

된장의 쓴맛 펩타이드 특성

홍혜정 · 이혜수

서울대학교 식품영양학과

Characteristics of bitter peptides from Doenjang

Hye Jeong Hong and Hei-Soo Rhee

Department of Food and Nutrition, Seoul National University

Abstract

Conventional Doenjang, three kinds of Improved Doenjang(A; koji: soybean: salt=53: 100: 33, B; koji: soybean: salt=100: 100: 40, C; koji: soybean: salt=200: 100: 40) prepared with different ratio of koji and salt were made to study the changes in the general contents, characteristics bitter peptides, correlations between bitterness and overall eating quality. 1. Total nitrogen contents increased a little, and amino nitrogen contents in all samples increase markedly. Especially, Amino nitrogen contents of conventional Doenjang increased more than others. Reducing sugars of doenjang prepared with *Asp. oryzae* were higher than conventional Doenjang and increased throughout the aging period and Doenjang prepared with *Asp. oryzae* were more acidic. 2. To characterize bitter peptides in fermented Doenjang, peptides were extracted with 2: 1(v/v) chloroform-methanol and separated by Gel chromatography with Sephadex and TLC. After Gel chromatography and TLC, each fraction examined presence of bitterness and evaluated intensity of bitterness. Amino acid composition of the fractions showing bitter tastes were as follows. Conv. peak 1-1 Trp-(Asp, Arg, Thr, Ser, Glu, Pro)-Phe Imp. A peak 1 Trp-(Glu, Val, Arg, Ile)-Phe Imp. B peak 1 Trp-(Ile, Pro, Asp, Lys, Val, Glu)-Trp. Imp. C peak 1-2 Trp-(Try, Thr, Glu, Pro, Gly)-Phe 3. Sensory evaluation revealed that correlation coefficient between bitterness and overall eating quality was not high.

I. 서 론

대두의 발효 식품인 된장은 발효과정 중에 콩단백질이 분해되어 분자량이 다른 여러 종류의 펩타이드가 생성되며 이들은 다시 분해되어 아미노산이나 아미노산 분해물인 암모니아를 형성하고, 이 물질들은 된장의 풍미에 관여하게 된다. 펩타이드는 김 등¹⁾, Jiro 등²⁾에 따르면 구성 아미노산과 그 배열 순서에 따라 신맛, 쓴맛, 혹은 무미를 나타낸다고 한다. 이 중 쓴맛 펩타이드는 쓴맛 펩타이드의 생성 속도가 분해 속도보다 클 때 나타나므로써³⁾ 쓴맛 펩타이드가 만들어질 수 있는 단백질이 많고⁴⁾, 그 단백질을 쓴맛 펩타이드로 쉽게 분해시킬 수 있는 효소 역가가 클 때 나타난다.

지금까지 쓴맛 펩타이드는 주로 카제인의 분해 산물, 치즈, 효소 처리한 대두 단백질에서 분리 확인되었다. 이들 연구에 의하면 쓴맛 펩타이드는 aliphatic, acidic, hydroxy 아미노산을 비교적 다량 가지고 있었고 basic, aromatic 아미노산은 소량이었고 가장 주된 구성인자는 다량의 glutamic acid, proline, leucine, valine이었다^{5,6)} 특히 쓴맛 펩타이드는 쓴맛 아미노산의 위치가 쓴맛의 생성과 강도에 영향을 미친다고 한다^{7,8)}. 이들 쓴맛 펩타이드는 정상적인 식품의 flavor구성성분이기도 하지만⁹⁾

풍미 저하를 가져오는 중요한 요소가 될 수 있다¹⁾.

지금까지 된장의 맛성분으로서 쓴맛 펩타이드 특성에 대해서는 김 등¹⁾과 김 등¹⁰⁾이 개량식 된장을 연구하였을 뿐이다.

