



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년02월08일
(11) 등록번호 10-1825962
(24) 등록일자 2018년01월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 11/30 (2016.01) A23L 11/20 (2016.01)
A23L 5/20 (2016.01) G01N 33/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A23L 11/32 (2016.08)
A23L 11/20 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2016-0152721
(22) 출원일자 2016년11월16일
심사청구일자 2016년11월16일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020160043465 A
KR1020130061476 A
KR1020000013476 A

(73) 특허권자
대한민국
(72) 발명자
김소영
전라북도 전주시 완산구 소태정로 1 409동 1602호
(효자동2가, 휴먼시아아이린)
박신영
전라북도 김제시 월성5길 57
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이원희

전체 청구항 수 : 총 10 항

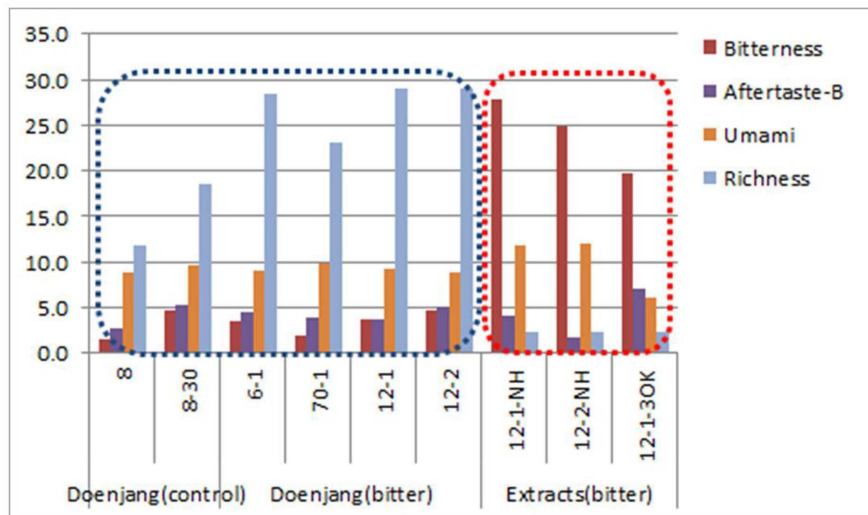
심사관 : 장은경

(54) 발명의 명칭 된장 유래 쓴맛 성분의 추출 방법 및 이의 이용

(57) 요약

본 발명은 된장 성분 중 쓴맛을 나타내는 펩타이드를 분리하는 방법에 관한 것으로, 된장에서 고형분을 제외한 여액에서 30 kDa와 10 kDa의 크기를 기준으로 정제한 후 (1) 30 내지 100 kDa 크기 정제물과 (2) 10 kDa 내지 100 kDa 크기 정제물을 쓴맛의 관능평가 및 쓴맛을 나타내는 아미노산을 분석한 결과, 10 내지 100 kDa 크기의 정제물 중 에탄올 용매의 분획물에서 특징적으로 쓴맛을 나타내는 펩타이드가 다량 존재하는 것을 확인하였다. 이에, 본 발명의 방법을 이용하여 된장으로부터 쉽게 쓴맛 펩타이드를 선택적으로 분리할 수 있고, 된장의 쓴맛 정도를 신속히 판단할 수 있으며, 된장의 맛 지표의 개발이 가능하다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A23L 5/23 (2016.08)

G01N 33/02 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2300/14 (2013.01)

(72) 발명자

조용식

전라북도 전주시 완산구 문학대4길 3, 210호

길나영

전라북도 전주시 완산구 서곡로 11, 105동 1506호

최보영

전라북도 전주시 완산구 평화9길 16, 102동 1002호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ01092701

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 농업기초기반연구

연구과제명 된장의 단백질 분해물 분석을 통한 쓴맛 성분 구명

기 여 율 1/1

주관기관 국립농업과학원

연구기간 2015.01.01 ~ 2017.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

- 1) 된장 추출물을 제조하는 단계;
 - 2) 상기 단계 1)의 추출물을 정지시켜 침전물을 형성시키는 단계;
 - 3) 상기 단계 2)의 침전물을 제거한 후 100 kDa 초과 분자량을 가지는 분획물 및 10 kDa 미만 분자량을 가지는 분획물을 제거하는 단계; 및
 - 4) 상기 단계 3)의 100 kDa 초과 및 10 kDa 미만 분자량을 가지는 분획물이 제거된 추출물을 정제한 후 암모니아수로 염기성 펩타이드를 용출시키는 단계;
- 를 포함하는 된장에 포함된 쓴맛 펩타이드의 분리 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 단계 1)의 추출물은 물, 알코올 또는 이들의 혼합물로 추출되는 것을 특징으로 하는 된장에 포함된 쓴맛 펩타이드의 분리 방법.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 알코올은 10 내지 30%의 에탄올인 것을 특징으로 하는 된장에 포함된 쓴맛 펩타이드의 분리 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 단계 2)의 침전물은 탄닌 또는 단백질인 것을 특징으로 하는 된장에 포함된 쓴맛 펩타이드의 분리 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 단계 2)의 침전물은 상기 단계 2)의 추출물을 3 내지 7℃에서 40 내지 55시간 동안 정지시켜 생성시킨 것을 특징으로 하는 된장에 포함된 쓴맛 펩타이드의 분리 방법.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 단계 4)의 암모니아수는 0.2 내지 0.8% 농도의 암모니아수인 것을 특징으로 하는 된장에 포함된 쓴맛 펩타이드의 분리 방법.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 단계 4)의 정제는 Dowex 50W (H⁺-form) 레진(resin)을 이용하여 수행되는 것을 특징으로 하는 된장에 포함된 쓴맛 펩타이드의 분리 방법.

청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 펩타이드는 메티오닌(Methionine), 발린(Valine), 이소루이신(Isoleucine), 루이신(Leucine) 및 페닐알라닌(Phenylalanine)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 아미노산을 포함하는 것을 특징으로 하는 된장에 포함된 쓴맛 펩타이드의 분리 방법.

