

된장 숙성 중 정미 성분의 변화에 관한 연구(III)

김미정 · 이해수

전 서울대학교 식품영양학과

Studies on the Changes of Taste Compounds during Soy Paste Fermentation (III)

Mee Jeong Kim and Hei Soo Rhee

Department of Food and Nutrition, Seoul National University

Abstract

For the purpose of supplying the information to improve the acceptability of soy paste as the condiment, the changes of peptide were determined. The results were as follows; Average peptide length were decreased. It was 102 at 0 day, 15 at 10 day and 4.1 at 180 day. Peptide fraction were the same as in 60 day and 180 day. Low molecular weight peptide were not changed greatly during fermentation. Peptide identified in 180 day fermentation were Ala-Ser, Gly-Glu, Glu-Ser, Asp-Glu, Asp-Tyr, Asp-Ala-Ser, Ala-Ser-Glu, Glu-Ser-Ala, and Ala-Lys-Met. In the characteristics of bitter peptide in 180 day fermentation, soy paste itself didn't show bitter taste', solvent extraction fraction 1' showed bitter taste. After gel chromatography, fraction I, fraction II and fraction III were obtained and fraction II were bitter peptide of low molecular weight. After gel chromatography', solvent extraction fraction 2'(water extraction) were divided into fraction IV, V, VI, VII and VIII. Fraction IV, V and VI showed bitter taste. Amino acids composition of the fractions showing bitter taste were like that; fr. I: Glu-(Asp, Pro, Val, Ile or Leu)-Met fr. II: Pro-(Glu, Val, Phe)-Ile or Leu fr. IV: Glu-(Asp, Ala, Tyr, Leu of Ile)-Phe fr. V: Ala-(Met, Glu, Pro)-Ile or Leu fr. VI: Asp-(Phe, Ser, Gly)-Val

I. 서 론

콩 고오지 제조중에 일어나는 콩단백질과 펩타이드의 동향을 보면 불용성 단백질 질소 및 펩타이드 질소는 균사발생시부터 전자는 감소되고 후자는 급격히 증가되다가 포자발생시는 한계로 속도가 완화된다고¹⁾ 펩타이드는 균사발생시기와 포자발생의 두 단계로 소멸되던가 생성되며 생성 펩타이드는 aspartic acid, glutamic acid, alanine을 함유 하였다고²⁾ di-,tri-펩타이드는 Gly-Glu, Ala-Ser, Glu-Ser-Ala 등이 있었다³⁾.

증자한 대두에 납두균을 접종시킨 뒤의 변화를 보면, 발효 50시간에 단백질의 가수분해가 현저하여 펩타이드, 아미노산, 암모니아태 질소가 8~45%로 감소하였고 발효 30시간 이후에는 단백질의 분해가 미약하게 일어나면서 비교적 큰 분자의 펩타이드 분해가 주로 일어나 저급 펩타이드 및 아미노산의 생성이 많았다⁴⁾.

대두는 그 자체로 여러가지 antinutritional factor를 가지고 있고 콩비린내로 인해 소비에 제한을 주고 있으므로 이런 점을 제거시킨 보관방법으로서 간장, 된장이 이용되어 왔는데 된장의 수용도에 영향을 미치는 쓴맛 펩타이드의 경우 시료자체는 쓴맛을 나타내지 않으나 용매로 추출된 소수성 펩타이드 분획은 강한 쓴맛을 나타내었다. 된장자체, 용매추출분획, 겔 크로마토그래피 분획I, II, III의 평균 소수도는 1229, 1654, 1900, 2016,

998 cal/mole이었고 쓴맛 펩타이드에서 중요한 아미노산은 Leucine, phenylalanine, proline, valine으로 나타났다⁵⁾. 따라서 본 논문에서는 된장의 맛성분으로 중요한 역할을 하는 peptide의 변화를 된장의 숙성에 따라 비교해 보고 쓴맛 peptide의 특성을 살펴보고자 하였다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 실험재료

시료는 전보⁶⁾와 같은 방법으로 준비하였다.

