

최 중
연구보고서

반응향 기술을 이용한 기능성
대두 펩타이드 함유 savory 향 개발

Development of functional soy
peptide-containing savory flavor using reaction
flavor technology

연구기관
단국대학교

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “반응향 기술을 이용한 기능성 대두 펩타이드 함유 savory 향 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2008년 4월 24일

주관연구기관명 : 단국대학교

총괄연구책임자 : 백 형 희

협동연구기관명 : 한양대학교

협동연구책임자 : 이 현 규

요약문

I. 제목

반응향 기술을 이용한 기능성 대두 펩타이드 함유 savory향 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구의 최종목표는 반응향 기술을 이용하여 대두 단백질로부터 기호성과 기능성이 융합된 신개념의 savory향을 개발하고자 하였다. 현재 식품업계는 well-being 붐을 타고 beef-free한 savory향을 요구하고 있으며, 아울러 기능성이 더해진다면 이용범위가 다양할 것 이므로 대두 펩타이드가 함유된 savory향을 개발하고자 하였다. 이를 실현하기 위하여 대두 단백질로부터 가수분해도를 달리한 대두 펩타이드를 제조한 후 생리활성을 측정하고 반응향 기술을 이용하여 savory향을 생성하기 위한 최적조건을 구하여 기호성과 기능성이 융합된 savory향을 개발하고자 하였다. 또한 대두 펩타이드의 생리활성을 검색하고, 우수 생리활성을 나타내는 펩타이드를 분리, 정제한 후 조성을 분석 한 후, 이를 기초로 실제 가공적성을 확인하여 부가가치가 높은 생리활성 함유 가공음료 개발에 필요한 기능성 소재 연구 자료를 제공하고자 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 효소별, 가수분해도에 따른 대두단백질 가수분해물 제조 및 대두단백질 분해효소 선별
2. RSM을 이용하여 최적화된 대두펩타이드 가수분해 반응향 제조
3. 최적화된 대두단백질 가수분해반응물의 향미특성 분석 및 단백질 가수분해도에 따른 savory향의 향미특성분석
4. 대두단백질 가수분해물을 이용한 기능성 음료 및 savory향 제품개발

5. ACE 저해활성을 보이는 대두단백질 가수분해반응향으로 부터 한외 여과법 및 다양한 컬럼법을 이용하여 ACE 저해활성 펩타이드를 분리 정제
6. 대두단백질 가수분해반응향과 단계별로 분리된 분획별 아미노산 조성 분석
7. 대두단백질 가수분해반응향의 pH와 온도에 따른 ACE 저해활성 변화 및 용해도 지수 조사

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 대두단백질 가수분해물 제조 및 대두 단백질 가수분해물의 쓴맛 측정

상업용 효소를 이용하여 대두 단백질 가수분해물을 제조하고 각각의 효소 및 가수분해도에 따른 쓴맛을 TNBS 법을 이용하여 측정하였다. 6가지 상업용 효소(Flavourzyme, Protamex, Bromelain, Neutrase, Papain, Alcalase)를 시간에 따른 가수분해도를 측정하였고, 각각의 가수분해물의 쓴맛을 TDA 법을 이용하여 측정하여 효소선발을 이용하였다.

2. RSM을 이용하여 최적화된 대두단백질 가수분해 반응향 제조

Savory향 생성 반응조건 최적화하기 위해 위의 연구를 통하여 선발된 Flavourzyme과 Protamex로부터 생산된 가수분해물 및 전구물질을 이용하여 반응 표면분석법의 중심합성설계를 하고 이를 이용하여 반응표면분석을 실시하였다. 종속 변수인 기호도 및 쓴맛에 영향을 미치는 변수간의 관계를 분석하였다. Regression equation을 이용하여 contour plot을 그려 각각의 독립변수의 영향을 분석하였다. Savory 향 생성의 최적조건은 종속변수에 따라 최적조건을 확인하였다. 기호도에 미치는 영향은 Flavourzyme을 사용한 경우는 DH, cysteine, glucose, thiamine의 순으로 나타났으며, 특히 DH와 cysteine이 기호도에 크게 영향을 미치는 인자로 생각되어 진다. Protamex의 경우는 cysteine, glucose, thiamine, DH 순으로 나타났으며, cysteine과 glucose 함량이 기호도에 큰 영향을 미치는 인자로 생각되어 진다. Flavourzyme으로 효소 처리한 가수분해물을 이용하여 향 제조 시 DH의 경우에는 대부분 DH가 10% 이하 (coded level 0 이하)에서 최적의 기호도를 나타내었다. 또한 DH와 함께 큰 영향을 나타내는 cysteine의 함량은 2% (coded level = 0) 부근에서 가장 높은 기호도를 나타내었는데 DH와 cysteine의 함량의 변화를 이

용하여 나타낸 contour plot을 확인해 보면 DH 7.2%, cysteine 1.8%에서 가장 높은 기호도를 나타내었다. 쓴맛의 강도에 미치는 영향은 Flavourzyme을 사용한 경우는 DH, glucose, cysteine, thiamine의 순으로 나타났다. 쓴맛의 경우는 기호도와는 달리 다른 독립변수에 비하여 DH가 큰 영향을 나타내는 것으로 확인되었다. 이는 Protamex의 경우에서도 마찬가지로 확인되었으며 Protamex의 경우 DH, cysteine, glucose, thiamine 순으로 나타났다. 그러나 Flavourzyme 처리와는 달리 cysteine 또한 쓴맛에 큰 영향을 나타냄을 확인 할 수 있었다. Protamex로 효소 처리한 가수분해물을 이용하여 향 제조 시 가장 높은 영향을 나타내는 cysteine의 경우에는 2% (coded level 0 이하)에서 부근에서 최적의 기호도를 나타내었다. 그러나 2% 이상이거나 그 이하에서는 기호도가 크게 감소하는 경향을 보였다. Glucose 함량은 cysteine과 마찬가지로 coded level이 0 (5%)에서 가장 높은 기호도를 나타내었으나 다른 범위에서는 기호도의 감소를 나타내었다. Cysteine과 glucose의 함량의 변화를 이용하여 나타낸 contour plot을 확인해 보면 cysteine 1.8%, glucose 4.5%에서 가장 높은 기호도를 나타내었다.

3. 최적화된 대두단백질 가수분해반응물의 향미특성 분석 및 단백질 가수분해도에 따른 savory향의 향미특성분석

최적화된 대두단백질가수분해반응물의 휘발성 성분을 solvent assisted flavor evaporation (SAFE)을 이용하여 추출하고 gas chromatography(GC)-mass spectrometry(MS)를 이용하여 분석한 결과 Protamex를 이용하여 제조된 savory 향에서는 81개, Flavourzyme을 이용한 경우 93개의 휘발성 성분이 동정되었다. 이 중 GC-olfactometry(O)를 통하여 최적화된 대두단백질가수분해반응물의 특징적인 향기성분을 동정한 결과 methional(no. 22, potato-like)이 가장 큰 log₃FD 값을 나타내어 최적화된 대두단백질가수분해반응물에서 중요한 향기성분으로 확인되었으며, 이외에 , 2-methyl-3-furanthiol(no. 1, meat-like), diacetyl(no. 1, buttery), 2-ethyl-3,5 -dimethyl pyrazine(no. 49, nutty), phenylacetaldehyde(no. 42, floral)도 중요한 향기성분으로 확인되었다.

대두 단백질 가수분해물의 가수분해도 및 전구물질에 따른 향기성분의 변화를 분석하기 위하여 반응표면분석법을 사용하여, 종속변수인 methional, 2,4-dimethyl pyrazine, phenylacetaldehyde, 2-ethyl-3,5-dimethyl pyrazine의 생성에 미치는 영향을 확인하였다. Protamex의 경우 methional은 glucose 4.5

~5.5%, cysteine 1.6~2.0%, DH 9~10%의 범위에서 최대의 함량을 나타내었다. 이외의 향기성분에서는 DH가 높을수록, glucose의 첨가량이 많을수록 생성되는 양이 증가됨이 확인되었다. Flavourzyme으로 처리 시, 4가지 모든 향기성분에서 동일한 결과를 나타내었다. DH가 높을수록, glucose의 첨가량이 많을수록 생성되는 양이 증가하였으나 cysteine 함량은 coded level 0 부근에서 낮은 함량이 생성되는 것으로 확인 되었다.

4. 대두단백질 가수분해물을 이용한 음료 및 savory 향 제품개발

SPI 가수분해물을 이용한 기능성 음료 제조를 최적화하기 위해 반응표면분석법을 이용하였다. 전체적인 기호도에서 serine을 사용한 시료에서는 serine과 glucose 함량이 증가할수록 맛에 대한 선호도도 증가하였으며, 특히 28% glucose를 첨가하였을 때 (coded level=0.8) serine의 함량이 증가할수록 맛에 대한 선호도도 크게 증가하였다. 또한 28% glucose 첨가 시 (coded level=0.8) 반응 3시간 일 때 (coded level=0) 가장 높은 맛의 선호도를 나타내었다. Glycine으로 제조한 시료의 경우 10% 이상의 glucose 첨가량의 범위(coded level=-1 이상)에서는 glycine 함량이 증가할수록 전체적인 기호도도 증가하였다. 또한 3시간 이하의 반응시간(coded level=0 이하)에서는 glucose 함량이 증가할수록 전체적인 기호도도 증가하였다.

천연과즙 농축액을 첨가하여 대두펩타이드 함유 기능성 음료를 제조하여 관능검사를 실시하였다. 향의 경우 자몽과 사과 농축액을 첨가한 시료의 선호도가 가장 우수하였으며, 복숭아, 레몬 및 오렌지를 첨가한 시료와 매실 농축액을 첨가한 시료순이었다. 전체적인 기호도에서는 대추를 첨가한 시료가 가장 우수하였으며, 레몬을 첨가한 시료가 높은 선호도를 나타내었다.

반응향 제조 기술을 이용하여 제조한 대두 단백질 가수분해물의 savory향 소재를 이용하여 제품화하였다. 대두 단백질 가수분해물 savory향 제품은 기존제품을 대신하여 savory향 소재로서의 가능성을 확인할 수 있었다.

5. 효소 종류별, 가수분해도별에 따른 대두단백질 가수분해물 제조 및 생리활성 (*in vitro*) 조사

단백질 당 Flavourzyme, Protamex, Bromelain, Papain, Neutrase을 각각 0.5% 처리하여 5분~24시간동안 50℃ water bath에서 가수분해하였다. 가수분

해에 사용한 5가지 protease 모두 시간이 증가함에 따라 가수분해도가 증가하였으며, 반응 3시간 이내에 급격하게 가수분해되어 6시간 이후에는 거의 반응을 보이지 않았다. 가수분해가 거의 완료된 시점인 6시간 가수분해시, Protamex와 Flavourzyme의 가수분해도는 각각 20.8%, 21.6%였으며, Neutrase, Papain, Bromelain은 18.9%, 16.7%, 14.9%로 Protamex와 Flavourzyme으로 처리한 경우보다 상대적으로 낮은 것으로 나타났다. 특히 Flavourzyme는 펩타이드의 노출된 아미노산 잔기로부터 아미노산을 유리시키는 exoprotease이므로 Alcalase 등 endoprotease보다 더 높은 가수분해도를 나타내는 것으로 보인다. 또한 효소 종류별, 가수분해도별에 따른 대두단백질 가수분해물을 대상으로 다양한 생리활성(ACE 저해활성, TBA, Ferric thiocyanate, SOD유사활성)을 측정하였다. ACE저해활성의 측정결과, Papain으로 처리하여 얻은 DH 12% 시료가 1 mg/mL 농도에서 63.03%로 높은 ACE저해 활성을 보였다. TBA와 Ferric thiocyanate를 측정한 결과 TBA는 항산화제로 알려져 있는 토코페롤에 비해서는 낮았지만 대부분의 효소 처리한 DH별 시료의 항산화 효과는 70% 이상으로 높았으며 DH(%)에 따라 증가하는 것으로 나타났다. 또한 Ferric thiocyanate도 대부분의 효소 처리한 시료가 DH(%)가 증가함에 따라 활성이 증가하였으며 DH가 12%인 경우 가장 높은 활성 증가를 보였다. 특히 5일 경과 시에는 대조군의 유지 변패도에 비해 Papain 69.26%, Bromelain 78.71%의 높은 항산화 효과를 보였다. SOD유사활성 측정결과, ACE저해활성과 유사하게 Protamex, Bromelain, Papain으로 처리한 경우 항산화 활성도 높았으며, DH(%)에 따라 활성이 증가하는 것으로 나타났다. 특히 DH 15%인 경우 Flavourzyme 13.83%, Protamex 44.93%, Papain 51.85%, Bromelain 99.17%, Neutrase 45.53%로 Bromelain이 가장 높은 활성을 보였다.

6. 최적화된 대두단백질 가수분해반응향의 생리활성(*in vitro*)조사

ACE 저해능과 SOD 유사활성에 대한 대두단백질가수분해반응물 제조조건을 최적화한 결과, Protamax로 가수분해한 대두단백질가수분해물의 최적조건으로 X_1 (DH): 2.22(%), X_2 (Glucose): 6.66(%), X_3 (Cysteine): 1.35(%), X_4 (Thiamin): 1.15(%)의 조건에서 시료를 제조하였다. 최적조건에서 제조된 대두단백질 가수분해반응향의 여러 생리활성을 탐색한 결과, ACE 저해능 52.25%와 SOD 유사활성 47.56%를 나타내었고, TBA와 Ferric thiocyanate는 활성이 나타나지 않았다. 따라서 이 후 대두단백질 가수분해반응향으로부터 ACE 저해 peptide를

분리 및 정제하였다.

7. 최적화된 대두단백질 가수분해반응향으로부터 ACE저해 peptide의 분리 및 정제
대두단백질 가수분해반응향으로부터 단계별로 분획한 fraction(분획전, <3kDa, G4, RG2, P3) 별의 ACE 저해활성물질을 분리한 결과, 0.53, 0.61, 0.79, 1.15와 4.69%/ug protein을 나타내었다. 따라서 대두단백질 가수분해반응향(0.53)의 활성에 비해 RP-HPLC에서 얻은 P3(4.69)의 경우 8.87배 정도 정제되었음을 알 수 있었다. 최종획분에 대한 구조동정을 시도하였으나 단일서열 구조 분석이 불가하여 분획별 아미노산 조성 변화로 분석 대체하였다.

8. 대두단백질 가수분해반응향으로부터 단계별로 분획한 fraction의 아미노산 조성 분석

대두단백질 가수분해반응향의 아미노산 조성을 분석한 결과, glutamic acid(21.4%), aspartic acid(13.8%), arginine(8.2%), leucine(6.8%), lysine(6.4%)의 순으로 나타났다. 각 단계 별 아미노산 조성을 분석한 결과로 <3kDa에서는 Asp/Asn조성이 상대적으로 높게 나타났다. FPLC 단계를 거친 활성이 가장 높은 RG-2에서는 산성 및 친수성 아미노산들인 Asp/Asn의 함량이 감소된 반면, Glu/Gln의 함량은 두드러지게 증가하였다. HPLC단계에서는 전반적으로 Asp/Asn와Glu/Gln의 함량은 두드러지게 증가하였고 활성이 가장 높았던 P3의 경우 His의 함량이 다소 증가함을 알 수 있었다. ACE저해물질이 peptide라는 것은 많은 연구결과에서 밝혀졌고, 이 peptide들의 C말단에는 tryptophan, phenylalanine, tyrosine, proline등, N말단에는 histidine을 비롯한 여러 방향족 아미노산들이 있으며, 이 peptide들은 ACE에 대해 angiotensin-I와 경쟁적으로 결합함으로써 ACE의 활성을 감소시키는 것으로 추정되고 있다(Kim et al., 1994; Cheung et al., 1980). Shin등(1995)은 ACE저해활성이 가장 높은 분획에서 아미노산 조성을 분석한 결과 염기성 아미노산인 histidine의 함량이 86.6%로 가장 높게 나타났다. 따라서 본 연구의 전반적인 아미노산 조성 분석결과 대두단백질 가수분해반응향에 비하여 8.87배 정제된 최종 획분인 P3에서 염기성 아미노산인 histidine의 함량이 9.3%로 다소 증가한 것으로 보았을 때 본 시료가 나타내는 ACE저해활성이 시료의 주성분인 histidine과 깊은 관련을 가진다고 예측되었다. 그러므로 본 연구결과 대두단백질 가수분해반응향는 식품에서의 다양한 활용과 함께 항고혈압관련 건강기능성 물질

의 개발을 위한 신소재로서의 활용 가능성이 높을 것이라 생각된다.

9. 대두단백질 가수분해반응물향의 pH와 온도에 따른 ACE 저해활성 변화 및 용해도 지수 조사

1) 대두단백질 가수분해반응향의 pH에 따른 ACE활성 변화

pH와 열처리에 따른 단백질의 변성이 ACE 저해활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 대두단백질 가수분해반응향의 한외여과 fraction 중 활성이 우수한 3 kDa이하 시료를 pH 2.0, 3.0, 7.0, 10.0, 12.0 에서 변성을 유도한 후 ACE 저해활성을 측정하였다. pH가 산성에서 중성으로 변함에 따라 ACE 저해활성은 증가하였고 이후 알칼리성이 강해짐에 따라 다시 감소하는 경향을 보였다. 그러나 변성을 유도하지 않은 시료에 비해 pH에 따른 변성이 유도됨으로써 ACE 저해활성은 유의적($p < 0.05$)으로 증가되는 것을 알 수 있었다. 또한 pH 7에서 변성된 경우 1.31%/ug protein의 ACE 저해활성을 보여 유의적으로 산성이나 알칼리 환경보다는 중성에서 ACE 저해활성의 증가가 최대화됨을 알 수 있었다($p < 0.05$).

2) 대두단백질 가수분해반응향의 열처리에 따른 ACE활성 변화

가장 높은 ACE 저해활성 변화를 나타낸 pH 7 환경에서 가열(30, 50, 70, 100°C에서 10분간)에 따른 변성을 유도한 후 ACE 저해 활성을 측정한 결과, 가열에 따른 변성은 모든 온도구간에서 유의적인 차이를 보이지 않았다($p < 0.05$). 70°C에서 변성을 유도한 시료의 경우 0.55%/ug protein의 높은 ACE 저해활성을 보였으나 유의적인 차이는 없었다($p < 0.05$).

3) 대두단백질 가수분해반응향의 pH와 열처리에 따른 수용성 용해도 지수 측정

대두단백질 가수분해반응향의 pH 변화가 용해도에 영향을 미치는지 알아보기 위하여 대두단백질 가수분해반응향의 한외여과 fraction 중 활성이 우수한 3 kDa이하 시료를 pH 3, 7, 10에서 변성을 유도한 후 용해도변화를 측정하였다. 각각의 pH에서 75.58%, 77.52%, 79.01%로 pH가 증가함에 따라 용해도가 조금씩 증가함을 보였으나 유의적인 차이는 없었다($p < 0.05$).

따라서 pH 7 환경에서 가열((30, 70, 100°C에서 10분간)에 따른 변성을 유도한 후 용해도변화를 측정하였다. 각각의 온도구간에서 91%, 90%, 92%로 가열에 따른 변성은 모든 온도구간에서 유의적인 차이를 보이지 않았다($p < 0.05$).

이상과 같이 대두단백질 가수분해반응향의 UF 활성분획인 분자량 3kDa이하 시료는 pH와 가열처리 등에 의하여 용해도 지수가 일정하게 유지됨을 알 수 있었다. 따라서 본 연구에서 분리한 ACE 저해활성 펩타이드는 우수한 생리활성뿐 아니라 안정된 가공적성 특성을 보임으로써 추후 기능성 식품 소재화로서의 가능성을 확인하였다.

SUMMARY

I. The subjective of project

Development of functional soy peptide-containing savory flavor using reaction flavor technology

II. The objectives and importance of project

Soybean, one of the most cultivated plants in the world is an important protein source and a potential source of various health effects. As the main components of soybean, soy proteins have been known to possess multiple health-promoting functions, including antioxidant, antitumor, hypocholesterolemic and antihypertensive properties. In addition, the proteolytic hydrolyzed peptides from the soy proteins have been receiving more and more attention since the functional and biological improvement of soybean peptides has been reported.

Previous studies have shown that numerous food-derived bioactive peptides have higher biological activities, such as antihypertensive, anticancer, antiobesity and antioxidant activities than intact protein. To understand the relation between various bioactivities and the principle hydrolysis condition, including enzyme used and DH, it is essential to know the bioactivities of hydrolysates with various DH using different proteolytic enzymes. So, this study was performed in order (1) to biological activities of soy protein hydrolysates and preparation of soy protein hydrolysates (savory flavor) by response surface analysis (RSM), (2) to isolation and purification of bioactive peptide and amino acid compositions analysis, and (3) to peptide of outstanding bioactivity and study on the Processing Adaptability.

III. Scopes of the project

1. Hydrolyzed soy protein isolate and evaluation of bitterness in enzymatic hydrolysates
2. Development of soy protein-containing savory flavor by response surface analysis (RSM)
3. Analysis of volatile compounds from optimized meat-like process flavors for degree of hydrolysis
4. Development of soy protein-containing savory flavor and functional food
5. Preparation of soy protein isolate hydrolysates and its biological activities by difference proteases, degree of hydrolysis
5. Preparation of soy protein isolate hydrolysates (savory flavor) by response surface analysis (RSM)
6. Isolation and purification of ACE inhibitory peptides from soy protein isolate hydrolysate (savory flavor)
7. Amino acid compositions analysis
8. Peptide of outstanding bioactivity and study on the Processing Adaptability

IV. The results and Recommendation

1. Hydrolyzed soy protein isolate and its biological activities by difference proteases, degree of hydrolysis

SPI was hydrolyzed by commercial protease, and the bitterness of enzymatic hydrolyzed SPI was evaluated by taste dilution analysis (TDA) and compared bitterness of SPI hydrolysates with respect to kinds of proteases and DH. SPI was hydrolyzed to obtain various DH with six commercial proteases (Flavourzyme, Alcalase, Neutrase, Protamex, papain, and bromelain) and The DH of enzymatic hydrolysates was measured. To select proteases, the bitterness of enzymatic hydrolysates was evaluated by TDA, which is based on threshold detection in serially diluted samples.

2. Development of soy protein-containing savory flavor by response surface analysis (RSM)

Response surface methodology (RSM) was used to optimize reaction conditions of meat-like process flavor, such as DH, glucose (%), cysteine (%), and thiamine (%). Central composite experimental design having four independent variables (DH, glucose, cysteine, and thiamin) with five levels was used to optimize reaction conditions. For Flavourzyme, DH was the most important factor that affected overall liking and bitterness of a meat-like process flavoring. Cysteine and glucose affected aroma quality of a meat-like process flavoring with little influence on bitterness. For overall liking, optimum levels of DH, glucose, and cysteine were 8~10%, 4~6%, and 1.5~2.5%, respectively. For bitterness, optimum DH was 5~8%. At optimum DH, bitterness increased as amount of precursors (glucose, cysteine, and thiamine) increased. For Protamex, DH was the most important factor on bitterness, while it had little effect on overall liking. Cysteine and glucose were important factor on overall liking of a meat-like process flavoring. Optimum conditions of glucose and cysteine were 4.0~5.0% and 1.2~1.6%. At optimum amounts of glucose and cysteine, overall liking increased as DH decreased and thiamine increased. For bitterness, low DH range presented low bitterness. As a result, optimum reaction conditions for a meat-like process flavoring from Flavourzyme-hydrolyzed SPI were determined to be DH 9.4%, glucose 4.9%, cysteine 1.8%, and thiamin 1.1%. Those from Protamex-hydrolyzed SPI were DH 2.5%, glucose 4.5%, cysteine 1.4%, and thiamin 0.5%.

3. Analysis of volatile compounds from optimized meat-like process flavors for degree of hydrolysis

Volatile compounds in optimized meat-like process flavors were isolated by high vacuum distillation using solvent assisted flavor evaporation (SAFE). To identify characteristic volatile compounds of the meat-like process flavoring, gas chromatography-mass spectrometry-olfactometry

was used. A total of 93 and 81 volatile compounds were identified by using Flavourzyme and Protamex, respectively. Also Fifteen aroma-active compounds were detected in a meat-like process flavoring by GC-MS-O. Methional (potato-like) was the most intense aroma active compound, followed by 2-methyl-3-furanthiol (2-MF, meat-like). In addition, diacetyl (buttery), 2-ethyl-3,5-dimethyl pyrazine (nutty) and phenylacetaldehyde (floral) play significant roles in the aroma of a meat-like process flavoring. Response surface methodology (RSM) was used to identify with formation effect of aroma-active compounds of meat-like process flavor, such as methional, 2,4-dimethyl pyrazine, phenylacetaldehyde, 2-ethyl-3,5-dimethyl pyrazine. For Protamex, optimum level of methional concentration were glucose 4.5~5.5%, cysteine 1.6~2.0%, DH 9~10%. Concentration of other aroma-active compounds increased as DH and glucose (%) increased. For Flavourzyme, optimum conditions were presented similar result. As Concentration of all aroma-active compounds increased as DH and glucose (%) increased. At 2% cysteine concentration (coded level=0), aroma-active compounds were presented low concentration.

4. Development of soy protein-containing savory flavor and functional food

Response surface methodology (RSM) was used to optimize reaction conditions of soy protein-containing functional beverage, such as reaction time, glucose (%), and amino acid (%). For serine, overall liking increased as serine and glucose (%). At 28% glucose concentration (coded level=0.8), taste increased as serine concentration increased. Maximum value of taste was presented at the 28% glucose concentration and 3 h reaction time. For glycine, overall liking was increased with increasing glycine above 10% glucose concentration or below 3 h reaction time.

Soy protein-containing functional beverages were processed with natural fruit concentrate and it was evaluated by sensory test. For flavor, soy protein-containing functional beverage added with apple and grapefruit

was the most preference, followed by peach, lemon and orange, and japanese apricot. For overall liking, soy protein-containing functional beverage added with jujube was the most preference followed by lemon.

To evaluate the application of meat-like process flavor using reaction flavor technology, savory flavor was prepared. It was thought that meat-like process flavor could be applied to final products such as seasoning, sauce and soup.

5. Preparation of soy protein isolate hydrolysates and its biological activities by difference proteases, degree of hydrolysis

For the preparation of soy protein isolate hydrolysates, soy protein isolate (10%, w/v) was incubated with five different proteolytic enzymes, including Flavourzyme, Protamex, Bromelain, Papain and Neutrase (0.5% of protein content) for 24hr at 50° C. SPI was hydrolyzed by five different enzymes, Protamex, Flavourzyme, Bromelain, Papain and Neutrase; SPI hydrolysates with DH of 20.8, 21.6, 14.9, 16.7 and 18.9% were produced. This result could be due to the fact that Flavourzyme contains both endoprotease and exoprotease activities (32), and produces hydrolysates having higher DH values than other enzymes.

6. Preparation of soy protein isolate hydrolysates (savory flavor) by response surface analysis (RSM)

Preparation of soy protein isolate hydrolysates(savory flavor) was hydrolyzed using Protamex by response surface analysis ((RSM); X_1 (DH): 2.22(%), X_2 (Glucose): 6.66(%), X_3 (Cystein): 1.35(%), X_4 (Thiamin): 1.15(%)). Antioxidant and antihypertensive activities of soy protein isolate hydrolysates(savory flavor) were examined. Antioxidant activity of soy protein isolate hydrolysates(savory flavor) was evaluated in terms of TBA, ferric thiocyanate, and SOD-like activity. ACE inhibitory activity and SOD-like activity were 52.25% and 47.56% respectively. TBA and ferric thiocyanate were not activity.

ACE inhibitory peptides were isolated from soy protein isolate hydrolysates (savory flavor) using ultrafiltration, gel filtration chromatography, and HPLC.

7. Isolation and purification of ACE inhibitory peptides from soy protein isolate hydrolysate (savory flavor)

The ACE inhibitory activity (specific activity) of the fraction (less than 3 kDa) through UF were 0.61%/ug protein. The fraction was subjected to consecutive chromatographic separations. The eluate from gel filtration chromatography (Superdex Peptide 10/300 GL column) was divided into five major fractions. Among them, the fraction G4 had the highest ACE inhibitory activity (specific activity = 0.79%/ug protein). It was lyophilized and subjected to gel filtration re-chromatography. Among three fractions, fraction RG2 (specific activity = 1.15%/ug protein) was further separated by RP-HPLC (reverse phase preparative-high performance liquid chromatography) with a linear gradient from 0% to 100% acetonitrile containing 0.1% TFA at a flow rate of 1 mL/min and fractionated into three fractions. The highest the ACE inhibitory activity was in fraction P3 (8.87%/ug protein). The ACE inhibitory peptide was purified 8.87-fold from soy protein isolate hydrolysate (savory flavor) using a five-step purification procedure.

8. Amino acid compositions analysis

Amino acid composition of ACE inhibitory peptide was purified 8.87-fold from soy protein isolate hydrolysate (savory flavor) using a five-step purification procedure was mainly consisted of His, which was one of the representative basic amino acid. Based on our results, we suggest that His with basic amino acid contributed greatly for observed ACE inhibitory activity.

9. Effect of pH and temperature on the Angiotensin I converting enzyme

(ACE) inhibitory activity of UF fraction (< 3 kDa) obtained from soy protein isolate hydrolysate (savory flavor)

The effect of pH and heating temperature on ACE inhibitory activity of the UF fraction (less than 3 kDa) of soy protein isolate hydrolysates (savory flavor) was investigated for the evaluation of potential for industrial application. ACE inhibitory activity increased as pH increased from 2 to 7 but decreased as pH increased after 7. ACE inhibitory activity increased by pH but was not significantly affected by heating ($p < 0.05$).

10. Solubility profiles of UF fraction (< 3 kDa) obtained from soy protein isolate hydrolysate (savory flavor) through ultrafiltration of Temperature.

Solubility profiles of UF fraction (< 3 kDa) obtained from soy protein isolate hydrolysate (savory flavor) through ultrafiltration of pH and temperature. The solubility was not significantly affected by pH and temperature ($p < 0.05$).

These results demonstrated that the ACE inhibitory peptide from soy protein isolate hydrolysate (savory flavor) may be useful as a functional food ingredient with antihypertensive activity.