청구항 9

된장에서 제 1항의 방법으로 분리된 펩타이드의 아미노산 함량을 측정하는 단계를 포함하는 된장의 쓴맛 평가 방법.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 아미노산은 메티오닌(Methionine), 발린(Valine), 이소루이신(Isoleucine), 루이신(Leucine) 또는 페닐알라닌(Phenylalanine)인 것을 특징으로 하는 된장의 쓴맛 평가 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 된장 유래 쓴맛 성분의 분리 방법, 및 이의 쓴맛 정도를 신속히 판단하기 위한 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 한국인이 즐겨 먹는 장의 종류에는 된장, 간장, 고추장, 청국장 등이 있다. 우리의 음식문화는 경제발전예 따라 급격히 서구화되고 있으나, 서구화된 음식은 우리의 체질에 맞지 않기 때문에 여러 건강상의 이상을 일으키고 있다. 그에 따라, 전통음식에 대한 관심이 높아져서 김치, 된장, 고추장 등에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다.

[0004] 한국 음식은 거의 모두 장류로 간을 맞추고 맛을 내므로, 장류의 맛은 곧 음식의 맛을 좌우하는 기본 요인이 된다. 또한, 장류는 매일같이 섭취하는 식품 중의 하나라고 할 수 있다. 전통적으로 한국인들은 부족한 단백질을 콩으로 만든 된장을 통해서 섭취할 수 있었는데, 된장은 우수한 단백질 식품으로 양질의 아미노산 형태로 존재하며 리신이 많이 들어있어 쌀을 주식으로 하는 한국인에게는 균형있는 식품이다. 또한 된장 속의 지방은 대부분 불포화 지방산으로 리놀렌산 등은 콜레스테롤이 쌓이는 것을 예방하며 혈액을 원활하게 한다. 또한, 된장에는 비린내를 없애는 교취효과(矯臭效果)가 있는데, 이것은 된장의 주성분인 단백질이 여러 냄새를 흡착하는 성질을 가지고 있기 때문이다. 고등어나 게 등 비린내 나는 생선요리와 일부 조수육(鳥獸肉) 요리에 된장을 섞어 쓰면 비린내를 없애고 맛을 돋을 수 있다. 된장을 언제부터 만들어 먹었는지는 기록이 없어 확실한 것을 알 수 없지만, 중국의 위지(魏志)와 동이전(東夷傳)에 "고구려에서 장양(藏釀)을 잘한다."라는 기록이 있는 것으로 보아, 삼국시대 이전부터 이미 된장과 간장이 한데 섞인 걸쭉한 것을 담가 먹다가 삼국시대에 와서 간장과 된장을 분리하는 기술이 발달하였던 것으로 추정할 수 있다.

[0005] 된장의 종류는 간장을 담가서 장물을 떠내고 건더기를 쓰는 재래식 된장과 메주에 소금물을 알맞게 부어 장물을 떠내지 않고 먹는 개량식 된장, 2가지 방법을 절충한 절충식 된장 등을 들 수 있으며, 그 밖에 계절에 따라 담그는 별미장으로, 봄철에 담그는 담복장과 막장이 있고, 여름철에 담그는 집장과 생황장, 가을철에 담그는 청태장과 팔장, 겨울철에 담그는 청국장 등이 있다.

[0006] 한편, 된장이나 간장은 기존의 수많은 연구개발을 통하여 항암작용 및 다이어트에 뛰어난 효과를 나타내는 것이 증명되고 있으나, 섭취 시에 풍미가 용이하지 않아 식품으로서 널리 응용될 수 없는 단점이 있다. 된장은 콩 발효식품으로서 콩을 주원료로 하여 발효·숙성과정 중 생성되는 펩타이드, 아미노산, 유리당 등에 의해 구수한 맛과 향을 가진다. 구체적으로, 된장은 발효 과정 중에 콩 단백질이 분해되어 분자량이 다른 여러 종류의 펩타이드가 생성되며 이들은 다시 분해되어 아미노산이나 아미노산 분해물인 암모니아를 형성하고, 이 물질들은 된장의 풍미에 관여하게 된다. 펩타이드는 구성 아미노산과 그 배열 순서에 따라 신맛, 쓴맛, 혹은 무미를 나타

낸다. 이 중 쓴맛 펩타이드는 쓴맛 펩타이드의 생성 속도가 분해 속도보다 클 때 나타나기 때문에, 쓴맛 펩타이드가 만들어질 수 있는 단백질이 많고 그 단백질을 쓴맛 펩타이드로 쉽게 분해시킬 수 있는 효소 역가가 클 때 나타난다. 지금까지 연구된 쓴맛 펩타이드는 주로 카제인의 분해 산물, 치즈, 효소 처리한 대두 단백질에서 분리 및 확인되었다. 이에 의하면, 쓴맛 펩타이드는 지방족(aliphatic), 산성(acidic), 히드록시(hydroxy) 아미노산을 비교적 다량 가지고 있었고 염기성(basic), 방향족(aromatic) 아미노산은 소량이었으며 가장 주된 구성인자는 다량의 글루타민산(glutamic acid), 프롤린(proline), 루이신(leucine), 발린(valine)이었다. 특히 쓴맛 펩타이드는 쓴맛 아미노산의 위치가 쓴맛의 생성과 강도에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 이들 쓴맛 펩타이드는 정상적인 식품의 풍미(flavor)의 구성성분이기도 하지만 풍미 저하를 가져오는 중요한 요소가 될 수 있다.

[0007] 이렇듯, 일부 연구를 통해 된장 유래 일부 펩타이드가 쓴맛의 원인으로 주목받고 있으나, 된장의 쓴맛 펩타이드에 대한 정제기술이 개발된 사례가 없다. 된장 발효 후 생성되는 쓴맛을 정량적으로 평가할 수 있는 기준이 필요하며, 이를 위해서는 쓴맛 펩타이드에 대한 정제와 이를 통한 맛 평가 기술이 개발되어야 한다.

[0009] 이에, 본 발명자들은 국민들이 자주 섭취하고 있는 발효식품 중 된장에서 쓴맛 성분을 분획 크기별로 분리하여 쓴맛이 많은 추출물과 적은 추출물을 구분할 수 있는 쓴맛 성분의 분획 제조 방법을 제공하고자, 된장으로부터 쓴맛 펩타이드를 선택적으로 추출하여 쓴맛 펩타이드의 분자량 특징을 규정하였으며, 이의 정제법을 제공하여 관능평가 전문가가 아닌 일반인도 된장의 쓴맛 정도를 신속히 판별할 수 있는 기술을 제시함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0011] (특허문헌 0001) 대한민국 특허출원 제 10-2016-0035834호(2016.03.25)
(특허문헌 0002) 대한민국 특허출원 제 10-2015-0176643호(2015.12.11)

비특허문헌

- [0012] (비특허문헌 0001) 고천[古川] 등, 원색곤충백과도감, 집양사[集英社], 동경[東京], 573-574(1977).
(비특허문헌 0002) 장지이[張芝利], 중국경제곤충지 28책, 초시목, 중국과학원 중국동물지 편찬위원회, 과학출판사(1984).

