국내 지역별 전통 대두발효식품의 비타민 B₁₂ 분포

박예은¹ · 곽유정¹ · 김 정¹ · 관우삼¹ · 홍원호¹ · 박수진¹ · 최용민² · 천지연^{1,3}

¹순천대학교 식품공학과

²농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부 식생활영양과

³순천대학교 김치연구소

Regional Variation of Vitamin B₁₂ Content in Korea Traditional Fermented Soy Foods

Ye-Eun Park¹, Yu-Jeong Gwak¹, Jeong Kim¹, YuSen Guan¹, Won-Ho Hong¹,
Su-Jin Park¹, Youngmin Choi², and Jiyeon Chun^{1,3}

¹Department of Food Science and Technology, Sunchon National University

²Food and Nutrition Division, Department of Agrofood Resources, National Institute of
Agricultural Sciences, Rural Development Administration

³Kimchi Science and Industrialization Institute, Sunchon National University

ABSTRACT This study was performed to investigate the variation in the vitamin B₁₂ levels of traditional fermented soy foods (*Doenjang*, *Kochujang*, and soy sauce) prepared in the seven provinces of Korea. A total of 21 composite samples (3 food types×7 regions) for vitamin B₁₂ analysis were prepared from the 4 samples collected from each food type and region. To assure the reliability of the analytical data, analytical method validation and quality control were also carried out. Immunoaffinity-HPLC for vitamin B₁₂ analysis showed good accuracy (recovery≥ 93.5%) and precision (coefficient variations≤ 4.1%). The limits of detection and quantification of vitamin B₁₂ analysis were 0.003 µg/100 g and 0.009 µg/100 g, respectively. The vitamin B₁₂ content of traditional fermented soy food varied significantly depending on the type of fermented soy food and the region in which it was prepared ($P<0.05$). The vitamin B₁₂ content of 21 traditional fermented soy foods was between 0.04~0.50 µg/100 g for *Doenjang*, 0.03~0.15 µg/100 g for *Kochujang*, and 0.02~0.80 µg/100 g for soy sauce. It was highest in the A, D, and E provinces for *Doenjang*, *Kochujang*, and soy sauce, respectively. Specifically, the soy sauce from the E province showed the highest vitamin B₁₂ content (0.80 µg/100 g) among the 21 samples. The variation in the vitamin B₁₂ levels among fermented samples was relatively wide in A (0.68 µg/100 g) and E (0.71 µg/100 g) provinces compared to the other regions (0.05~0.10 µg/100 g). This study, based on reliable analytical method validation and quality control performance, showed that the variations in vitamin B₁₂ content of traditional fermented soy food were affected by the food type and region of preparation.

Key words: fermented soy food, vitamin B₁₂, regional variation, method validation

서 론

비타민 B₁₂는 cobalt corrinoid 계열의 화합물, 특히 코발라민류의 화합물을 총칭하며 수용성 비타민 중 가장 복잡한 구조를 가지고 있다(Martens 등, 2002). 비타민 B₁₂는 혈청에서 haptocorrin에 holohaptocorrin으로 결합하고, trans-

cobalamin에는 holotranscobalamin으로 결합한다. 이것은 장 세포에서 합성되며 이는 수용체 매개 세포 내 이입을 통해 회장에서 혈액과 다른 세포로 비타민 B₁₂를 흡수하는 역할을 한다(Hunt 등, 2014). 비타민 B₁₂는 대부분 동물성 식품에 함유되어 있으나, 발효식품과 같은 미생물 작용에 의해 제조되는 식품에서도 상당량의 비타민 B₁₂가 함유되어 있는

Received 17 September 2021; Revised 29 November 2021; Accepted 10 December 2021

Corresponding author: Jiyeon Chun, Department of Food Science and Technology, Sunchon National University, 255, Jungang-ro, Suncheon-si, Jeonnam 57922, Korea, E-mail: cjyfall@sunchon.ac.kr

Author information: Ye-Eun Park (Graduate student), Yu-Jeong Gwak (Graduate student), Jeong Kim (Graduate student), YuSen Guan (Graduate student), Won-Ho Hong (Student), Su-Jin Park (Researcher), Jiyeon Chun (Professor)

© 2022 The Korean Society of Food Science and Nutrition.

This is Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

것으로 보고되어 있다(Watanabe, 2007; Kwak 등, 2008). 비타민 B₁₂ 결핍은 주로 동물성 식품의 섭취 및 소화가 어려운 노인이나 채식주의자들에게 발병될 수 있으며, 이외에도 동물성 식품 섭취가 제한적인 어린이와 성인에게도 비타민 B₁₂ 결핍이 나타나는 것으로 알려져 있다(Hunt 등, 2014). 비타민 B₁₂ 결핍 시 호모시스테인 수치가 증가하여 인슐린 저항성 및 내피 기능 장애를 일으킬 수 있으며, 이외에도 거대세포성 빈혈 및 다양한 신경 정신 질환, 허혈성 뇌졸중과 같은 뇌혈관 질환을 유발할 수 있는 것으로 보고되어 있다(Oh와 Brown, 2003; He 등, 2004; Setola 등, 2004).