CONTENTS

Chapter 1. Outline of research	30
Section 1. Purpose of research	30
Section 2. Necessity of research	30
Section 3. Scope and cultural aspects	36
Chapter 2. The present situation of technology development	37
Chapter 3. Results and discussion	41
Section 1. Development of savory flavoring and functional food using reaction flavor technology from soy protein isolate	41
1. Materials and methods	41
A. Selection of protease	41
1) Materials	41
2) Enzymatic hydrolysis	41
A) Protease activity	41
B) Enzymatic hydrolysis of SPI	42
C) Determination of degree of hydrolysis	42
3) Sensory analysis	43
B. Production of meat-like process flavors for degree of hydrolysis	43
1) Production of SPI hydrolysates for degree of hydrolysis	43
2) Selection of precursor	43
3) Optimization of reaction condition of meat-like process flavorings from SPI hydrolysates	44
A) Response surface methodology	44
B) Sensory evaluation	44
C) Production of meat-like process flavors	44
C. Analysis of volatile compounds from optimized meat-like process flavors	48
1) Analysis of volatile compounds from optimized meat-like process flavors	48
A) Solvent assisted flavor evaporation(SAFE)	48

B) Gas chromatography–mass spectrometry–olfactometry (GC–MS– O)	48
(1) Gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS)	48
(2) Gas chromatography–olfactometry (GC–O)	48
(3) Identification of volatile compounds	49
(4) Quantification of volatile compounds	49
D. Analysis of volatile compounds from optimized meat–like process flavors for degree of hydrolysis	50
1) Solid phase microextraction (SPME)	50
2) Gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS)	50
3) Analysis of change of volatile compounds using RSM	50
E. Development of savory flavor and functional food from soy protein isolate	53
1) Materials	53
2) Methods	53
A) Production of functional soy peptide–containing beverage using Maillard reaction	53
(1) Selection of precursor	53
(2) Optimization of production condition of functional soy protein–containing beverage	53
B) Production of functional soy peptide–containing beverage added natural fruit concentrate	56
C) Development of soy peptide–containing savory flavor	56
D) Sensory evaluation	56
E) Statistical analysis	56
2. Results and discussion	59
A. Selection of protease	59
1) Protease activity	59
2) Enzymatic hydrolysis of SPI	59
3) Evaluation of bitterness in enzymatic hydrolysates of SPI	69
B. Optimization of reaction condition of savory flavor	77

1) Optimization of reaction condition of savory flavor using RSM	77
C. Analysis of volatile compounds from optimized meat-like process flavors	88
1) Identification of volatile compounds from optimized meat-like process flavors	88
2) Identification of aroma-active compounds from optimized meat-like process flavors	89
D. Analysis of volatile compounds from optimized meat-like process flavors for degree of hydrolysis	99
1) Analysis of change of volatile compounds using RSM	99
E. Development of savory flavor and functional food from soy protein isolate	114
1) Production of functional soy protein-containing beverage using Maillard reaction	114
A) Selection of precursor	114
B) Optimization of production condition of functional soy protein-containing beverage	114
2) Production of functional soy protein-containing beverage added natural fruit concentrate	128
3) Development of soy-containing savory flavor	128
Section 2. Biological activities research and sequencer analysis of functional soy peptide	135
1. Materials and methods	135
A. Biological activities of soy protein isolate hydrolysates by difference proteases, degree of hydrolysis and preparation of soy protein isolate hydrolysates(savory flavor) by response surface analysis(RSM)	135
1) Preparation of soy protein isolate hydrolysates and its biological activities by difference proteases, degree of hydrolysis	135
A) Preparation of soy protein isolate hydrolysates by degree of hydrolysis	135
B) Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity of soy	

protein isolate hydrolysates	135
C) Effect on antioxidant of soy protein isolate hydrolysates	135
(1) Thiobarbituric acid(TBA) values of soy protein hydrolysate by variety hydrolase	136
(2) Ferric thiocyanate values of soy protein hydrolysate by variety hydrolase	136
(3) Superoxide dismutase(SOD)-liked activity(%) of soy protein hydrolysate by variety hydrolase	136
(4) MTT assay of the soy protein hydrolysate	137
2) Preparation of soy protein isolate hydrolysates(savory flavor) by response surface analysis(RSM)	137
B. Isolation and purification of ACE inhibitory peptides and amino acid compositions analysis from soy protein isolate hydrolysate (savory flavor)	139
1) General component and molecular weight distribution characterization of soy protein isolate hydrolysate (savory flavor)	139
A) General component analysis	139
B) Molecular weight distribution analysis	139
2) Isolation and purification of ACE inhibitory peptides from soy protein isolate hydrolysate (savory flavor)	139
A) Ultrafiltration	139
B) Gel filtration chromatography	141
C) Re-gel filtration chromatography	141
D) Reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC)	141
E) Protein Quantity	145
3) Amino acid compositions analysis	145
C. Peptide of outstanding bioactivity and study on the Processing Adaptability	145
1) Effect of pH and temperature on the Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity of UF fraction (< 3 kDa) obtained from soy	

protein isolate hydrolysate (savory flavor)	145
A) Effect of pH on the Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity of UF fraction (< 3 kDa) obtained from soy protein isolate hydrolysate (savory flavor)	145
B) Effect of temperature on the Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity of UF fraction (< 3 kDa) obtained from soy protein isolate hydrolysate (savory flavor)	147
2) Solubility profiles of UF fraction (< 3 kDa) obtained from soy protein isolate hydrolysate (savory flavor) through ultrafiltration of pH and Temperature	147
3) SPSS	147
2. Results and discussion	148
A. Biological activities of soy protein isolate hydrolysates by difference proteases, degree of hydrolysis and preparation of soy protein isolate hydrolysates(savory flavor) by response surface analysis(RSM)	148
1) Preparation of soy protein isolate hydrolysates and its biological activities by difference proteases, degree of hydrolysis	148
A) Preparation of soy protein isolate hydrolysates by degree of hydrolysis	148
B) Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity of soy protein isolate hydrolysates	150
C) Effect on antioxidant of soy protein isolate hydrolysates	150
(1) Thiobarbituric acid(TBA) values of soy protein hydrolysate by variety hydrolase	150
(2) Ferric thiocyanate values of soy protein hydrolysate by variety hydrolase	150
(3) Superoxide dismutase(SOD)–liked activity(%) of soy protein hydrolysate by variety hydrolase	154
2) Preparation of soy protein isolate hydrolysates(savory flavor) by response surface analysis(RSM)	156
A) Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity of soy	

protein isolate hydrolysates (savory flavor)	156
B) Effect on antioxidant of soy protein isolate hydrolysates (savory flavor)	160
C) MTT assay of the soy protein hydrolysate (savory flavor)	166
B. Isolation and purification of ACE inhibitory peptides and amino acid compositions analysis from soy protein isolate hydrolysate (savory flavor)	172
1) General component and molecular weight distribution characterization of soy protein isolate hydrolysate (savory flavor)	172
A) General component analysis	172
B) Molecular weight distribution analysis	172
C) Biological activities (<i>in vitro</i>) of soy protein isolate hydrolysates of soy protein isolate hydrolysates(savory flavor) by response surface analysis(RSM)	172
3) Isolation and purification of ACE inhibitory peptides from soy protein isolate hydrolysate (savory flavor)	172
A) Ultrafiltration	172
B) Gel filtration chromatography	175
C) Re-gel filtration chromatography	175
D) Reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC)	178
E) Step of Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity	178
4) Amino acid compositions analysis	181
C. Peptide of outstanding bioactivity and study on the Processing Adaptability	183
1) Effect of pH and temperature on the Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity of UF fraction (< 3 kDa) obtained from soy protein isolate hydrolysate (savory flavor)	183
A) Effect of pH on the Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity of UF fraction (< 3 kDa) obtained from soy protein isolate	

hydrolysate (savory flavor)	183
B) Effect of temperature on the Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity of UF fraction (< 3 kDa) obtained from soy protein isolate hydrolysate (savory flavor)	183
2) Solubility profiles of UF fraction (< 3 kDa) obtained from soy protein isolate hydrolysate (savory flavor) through ultrafiltration of pH and Temperature	186
Chapter 4. Accomplishment and contribution to the related area	189
Chapter 5. Application plan	193
Chapter 6. References	195
Chapter 7. Appendix	205

목 차

제 1장 연구개발과제의 개요	30
제 1절 연구개발의 목적	30
제 2절 연구개발의 필요성	30
제 3절 연구개발의 범위	36
제 2장 국내외 기술개발 현황	36
제 3장 연구개발 수행내용 및 결과	37
제 1절 반응향 기술을 이용한 대두 단백질로부터 신개념 savory향 및 기능성 식품 개발	41
1. 재료 및 방법	41
가. 대두 단백질 분해효소 선발	41
1) 실험재료	41
2) Enzymatic hydrolysis	41
가) 단백질 분해효소 역가측정	41
나) 대두 단백질의 가수분해	42
다) 가수분해도 측정	42
3) 관능검사	43
나. 가수분해도에 따른 savory향 제조	43
1) 가수분해 정도에 따른 대두 단백질 가수분해물의 제조	43
2) 전구물질 선정	43
3) Savory향 제조의 최적화	44
가) 반응표면분석법 (Response surface methodology, RSM)	44
나) 관능검사	44
다) 대두 단백질 가수분해물의 savory향 제조	44
다. 최적화된 대두 단백질 가수분해물 savory향 향기성분 분석	48
1) 최적화된 대두 단백질 가수분해물 savory향의 향기성분 분석	48
가) Solvent assisted flavor evaporation(SAFE)법을 이용한 최적화된 savory 향의 향기성분 추출	48
나) Gas chromatography-mass spectrometry-olfactometry (GC-MS-O)를 이용한 향미특성 분석	48

(1) Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)	48
(2) Gas chromatography-olfactometry (GC-O)	48
(3) 휘발성 향기성분의 동정	49
(4) 휘발성 향기성분의 정량	49
라. 단백질 가수분해도에 따른 savory향의 향미특성분석	50
1) Solid phase microextraction(SPME)를 이용한 savory 향의 향기성분 추출	50
2) Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)	50
3) 반응표면분석을 이용한 향기성분의 변화 분석	50
마. 대두 단백질 가수분해물을 이용한 savory향 제품 및 기능성 음료의 개발	53
1) 실험재료	53
2) 실험방법	53
가) Maillard reaction을 이용한 대두펩타이드 함유 기능성 음료의 제조	53
(1) 전구물질 선정	53
(2) 대두 단백질 가수분해물을 이용한 기능성 음료 제조의 최적화 ...	53
나) 천연과즙 농축액을 첨가한 대두펩타이드 함유 기능성 음료의 제조 ...	56
다) 대두 단백질 가수분해물 savory향 제품 개발	56
라) 관능검사	56
마) 통계처리	56
2. 결과 및 고찰	59
가. 대두단백질 분해효소 선발설정	59
1) 효소 역가 측정	59
2) 대두 단백질의 효소적 가수분해	59
3) 대두 단백질 가수분해물의 쓴맛 측정	69
나. Savory향 생성 반응조건 최적화	77
1) 반응표면분석을 이용한 savory향 생성 반응조건 최적화	77
다. 최적화된 대두단백질가수분해반응물(savory향)의 향미특성 분석	88
1) 최적화된 대두단백질가수분해반응물(savory향)의 휘발성 성분	88
2) 최적화된 대두단백질가수분해반응물의 특징적인 향기 성분 동정	89
라. 단백질 가수분해도에 따른 savory향의 향미특성분석	99

1) 반응표면분석을 이용한 향기성분의 변화 분석	99
마. 대두 단백질 가수분해물을 이용한 기능성 음료의 개발	114
1) Maillard reaction을 이용한 대두 펩타이드 함유 기능성 음료 개발	114
가) 전구물질 선정	114
나) SPI 가수분해물을 이용한 기능성 음료 제조의 최적화	114
2) 천연과즙 농축액을 첨가한 대두 펩타이드 함유 기능성 음료의 제조	128
3) 대두 단백질 가수분해물 savory향 제품 개발	128
제 2절 기능성 대두 펩타이드의 생리활성 탐색 및 구조 분석	135
1. 재료 및 방법	135
가. 가수분해도에 따른 대두 단백질 가수분해물의 생리활성 탐색 및 RSM을 이 용한 대두 펩타이드 생성의 반응조건 최적화	135
1) 효소 종류별, 가수분해도별에 따른 대두 단백질 가수분해물 제조 및 생리 활성 측정	135
가) 가수분해 정도에 따른 대두 단백질 가수분해물 제조	135
나) 대두단백질 가수분해반응의 ACE 저해능 조사	135
다) 대두단백질 가수분해물의 항산화 효과 조사	135
(1) TBA 법에 의한 측정	136
(2) Ferric thiocyanate 법에 의한 측정	136
(3) Superoxide dismutase(SOD)-liked activity 측정	136
라) 대두단백질 가수분해물의 항암활성 조사	137
2) RSM에 의한 대두단백질가수분해반응향의 최적화	137
나. 생리활성 우수 펩타이드 분리, 정제 및 아미노산 조성 분석	139
1) 최적화된 대두단백질가수분해반응향의 일반성분 및 분자량 분포 특성분석	139
가) 일반성분 분석	139
나) 분자량 분포 분석	139
2) 대두단백질가수분해반응향로부터 ACE저해 peptide의 분리 및 정제	139
가) 한외 여과법(Ultrafiltration)	139
나) Gel filtration chromatography	141
다) Re-gel filtration chromatography	141
라) Reverse phase high performance liquid chromatography	

(RP-HPLC)	141
마) 단백질 정량	145
3) 아미노산 조성 분석	145
다. 우수한 생리활성을 갖는 펩타이드 및 아미노산 가공적성 연구	145
1) 대두단백질가수분해반응향의 pH와 열처리에 따른 ACE 저해활성 변화	145
가) 대두단백질가수분해반응향의 pH에 따른 ACE활성 변화	145
나) 대두단백질가수분해반응향의 열처리에 따른 ACE활성 변화	147
2) 대두단백질가수분해반응향의 pH와 열처리에 따른 수용성 용해도 지수 측정	147
3) 통계처리	147
2. 결과 및 고찰	148
가. 가수분해도에 따른 대두 단백질 가수분해물의 생리활성 탐색 및 RSM을 이용한 대두 펩타이드 생성의 반응조건 최적화	148
1) 가수분해 정도에 따른 대두단백질 가수분해물 제조	148
가) 가수분해 정도에 따른 대두단백질 가수분해물 제조	148
나) 대두단백질 가수분해물의 ACE 저해능 조사	150
다) 대두단백질 가수분해물의 항산화 효과 조사	150
(1) TBA 법에 의한 측정	150
(2) Ferric thiocyanate 법에 의한 측정	150
(3) Superoxide dismutase(SOD)-liked activity 측정	154
2) RSM에 의한 대두단백질가수분해반응향의 최적화	156
가) 대두단백질가수분해반응향의 ACE 저해능 조사	156
나) 대두단백질가수분해반응물향의 항산화효과 조사	160
다) 대두단백질가수분해반응향의 암세포독성 효과 조사	166
나. 생리활성 우수 펩타이드 분리, 정제 및 아미노산 조성 분석	172
1) 최적화된 대두단백질가수분해반응향의 일반성분 및 분자량 분포 특성분석	172
가) 일반성분 분석	172
나) 분자량 분포 분석	172
2) 최적화된 대두단백질가수분해반응향의 생리활성 (<i>in vitro</i>) 조사	172

3) 최적화된 대두단백질가수분해반응향로부터 ACE저해 peptide의 분리 및 정제	172
가) 한외 여과법(Ultrafiltration)	172
나) Gel filtration chromatography	175
다) Re-gel filtration chromatography	175
라) Reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC)	178
마) 단계별 ACE 저해활성	178
4) 아미노산 조성 분석	181
다. 우수한 생리활성을 갖는 펩타이드 및 아미노산 가공적성 연구	183
1) 대두단백질가수분해반응향의 pH와 열처리에 따른 ACE 저해활성 변화	183
가) 대두단백질가수분해반응향의 pH에 따른 ACE활성 변화	183
나) 대두단백질가수분해반응향의 열처리에 따른 ACE활성 변화	183
2) 대두단백질가수분해반응향의 pH와 열처리에 따른 수용성 용해도 지수 측정	186
제4장 목표달성도 및 관련 분야에의 기여도	189
제5장 연구개발결과의 활용계획	193
제6장 참고문헌	195
제7장 부록	205

제 1장 연구개발과제의 개요

제 1절 연구개발의 목적

“반응향 기술을 이용한 기능성 대두 펩타이드 함유 savory향 및 기능성 식품 개발을 통한 고부가가치 상품 소재화를 통한 소득 증대” 라는 최종목표를 추구하고자 다음과 같은 세부목적을 가지고 본 과제를 수행하였다.

- 반응향 기술을 이용하여 대두 단백질로부터 기호성과 기능성이 융합된 신개념의 savory향 및 기능성 식품 개발
- 기능성 대두 펩타이드의 생리활성 탐색 및 구조 분석

제 2절 연구개발의 필요성

Process flavor란 전구물질로부터 어떤 형태의 가공을 통해 향을 생산하는 기술을 말하는 것으로 주요 가공 열처리 및 효소작용을 들 수 있으며 특히, 가열에 의해 향을 생산하는 기술을 reaction flavor(반응향) 기술이라고 하는데, 식생활 패턴의 변화에 따른 간편 편의식품의 수요증가는 반응향 기술을 이용한 process flavor 개발을 요구하고 있다. 이들은 약 30년 전부터 상업적으로 이용되어 왔으며 현재 상업적으로나 연구 분야 모두에서 중요한 위치를 차지하고 있고 반응향 기술은 Maillard 반응을 이용하여 전구물질로부터 savory 향(주로 고기향)을 생산하는 기술로 전구물질 및 반응조건에 따라 특이적인 향을 제조할 수 있다 (Figure 1).

현재 식품업계는 광우병으로 인해 소고기에서 유래하지 않는(beef-free) savory향의 생산을 절실히 요구하고 있으며 MCPD에 의한 안전성 문제등으로 인해 산분해 HVP보다 효소분해 HVP의 수요가 급증하였다. 특히 동물성 단백질보다는 식물성 단백질의 수요가 많이 증가하였는데, 이러한 점에서 대두 단백질은 savory 향(또는 beef enhancer, beef booster)의 좋은 급원이다. 대두 단백질을 가수분해도(degree of hydrolysis, DH)를 조절해서 효소분해 했을 경우 펩타이드와 아미노산의 조성이 다를 것이며, 이는 결국 반응에 의해 다른 향미특성을 가진

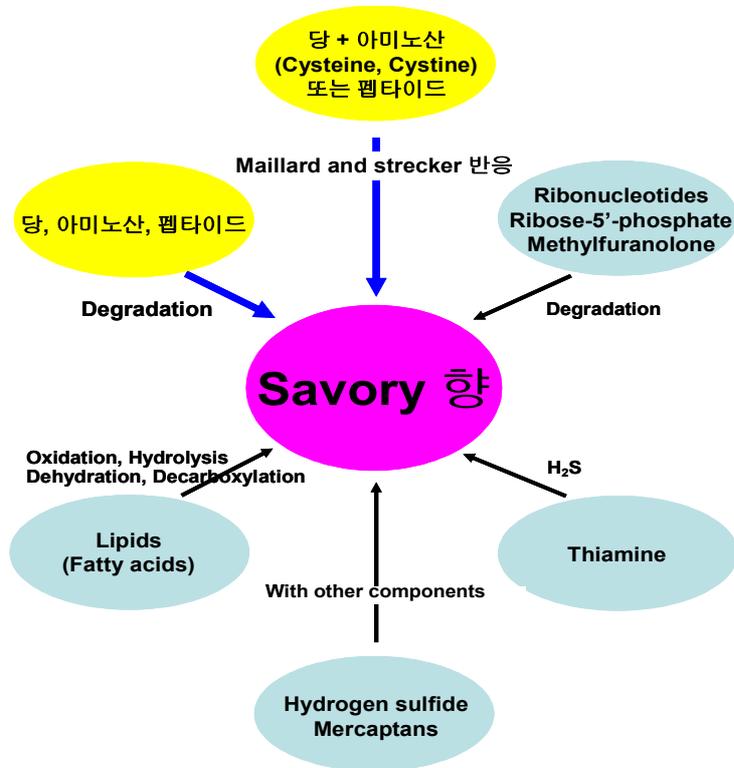


Figure 1. Savory 향 생산에 관여하는 반응 및 전구물질.

savory향을 생성할 것 이다(Figure 2).

최근 급속한 경제성장과 서구식 식생활로 인하여 뇌졸중, 뇌혈관성 치매를 비롯한 심혈관계질환의 발병이 증가하고 있으며, 이에 따른 생리활성을 가지는 기능성 식품에 대한 관심 또한 증가하고 있고, 97년 650억불 규모이던 세계 건강기능성 식품시장은 2000년도에는 1,380억불로 급성장하였고, 매년 약 11%의 성장률을 보이고 있으며, 국내 기능성 식품시장은 98년 2조 2,000억원에서 2000년 3조 5,000억원으로 성장하였으며, 매년 10%이상의 높은 성장률을 보이고 있다.

식품 중의 단백질은 섭취된 후 가수분해 되는데 이때 생성되는 펩타이드나 아미노산은 생체내에서 여러 가지 생리활성을 갖게 되며, 또한 펩타이드나 아미노산은 단맛, 쓴맛, 짠맛, 신맛, 감칠맛 등 5원미 모두에 관여하며, 용해성, 거품성, 유화성 등 식품의 물성에도 크게 영향을 미치며, 영양학적인 측면에서도 펩타이드의 흡수성은 매우 중요하며, 최근 연구에 따르면 펩타이드는 단백질이나 아미노산에 비해 흡수속도가 빨라서 아미노산류의 빠른 흡수가 필요한 경우 매우 유용하며 펩타이드는 단백질에 비해 항원성이 감소하므로 allergy 예방하는 새로운 기능성 식품개발에 활용될 것으로 생각된다.

식품 중에 존재하는 생리활성 펩타이드로는 동물성 식품유래 호르몬류나 식물성 식품유래의 효소저해물질 등과 같은 현재적 생리활성 펩타이드와 소화과정이나 식품가공과정 중에 부분 가수분해되어 생성되는 잠재적 생리활성 펩타이드 등으로 분류할 수 있으며, 잠재적 생리활성 펩타이드는 앞으로도 주목되는 부분이다. 잠재적 생리활성 펩타이드에는 그 작용에 따라 1) casomorphin과 같은 opioid 펩타이드류, 2) CPP와 같은 미네랄 흡수촉진 펩타이드류, 3) ACE 저해 펩타이드류, 4) 혈소판 응집저해 펩타이드류, 5) 콜레스테롤 흡수저해 펩타이드류, 6) 면역활성 펩타이드류 등이 알려져 있으며(Table 1 참조), 이와 관련된 연구도 활발하게 진행되고 있으나 현재까지 생리활성을 갖는 펩타이드의 구조분석 및 응용연구는 미흡한 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 반응향 기술을 이용하여 대두 단백질로부터 기호성과 기능성이 융합된 신개념의 savory향을 개발하고자 하였다. 현재 식품업계는 well-being붐을 타고 beef-free한 savory 향을 요구하고 있으며, 아울러 기능성이 더해진다면 이용범위가 다양할 것 이므로 대두 펩타이드가 함유된 savory 향을 개발하고자 하였다. 이를 실현하기 위하여 대두 단백질로부터 가수분해도를 달리한 대두 펩타이드를 제조한 후 생리활성을 측정하고 반응향 기술을 이용하여 savory

Table 1. 식품단백질 유래 기능성 펩타이드

종류	기원	작용
1. Opioid peptides (agonist) β-casomorphin (사람) β-casein(59-63) gluten exsorphin	β-casein (인유) β-casein (인유) gluten	진통, 장관연동의 억제 진통, 장관연동 억제, 인슐린분비촉진
2. Antihypertensive peptides	대두단백질 된장 β-casein (인유) 정어리 근육	혈압강하
3. Hypocholesterolemic peptides	대두 11S acidic subunit	콜레스테롤 흡수저해

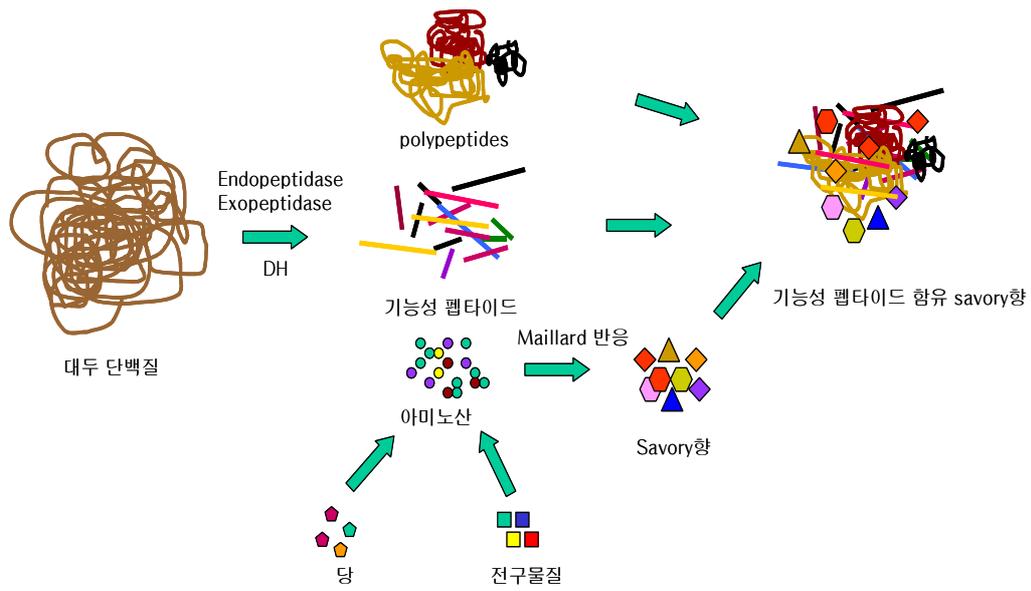


Figure 2. 가수분해도 조절에 의한 기능성 대두 펩타이드 함유 savory향 개발 개념도.

향을 생성하기 위한 최적조건을 구하여 기호성과 기능성이 융합된 savory 향을 개발하고자 하였다, 또한 대두 펩타이드의 생리활성을 검색하고, 우수 생리활성을 나타내는 펩타이드를 분리, 정제한 후 조성을 분석 한 후, 이를 기초로 실제 가공적성을 확인하여 부가가치가 높은 생리활성 함유 가공음료 개발에 필요한 기능성 소재 연구 자료를 제공하고자 하였다.

제 3절 연구개발의 범위

1. 효소별, 가수분해도에 따른 대두단백질 가수분해물 제조 및 대두단백질 분해효소 선별
2. RSM을 이용하여 최적화된 대두단백질 가수분해 반응향 제조
3. 최적화된 대두단백질가수분해반응물의 향미특성 분석 및 단백질 가수분해도에 따른 savory향의 향미특성분석
4. 대두단백질 가수분해물을 이용한 대두단백질 가수분해물 함유 음료 및 savory향 제품개발
5. ACE 저해활성을 보이는 대두단백질가수분해반응향으로 부터 한외 여과법 및 다양한 컬럼법을 이용하여ACE 저해활성 펩타이드를 분리 정제
6. 대두단백질가수분해반응향과 단계별로 분리된 분획별 아미노산 조성 분석
7. 대두단백질가수분해반응향의 pH와 온도에 따른 ACE 저해활성 변화 및 용해도 지수 조사

제 2장 국내외 기술개발 현황

Well-being 붐을 타고 현재 식품업계는 beef-free한 savory향의 개발이 절실하게 필요하게 되었다. Savory향은 Figure 1과 같이 Maillard 반응에 기초하여 여러 전구물질의 반응으로 생성되는 반응향이며 특히 아미노산과 펩타이드가 중요한 전구물질이 된다. 대두 단백질 또한 단백질 분해효소로 효소분해 시키면 savory향 전구물질과 동시에 기능성 펩타이드도 생성된다. 다양한 가수분해도의 대두 단백질을 savory향의 전구물질로 사용하면 다양한 향미특성을 갖는 savory향의 제조가 가능하나 이에 대한 연구는 현재 전무한 실정이다.

반응향 생성에 있어서 가수분해도 및 온도 요인의 변화에 의해 기호성과 기능성이 강화된 대두펩타이드의 제조가 가능하며 이를 기능성 소재로 한 다이어트 식품, 생식, 분말조미식품, 건강보조식품 및 음료 등 다양한 형태의 식품에 응용할 수 있다. 현재, 반응향 기술에 의한 고기향 생성 및 대두 펩타이드 제조에 관한 연구는 개별적으로 많은 연구가 이루어지고 있으나 이 둘을 융합한 기능성 펩타이드를 함유한 savory향 개발에 관한 연구는 이루어진 바 없다.

일본에서는 최근 콩 펩타이드의 기능성에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있으며, 이를 식품에 응용하고자 하는 노력이 계속되고 있다(Figure 3). 콩 펩타이드는 후지세이유사가 1985년에 독자적인 효소처리 기술로 세계에서 처음으로 이용하기 쉬운 형태로 추출하는데 성공하였다. 또한 단백질 원료로부터 효소를 이용하여 가수분해물을 제조하거나, 특수배양방법에 의한 미생물 배양, 단백질원료의 최적 가수분해 반응조건 확립 등 일본의 식물성 단백질 분해 기술은 한국에 비해 우수한 실정이다. 우리나라의 단백질 분해기술은 산분해법, 자연양조법이 주를 이루고 있으나 이러한 방법은 유해물질로부터의 안전성 미확보 및 경제성 미비 등 한계가 있다.

현재 기호성과 기능성이 융합된 신개념의 식품소재로서 새로운 형태의 식품 생산이 크게 대두되고 있는 실정이다. 광우병 발생 시 소의 도살에 의해 천연 쇠고기향 생산을 위한 원료고기의 수급에 차질을 초래하고, 또한, 소비자들은 광우병 발생 시 쇠고기에서 유래한 고기향 base의 소비를 기피 하는 추세이다. 따라서, 식품업계는 원료고기에서 유래하지 않는 (meat-free) 고기향 base의 개발을 절실히 요구하고 있다. 소고기를 사용하지 않고 식물성 단백질로 부터 고기향을 부여할 수 있는 향미제의 개발은 광우병의 발생에 관계없이 천연 고기향을 안정적으로 공

콩 가공식품 (일본 콩 펩타이드 건강포럼 제공)

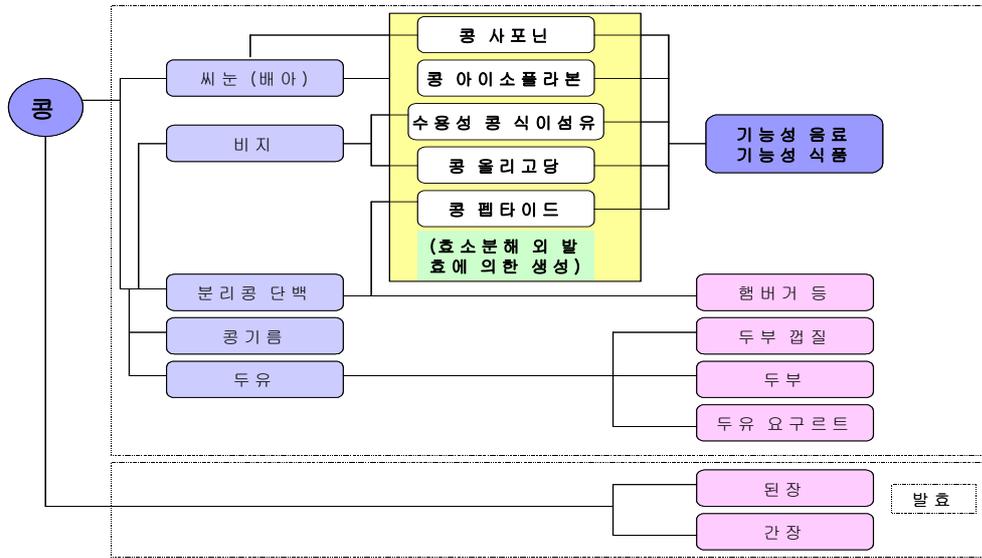


Figure 3. 콩이용 주요 가공식품 현황.

급가능할 것으로 기대되며, 현재 대두 펩타이드의 건강기능성이 밝혀짐으로써 이에 대한 관심이 높으나 기호성으로 인해 제품의 형태가 다양하지 못하지만 기호성이 강화된 대두 펩타이드는 기능성 식품소재로서 응용범위가 다양하게 나타나고 있다.

일본에서 기능성 음료는 아미노산 음료를 중심으로 일본음료시장이 성장하는데 주도적인 역할을 하고 있으며(Table 2), 대두 펩타이드를 사용한 제품이 계속 출시되고 있어 국내 연구가 절실히 필요한 실정이다. 국내에서도 최근 펩타이드 및 아미노산 함유제품이 각광을 받고 있으며, 특히 대두 펩타이드는 콜레스테롤 흡수억제, 혈압강하 등의 생리활성을 보여 건강식품에 활용되고 있다(Table 3). 기능성 펩타이드는 생리활성 뿐 아니라 단백질 효소분해물이 가지는 물리적, 영양적 기능도 우수하여 건강기능소재 산업에 기여할 것으로 생각된다.

결과적으로 국내·외 기관의 연구동향을 살펴보면, 수산부산물의 단백질을 이용하여 bioflavor를 개발하려는 시도와 효소분해 HVP를 이용하여 소고기향을 개발하려는 시도가 있었으나, 이는 탈지대두를 최대한 가수분해 시킨 것이었다. 또한 단백질 가수분해도에 따른 반응향의 향미특성에 대해서는 현재까지 보고된 바가 없으나 현재 HVP를 이용한 고기향 개발에 관한 연구는 꾸준히 이루어지고 있다. 펩타이드의 생체조절 기능성은 주로 혈압강하, 혈청콜레스테롤 강하, 면역증강, 칼슘 흡수촉진, 항종양 등이 연구되어지고 있으며, 특히 대두 펩타이드는 자발성 고혈압 흰쥐를 대상으로 한 실험에서 혈중 중성지방, 총콜레스테롤, LDL 콜레스테롤을 저하시키며, ACE 저해 활성 및 혈중 지질 수준의 개선작용을 나타낸다는 보고가 있으며, 이와 같이 대두 펩타이드 가공식품의 기능성이 인정되면서 기능성 식품소재로서 주목을 받고 있다. 대두 펩타이드와 관련된 연구는 주로 생리활성을 중심으로 비교적 단순하게 이루어졌으며, 대두단백질의 가수분해 기술 역시 최근 효소분해법이 대두되고 있기는 하지만, 아직까지는 산분해가 주를 이루고 있다. 일본에서는 최근 효소를 이용한 대두단백질의 가수분해 기술에 대한 연구가 많이 이루어지고 있으나 우리나라는 아직까지 미흡한 실정이다. 또한 단백질 가수분해도에 따른 생리활성 변화 특성에 대해서는 현재까지 보고된 바가 없다.

따라서, 본 연구를 통하여 가수분해 대두 단백질로부터 savory향 개발 및 생리활성 펩타이드를 분리, 정제하고 나아가 가공적성을 연구함으로써 기호성과 생리활성을 갖춘 기능성 펩타이드 및 아미노산 함유 제품개발의 기초 자료로 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

Table 2. 일본의 펩타이드 및 아미노산 함유 제품

	제조사	제품명	주요 함유소재
펩타이드	일본식품화공	페푸치노	옥수수단백질 유래 펩타이드
	에스에스	에프츠	카제인 Na, 대두단백질 펩타이드
	일연화학	라이프론	카제인 Na
	후지세이유	하이뉴트	대두단백질 펩타이드
아미노산	기린 비버리지	아미노 사푸리	발린, 루신 등 8가지 필수아미노산
	아사히 음료	Charge	8가지 필수아미노산, 구연산, 사과산
	산토리	아미노 시키	리신, 아스파탐, 티로신, 세린 등
	칼피스	아미노 칼피스	8가지 필수아미노산
	아지노모도	아미노 바이탈	발린, 루신, 이소루신, 아르기닌

Table 3. 국내 펩타이드 및 아미노산 함유 제품

	제조사	제품명	주요 함유소재
펩타이드	CJ (주)	팻다운	식이섬유, L-카르니틴, 대두펩타이드
	CJ (주)	CJ 뉴트라 슬림생식	치커리파이버, 대두펩타이드, 콜라겐
	조선무약농심	술표 칼슘 CPP 콩라면	비타민D, 칼슘, 대두펩타이드 콩기름, 대두펩타이드 분말
아미노산	해태음료(주)	아미노업	발린, 루신 등 8가지 필수아미노산
	해태음료(주)	네버스탑 엑싱	L-글루타민, L-카르니틴
	한국야쿠르트	아미노센스	8가지 필수아미노산
	롯데칠성음료	플러스마이너스	8가지 필수아미노산

제 3장 연구개발 수행내용 및 결과

제 1절 반응향 기술을 이용한 대두 단백질로부터 신개념 savory향 및 기능성 식품 개발

1. 재료 및 방법

가. 대두 단백질 분해효소 선별

1) 실험재료

본 연구를 위하여 분리대두단백질을 참여기업인 원우테크로부터 제공받아 재료로 사용하였다. 대두 단백질 분해에 이용한 단백질 분해효소로는 Novo사 (Novo Nordisk Co. Ltd., Denmark)로부터 Alcalase, Flavourzyme, Protamex 와 Neutrase를 Sigma사 (Sigma Chemical. Co., St. Louis, MO, USA)로부터 Bromelain과 Papain을 구입하여 사용하였다.