2. 실험방법

(1) 저분자 펩타이드

1) 펩타이드 분리

시료 20 g에 증류수 20 ml을 가하여 진탕, 원심분리시킨 뒤 3 ml을 취해 전처리한 Dowex-50×12(200~400 mesh)으로 채운 column을 0.5 ml/min 속도로 통과시켰다. 10 ml/증류수를 두번으로 나눠 세척하여 이 세척액을 통과액과 합하였다(A). 다음 55% 알코올에 녹인 0.8 N HCl을 10 ml씩 네번 통과시켜 이것을 (B)펩타이드화합물이라 보고 분리 수거하여 HPLC용 시료로 분석하였다. 펩타이드의 분리를 위한 HPLC의 분석조건은 Table 1와 같다.

2) 펩타이드의 구성 아미노산

Table 1. Conditions of High Performance Liquid Chromatograph for Peptides

1. InStrument	Water HPLC
2. Column	u-Bondapack C ₁₈
3. Eluent	0.1% TFA solvent
4. Flow Rate	1 ml/min
5. Detection	UV 254 nm
6. Prefilter	0.45 nm filter paper

저분자 펩타이드로 보이는 수거물(B)를 HPLC로 분리하여 펩타이드 분자 각 피크들을 fraction 별로 수거하였는데 필요한 경우 다시 HPLC로 하나의 펩타이드 분자임을 확인한 뒤 분획한 각 펩타이드는 김¹⁻³⁾의 방법에 따라 다음과 같이 아미노산으로 가수분해 하였다. 자료분석은 표준물질 아미노산의 전개로 같은 Rf치에 해당하는 아미노산을 동일 물질로 보고 행하였다.

3) N-말단 결정

김^{3,4)}이 사용한 방법에 따라 행하였다.

4) C-말단결정

Braun⁷⁾과 김³⁾이 사용한 방법에 따라 행하였다.

(2) 쓴맛 펩타이드

1) 쓴맛 펩타이드 '용매추출분획의 추출'

쓴맛 펩타이드의 추출은 Harwalkar의 방법⁸⁾에 따라 행하였다. 즉, 1,000 ml 메스 실린더에 냉동한 시료 50 g을 넣고 chloroform-methanol 2 : 1(V/V)을 시료무게의 10 배 용량을 넣은 후 균질기로 5분간 증속으로 균질화하고 다시 고속으로 10분간 혼합한 다음 여과지(Whatman No. 42, 이하동일)와 부호너 깔대기를 사용하여 120 mmHg로 감압여과하였다. 남은 잔사에 chloroform-methanol 2 : 1 (V/V)을 최초 시료무게의 5배 용량을 넣은 후 추출을 2회 더하여 먼저 여액을 합했다. 추출여액은 진공농축기로 60℃ 이하에서 감압건조 시킨 후 최초 시료무게의 25배 용량의 chloroform-methanol-water(8 : 4 : 3(V/V/V))로 분액여두에 옮기고, 5분간 세게 흔든 후 콕크를 단단히 하여 하루밤 정지하였다. 이중 계면과 상층을 정지여과하였으며 상층조성인 chloroform-methanol-water(3 : 48 : 47(V/V/V)) 30 ml를 사용하여 분액여두를 세척여과하여 합하였다. 이를 다시 감압건조한 후 증류수 일정부피에 용해한 다음 4℃에서 16,500xg로 5분간 원심분리하여 상등액을 투석하여 분자량이 1200 이하의 물질과 2000 이상의 물질을 분리하였다. 분자량이 1200 이하의 물질을 '용매 추출분획1'이라 칭하였다.

2) 겔 크로마토그래피에 의한 펩타이드의 분리

겔 크로마토그래피의 겔로는 sephadex G-15-120을, 용출 용매로는 물을 사용하였고, 용출 분획중 펩타이드의 양은 280 nm에서의 흡광도를 측정함으로써 분석하였다. 용출분획의 펩타이드들의 확인을 위해 BuOH : HAC : H₂O=4 : 1 : 1(v/v/v)의 전개용매를 사용하여 Whatman filter paper No.1에서 광을 차단시키고 전개하였다. 발색은 1% starch-iodine reagent를 사용하여 black-blue를

나타내는 부분을 확인하였다.