최근 발효식품의 다양한 건강 유익성이 새롭게 부각되고 있는데, 이는 발효 미생물들이 발효과정 중 다양한 건강에 유익한 산물을 생성할 뿐 아니라 미생물 자체의 정장 작용에 의한 것으로 알려져 있다(Park, 2012). 우리나라의 대표적인 발효식품인 된장, 간장, 고추장은 콩을 발효시켜 만든 것으로 먼저 메주를 만든 후 이를 발효시켜 염수를 넣고 여과한 것을 간장, 여과하지 않은 것을 된장, 메주에 쌀, 밀 등의 곡류와 소금, 고춧가루 등을 첨가한 것을 고추장이라고 부른다(Shin과 Jeong, 2015). 우리나라 전통 발효식품인 장류는 항암, 항당뇨, 혈전 용해 등 다양한 건강 기능성 효과를 지니고 있는 것으로 보고되어 있다(Kim 등, 2004; Kim과 Jung, 2004; Kwon과 Shon, 2004; Jung 등, 2006; Yang 등, 2019). 장류는 한국 식단에서 국, 찌개, 반찬 등 일상식에서 다양한 음식의 조미료로 활용되고 있어 매일 섭취하게 되는 식품군이다. 지역의 식문화에 따라 다양한 방법으로 제조되는 장류는 그 영양학적인 특성도 다양할 것으로 보이나, 이들 장류 중 발효 미생물에 의해 합성될 수 있는 비타민 B₁₂ 수준에 관한 정보는 거의 전무한 수준이다.

본 연구에서는 우리나라 전통대두발효 식품인 된장, 간장 및 고추장을 지역별로 총 21종을 수거하고 이들의 비타민 B₁₂ 함량을 분석하였으며, 비타민 B₁₂ 분석에 사용된 분석법을 검증하고 분석품질관리를 수행하여 주기적으로 농촌진흥청에서 개정하는 국가표준식품성분표의 국내 지역별 장류에 대한 비타민 B₁₂를 업데이트하는 데 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

시약

비타민 B₁₂ 표준품 cyanocobalamin은 Sigma-Aldrich 사(St. Louis, MO, USA)에서 구매하였고 추출 시 사용되는 sodium cyanide와 sodium acetate trihydrate는 Wako 사(Osaka, Japan), water는 Sigma-Aldrich에서 구입하였으며, 그 외에 사용되는 시약 및 용매는 특급 및 HPLC급을 구입하여 사용하였다.

시료 준비

수집된 우리나라 지역별로 제조되고 있는 전통 장류는 총 21종으로 국내 7개(강원, 충북, 충남, 경북, 경남, 전북 및

전남) 지역별로 각각 4~7종의 장류 시료를 수집한 후 동량의 비율로 균질하게 혼합한 composite 시료를 제조하여 분석 시료로 사용하였다. 된장과 간장은 국내산 콩, 천일염, 물 이외에 다른 부원료를 사용하지 않은 전통식품 품질인증된 제품만 수거하였으며, 고추장의 경우 국산 고춧가루, 엿기름, 쌀가루, 메주가루, 천일염, 물 이외의 부원료를 사용하지 않은 전통식품품질인증 제품을 수거하였다. 모든 시료는 2019년에 제조하여 숙성 후 2020년에 판매하는 제품을 수거하였으며, composite 시료는 -70°C에서 보관하며 분석에 사용하였다.

비타민 B₁₂ 추출

비타민 B₁₂ 추출은 마개가 있는 광구플라스크에 시료를 0.5~5.0 g을 칭량한 후 1% sodium cyanide 0.5 mL와 0.2 M sodium acetate trihydrate buffer(pH 4.0) 49.5 mL를 넣은 후 10분 동안 sonication(8893-DHT, Cole-Parmer, Chicago, IL, USA)시켰다. 다음으로 시료 플라스크를 100°C 항온수조(WB-20M, Jeio Tech Co., Daejeon, Korea)에서 1시간 동안 가열하며 cobalamin류를 추출 및 cyano-cobalamin으로 전환하였다. 추출이 끝난 시료는 냉각 후 여과지(Whatman No.1, GE Healthcare, Amersham Place, UK)를 이용하여 여과한 뒤 분석에 사용하였다.