2) Enzymatic hydrolysis

가) 단백질 분해효소 역가측정

단백질 분해효소 역가를 측정하기 위하여 먼저 L-tyrosine을 이용하여 standard curve를 작성하였다. 105℃의 dry oven에서 3시간 동안 건조한 L-tyrosine 0.1 g을 100 mL 0.1 N HCl에 녹여 1 mg/mL L-tyrosine용액을 만들었다. 이 용액으로부터 L-tyrosine의 농도가 10, 20, 30, 40, 50, 100 μ g/mL 이 되도록 만들었다. L-tyrosine 용액 1 mL을 취하여 5 mL의 0.5 N NaOH와 1 mL의 1 N Folin & Ciocalteu's phenol reagent (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)와 즉시 혼합한 후 30℃에서 15분 동안 발색시킨 후 UV/visible spectrophotometer (Shimadzu UV-1201, Kyoto, Japan)를 사용하여 578 nm의 파장에서 absorbance를 측정하였다. Flavourzyme과 Alcalase의 역가를 표준화하기 위하여 casein을 기질로 단백질 분해효소 역가를 측정하였다. 2 g의 casein (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)을 25 mL 0.1 N NaOH에 넣고 10

분정도 가열하면서 녹였다. 냉각시킨 후 0.1 N HCl로 pH를 7.0으로 조정하여 10 mL의 1 M phosphate buffer (pH 7.0)를 넣은 후 증류수를 전체 용액의 양이 100 mL이 되도록 넣어서 2% casein용액을 만들었다. 2% casein용액 2.5 mL을 test tube에 넣고 37°C에서 10분간 유지시킨 후 단백질 분해효소를 넣고 20분 동안 반응시켰다. 5 mL의 0.3 M trichloroacetic acid (TCA)를 넣어서 반응을 종결시킨 후 실온에서 20분간 방치하고 Whatman No. 40 filter paper로 여과하였다. 상정액 1 mL을 취하여 5 mL의 0.5 N NaOH와 1 mL의 1.0 N Folin & Ciocalteu's phenol reagent을 즉시 혼합하였다. 이 혼합액을 30°C에서 15분 동안 방치하여 발색시키고 absorbance를 측정하였다. 0.3 M TCA soluble peptide의 양은 L-tyrosine standard curve를 이용하여 정량하였다. 단백질 분해효소 1 unit는 반응조건에서 20분간 1 μ L의 단백질 분해효소에 의해 생성된 L-tyrosine의 양으로 정의하였다.

나) 대두 단백질의 가수분해

분리대두 단백질은 10% (W/V)로 물과 혼합하여 가수분해의 기질로 사용하였다. 분리 대두 단백질을 2 L의 jacketed beaker에 넣고 50°C에서 30분 동안 가온하였다. 일정량의 단백질 분해효소를 각각 넣고 (E/S: 0.5, 1, 2%) 50°C에서 0, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180분의 간격을 두고 가수분해시켰다. 가수분해가 종결되면 95°C 열수로 10분간 처리하여 효소를 불활성화 시켜서 가수분해도를 측정하고, 효소선발을 위한 관능검사의 시료로 사용하였다.

다) 가수분해도 측정

대두 단백질 가수분해물의 가수분해도를 결정하기 위해 trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) 방법을 사용하였다. 1% sodium dodecyl sulfate (SDS)에 녹인 표준물질 및 대두단백질 가수분해물 0.25 mL을 phosphate buffer (pH: 8.2) 2 mL에 녹인 후 0.1% TNBS 용액 2 mL을 가하였다. Aluminum foil을 이용하여 빛을 차단하고 50°C에서 1시간동안 반응시켰다. 이후 0.1 N HCl 4 mL을 가하여 반응을 중시시켰다. 상온에서 30분간 정치 후 UV/visible spectrophotometer (Shimadzu UV-1201, Kyoto, Japan)를 사용하여 340 nm 영역에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 leucine을 0~1.5 mM의 범위에서 흡광도를 측정하여 검량선을 나타내었다. 대두 단백질 가수분해물의 가수분해

도(degree of hydrolysis, DH)는 Adler-Nissen의 TNBS 방법에 따라 다음과 같이 정의하였다.

$$DH = (h/h_{tot}) \times 100$$

(h : t시간 후에 단백질 분해효소에 의해 생성된 α -amino group의 밀리당량수 (milliequivalents/g), h_{tot} : 시료의 가수분해 시 생성될 수 있는 α -amino group 최대량(milliequivalents/g))

3) 관능검사

대두 단백질 가수분해물의 쓴맛정도를 측정하기 위해 관능검사를 실시하였다. 10 명의 패널요원을 선정하고 쓴맛강도를 표현할 수 있도록 훈련을 실시하였다. 쓴맛정도는 taste dilution analysis (TDA) 법을 이용하여 실시하였다. 대두 가수분해물을 1:1로 증류수로 단계적으로 희석하여 쓴맛이 없는 blank 시료 (분리 대두 단백질)와 비교하여 쓴맛의 차이가 나지 않을 때 까지 실시하였다. 쓴맛의 강도는 TD factor로 나타내었다. TD factor는 blank 시료와 대두 단백질 가수분해물의 쓴맛의 차이가 나타나지 않을 때의 희석배수를 의미한다. 삼점법을 이용하여 blank 시료와 대두 단백질 가수분해물 시료의 차이를 판별하였고, 난수표를 이용하여 시료번호를 부여하여 관능검사를 실시하였다.

나. 가수분해도에 따른 savory향 제조

1) 가수분해 정도에 따른 대두 단백질 가수분해물의 제조

단백질 분해효소 중 쓴맛이 적고, 생리 활성도가 높은 대두 단백질 가수분해물을 생산하는 Flavourzyme과 Protamex를 대두 단백질 분해효소로 선정하였다. 가수분해 시간을 효소에 따라 조절하여 가수분해도가 다른 대두 단백질 가수분해물을 제조하였다.

2) 전구물질 선정

가수분해도에 따른 savory향 제조를 위하여 반응향 제조에 필요한 전구물질을 선정하였다. 여러 종류의 당과 아미노산 등을 이용하여 예비실험 한 결과 glucose, cysteine, thiamine을 전구물질로 선정하였다.

3) Savory향 제조의 최적화

가) 반응표면분석법 (Response surface methodology, RSM)

대두 단백질 가수분해물의 savory향 제조 조건을 최적화하기 위하여 반응표면분석법을 사용하였다. 최적화를 위한 독립변수로는 가수분해도(degree of hydrolysis, DH), glucose 양(%), cysteine 양(%), thiamine 양(%)을 선정하였다. 각각의 반응조건에 5개의 level에 따른 coded unit (Table 4)를 부여하고 이들을 중심합성설계법을 이용하여 28번의 design point를 갖도록 실험을 설계하여 반응표면분석을 행하였다(Table 5). 종속변수로는 기호도, 쓴맛 및 생리활성인 ACE 저해능, SOD 유사활성, 항암활성을 정하였다. 기호도 및 쓴 맛은 관능검사를 통하여 측정하였고, 측정된 값은 second order model equation을 적용하여 multiple regression에 의하여 분석하였다. 또한 모든 통계분석은 SAS program (SAS Institute Inc.)을 이용하였다.

나) 관능검사

관능검사를 위하여 단국대학교 식품공학과 대학원생을 중심으로 14명을 패널로 선정하였다. 패널은 남자가 9명, 여자가 5명으로 구성되었다. 기호도는 9점법(매우좋다(9점), 좋다(7점), 보통이다(5점), 싫다(3점), 매우싫다(1점))을 이용하였고, 쓴맛 측정은 TDA 법을 이용하였다.

다) 대두 단백질 가수분해물의 savory향 제조

가수분해도 및 전구물질 함량에 따른 대두 단백질 가수분해물 savory 향의 향기성분을 분석하기 위하여 savory 향을 제조하였다. 선정된 단백질분해효소 Flavourzyme과 Protamex를 이용하여, 가수분해도가 다른 대두 단백질 가수분해물을 제조하고, glucose, cysteine, thiamine을 전구물질로 첨가하여 중심합성설계를 실시하였고 이에 따라 savory 향을 제조하였다. 가수분해도 및 전구물질 함량에 따른 savory 향의 휘발성성분의 차이를 분석하기 위하여 사용된 시료의 생성조건은 Table 6과 같다. 또한 기호도를 종속변수로 하여 반응표면분석법을 이용하여 대두 단백질 가수분해물의 savory향 제조 조건을 최적화하였고 (Table 6), 이 최적 조건에 따라 Flavourzyme과 Protamex를 처리한 대두 단백질 가수분해물의 savory향을 각각 제조하였다.

Table 4. Coded levels for independent variables used in developing experimental data

Variable	Coded level					Interval
	-2	-1	0	1	2	
DH (%)	0	5	10	15	20	5
Glucose (%)	0	2.5	5	7.5	10	2.5
Cysteine (%)	0	1	2	3	4	1
Thiamine (%)	0	1	2	3	4	1

Table 5. Experimental samples with different combinations of DH, glucose, cysteine and thiamine used in the central composite design

No.	DH ¹ (%)	Glucose(%)	Cysteine(%)	Thiamine(%)
1	5	2.5	1	1
2	5	2.5	1	3
3	5	2.5	3	1
4	5	2.5	3	3
5	5	7.5	1	1
6	5	7.5	1	3
7	5	7.5	3	1
8	5	7.5	3	3
9	15	2.5	1	1
10	15	2.5	1	3
11	15	2.5	3	1
12	15	2.5	3	3
13	15	7.5	1	1
14	15	7.5	1	3
15	15	7.5	3	1
16	15	7.5	3	3
17	0	5	2	2
18	20	5	2	2
19	10	0	2	2
20	10	10	2	2
21	10	5	0	2
22	10	5	4	2
23	10	5	2	0
24	10	5	2	4
25	10	5	2	2
26	10	5	2	2
27	10	5	2	2
28	10	5	2	2

¹ degree of hydrolysis.

Table 6. optimum conditions of savory flavoring

	DH ¹ (%)	Glucose(%)	Cysteine(%)	Thiamine(%)
Flavourzyme	9.4	4.9	1.8	1.1
Protamex	2.5	4.5	1.4	0.5

¹ degree of hydrolysis.

다. 최적화된 대두 단백질 가수분해물 savory향의 향기성분 분석

1) 최적화된 대두 단백질 가수분해물 savory향의 향기성분 분석

가) Solvent assisted flavor evaporation(SAFE)법을 이용한 최적화된 savory 향의 향기성분 추출

SAFE를 이용하여 최적화된 savory 향의 향기성분을 추출하였다. 최적화된 savory 향 10 g, deodorized distilled water 100 mL, 내부표준물질 (3-heptanol) 9.72 μg 을 250 mL 삼각플라스크에 넣고 4시간 동안 추출한 후 여과하였다. SAFE를 이용하여 여과된 savory 향의 향기성분을 추출하였다. 이 때 압력은 10^{-3} Pa이었고, water bath의 온도는 40°C 이었다. SAFE를 통해 얻은 추출물에 10 mL의 재증류한 dichloromethane을 넣고 2시간씩 2회 추출하였다. 추출이 끝난 후 용매층을 분리하고 -20°C 에서 12시간 냉동 후 용매층을 anhydrous sodium sulfate에 통과시켜 수분을 제거하였다. 수분이 제거된 추출액은 N_2 gas를 이용하여 100 μL 로 농축하여 gas chromatography-mass spectrometry 및 gas chromatography-olfactometry의 분석시료로 사용하였다.

나) Gas chromatography-mass spectrometry-olfactometry(GC-MS-O)를 이용한 향미특성 분석

(1) Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

SAFE를 이용하여 추출한 savory 향의 휘발성 향기성분 동정은 Agilent 6890N GC/Agilent 5973 network mass selective detector (MSD) (Agilent Co., Palo Alto, CA, USA)를 사용하였다. Column은 DB-5ms (60 m length x 0.25 mm i.d. x 0.25 μm film thickness : J & W Scientific, Folsom, CA, USA)를 사용하였고, oven 온도는 40°C 에서 5분간 유지한 후 200°C 까지 $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 속도로 승온시켜 20분간 유지하였다. Injector 온도는 200°C , detector 온도는 250°C 였으며 carrier gas로는 helium을 사용하였고 유속은 1.0 mL/min 였다. Ionization voltage는 70 eV 그리고 분석할 분자량의 범위(m/z)는 33~350으로 하여 분석하였다. GC-MS 분석은 triplicate로 하였다.

(2) Gas chromatography-olfactometry (GC-O)

SAFE를 이용하여 추출한 savory 향의 휘발성 향기성분을 GC-O를 이용

하여 동정하였다. GC-O로는 aroma extract dilution analysis (AEDA)를 행하였다. 100 μ L까지 농축한 향기성분을 3의 배수로 단계적으로 희석한 후 각각에 대해 GC-O를 행하였다. 냄새가 마지막으로 감지된 희석배수를 그 냄새성분의 flavor dilution (FD) factor라 정의 하고 RI값을 X축으로 하고 \log_3 FD를 Y축으로 하여 FD chromatogram을 그렸다. GC-O는 Varian 3350 (Varian instrument Group, Walnut Creek, CA, USA)을 사용하였다. Detector는 FID (Flame ionization detector)를 사용하였고 column으로부터 분지시켜 nose cone을 이용하여 sniffing을 실시하였다. Column은 DB-5ms (30 m length \times 0.25 mm i.d. \times 0.25 μ m film thickness : J & W Scientific, Folsom, CA)를 사용하였다. Temperature program은 40 $^{\circ}$ C에서 5분간 유지한 후 200 $^{\circ}$ C까지 5 $^{\circ}$ C/min 속도로 승온시켜 10분간 유지하였다. Injector 온도는 200 $^{\circ}$ C, Detector 온도는 250 $^{\circ}$ C였으며 carrier gas로는 helium을 사용하였고 유속은 1.4 mL/min 였다.

(3) 휘발성 향기성분의 동정

휘발성 향기성분의 동정은 retention indices (RI)와 Wiley/7n mass spectral database (Agilent Co., Palo Alto, CA, USA)를 이용하였다 (positive identification). 또한 GC-O 상에서 향기 성분이 감지된 부분과 retention index를 비교하였고, 문헌상의 retention index와 spectrum을 비교하여 향기성분을 확인하였다.

(4) 휘발성 향기성분의 정량

GC-MS로 확인된 휘발성 향기성분의 농도는 추출 시 내부 표준물질로 사용한 3-heptanol의 peak area와 동정된 휘발성 향기성분의 peak area의 peak area ratio로 다음 식에 의해 정량하였다. 이때 peak area ratio와 amount ratio의 상관계수는 1 이라고 가정하였다.

$$\text{농도(ppm)} = \frac{\text{peak area ratio} \times \mu\text{g of 3-heptanol}}{\text{g of sample}}$$

라. 단백질 가수분해도에 따른 savory 향의 향미특성분석

1) Solid phase microextraction(SPME)를 이용한 savory 향의 향기성분 추출

가수분해도 및 전구물질 함량에 따른 savory 향의 휘발성 성분의 차이를 분석하기 위하여 SPME를 사용하여 향기성분을 추출하였다. SPME apparatus(Supelco co. Bellefonte, PA, USA)는 SPME fiber와 SPME holder로 구성되어 있으며 50/30 μ m divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS)으로 coating된 fiber를 이용하였다. 시료는 효소별로 중심합성 설계에 의하여 제조된 savory 향을 이용하였다. Savory 향 2 g, deodorized distilled water 10 mL, 내부표준물질 (3-heptanol) 0.972 μ g을 20 mL headspace vial에 넣고 teflon cap으로 밀봉하였다. 60 $^{\circ}$ C에서 30 min간 방치하여 평형상태에 도달시켰다. 평형상태에 도달한 sample에 SPME fiber를 1cm 노출시켜 30min 동안 향을 추출하였다. GC injection을 위해 200 $^{\circ}$ C injector port에서 fiber를 노출시켜 1 min동안 탈착시켰다. GC-O 및 GC-MS로 휘발성 향기성분을 분리하고 동정하였다.

2) Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

SPME를 이용하여 추출한 savory 향의 휘발성 향기성분 동정은 Agilent 6890N GC/Agilent 5973 network mass selective detector (MSD) (Agilent Co., Palo Alto, CA, USA)를 사용하였다. Column은 DB-5ms (60 m length x 0.25 mm i.d. x 0.25 μ m film thickness : J & W Scientific, Folsom, CA, USA)를 사용하였고, oven 온도는 40 $^{\circ}$ C 에서 5분간 유지한 후 200 $^{\circ}$ C까지 5 $^{\circ}$ C/min의 속도로 승온시켜 20분간 유지하였다. Injector 온도는 200 $^{\circ}$ C, detector 온도는 250 $^{\circ}$ C였으며 carrier gas로는 helium을 사용하였고 유속은 1.0 mL/min 였다. Ionization voltage는 70 eV 그리고 분석할 분자량의 범위(m/z)는 33~350으로 하여 분석하였다. GC-MS 분석은 triplicate로 하였다.

3) 반응표면분석을 이용한 향기성분의 변화 분석

대두 단백질 가수분해물의 향기성분의 변화를 분석하기 위하여 반응표면분석법을 사용하였다. 독립변수로는 가수분해도(degree of hydrolysis, DH), glucose 양(%), cysteine 양(%), thiamine 양(%)을 선정하였다. 각각의 반응조건에 5개의

level에 따른 coded unit (Table 7)를 부여하고 이들을 중심합성설계법을 이용하여 28번의 design point를 갖도록 실험을 설계하여 반응표면분석을 행하였다. 종속변수로는 최적화된 대두단백질가수분해반응물의 향기성분 분석에서 중요한 향기성분으로 동정된 methional, 2,4-dimethyl pyrazine, phenylacetaldehyde 및 2-ethyl-3,5-dimethyl pyrazine의 함량으로 정하였다. 종속변수로는 최적화된 대두단백질가수분해반응물 향기성분의 함량은 GC-MS를 통하여 측정하였고, 측정된 값은 second order model equation을 적용하여 multiple regression에 의하여 분석하였다. 또한 모든 통계분석은 SAS program (SAS Institute Inc.)을 이용하였다.

Table 7. Coded levels for independent variables used in developing experimental data

Variable	Coded level					Interval
	-2	-1	0	1	2	
DH (%)	0	5	10	15	20	5
Glucose (%)	0	2.5	5	7.5	10	2.5
Cysteine (%)	0	1	2	3	4	1
Thiamine (%)	0	1	2	3	4	1

마. 대두 단백질 가수분해물을 이용한 savory 향 제품 및 기능성 음료의 개발

1) 실험재료

본 연구를 위하여 대두 단백질을 참여기업인 원우테크에서 제공받아 재료로 사용하였다. SPI 분해에 이용한 단백질 분해효소는 Novo사 (Novo Nordisk Co. Ltd., Denmark)의 Flavorzyme와 Protamex를 사용하였다. 또한 glucose, glycine, lysine, proline, isoleucine, tyrosine, serine, alanine과 phenylalanine은 Sigma사 (Sigma Chemical. Co., St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

2) 실험방법

가) Maillard reaction을 이용한 대두펩타이드 함유 기능성 음료의 제조

(1) 전구물질 선정

음료 제조에 필요한 전구물질을 선정하기 위하여 대두 단백질 가수분해물, glucose와 아미노산을 이용하여 시료를 제조하였다. 대두 단백질은 10% (W/V)로 물과 혼합하여 가수분해의 기질로 사용하였다. 대두 단백질을 2 L의 jacketed beaker에 넣고 50℃에서 30분 동안 가온하였다. 기질 대 효소대비 (E/S) 0.5%의 단백질 분해효소를 넣고 50℃에서 1시간 가수분해 시켰다. 가수분해가 종결되면 100℃ 열수로 30분간 처리하여 효소를 불활성화 시킨 후, 3배의 증류수를 가수하여 상온에서 추출하였다. 추출물의 SPI 함량 대비 20% glucose와 20% glycine, lysine, proline, isoleucine, tyrosine, serine, alanine과 phenylalanine을 각각 첨가하여 100℃에서 3시간 반응시켰고, 2,000 rpm의 속도로 20분간 원심분리 후 상정액을 취하여 전구물질 선정을 위한 관능검사 시료로 사용하였다.

(2) 대두 단백질 가수분해물을 이용한 기능성 음료 제조의 최적화

기호도 검사에 의해 선정된 아미노산을 이용하여 대두 단백질 함유 음료제조 조건을 최적화하기 위하여 반응표면분석법을 사용하였다. 독립변수로는 시료 100 mL 당 대두 단백질 함량 대비 glucose 첨가량(%), 아미노산의 첨가량(%), 반응시간을 선정하였다. 각각의 반응조건에 5개의 level에 따른 coded unit (Table 8)를 부여하고 이들을 중심합성설계법을 이용하여 18번의 design point를 갖도록 실험을 설계 (Table 9)하고 반응표면분석을 행하였다. 종속변수로는 향, 맛, 전체적인 기호도로 정하였다. 향, 맛, 전체적인 기호도는 관능검사를 통하여 측정하였고,

Table 8. Coded levels for independent variables used in developing experimental data

Variable	Coded level					Interval
	-2	-1	0	1	2	
glucose (%)	0	10	20	30	40	10
amino acid (%)	0	10	20	30	40	10
reaction time(hr)	1	2	3	4	5	1

Table 9. Experimental data for overall like with different combinations of glucose (X_1), amino acid (X_2) and reaction time (X_3) used in the central composite design.

No.	coded level		
	X_1	X_2	X_3
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	1
3	-1	1	-1
4	-1	1	1
5	1	-1	-1
6	1	-1	1
7	1	1	-1
8	1	1	1
9	-2	0	0
10	2	0	0
11	0	-2	0
12	0	2	0
13	0	0	-2
14	0	0	2
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0

측정된 값은 second order model equation을 적용하여 multiple regression에 의하여 분석하였다.

나) 천연과즙 농축액을 첨가한 대두펩타이드 함유 기능성 음료의 제조

대두 단백질은 10% (W/V)로 물과 혼합하여 가수분해의 기질로 사용하였다. SPI를 2 L의 jacketed beaker에 넣고 50℃에서 30분 동안 가온하였다. 기질 대 효소대비 (E/S) 0.5%의 단백질 분해효소를 넣고 50℃에서 1시간 가수분해 시켰다. 가수분해가 종결되면 100℃ 열수로 30분간 처리하여 효소를 불활성화 시킨 후, 3배의 증류수를 가수하여 상온에서 추출하였다. 천연 첨가물의 종류와 첨가량은 Table 10에 나타내었다.

다) 대두 단백질 가수분해물 savory향 제품 개발

최적 조건에 따라 Flavourzyme과 Protamex를 처리한 대두 단백질 가수분해물의 savory향 소재를 Table 11과 같이 제조하였다. 이 후 제조된 savory 향 소재는 80℃에서 8시간 동안 진공건조를 실시하였고 건조가 끝난 후 분말화 하여 savory 향 제품의 소재로 이용하였다. 제조된 savory 향 소재는 원우테크에서 제조되는 소고기 전골풍미제품에 소고기 향 대신 10% 대치하여 제품화 하였다. 또한 기존의 제품과 대두 단백질 가수분해물 savory향 소재로 대치한 제품을 관능검사를 통하여 비교 분석하였다.

라) 관능검사

관능검사를 위하여 단국대학교 식품공학과 대학원생을 중심으로 12명을 패널로 선정하였다. 향, 맛, 전체적인 기호도의 특성에 대하여 9점법(매우 좋다(9점), 좋다(7점), 보통이다(5점), 싫다(3점), 매우 싫다(1점))을 이용하였다. 세 자리 수로 된 난수표로 시료기호를 표기한 투명 컵에 일정량의 시료를 담아 물과 함께 제공하였고, 한 개의 시료를 평가한 다음 물로 입을 헹군 후 다른 시료를 평가하도록 하였다.

마) 통계처리

실험 결과 얻어진 데이터는 SAS program (SAS Institute Inc.)을 이용하여 ANOVA 분산분석과 Duncan의 다범위 검정을 이용하여 5% 수준에서 유의적 차이를 검증하였다.

Table 10. Composition of additive material

No.	additive material
1	apple extract, grapefruit extract, sugar, syrup
2	peach extract, lemon extract, orange extract, sugar, syrup
3	japanese apricot extract, sugar, syrup
4	jujube extract, lemon extract, sugar, syrup
5	jujube extract, dried persimmons extract, sugar, syrup

Table 11. optimum conditions of savory flavoring

	DH ¹ (%)	Glucose(%)	Cysteine(%)	Thiamine(%)
Flavourzyme	9.4	4.9	1.8	1.1
Protamex	2.5	4.5	1.4	0.5

¹ degree of hydrolysis.

2. 결과 및 고찰

가. 대두단백질 분해효소 선발설정

1) 효소 역가 측정

실험기간 중 효소활성의 감소를 보정하기 위해 2% casein 용액을 기질로 본 실험에 사용한 단백질 분해 효소의 효소 역가를 측정한 결과는 Table 12에 나타내었다. Alcalase가 가장 높은 역가를 나타내었으며, Papain, Bromelain, Neutrase, Flavourzyme, Protamex 순으로 나타났다.

2) 대두 단백질의 효소적 가수분해

대두 단백질 가수분해물의 가수분해도를 결정하기 위해 TNBS 방법을 사용하였다. 표준물질로 leucine을 0~1.5 mM의 범위에서 흡광도를 측정하여 검량선을 나타내었다(Figure 4). 분리 대두 단백질을 기질로 상업용 효소인 Flavorzyme, Alcalase, Protamex, Neutrase, Bromelain, Papain의 효소별, 기질 대 효소량별(0.5, 1, 2 %)로 가수분해 정도를 비교한 progress curve는 Figure 5~10과 같다.

모든 효소에서 reaction progress curve는 초기의 빠른 반응속도로 가수분해가 일어나다가 후에 느려지는 전형적인 형태를 나타내고 있다. 이러한 형태는 효소적 가수분해에서 보고 된 reaction progress curve의 형태와 유사하였다. 초기단계에서는 약한 peptide결합이 급속하게 분리되고 나중단계에서는 덜 약한 peptide결합이 느리게 분리되는 결과로 보고되고 있으며, 또한 초기단계에서는 효소가 불용성 단백질 표면에 흡착하고 줄어든 polypeptide결합이 더욱 compact하게 작용하여 반응을 느리게 한다는 보고도 있다. 또한 120분 이후에는 대부분 단백질 가수분해가 진행되지 않음을 나타내었다. 모든 효소에서 E/S %가 증가할수록 가수분해도도 증가함을 나타내었으나, 1 과 2%에서는 크게 차이를 나타내지 않았다. Protamex가 가장 높은 가수분해도를 나타내었으며 Alcalase, Flavourzyme, Neutrase, Bromelain, Papain 순으로 가수분해도가 높았다. 대부분 초기에는 6~10%정도의 가수분해도를 나타내었으며 점차적으로 증가하여 최종적으로 E/S%에 따라 15 ~ 30% 정도의 가수분해도를 나타내었다. Alcalase는 초기에 매우 빠른 반응속도로 가수분해가 진행되고 60분경과 후 15~18% 정도의 가수분해도를 나타내었고, 가수

분해도 정도는 이후 감소하여 180분에서는 20~23%의 가수분해도를 나타내었다 (Figure 5). 또한 Alcalase는 E/S%에 따라 가수분해도는 다른 효소에 비하여 큰 차이를 나타내지 않았다. Flavourzyme은 다른 효소에 비하여 느린 초기 효소 반응 속도를 나타내었으나, 계속적으로 효소분해가 진행되는 결과를 나타내었다(Figure 6). 60분까지 점차적으로 가수분해 정도가 진행되었으며, 이후에는 비슷한 가수분해도를 나타내었다. 60분경과 후 12~17% 정도의 가수분해도를 나타내었고, 최종적으로 14~23% 정도의 가수분해도를 나타내었다. Neutrase는 Flavourzyme과 비슷한 경향을 나타내었으며 상대적으로 낮은 가수분해도를 나타내었다(Figure 7). 60분경과 후 13~17% 정도의 가수분해도를 나타내었고, 최종적으로 15~21% 정도의 가수분해도를 나타내었다. Protamex는 사용한 상업용 가장 높은 가수분해도를 나타내었다(Figure 8). 초기 매우 빠른 반응속도를 나타내었으며, 90분까지 계속적으로 가수분해도가 증가하였고 이후 반응속도가 감소함을 나타내었다. 60분경과 18~22% 정도의 가수분해도를 나타내었고 이후 최종적으로 22~28% 정도의 가수분해도를 나타내어 가장 높은 가수분해도를 나타내었다. Bromelain은 Neutrase와 비슷한 경향을 나타내었으나, 가장 낮은 가수분해도를 나타내었다(Figure 9). 60분 경과 후 13~17% 정도의 가수분해도를 나타내었고, 최종적으로 15~18% 정도의 가수분해도를 나타내었다. Papain은 Neutrase와 가수분해도 및 경향이 매우 유사하게 나타내었다(Figure 10). 초기 상대적으로 빠른 반응 속도를 나타내었으나, 30분 이후 급격히 가수분해 속도가 감소하였다. 60분 경과 후 13~18% 정도의 가수분해도를 나타내었고, 최종적으로 15~21% 정도의 가수분해도를 나타내었다. 분리 대두 단백질을 이용하여 효소반응을 통한 대두 단백질 가수분해물 제조 시 반응 시간 및 효소량 등의 반응조건을 조절하여 가수분해를 조절할 수 있으며, 특히 시간에 따른 반응의 조절로 위와 같이 일정한 가수분해도를 가지는 대두 단백질 가수분해물을 제조할 수 있었다.

Table 12. Measurement of enzyme activity using casein substrate and declared activity of enzyme manufacture

Enzyme	I.U. ^a
Alcalase	63.06
Flavourzyme	42.39
Protamex	40.99
Papain	54.92
Bromelain	43.01
Neutrase	42.59

^a One unit was defined as the amount of L-tyrosine produced by 1 mg protease solution

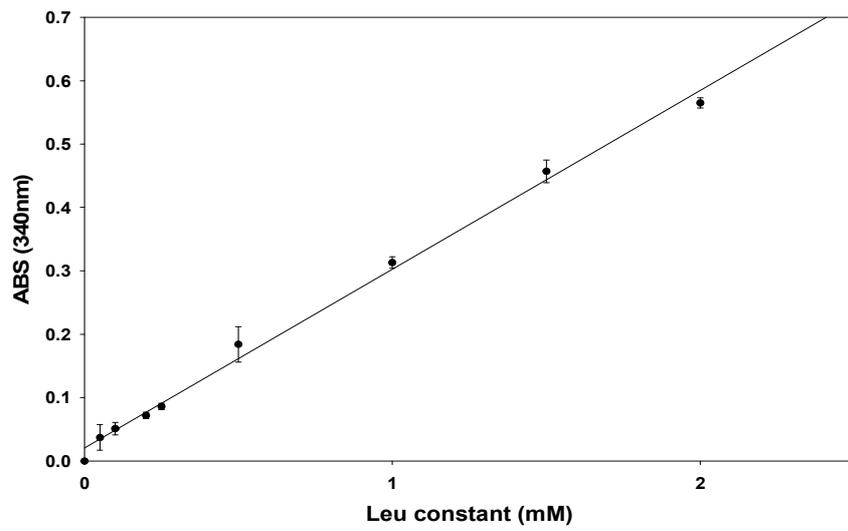


Figure 4. L-leucine standard curve by TNBS method.

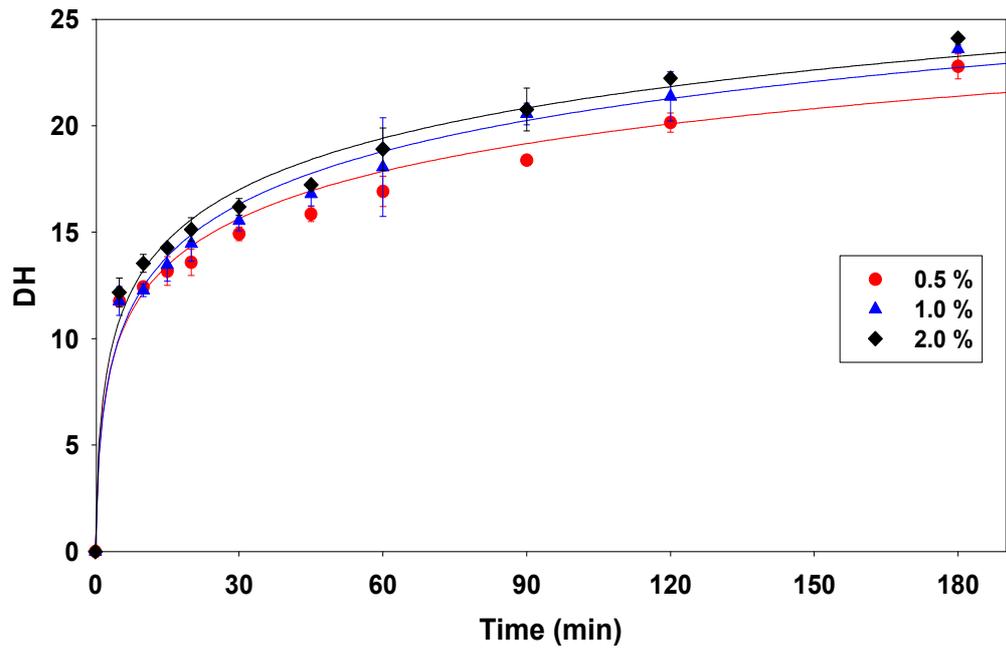


Figure 5. Reaction progress curves for enzymatic hydrolysis of beef extract by Alcalase.