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0013] 본 발명의 목적은 된장 유래 쓴맛 성분의 분리 방법, 및 이의 쓴맛 정도를 신속히 판단하기 위한 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0015] 상기 목적을 달성하기 위해 본 발명은
- [0016] 1) 된장 추출물을 제조하는 단계;
- [0017] 2) 상기 단계 1)의 추출물을 정치시켜 침전물을 형성시키는 단계;
- [0018] 3) 상기 단계 2)의 침전물을 제거한 후 100 kDa 초과 분자량을 가지는 분획물 및 10 kDa 미만 분자량을 가지는 분획물을 제거하는 단계; 및
- [0019] 4) 상기 단계 3)의 100 kDa 초과 및 10 kDa 미만 분자량을 가지는 분획물이 제거된 추출물을 정제한 후 암모니아수로 펩타이드를 용출시키는 단계를 포함하는 된장에 포함된 쓴맛 펩타이드의 분리 방법을 제공한다.
- [0020] 아울러, 본 발명은 된장에서 상기 방법으로 분리된 펩타이드의 아미노산 함량을 측정하는 단계를 포함하는 된장

의 쓴맛 평가 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0022]

본 발명은 된장 성분 중 쓴맛을 나타내는 펩타이드를 분리하는 방법에 관한 것으로, 된장 20% 에탄올 추출물로부터 10 kDa 및 30 kDa의 크기를 기준으로 10~100 kDa 또는 30~100 kDa 크기의 고분자 정제 시료를 분획하여 쓴맛의 관능평가 및 쓴맛을 나타내는 아미노산을 분석한 결과, 에탄올 용매로부터 분리된 10 내지 100 kDa 크기를 가지는 분획물에서 특징적으로 쓴맛을 나타내는 펩타이드가 다량 존재하는 것을 확인하였다. 이에, 본 발명의 방법을 이용하여 된장으로부터 쉽게 쓴맛 펩타이드를 선택적으로 분리할 수 있고, 일반인도 된장의 쓴맛 정도를 신속히 판단할 수 있으며, 된장의 맛 지표의 개발이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0024]

도 1은, 된장의 쓴맛 성분을 분리하고 정제하는 과정을 나타낸 도이다.

도 2는, 된장을 물 또는 에탄올 용매를 이용하여 추출 후 분리된 펩타이드 정제물의 쓴맛 관능평가 결과를 나타낸 도이다:

8: 8번 된장 물 추출물(음성 대조군);

8-30: 8번 된장 물 추출물(양성 대조군으로 8% 저염 된장);

6-1: 6번 된장 물 추출물;

70-1: 70번 된장 물 추출물;

12-1: 12번 된장 물 추출물;

12-2: 12번 된장 물 추출물(반복수);

12-1-NH: 12-1번 된장 에탄올 추출물로부터 이온크로마토그래피 후 정제된 10-100 kDa 크기 시료;

12-2-NH: 12-2번 된장 에탄올 추출물로부터 이온크로마토그래피 후 정제된 10-100 kDa 크기 시료; 및

12-1-30K: 12-1번 된장 에탄올 추출물로부터 30-100 kDa 크기로 분리/정제한 시료.

도 3은, 된장 에탄올 추출물로부터 펩타이드 크기별 분획한 정제물의 맛의 강도 비교 결과를 나타낸 도이다:

12-1-NH: 12-1번 된장 에탄올 추출물로부터 이온크로마토그래피 후 정제된 10-100 kDa 크기 시료;

12-2-NH: 12-2번 된장 에탄올 추출물로부터 이온크로마토그래피 후 정제된 10-100 kDa 크기 시료; 및

12-1-30K: 12-1번 된장 에탄올 추출물로부터 30-100 kDa 크기로 분리/정제한 시료.

도 4a는 쓴맛된장의 추출물로부터 크기 30 내지 100 kDa 크기의 정제시료의 구성 아미노산 분석 결과를 나타낸 도이다:

6-30kDa: 6번 된장 추출물의 30-100 kDa 크기로 분리한 시료;

12-30kDa: 12번 된장 추출물의 30-100 kDa 크기로 분리한 시료; 및

70-30kDa: 70번 된장 추출물의 30-100 kDa 크기로 분리한 시료.

도 4b는, 된장 추출물로부터 에탄올 용매로 추출한 후 이온크로마토그래피로 분리된 펩타이드 크기 10-100 kDa의 분획 시료의 구성 아미노산 분석 결과를 나타낸 도이다:

6-NH: '6번 된장' 시료로부터 10 kDa 이상 크기로 분리된 정제물을 에탄올 용매로 추출 후 이온크로마토그래피 후 정제된 10-100 kDa 크기 시료;

12-NH: '12번 된장' 시료로부터 10 kDa 이상 크기로 분리된 정제물을 에탄올 용매로 추출 후 이온크로마토그래피 후 정제된 10-100 kDa 크기 시료; 및

70-NH: '70번 된장' 시료로부터 10 kDa 이상 크기로 분리된 정제물을 에탄올 용매로 추출 후 이온크로마토그래피 후 정제된 10-100 kDa 크기 시료.