비타민 B₁₂ 정제 및 HPLC 분석

추출된 cyanocobalamin은 immunoaffinity column(Easi-Extract Vitamin B₁₂, R-Biopharm Rhone Ltd., Glasgow, UK)을 사용하여 농축 및 정제하였다. 먼저 냉장 상태의 비타민 B₁₂ 분석용 immunoaffinity column을 실온 상태로 안정화시킨 후 내부에 들어있는 완충용액을 제거하고 water 3 mL를 주입하여 conditioning 하였다. 그 후 시료 추출액 9 mL를 주입하여 cyanocobalamin을 column 내부에 있는 면역 친화성 겔에 흡착시킨 후 불순물 제거를 위해 water 9 mL를 주입하여 washing 하였다. Syringe를 이용하여 column 내부에 남아있는 수분을 제거한 후 methanol 3 mL를 주입하여 cyanocobalamin을 용출시켰다. 그 후 70°C에서 질소를 이용하여 용출된 추출액을 전량 휘발시킨 후 water 0.5 mL를 주입하여 잔사를 재용해시킨 다음 0.45 µm membrane filter(Futecs Co., Daejeon, Korea)로 여과하여 HPLC 분석 시료로 사용하였다.

HPLC는 Agilent 1260 infinity(Agilent, Santa Clara, CA, USA), column은 C₁₈ ACE 3 AQ(3 mm×150 mm, ACE, Aberdeen, Scotland)를 사용하였으며, 비타민 B₁₂ 정량 분석을 위한 이동상은 water와 acetonitrile을 사용하여 Table 1의 gradient 조건을 이용하여 분석하였다. 분석 시자의외부 검출기를 사용하여 361 nm에서 검출하였으며, 이때 flow rate는 0.25 mL/min, column oven 온도는 35°C에서 분석을 진행하였다.

Table 1. Gradient condition of HPLC mobile phases for vitamin B₁₂ analysis

Time (min)	Water (%)	Acetonitrile (%)
0	100	0
11	85	15
19	75	25
20	90	10
26	100	0
40	100	0

비타민 B₁₂ 분석법의 LOD 및 LOQ 검증

비타민 B₁₂ 분석법 검증은 AOAC(2002)가 제시하고 있는 guideline에 따라 수행하였다. 비타민 B₁₂의 검출한계(limit of detection, LOD)와 정량한계(limit of quantification, LOQ)는 공시험 시료(blank)를 분석한 후 검출된 signal to noise(S/N)의 평균값에 각각 3.3과 10을 곱하여 나온 값을 더하여 구하였다.

비타민 B₁₂ 분석법의 직선성 및 특이성 검증

비타민 B₁₂ 분석의 직선성(linearity)은 표준품(cyanocobalamin)을 농도별(0.004, 0.01, 0.02, 0.04, 0.1, 0.2 µg/mL)로 제조하여 HPLC로 분석 후 분석 성분의 농도를 x축, 해당 성분의 피크 면적을 y축으로 검량선을 작성한 다음 이들의 상관관계를 분석하여 분석법의 직선성을 평가하였다. 비타민 B₁₂의 HPLC 분석법의 특이성(specificity) 검증은 cyanocobalamin 표준용액과 시료의 PDA(photodiode array detector, Agilent) spectrum(200~600 nm)을 비교하였다.

비타민 B₁₂ 분석법의 정확성 및 정밀성 검증

정확성(accuracy)은 표준참고물질(standard reference material, SRM) SRM 1549a(whole milk powder), SRM 1869{Infant/Adult Nutritional Formula II(milk/whey/soy based)}와 인증물질 BCR-487(The Community Bureau of Reference, pig liver)을 사용하였다. SRM은 NIST(National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였으며, BCR은 EC(European Commission)의 IRMM(Institute for Reference Materials and Measurement, Geel, Belgium)으로부터 구입하였다. SRM 1549a, SRM 1869 및 BCR-487의 비타민 B₁₂ 함량을 분석하고 구입처에서 제시한 참고값(reference value)과 비교하여 회수율(%)을 구하여 정확성을 평가하였다. 정밀성(precision)은 상업용 분유(Imperial dream XO world class 3, Namyang, Seoul, Korea)를 시료로 사용하여 하루에 5회 반복 실험한 결과와 5일간 5회 반복한 실험 결과의 표준편차를 각각 repeatability(relative standard deviation, RSD_r)와 reproducibility(RSD_R)로 나타내어 평가하였다.

분석품질관리

분석품질관리는 AOAC(2002)가 제시하는 guideline에 준하여 시료를 분석하는 모든 기간 동안 수행하였다. 품질관리 시료인 상업용 분유(Imperial Dream XO, Namyang)를 반복 분석하여 표준편차 5% 이내에 포함되는 10개의 데이터값을 선택하고 이들의 평균값을 품질관리도표(quality control(QC) chart) 작성을 위한 기준값으로 설정하였다. 품질관리도표의 관리상한선(upper control line, UCL), 관리하한선(lower control line, LCL), 조치상한선(upper action line, UAL) 및 조치하한선(lower action line, LAL)은 다음과 같이 설정하여 분석품질관리에 사용하였다.

$$UCL \text{ and } LCL = \text{mean} \pm (2 \times \text{standard deviation})$$

$$UAL \text{ and } LAL = \text{mean} \pm (3 \times \text{standard deviation})$$

매회 시료 분석 시 QC 시료를 함께 분석하여 분석 결과가 QC chart의 관리선 수준으로 진행되는지 확인하였다. 분석값이 조치선 범위를 벗어나는 경우, 실험 조건 및 환경을 점검하고 QC 시료의 분석값이 관리 범위 내에 들어오는 것을 확인한 이후 시료 분석을 재진행하였다.