따라서, 본 논문에서는 재래식 된장과 *Asp. Oryzae*를 이용한 개량식 된장의 쓴맛 펩타이드를 추출하여 확인하고, 그 특성을 알아보고자 한다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

(1) 재래식 된장

'90년 3월 시중에서 구입한 재래식 메주 4.23 kg, 한주소금 1.45 kg, 물 7.25 kg(100 : 34 : 171)을 혼합하여 항아리에 넣고 실온에서 숙성시켰다. 시료는 0, 10, 20, 30, 45, 60, 90일째 되는 날 채취하여 냉동저장하였다.

(2) 개량식 된장 A

쌀고지 1.6 kg, 삶은 콩 3 kg, 한주소금 1 kg(53 : 100 : 33)을 섞어 곱게 간 후 실온에서 숙성시켰다. 재래식과 동일하게 시료를 채취하여 냉동저장 하였다.

(3) 개량식 된장 B, C¹¹⁾

쌀고지 : 삶은 콩 : 소금의 비율이 100 : 100 : 40인 것

(B), 200 : 100 : 40인것(C) 두가지를 만들었다. 용기의 뚜껑을 덮고 무거운 돌을 올려놓아 35°C 에서 숙성시키면서 0, 5, 10, 15, 20, 30일째 되는 날 시료를 채취하였다.

2. 일반성분 분석

수분, 총질소, 아미노산태 질소는 상법¹²⁾에 따라 환원당은 Somogyi-Nelson법¹³⁾, 염도는 Mohr법¹⁴⁾으로, pH는 pH meter로 측정하였다.

3. 쓴맛 펩타이드

(1) 쓴맛 펩타이드의 추출

쓴맛 펩타이드의 추출은 각 된장중 숙성이 끝난 마지막 채취시료를 사용하여 Harwalker 등의 방법^{9,15)}에 따라 행하였다.

추출된 용매 추출 분획은 감압건조 후 증류수 일정 부피에 용해한 다음 4°C 에서 16,500 xg로 5분간 원심분리하여 상등액을 투석하여 분자량이 1200 이하의 물질과 2000 이상의 물질을 분리하였다. 이중 분자량이 1200 이하의 물질을 다음 실험의 시료로 사용하였다.

(2) 겔 크로마토그래피에 의한 펩타이드의 분리

겔 크로마토그래피의 겔로는 Sephadex G-15-120을 용출용매로는 물을 사용하였고, 용출분획 중 펩타이드의 양은 280 nm에서의 흡광도를 측정하였다⁹⁾.

(3) 펩타이드의 확인 및 정제⁷⁾

겔 크로마토그래피에 의한 용출분획은 완전히 건조시킨 후 소량의 물로 용해시켜 20×20 cm의 유리판에 silica gel G를 입힌 thin layer Chromatography(TLC)에 *n*-Butanol : Acetic acid : Water=4 : 1 : 1로 전개시켰다. 발색은 ninhydrin으로 80°C 에서 10분간 발색시켰다. 각각의 크로마토그램에서 ninhydrin-positive 부분을 물로 용출시켜 건조시켰다.

(4) 쓴맛 검사

3)의 ninhydrin-positive부분을 0.2% 수용액으로 만들어 5명의 대학원생에게 쓴맛의 존재여부를 검사시켰다.

(5) 펩타이드의 아미노산 조성

건조된 펩타이드 10 mg에 6N hydrochloric acid 5 ml를 가하여 봉관하고 150°C 에서 6시간 가수분해시킨 후 potassium hydroxide와 diposphorus pentaoxide를 넣은 감압 데시케이터에서 hydrochloric acid를 제거, 농축시켰다. 이것을 Whatman filter paper No.1로 2차원 전개하였다.

1차; *n*-Butyl alcohol : Acetic acid : Water=4 : 1 : 1
2차; *m*-Cresol-Phenol=2 : 1, pH 8.3 Borate buffer

(6) N-말단 결정

Rao 등¹⁶⁾과 Levy 등¹⁷⁾의 방법을 따랐다.

(7) C-말단 결정

Braun¹⁸⁾과 Ching 등¹⁹⁾의 방법을 따랐다.

