 도움을 주신 많은 분들에게 진심어린 감사의 마음을 전합니다. 먼저 학문의 길로 인도하여 주시고 인내와 사랑으로 지도해 주신 전병수 교수님께 깊은 감사를 표합니다. 또한 바쁘신 시간 중에도 저의 논문을 세심히 살펴주시고 다듬어 주신 양지영 교수님과 안동현 교수님께도 깊은 감사의 뜻을 전합니다.

그리고 학문의 길을 걸을 수 있도록 격려와 지도를 아끼지 않으신 이근태 교수님, 조영제 교수님, 김선봉 교수님, 이양봉 교수님, 김영목 교수님께 진심으로 감사드립니다.

실험실 생활을 인연으로 조연과 가르침을 주신 한정호 박사님, 강길운 박사님, 홍언련 박사님, 윤성옥 석사님, 이승진 석사님, 박선영 석사님, 정선미 석사님께 감사드립니다. 대학원 생활을 하면서 함께 땀 흘리며 노력했던 식품공학실험실의 식구들 윤현석 · 박지연 선배님, 신상규 · 백성신 동기님, 신언미, 노명균, 이선애, 안향민, 이호 후배님께 고마움을 전합니다. 실험실에서 함께 생활한 유병욱 선배님, 이수은 선배님, 김현태, 김태석, 김주연 · 김영란 · 조영제 · 우은영 후배님께도 감사드리며 이병관, 이아름 · 박현민 · 윤준호 · 오준구 후배님에게도 감사의 마음 전합니다.

10여 년간 함께하면서 힘이 되어준 친구들 이정은, 박현주, 강희진, 김보미, 김리정, 남민정, 조정희, 강수지에게 고맙다는 전하고 싶습니다.

지금까지 뒷바라지 해주신 가족들께 가장 감사합니다. 효도하겠다는 말이 부끄럽지만 앞으로 부모님께 최선을 다하겠습니다. 건강히 오래오래 제 곁에 있어 주십시오.