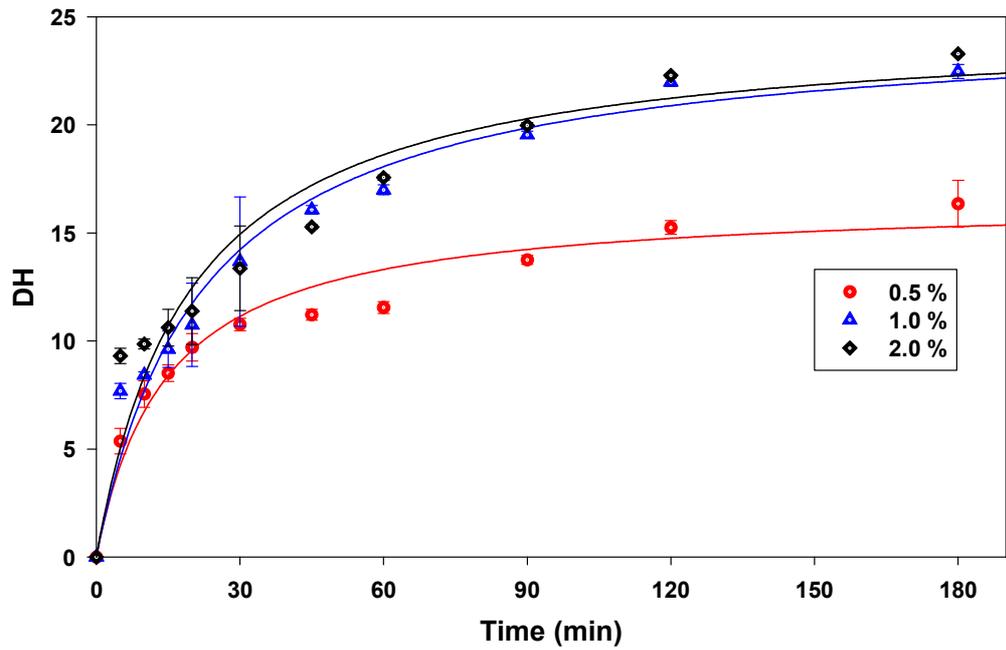


Figure 6. Reaction progress curves for enzymatic hydrolysis of beef extract by Flavourzyme.

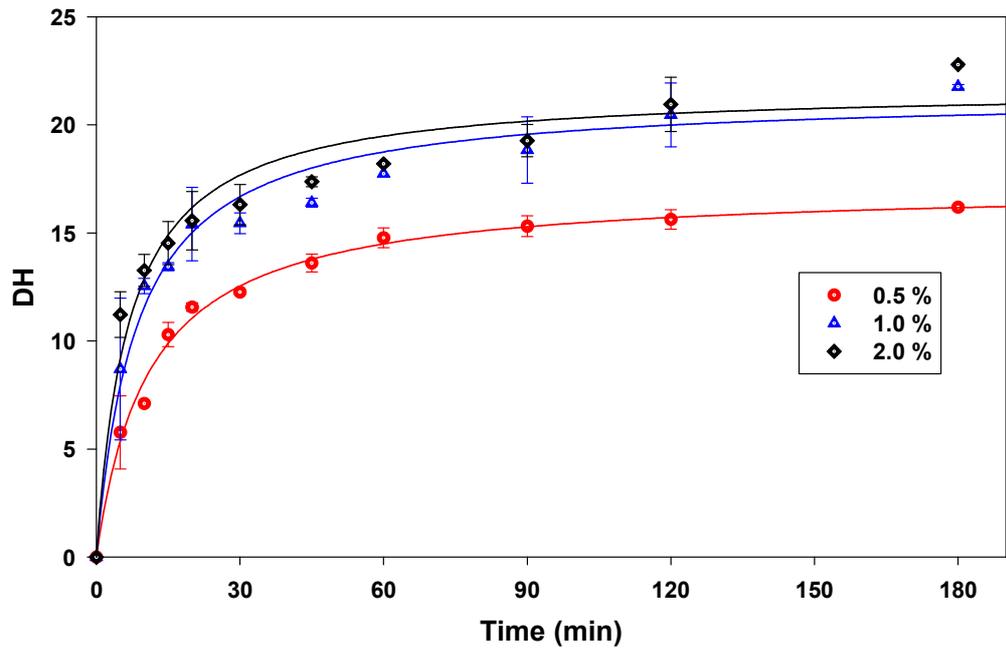


Figure 7. Reaction progress curves for enzymatic hydrolysis of beef extract by Neutrase.

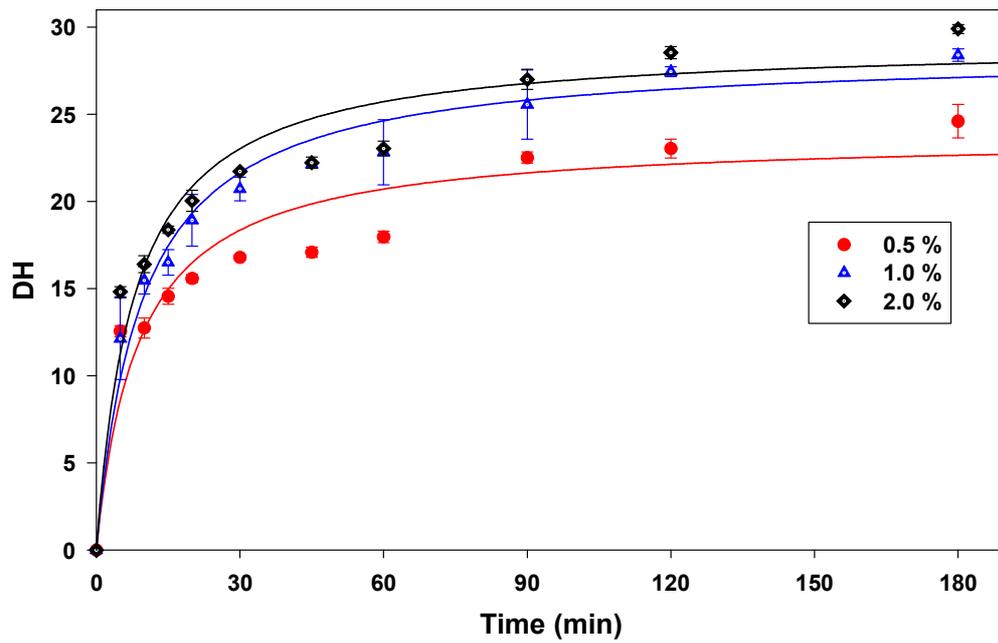


Figure 8. Reaction progress curves for enzymatic hydrolysis of beef extract by Protamex.

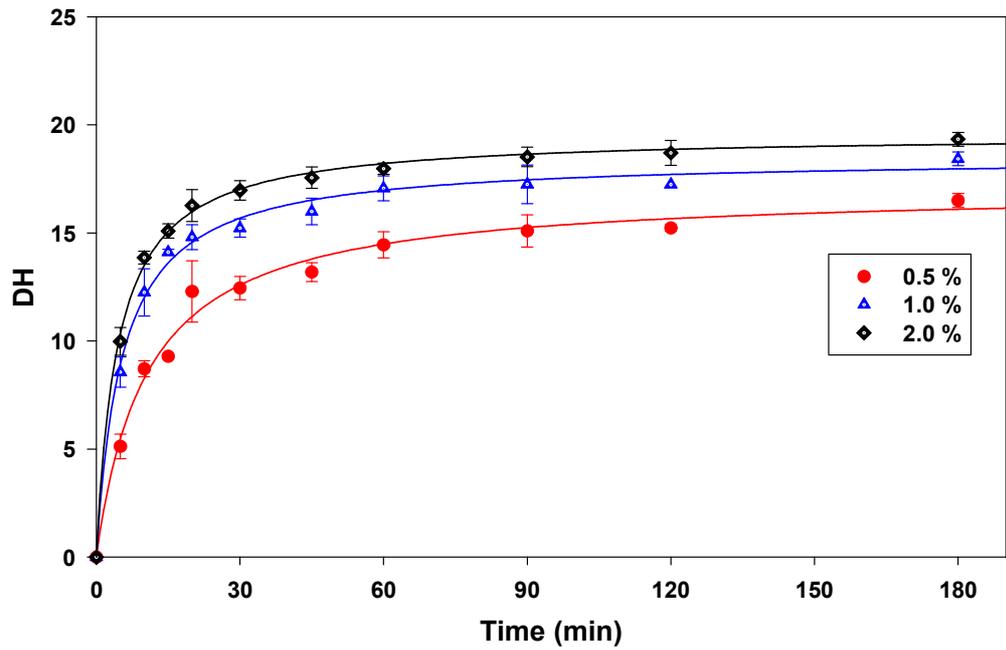


Figure 9. Reaction progress curves for enzymatic hydrolysis of beef extract by Bromelain.

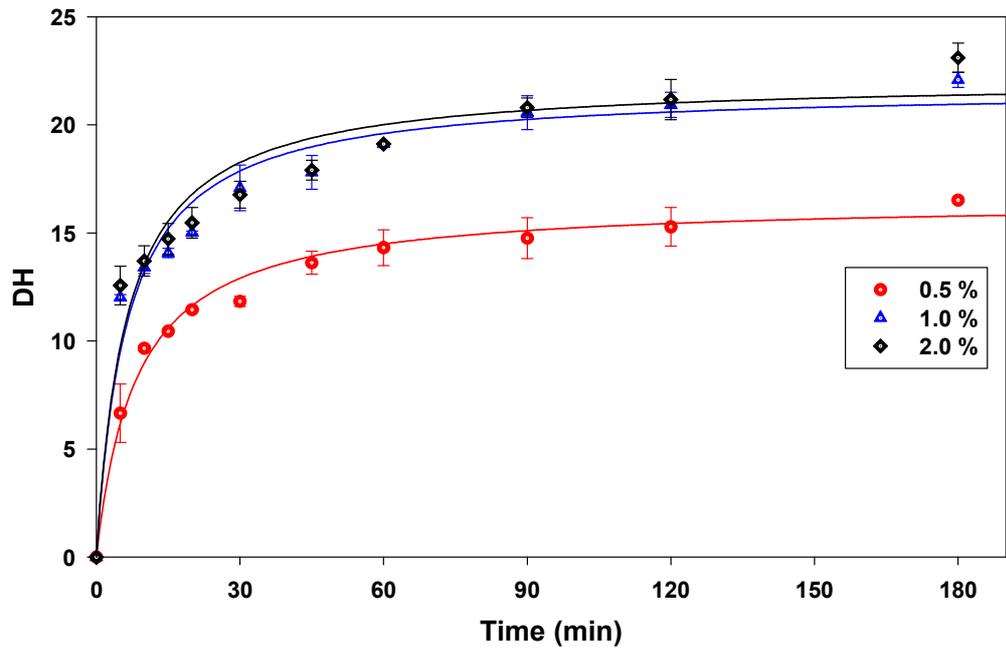


Figure 10. Reaction progress curves for enzymatic hydrolysis of beef extract by Papain.

3) 대두 단백질 가수분해물의 쓴맛 측정

효소분해법에 의해 제조된 대두 단백질 가수분해물의 쓴맛정도를 측정하기 위해 TDA 법을 이용하여 실시하였다. 또한 쓴맛의 강도는 TD factor로 나타내었다. 가수분해한 시료를 증류수로 단계적으로 2배로 희석하여 쓴맛이 blank 시료와 차이가 나타나지 않을 때 까지 실시하였다. 실험에 사용한 상업용 효소 중 Alcalase가 가장 큰 TD factor를 나타내었고 Protamex, Neutrase, Papain은 유사한 경향 및 정도를 나타내었으며, Flavourzyme은 가장 적은 쓴맛을 나타내었다(Figures 11~16). 모든 효소에서 가수분해도가 증가함에 따라 쓴맛의 강도도 증가함을 나타내었으나 Papain의 경우 가장 높은 가수분해도를 가지는 가수분해물은 쓴맛이 감소함을 나타내었다. 단백질 가수분해물의 경우 500에서 3,000정도의 분자량을 가진 경우 bitter taste가 발생하며, 또한 가수분해물의 hydrophobic amino acid 잔기가 많을 경우(Proline, Leucine, Isoleucine 등)에 bitter taste의 강도는 증가한다고 보고되고 있다. 따라서 효소별로 가수분해효소가 작용하는 amino acid가 다르며, 이로 인해 생산되는 가수분해물, 즉 대두 펩타이드의 분자량 및 hydrophobic 잔기의 차이에 의해 이러한 결과가 나타났다고 생각되어 진다. Alcalase는 가장 높은 쓴맛정도를 나타내었다(Figure 11). 낮은 가수분해도에서도 높은 쓴맛을 나타내었으며, 가수분해도가 증가함에 따라 급격하게 증가하여, 180분 가수분해한 시료에서는 TD factor가 64로 가장 높은 TD factor를 나타내었다. Flavourzyme은 모든 효소 중 가장 낮은 쓴맛 정도를 나타내었다(Figure 12). 가수분해도가 12% 이하에서는 쓴맛이 전혀 감지되지 않았으며, 높은 가수분해도인 15%에서는 TD factor가 2 정도로 다른 효소들로 처리한 가수분해물에 비하여 (TD factor 8~32) 매우 낮은 쓴맛을 나타내었다. Neutrase는 가수분해도가 7% 이하에서는 쓴맛이 감지되지 않았으며, 15%에서는 TD factor가 16으로 나타났다(Figure 13). 낮은 가수분해도에서는 쓴맛이 나타나지 않았으나, 높은 가수분해도(DH 10% 이상)에서는 Protamex에 비하여 높은 TD factor를 나타내었다(Figure 14). Protamex는 높은 가수분해도에 비해 쓴맛의 강도는 상대적으로 작은 값을 나타내었다. 초기 가수분해물에서 시료에서 쓴맛이 감지되었으나(TD factor = 4), 가수분해도가 증가함에 따라 쓴맛의 증가는 상대적으로 낮았다. 가수분해도 15%에서 TD factor는 8로써 Flavourzyme을 제외한 모든 효소로 처리한 가수분해물에 비하여 동일한 가수분해도에서 상대적으로 낮은 쓴맛정도를 나타내었으며(16~32), 또한 가수분해도 20%에서도 Alcalase와 비교하여 상대적으로 매우 낮은 쓴맛정도를 나타내었다(Protamex: 16, Alcalase:

64). Bromelain 및 Papain은 Neutralse와 유사한 경향의 쓴맛 정도를 나타내었다 (Figure 15 와 16). 그러나 Papain이 경우 가장 높은 가수분해도에서는 쓴맛이 오히려 감소함을 나타내었다. Flavourzyme을 이용 시 쓴맛을 제거하는 가장 좋은 효과를 부여할 수 있으나, 다른 효소에 비하여 상대적으로 낮은 가수분해도를 나타내었다. Protamex는 높은 가수분해도를 나타내며, 또한 높은 가수분해도에 비하여 상대적으로 낮은 쓴맛을 나타내었다. 위의 결과에 의하여 Flavourzyme과 Protamex를 대두 단백질 분해효소로 선발하여 최적화 연구에 사용하였다.

25 

Figure 11. Changes in TD factors during proteolysis with 0.5% E/S by Alcalase.

20 T

Figure 12. Changes in TD factors during proteolysis with 0.5% E/S by Flavourzyme.

20 T

Figure 13. Changes in TD factors during proteolysis with 0.5% E/S by Neutrase.

30 

Figure 14. Changes in TD factors during proteolysis with 0.5% E/S by Protamex.

20 

Figure 15. Changes in TD factors during proteolysis with 0.5% E/S by Bromelain.

20 T

Figure 16. Changes in TD factors during proteolysis with 0.5% E/S by Papain.

나. Savory향 생성 반응조건 최적화

1) 반응표면분석을 이용한 savory향 생성 반응조건 최적화

Savory향 생성 반응조건 최적화하기 위해 위의 연구를 통하여 선발된 Flavourzyme과 Protamex로부터 생산된 가수분해물을 이용하여 반응표면분석법의 중심합성설계(central composite design)와 각 독립변수(independent variables)에 따른 각 code화된 level에서 종속변수(dependent variables)인 기호도와 bitterness 정도를 Table 13에 나타내었다. 이 결과를 가지고 RSM을 행하여 계산된 model coefficients는 Table 14에 나타내었다. 종속변수에 의해 계산된 regression coefficient를 가지고 $p < 0.1$ 에서 향 생성반응을 가장 잘 설명하는 모델식은 다음과 같다.

$$\begin{aligned} Y_1 &= 4.8875 - 1.5850X_1X_2 - 1.4867X_3^2 + 1.3600X_1X_4 \\ Y_2 &= 4.8056 - 1.3981X_2^2 + 2.2778X_3X_2 - 1.3981X_3^2 - 1.1667X_3X_4 \\ Y_3 &= 1.3750X_1^2 - 1.2500X_1X_2 + 0.8750X_3^2 \\ Y_4 &= 0.5833X_3 + 2.1250 X_3^2 \end{aligned}$$

(Y1 = 기호도, Flavourzyme; Y2 = 기호도, Protamex; Y3 = 쓴맛, Flavourzyme; Y4 = 쓴맛, Protamex; X1 = DH; X2 = glucose; X3 = cysteine; X4 = thiamine)

또한 각각의 식들의 R^2 값은 0.7475, 0.8200, 0.8254, 0.8099로 다소 낮게 나왔지만 모델식이 어느 정도의 유의수준에서 적합한가를 보여주는 probability은 모두 0.05이하로 $P < 0.05$ 의 유의수준에서 가정된 모형반응이 적합하다고 말할 수 있다. 기호도에서 각각 독립변수의 영향정도를 분석하여 본 결과는 Table 15에 나타내었다. 그 결과 기호도에 미치는 영향은 Flavourzyme을 사용한 경우는 DH, cysteine, glucose, thiamine의 순으로 나타났으며, 특히 DH와 cysteine이 기호도에 크게 영향을 미치는 인자로 생각되어 진다. Protamex의 경우는 cysteine, glucose, thiamine, DH 순으로 나타났으며, cysteine과 glucose 함량이 기호도에 큰 영향을 미치는 인자로 생각되어 진다. RSM을 행하여서 구한 coefficients를 가지고 두개의 independent variables간의 상관관계를 보기 위하여 contour plot를 그렸다(Figure

17 와 18). Flavourzyme으로 효소 처리한 가수분해물을 이용하여 향 제조 시 DH의 경우에는 대부분 DH가 10% 이하 (coded level 0 이하)에서 최적의 기호도를 나타내었다(Figure 17). 또한 DH와 함께 큰 영향을 나타내는 cysteine의 함량은 2% (coded level = 0) 부근에서 가장 높은 기호도를 나타내었는데 DH와 cysteine의 함량의 변화를 이용하여 나타낸 contour plot을 확인해 보면 DH 7.2%, cysteine 1.8%에서 가장 높은 기호도를 나타내었다. 또한 glucose 및 thiamine의 경우 DH와 cysteine에 비하여 적은 효과를 나타내었으나, contour plot을 확인하여 보면 대부분 coded level 0 (glucose = 5%, thiamine = 2%)에서 높은 기호도를 나타내었으며 특히 thiamine의 경우 2% 이상에서는 기호도가 급격하게 감소함을 나타내었다. Protamex로 효소 처리한 가수분해물을 이용하여 향 제조 시 가장 높은 영향을 나타내는 cysteine의 경우에는 2% (coded level 0 이하)에서 부근에서 최적의 기호도를 나타내었다(Figure 18). 그러나 2% 이상이거나 그 이하에서는 기호도가 크게 감소하는 경향을 보였다. Glucose 함량은 cysteine과 마찬가지로 coded level이 0 (5%)에서 가장 높은 기호도를 나타내었으나 다른 범위에서는 기호도의 감소를 나타내었다. Cysteine과 glucose의 함량의 변화를 이용하여 나타낸 contour plot을 확인해 보면 cysteine 1.8%, glucose 4.5%에서 가장 높은 기호도를 나타내었다. DH와 thiamine의 함량은 기호도에 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다.

쓴맛에서 각각 독립변수의 영향정도를 분석하여 본 결과는 Table 16에 나타내었다. 쓴맛의 강도에 미치는 영향은 Flavourzyme을 사용한 경우는 DH, glucose, cysteine, thiamine의 순으로 나타났다. 쓴맛의 경우는 기호도와는 달리 다른 독립변수에 비하여 DH가 큰 영향을 나타내는 것으로 확인되었다. 이는 Protamex의 경우에서도 마찬가지로 확인되었으며 Protamex의 경우 DH, cysteine, glucose, thiamine 순으로 나타났다. 그러나 Flavourzyme 처리와는 달리 cysteine 또한 쓴맛에 큰 영향을 나타냄을 확인 할 수 있었다. RSM을 행하여서 구한 coefficients를 가지고 두개의 independent variables간의 상관관계를 보기 위하여 contour plot를 그렸다(Figure 19 과 20). Flavourzyme으로 효소처리한 가수분해물을 이용하여 향 제조시 DH의 경우에는 대부분 DH가 10% 이하 (coded level 0 이하)에서 쓴맛이 감지되지 않는 것으로 나타났다(Figure 19). 이 결과는 위의 대두 단백질 가수분해물의 결과와 동일하게 나타났으며 가수분해도가 증가할수록 쓴맛의 강도가 증가함을 나타내는 결과와 일치하였다. Glucose, cysteine, thiamine는

대부분 coded level 0 부근 (glucose = 5%, cysteine, thiamin = 2%)에서 가장 낮은 쓴맛 강도를 나타내었으나 DH에 비하여 낮은 영향을 주는 것으로 확인되었다. Protamex에서도 DH가 가장 높은 영향을 나타내었다(Figure 20). Protamex의 경우도 Flavourzym과 마찬가지로 DH 범위가 10% 이하에서 쓴맛이 나타나지 않는다고 확인되었다. 또한 cysteine이 Protamex의 경우 쓴맛에 큰 영향을 나타낸다고 확인되었는데 2%에서 가장 낮은 쓴맛을 나타낸 반면 이 외의 범위에서는 급격하게 쓴맛이 증가함을 알 수 있었다. 우에는 2% (coded level 0 이하)에서 부근에서 최적의 기호도를 나타내었다.

Table 13. Experimental data for overall like (F : Flavourzyme, P : Protamex) and bitterness (F : Flavourzyme, P : Protamex) with different combinations of DH (X_1), glucose (X_2), cysteine (X_3) and thiamine (X_4) used in the central composite design

No.	coded level				Experiment data			
	X_1	X_2	X_3	X_4	overall like		bitterness	
					F	P	F	P
1	-1	-1	-1	-1	5.11	5.00	0	0
2	-1	-1	-1	1	3.89	5.33	0	2
3	-1	-1	1	-1	4.22	4.67	0	0
4	-1	-1	1	1	2.56	2.78	0	1
5	-1	1	-1	-1	4.78	3.56	0	0
6	-1	1	-1	1	3.67	3.33	1	0
7	-1	1	1	-1	5.33	5.56	0	0
8	-1	1	1	1	4.22	4.67	0	0
9	1	-1	-1	-1	4.11	4.44	2	2
10	1	-1	-1	1	4.56	4.78	2	0
11	1	-1	1	-1	4.56	4.00	2	3
12	1	-1	1	1	4.11	2.89	3	3
13	1	1	-1	-1	3.22	4.33	1	2
14	1	1	-1	1	3.11	4.00	2	3
15	1	1	1	-1	3.22	4.78	1	3
16	1	1	1	1	3.67	4.11	1	2
17	-2	0	0	0	5.56	5.00	0	0
18	2	0	0	0	3.33	4.56	2	4
19	0	-2	0	0	4.78	2.89	0	0
20	0	2	0	0	5.00	4.00	0	0
21	0	0	-2	0	4.00	4.44	0	2
22	0	0	2	0	3.33	2.44	1	4
23	0	0	0	-2	4.56	6.33	0	0
24	0	0	0	2	4.78	4.89	0	2
25	0	0	0	0	4.22	5.44	0	1
26	0	0	0	0	5.33	4.89	0	0
27	0	0	0	0	5.44	3.77	0	2
28	0	0	0	0	4.56	5.11	0	0

Table 14. Regression coefficients¹ for the response surface models

Factor	overall liking		bitterness	
	F	P	F	P
Intercept	4.8875**	4.8056**	0.0000	0.7500
Linear				
X ₁	-0.6400	-0.2037	1.4167	1.9167
X ₂	-0.1217	0.2222	-0.2500	-0.0833
X ₃	-0.1583	-0.4444	0.0833	0.5833*
X ₄	-0.3600	-0.6111	0.2500	0.4167
Quadratic				
X ₁ ²	-0.7067	-0.0648	1.3750***	1.1250
X ₂ ²	-0.2617	-1.3981***	0.3750	1.1250
X ₃ ²	-1.4867***	-1.3981***	0.8750*	2.1250**
X ₄ ²	-0.4817	0.7685	0.3750	0.1250
Interactions				
X ₁ X ₂	-1.5850**	0.4444	-1.2500**	-0.8750
X ₃ X ₁	0.4200	-0.5556	0.2500	1.2500
X ₃ X ₂	0.9700	2.2778***	-0.7500	-0.7500
X ₄ X ₁	1.3600**	0.2222	0.2500	-1.2500
X ₄ X ₂	0.2500	0.0556	0.2500	-0.2500
X ₄ X ₃	-0.1950	-1.1667*	-0.2500	-0.2500
R ²	0.7475	0.8200	0.8254	0.8099
F	2.75	4.23	4.39	3.95
Probability	0.0384	0.0067	0.0057	0.0090

¹ Model on which X₁ = DH, X₂ = glucose, X₃ = cysteine, X₄ = thiamine

* P < 0.1

** P < 0.05

*** P < 0.001

Table 15. Analysis of variance for the effects of variables on the overall liking

Variable	overall liking			
	Flavourzyme		Protamex	
	F value	Pr>F	F value	Pr>F
DH (%)	4.73	0.0111	0.51	0.7642
Glucose (%)	2.26	0.1094	5.42	0.0065
Cysteine (%)	2.82	0.0612	6.90	0.0024
Thiamine (%)	1.88	0.1669	2.85	0.0592

Table 16. Analysis of variance for the effects of variables on the bitterness

Variable	bitterness			
	Flavourzyme		Protamex	
	F value	Pr>F	F value	Pr>F
DH (%)	11.00	0.0003	7.57	0.0016
Glucose (%)	1.84	0.1739	0.89	0.5136
Cysteine (%)	1.25	0.3433	2.91	0.0561
Thiamine (%)	0.51	0.7616	0.73	0.6149

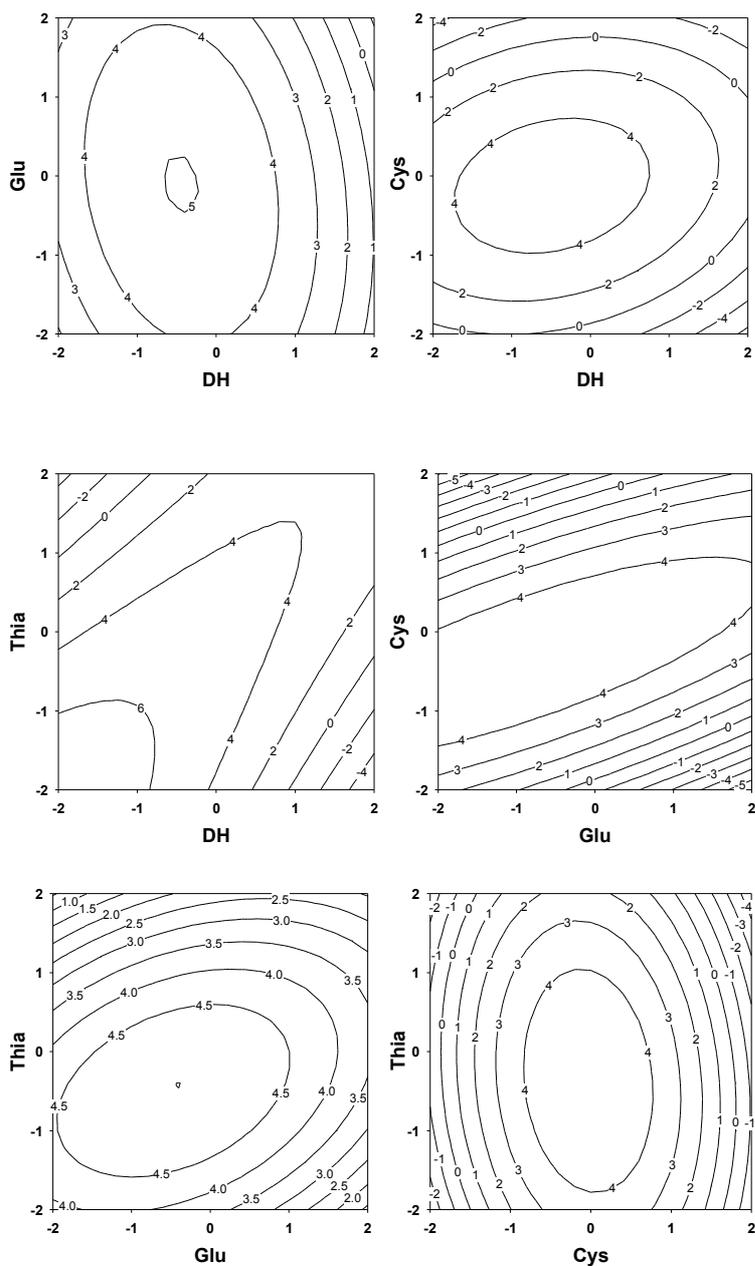


Figure 17. Response surface contour plots for overall liking by Flavourzyme as plotted for two variables with other two variable fixed at 0 coded levels.

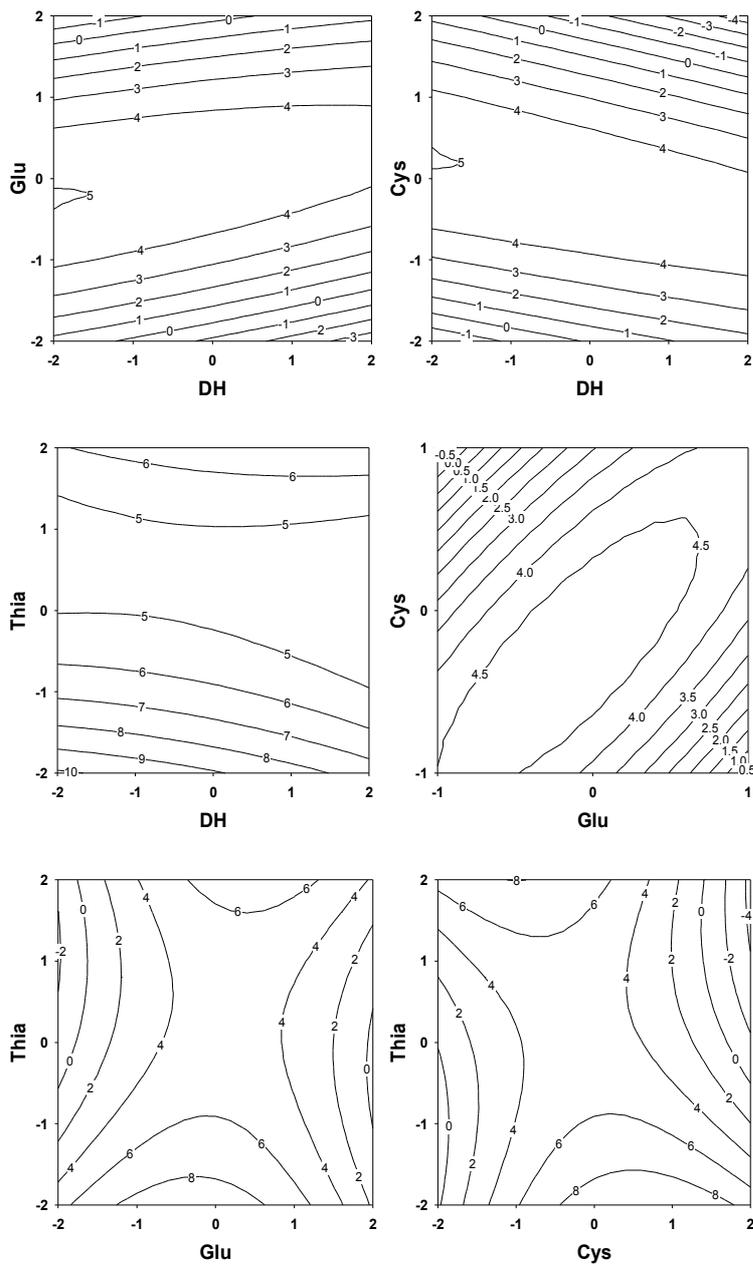


Figure 18. Response surface contour plots for overall liking by Protamex as plotted for two variables with other two variable fixed at 0 coded levels.

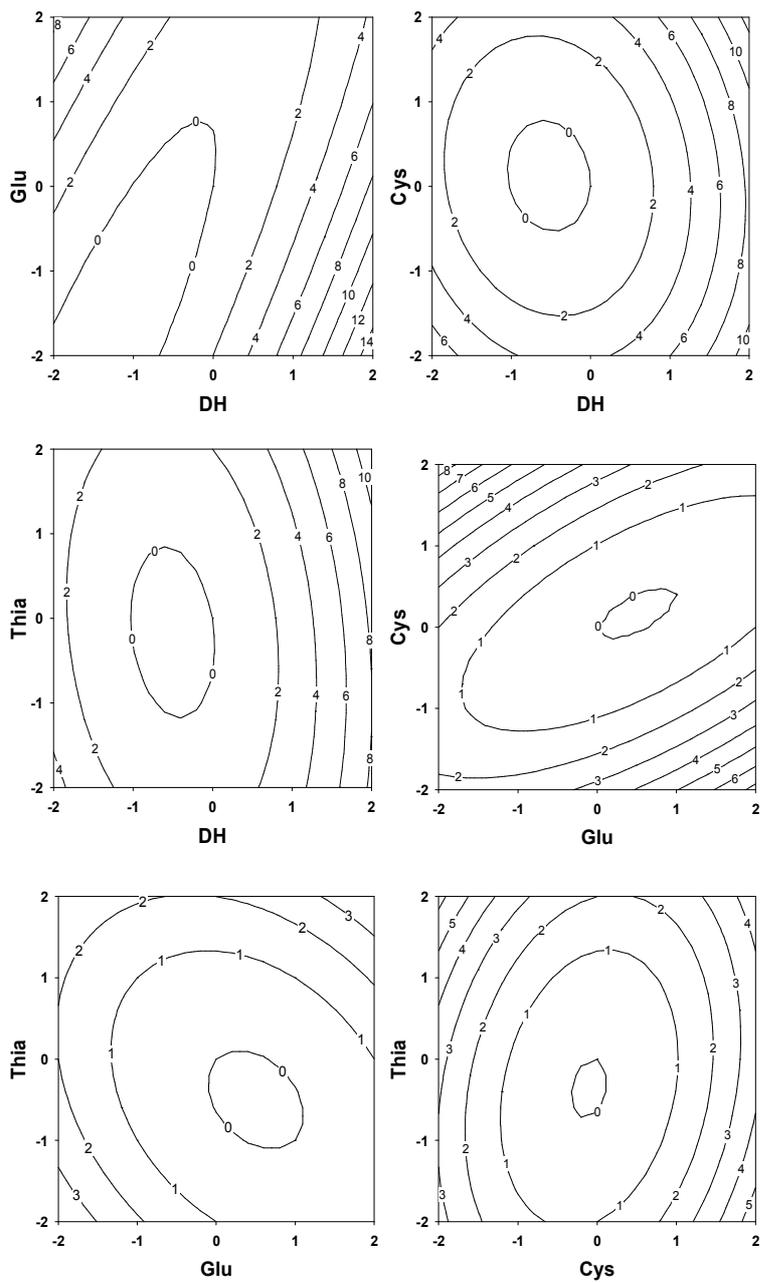


Figure 19. Response surface contour plots for bitterness by Flavourzyme as plotted for two variables with other two variable fixed at 0 coded levels.