III. 결과 및 고찰

Table 1. General contents of each Doenjang

days	water(%)	TN(%)	RS(%)	Salt(%)	AN(%)	pH
conventional Doenjang						
00	56.40	2.22	0.70	13.86	0.16	6.16
10	40.90	2.28	1.23	13.86	0.21	6.12
20	57.21	2.28	1.46	14.48	0.28	6.09
30	58.18	2.36	1.80	13.77	0.36	6.00
45	54.68	2.31	2.04	12.68	0.41	6.01
60	52.26	2.49	2.18	14.69	0.44	5.93
90	51.17	2.49	2.20	15.20	0.50	5.80
Improved Doenjang A						
00	53.16	1.58	7.95	12.84	0.10	5.89
10	55.23	1.58	14.07	13.81	0.22	5.85
20	51.06	1.61	15.80	14.08	0.24	5.81
30	50.37	1.43	15.70	13.94	0.28	5.74
45	53.34	1.51	18.80	13.23	0.27	5.68
60	50.69	1.41	19.00	13.93	0.32	5.64
90	50.02	1.56	19.50	12.84	0.32	5.48
Improved Doenjang B						
00	40.18	1.55	7.1	16.83	0.06	5.95
05	40.63	1.37	14.30	17.51	0.51	5.67
10	42.34	1.81	22.30	17.35	0.17	5.61
15	42.81	1.67	21.30	15.60	0.18	5.58
20	42.47	1.56	21.00	17.47	0.20	5.49
30	41.34	1.82	21.20	16.13	0.19	5.39
Improved Doenjang C						
00	42.62	1.14	19.30	11.29	0.07	5.85
05	41.16	1.24	23.90	11.45	0.17	5.68
10	42.67	1.20	28.50	11.10	0.22	5.59
15	42.33	1.27	23.70	10.80	0.24	5.50
20	39.71	1.26	25.40	11.53	0.29	5.39
30	39.52	1.40	27.40	11.76	0.24	5.21

TN: Total Nitrogen, RS: Reducing sugar, AN: Amino nitrogen

1. 일반 성분 분석

시료의 수분 함량은 Table 1에서 보는 바와 같이 숙성에 따라 약간 감소하는 경향을 보였다.

총질소 함량은 Table 1과 같이 재래식 된장은 2.22~2.49%, 개량식 된장(A)는 1.41~1.61%, 개량식 된장 B는 1.37~1.82%, 개량식 된장 C는 1.14~1.40%로 약간씩 차이가 났다. 이렇게 종류에 따라 함량이 다른 것은 된장시료 중의 대두의 비율이 다르기 때문인 것으로 생각된다.

아미노산태 질소의 함량은 네 가지 시료 모두 크게 증가하였다. 이것들은 숙성이 진행되면서 단백질이 아미노산으로 가수분해됨으로써 증가하였다.

환원당 함량은 쌀고지 함량이 많을수록 월등히 많았다. 재래식 된장은 숙성됨에 따라 완만하게 증가하였고 개량식 된장 A는 숙성 30일까지 증가하다가 숙성 45일에 약간 감소하였다가 그 후로는 변화가 없었다. 개량식 된장 B, C는 숙성 10일까지 급격히 증가하다가 15일에 감소하다가 그 후로 변화가 없었다.

된장 숙성중의 pH는 점차 감소하는 양상을 보였다.

이렇게 된장이 숙성됨에 따라 pH가 저하되는 것은 된장시료중의 당이나 단백질에 미생물이 작용하여 여러가지 휘발성 또는 비휘발성 유기산이 생성되어 산도를 증가시키기 때문이라고 하였다²⁰⁾.

염도는 숙성에 따라 뚜렷한 변화가 없었다.

2. 쓴맛 펩타이드

쓴맛 펩타이드를 추출하기 위하여 시료로부터의 추출

용매로 chloroform-methanol 2:1(v/v)을 사용하고, 추출액을 감압건조하여 완전히 증발시킨 후에 일정비율로 혼합된 chloroform-methanol-water를 가함으로써 쓴맛 펩타이드를 지질로부터 분리시켰다. 용매 추출분획에 포함된 펩타이드를 분자량별로 나누기 위해 Sephadex G-15 겔 크로마토그래피를 실시, 흡광도를 측정하여 Fig. 2~5의 결과를 얻었다. 그림에서 최고 peak의 흡광도를 비교해 보았을 때 재래식 된장이 가장 높았고 개량식

된장의 판능 검사표

날 짜 : 1991. 11.
평가자 이름 :

다음은 된장의 flavor에 대해서 실험하고자 합니다.
시료에서 가장 잘 표현할 수 있다고 생각되는 지점에 표시하여 주십시오.
한 선에 4개의 시료를 표시하고, 각 위치에 시료의 번호를 적어 주십시오.