도 4c는, 된장 추출물로부터 에탄올 용매로 추출 후 10-100 kDa 크기 정제 시료에서 이온크로마토그래피 후 세

적하여 나온 잔류물의 구성 아미노산 분석 결과를 나타낸 도이다:

6-WNH: '6번 된장' 시료로부터 에탄올 용매로 추출 후 10-100 kDa 크기 정제시료에서 이온크로마토그래피 후 세척하여 나온 잔류물;

12-WNH: '12번 된장' 시료로부터 에탄올 용매로 추출 후 10-100 kDa 크기 정제시료에서 이온크로마토그래피 후 세척하여 나온 잔류물; 및

70-WNH: '70번 된장' 시료로부터 에탄올 용매로 추출 후 10-100 kDa 크기 정제시료에서 이온크로마토그래피 후 세척하여 나온 잔류물.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명한다.
- [0027] 본 발명은 하기 단계로 구성되는 된장에 포함된 쓴맛 펩타이드의 분리 방법을 제공한다:
- [0028] 1) 된장 추출물을 제조하는 단계;
- [0029] 2) 상기 단계 1)의 추출물을 정치시켜 침전물을 형성시키는 단계;
- [0030] 3) 상기 단계 2)의 침전물을 제거한 후 100 kDa 초과 분자량을 가지는 분획물 및 10 kDa 미만 분자량을 가지는 분획물을 제거하는 단계; 및
- [0031] 4) 상기 단계 3)의 100 kDa 초과 및 10 kDa 미만 분자량을 가지는 분획물이 제거된 추출물을 정제한 후 암모니아수로 펩타이드를 용출시키는 단계.
- [0032] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 된장은 시판되는 것 등 제한 없이 사용할 수 있다. 상기 단계 1)의 추출물 제조시 추출용매는 물, 알코올 또는 이들의 혼합물을 사용할 수 있으며, 상기 알코올로는 C₁ 내지 C₂ 저급 알코올일 수 있고, 상기 10 내지 30%의 에탄올일 수 있으며, 구체적으로는 20%의 에탄올일 수 있다. 상기 단계 1)의 추출물 제조시 추출방법으로는 열수 추출, 침지 추출, 초임계 추출, 아임계 추출, 고온 추출, 고압 추출, 환류 냉각 추출 및 초음파 추출 등의 추출장치를 이용한 방법 또는 XAD 및 HP-20을 포함한 흡착 수지를 이용하는 방법 등 당 업계의 통상적인 추출방법을 사용할 수 있으며, 가온하며 환류 추출 또는 상온에서 추출할 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 상기 추출용매를 된장에 1 내지 10배 첨가하여 추출할 수 있고, 4 내지 6배 첨가하여 추출할 수 있다. 추출온도는 20℃ 내지 100℃ 일 수 있고, 구체적으로 실온 또는 60℃ 내지 90℃일 수 있다. 또한, 추출시간은 3 내지 36시간일 수 있고 구체적으로 5 내지 20시간일 수 있다. 아울러, 추출 횟수는 1 내지 5회인 것일 수 있고, 2 내지 3회 반복 추출할 수 있다.
- [0033] 상기 단계 2)는 고분자 폴리머를 제거하기 위한 단계로, 상기 침전물은 탄닌 또는 단백질과 같은 고분자 폴리머일 수 있다. 상기 단계 2)의 침전물은 상기 단계 2)의 추출물을 3 내지 7℃에서 40 내지 55시간 동안 정치시켜 생성시킬 수 있으며, 구체적으로 4℃에서 48시간 동안 정치시켜 생성시킨 후 제거할 수 있다.
- [0034] 상기 단계 3)은 저분자 및 염류를 제거하는 컷오프(cut-off) 기반 분자량 별 분획 단계로, 상기 분획은 멤브레인 필터를 이용하여 분획할 수 있고, 순차적으로 100 kDa 초과 분자량을 제거한 뒤 10 kDa 미만 분자량을 제거하는 순으로 제조될 수 있다. 또한 분획물에 저분자 잔류물이 남아있지 않도록 에탄올을 이용한 세척 단계를 추가할 수 있다.
- [0035] 상기 단계 4)의 정제는 Dowex 50W (H⁺-form) 레진(resin)을 이용하여 수행될 수 있으나, 펩타이드 정제시 사용되는 레진이라면 어떤 것이든 사용 가능하다.
- [0036] 상기 단계 4)의 정제시 10 내지 100 kDa 미만 분자량을 가지는 정제물을 극성별로 분리하기 위해 에탄올 또는 물을 사용할 수 있으며, 상기 알코올로는 C₁ 내지 C₂ 저급 알코올일 수 있고, 10 내지 100%의 에탄올일 수 있으며, 구체적으로는 100%의 에탄올일 수 있다.
- [0037] 상기 단계 4)의 암모니아수는 펩타이드를 용출시키기 위한 것으로 0.2 내지 0.8% 농도의 암모니아수일 수 있고, 구체적으로 0.5%의 농도의 암모니아수일 수 있다. 상기 정제된 펩타이드는 메티오닌(Methionine), 발린(Valine), 이소루이신(Isoleucine), 루이신(Leucine) 및 페닐알라닌(Phenylalanine)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 아미노산을 포함할 수 있으나 이에 한정되지 않는다.
- [0039] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 된장의 쓴맛 펩타이드(peptide)를 분리하고자 안동, 경산, 대구

에서 생산된 된장 시료를 이용하여 20% 에탄올 용매로 추출 후 고형분을 제거한 여액에서 10 kDa 및 30 kDa 이상의 크기로 필터 분리 후, 상기 분리된 시료를 100% 에탄올 또는 물로 추출한 후 이온크로마토그래피에서 암모니아수로 쓴맛 펩타이드를 용출 및 정제하였으며, 비교를 위해 동일한 방법으로 직접 제조한 된장과 시판된 장으로부터 쓴맛 펩타이드를 분리 및 정제하였다.

[0040] 본 발명자들은 정제한 시료의 관능평가를 통해 쓴맛을 평가하고자 맛 센서 분석기(TS-5000Z, Insent, Atsugi, Japan)를 이용하여 추출물 시료들은 각각 0.012 mg을 취해 증류수로 5,000배 희석한 후 여과하였고, 3회 반복 측정 후, 평균값을 구하여 쓴맛(Bitter), 짠맛(Saltiness), 신맛(Sourness), 감칠맛(Umami), 풍부한맛(Richness), 떫은맛(Astringency) 및 후미(Aftertaste-A, B)의 값을 객관적으로 나타내었다. 그 결과, 분해물 시료(실시에 1의 단계로 정제된 시료 12-1-NH, 12-2-NH, 12-1-30K)가 비교군 및 대조군 시료에 비해 쓴맛이 월등히 높았다(도 2 참조). 또한, 분해물 시료(실시에 1의 단계로 정제된 시료 12-1-NH, 12-2-NH, 12-1-30K)의 각각의 평균값에 대한 쓴맛 성분을 비교한 결과 30-100 kDa 이상 크기의 펩타이드 정제물의 쓴맛이 10-100 kDa 크기의 펩타이드 정제물과 비교하여 상대적으로 낮은 것을 확인하였다(도 3 참조). 따라서, 된장의 쓴맛 펩타이드는 10-100 kDa 크기를 특징적으로 갖는 것을 알 수 있다.