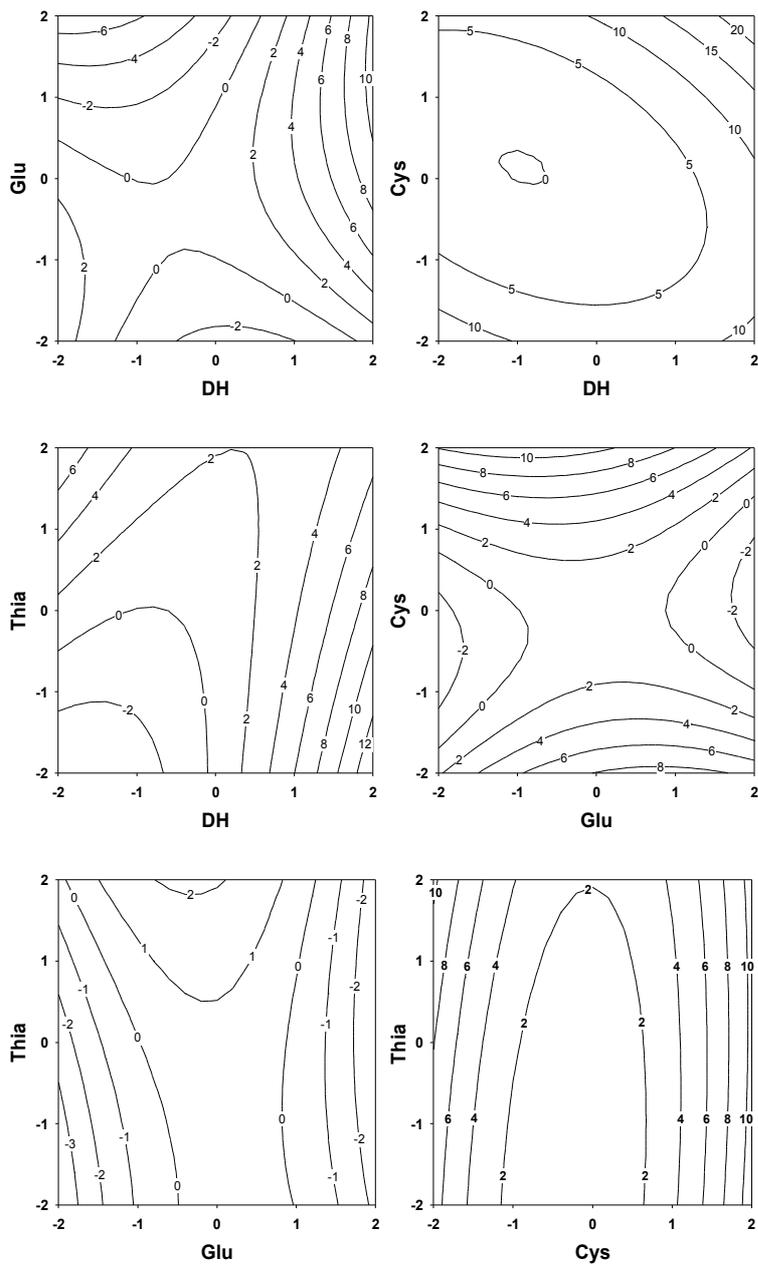


Figure 20. Response surface contour plots for bitterness by Protamex as plotted for two variables with other two variable fixed at 0 coded levels.

다. 최적화된 대두단백질가수분해반응물(savory향)의 향미특성 분석

1) 최적화된 대두단백질가수분해반응물(savory향)의 휘발성 성분

선정한 Protamex와 Flavourzyme를 사용하여 최적조건에서 savory 향을 제조하였다. 최적화된 savory 향의 휘발성 성분을 SAFE를 이용하여 추출하고 GC-MS를 이용하여 분석한 결과는 Table 17에 나타내었다. Protamex를 사용하여 제조된 savory 향에서는 81개, Flavourzyme을 사용한 경우 93개의 휘발성 성분이 동정되었다. 휘발성 성분을 작용기별로 보면, Protamex는 hydrocarbon류 14종, alcohol류 12종, ketone류 12종, aldehyde류 11종, 합질소화합물 9종, ester류 6종, acid류 5종, 함황화합물 5종, 방향족화합물 5종, lactone류 2종, 이 밖에 furan류가 동정되었고, Flavourzyme의 경우 hydrocarbon류 14종, ketone류 13종, aldehyde류 13종, 합질소화합물 9종, alcohol류 8종, acid류 6종, ester류 5종, 함황화합물 5종, 방향족화합물 2종, 이 밖에 furan류와 lactone류가 동정되었다.

Protamex를 이용하여 제조된 savory 향은 maltol(no. 60), hexanal(no. 12), eugenol(no. 82), benzaldehyde(no. 27)가 상대적으로 높은 함량으로 나타났으며, 이 밖에도 dihydro-2-methyl-3(2H) furanone(no. 13), 2-acetyl pyrrole(no. 46) 등도 주된 휘발성 화합물로 동정되었다. Flavourzyme을 이용하여 제조된 savory 향은 (no. 42), 2-acetyl pyrrole(no. 46), maltol(no. 60), benzaldehyde(no. 27)가 상대적으로 높은 함량으로 나타났으며, 이 밖에도 toluene(no. 11), dihydro-2-methyl-3(2H) furanone(no. 13)도 주된 휘발성 성분으로 동정되었다.

효소 처리에 따른 두 가지 savory향의 휘발성 성분은 유사한 경향을 나타내었으나, Flavourzyme을 이용하여 제조된 savory 향이 Protamex를 이용하여 제조된 savory 향에 비해 많은 종류의 휘발성 성분을 함유하고 있었다. Flavourzyme은 exo-type과 endo-type의 성질을 모두 갖고 있기 때문에 endo-type의 성질만을 갖고 있는 Protamex와 차이를 나타내었을 뿐 아니라 최적 가수분해도에 있어서도 Flavourzyme은 9.4%, Protamex는 2.5%로 큰 차이를 나타내어, Flavorzyme로 가수분해한 경우에 상대적으로 많은 양의 아미노산을 생성하여 반응과정 중 많은 양의 휘발성 성분이 생성되었을 것으로 생각된다. Savory 향의 휘발성 성분 중 pyrazine, furan, thiazole등은 가열에 의한 Maillard reaction에 의해 생성된 화합물로 대두단백질 가수분해물 savory 향의 중요한 휘발성 성분으로 동정되었다.

Pyrazine류는 Protamex와 Flavourzyme을 이용한 두 경우 모두 2-ethyl-6-methyl pyrazine(no. 32), 2-ethyl-5-methyl pyrazine(no. 33)을 제외하고 동일한 휘발성 성분이 동정되었고, Flavourzyme을 이용한 경우에 많은 양의 성분이 동정되었다. 특히 2-ethyl-6-methyl pyrazine(no. 32)는 Flavourzyme을 이용한 시료에서는 많은 양이 동정되었지만, Protamex를 이용한 시료에서는 동정되지 않았다. 동정된 pyrazine류 중 2,5-dimethyl pyrazine(no. 24), 2-ethyl-3,5-dimethyl pyrazine(no. 49) 등은 대부분 고소한 향이나 고기향에 기여하는 화합물로 보고되고 있다. 함황화합물은 가열에 의해 생성되는 thiazole, thiophene과 같은 고리형 화합물이 대부분 동정되었다. 고리형 함황화합물 역시 Flavourzyme을 이용한 경우 Protamex를 이용한 경우에 비해 많은 양의 성분이 동정되었으며, 특히 4-methyl-5-vinyl thiazole(no. 39)은 Flavourzyme을 이용한 시료에서만 동정되었다. Aldehyde 화합물은 phenylacetaldehyde(no. 42)가 중요한 화합물로 동정되었으며, 이외에 hexanal, nonanal, benzaldehyde, furfural 등이 동정되었다. Aldehyde 화합물 중 phenylacetaldehyde(no. 42)는 phenylalanine의 Streaker aldehyde로 Maillard reaction 중 환원당과 반응하여 생성되어 진다고 보고되어 있다. 또한 Flavourzyme으로 처리한 경우 Protamex보다 높은 함량을 나타냈는데, 이러한 이유는 위에서 언급한 효소의 특성 차이와 가수분해도의 차이에 의해 나타난다고 생각된다. Ketone류 화합물은 diacetyl, 2-heptanone, 2,3-octanedione등이 동정되었다. Alcohol 화합물은 maltol, 1-octen-3-ol 등이 동정되었으며, 특히 1-octen-3-ol은 지방 산화에 의해 생성된 대표적인 화합물로 보고되어 있으며, 또한 버섯의 특징적인 향기성분으로 알려져 있다. 대부분 화합물은 대두단백질가수분해물과 첨가한 전구물질이 진공과정 중 가열에 의하여 생성된 화합물로 savory 향에 기여하는 것으로 생각한다.

2) 최적화된 대두단백질가수분해반응물의 특징적인 향기 성분 동정

최적화된 savory 향의 특징적인 향기 성분을 SAFE를 이용하여 추출하고 GC-MS-O를 이용하여 분석한 결과는 Table 18과 19에 나타내었으며, 향기 성분의 상대적 강도를 알아보기 위하여 AEDA를 행하여 flavor dilution chromatogram을 Figure 21과 22에 나타내었다. Protamex를 이용하여 제조된 savory 향에서는 16개, Flavourzyme을 이용한 경우 17개의 향기 성분이 동정되었다. Protamex로

처리한 savory 향은 methional(no. 22, potato-like, $\log_3\text{FD} = 6$)이 큰 $\log_3\text{FD}$ 값을 나타내었으며, 2-methyl-3-furanthiol(no. 1, meat-like, $\log_3\text{FD} = 5$), diacetyl(no. 1, buttery, $\log_3\text{FD} = 4$), 2-ethyl-3,5-dimethyl pyrazine(no. 49, nutty, $\log_3\text{FD} = 4$), 2-acetyl-2-thiazoline (no. 57, roasted, $\log_3\text{FD} = 4$)도 높은 $\log_3\text{FD}$ 값을 나타내었다. Flavourzyme으로 처리한 savory 향은 methional(no. 22, potato-like, $\log_3\text{FD} = 7$)이 가장 큰 $\log_3\text{FD}$ 값을 나타내었으며, 이 밖에 2-methyl-3-furanthiol(no. 1, meat-like, $\log_3\text{FD} = 7$), phenylacetaldehyde(no. 42, floral, $\log_3\text{FD} = 6$), 2-ethyl-3,5-dimethyl pyrazine(no. 49, nutty, $\log_3\text{FD} = 6$) 과 2-acetyl-3-methyl pyrazine이 높은 $\log_3\text{FD}$ 값을 나타내었다. Methional(no. 22, potato-like, $\log_3\text{FD} = 6$)과 2-methyl-3-furanthiol(no. 1, meat-like, $\log_3\text{FD} = 5$)은 함황화합물로 Protamex와 Flavourzyme 모두에서 높은 $\log_3\text{FD}$ 값을 나타내었다.

Methional(no. 22, potato-like)은 methionine의 Strecker aldehyde로 Maillard reaction 중 환원당과 반응하여 생성된다고 보고 되고 있다. 또한 2-methyl-3-furanthiol(no. 1, meat-like)은 thiamin의 열분해나 ribose와 cysteine 사이의 Maillard reaction에 의해 생성되며, threshold 값이 매우 낮은 화합물로 알려져 있다. 이러한 이유로 GC-MS 상에서는 peak를 확인할 수 없었으나, GC-O에 의해서는 확인되었으며, 또한 참고문헌 상의 retention index가 일치함을 확인하여 동정할 수 있었다. Maillard reaction에서 savory 향 생성에 중요하게 작용하는 환원당으로는 ribose가 대표적이며 cysteine 등과 같은 함황아미노산과 반응하여 savory 향을 생성하는 중요한 반응 중간 산물을 생성한다고 보고되고 있다. 또한 savory 향을 생성하기 위해서는 전구물질로 thiamin, methionine 및 함황아미노산이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 이러한 전구물질들의 H_2S , ammonia 및 thiol과 Maillard reaction 중간체가 반응에 참여하는 것으로 알려져 있다. 또한 H_2S 는 함황아미노산의 Steacker 분해를 통해 생성되고 thiamin의 가열에 의해서도 생성되며 상압 하에서 aldehyde와 반응하여 savory향에 가장 중요한 함황고리화합물을 생성하는 것으로 알려져 있다.

Phenylacetaldehyde(no. 42)와 2-acetyl-3-methyl pyrazine(no. 62, toasted, nutty)는 두 효소로 처리한 savory 향에서 모두 동정되었지만, Flavourzyme으로 처리한 savory 향에서는 높은 $\log_3\text{FD}$ 값을 나타내었고, Protamex로 처리한 savory 향에서는 상대적으로 낮은 $\log_3\text{FD}$ 값을 나타내었다.

Table 17. Volatile compounds of savory flavorings manufactured from soy protein isolates hydrolyzed by Protamex and Flavourzyme

No ¹	RI ²	Volatile compound	conc. (ppm) ³	
			Protamex	Flavourzyme
1	593	diacetyl	0.228±0.013	0.039±0.009.
2	597	2-butanone	0.367±0.265	0.389±0.551
3	624	trimethyl oxirane	0.581±0.037	n.d.
4	640	benzene	0.847±0.137	n.d.
5	654	3-methyl butanal	0.360±0.001	3.946±0.205
6	662	2-methyl butanal	0.360±0.040	0.932±0.202
7	688	1-penten-3-ol	0.714±0.014	0.703±0.038
8	703	6-methyl-2-hepten-4-ol	0.154±0.040	n.d.
9	706	2,3-pentanedione	0.405±0.423	0.346±0.056
10	707	pentanal	0.507±0.119	0.176±0.249
11	770	toluene	1.095±0.964	4.710±5.608
12	804	hexanal	2.378±0.117	1.582±1.993
13	812	dihydro-2-methyl-3(2H) furanone	1.800±0.078	4.553±1.831
14	838	furfural	0.506±0.079	0.103±0.146
15	850	3-methyl butanoic acid	0.319±0.049	0.655±0.013
16	852	2-methyl butanoic acid	n.d.	0.300±0.209
17	857	furfuryl alcohol	0.261±0.045	0.402±0.132
18	870	1-hexanol	0.377±0.004	0.621±0.340
19	891	2-heptanone	0.898±0.180	0.837±0.408
20	898	3-heptanol	internal standard	
21	907	2-butoxy ethanol	0.099±0.009	0.243±0.047
22	910	methional	0.112±0.037	0.808±0.311
23	912	2-acetyl furan	0.165±0.014	0.295±0.020
24	915	2,5-dimethyl pyrazine	0.884±0.004	2.267±0.458
25	962	δ-valerolactone	0.095±0.046	n.d.
26	965	1,2,3-trimethyl benzene	0.114±0.019	n.d.
27	967	benzaldehyde	1.991±0.142	6.371±6.050
28	981	1-octen-3-ol	1.031±0.126	1.262±0.031
29	985	2,3-octanedione	0.477±0.059	2.827±2.832
30	987	hexanoic acid	0.975±1.090	6.623±4.295
31	992	1-decene	0.134±0.189	1.009±0.824
32	999	2-ethyl-6-methyl pyrazine	n.d.	2.217±2.198
33	1000	2-ethyl-5-methyl pyrazine	0.201±0.020	n.d.
34	1000	decane	0.136±0.192	n.d.
35	1004	trimethyl pyrazine	0.344±0.188	1.846±1.980
36	1020	2-methyl-6-vinyl pyrazine	0.271±0.031	0.488±0.121
37	1023	2-acetyl thiazole	0.238±0.140	0.977±1.043
38	1029	2-ethyl hexanol	0.152±0.020	n.d.
39	1030	4-methyl-5-vinyl thiazole	n.d.	0.214±0.137
40	1037	benzyl alcohol	1.080±0.046	2.468±0.509

Table 17. Continued

No ¹	RI ²	Volatile compound	conc. (ppm) ³	
			Protamex	Flavourzyme
41	1042	1-methyl-2-pyrrolidine	0.156±0.220	1.852±1.792
42	1049	phenylacetaldehyde	0.519±0.031	15.300±1.798
43	1055	γ -hexalactone	0.236±0.009	0.720±0.300
44	1058	2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone	0.185±0.045	0.680±0.138
45	1061	unknown (43, 71, 99)	0.332±0.080	0.741±0.390
46	1066	2-acetyl pyrrole	1.604±0.019	10.036±1.549
47	1072	acetophenone	0.359±0.222	n.d.
48	1077	heptanoic acid	n.d.	0.779±0.027
49	1079	2-ethyl-3,5-dimethyl pyrazine	0.377±0.016	1.113±0.141
50	1088	unknown (43, 128)	0.182±0.133	0.879±0.118
51	1090	unknown (109, 119)	0.134±0.031	n.d.
52	1090	2-phenyl-2-propanol	0.036±0.051	n.d.
53	1095	unknown	0.077±0.109	0.403±0.105
54	1100	undecane	0.299±0.168	0.345±0.012
55	1106	nonanal	0.214±0.099	0.180±0.033
56	1110	2-acetyl-2-thiazoline	0.199±0.077	n.d.
57	1110	5-formyl-4-methyl thiazole	0.191±0.038	1.468±0.051
58	1111	2-ethyl hexanoic acid	0.117±0.038	n.d.
59	1114	maltol	2.964±0.779	9.007±2.562
60	1118	benzeneethanol	0.750±0.061	n.d.
61	1125	2-acetyl-3-methyl pyrazine	0.222±0.014	0.800±0.253
62	1127	2-formyl-3-methyl thiophene	0.332±0.034	1.692±1.653
63	1149	2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one	n.d.	0.256±0.105
64	1151	diethoxy methane	n.d.	0.080±0.016
65	1165	octanoic acid	0.386±0.189	1.518±0.323
66	1185	unknown (109)	0.165±0.021	n.d.
67	1192	1-dodecene	0.708±0.109	1.273±0.152
68	1200	dodecane	0.326±0.205	0.361±0.124
67	1208	decanal	0.131±0.019	0.160±0.078
70	1213	2,6-dimethyl undecane	0.082±0.036	n.d.
71	1224	2-acetyl-3,5-dimethyl pyrazine	0.042±0.003	0.163±0.015
72	1226	3,4-dimethyl benzaldehyde	n.d.	0.108±0.020
73	1229	3-vinyl-1,2-dithiocyclohex-5-ene	0.218±0.026	0.320±0.109
74	1232	3-ethyl-4-methyl-1H-pyrrole-2,5-dione	n.d.	0.145±0.014
75	1235	2-pentyl cyclopentanone	n.d.	0.104±0.034
76	1240	benzothiazole	0.140±0.027	0.216±0.007
77	1250	unknown	0.238±0.050	0.776±0.101
78	1260	nonanoic acid	n.d.	0.753±0.204
79	1264	4-methoxy benzaldehyde	n.d.	0.181±0.072
80	1345	5-pentyl-2(5H)-furanone	0.818±0.797	0.691±0.015

Table 17. Continued

No ¹	RI ²	Volatile compound	conc. (ppm) ³	
			Protamex	Flavourzyme
81	1358	eugenol	2.109±0.032	2.062±0.277
82	1366	dihydro-5-pentyl-3(2H)-furanone	0.278±0.041	0.565±0.199
83	1376	2,6,10-trimethyl dodecane	0.072±0.102	n.d.
84	1379	butyl butanoate	0.715±0.111	1.409±0.561
85	1392	1-tetradecene	1.511±0.459	1.692±0.166
86	1400	tetradecane	0.591±0.234	0.540±0.038
87	1403	vanillin	n.d.	0.170±0.035
88	1463	2,6-di(t-butyl)-4-hydroxy-4-methyl-2,5-cyclohexadien-1-one	1.320±0.073	3.619±2.579
89	1471	2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-2,5-cyclohexadiene-1,4-dione	0.107±0.037	n.d.
90	1475	1-dodecenol	0.167±0.005	0.449±0.073
91	1492	5-methyl-2-phenyl-2-hexenal	n.d.	0.199±0.015
92	1500	pentadecane	0.356±0.101	0.429±0.167
93	1508	2,4-bis(1,1-dimethylethyl)phenol	0.821±0.236	1.794±0.353
94	1593	1-hexadecene	1.810±0.007	n.d.
95	1600	hexadecane	0.181±0.119	n.d.
96	1642	benzophenone	n.d.	0.263±0.323
97	1645	diphenyl methanone	0.079±0.009	n.d.
98	1651	dihydro methyl jasmonate	0.068±0.016	0.319±0.030
99	1654	diethyl <i>p</i> -phthalate	0.204±0.193	n.d.
100	1676	1-heptadecene	0.097±0.007	n.d.
101	1685	2,4-dibutyl-6-nitro phenol	0.127±0.027	n.d.
102	1700	heptadecane	0.115±0.052	n.d.
103	1714	2-octyl benzoate	0.121±0.018	n.d.
104	1742	2-ethylhexyl-3(4-methoxyphenyl)-2-propenoate	n.d.	1.254±0.712
105	1751	α -hexyl cinnamic aldehyde	0.118±0.003	n.d.
106	1793	1-octadecene	0.577±0.046	1.238±0.436
107	1800	octadecane	0.176±0.033	0.267±0.122
108	1857	bis(2-methylpropyl)-1,2-benzenedicarboxylate	0.698±0.076	2.187±1.472
119	1875	1-nonadecene	0.471±0.039	0.935±0.078

¹ Numbers correspond to those in Tables 18 and 19 and Figures 21 and 22.

² Retention indices were determined using C₆~C₂₂ as external reference.

³ Concentration.

2-ethyl-3,5-dimethyl pyrazine(no. 49, nutty)는 두 효소로 처리한 savory 향에서 모두 높은 \log_3 FD 값을 나타내었다.

1-octen-3-ol(no. 28, metallic, \log_3 FD = 0), 2-acetyl-2-thiazoline(no. 57, roasted, \log_3 FD = 4)은 Protamex에서는 확인되었으나, Flavourzyme에서는 확인되지 않았다. Hexanoic acid(no. 30, goat like, \log_3 FD = 1), maltol(no. 60, cocoa, \log_3 FD = 1), 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one(no. 64, molty, \log_3 FD = 3)는 Flavourzyme에서는 확인되었지만, Protamex에서는 확인되지 않았다.

Table 18. Aroma-active compounds in savory flavoring manufactured from soy protein isolate hydrolyzed by Protamex

No ¹	RI ²	Compound name	Aroma description
1	593	diacetyl	buttery
5	654	3-methyl butanal	malty
6	662	2-methyl butanal	buttery
12	804	hexanal	green
I	866	2-methyl-3-furanthiol	meat-like
22	910	methional	potato-like
24	915	2,5-dimethyl pyrazine	potato chip
28	981	1-octen-3-ol	metallic
35	1004	trimethyl pyrazine	roasted
37	1023	2-acetyl thiazole	popcorn
42	1049	phenylacetaldehyde	floral
49	1079	2-ethyl-3,5-dimethyl pyrazine	nutty
56	1110	2-acetyl-2-thiazoline	roasted
61	1125	2-acetyl-3-methylpyrazine	roasted, nutty
A	1187	unknown	burn meat
71	1224	2-acetyl-3,5-dimethyl pyrazine	popcorn

¹ Numbers correspond to those in Tables 17 and 19 and Figures 21 and 22.

² Retention indices were determined using C₆~C₂₂ as external reference.

Table 19. Aroma-active compounds in savory flavoring manufactured from soy protein isolate hydrolyzed by Flavourzyme

No ¹	RI ²	compound name	Aroma description
1	593	diacetyl	buttery
5	654	3-methyl butanal	malty
6	662	2-methyl butanal	buttery
12	804	hexanal	green
I	866	2-methyl-3-furanthiol	meat-like
22	910	methional	potato-like
24	915	2,5-dimethyl pyrazine	potato chip
30	987	hexanoic acid	goat like
35	1004	trimethyl pyrazine	roasted
37	1023	2-acetyl thiazole	popcorn
42	1049	phenylacetaldehyde	floral
49	1079	2-ethyl-3,5-dimethyl pyrazine	nutty
59	1114	maltol	cocoa
61	1125	2-acetyl-3-methyl pyrazine	roasted, nutty
63	1149	2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one	malty
A	1187	unknown	burn meat
71	1224	2-acetyl-3,5-dimethyl pyrazine	popcorn

¹ Numbers correspond to those in Tables 16 and 17 and Figures 21 and 22.

² Retention indices were determined using C₆~C₂₂ as external reference.

Protamex

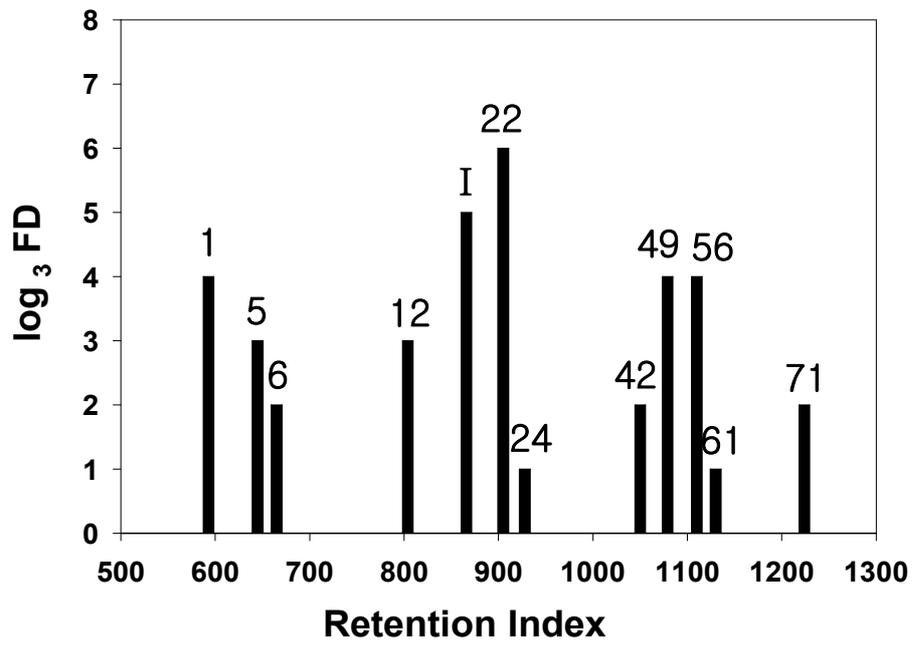


Figure 21. FD chromatogram of savory flavor treated by Protamex.

Flavourzyme

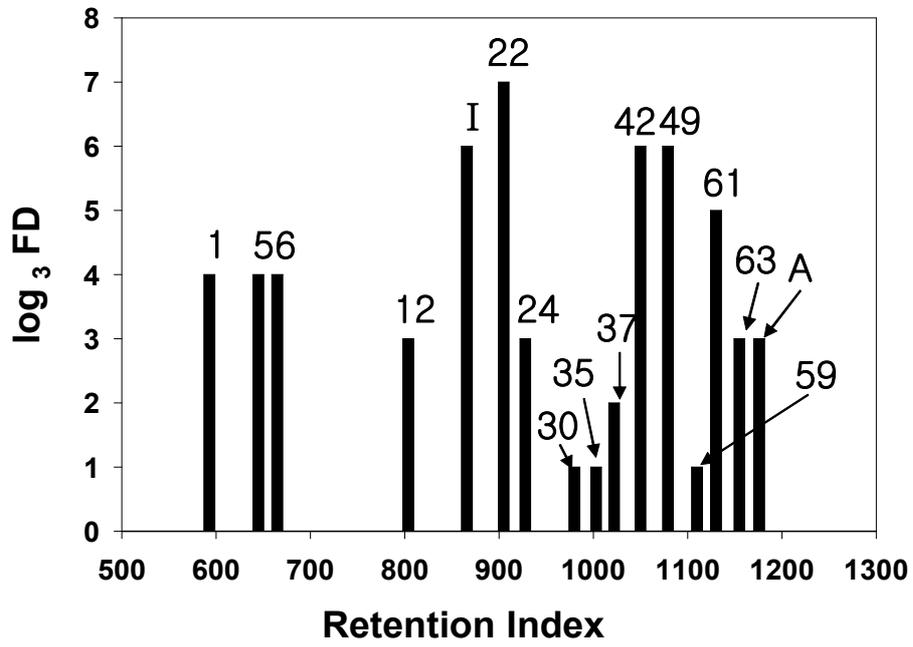


Figure 22. FD chromatogram of savory flavor treated by Flavourzyme.

라. 단백질 가수분해도에 따른 savory향의 향미특성분석

1) 반응표면분석을 이용한 향기성분의 변화 분석

대두 단백질 가수분해물의 가수분해도 및 전구물질에 따른 savory향의 향미특성을 이해하기 위하여 최적화된 savory향으로부터 동정된 중요한 aroma-active 화합물을 종속변수로 하여 반응표면분석법(RSM)으로 분석하였다. 독립변수는 가수분해도(degree of hydrolysis, DH), glucose 양(%), cysteine 양(%) 및 thiamine 양(%)으로 하고, 각각의 반응조건에 5개의 level에 따른 coded unit를 부여하고 이들을 중심합성설계법을 이용하여 28번의 design point를 갖도록 실험을 설계하여 RSM을 행하였다. SPME법으로 휘발성 향기성분을 분석한 후 앞에서 동정된 중요 aroma-active 화합물 중 methional, 2,4-dimethyl pyrazine, phenylacetaldehyde 및 2-ethyl-3,5-dimethyl pyrazine의 함량을 RSM을 위한 종속변수로 사용하였다. RSM 결과 구해진 model coefficients는 Table 20과 21에 나타내었다. 각각의 식들의 R²값은 Protamex로 제조한 savory향의 경우 0.7573, 0.8509, 0.7590, 0.8717로 다소 낮게 나왔지만 모델식이 어느 정도의 유의수준에서 적합한가를 보여주는 probability는 모두 0.05이하로 P<0.05의 유의수준에서 가정된 모델식이 적합하다고 말할 수 있다. 또한 Flavourzyme으로 제조한 savory향의 경우 R²값은 0.8128, 0.8022, 0.8793, 0.8015로 다소 높게 나타났으며, probability 또한 모두 0.05이하로 P<0.05의 유의수준에서 가정된 모델식이 적합하다고 말할 수 있다. Protamex로 제조한 savory 향의 종속변수인 각각의 중요 aroma-active 화합물의 함량에 미치는 독립변수의 영향은 Table 22에 나타내었다. 또한 RSM에서 구한 coefficients를 가지고 두개의 독립변수간의 상관관계를 알아보기 위하여 contour plot를 그렸다(Figures 23 ~ 26). 그 결과 중요 aroma-active 화합물의 생성에는 전구물질로 사용한 cysteine, glucose가 큰 영향을 나타내었으며, 대두 단백질 가수분해물의 가수분해도 또한 중요한 factor임을 알 수 있었다. 그러나 thiamine의 경우 대부분의 중요 aroma-active 화합물의 생성에 영향을 주지 않는 것으로 확인되었다.

Methional의 생성은 cysteine이 가장 큰 영향을 나타내었으며, glucose도 높은 영향을 미치는 것으로 확인되었다. 또한 두 독립변수 간의 상관관계를 countor plot을 확인해 본 결과 glucose 4.5~5.5%(coded level -0.5~0.5), cysteine 1.6~2.0%(-0.4~0), DH 9~10%(-0.2~0)의 범위에서 methional이 최대함량을 나

타내었다(Figure 23). 이는 Protamex로 제조한 savory향의 경우 기호도의 최대범위와 영향력이 적은 DH를 제외하고 비슷한 경향을 나타냄을 확인할 수 있었다. 2,4-Dimethyl pyrazine, phenylacetaldehyde, 2-ethyl-3,5-dimethyl pyrazine은 DH, cyteine, glucose 함량이 휘발성 성분 생성에 큰 영향을 미치는 것으로 확인되었으나 thiamine의 경우 큰 영향을 나타내지 못함을 확인할 수 있었다. 2,4-Dimethyl pyrazine은 DH, glucose 함량이 큰 영향을 나타내었으며, cysteine 또한 큰 영향을 미치는 것으로 확인되었다. Countor plot에서는 DH가 높을수록, glucose의 첨가량이 많을수록 생성되는 양이 증가함을 확인할 수 있었다(Figure 24). 그러나 cysteine의 경우 coded level 0 부근에서 낮은 함량이 생성되는 것으로 확인 되었다. phenylacetaldehyde는 DH, cysteine, glucose 순으로 생성되는 양에 영향을 주는 것으로 확인되었다. Countor plot에서는 2,4-dimethyl pyrazine과 동일하게 DH가 높을수록, glucose의 첨가량이 많을수록 생성되는 양이 증가하나, cysteine의 경우 coded level0 부근에서 낮은 함량이 생성되는 것으로 확인 되었다(Figure 25). 2-Ethyl-3,5-dimethyl pyrazine은 DH, glucose 함량이 높은 영향을 나타내었으며, cysteine 또한 큰 영향을 미치는 것으로 확인되었다. Countor plot에서는 DH가 높을수록, glucose의 첨가량이 많을수록 생성되는 양이 증가함을 확인할 수 있었다(Figure 26). 그러나 cysteine의 경우 coded level 0 부근에서 낮은 함량이 생성되는 것으로 확인 되었다. Protamex의 경우 methional을 제외한 나머지 향기성분들은 모두 동일한 경향의 결과를 확인할 수 있었으며, methional의 경우 기호도의 최대 조건과 최대 생성 조건과 비슷한 경향을 나타냄을 확인할 수 있었다.