1. 단 맛

약하다. 강하다.

2. 구수한 맛

약하다. 강하다.

3. 신 맛

약하다. 강하다.

4. 쓴맛

약하다. 강하다.

5. off flavor

약하다. 강하다.

6. overall eating quality

나쁘다. 좋다.

Fig. 1. A Sheet for sensory evaluation of Doenjang.

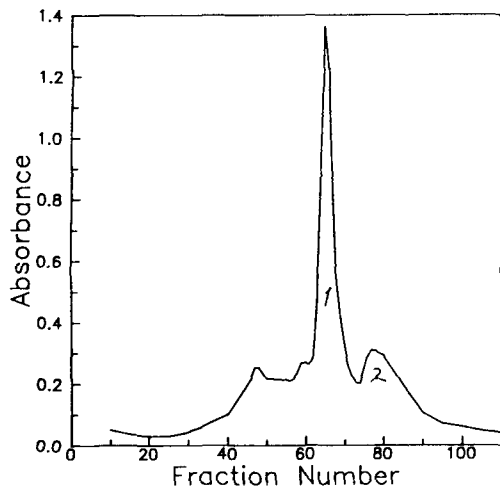


Fig. 2. Gel chromatogram of solvent extraction of conventional Doenjang sample conc.: solvent fraction of 50 g Doenjang/15 ml water.
column size: 2.2×50
sample size: 0.8 ml
flow rate: 30 drop/tube/5 min

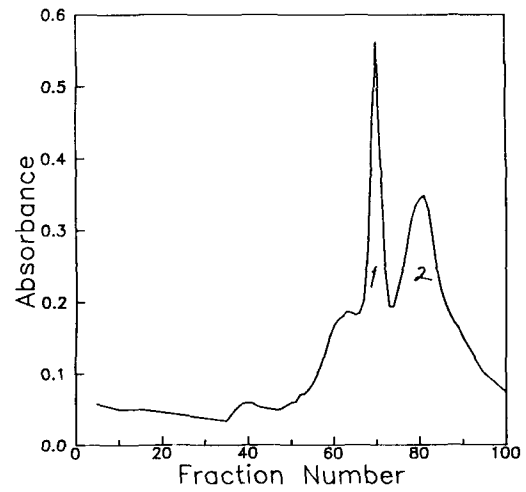


Fig. 4. Gel chromatogram of solvent extraction of Improved Doenjang B sample conc.: solvent extraction of 50 g Doenjang/15 ml water.
column size: 2.2×50
sample size: 0.8 ml
flow rate: 30 drop/tube/5 min

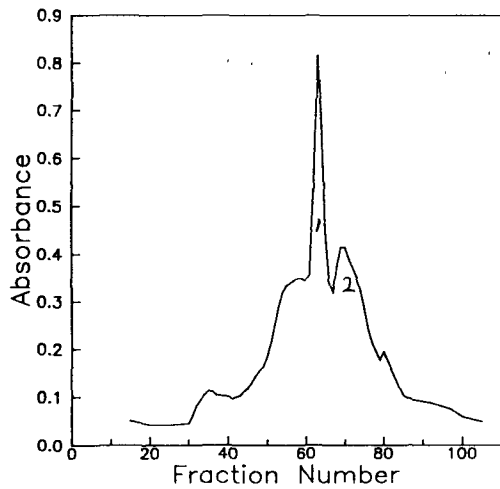


Fig. 3. Gel chromatogram of solvent extraction of Improved Doenjang A sample conc.: solvent extraction of 50 g Doenjang/15 ml water.
column size: 2.2×50
sample size: 0.8 ml
flow rate: 30 drop/tube/5 min