다음에 chloroform-methanol에 불용성인 잔사를 10분 건조시킨 후 시료의 3배의 물을 가하여 교반 추출하고 그 추출액을 투석(Dialysis tubing, Benzoylated, SIGMA)하여 분자량이 1200 이하의 물질과 2000 이상의 물질을 분리하였다. 분자량이 1200 이하의 물질을 '용매추출분획2'라 하였다.

2) Gel electrophoresis에 의한 펩타이드의 확인

펩타이드의 gel electrophoresis를 위한 시료제조는 다음과 같이 하였다¹⁰⁻¹¹⁾. Sample buffer를 만들기 위하여 Tris 0.25 M에 SDS(sodium dodecyl sulfate) 8%, 2-mercaptoethanol 10%, glycerol 20%를 100 ml로 만들어 pH를 6.8로 맞추었다. 여기에 시료를 1 : 1 비율로 가해 10분간 100℃에 방치하고 12000 rpm에서 5분간 원심분리시켰다. 이중에 상등액을 gel electrophoresis하였다.

Gel의 제조는 T : 13%, C : 2.4%로 pH 8.8을 맞추고 Laemmli method(1970년)을 사용하여 제조하였다. Electrophoresis는 120V로 일정하게 1시간 30분 전개시켰다. 발색에는 Coomassie brilliant blue R-250을 사용하였다.

4) 펩타이드의 아미노산 조성과 N-말단, C-말단 결정

용매 추출분획1 과 2를 겔 크로마토그래피한 것 중 쓴맛을 나타내는 펩타이드들은 회수하여 농축시킨 뒤, 구성 아미노산 결정에 사용하였다. 펩타이드의 구성 아미노산 결정은 앞의 방법과 같이 실시 하였는데, 산 가수분해시킨 아미노산은 Whatman filter paper No.1에서, BuOH : HAC : H₂O=4 : 1 : 1(v/v)로 1차원 전개하였다. 아미노산 중 트립토판의 확인을 위해 알칼리 가수분해를 행하였다. 5.5 N Ba(OH)₂용액으로 20시간 테프론 봉관한 플라스크에서 가수분해시킨 뒤 Ba이온을 2N 황산으로 침전시켜 2000 rpm으로 원심분리하여 제거하고 앞서와 같이 크로마토그래피하였다. 조성아미노산의 N-말단과 C-말단은 앞에서 사용했던 방법에 따라 결정하였다.

5) 관능검사

서울대학교 식품영양학과 대학원생 중 본 실험에 흥미를 가지고 있는 7명에게 앞에서의 방법으로 추출된 쓴맛 펩타이드 10가지(용매추출분획1, fr.I, fr.II, fr.III, 용매추출분획2, fr.IV, fr.V, fr.VI, fr.VII, fr.VIII)에 대하여 시료간에 쓴맛의 강도가 다른지와 쓴맛이 느껴지는 것과 느껴지지 않는 것을 구분케 하였다.

III. 결과 및 고찰

Table 2은 전기한 총질소 함량에서 아미노태 질소의 함량을 나누어 된장 숙성에 따른 펩타이드의 길이 변화를 나타내었다. 물에 담금한 경우에 펩타이드의 길이는 280을 넘고 된장담금 직후에, 숙성 0일째도 펩타이드의 길이는 100을 넘었으나 숙성이 진행되면서 단백질 분해 효소의 활성이 급격히 증가하면서 숙성 10일째는 평균 길이가 15로 감소되었다. 숙성이 계속되면서는 길이변화가 평균 1씩 줄어 들었고 60일에 4.9이었던 것이 180

Table 2. Average Peptide Length during Soy Paste Fermentation

Sample	SO	CO	0	10	20	30	45	60	180
Total N(mg/100 g)	3190	2160	2000	2070	2090	2100	2080	2080	2070
Animo N(mg/100 g)	11.2	11.2	19.6	134.3	263.3	319.6	376.6	426.6	506.6
A.P.L.	284.8	192.9	102.0	15.4	7.9	6.6	5.5	4.9	4.1