Flavourzyme으로 제조한 savory 향의 종속변수인 각각의 향기성분의 함량에 대한 독립변수의 영향은 Table 23에 나타내었다. 또한 RSM을 행하여서 구한 coefficients를 가지고 두개의 independent variables간의 상관관계를 보기 위하여 contour plot를 그렸다(Figures 27 ~ 30). 그 결과 향기성분 함량에 미치는 영향은 Flavourzyme으로 제조한 savory향의 경우는 Protamex로 제조한 경우와 비슷한 경향을 나타내었으며, 전구물질로 사용한 cysteine, glucose와 DH가 큰 영향을 나타내었으나 thiamine의 경우 대부분의 향기성분의 함량에 영향을 나타내지 않았다.

Table 20. Regression coefficients¹ of savory flavoring by Protamex for the response surface models (X₁ = DH, X₂ = glucose, X₃ = cysteine, X₄ = thiamine)

Factor	MET ¹	DMP	PHE	EDMP
Intercept	0.9347	0.2228	0.0992	0.2875
Linear				
X ₁	-0.0697	0.6593	0.6068	0.8964
X ₂	0.0565	0.4843	0.4237	0.5737
X ₃	-0.3908	-0.4822	-0.5242	-0.4367
X ₄	0.0632	-0.2313	0.0232	-0.1304
Quadratic				
X ₁ ²	-0.5621*	0.3624	0.3140	0.6657**
X ₂ ²	-0.5532*	-0.0792	0.1943	-0.2166
X ₃ ²	-0.5145*	0.4833*	0.3924	0.3716
X ₄ ²	-0.0125	0.3025	0.2370	0.3259
Interactions				
X ₁ X ₂	0.5306	1.1089**	1.1640**	1.4660**
X ₁ X ₃	0.2111	-0.5106	-1.2494**	-0.4738
X ₂ X ₃	0.1905	-0.1236	-0.9100*	-0.1767
X ₁ X ₄	0.0022	-0.2977	0.0690	-0.0696
X ₂ X ₄	0.1272	-0.4779	-0.2094	-0.7418*
X ₃ X ₄	-0.1317	-0.2078	-0.1690	0.5915
R ²	0.7573	0.8509	0.7590	0.8717
F	2.90	5.30	2.92	6.31
Probability	0.0316	0.0024	0.0306	0.0010

¹ MET = methional, DMP = 2,4-dimethyl pyrazine, PHE = phenylacetaldehyde, EDMP = 2-ethyl-3,5-dimethyl pyrazine

* P < 0.1

** P < 0.05

Table 21. Regression coefficients¹ of savory flavoring by Flavourzyme for the response surface models (X₁ = DH, X₂ = glucose, X₃ = cysteine, X₄ = thiamine)

Factor	MET ¹	DMP	PHE	EDMP
Intercept	0.3605	0.0167*	0.8495*	0.0172
Linear				
X ₁	0.3207	0.5590	8.4459*	0.6907**
X ₂	0.4194	0.1459	3.2933*	0.1457
X ₃	-0.5207	-0.2602**	-2.8547*	-0.1530*
X ₄	0.0782	-0.0570	0.6030	-0.0589
Quadratic				
X ₁ ²	0.1537	0.7000**	7.4759**	0.8569*
X ₂ ²	-0.0679	0.0542	1.2892	0.0918
X ₃ ²	0.3944	0.6463**	6.1621**	0.5940*
X ₄ ²	0.9321**	0.2393	4.2298*	0.2724
Interactions				
X ₁ X ₂	0.3631	0.6283**	9.6044**	0.6262**
X ₁ X ₃	0.1087	-0.0146	0.3156	0.2079
X ₂ X ₃	-0.3676	0.4218	2.2404	0.6625**
X ₁ X ₄	-0.5956*	-0.3556	-1.8450	-0.3660
X ₂ X ₄	0.2095	-0.0142	-1.6418	-0.0117
X ₃ X ₄	-0.5263	-0.1874	-3.3597	-0.2087
R ²	0.8128	0.8022	0.8793	0.8015
F	4.03	3.77	6.76	3.75
Probability	0.0083	0.0111	0.0007	0.0113

¹ MET = methional, DMP = 2,4-dimethyl pyrazine, PHE = phenylacetaldehyde, EDMP = 2-ethyl-3,5-dimethyl pyrazine

* P < 0.1

** P < 0.05

Table 22. Analysis of variance for the effects of variables on the volatile compounds of savory flavoring by Protamex

Variable	MET		DMP		PHE		EDMP	
	F	Pr>F	F	Pr>F	F	Pr>F	F	Pr>F
DH (%)	1.70	0.2031	7.94	0.0013	4.76	0.0109	11.17	0.0002
Glucose (%)	2.31	0.1040	5.23	0.0075	3.03	0.0498	6.78	0.0026
Cysteine (%)	3.10	0.0464	3.74	0.0256	3.87	0.0227	2.78	0.0639
Thiamine (%)	2.04	0.1399	1.48	0.2616	0.15	0.9770	1.66	0.2143

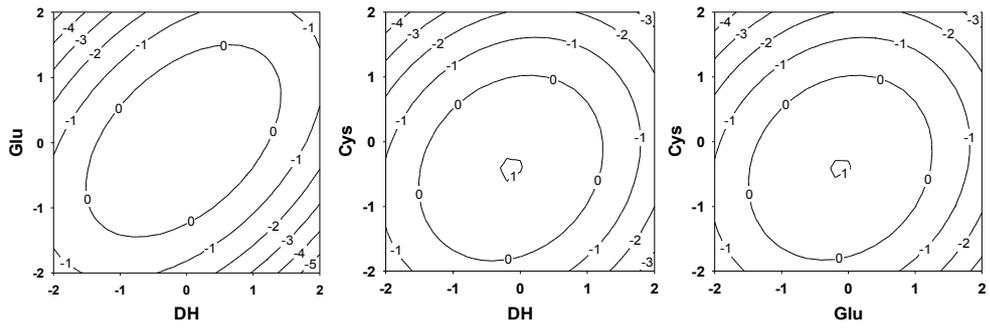


Figure 23. Response surface contour plots for methional of savory flavoring by Protamex as plotted for two variables with other two variable fixed at 0 coded levels.

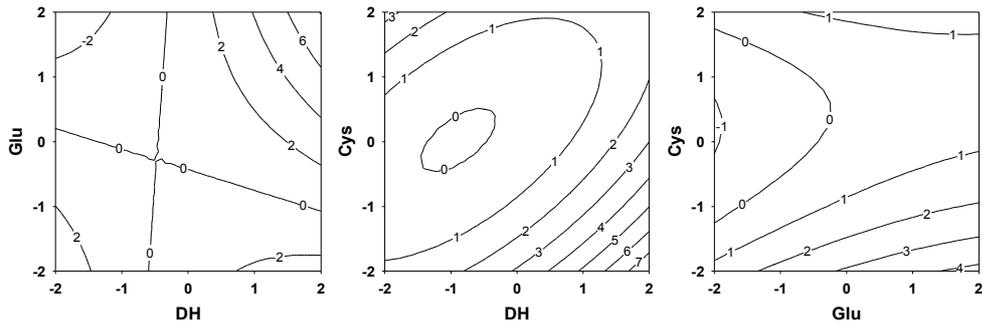


Figure 24. Response surface contour plots for 2,4-dimethyl pyrazine of savory flavoring by Protamex as plotted for two variables with other two variable fixed at 0 coded levels.

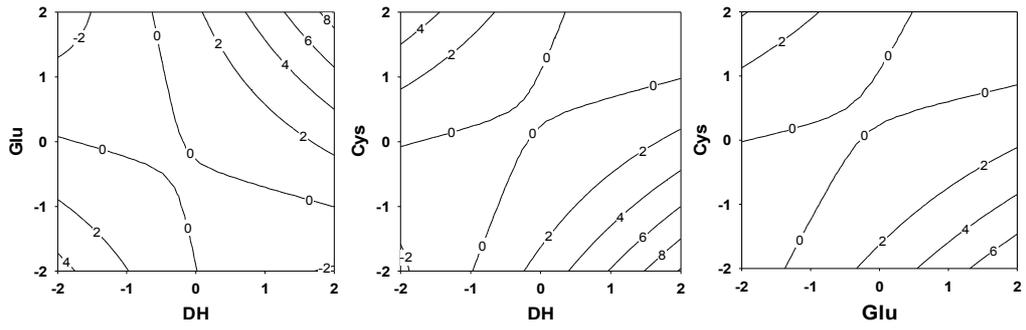


Figure 25. Response surface contour plots for phenylacetaldehyde of savory flavoring by Protamex as plotted for two variables with other two variable fixed at 0 coded levels.

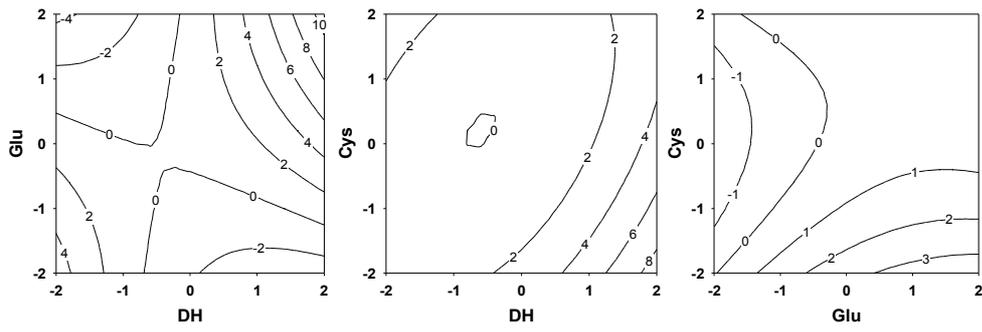


Figure 26. Response surface contour plots for 2-ethyl-3,5-dimethyl pyrazine of savory flavoring by Protamex as plotted for two variables with other two variable fixed at 0 coded levels.

Methional의 생성은 cysteine이 가장 큰 영향을 나타내었으며, glucose도 높은 영향을 미치는 것으로 확인되었다. 또한 두 독립변수 간의 상관관계를 countor plot을 확인해 본 결과 cysteine 함량이 낮을수록, DH가 높을수록, glucose의 첨가량이 많을수록 생성되는 양이 증가함을 확인할 수 있었다(Figure 27). 이는 Protamex로 제조한 경우와 차이를 나타내었다. 2,4-Dimethyl pyrazine, phenylacetaldehyde, 2-ethyl-3,5-dimethyl pyrazine은 DH가 가장 큰 영향을 미치는 인자로 확인되었으며, cysteine, glucose 함량도 휘발성 성분 생성에 큰 영향을 미치는 것으로 확인되었으나 thiamine의 경우 큰 영향을 나타내지 못하였다. 2,4-Dimethyl pyrazine은 DH, glucose 함량이 높은 영향을 나타내었으며, cysteine 또한 큰 영향을 미치는 것으로 확인되었다. Countor plot에서는 DH가 높을수록, glucose의 첨가량이 많을수록 생성되는 양이 증가함을 확인할 수 있었다(Figure 28). 그러나 cysteine의 경우 coded level 0 부근에서 최소 함량을 나타내는 것으로 확인 되었다. phenylacetaldehyde는 2,4-dimethyl pyrazine과 마찬가지로 DH, glucose, cysteine 순으로 생성되는 양에 영향을 주는 것으로 확인되었다. Countor plot에서는 DH가 높을수록, glucose의 첨가량이 많을수록 생성되는 양이 증가하나, cysteine의 경우 coded level 0~1 부근에서 낮은 함량이 생성되는 것으로 확인 되었다(Figure 29). 2-Ethyl-3,5-dimethyl pyrazine은 DH가 가장 높은 영향을 미치는 것으로 확인되었으며, cysteine, glucose 함량도 높은 영향을 미치는 것으로 확인되었다. Countor plot에서는 DH가 높을수록, glucose의 첨가량이 많을수록 생성되는 양이 증가함을 확인할 수 있었다(Figure 30). 그러나 cysteine의 경우 coded level 0~1 부근에서 낮은 함량이 생성되는 것으로 확인 되었다. Flavourzyme의 경우 분석한 모든 향기성분들은 동일한 경향의 결과를 확인할 수 있었다. 결론적으로 대두 단백질의 가수분해도 (DH)는 savory향의 향미특성에 영향을 미치는 주요 요인으로서 DH가 높을수록 savory향의 향미특성에 중요한 aroma-active화합물의 함량이 증가하였다.

Table 23. Analysis of variance for the effects of variables on the volatile compounds of savory flavor by Flavourzyme

Variable	MET		DMP		BEN		EDMP	
	F	Pr>F	F	Pr>F	F	Pr>F	F	Pr>F
DH (%)	2.23	0.1132	7.63	0.0015	14.74	0.0001	8.49	0.0009
Glucose (%)	2.66	0.0720	1.72	0.2000	4.06	0.0193	1.82	0.1780
Cysteine (%)	4.43	0.0142	3.03	0.0496	2.97	0.0531	2.24	0.1121
Thiamine (%)	1.61	0.2221	0.65	0.6663	1.13	0.3946	0.58	0.7147

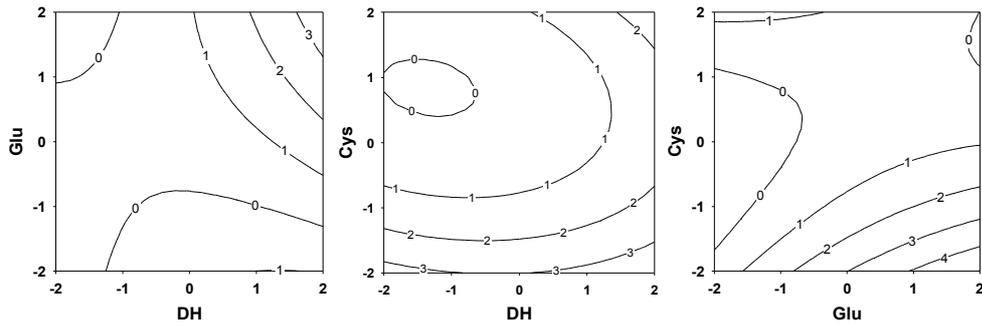


Figure 27. Response surface contour plots for methional of savory flavor by Flavourzyme as plotted for two variables with other two variable fixed at 0 coded levels.

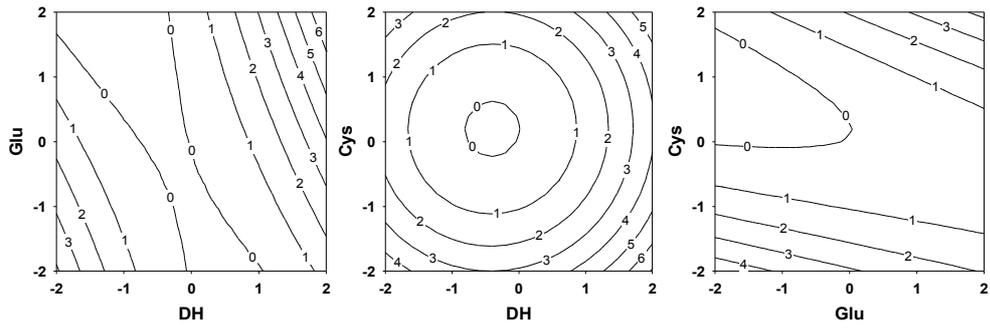


Figure 28. Response surface contour plots for 2,4-dimethyl pyrazine of savory flavor by Flavourzyme as plotted for two variables with other two variable fixed at 0 coded levels.

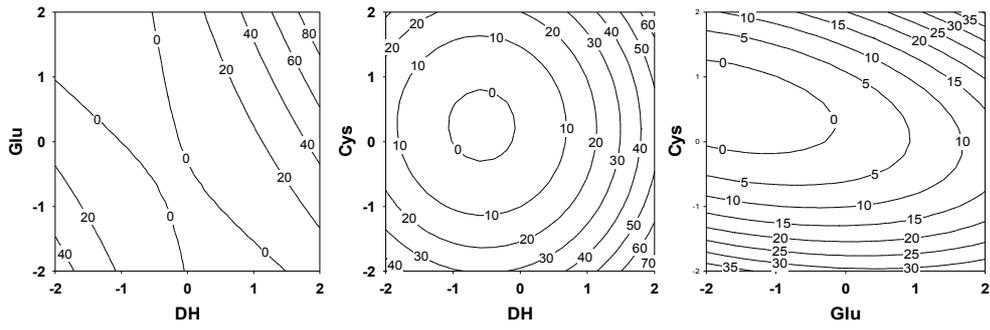


Figure 29. Response surface contour plots for benzeneacetadehyde of savory flavor by Flavourzyme as plotted for two variables with other two variable fixed at 0 coded levels.

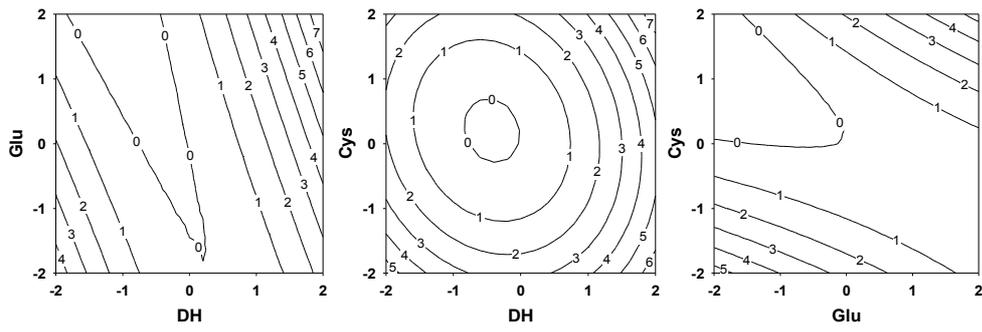


Figure 30. Response surface contour plots for 2-ethyl-3,5-dimethyl pyrazine of savory flavor by Flavourzyme as plotted for two variables with other two variable fixed at 0 coded levels.

마. 대두 단백질 가수분해물을 이용한 기능성 음료의 개발

1) Maillard reaction을 이용한 대두 펩타이드 함유 기능성 음료의 개발

가) 전구물질 선정

음료 제조에 필요한 전구물질을 선정하기 위하여 대두단백질 가수분해물, glucose와 아미노산을 이용하여 시료를 제조하였다. 추출물의 대두단백질 함량 대비 20%의 glucose와 20% glycine, lysine, proline, isoleucine, tyrosine, serine, alanine과 phenylalanine을 각각 첨가하여 관능검사 시료로 사용하였고, 관능검사 결과는 Tables 24~26에 나타내었다. 관능검사를 통하여 향(flavor)의 선호도를 확인한 결과(Table 24) serine, glycine, phenylalanine, isoleucine, lysine, tyrosine 및 proline을 각각 첨가한 시료의 순서로 높은 선호도를 보였고, alanine을 첨가한 시료가 가장 낮은 선호도를 나타내었다. 그러나 통계적으로는 serine, glycine, phenylalanine, isoleucine, lysine 및 tyrosine을 첨가한 시료 간에 유의적 차이가 나타나지 않았다. 맛(taste)은 serine을 첨가한 시료가 가장 높은 선호도를 보였으며, alanine을 첨가한 시료는 가장 낮은 선호도를 나타내었다(Table 25). Serine, glycine, isoleucine 및 proline을 각각 첨가한 시료는 통계적으로 유의적 차이를 나타내지 않았다. 종합적인 기호도(overall liking)는 맛의 선호도와 유사한 결과를 나타내었다(Table 26). Serine을 첨가한 시료가 가장 높은 선호도를 보였으면, serine, glycine, isoleucine 및 proline을 각각 첨가한 시료 간에는 유의수준 범위 내에서 차이를 보이지 않았다. 이것으로 보아 향보다는 맛이 시료의 종합적인 기호도에 많은 영향을 준 것으로 보이며 다른 아미노산 첨가 시료의 비해 serine 및 glycine을 각각 첨가한 시료가 향, 맛, 전체적인 기호도의 선호도가 가장 높은 것으로 나타났다. 이러한 결과로 serine과 glycine을 Maillard reaction을 이용한 대두 펩타이드 함유 기능성 음료의 전구물질로 결정하였다.

나) 대두 단백질 가수분해물을 이용한 기능성 음료 제조의 최적화

대두 단백질 가수분해물을 이용한 기능성 음료 제조를 최적화하기 위해 위의 연구를 통하여 선발된 serine과 glycine을 이용하여 시료를 제조하였고, 반응표면분석법의 중심합성설계(central composite design)와 각 독립변수(independent variables)에 따른 각 code화된 level에서 종속변수(dependent variables)인 향, 맛 및 전체적인 기호도를 Table 27에 나타내었다. 이 결과를 가지고 RSM을 행하

Table 24. Evaluation of flavor in soy peptide-containing functional beverage added with different amino acids

Amino acids	Flavor
Serine	6.00 ^a
Glycine	5.93 ^a
Phenylalanine	5.53 ^{ab}
Isoleucine	5.27 ^{ab}
Lysine	5.13 ^{ab}
Tyrosine	4.87 ^{ab}
Proline	4.53 ^b
Alanine	3.27 ^c

^{abcd} Means of different letters with low are significantly different at $\alpha=0.05$ as described by Duncan's multiple range test.

Table 25. Evaluation of taste in soy peptide-containing functional beverage added with different amino acids

Amino acids	Taste
Serine	6.47 ^a
Glycine	6.13 ^{ab}
Isoleucine	5.47 ^{ab}
Phenylalanine	5.20 ^{ab}
Lysine	4.87 ^{bc}
Tyrosine	3.80 ^{cd}
Proline	3.33 ^{de}
Alanine	2.20 ^e

^{abcd} Means of different letters with low are significantly different at $\alpha=0.05$ as described by Duncan's multiple range test.

Table 26. Evaluation of overall liking in soy peptide-containing functional beverage added with different amino acids

Amino acids	Overall liking
Serine	6.47 ^a
Glycine	6.33 ^a
Isoleucine	5.53 ^{ab}
Phenylalanine	5.47 ^{ab}
Lysine	4.93 ^b
Tyrosine	4.33 ^{bc}
Proline	3.60 ^c
Alanine	2.53 ^{cd}

^{abcd} Means of different letters with low are significantly different at $\alpha=0.05$ as described by Duncan's multiple range test.

Table 27. Experimental data for flavor (S : Serine, G : Glycine), taste (S : Serine, G : Glycine) and overall liking (S : Serine, G : Glycine) with different combinations of glucose (X_1), amino acid (X_2) and time (X_3) used in the central composite design.

No.	coded level			Experiment data					
	X_1	X_2	X_3	flavor		taste		overall liking	
				S	G	S	G	S	G
1	-1	-1	-1	5.92	5.92	5.50	4.67	5.83	4.58
2	-1	-1	1	5.67	5.42	4.83	4.50	5.08	4.42
3	-1	1	-1	6.08	5.08	5.92	4.67	5.92	4.92
4	-1	1	1	6.17	6.00	5.25	6.00	5.42	6.17
5	1	-1	-1	6.67	6.25	5.83	5.92	6.00	6.00
6	1	-1	1	6.42	4.25	5.25	5.25	5.50	4.42
7	1	1	-1	5.58	5.75	6.25	6.17	6.25	6.08
8	1	1	1	6.25	6.25	5.75	6.25	6.00	6.58
9	-2	0	0	5.42	5.67	4.08	4.58	4.17	4.50
10	2	0	0	6.33	5.83	6.08	5.67	6.08	5.75
11	0	-2	0	6.42	5.92	4.83	5.00	5.25	5.25
12	0	2	0	6.50	5.67	6.42	6.33	6.33	6.33
13	0	0	-2	5.00	5.58	4.08	5.50	4.00	5.42
14	0	0	2	5.25	4.75	4.25	4.67	4.50	4.42
15	0	0	0	5.83	6.00	5.00	5.00	5.00	4.92
16	0	0	0	6.17	5.83	5.33	5.58	5.42	5.67
17	0	0	0	6.75	6.25	6.42	5.92	6.33	6.08
18	0	0	0	6.17	5.83	6.25	5.50	6.17	5.92

Table 28. Regression coefficients¹ for the response surface models

Factor	flavor		taste		overall liking	
	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly
Intercept	6.2760**	5.8500***	5.8613	5.6767	5.8703	5.7633**
Linear						
X ₁	0.3625	0.0625	0.6975	0.9875**	0.6650	0.6250**
X ₂	-0.0550	-0.0125*	0.6175	0.4875	0.4175	0.4250**
X ₃	0.0950**	-0.1875	-0.2600*	-0.1125	-0.1250	-0.2000
Quadratic						
X ₁ ²	-0.3090	-0.3000	-0.5587	-0.8733**	-0.4647	-0.6367*
X ₂ ²	0.2760	-0.1000	-0.0136	0.2267	0.2003	0.3133
X ₃ ²	-1.0590**	-0.5500*	-1.4736**	-0.7233**	-1.3397	-0.7367*
Interactions						
X ₁ X ₂	-0.9600**	1.1500**	0.0400	-0.8733	0.1600	0
X ₃ X ₁	0.2900	-1.0500*	0.1300	-0.5500	0.2500	-1.2000*
X ₃ X ₂	0.6300	1.8500**	0.0400	1.2500**	0.2500**	2.3000**
R ²	0.8331	0.7850	0.6924	0.8882	0.6319	0.8526
F	4.44	3.25	2.00	7.06	1.53	5.14
Probability	0.0237	0.0559	0.1708	0.0057	0.2813	0.0153

¹ Model on which X₁ = glucose, X₂ = amino acid, X₃ = time

* P < 0.1

** P < 0.05

*** P < 0.001

여 계산된 model coefficients는 Table 28에 나타내었다. 종속변수에 의해 계산된 regression coefficient를 가지고 $p < 0.1$ 에서의 모델식은 다음과 같다.

$$\begin{aligned}
 Y_1 &= 6.2760 + 0.0950X_3 - 1.0590X_3^2 - 0.9600X_1X_2 \\
 Y_2 &= 5.8500 - 0.0125X_2 - 0.5500X_3^2 + 1.1500X_1X_2 - 1.0500X_1X_3 + \\
 &\quad 1.8500X_2X_3 \\
 Y_3 &= 1.3750X_1^2 - 1.2500X_1X_2 + 0.8750X_3^2 \\
 Y_4 &= 0.39875X_1 - 0.8733 X_1^2 - 0.7233X_3^2 + 1.2500X_2X_3 \\
 Y_5 &= 0.2500X_2X_3 \\
 Y_6 &= 5.7633 + 0.6250X_1 + 0.4250X_2 - 0.6367X_1^2 - 0.7367X_3^2 - \\
 &\quad 1.200X_1X_3 + \\
 &\quad 2.3000X_2X_3
 \end{aligned}$$

(Y_1 = flavor, serine; Y_2 = flavor, glycine; Y_3 = taste, serine; Y_4 = taste, glycine; Y_5 = overall liking, serine; Y_6 = overall liking, glycine; X_1 = glucose (%); X_2 = amino acid(%); X_3 = reaction time (hr))

또한 각각의 식들의 R^2 값은 0.8331, 0.7850, 0.6924, 0.8882, 0.6319, 0.8526이었고, probability는 0.0237, 0.0559, 0.1708, 0.0057, 0.2813, 0.0153로 나타났다.

향에서 각각 독립변수의 영향정도를 분석한 결과는 Table 29에 나타내었다. 그 결과 serine을 사용한 경우 향에 미치는 영향은 반응시간, glucose, amino acid의 순으로 나타났으며, 특히 반응시간과 glucose의 첨가량이 향에 크게 영향을 미치는 인자로 나타났다. Glycine을 사용한 경우 반응시간, amino acid, glucose 순으로 향에 영향을 미쳤으며, 반응시간과 glycine 함량이 향에 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다. RSM을 통하여 구한 coefficients를 가지고 두개의 independent variables간의 상관관계를 보기 위하여 contour plot를 그렸다(Figure 31 와 32). Serine 첨가구에서는 serine과 glucose 함량이 증가할수록 향에 대한 선호도도 증가하였다(Figure 31). 또한 반응 2시간 (coded level=0) 일 때 glucose의 경우 28% 첨가 시(coded level=0.8), serine의 경우 10%에서 30% 부근(coded level -1~1)에서 높은 향 선호도를 나타내었다. Glycine을 첨가하여 제조한 시료에서는 glucose와 glycine의 함량이 증가할수록 향에 대한 선호도로 증가하였다(Figure

Table 29. Analysis of variance for the effects of variables on the flavor

Variable	flavor			
	Serine		Glycine	
	F value	Pr>F	F value	Pr>F
Glucose (%)	3.41	0.066	2.79	0.1012
Amino acid (%)	2.28	0.1495	4.93	0.0267
Reaction time (hr)	5.31	0.0219	5.82	0.0170

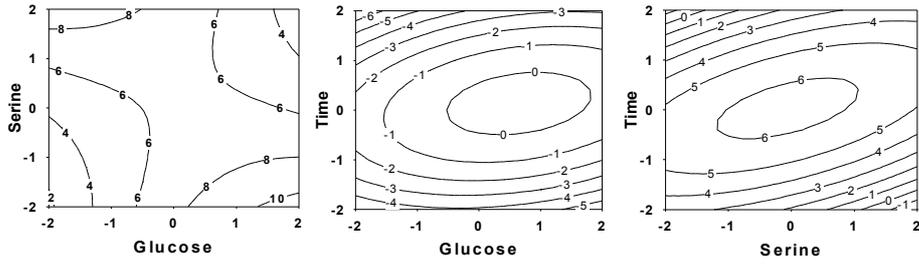


Figure 31. Response surface contour plots for flavor by serine as plotted for two variables with other two variable fixed at 0 coded levels.

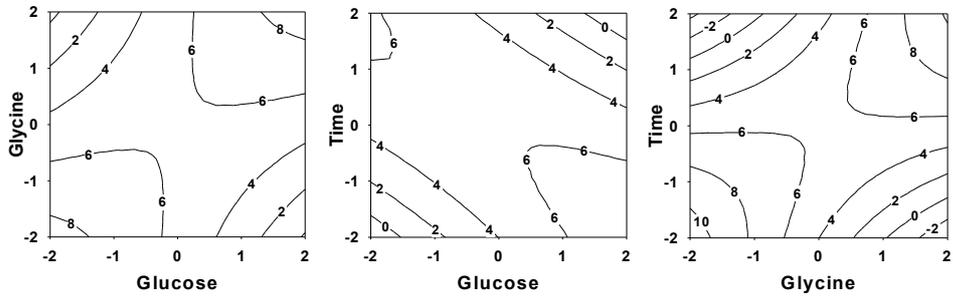


Figure 32. Response surface contour plots for flavor by glycine as plotted for two variables with other two variable fixed at 0 coded levels.

32). Glucose 함량이 30% 이상(coded level=1 이상) 반응시간은 3시간이하(coded level=0 이하)에서 향 선호도가 높았으며, 25% 이상의 glycine 함량(coded level=0.5)에서는 반응시간이 증가할수록 향 선호도도 증가하였다. 맛에서 각각 독립변수의 영향정도를 분석한 결과는 Table 30에 나타내었다. 그 결과 serine을 사용한 경우 맛에 미치는 영향은 반응시간, glucose, amino acid의 순으로 나타났다. Glycine을 사용한 경우 glucose, amino acid, 반응시간 순으로 맛에 영향을 미쳤으며, glucose 함량이 맛에 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다. RSM을 통하여 구한 coefficients를 가지고 두개의 independent variables간의 상관관계를 보기 위하여 contour plot를 그렸다(Figure 33 와 34). Serine 첨가구에서는 serine과 glucose 함량이 증가할수록 맛에 대한 선호도도 증가하였다(Figure 33). 특히 25% glucose를 첨가하였을 때 (coded level=0.5) serine의 함량이 증가할수록 맛에 대한 선호도도 크게 증가하였다. 또한 28% glucose 첨가 시 (coded level=0.8) 반응 3시간일 때 (coded level=0) 가장 높은 맛의 선호도를 나타내었다. Glycine을 사용하여 제조한 시료의 경우 glucose 함량이 20~30%(coded level=0~1)일 때 glycine의 함량에 상관없이 맛에 대한 높은 선호도를 나타내었고, 28%의 glucose 첨가 시 (coded level=0.8) 2시간 30분 반응시간에서 (coded level=-0.5) 가장 높은 선호도를 보였다.