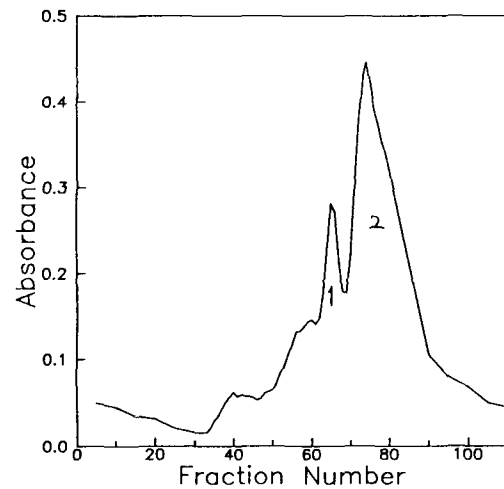


Fig. 5. Gel chromatogram of solvent extraction of Improved Doenjang C sample conc.: solvent extraction of 50 g Doenjang/15 ml water.
column size: 2.2×50
sample size: 0.8 ml
flow rate: 30 drop/tube/5 min

된장 A, 개량식 된장 B, 개량식 된장 C의 순이었다. Deutscher 등²¹⁾은 단백질의 농도와 UV흡수량과는 비례한다고 하였다. 따라서 이것은 쓴맛 펩타이드가 재래식 된장에 더 많음을 나타내준다.

겔 크로마토그래피에서 주요 peak가 하나의 펩타이

드로 구성되어 있는지를 확인하기 위해서 TLC로 전개시켜 본 결과는 Fig. 6과 같다. 그림에서 보면 재래식 된장 peak 1은 ninhydrin-positive부분이 두 점으로 분리되어 나타난 것으로 보아 겔 크로마토그래피에서 분자량이 비슷한 두개의 펩타이드가 함께 용출되었다고 볼 수

Table 2. Amino Acid composition of bitter peptides

peak 1-1	Conventional Doengang Trp-(Asp, Arg, Thr, Ser, Glu, Prp)-Phe
peak 2	Improved Doengang A Trp-(Glu, Val, Arg, Ile)-Phe
peak 1	Improved Doengang B Trp-(Ile, Pro, Asp, Lys, Val, Glu)-Trp
peak 1-2	Improved Doengang C Trp-(Tyr, Thr, Glu, Pro, Gly)-Phe

Table 3. Pearson Correlation Coefficient between each flavor and overall eating quality of Doengjang

flavor	Conv.	Imp. A	Imp. B	Imp. C
sweet	0.657	-0.302	-0.138	-0.157
umami	0.457	0.424	0.369	0.462
acidic	0.100	0.119	-0.659	-0.467
bitter	-0.017	-0.310	0.196	0.540
off flavor	-0.886	-0.405	-0.085	-0.005

Conv.: Conventional Doengang
Imp.: Improved Doengang

있다. 따라서, TLC에 나타난 ninhydrin-positive 점들을 각각 다른 펩타이드로 보고 ninhydrin은 날려보내고 물로 용출시켜 재결정시켰다. 이것을 쓴맛 검사를 시켰을 때 재래식 된장 peak 1-1, 개량식 된장 peak 1, 개량식 된장 C peak 2-1, 개량식 된장 A peak 2가 쓴맛이 있었다. 쓴맛 펩타이드들의 구성 아미노산과 N-,C-말단은 Table 2와 같다.

쓴맛 펩타이드가 쓴맛을 나타내는 데는 basic, hydrophobic. 아미노산이 중요한 역할을 하며²³⁾ 특히 Soichi 등²³⁾에 따르면 hydrophobic C-terminal sequence와 관련이 있다고 했으며 Michiko 등²⁴⁾은 C-terminal에 leucine이 있으면 펩타이드가 쓴맛을 나타낸다고 하였다.