Table 3. Retention Time of Low M.W. Peptide Fraction in HPLC Chromatogram

Sample	Soak	Cook	0	10	20	30	45	60	180
R.T.	12.1	12.1	-	-	12.0	-	12.5	12.5	13.1
	13.3	13.3	13.2	13.2	12.9	13.7	13.1	13.1	13.5
	-	-	14.3	14.3	14.4	14.5	14.0	14.0	-
	-	-	-	-	15.4	-	15.4	15.4	15.4
	16.1	16.0	16.0	-	16.6	16.2	16.2	16.2	16.2
	16.9	-	-	17.8	17.8	17.5	17.5	17.7	-
	18	18	-	-	-	-	-	-	-
	18.9	18.9	18.9	18.9	18.5	18.9	18.6	18.6	19.8
	-	-	19.9	19.9	19.2	20	-	-	-
	21.7	21.7	20.9	20.9	21.4	21.3	20.9	20.9	21.9
	-	-	22.3	22.3	22.6	23.1	22.7	22.7	22.8
	-	-	22.9	22.9	-	-	-	-	-
	27.4	27.4	24	24	24.3	29.4	29.2	29.2	29.4
	32.3	32.3	-	-	30.6	-	-	-	-
	39	39	37.5	37.5	40.6	41.5	41.5	41.5	41.5

Table 4. Amino Acid Sequence of Peptide Fraction in 180 day Fermentation

Peptide Fraction (R.T.)	Amino Acid	Sequence
13.1	Ala,Ser	Ala-Ser
13.5	Gly,Glu	Gly-Glu
15.4	Glu,Ser	Glu-Ser
16.2	Asp,Glu	Asp-Glu
17.7	Asp,Tyr	Asp-Tyr
19.8	Asp,Ala,Ser	Asp-Ala-Ser
21.9	Ala,Ser,Glu	Ala-Ser-Glu
22.8	Ala,Ser,Glu	Glu-Ser-Ala
29.4	Ala,Lys,Met	Ala-Lys-Met

Table 5. Amino acid composition of bitter peptide

Fr. I	Glu-(Asp,Pro,Val,Ile or Leu)-Met
Fr. II	Pro-(Glu,Val,Phe)-Ile or Leu
Fr. IV	Glu-(Asp,Ala,Tyr,Leu or Ile)-Phe
Fr. V	Ala-(Met,Glu,Pro)-Ile or Leu
Fr. VI	Asp-(Phe,Ser,Gly)-Val

일에는 4.1로 시간경과에 비해 펩타이드의 평균길이는 크게 변화하지 않았는데 이것은 같은 기간에 단백질 분해효소의 활성도의 변화 양상과 비슷하였다.

Table 3은 숙성별로 펩타이드가 HPLC에서 나타나고 있는 양상을 retention time과 함께 제시하였다. HPLC에서 나타난 각 피크중에 11분 이하의 것은 paper chromatography결과 아미노산으로 판정되므로 12분대 이상의 것만을 펩타이드들로 보았고 숙성에 따른 저분자량의 펩타이드들의 변화가 뚜렷하지 않은 것으로 나타났다. 따라서 비슷한 retention time을 보여주어 숙성이 어느 정도 진행된 60일과 완전히 숙성된 것으로 여겨지는 180일째의 시료만을 택하여 HPLC를 통과한 분획을 회수하였다. 60일과 180일 숙성 시료에서 반복되는 분획이

대부분이고 이전의 숙성시료들도 저분자량의 펩타이드들은 큰 변화없이 나타나고 있었기 때문에 펩타이드의 아미노산 조성을 유추하기가 용이하였다.

분획을 회수하여 얻은 각 펩타이드들은 오염도를 알아보기 위하여 다시 HPLC에 주입시킨 뒤 순도를 살펴 각 펩타이드의 단일 피크를 얻고자 하였고 회수된 것은 전기의 방법으로 가수분해시킨 뒤 paper chromatography를 올려 아미노산 조성을 살펴 본 결과와 N,C-말단 결정으로 얻어진 결과는 다음과 같다(Table 4).