통계 분석

통계 분석은 SPSS 프로그램(Statistics Package for the Social Science, ver. 22.0 for Window, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하여 평균과 표준편차를 산출하였으며, 시료 간의 유의적인 차이를 알아보기 위해 일원배치분산분석(one-way ANOVA), 시료와 지역 간의 차이를 알아보기 위해 이원배치분산분석(two-way ANOVA)을 실시하였다. 사후검정은 Duncan's multiple range test를 95%의 신뢰수준에서 실시하였다.

결과 및 고찰**비타민 B₁₂ 분석법의 검출한계, 정량한계, 직선성 및 특이성 검증**

Immunoaffinity-HPLC를 이용한 비타민 B₁₂ 분석의 LOD, LOQ 및 직선성을 분석한 결과는 Table 2와 같다. LOD와 LOQ는 각각 0.003 µg/100 g과 0.009 µg/100 g으로 나타났다. Immunoaffinity/HPLC 분석법을 이용한 Yoon 등(2019)은 비타민 B₁₂ 분석 시 LOD 및 LOQ는 각각 0.0003 mg/kg(0.03 µg/100 g)과 0.0008 mg/kg(0.08 µg/100 g)으로 보고하였으며, immunoaffinity-HPLC/DAD assay를 사

Table 2. Linearity, LOD, and LOQ of vitamin B₁₂ analysis¹⁾

Parameters	
LOD (µg/100 g)	0.003
LOQ (µg/100 g)	0.009
Linear equation (y = ax+b)	y = 2,021.4x+0.3815
Correlation of linearity (R ²)	0.9999

¹⁾LOD: limit of detection, LOQ: limit of quantification.

Fig. 1. HPLC chromatograms of cyanocobalamin at 361 nm (A: standard (0.01 µg/mL) and B: soy sauce sample) and PDA spectrums (C: standard and sample) at 200~600 nm.

용하여 동물성 식품의 비타민 B₁₂를 분석한 Jeong 등(2020)의 연구는 LOD와 LOQ를 각각 0.008 µg/100 g과 0.026 µg/100 g이었다고 보고하였다. 이에 비하여 본 연구에서 적용한 immunoaffinity-HPLC 분석법의 LOD와 LOQ는 약 3~10배 이상 낮게 나타나 분석 민감도(sensitivity)가 높은 것으로 확인되었다. 따라서 본 연구에서 적용하는 분석법은 식품 중 미량으로 존재하는 수준의 비타민 B₁₂ 정량 분석에 적합할 것으로 보인다. Immunoaffinity-HPLC를 이용한 비타민 B₁₂ 분석의 직선성은 cyanocobalamin 용액을 6개 수준(0.004~0.200 µg/mL)으로 제조하여 분석한 결과 cyanocobalamin 농도(x)와 HPLC peak area(y)는 $y=2021.4x + 0.3815$ 의 관계식을 보였으며, 상관계수 $R^2=0.9999$ 를 보여 분석의 직선성(linearity)이 우수한 것으로 나타났다. 분석법의 특이성(specificity)은 비타민 B₁₂ 표준용액과 시료의 chromatogram의 retention time을 확인한 결과 29.5분으로 일치하였으며, 200~600 nm 범위에서 얻어진 DAD spectrum을 겹쳐보았을 때 흡광 패턴이 일치하는 것으로 나타나 분석의 특이성이 우수함을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

비타민 B₁₂ 분석법의 정밀성과 정확성 검증

비타민 B₁₂에 대한 immunoaffinity-HPLC 분석법의 정밀성은 반복성(repeatability, RSD_r)과 재현성(reproducibility, RSD_R)으로 평가한 결과 결과값의 coefficient variation(CV)이 RSD_r은 2.2%, RSD_R은 4.1%를 나타내었다