본 연구 결과에서는 시료 4가지 모두 N-, C-말단은 tryptophan과 phenylalanine 이었다. 이 결과는 효소가 단백질을 가수분해할 때 무작위로 작용하지 않고 단백질의 특정 위치를 특이적으로 잘랐다는 clegg 등²⁵⁾의 연구와 상응하고 있다. 주요 구성 아미노산은 acidic, hydrophobic한 것이었다.

3. 관능검사

4가지 시료에 대한 관능검사 자료에 대해서 각각의 flavor와 전체적인 수용도 사이의 Pearson 상관관계의 결과는 Table 3과 같다.

재래식 된장과 off flavor와는 음의 상관관계를 확실히 보였지만 다른 종류의 된장과 특정한 flavor사이의 상관계수는 높지 않았다. 이것으로 보아 된장의 수용도는 어느 한가지의 flavor에 의해 좌우되는 것이 아니라 단맛, 구수한맛, 신맛, 쓴맛, off flavor가 잘 조화된 된장 고유의 맛에 의해 결정되는 것 같다. 따라서 된장의 쓴맛은 그

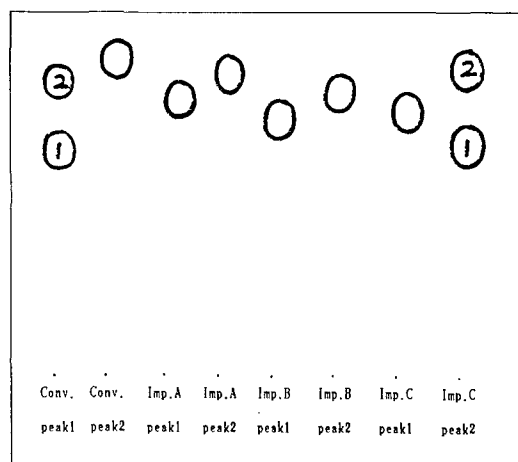


Fig. 6. TLC of bitter fraction obtained by Gel chromatography.

자체만으로는 수용도에 크게 영향을 미치지 않는 것 같다.

4. 관능검사

서울대학교 대학원 식품영양학과에 재학중인 학생 가운데 본 실험에 흥미를 갖고 된장을 좋아하는 14명을 선정하여 실험목적을 설명하고 각 된장의 단맛, 구수한맛, 신맛, 쓴맛, off flavor, overall eating quality에 대한 Multisample Difference Test를 실시하였다.

사용한 관능검사지는 Fig. 1과 같다. 측정치는 성분의 길이를 자로 재어 전체 길이를 1로하여 비율로 환산하였다. 각 시료의 특성치로 각각의 flavor와 전체적인 수용도와의 Pearson 상관관계를 알아 보았다.

IV. 요약

본 연구에서는 재래식 된장, *Asp. oryzae*를 이용한 고지와 소금의 배합을 달리한 개량식 된장 세가지(A; 쌀고지 : 콩 : 소금 = 53 : 100 : 33, B; 쌀고지 : 콩 : 소금 = 100 : 100 : 40, C; 쌀고지 : 콩 : 소금 = 200 : 100 : 40)를 만들어 일반 성분의 변화와 쓴맛 펩타이드의 특성을 살펴보고 쓴맛 펩타이드가 된장의 수용도에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보았다.

1. 4가지 된장 모두 총질소는 발효기간 중 약간씩 증가하였으며 아미노산태 질소는 크게 증가하였다. 특히 재래식 된장의 아미노산태 질소는 다른 시료에 비해 큰 폭의 증가를 보였다. 환원당은 쌀고지를 첨가한 된장의 경우 함량이 월등히 많았으며 숙성됨에 따라 모든 된장이 증가 추세를 보였다. pH는 된장이 숙성됨에 따라 점차로 저하하였으며 고지가 첨가된 된장의 경우 더욱 산성을 띠었다.

2. 숙성시킨 된장에서 쓴맛 펩타이드의 특성을 알아

보기 위해 소수성 펩타이드를 2 : 1(v/v) Chloroform-methanol로 추출하였다. 추출된 추출물을 겔 크로마토그래피를 사용하여 분자량별로 분리하고 다시 TLC로 정제하였다. 정제된 펩타이드는 쓴맛 검사를 하여서 쓴맛을 나타내는 펩타이드를 얻었다. 쓴맛 펩타이드의 아미노산 조성은 다음과 같다.