전체적인 기호도에서 각각 독립변수의 영향정도를 분석한 결과는 Table 31에 나타내었다. Serine을 전구물질로 사용한 시료의 경우 반응시간, glucose, amino acid의 순으로 전체적인 기호도 영향을 미쳤으며, glycine을 사용한 경우 반응시간, amino acid, glucose의 순으로 영향을 미쳤다. RSM을 통하여 구한 coefficients를 가지고 두개의 independent variables간의 상관관계를 보기 위하여 contour plot를 그린 결과를 Figure 35와 36에 도식화하였다. Figure 35에서 보듯이, serine을 사용한 시료에서는 serine과 glucose 함량이 증가할수록 맛에 대한 선호도도 증가하였으며, 특히 28% glucose를 첨가하였을 때 (coded level=0.8) serine의 함량이 증가할수록 맛에 대한 선호도도 크게 증가하였다. 또한 28% glucose 첨가 시 (coded level=0.8) 반응 3시간일 때 (coded level=0) 가장 높은 맛의 선호도를 나타내었다. 이는 serine 첨가 시 맛에 대한 선호도의 결과와 유사하며, 이러한 결과를 통해 serine의 전체적인 기호도는 맛에 대한 선호도에 많은 영향을 받는다고 생각되어 진다. Glycine으로 제조한 시료의 경우 10% 이상의 glucose 첨가량의 범위(coded level=-1 이상)에서는 glycine 함량이 증가할수록 전체적인

Table 30. Analysis of variance for the effects of variables on the taste

Variable	taste			
	Serine		Glycine	
	F value	Pr>F	F value	Pr>F
Glucose (%)	1.51	0.2864	10.55	0.0028
Amino acid (%)	0.97	0.4745	4.00	0.0452
Reaction time (hr)	2.06	0.1788	3.37	0.0674

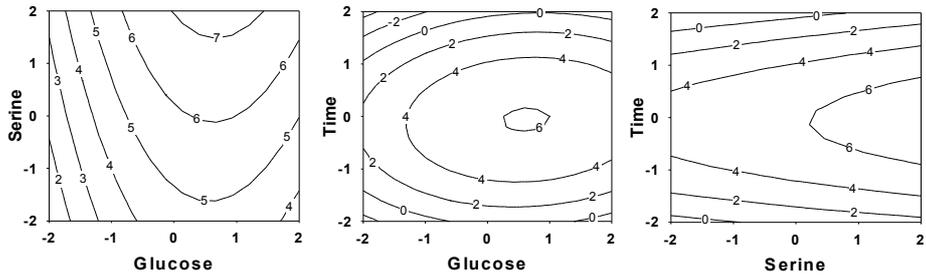


Figure 33. Response surface contour plots for taste by serine as plotted for two variables with other two variable fixed at 0 coded levels.

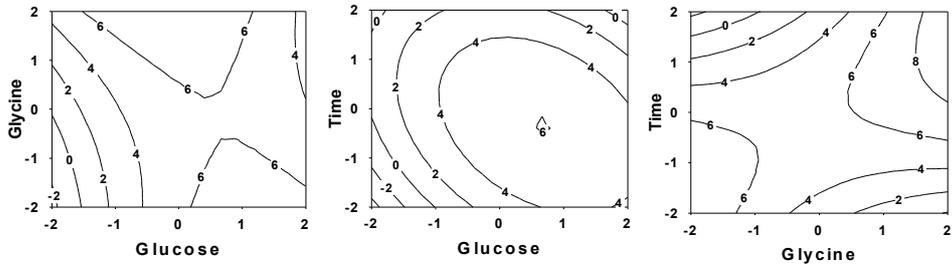


Figure 34. Response surface contour plots for taste by glycine as plotted for two variables with other two variable fixed at 0 coded levels.

Table 31. Analysis of variance for the effects of variables on the overall liking

Variable	overall liking			
	Serine		Glycine	
	F value	Pr>F	F value	Pr>F
Glucose (%)	1.27	0.3579	4.39	0.0359
Amino acid (%)	0.48	0.7511	5.43	0.0206
Reaction time (hr)	1.55	0.2771	6.61	0.0119

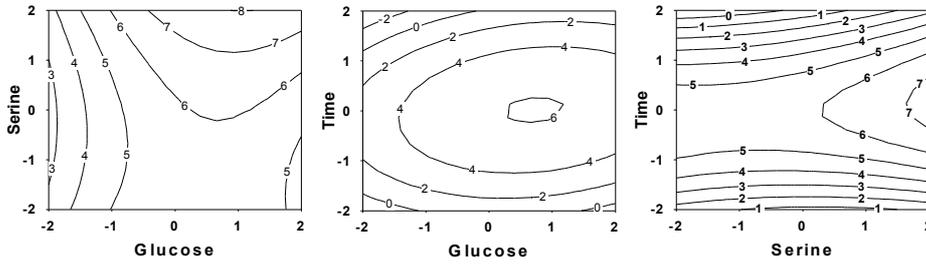


Figure 35. Response surface contour plots for overall liking by serine as plotted for two variables with other two variables fixed at 0 coded levels.

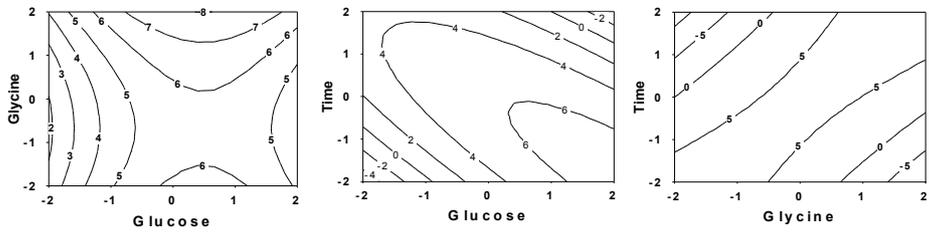


Figure 36. Response surface contour plots for overall liking by glycine as plotted for two variables with other two variables fixed at 0 coded levels.

기호도도 증가하였다. 또한 3시간 이하의 반응시간(coded level=0 이하)에서는 glucose 함량이 증가할수록 전체적인 기호도도 증가하였다.

2) 천연과즙 농축액을 첨가한 대두 펩타이드 함유 기능성 음료의 제조

천연과즙 농축액을 첨가하여 대두 펩타이드 함유 기능성 음료를 제조하여 관능검사 시료로 사용하였고, 그 결과인 향, 맛, 전체적인 기호도는 Tables 32~34에 나타내었다. 향의 경우 자몽과 사과 농축액을 첨가한 시료의 선호도가 가장 좋았지만, 복숭아, 레몬 및 오렌지를 첨가한 시료와 매실 농축액을 첨가한 시료는 통계적으로 유의적 차이를 나타내지 않았다(Table 32). 하지만 대추를 첨가한 시료의 경우 다른 과일 농축액을 첨가한 시료에 비해 선호도가 좋지 않았으며, 통계적으로도 유의적 차이가 나타났다. Table 33에서 보듯이 맛의 경우에는 대추만 들어간 시료와 대추 및 레몬 농축액이 들어간 시료의 선호도가 높게 나타났다. 매실 농축액이 첨가된 시료의 선호도가 가장 낮았다. 대추가 들어간 시료의 경우 향에 대해서는 낮은 선호도를 보였으나, 맛에 대한 선호도는 높게 평가되었다. 전체적인 기호도에서는 매실을 첨가한 시료를 제외하고 통계적으로는 유의적 차이는 나타나지 않았으나, 대추를 첨가한 시료가 높은 선호도를 나타내었다. 이것으로 보아 향을 제외한 맛이나 전체적인 기호도의 선호도는 대추를 첨가한 시료에서 높게 나타난 것으로 확인되었다.

3) 대두 단백질 가수분해물 savory향 제품 개발

Flavourzyme과 Protamex를 사용하여 제조한 대두 단백질 가수분해물의 savory향 소재를 원우테크에서 제조되는 소고기 전골풍미제품에 소고기 향 대신 10% 대치하여 제품화 하여 관능검사의 시료로 이용하였으며, 그 결과를 Table 35 및 36에 나타내었다. Table 35에서 보듯이 소고기 전골풍미제품(control)과 savory 향 소재를 10% 대치한 제품의 쓴맛 강도와 기호도를 평가한 결과 두 종속변수에서 통계적으로 유의적 차이를 보이지 않았다. 또한 두 종속변수 모두 Protamex를 사용한 savory 향 소재, Flavourzyme을 사용한 savory 향 소재, control 순으로 선호도가 높게 나타났다. 또한 savory향 제품을 2%로 희석하여 쓴맛 및 기호도를 측정하였으며, 그 결과는 Table 36에 나타내었다. 쓴맛 및 기호도 모두 Flavourzyme을 사용한 savory 향 소재 희석액, Protamex를 사용한 savory 향 소재 희석액, control의 순으로 선호도가 나타났으며, 쓴맛의 경우 세 시료간의

Table 32. Sensory evaluation of flavor in soy peptide-containing functional beverage added with various natural fruit concentrates

drinks	flavor
apple + grapefruit	6.64 ^a
peach + lemon + orange	5.82 ^{ab}
japanese apricot	5.82 ^{ab}
jujube + lemon	4.82 ^b
jujube + dried persimmons	4.45 ^b

^{abcd} Means of different letters with low are significantly different at $\alpha=0.05$ as described by Duncan's multiple range test.

Table 33. Sensory evaluation of taste in soy peptide-containing functional beverage added with various natural fruit concentrates

drinks	taste
jujube + lemon	5.73 ^a
jujube + dried persimmons	4.64 ^{ab}
peach + lemon + orange	4.09 ^{bc}
apple + grapefruit	3.91 ^{bc}
japanese apricot	2.82 ^c

^{abcd} Means of different letters with low are significantly different at $\alpha=0.05$ as described by Duncan's multiple range test.

Table 34. Sensory evaluation of overall liking in soy peptide-containing functional beverage added with various natural fruit concentrates

drinks	overall liking
jujube + lemon	5.36 ^a
jujube + dried persimmons	4.55 ^{ab}
peach + lemon + orange	4.36 ^{ab}
apple + grapefruit	4.27 ^{ab}
japanese apricot	3.36 ^b

^{abcd} Means of different letters with low are significantly different at $\alpha=0.05$ as described by Duncan's multiple range test.

Table 35. Sensory evaluation of savory flavor powder treated with different proteases

Savory flavor powder	bitterness	overall like
Protamex	5.58 ^a	5.67 ^a
Flavourzyme	5.50 ^a	5.58 ^a
Control	5.00 ^a	5.00 ^a

^{abcd} Means of different letters with low are significantly different at $\alpha = 0.05$ as described by Duncan's multiple range test.

Table 36. Sensory evaluation of savory flavor soup treated with different proteases

Savory flavor soup	bitterness	overall like
Flavourzyme	5.92 ^a	6.17 ^a
Protamex	5.67 ^a	5.50 ^{ab}
Control	5.00 ^a	5.00 ^b

^{abcd} Means of different letters with low are significantly different at $\alpha = 0.05$ as described by Duncan's multiple range test.

유의적 차이를 보이지 않았다. 그러나 기호도에서는 Flavourzyme을 사용한 savory 향 소재 희석액이 control에 비해 통계적으로도 높은 선호도를 보였다. 이러한 결과로 미루어 보아 대두 단백질 가수분해물 savory향 제품은 기존제품을 대신하여 savory향 소재로서의 가능성을 확인할 수 있었다.

제 2절 기능성 대두 펩타이드 생리활성 탐색 및 구조 분석

1. 재료 및 방법

가. 가수분해도에 따른 대두 단백질 가수분해물의 생리활성 탐색 및 RSM을 이용한 대두 펩타이드 생성의 반응조건 최적화

1) 효소 종류별, 가수분해도별에 따른 대두 단백질 가수분해물 제조 및 생리활성 측정

가) 가수분해 정도에 따른 대두 단백질 가수분해물 제조

기질로 사용되는 분리대두단백질 용액은 증류수를 이용하여 10% (w/v) 농도로 제조하여 50℃에서 24시간 동안 가수분해를 진행하면서 시간 별로 시료를 취해 가수분해도 측정에 사용하였다. 기질용 액 단백질 농도의 0.5%에 해당하는 각 효소를 첨가하여 50℃에서 24시간 동안 가수분해하였다. 효소반응이 종료된 후 95℃에서 10분간 가열하여 효소반응을 정지시켜 대두단백질 가수분해물을 제조하였다.

나) 대두단백질 가수분해반응의 ACE 저해능 조사

항고혈압(ACE저해)효과 분석은 Cushman과 Cheung(1971)의 방법을 이용하여 분석하였다. 시료 50 μ l에 Hippuryl-L-histidyl-L-leucine(HHL) 50 μ l와 0.4 N NaCl이 함유된 0.1 M sodium borate beffer(pH 8.3) 100 μ l를 가한 후 37℃에서 30분 반응시켰다. 여기에 ACE 조효소액 50 μ l를 가하여 다시 37℃에서 30분간 반응시킨 뒤 1N HCl 250 μ l를 넣어 반응을 정지시켰다. 이것에 ethyl acetate 1.5 ml을 가하여 원심분리 후 상층액 1 ml을 취해 건조시키고 증류수 1ml을 넣어 추출된 hippuric acid를 280 nm에서 측정하였다.

$$\text{ACE inhibitory activity(\%)} = 1 - \{(S-SB) / (C-B)\} \times 100$$

S : Sample 흡광도, SB : Sample blank 흡광도, C : Control 흡광도, B : Blank 흡광도

다) 대두단백질 가수분해물의 항산화 효과 조사

(1) TBA 법에 의한 측정

Thiobarbituric acid(TBA)법은 TBA가 자동산화에 의해 생성된 불포화 지질의 산화 생성물과 반응하여 산화를 일으키는 정도를 측정하는 방법으로 linoleic acid model system은 Osawa 등(1981)의 방법을 약간 변형하여 이용하였다. 즉 linoleic acid 0.13 mL, 99.5% ethanol 10 mL, 50 mM phosphate buffer(pH 7.0) 10 mL, 시료 1.3 mg을 넣어 혼합한 다음 총용량이 25 mL이 되도록 증류수로 조정하였다. 이 reaction mixture는 밀봉하여 암실(40℃)에서 보관하면서 자동 산화를 촉진시켰다. TBA법에 의한 항산화 측정은 Ohkawa 등(1979)의 방법에 따라 reaction mixture 50 μ l에 증류수 0.8mL, 8.1% sodium dodecyl sulfate(SDS) 0.2 mL, 20% acetic acid(pH 3.5) 1.5 mL, 0.8% 2-thiobarbituric acid 1.5 mL을 넣고 혼합한 후 5℃에서 60분간 방치한 다음 95℃에서 60분 동안 반응시켜 532 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 결과는 24시간 간격으로 7일 동안 측정하였다.

(2) Ferric thiocyanate 법에 의한 측정

Ferric thiocyanate 법은 유지의 자동산화에 의해 형성된 과산화물이 ferrous thiocyanate를 ferric thiocyanate로 산화시키는 정도를 비색법으로 측정하는 방법으로, linoleic acid model system은 TBA법에서 사용한 방법과 동일하게 사용하였으며 40℃에서 반응시킨 reaction mixture 100 μ l에 75% ethanol 4.7 mL, 30% ammonium thiocyanate 0.1 mM, 3.5% HCl에 녹인 20 mM ferrous chloride 용액 0.1mL을 넣고 혼합한 후 40℃에서 3분간 반응시켜 500 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 결과는 24시간 간격으로 5일 동안 측정하였다.

(3) Superoxide dismutase(SOD)-liked activity 측정

SOD 유사활성은 Marklund와 Marklund의 방법(1974)을 약간 변형하여 과산화수소(H₂O₂)로 전환시키는 반응을 촉매하는 pyrogallol의 생성량을 측정하여 나타내었다. 즉, 시료 0.2 mL에 pH 8.5로 보정한 tris-HCl buffer(50mM tris[hydroxymethyl] aminomethane+10mM EDTA) 3mL와 7.2mM pyrogallol 0.2 mL를 가하고 25℃에서 10분간 방치 후 1N HCl 1mL로 반응을 정지시켰다. 반응액 중 산화된 pyrogallol의 양은 420 nm에서 흡광도를 측정하였으며 SOD 유사활성은 다음과 같이 계산하여 나타내었다.

$$\text{SOD-liked activity(\%)} = 100 - \{(\text{Sample 흡광도} / \text{Control 흡광도}) \times 100\}$$

라) 대두단백질 가수분해물의 항암활성 조사

대두단백질 가수분해물의 암세포독성을 측정하기 위한 cell line으로는 HT1080(null fibrosarcoma, human, KCLB 10121)과 MCF7(breast adenocarcinoma, human, KCLB 30022)을 한국 세포주 은행에서 분양 받아 사용하였으며, Charmichael et al(1987)의 방법에 따라 MTT가 세포내에서 mitochondrial ehydrogenase와 반응하여 formazan을 형성하는 정도를 측정하는 MTT assay를 이용하여 측정하였다. 즉 cell line을 96 well plate에 5×10^4 cell/well이 되도록 $100 \mu\text{l}$ 분주하고 시료 $100 \mu\text{l}$ 를 첨가하여 37°C , 5% CO_2 incubator에서 68시간 배양 후 MTT solution $20 \mu\text{l}$ 를 첨가하여 같은 배양조건에서 4일간 더 배양하였다. 배양 종료 후 원심 분리하여 상층액 $200 \mu\text{l}$ 를 제거한 후 생성된 formazan 결정을 DMSO $150 \mu\text{l}$ 에 용해시켜 15분 동안 교반 후 ELISA reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 성장저해 효과는 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Growth inhibitory activity(\%)} = (C - S) / C \times 100$$

C : Control 흡광도, S : Sample 흡광도

2) RSM에 의한 대두단백질가수분해반응향의 최적화

대두 단백질 가수분해물의 savory향 제조 조건을 최적화하기 위하여 반응 표면분석법을 사용하였다. 최적화를 하기위한 독립변수로는 가수분해도(degree of hydrolysis, DH), glucose 양(%), cysteine 양(%), thiamine 양%)을 선정하였다. 각각의 반응조건에 5개의 level에 따른 coded unit(Table 37)를 부여하고 이들을 중심합성설계법을 이용하여 28번의 design point를 갖도록 실험을 설계하여 반응표면분석을 행하였다. 종속변수로는 생리활성인 ACE저해능, SOD 유사활성, 항암활성을 정하였다. 모든 통계분석은 SAS program (SAS institute Inc.)를 이용하였다.

Table 37. Coded levels for independent variables used in developing experimental data

Variable	Coded level					Interval
	-2	-1	0	1	2	
DH (%)	0	5	10	15	20	5
Glucose (%)	0	2.5	5	7.5	10	2.5
Cysteine (%)	0	1	2	3	4	1
Thiamine (%)	0	1	2	3	4	1

나. 생리활성 우수 펩타이드 분리, 정제 및 아미노산 조성 분석

1) 최적화된 대두단백질가수분해반응향의 일반성분 및 분자량 분포 특성분석

가) 일반성분 분석

최적화된 대두단백질가수분해반응향의 일반성분분석은 A.O.A.C 방법 (1990) 에 준하여 조단백은 Kjeldahl 질소 정량법, 조지방은 Soxhlet's 추출법, 조회분은 550°C에서 직접 회화법을 이용하여 분석하였다.

나) 분자량 분포 분석

최적화된 대두단백질가수분해반응향의 분자량 분포는 GPC(gel permeation chromatography)를 이용하여 Table 38과 같은 조건에서 분석하였다. 분자량 분포는 단백질 분자량 표준물질인 thyroglobulin(670 kDa), bovine gamma-globulin(158 kDa), chicken ovalbumin(44 kDa), equine myoglobin(17 kDa), vitamin B₁₂(1.35 kDa)가 함유된 gel filtration standard (Bio-rad Lab. Hercules, USA)를 사용하여 표준물질의 chromatogram을 얻어 피크 면적을 계산하고 머무름 시간을 비교하여 시료의 분자량을 계산하였다(Borneo & Khan, 1999).

2) 대두단백질가수분해반응향로부터 ACE저해 peptide의 분리 및 정제

최적화된 대두단백질가수분해반응향의 ACE저해 peptide는 ultrafiltration, gel filtration chromatography, RP-HPLC로 분리 정제 하였다(Figure 37). 이 때 ACE 저해활성은 ACE 저해활성을 단백질 함량으로 나누어 계산함으로써 동일 단백질 농도에서의 활성(specific activity; % inhibition/ug protein)으로 비교하였다.

가) 한외 여과법(Ultrafiltration)

대두단백질가수분해반응향은 ultrafiltration cell(Amicon Co., Beverly, MA, USA)을 이용하여 한외여과하였다. Ultrafiltration membrane은 YM-10과 YM-3(MWCO; 10,000, 3,000; Amicon Co., Beverly, MA, USA)을 사용하여 3개의 fraction(10 kDa 이상, 3-10 kDa, 3 kDa 이하)을 얻어 동결건조한 후 각각의 수율 및 ACE 저해 효과를 측정하였다. ACE 저해 활성이 가장 높은 fraction은 -70°C에 보관하면서 다음 정제에 사용하였다.

Table 38. Conditions of GPC for analysis of molecular weight distribution of soy protein isolate hydrolysate

Instrument	Waters 510 HPLC pump
Detector	Waters 486 Tunable absorbance detector
Data module	Water 746
Column	Bio-sil SEC-125 column
Column size	7.8 × 300 mm
Eluent	0.05 M sodium phosphate buffer (pH 6.8) with 0.15 M NaCl
Injection volume	10 μ L
Flow rate	1.0 mL/min
Run time	15-17 min
Wavelength	280 nm

나) Gel filtration chromatography

한외여과에서 얻은 시료 중 ACE 저해 활성이 가장 높은 fraction에 대한 분자량에 따른 분리를 위하여 gel filtration column인 Superdex Peptide 10/300 GL column(10×300 mm)을 사용하여 prep-FPLC system(fast protein liquid chromatography; AKTA, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)을 이용하여 Table 39과 같은 조건에서 분리하였다. Superdex Peptide 10/300 GL column은 agarose와 dextran이 서로 연결되어 이루어진 matrix로 충전된 column으로서, 단백질을 분리할 수 있는 분자량 범위는 100–7000 Da 정도이다. 활성 fraction은 0.2 μ m membrane filter로 여과하여 500 μ L씩 분석에 사용하였으며 30% acetonitrile로 충전한 column에 loading한 후 30% acetonitrile을 이동상으로 하여 0.2 mL/min의 유속으로 40분간 분석하여 214 nm에서 흡광도를 측정하여 peak fraction만을 얻었다. 각 fraction은 centrifugal vacuum concentrator를 이용하여 감압농축한 후 ACE 저해 활성을 측정하였으며 다음 정제를 위하여 -70°C 에 보관하여 사용하였다.

다) Re-gel filtration chromatography

Gel filtration chromatography 중에서 ACE 저해 활성이 가장 높은 fraction에 대해 동일한 조건에서 2차 정제가 이루어졌다. 각 fraction은 centrifugal vacuum concentrator를 이용하여 감압 농축한 후 ACE 저해 활성을 측정하였으며 다음 정제를 위하여 -70°C 에 보관하여 사용하였다.

라) Reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC)

두 번의 gel filtration column을 거쳐 얻어진 활성 fraction을 μ BondapakTM C₁₈column(4.6×300 mm; Waters Co., Milford, MA, Ireland)이 장착된 HPLC system(Waters Co., Milford, MA, Ireland)을 이용하여 Table 40와 같은 조건에서 분리 정제하였다. 이동상은 Acetonitrile(0–100%)과 Water(100–0%)를 linear gradient로 1.0 mL/min의 속도로 용출하였다. 활성 fraction은 0.2 μ m membrane filter로 여과하여 50 μ L씩 15분간 분석하여 얻은 peak fraction에 대해 ACE 저해율을 조사하였다.

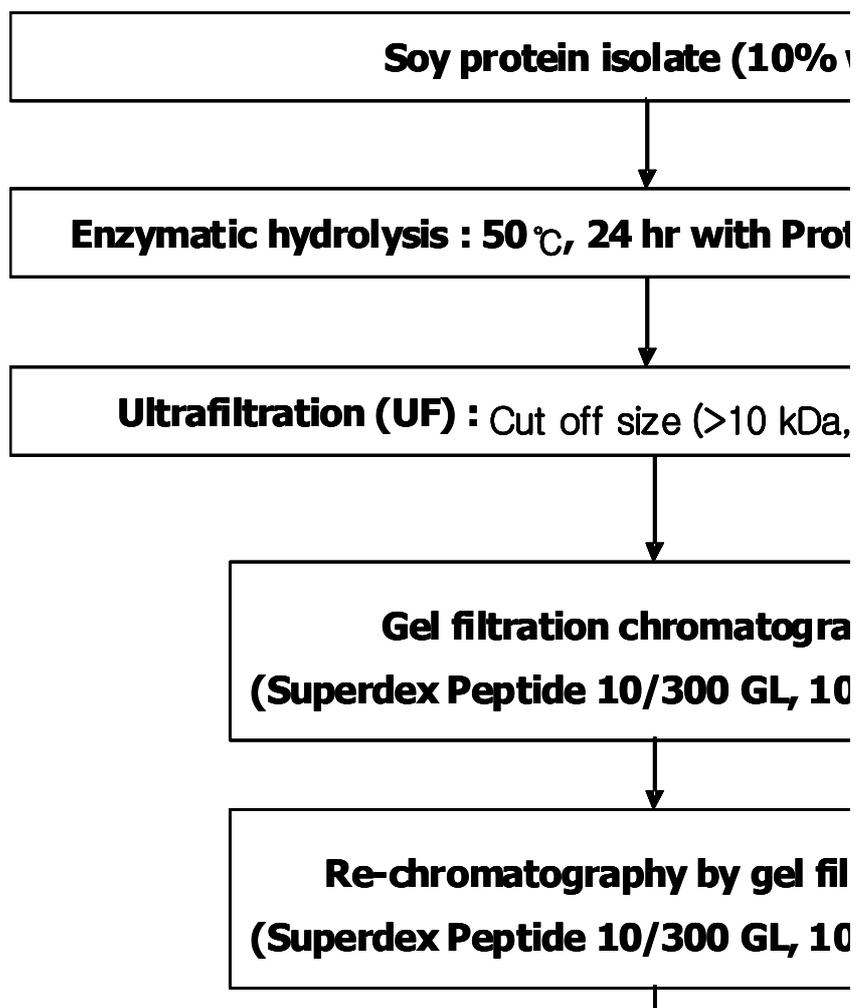


Figure 37. Procedures for isolation and purification of ACE inhibitory compounds from soy protein isolate hydrolysate.

Table 39. Conditions of gel filtration chromatography for the purification of ACE inhibitory peptides from active fraction obtained by ultrafiltration

Instrument	AKTA FPLC P-920 Pump, M-925 Mixer, FR-902 Flow restrictor, Frac-900 Fraction collector
Detector	Monitor UPC-900
Comumn	Superdex Peptide 10/300 GL
Column size	10 × 300 mm
Eluent	30% acetonitrile
Injection volume	500 μ L
Flow rate	0.36 mL/min
Pressure	<1.8 MPa
Wavelength	214 nm

Table 40. Conditions of RP-HPLC for the purification of ACE inhibitory peptides from active fraction obtained by gel filtration

Instrument	Waters 515
Detector	Waters 486 Tunable absorbance detector
Data module	clarity
Column	μ Bondapak TM C ₁₈
Column size	4.6 × 300 mm
Eluent A	Acetonitrile(0-100% linear gradient for 15 min)
Eluent B	Water(100-0% linear gradient for 15 min)
Flow rate	1.0 mL/min
Wavelength	214 nm

마) 단백질 정량

각 단계별 시료의 단백질 정량은 micro BCA(Bicinchoninic acid)법에 따라 BCA protein assay kit(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하여 bovine serum albumine(BSA)을 표준물질로 환산 측정하였다(Kuba et al., 2003).

3) 아미노산 조성 분석

대두단백질가수분해반응향의 아미노산 조성은 AccQ-Tag 법(Bennet and Solomon, 1986)을 이용하여 분석하였다. 즉, 대두단백질가수분해반응물(savory향) 0.5 g에 증류수를 가하여 sonication한 용액을 50 μ L 취하여 borate buffer 350 μ L와 AccQ-Tag 유도체시약 100 μ L을 넣어 잘 혼합한 후 55°C에서 10분간 유도체화 하였다. 유도체화 된 시료를 각각 10 μ L씩 취한 후 HPLC의 자동시료주입기에 안치하여 Table 41과 같은 조건으로 분석하였다. 표준물질은 40 μ L, 시료용액은 10 μ L을 HPLC에 주입하여 아미노산을 분석하였으며, column은 AccQ-TagC₁₈ amino acid analysis column(Millipore Co. Milford.,MA, USA)을 사용하였다. 이동상은 0.14 M sodium acetate와 10% triethylamine을 혼합한 용액에 1% phosphoric acid를 이용하여 pH 5.02로 맞춘 용액(eluent A)과 water와 acetonitrile을 4:6으로 혼합한 용액(eluent B)을 linear gradient로 용출하였다.

다. 우수한 생리활성을 갖는 펩타이드 및 아미노산 가공적성 연구

1) 대두단백질가수분해반응향의 pH와 열처리에 따른 ACE 저해활성 변화

가) 대두단백질가수분해반응향의 pH에 따른 ACE활성 변화

pH와 열처리에 따른 단백질의 변성이 ACE 저해활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 대두단백질가수분해반응향의 한외여과 fraction 중 활성이 우수한 3 kDa 이하 시료를 pH 2.0, 3.0, 7.0, 10.0, 12.0 용액에 2%(w/v)의 농도로 제조한 시료와 변성처리 하지 않은 UF fraction (<3 kDa)을 실온에서 한 시간 동안 반응시켜 변성도가 다른 시료를 준비하였다. 변성이 유도된 시료용액을 원심분리(8,000 X g, 20분)하여 얻은 상등액은 centrifugal vacuum concentrator를 이용하여 감압 농축한 후 남아있는 단백질 함량과 ACE 저해 활성을 측정하였다.

Table 41. Conditions of HPLC for amino acid composition analysis of SPIH¹⁾

Instrument	Waters 1525 Binary Pump, Waters 717 plus Autosampler, Waters 474 Fluorescence detector
Column	AccQ-Tag column C ₁₈
Column size	3.9 × 150 mm
Eluent A	0.14 M Sodium acetate, 10% triethylamine in water, pH 5.02
Eluent B	Acetonitrile : water = 6:4
Gradient	AccQ-Tag method
Flow rate	1.0 mL/min
Run time	45 min
Wavelength	ex. = 250 nm, em. = 395 nm

¹⁾ SPIH : soy protein isolate hydrolysate(savory flavor)

나) 대두단백질가수분해반응향의 열처리에 따른 ACE활성 변화

가열에 따른 활성변화는 2%(w/v, pH 7.0)의 농도로 제조한 시료용액을 30, 50, 70, 100℃에서 10분간 가열한 후 pH 변성과 동일한 방법으로 활성을 조사하였다.

2) 대두단백질가수분해반응향의 pH와 열처리에 따른 수용성 용해도 지수 측정

대두단백질가수분해반응물(savory향)의 용해도 측정은 Ortiz와 Wagner (2002)의 방법을 이용하여 분석하였다. 대두단백질가수분해반응향의 한외여과 fraction 중 활성이 우수한 3 kDa 이하 시료를 HCl과 NaOH로 조정하여 pH 3.0, 7.0, 10.0 용액에 1%(w/v)의 농도로 제조한 후 1시간 동안 stirring하였다. 실온에서 30분 동안 반응시킨 후 3000g, 20분간 원심분리(VS-21SMTi, Vision Scientific Co., Kyunggi-do, Korea)하였다. 상등액을 취하여 BCA방법으로 단백질 정량을 함으로써 용해도 값을 구하였다.

$$\text{용해도(\%)} = \frac{\text{상등액의 단백질 함량}}{\text{시료의 총 단백질 함량}} \times 100$$

3) 통계처리

본 연구의 실험결과들은 SPSS(statistical package for social science)를 이용하였으며, 각 실험결과들의 평균값들의 차이 검증은 One-Way ANOVA(analysis of variance)를 사용하였고, Duncan's multiple range test로 p<0.05 수준에서 유의성을 검증하였다(Lee et al., 1998).

2. 결과 및 고찰

가. 가수분해도에 따른 대두 단백질 가수분해물의 생리활성 탐색 및 RSM을 이용한 대두 펩타이드 생성의 반응조건 최적화

1) 효소 종류별, 가수분해도별에 따른 대두단백질 가수분해물 제조 및 생리활성 측정

가) 가수분해 정도에 따른 대두단백질 가수분해물 제조

단백질 당 flavourzyme, protamex, bromelain, papain, neutrase을 각각 0.5% 처리하여 5분~24시간동안 50℃ water bath에서 가수분해하였다. 가수분해에 사용한 5가지 protease 모두 시간이 증가함에 따라 가수분해도가 증가하였으며, 반응 3시간 이내에 급격하게 가수분해되어 6시간 이후에는 거의 반응을 보이지 않았다. 가수분해가 거의 완료된 시점인 6시간 가수분해시, protamex와 flavourzyme의 가수분해도는 각각 20.8%, 21.6%였으며, neutrase, papain, bromelain은 18.9%, 16.7%, 14.9%로 protamex와 flavourzyme으로 처리한 경우보다 상대적으로 낮은 것으로 나타났다. 특히 flavourzyme는 펩타이드의 노출된 아미노산 잔기로부터 아미노산을 유리시키는 exoprotease이므로 neutrase 등 endoprotease보다 더 높은 가수분해도를 나타내는 것으로 보인다(Figure 38).

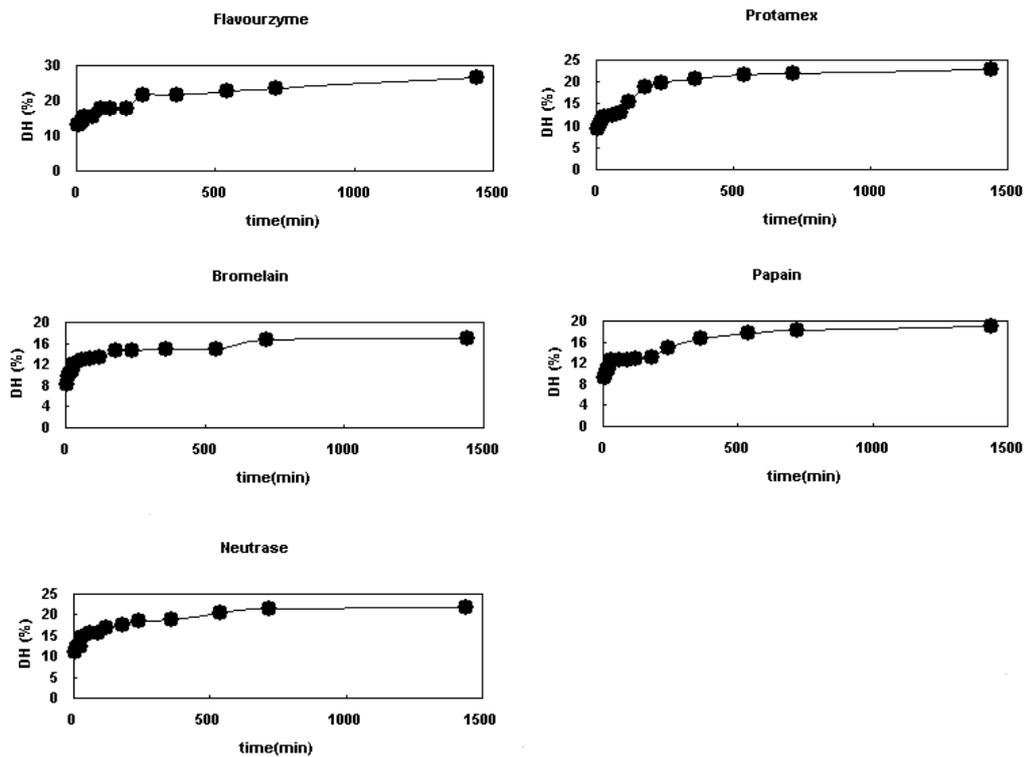


Figure 38. Time course of proteolytic degradation of five different proteases at 0.5:100(w/w) enzyme/substrate.