(Table 3). AOAC guideline(2002)에서 제시하는 분석법의 정밀성에 대한 수용범위는 시료 중 분석하고자 하는 성분의 농도가 1 µg/100 g 수준인 경우 RSD_r과 RSD_R의 CV값이 각각 8%와 16% 이하이다. 이에 대하여 본 연구의 비타민 B₁₂ 분석법의 정밀성 CV값은 모두 AOAC guideline이 정한 범위 이하 수준으로 정밀성이 우수함을 확인할 수 있다. 한편, 비타민 B₁₂ 분석법의 정확성은 SRM 1549a, SRM 1869 및 BCR-487를 분석하여 참고값과 분석값을 비교 검증한 결과는 Table 4와 같다. SRM 1549a의 분석값은 3.01 µg/100 g, SRM 1869는 4.77 µg/100 g, BCR-487은 104.75 µg/100 g을 나타냈으며, 참고값에 비교하여 각각 회수율 94.1%, 109.73% 및 93.5%를 얻었다. AOAC guideline

Table 3. Precision of vitamin B₁₂ analysis

Analytes	Repeatability ¹⁾ (µg/100 g)		Reproducibility ²⁾ (µg/100 g)	
	Mean±SD ³⁾	CV ⁴⁾ (%)	Mean±SD	CV (%)
Vitamin B ₁₂	5.67±0.12	2.2	5.58±0.23	4.1

¹⁾Repeatability refers to the results of independent 5 determinations in triplicates obtained by analyzing a sample five times on the same day.

²⁾Reproducibility refers to the results of independent 5 determinations in triplicates obtained by analyzing a sample five times on different days.

³⁾Standard deviation.

⁴⁾Coefficient variation.

Table 4. Accuracy of vitamin B₁₂ analysis

Samples	Reference value ⁴⁾ (μg/100 g)	Analysis value ⁵⁾ (μg/100 g)	Recovery ⁶⁾ (%)
Mean±SD			
SRM 1549a ¹⁾	3.20±0.20	3.01±0.10	94.1
SRM 1869 ²⁾	4.35±0.65	4.77±0.39	109.73
BCR-487 ³⁾	112.00±9.00	104.75±3.56	93.5

¹⁾SRM 1549a: Standard Reference Material, whole milk powder.

²⁾SRM 1869: Standard Reference Material, Infant/Adult Nutritional Formula II (milk/whey/soy based).

³⁾BCR-487: The community bureau of reference, pig liver.

⁴⁾The reference values for the cyanocobalamin content in SRM 1549a, SRM 1869, and BCR 487 provided by NIST and IRMM respectively.

⁵⁾The analytical value obtained in this study.

⁶⁾Recovery (%)=(analysis value/ reference value)×100.

(2002)에서 제시하는 정확성 수용범위는 분석 농도 1 μg/100 g 기준에서 70~125%, 100 μg/100 g 기준에서는 75~120%이다. 본 연구에서의 회수율 분석값 모두 이러한 수용범위를 충족하고 있어 분석법의 정확성이 우수함을 확인하였다. 비타민 B₁₂의 정밀성 분석을 나타낸 연구에선 정밀성의 반복성과 재현성의 수용범위가 각각 4.38%와 2.89%를 나타내고 있으며(Kwon 등, 2020), 또 다른 연구에선 2.99%와 4.03%를 나타내었다(Jeon과 Kim, 2020). 정확성 분석을 위해 SRM 1849a(infant/adult nutritional formula)를 분석한 Jeon과 Kim(2020)의 연구는 분석법의 정확성이 91.8%를 충족하였다고 보고하였으며, 같은 sample을 분석한 다른 연구에서는 119.7%의 회수율을 나타냈다(Kim과 Kim, 2020). 본 연구에서 활용한 분석법의 정밀성과 정확성을 비교하였을 때 우수한 결과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

전통 장류의 지역별 비타민 B₁₂ 분포

본 연구에서 검증된 분석법을 적용하여 국내 7개 지역에서 전통 방식으로 제조된 장류(된장, 고추장 및 간장)의 지역별 비타민 B₁₂ 수분을 분석하였으며, 이들 분포의 차이를 one way ANOVA로 분석한 결과는 Table 5와 같다. Table 5의 국내 7개 행정구역명은 실명이 아닌 알파벳으로 표기하였으며, 시료는 각 지역을 대표할 수 있도록 지역별 그리고 발효 제품별로 4개씩 수거한 후 동량씩 혼합 및 균질화시킨 composite sample로 제조하여 분석하였다. 본 연구에서 적용한 분석법의 LOD와 LOQ는 각각 0.003 μg/100 g과 0.009 μg/100 g으로 검증되어(Table 2) Table 5에 제시된 발효대두식품의 비타민 B₁₂ 함량(0.02~0.80 μg/100 g) 분석은 모두 신뢰성 있는 정량 분석이 가능한 것으로 확인되었다. 지역별로 수거된 전통발효 장류의 비타민 B₁₂를 분석한 결과, 모든 지역의 장류에서 비타민 B₁₂가 검출되었으며, 비타민 B₁₂ 함량 분포는 된장의 경우 0.04~0.50 μg/100 g, 고추장 0.03~0.15 μg/100 g, 그리고 간장 0.02~0.80 μg/