혼도등¹²⁾은 미소숙성중에서 숙성 초기단계에서 펩타이드의 변화는 다르지만 35일 이후에는 뚜렷한 변화가 없었고 숙성 마지막 단계에서 총 질소의 10% 이하의 펩타이드를 가지고 있다고 하였다. 쓴맛 펩타이드를 추출하기 위해서 시료로부터의 추출용매로 chloroform-methanol 2 : 1(v/v)을 사용하고 추출액을 감압건조하여 완전히 증발시킨 후에 일정비율로 혼합한 chloroform-methanol-물을 가함으로써 재현성을 높일 수 있었다. 용매추출 분획1에 포함된 펩타이드를 분자량 별로 나누기 위해 Sephadex G-15 크로마토그래피를 실시한 결과

겔 column의 void volume은 45 ml이었다. 이 실험에서 대략 3개의 피크를 얻어 이를 각각 fr I, II, III이라 구분하였다.

Fr. III은 tyrosine과 tryptophane 혼합용액의 elution volume과 같게 나타나 유리아미노산이라 보았다. 이 중에 fr. I과 fr. II에서 쓴맛을 나타내었기에 이 부분을 산 가수분해 시킨 뒤 paper chromatography로 분리하여 이 펩타이드의 구성 아미노산을 얻어 Table 5에 제시한다. Chloroform-methanol 불용성 잔사를 물에 녹여 투석시킴으로써 분자량 1200 이하의 펩타이드를 얻어 이것을 '용매추출 분획2'라고 하였고 나머지를 '용매추출 분획3'이라 하였다. 이중에 분획2가 쓴맛을 나타내었기에 여기에 포함된 펩타이드를 분자량별로 분리하기 위해 겔크로마토그래피한 결과는 대략 5개의 피크가 나왔는데 각각 fr. IV, fr.V, fr.VI, fr.VII, fr.VIII이라고 하였다. 얻어진 분획들 중에 쓴맛을 나타내는 분획들은 농축시켜 paper chromatography로 펩타이드를 확인하였다. paper chromatogram 상에 blue black의 단일 띠로 나타난 fr. I,II,IV,V,VI 분획들을 gel electrophoresis 하였는데, 각 분획들은 농축을 지나치게 시킨 결과 농도가 굉장히 짙어 가는 띠로 나타나지 않고 굵고 짙은 띠로 나타났다. '용매추출 분획2' 중에서 fr. IV, V, VI이 쓴맛을 나타내었기에 이것을 가수분해시킨 뒤 아미노산 조성과 N-C-말단을 알아본 결과는 위의 Table 5과 같다.

추출된 시료 10개에 대해 관능검사를 실시한 결과 평가자들은 시료간에 쓴맛의 강도가 다르다고 판정하였는데 이것은 시료중의 펩타이드의 농도가 각기 다르기 때문이라고 생각된다. 그러나 정량적으로 평가할 수 없는 한계때문에 통계적으로 처리할 수 없었다.

Chloroform-methanol에 용출된 것 중 겔크로마토그래피 fr. III는 모든 평가자들이 쓴맛이 없다고 하였으며 물에 용출시킨 것 중 겔크로마토그래피 fr. VII, VIII도 평가자들 모두가 쓴맛이 없다고 하였다. Chloroform-methanol에 용출시킨 fr. II는 모든 평가자들이 가장 쓰다고 하였다. '용매추출 분획1'과 '용매추출 분획2'도 몹시 쓰다고 평가하였다. 평가자들 모두가 가장 쓰다고 평가했던 fr. II는 Table 5에서 보는 바와같이 펩타이드의 C-말단이 leucine 또는 isoleucine인 것으로 여겨졌는데 펩타이드의 C-말단이 leucine이면 쓴맛을 나타낸다는 보고¹³⁾와 일치하는 것으로 나타났다. Fr. V에도 같은 이론이 적용되어 쓴맛을 나타내리라 여겨진다.