[0041] 또한, 본 발명자들은 실시에 1에서 된장으로부터 분리한 쓴맛 성분 정제물의 아미노산 구성을 분석하고자 각각의 시료 0.01 g을 6N HCl로 녹인 다음 질소 충전하여 24시간 동안 110℃에서 가수분해시킨 후, 감압 증발하여 유도체화 하였으며, 분석시료로 사용하기 위해 증류수(D.W.)로 500배 희석하였다. 그 결과, 된장 추출물을 에탄올 용매로 분획한 10-100 kDa 크기 시료(6-2-NH, 12-2-NH 및 70-2-NH)에서 쓴맛 아미노산으로 알려진 메티오닌(Methionine), 발린(Valine), 이소루이신(Isoleucine), 루이신(Leucine), 페닐알라닌(Phenylalanine)이 다량 검출된 것을 확인하였다(도 4 참조).

[0042] 따라서, 이상의 결과를 토대로 된장 중 쓴맛 성분은 에탄올 추출물 중 10-100 kDa 크기의 분획물에 존재함을 확인하였다.

[0044] 아울러, 본 발명은 된장에서 상기 방법으로 분리된 펩타이드의 아미노산 함량을 측정하는 단계를 포함하는 된장의 쓴맛 평가 방법을 제공한다.

[0045] 상기 측정하는 아미노산은 메티오닌(Methionine), 발린(Valine), 이소루이신(Isoleucine), 루이신(Leucine) 또는 페닐알라닌(Phenylalanine)일 수 있으나, 된장의 쓴맛을 나타내는 아미노산이면 측정 대상이 될 수 있다.

[0047] 이하, 본 발명을 실시에 및 실험예에 의해서 상세히 설명한다.

[0048] 단, 하기 실시에 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시에 및 실험예에 의해서 한정되는 것은 아니다.

실시예 1

[0050] 된장의 쓴맛 성분의 분리

[0051] <1-1> 된장 시료의 선정

[0052] 본 발명자들은 된장의 쓴맛 성분 분리를 위한 쓴맛 된장을 선별하기 위해 시판장 58종의 된장 시료를 대상으로 쓴맛 관능평가를 2차에 걸쳐 수행하였으며, 실험 대상으로 선정된 된장 시료는 하기 표 1과 같다.

표 1

[0053]

구분	1회	2회	3회	4회	5회	6회
1차 (된장 고형분 자체)	6(4.0점) 12(3.7점)	6(3.0점) 21(2.7점) 27(3.3점)	31(4.3점) 34(3.3점) 35(3.7점)	31(4.0점) 49(4.3점) 53(3.7점)	31(4.0점) 49(4.3점) 56(3.3점)	49(4.7점) 70(3.7점) 76(3.7점)
2차 (15%, 시료액)	6, 12, 21, 27, 31, 34, 35, 49, 53, 56, 70, 76 (※ 여주차를 대조구로 하여 더 쓰면 3 이상, 덜 쓰면 3 이하 점수 부여)					
최종 선정	6, 12, 70번 시료					

[0055] <1-2> 된장 추출물의 쓴맛 성분 분리

[0056] 본 발명자들은 된장의 쓴맛 펩타이드(peptide)를 분리하고자 상기 쓴맛 된장으로 선정된 된장 시료 6번, 12번,

70번을 이용하여 하기와 같은 단계로 추출하였다.

[0057] 제 1단계로, 고분자 폴리머(탄닌, 단백질 등)를 제거함으로써 된장 펩타이드 및 침전된 펩타이드(Precipitated peptide)만을 분리하였다.

[0058] 구체적으로, 된장 50 g을 20% 에탄올 수용액 120 ml를 넣고 균질화(homogenization) 5분 실시 후 초음파 분해(sonication)를 10분간 수행하여 펩타이드를 추출하였고, 필터 페이퍼(filter paper)(8 μ m, No. 20)를 통해 고형분을 걸러낸 후 20% 에탄올을 사용하여 세척하고, 48시간 동안 4℃에서 보관하여 고분자 펩타이드 침전물 생성을 유도하여 3 μ m 공극(pore) 사이즈를 갖는 셀룰로오스 기반의 필터(cellulose-based filter)(Filter paper No. 6)를 사용하여 입자크기에 따라 분리하고 20% 에탄올을 사용하여 잔류물을 씻어내었다.

[0059] 제 2단계로, 저분자 및 염류를 제거하기 위해 분자량(Molecular weight)에 기초하여 컷오프(cut-off)를 실시하였다(10-30 kDa).

[0060] 구체적으로, 상기 1 단계 과정을 통해 정제된 시료용액을 분자량 크기별 분획하는 단계로, 30 kDa 이상 또는 10 kDa 이상의 분자량으로 분리하기 위해 밀리포어 멤브레인 필터(millipore membrane filter; Ultracel 30 kDa)를 사용하여 질소 압을 가하여 30 kDa 크기를 기준으로 펩타이드를 분리하였고(30 kDa 이상), 10 kDa 크기 이상의 분자량으로 분리하기 위해 밀리포어 멤브레인 필터(Ultracel 10 kDa)를 사용하여 질소 압을 가하여 펩타이드로 분리하였으며(10 kDa 이상), 20% 에탄올을 사용하여 세척하여 저분자 잔류물들이 남아있지 않도록 하였다. 상기 크기 분획된 시료 용액을 100% 에탄올 또는 물로 추출 및 정제한 후 하기 이온크로마토그래피로 정제하기 위한 시료로 사용하였다.

[0061] 제 3단계로, 펩타이드를 정제하기 위한 이온 교환(Ion exchange) 크로마토그래피를 실시하였다.