Table 5. Vitamin B₁₂ contents of traditionally fermented soyfood in Korea

Fermented soyfood	Regions	Vitamin B ₁₂ (μg/100 g) ¹⁾
Doenjang	A	0.50±0.02 ^{aB}
	B	0.13±0.02 ^{cA}
	C	0.07±0.01 ^{eA}
	D	0.08±0.01 ^{dB}
	E	0.29±0.01 ^{bB}
	F	0.04±0.01 ^{fC}
	G	0.08±0.01 ^{deA}
Range (total mean)		0.04~0.50 (0.17±0.16)
Kochujang	A	0.11±0.00 ^{bC}
	B	0.03±0.00 ^{fC}
	C	0.06±0.00 ^{eB}
	D	0.15±0.01 ^{aA}
	E	0.09±0.00 ^{dC}
	F	0.10±0.00 ^{cB}
	G	0.03±0.00 ^{fC}
Range (total mean)		0.03~0.15 (0.08±0.04)
Soy sauce	A	0.79±0.01 ^{aA}
	B	0.07±0.01 ^{dB}
	C	0.02±0.00 ^{eC}
	D	0.14±0.00 ^{bA}
	E	0.80±0.01 ^{aA}
	F	0.12±0.00 ^{cA}
	G	0.07±0.00 ^{dB}
Range (total mean)		0.02~0.80 (0.29±0.33)

¹⁾Mean±SD. Means with different superscript small (a-f) and capital (A-C) letters are significantly different among the same type of soyfood and the same region, respectively at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

100 g의 범위를 나타내었다. 지역별로 제조된 대두 발효 제품 중에서는 간장이 최고와 최저 함량 간의 차이가 0.78 μg/100 g으로 가장 넓은 분포를 나타내 지역별로 제조되는 방식에 따라 비타민 B₁₂ 함량 차이가 크게 나타나는 것으로 확인되었다. 전체적으로 7개 지역의 비타민 B₁₂ 함량의 평균값을 비교해 보면 간장(0.29 μg/100 g)이 유의적으로 가장 높게 나타났으며 그다음으로 된장(0.17 μg/100 g), 고추장(0.08 μg/100 g)의 순서였다.

한편, Fig. 2는 국내 7개 지역에서 재래식으로 제조된 된장, 간장 및 고추장의 비타민 B₁₂ 함량 분포가 지역별로 다르게 나타남을 보여준다. 일부 지역에서 제조된 세 종류의 대두 발효 제품의 비타민 B₁₂ 함량 범위가 다른 지역에 비하여 큰 차이를 나타낸 반면, 이외 다른 지역에서 수거된 대두 발효 제품은 제품 간 비타민 B₁₂ 함량 차이가 약 0.1 μg/100 g 이하로 큰 차이가 없음을 보여주었다. 특히, 일부 지역에서 간장이 된장과 고추장에 비하여 두드러지게 높은 함량을 보였는데(Fig. 2), 이는 발효가 된장에 비해 간장이 발효 기간이 길어 미생물의 작용이 오랜 기간 이루어지는 과정에서 비타민 B₁₂ 합성량이 높아진 것으로 보인다. 이에 반해 고추장의 비타민 B₁₂ 함량은 지역 간의 차이가 두드러지지 않는 것으로 확인되었다. 분석된 전통 장류의 종류(된장, 간장 및

Fig. 2. Regional variations of the vitamin B₁₂ content in Korea traditional fermented soyfood.

Table 6. Two-way ANOVA F-values of the vitamin B₁₂ contents in traditionally fermented soyfood in Korea

	Region	Type of food	Region×Type of food
F-value	8,464.437***	6,983.822***	2,836.467***

*** $P < 0.001$.

고추장)와 제조 지역의 비타민 B₁₂ 함량에서의 유의적 차이, 이들 간의 상관성을 분석하기 위해 이원분산분석(two-way ANOVA)을 실시한 결과(Table 6), 지역별, 장류별, 지역×장류 모두 통계적으로 유의적인 차이가 있음을 확인할 수 있었다($P < 0.05$).

국내외 연구 보고에서도 비타민 B₁₂가 존재하지 않는 식물성 원료를 발효시키는 경우, 미생물에 의한 비타민 B₁₂ 합성이 유발되어 발효된 식품에서 주로 동물성 식품에서 존재하는 비타민 B₁₂가 검출되는 것을 확인할 수 있다. Kawk 등(2008)은 전통식 된장이 공장식 된장보다 비타민 B₁₂ 함량이 훨씬 높았고, 전통식 고추장의 경우 전통식 된장보다 비타민 B₁₂ 함량이 낮다고 보고하여 본 연구 결과와 유사한 것으로 나타났다. Liem 등(1977)은 인도네시아의 콩 발효