재래식 된장 peak 1-1. Trp-(Asp, Arg, Thr, Ser, Glu, Pro)-Phe

개량식 된장 B peak 1 Trp-(Ile, Pro, Asp, Lys, Val, Glu)-Trp

개량식 된장 B peak 1 Trp-(Ile, Pro, Asp, Lys, Val, Glu)-Trp

개량식 된장 C peak 1-2 Trp-(tyr, Thr, Glu, Pro, Gly)-Phe.

3. 관능검사의 결과를 Pearson 상관관계를 알아본 결과 쓴맛과 전체적인 수용도와의 상관관계는 높지 않았다. 주요어 : 된장, 쓴맛 펩타이드, 겔 크로마토그래피, TLC, 관능검사

참고문헌

1. 김수로, 이형주: 한국식품과학회지 17(4): 276-281(1985).
2. Jiro, K., Shimitzu, A., Kimizuka, A., Ninomiya, T., and Kat suya, N.: *J. Arg. Food Chem.* 18(4): 689-695(1965).
3. Emmons, D.B., Mcgugan, W.A., Elliott, J.A.: *J. Dairy Sci.* 45: 595(1962).
4. Sandine, W.E., Daly, C., Elliker, P.R., and Vedamathu, E.R.: *J. Dairy Sci.* 55(7): 1031-1039(1972).
5. Hamilton, J.S., Hill, R.D., and Leeuwen, H.V.: *Arg. Biol. Chem.* 38(2): 375-379(1979).
6. Edwards, J., and Kosikowski, F.V.: *J. Dairy Sci.* 66: 727(1983).
7. Matoba, T., Hayashi, R., Hata, T.: *Agr. Biol. Chem.* 34(8): 1235-1243(1970).
8. Matoba, T., Nagayasu, C., Hayashi, R., Hata, T.: *Agr. Biol. Chem.* 33(11): 1662-1663(1969).
9. Harwalker, V.A., and Elloit, J.A.: *J. Dairy Sci.* 54(1): 8-11(1970).
10. 김미정: 된장 숙성중 정미성분의 변화에 관한 연구, 서울대 박사학위논문, (1990).
11. 日, 醱酵食品 全光書林
12. Horwitz, W.(ed): AOAC Methods of Analysis(13th ed), Association of Official Analytical Chemists, Washington (1984).
13. Whistler, R.L. (ed): Methods in carbohydrate chemistry. Vol.1: 386, academic press, (1964).
14. 한국식품 연구문헌 총람 제 1보 p.463.
15. Harwalker, V.R.: *J. Dairy Sci.* 55(6): 742-743(1972).
16. Rao, K.R., and Sober, H.A.: *J. Amer. Chem. Soc.* 76: 1328, 194.
17. Levy, A.L., and Chung, D.: *J. Amer. Chem. Soc.* 77: 2899(1955).
18. Braun, V., Schroder, W.A.: *Arch. Biochem. Biophysic.* 118: 241-252(1967).
19. Ching-I Niu and Conrat, H.F.: *J. Amer. Chem. Soc.* 77: 5882-5885(1955).
20. 김재욱, 조성환: 한국농화학회지 18(1): 1-9(1975).
21. Deucher, M.P., Stoscheck, C.M. (ed): Methods in Enzymology vol. 182: 50 Quantitation of protein. Guide to protein purification. Academic press.
22. Otagiri, K., Noshio, Y., Shinoda, E., Fukui, H. and Okai, H.: *Agr. Biol. Chem.* 49(4): 1019-1026(1985).
23. Arai, S., Yamashita, M., Kato, M. and Fujimaki, M.: *Agr. Biol. Chem.* 34(5): 729-738(1970).
24. Yamashita, M., Arai, S., and Fujimaki, M.: *Agr. Biol. Chem.* 33(3): 321-330(1969).
25. Clegg, K.M., McMillan, A.D.: *J. Food Tech* p.21-29 (1974).