[0062] 구체적으로, 상기 1 및 2 단계 과정을 통해 정제된 시료 0.5 g을 20% 에탄올 수용액에 녹인 후 Dowex 50W (H+-form) 레진 1 g을 넣고 10분간 교반 후 20% 에탄올 수용액으로 씻어낸 뒤, 0.5% 암모니아수로 고정상에 부착된 펩타이드를 용출시켜 10-100 kDa 및 30-100 kDa의 크기로 정제하였다(NH). 또한, 20% 에탄올/물로 수차례 세척하여 나온 잔류물을 농축하여 비교 분석으로 사용하였다(WNH).

[0063] 이렇게 에탄올 추출물의 이온크로마토그래피 정제 시료(에탄올-NH), 상기 에탄올 추출물의 이온크로마토그래피 후의 잔류물 정제 시료(에탄올-WNH), 물 추출물의 이온크로마토그래피 정제 시료(물-NH), 및 상기 물 추출물의 이온크로마토그래피 후의 잔류물 정제 시료(물-WNH)를 이용하여 구성 아미노산 분석을 실시하였다. 또한, 상기 시료를 감압농축 혹은 진공건조시킨 뒤 음용수를 사용하여 10 mg/mL 농도로 제조한 뒤 쓴맛 평가용으로 사용하였다.

[0064] 그 결과, 된장으로부터 분리 및 정제된 쓴맛 펩타이드 양은 아래의 표 2와 같다.

표 2

[0065] 정제 시료명 및 정제된 시료량

된장 시료 번호	구입시기	시료정보	정제 시료명	정제 시료량(mg)
6-1	2015	생산지: 안동	6-1-NH	137
6-2	2016	원료: 메주72%, 정제염28%	6-2-NH	94
12-1	2015	생산지: 경산	12-1-NH	154
12-2	2016	원료: 메주95%, 천일염5%	12-2-NH	123
70-1	2015	생산지: 대구	70-1-NH	160
70-2	2016	원료: 메주60%, 천일염20%, 정제수20%	70-2-NH	157

[0066] * 모든 시료는 2 반복 수행

실시예 2

[0068] 된장으로부터 분리한 쓴맛 성분 정제물의 관능평가

[0069] 본 발명자들은 상기 실시예 <1-2>에서 된장 에탄올 추출물로부터 분리된 정제 시료의 관능평가를 통해 쓴맛을 평가하고자 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0070] 분석 기기 : Insent(Intelligent Sensor Technology, Inc., Japan), 7 sensor

[0071] 분석 시료 : 대조군(된장 시료 8번), 쓴맛 비교군(된장 시료 6, 12, 70번) 및 [실시에 1]에서 제조한 된장 쓴맛 정제물(정제 시료명 12-1-NH, 12-2-NH, 12-1-30K)

표 3

[0072] 관능평가를 위한 시료

시료명	시료 번호	크기	설명
8	8	-	된장 8번 물 추출물 (음성 대조군; 시판 된장)
8-30	8	-	된장 8번 물 추출물 (양성 대조군; 8% 저염 된장)
6-1	6	-	선발된 쓴맛 된장 6번 물 추출물
12-1	12	-	선발된 쓴맛 된장 12번 물 추출물
70-1	70	-	선발된 쓴맛 된장 70번 물 추출물
6-2	6	-	선발된 쓴맛 된장 6번 물 추출물 (반복수)
12-2	12	-	선발된 쓴맛 된장 12번 물 추출물 (반복수)
70-2	70	-	선발된 쓴맛 된장 70번 물 추출물 (반복수)
12-1-NH	12	10-100 kDa	12번 된장 에탄올 추출물의 이온크로마토그래피 정제 시료 (염기성 펩타이드)
12-2-NH	12	10-100 kDa	12번 된장 에탄올 추출물의 이온크로마토그래피 정제 시료 (염기성 펩타이드)
12-1-30K	12	30-100 kDa	12번 된장 에탄올 추출물로부터 분리된 30-100 kDa 크기 정제 시료

[0074] 구체적으로, 정제물의 맛 성분 분석을 위하여 맛 센서 분석기(TS-5000Z, Insent, Atsugi, Japan)를 이용하여 수행하였다. 분석 시료로 사용하기 위해 된장에서 분리한 상기 추출물 시료들은 각각 0.012 mg을 취해 증류수로 5,000배 희석한 후 여과하였다. 맛 센서 분석기에 시료를 60 mL 씩 넣어 3회 반복 측정된 후, 평균값을 구하여 쓴맛(Bitter), 짭맛(Saltiness), 신맛(Sourness), 감칠맛(Umami), 풍부한맛(Richness), 떫은맛(Astringency) 및 후미(Aftertaste-A, B)의 값을 객관적으로 나타내었다.

[0075] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이 분해물 시료(실시에 1의 단계로 정제된 시료 12-1-NH, 12-2-NH, 12-1-30K)가 비교군 및 대조군 시료에 비해 쓴맛이 월등히 높았다(도 2).

[0076] 또한, 도 3에 나타난 바와 같이 분해물 시료(실시에 1의 단계로 정제된 시료 12-1-NH, 12-2-NH, 12-1-30K)의 평균값에 대한 각각의 쓴맛 성분을 비교한 결과 30-100 kDa 크기의 펩타이드 정제물(시료 번호 12-1-30K)의 쓴맛이 10-100 kDa 크기의 펩타이드 정제물(시료 번호 12-1-NH 및 12-2-NH)과 비교하여 상대적으로 낮은 것을 확인하다(도 3).

[0077] 따라서, 된장의 쓴맛 펩타이드는 특징적으로 10-100 kDa 크기 물질이 다량 존재한다는 것을 알 수 있다.