식품인 템페(tempeh)와 온쭈(ontjom)에서도 다량의 비타민 B₁₂가 검출되었고, 발효 중 생성되는 미생물이 비타민 B₁₂의 공급원이라 보고하였다. 또한, Keuth와 Bisping(1994)은 템페 발효 중 분리된 *Citrobacter freundii*와 *Klebsiella pneumoniae* 균주에 의해 비타민 B₁₂가 형성되었다고 보고하였으며, 발효 온도 감소 시 비타민 B₁₂ 생성 또한 감소하였다고 하였다. Mohammed 등(2014)은 비타민 B₁₂의 합성이 가능한 박테리아는 제한적이며, 그중 *Bacillus megaterium*은 비타민 B₁₂를 합성할 수 있는 박테리아 중 하나라고 보고하였다. 한편, Ryu와 Kwon(2012)은 오디의 추출공정에 따른 비타민 함량을 분석했을 때 쪄산발효 시 비타민 B₁₂가 증가하였다고 보고하여, 식물성 원료를 쪄산발효 시켰을 때 비타민 B₁₂ 합성이 가능함을 보여주었다.

국내성인 남녀 기준 비타민 B₁₂ 권장섭취량으로 하루 2.4 µg(MHW와 KNS, 2020)이 요구된다. 국내 발효 장류의 비타민 B₁₂ 함량 수준을 살펴볼 때, 일일 섭취량에 비해서는 낮은 수준을 나타내고 있으나, 한국 식단에서 자주 섭취되는 찜, 국, 찌개 등을 조리 시 조미료의 목적으로 대부분의 메뉴에 장류가 사용되기 때문에 매일의 식단에서 장류로 인해 지속적으로 상당 수준의 비타민 B₁₂를 섭취할 수 있을 것으로 보인다.

분석품질관리

시료의 비타민 B₁₂ 분석과 함께 분석품질관리 시료를 함께 분석하여 비타민 B₁₂ QC chart를 작성한 결과는 Fig. 3과 같다. QC chart의 기준 평균값은 5.66 µg/100 g이었으며, 관리상한선(UCL)과 관리하한선(LCL)은 각각 5.98 µg/100 g와 5.27 µg/100 g, 조치상한선(UAL)과 조치하한선(LAL)은 각각 6.15 µg/100 g와 5.09 µg/100 g로 설정하여 관리하였다. 본 연구에서 수행된 QC 시료 분석값은 QC chart 관리 범위에 모두 들어오는 것이 확인되어, 본 연구에서 분석된 시료의 비타민 B₁₂ 분석이 신뢰도가 확보된 관리 수준으로 진행되었음을 확인하였다. 이는 본 연구의 분석 결과값이 국내 지역별 대두발효제품에 대한 비타민 B₁₂ 데이터베

Fig. 3. A quality control chart of vitamin B₁₂ analysis.

이스를 구축하는 데 활용될 수 있는 신뢰도 높은 자료라 할 수 있겠다.