IV. 요 약

된장의 맛성분에 크게 기여할 것으로 보이는 펩타이드의 분리를 통해 된장의 수용도를 높이는 자료를 제공하고자 개량식 제조 된장에서 펩타이드의 특성을 연구한 결과, 된장 숙성중에 단백질의 분해로 생성되는 peptide는 숙성에 따라 그 길이가 짧아져 A.P.L.(average peptide length)는 숙성 0일에 102에서 10일에는 15로

급격히 줄었고 20일에 7.9, 숙성 60일에는 4.9로, 180일에는 4.1로 나타났다. HPLC로 분리한 펩타이드는 숙성 60일과 180일 분획이 거의 비슷하여 저분자량의 펩타이드는 숙성에 따른 변화가 크지 않음을 알 수 있었고 확인된 저분자량의 펩타이드는 Gly-Glu, Ala-Ser, Glu-Ser, Asp-Tyr, Asp-Glu, Glu-Ser-Ala, Asp-Ala-Ser, Ala-Ser-Glu, Ala-Lys-Met이었다. 180일 숙성시킨 시료에서 쓴맛 펩타이드의 특성을 알아보기 위해 chloroform-methanol에 추출한 '용매추출 분획1'을 겔 크로마토그래피한 결과 세개의 피크로 나뉘어 졌는데 fraction I과 II는 쓴맛을 나타내었고 이들의 아미노산 조성은 각각 Glu-(Asp, Pro, Val, Ile or Leu)-Met와 Pro-(Glu, Val, Phe)-Ile or Leu인 것으로 나타났다. Chloroform-methanol 불용성인 잔사를 물에 녹인 뒤 분자량 1200 이하의 것을 투석시켜 얻은 '용매추출 분획2'는 겔크로마토그래피 결과 다섯개의 피크로 나뉘어 졌고 여기서 쓴맛을 내는 fraction IV, V, VI의 아미노산 조성은 각각 Glu-(Asp, Ala, Tyr, Leu or Ile)-Phe와 Ala-(Met, Glu, Ala, Pro)-Ile or Leu와 Asp-(Phe, Ser, Gly)-Val이었다.

참고문헌

1. 김재욱, 콩고오지 제조중의 peptide에 관한 연구, 제1보 콩고오지 제조중의 prptide의 소장, 농화학회지, 6: 79-87(1965).
2. 김재욱, 콩고오지 제조중의 peptide에 관한 연구, 제2보 콩고오지 제조중에 생성되는 저급 peptide의 구성 amino acid, 농화학회지, 6: 89-106(1965).
3. 김재욱, 콩고오지 제조중의 peptide에 관한 연구, 제3보 콩고오지 제조중의 생성되는 저급 peptide의 구조, 농화학회지, 6: 107-117(1965).
4. 김수영, 김재욱, 납두제조 중의 단백질, peptide 및 amino acid의 변화에 관한 연구, 농화학회지, 6: 11-20 (1967).
5. 김수호, 이형주, 치즈 및 된장에서의 쓴맛 펩타이드 특성, 한국 식품과학회지, 17(4): 276-281(1985).
6. 김미정, 이혜수, 된장숙성 중 정미성분의 변화에 관한 연구(I), 한국조리과학회지, 6(1): 1-8(1990).
7. Braun, V. and Schoeder, W.A., A reinvestigation of the hydrazinolytic procedure for the determination of C-terminal acids, *Arch. Biochem. Biophys.*, 118: 241-252 (1967).
8. Harwalkar, V.R. and Elliott, J.A., Isolation of bitter and astrigent fraction from cheddar cheese, *J. Dairy Sci.*, 54(1): 8-11(1970).
9. Harwalkar, V.R., Influence of hydrogen ion concentration on extractability and flavor of bitter and astrigent flavor components from cheddar cheese and cultured milk. *J. Dairy Sci.*, 55(6): 742-743(1971).
10. Hevia, P., Whitaker, J.R., and Olcott, J.S., Solubilization of a fish protein concentrate with proteolytic enzymes, *J. Agr. Food Chem.*, 24(2): 383-385(1976).
11. Hames, B.D. and Rickwood, D., Gel electrophoresis of proteins-a practical approach-, IRL press(1981).
12. Hondo Satoshi and Tsutomu Mochizuki, Studies on the degradation process of soybean protein during

- miso making, 일본 식품공업학회지, 15(9): 414-417 (1968).
13. Arai Soichi, The bitter flavor due to peptides or protein hydrolysates and its control by bitterness-masking with oligopeptides, 133-147(1983).