실시예 3

[0079] 된장으로부터 분리한 쓴맛 성분 정제물의 구성 아미노산 분석

[0080] 본 발명자들은 상기 실시예 <1-2>에서 된장 에탄올 추출물로부터 분리된 정제 시료의 아미노산 구성을 분석하고자 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0081] 분석 기기 : UPLC(Waters)

[0082] 분석 시료 : [실시에 1]에서 제조한 된장 쓴맛 정제물 중 30 내지 100 kDa 크기의 정제물(정제 시료명 6-30kDa, 12-30kDa, 70-30kDa), 에탄올로 분획된 10-100 kDa 크기의 정제물(정제 시료명 6-NH, 12-NH, 70-NH) 및 이의 잔류물(정제 시료명 6-WNH, 12-WNH, 70-WNH)

표 4

[0083] 구성 아미노산 분석을 위한 시료

시료명	시료 번호	크기	설명
6-30kDa	6	30-100 kDa	6번 된장 에탄올 추출물의 30 kDa 크기 이상으로 분리/정제한 시료
12-30kDa	12	30-100 kDa	12번 된장 에탄올 추출물의 30 kDa 크기 이상으로 분리/정제한 시료
70-30kDa	70	30-100 kDa	70번 된장 에탄올 추출물의 30 kDa 크기 이상으로 분리/정제한 시료
6-NH	6	10-100 kDa	6번 된장 에탄올 추출물의 이온크로마토그래피 정제 시료
12-NH	12	10-100 kDa	12번 된장 에탄올 추출물의 이온크로마토그래피 정제 시료
70-NH	70	10-100 kDa	70번 된장 에탄올 추출물의 이온크로마토그래피 정제 시료
6-WNH	6	10-100 kDa	6번 된장 에탄올 추출물의 이온크로마토그래피 후 세척하여 나온 잔류물
12-WNH	12	10-100 kDa	12번 된장 에탄올 추출물의 이온크로마토그래피 후 세척하여 나온 잔류물
70-WNH	70	10-100 kDa	70번 된장 에탄올 추출물의 이온크로마토그래피 후 세척하여 나온 잔류물

[0085] 구체적으로, 상기 각각의 정제 시료 0.01 g을 6N HCl로 녹인 다음 질소 충전하여 24시간 동안 110℃에서 가수분해시킨 후, 감압 증발하여 유도체화 하였으며, 분석시료로 사용하기 위해 증류수(D.W.)로 500배 희석하였다. 구성 아미노산 분석을 위한 UPLC 기기 분석 조건은 하기 표 5와 같다.

표 5

[0086] 펩타이드 정제 분획물의 구성 아미노산 UPLC 기기 분석 조건

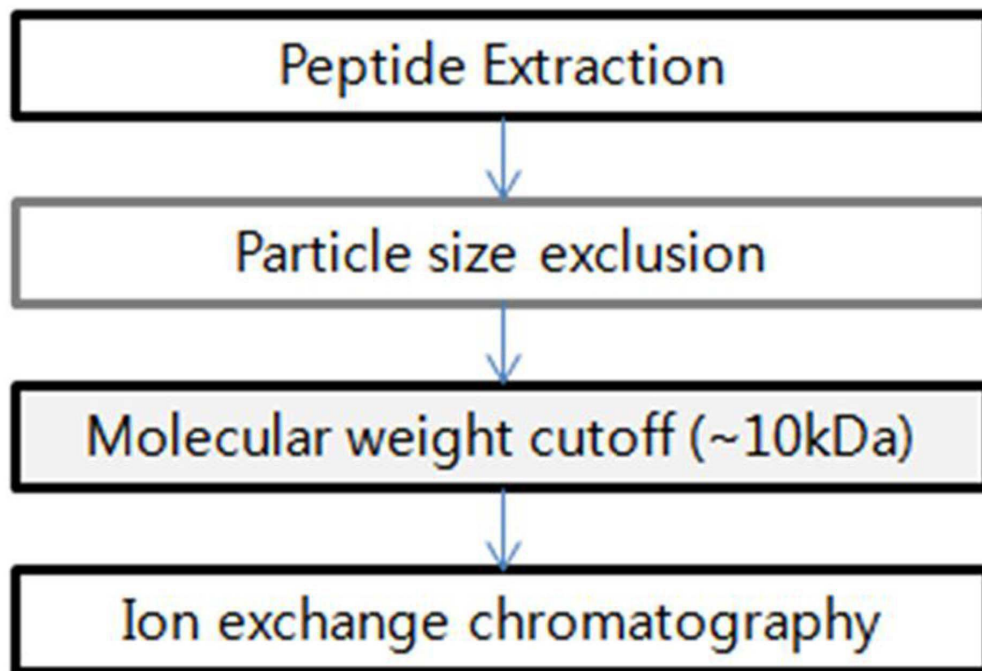
컬럼	AccQ-Tag™ UltraColumn 2.1×100mm		
매개변수	값	매개변수	값
유동상 A	Eluent A	컬럼온도	55℃
유동상 B	Eluent B	Weak 주사 세척	600 uL
유속	0.7 mL/min	strong 주사 세척	200 uL
주입량	1.0 uL	검출	UV 260nm
샘플 루프 사이즈	2.0 uL	샘플링 속도	20 pts/sec
샘플온도	20℃	시간 상수	0.4

[0088] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이 된장 에탄올 추출물로부터 분리된 10-100 kDa 크기 시료(6-2-NH, 12-2-NH 및 70-2-NH)에서 쓴맛 아미노산으로 알려진 메티오닌(Methionine), 발린(Valine), 이소루이신(Isoleucine), 루이신(Leucine), 페닐알라닌(Phenylalanine)이 다량 검출된 것을 확인하였다(도 4).

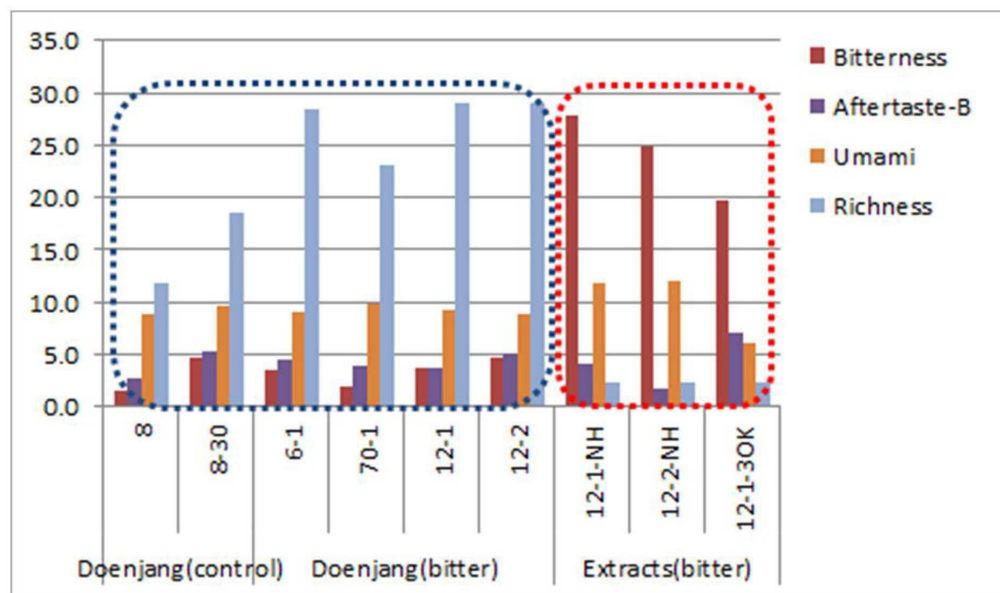
[0089] 따라서, 이상의 결과를 토대로 된장 중 쓴맛 성분은 에탄올 추출물 중 10 내지 100 kDa 크기의 분획물에 존재함을 확인하였다.