요 약

본 연구에서는 국내 지역별로 제조된 한국 전통 장류인 된장, 간장 및 고추장을 지역별로 수거하여 비타민 B₁₂ 함량을 분석하고 시료 간 차이를 지역별 및 제품별로 비교 분석하였다. 또한, 데이터의 신뢰성 확보를 위해 비타민 B₁₂ 분석에 사용된 immunoaffinity-HPLC법을 검증하고 모든 분석에 대한 분석품질관리를 실시하였다. 분석법 검증은 LOD, LOQ, 직선성, 특이성, 정밀성 및 정확성을 평가하여 검증하였으며, 모든 지표에서 국제 가이드라인에서 제시하고 있는 수용 범위에 적합한 값을 얻어 분석법의 적합성을 확인하였다. 지역별 전통 장류의 비타민 B₁₂ 분석 결과, 된장 0.04~0.50 µg/100 g, 고추장 0.03~0.15 µg/100 g, 간장 0.02~0.80 µg/100 g의 범위를 나타내어 발효기간이 가장 긴 간장이 지역별 가장 넓은 비타민 B₁₂ 분포 범위를 나타냈다. 일부 지역은 발효 제품 간 비타민 B₁₂ 함량 분포가 넓게 나타났다. 본 연구 결과는 분석법 검증과 분석품질관리를 수행하여 국내 전통 장류의 비타민 B₁₂에 대한 신뢰성이 확보된 분석 결과를 얻을 수 있었다. 비타민 B₁₂는 발효 미생물에 의해 합성되는 수용성 비타민으로 지역별 제조 방법에 따른 차이가 최종 제품의 비타민 B₁₂ 함량에 유의적으로 영향을 미치는 것으로 보이며, 간장, 된장 및 고추장과 같은 발효제품의 특성에 따라서도 유의적인 차이를 나타내는 것으로 확인되었다. 총 21종의 장류에 대한 비타민 B₁₂의 분석 결과는 농진청에서 발간하는 국가표준식품성분표 개정을 위한 데이터로 활용될 수 있으며, 향후 국내 장류의 유용성분 증진 및 산업화를 위한 기초 데이터로도 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2020-2021년도 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ01339805)의 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- AOAC. AOAC guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals. Association of Official Analytical Chemists International, Gaithersburg, MD, USA. 2002. p 2, 12-13, 22, 25.
- He K, Merchant A, Rimm EB, Rosner BA, Stampfer MJ, Willett WC, et al. Folate, vitamin B₆, and vitamin B₁₂ intakes in relation to risk of stroke among men. *Stroke*. 2004. 35:169-174.
- Hunt A, Harrington D, Robinson S. Vitamin B₁₂ deficiency. *BMJ*. 2014. 349:g5226. <https://doi.org/10.1136/bmj.g5226>
- Jeon A, Kim Y. Analysis of water-soluble vitamins contents on commercial seasonings and sauces. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2020. 49:335-343.
- Jeong YN, Park SJ, Lee SH, Choi Y, Choi KS, Chun J. Analysis and verification of vitamin B₁₂ in animal foods for update of national standard food composition table. *Korean J Food Sci Technol*. 2020. 52:317-324.
- Jung KO, Park SY, Park KY. Longer aging time increase the anticancer and antimetastatic properties of *doenjang*. *Nutrition*. 2006. 22:539-545.
- Keuth S, Bisping B. Vitamin B₁₂ production by *Citrobacter freundii* or *Klebsiella pneumoniae* during tempeh fermentation and proof of enterotoxin absence by PCR. *Appl Environ Microbiol*. 1994. 60:1495-1499.
- Kim DH, Song HP, Kim KY, Kim JO, Byun MW. A correlation between fibrinolytic activity and microflora in Korean fermented soybean products. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2004. 33:41-46.
- Kim N, Kim Y. Water-soluble vitamins contents in seafood-based dishes. *Korean J Food Nutr*. 2020. 33:390-398.
- Kim SJ, Jung KO. *In vitro* anticancer effect of kochujang (Korean red pepper soybean paste) and its ingredients in AGS human gastric cancer cells. *J Korean Assoc Cancer Prev*. 2004. 9:42-48.
- Kwak CS, Hwang JY, Watanabe F, Park SC. Vitamin B₁₂ contents in some Korean fermented foods and edible seaweeds. *Korean J Nutr*. 2008. 41:439-477.
- Kwon J, Jeon A, Kim Y. Contents of water-soluble vitamins in commercial home meal replacement. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2020. 49:1077-1085.
- Kwon SH, Shon MY. Antioxidant and anticarcinogenic effects of traditional doenjang during maturation periods. *Korean J Food Preserv*. 2004. 11:461-467.
- Liem ITH, Steinkraus KH, Cronk TC. Production of vitamin B-12 in tempeh, a fermented soybean food. *Appl Environ Microbiol*. 1977. 34:773-776.
- Martens JH, Barg H, Warren MJ, Jahn D. Microbial production of vitamin B₁₂. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2002. 58:275-285.
- Ministry of Health and Welfare, The Korean Nutrition Society. 2020 Dietary Reference Intakes for Koreans: Vitamins. Sejong, Korea. 2020. p 302.
- Mohammed Y, Lee B, Kang Z, Du G. Development of a two-step cultivation strategy for the production of vitamin B₁₂ by *Bacillus megaterium*. *Microb Cell Fact*. 2014. 13:102. <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0102-7>
- Oh R, Brown DL. Vitamin B₁₂ deficiency. *Am Fam Physician*. 2003. 67:979-986.
- Park KY. Increased health functionality of fermented foods. *Food Industry and Nutrition*. 2012. 17:1-8.
- Ryu IH, Kwon TO. Sensory characteristics of granular tea and the components of mulberry fruit extracts by different extraction process. *Korean J Med Crop Sci*. 2012. 20:331-338.
- Setola E, Monti LD, Galluccio E, Palloschi A, Fragasso G, Paroni R, et al. Insulin resistance and endothelial function are improved after folate and vitamin B₁₂ therapy in patients with metabolic syndrome: relationship between homocysteine levels and hyperinsulinemia. *Eur J Endocrinol*. 2004. 151:483-489.
- Shin D, Jeong D. Korean traditional fermented soybean products: *Jang*. *J Ethic Foods*. 2015. 2:2-7.
- Watanabe F. Vitamin B₁₂ sources and bioavailability. *Exp Biol Med*. 2007. 232:1266-1274.
- Yang HJ, Kim MJ, Hong SP. Anti-diabetic effect of *Ganjang* and *Doengang* in different aging periods. *Korean J Food Preserv*. 2019. 26:300-307.
- Yoon J, Chung H, Kim Y. Analysis of selected water-soluble vitamin B₁, B₂, B₃, and B₁₂ contents in namul (wild greens) consumed in Korea. *Korean J Food Nutr*. 2019. 32:61-68.