도면

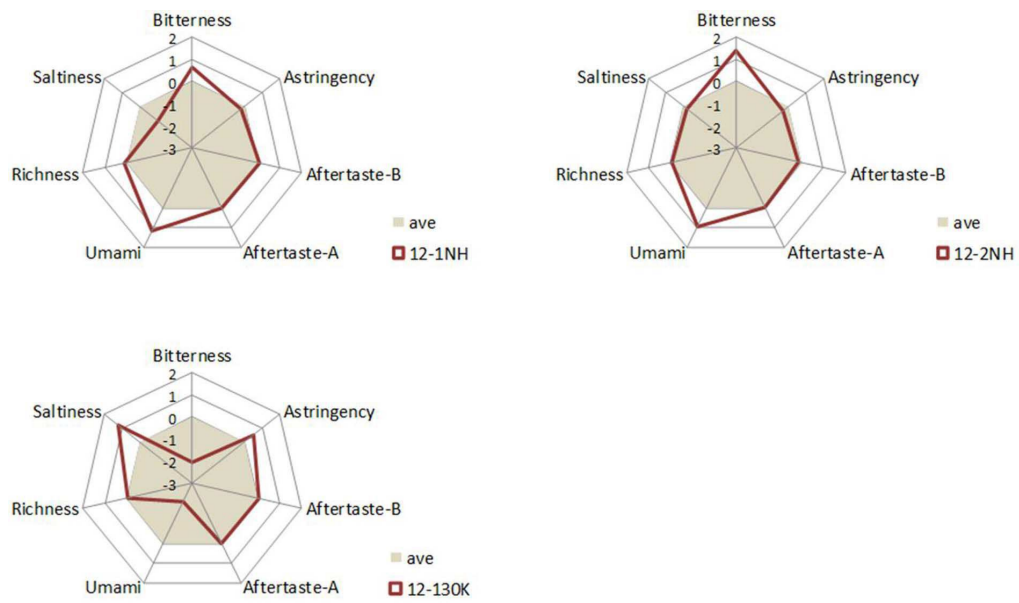
도면1



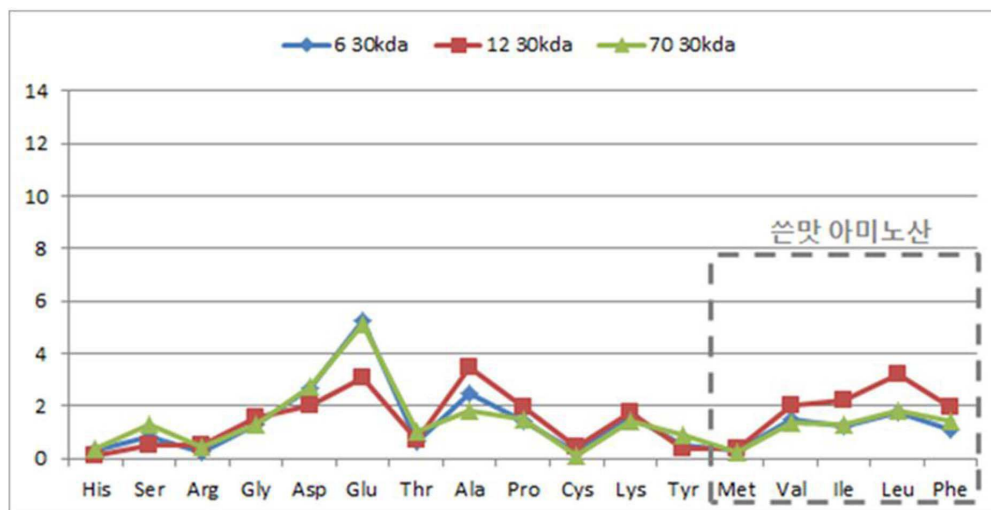
도면2



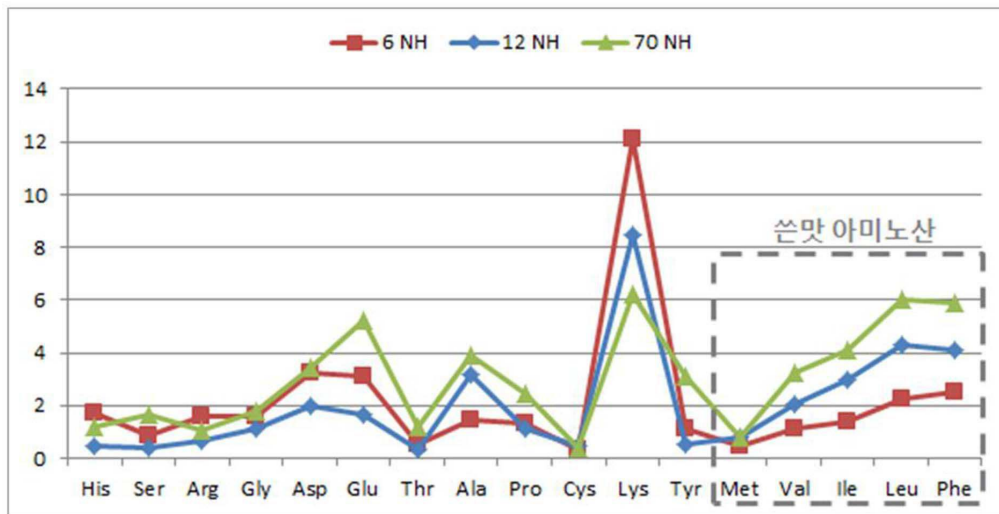
도면3



도면4a



도면4b



도면4c