나) 대두단백질 가수분해물의 ACE 저해능 조사

안지오텐신 전환효소(ACE: angiotensin converting enzyme)는 angiotensin계에 의한 생리 생화학적 기전으로 혈압을 상승시키는 기능을 한다. 고혈압의 직접적인 억제를 위하여 안지오텐신 전환효소의 활성을 억제할 수 있는 물질에 초점이 맞추어져 연구가 진행되어지고 있다. 본 실험에서는 SPI와 효소종류별(%)DH가 각기 다른 시료를 대상으로 ACE저해 활성을 측정한 결과 protamex, bromelain, papain으로 처리한 경우 활성이 높게 나타났으며, 특히 papain으로 처리하여 얻은 DH 12% 시료가 1 mg/mL 농도에서 63.03%로 높은 ACE저해 활성을 보였다(Figure 39). Rho(2006)는 고온단기 발효한 간장반응물의 ACE저해 활성 측정결과 IC₅₀값이 1.46mg/mL로 나타났다고 보고하였으며, 다양한 대두발효 식품의 IC₅₀값을 비교 측정한 연구결과에서는 soy sauce 3.44 mg/mL, miso paste 1.27 mg/mL로 나타났다고 보고하였다(Kuba et al, 2003).

다) 대두단백질 가수분해물의 항산화 효과 조사

(1) TBA 법에 의한 측정

일정기간동안 60℃로 조절된 항온기에서 자동 산화시킨 후 대두단백질 가수분해물의 항산화효과를 측정한 결과, SPI에 비해 효소 처리한 경우 높은 활성을 보였다. 항산화제로 알려져 있는 토코페롤에 비해서는 낮았지만 대부분의 효소 처리한 DH별 시료의 항산화 효과는 70% 이상으로 높았으며 DH(%)에 따라 증가하는 것으로 나타났다. 특히 protamex 21%와 Nentrax 15%는 80% 이상의 높은 항산화 활성을 보이는 것으로 나타났다(Figure 40). Yee 등(1980)은 대두단백질을 pepsin으로 가수분해 시킨 가수분해물의 항산화 활성을 측정한 결과 대조군에 비해 약 80%의 활성을 보였다고 보고하였으며, Yamaguchi(1979)는 대두단백질을 효소로 가수분해 시킨 가수분해물 중 저분자의 펩타이드가 높은 항산화 효과를 보였다고 보고하였다.

(2) Ferric thiocyanate 법에 의한 측정

TBA법에 의한 항산화 측정결과와 마찬가지로 ferric thiocyanate values 또한 papain과 bromelain으로 처리한 경우 다른 경우에 비해 상대적으로 높은 활성을 보였다. papain과 bromelain을 포함하여 대부분의 효소 처리한 시료가 DH(%)가 증가함에 따라 활성이 증가하였으며 DH가 12%인 경우 가장 높은 활성 증가를

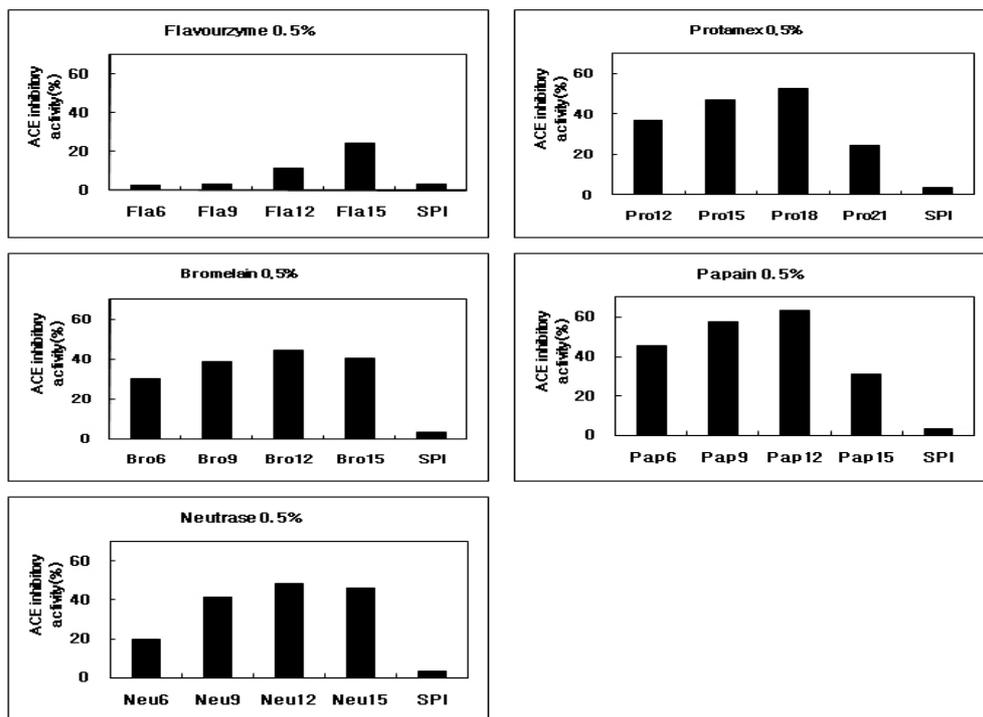


Figure 39. ACE inhibitory activity(%) of soy protein hydrolysate by variety hydrolase.

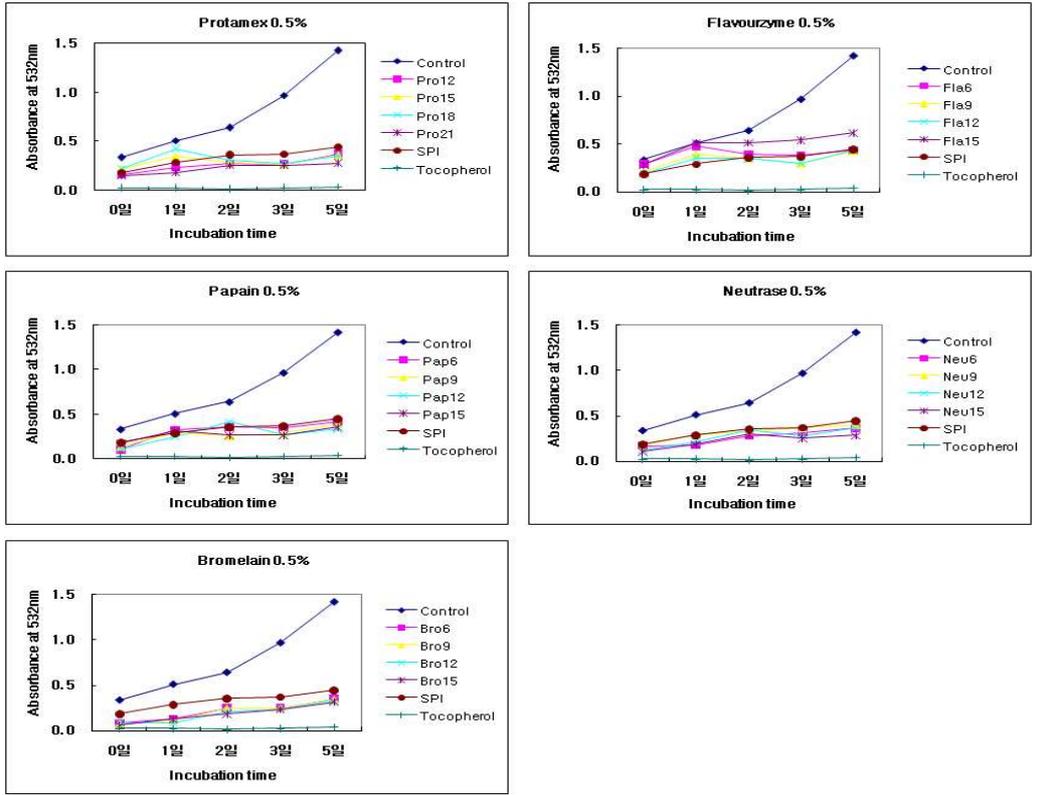


Figure 40. Thiobarbituric acid(TBA) values of soy protein hydrolysate by variety hydrolase.

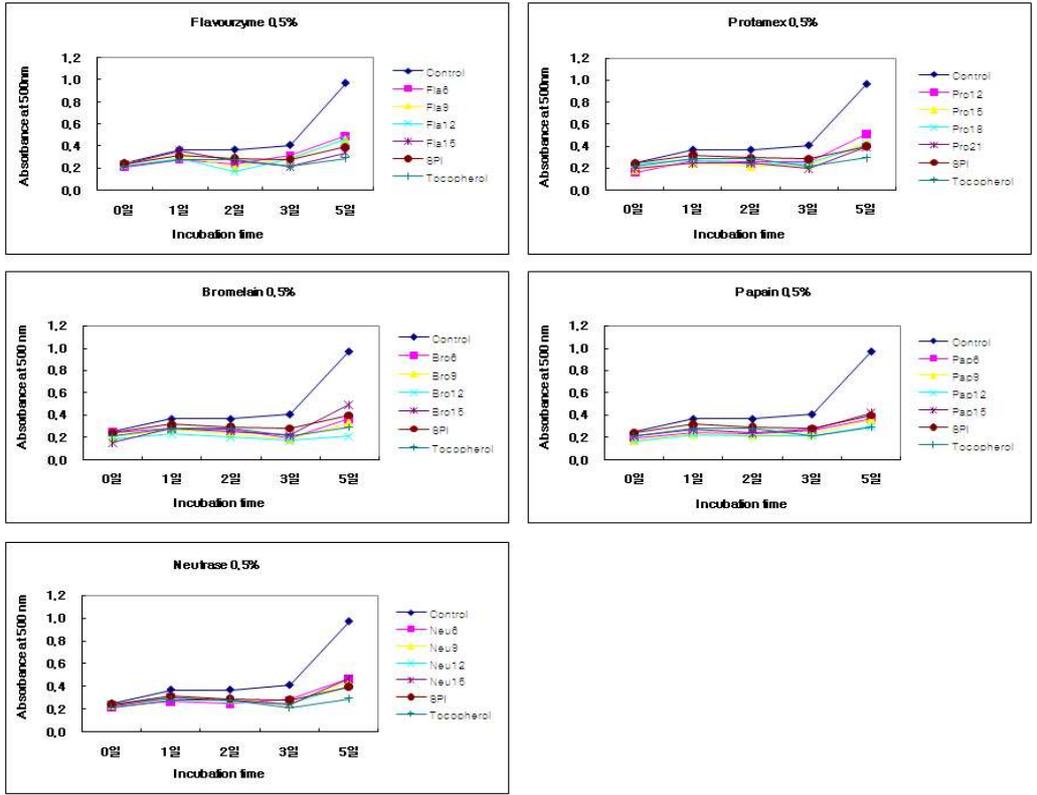


Figure 41. Ferric thiocyanate values of soy protein hydrolysate by variety hydrolyse.

보였다. 특히 5일 경과 시에는 대조군의 유지 변패도에 비해 papain 69.26%, bromelain 78.71%의 높은 항산화 효과를 보였다(Figure 41). 효소처리 가수분해물의 높은 항산화 활성은 linoleic acid model system에서 대두단백질 가수분해물이 항산화활성을 보였다는 결과와 유사한 경향을 보였다(Chen 등, 1996).

(3) Superoxide dismutase(SOD)-liked activity 측정

SOD는 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)에 대한 저항기작에 관여하는 항산화 효소의 일종으로 강한 독성을 가지고 있는 superoxide radical anion($O_2^{\cdot-}$)을 hydrogen peroxide(H_2O_2)와 산소로 바꿔주어 세포를 보호하는 물질로서 SOD 노화, 퇴행성 뇌질환 및 심혈관계 질환 등 각종 질병과 관련이 있는 것으로 보고되고 있다. 본 실험에서는 대표적인 항산화 측정법으로 알려져 있는 DPPH radical 소거능 측정결과 소거활성이 10%정도로 매우 낮아(data제시 안함) superoxide anion의 활성을 억제시킬 수 있는 유사물질의 활성능을 측정하였으며 측정결과, ACE저해활성과 유사하게 protamex, bromelain, papain으로 처리한 경우 항산화 활성도 높았으며, (%)DH에 따라 활성이 증가하는 것으로 나타났다. 특히 DH 15%인 경우 flavourzyme 13.83%, protamex 44.93%, papain 51.85%, bromelain 99.17%, neutrase 45.53%로 bromelain이 가장 높은 활성을 보였다(Figure 42). Ryu(2002)는 청국장 발효시 생성된 아미노산이나 펩타이드가 수소공여능에 기여함을 보고하였으며, Chen 등(1996)은 대두단백질 가수분해물이 높은 항산화활성을 보였다고 보고하였다. 대두 발효식품에서 항산화 활성은 발효과정 중 glucoside 등으로부터 나오는 polyphenol compound (isoflavones, chlorogenic acid isomers, caffeic acid)가 유리되기 때문이라고 추정되는데 이러한 항산화성은 발효과정 등에 형성된 갈변물질에 의해 더 강하게 일어날 수 있으며 여러 가지 종류의 인지지방질, 아미노산, 펩타이드 등도 함께 기여할 것이라고 보고되고 있다.

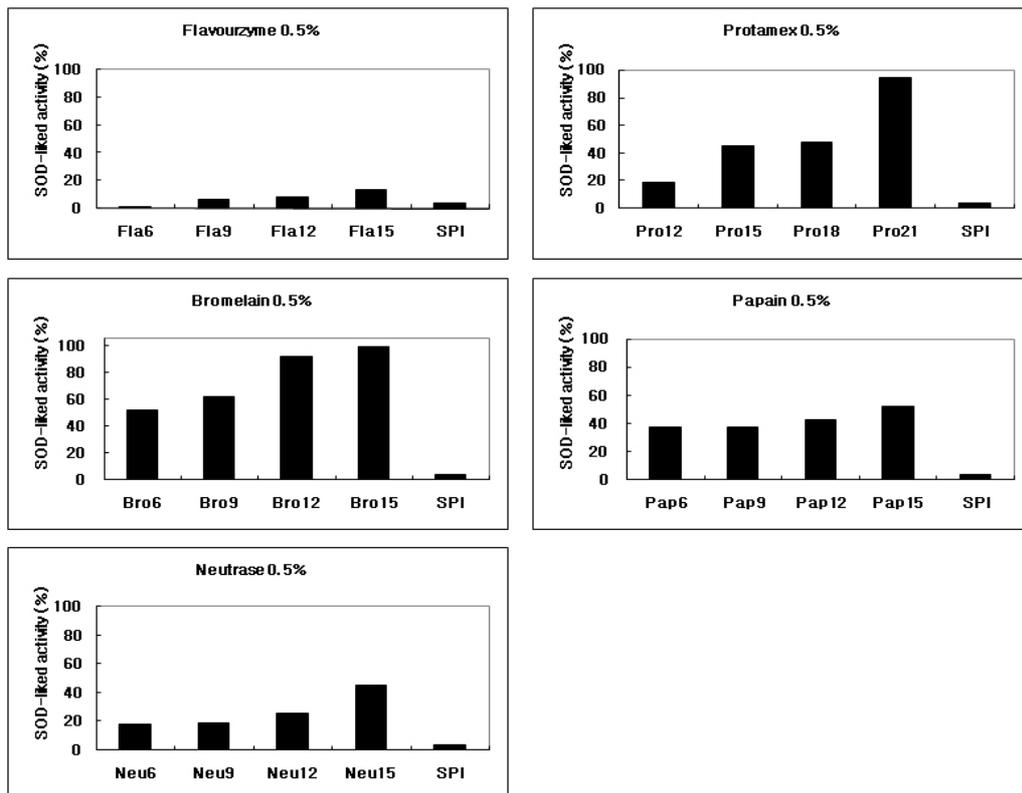


Figure 42. Superoxide dismutase(SOD)-liked activity(%) of soy protein hydrolysate by variety hydrolase.

2) RSM에 의한 대두단백질가수분해반응향의 최적화

가) 대두단백질가수분해반응향의 ACE 저해능 조사

대두단백질가수분해반응향의 ACE 저해효과에 영향을 미치는 DH와 glucose, cysteine, thiamine의 첨가 비율을 각각 독립변수로 하여 설정된 28개 실험구의 항고혈압효과는 Table 42에 나타내었다. Protamex를 이용하여 대두단백질가수분해반응향의 ACE 저해효과에 대한 RSREG 통계처리 결과는 Table 43과 같으며, 4가지 독립변수가 각각 변화함에 따른 ACE 저해능(Y)에 대한 회귀식은 다음과 같이 표현되었다.

$$Y = 34.78 + 11.89X_1 + 9.62X_1^2 - 12.72X_1X_2$$

이때의 결정계수(coefficient of determination, R^2)는 0.7264이고 유의성은 0.0565로서 10% 수준에서 인정되었다. 이러한 유의수준은 일반적인 생화학 실험에서의 유의수준인 $\pm 5\%$ 이내의 범위는 벗어나지만, 식품공학적 한계수준인 $\pm 15-20\%$ 유의수준의 범위에는 속하므로 $\pm 10\%$ 수준에서 채택하였다. 여기에서 독립변수 중 X_1 (DH)와 X_2 (glucose)는 유의적인 상관관계를 보였으나 X_3 (cysteine)과 X_4 (thiamine)은 유의적인 상관관계를 보이지 않아 이들 요인들은 protamex로 가수분해한 대두단백질가수분해반응물(savory향)의 ACE 저해능에 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났으며, 전체적으로 DH가 증가할수록 대두단백질가수분해반응향의 ACE 저해능은 증가하는 경향을 보였다(Figure 43(b, d)), 반면 Flavourzyme으로 가수분해한 대두단백질가수분해반응향의 ACE 저해능은 RSREG 통계처리 결과 결정계수(R^2) 0.5760, P-value 0.3406으로 유의성을 보이지 않아 분석에서 제외하였다.

Table 42. Response of independent variables to the experiment for the ACE inhibitory activity(%) of the soy protein hydrolysates

Run number	Coded variable ¹⁾				Dependent variable (ACE inhibitory activity(%)/mg protein)	
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	P ²⁾	F ³⁾
	1	-1	-1	-1	-1	34.96
2	-1	-1	-1	1	59.21	64.84
3	-1	-1	1	-1	30.47	35.30
4	-1	-1	1	1	29.29	40.19
5	-1	1	-1	-1	58.36	60.05
6	-1	1	-1	1	28.76	75.83
7	-1	1	1	-1	26.09	36.53
8	-1	1	1	1	99.31	39.75
9	1	-1	-1	-1	99.16	67.97
10	1	-1	-1	1	83.66	76.06
11	1	-1	1	-1	90.00	55.70
12	1	-1	1	1	96.26	55.94
13	1	1	-1	-1	22.05	57.55
14	1	1	-1	1	41.06	35.34
15	1	1	1	-1	90.12	49.40
16	1	1	1	1	70.91	41.99
17	-2	0	0	0	59.68	92.67
18	2	0	0	0	89.02	56.44
19	0	-2	0	0	76.34	73.22
20	0	2	0	0	58.93	43.51
21	0	0	-2	0	62.44	99.96
22	0	0	2	0	52.43	46.18
23	0	0	0	-2	56.85	98.93
24	0	0	0	2	37.03	48.68
25	0	0	0	0	53.77	46.63
26	0	0	0	0	39.81	52.88
27	0	0	0	0	18.06	53.31
28	0	0	0	0	27.49	46.61

¹⁾ X₁: DH, X₂: glucose, X₃: cysteine, X₄: thiamine

²⁾ P: soy protein hydrolysate using Protamex 0.5%

³⁾ F: soy protein hydrolysate using Flavourzyme 0.5%

Table 43. Values of regression coefficient calculated for the ACE inhibitory activity(%) of the soy protein hydrolysate by protamex 0.5% / g protein

Independent variable ¹⁾	Coefficient	t-Value	Significant level(P)
Constant	34.782500	3.58	
X ₁	11.893750	3.00	<0.1
X ₂	-5.048750	-1.27	
X ₃	3.550417	0.90	
X ₄	0.733750	0.18	
X ₁ X ₁	9.623437	2.43	<0.1
X ₂ X ₁	-12.720625	-2.62	<0.1
X ₂ X ₂	7.944688	2.00	
X ₃ X ₁	6.093125	1.25	
X ₃ X ₂	10.448125	2.15	
X ₃ X ₃	5.394687	1.36	
X ₄ X ₁	-4.758125	-0.98	
X ₄ X ₂	1.849375	0.38	
X ₄ X ₃	3.808125	0.78	
X ₄ X ₄	2.770937	0.70	
R ²			0.7264
F			2.47
Probability			0.0565

¹⁾ X₁: DH, X₂: glucose, X₃: cysteine, X₄: thiamine

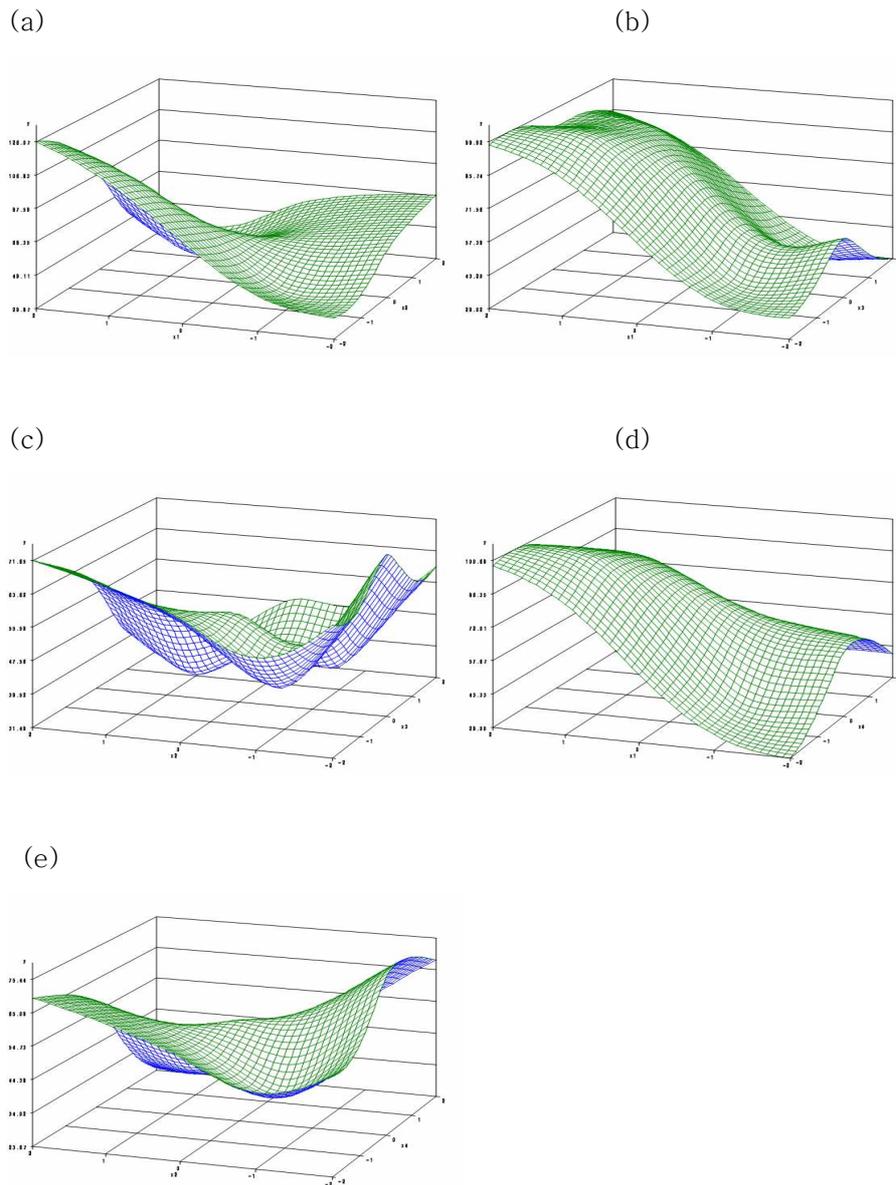


Figure 43. Response surface on the ACE inhibitory activity(%) of the soy protein hydrolysate by protamex 0.5% / g protein; (a)X₁:DH, X₂:glucose (b)X₁:DH, X₃:cysteine (c)X₂:glucose, X₃:cysteine (d)X₁:DH,, X₄:thiamine (e)X₂:glucose, X₄: thiamine.

나) 대두단백질가수분해반응물향의 향산화효과 조사

대두단백질가수분해반응향의 향산화효과에 영향을 미치는 DH와 glucose, cysteine, thiamine의 첨가비율을 각각 독립변수로 하여 설정된 28개 실험구의 향산화효과는 Table 44에 나타내었다. Protamex로 가수분해한 대두단백질가수분해반응향의 향산화효과에 대한 RSREG 통계처리 결과는 Table 45와 같다. 4가지 독립변수에 대한 향산화효과(Y)를 종속변수로 설정하여 다중 회귀분석을 수행한 결과 90% 수준에서 유의수준을 나타내는 것을 채택하고 나머지는 기각하여 다음과 같은 다항 회귀식을 얻었다.

$$Y(\%) = 20.20 - 4.84X_3 + 4.39X_1X_1 + 4.16X_2X_2 + 2.72X_4X_4$$

Protamex로 처리한 대두단백질가수분해반응향의 향산화효과에 대한 회귀식의 결정계수는 0.7937이고 유의성은 0.0138로서 10% 수준에서 인정되었다. 여기에서 X_3 (cysteine)의 비율이 향산화효과에 유의적인 상관관계를 보였으며 당의 첨가(glucose, cysteine, thiamine)가 향산화효과에 영향을 미치는 것으로 나타났지만, DH는 향산화효과에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(Figure 44). 또한 Flavourzyme으로 가수분해 처리한 대두단백질가수분해반응향의 향산화효과에 대한 RSREG 통계처리 결과는 Table 46에 나타내었으며, 이에 대한 회귀식은 다음과 같이 표현되었다.

$$Y(\%) = 11.61 - 5.74X_3$$

이때의 결정계수는 0.6926이고 유의성은 0.0962로 10% 수준에서 인정되었다. 이러한 유의수준은 식품공학적 한계수준인 15-20%의 유의수준 범위에는 해당되므로 10% 수준에서 채택하였다. 회귀식에 따르면 X_3 의 비율이 향산화효과에 영향을 미치는 것으로 나타났으며, DH와 glucose의 비율도 대두단백질가수분해반응향의 향산화효과에 관여하는 것을 알 수 있었다(Figure 45).

Table 44. Response of independent variables to the experiment for the Superoxide dismutase(SOD)-liked activity(%) of the soy protein hydrolysates

Run number	Coded variable ¹⁾				Dependent variable (antioxidant activity(%)/mg protein)	
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	P ²⁾	F ³⁾
1	-1	-1	-1	-1	45.11	45.90
2	-1	-1	-1	1	29.84	15.74
3	-1	-1	1	-1	37.38	11.06
4	-1	-1	1	1	24.61	3.37
5	-1	1	-1	-1	44.15	25.90
6	-1	1	-1	1	38.17	13.86
7	-1	1	1	-1	29.59	1.96
8	-1	1	1	1	28.43	7.21
9	1	-1	-1	-1	44.59	14.03
10	1	-1	-1	1	46.87	10.90
11	1	-1	1	-1	29.30	9.17
12	1	-1	1	1	37.02	9.65
13	1	1	-1	-1	32.57	16.62
14	1	1	-1	1	33.95	13.27
15	1	1	1	-1	28.35	14.55
16	1	1	1	1	24.40	11.74
17	-2	0	0	0	44.52	37.21
18	2	0	0	0	27.22	16.53
19	0	-2	0	0	32.43	24.63
20	0	2	0	0	37.50	26.16
21	0	0	-2	0	37.11	39.59
22	0	0	2	0	17.01	14.44
23	0	0	0	-2	32.31	29.07
24	0	0	0	2	26.12	13.38
25	0	0	0	0	26.24	11.54
26	0	0	0	0	23.76	16.07
27	0	0	0	0	12.96	9.36
28	0	0	0	0	17.87	9.48

¹⁾ X₁: DH, X₂: glucose, X₃: cysteine, X₄: thiamine

²⁾ P: soy protein hydrolysate using Protamex 0.5%

³⁾ F: soy protein hydrolysate using Flavourzyme 0.5%

Table 45. Values of regression coefficient calculated for the Superoxide dismutase(SOD)-liked activity(%) of the soy protein hydrolysate by protamex 0.5% / g protein

Independent variable ¹⁾	Coefficient	t-Value	Significant level(P)
Constant	20.207500	6.99	
X ₁	-1.451250	-1.23	
X ₂	-1.040417	-0.88	
X ₃	-4.848750	-4.11	<0.1
X ₄	-1.672083	-1.42	
X ₁ X ₁	4.393646	3.72	<0.1
X ₂ X ₁	-2.619375	-1.81	
X ₂ X ₂	4.167396	3.53	<0.1
X ₃ X ₁	-0.103125	-0.07	
X ₃ X ₂	0.001875	0.00	
X ₃ X ₃	2.191146	1.86	
X ₄ X ₁	2.663125	1.84	
X ₄ X ₂	0.520625	0.36	
X ₄ X ₃	0.464375	0.32	
X ₄ X ₄	2.729896	2.31	<0.1
R ²			0.7937
F			3.57
Probability			0.0138

¹⁾ X₁: DH, X₂: glucose, X₃: cysteine, X₄: thiamine

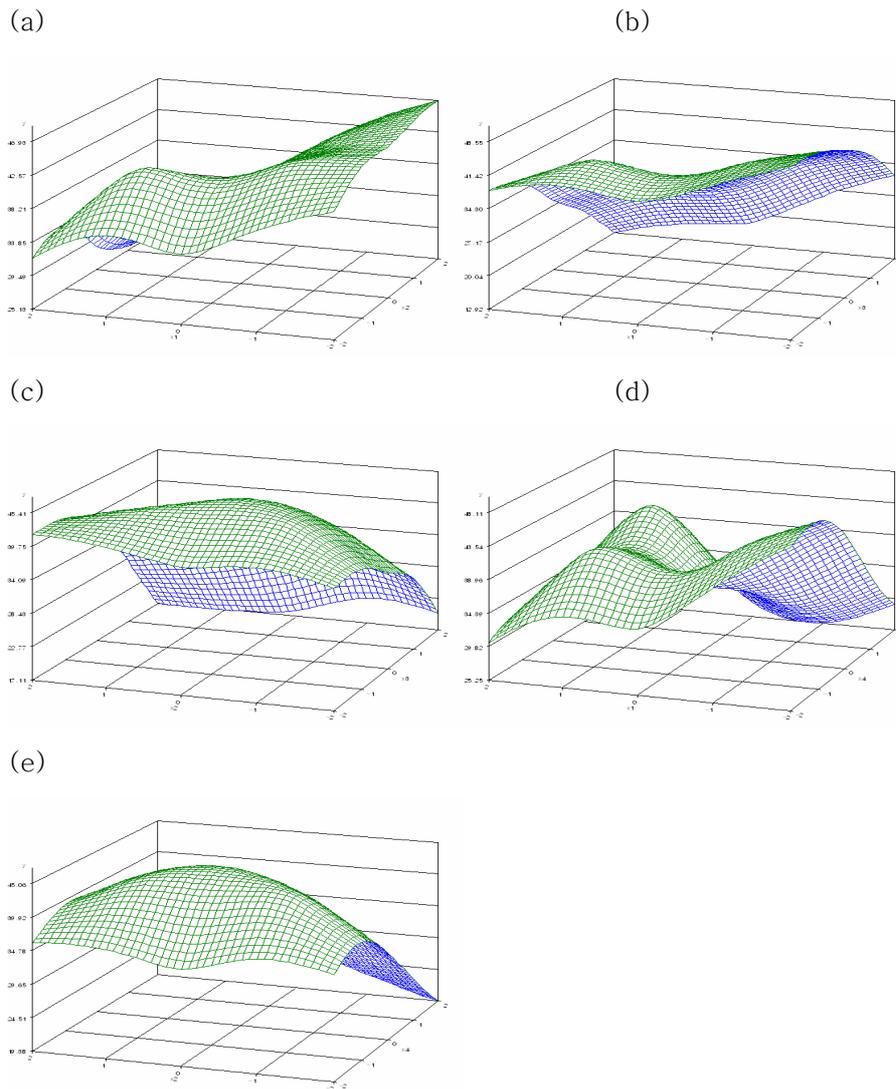


Figure 44. Response surface on the Superoxide dismutase(SOD)-liked activity(%) of the soy protein hydrolysate by protamex 0.5% / g protein; (a)X₁:DH, X₂:glucose (b)X₁:DH,, X₃:cysteine (c)X₂:glucose, X₃:cysteine (d)X₁:DH,, X₄:thiamine (e)X₂:glucose, X₄: thiamine.

Table 46. Values of regression coefficient calculated for the Superoxide dismutase(SOD)-liked activity(%) of the soy protein hydrolysate by flavourzyme 0.5% / g protein

Independent variable ¹⁾	Coefficient	t-Value	Significant level(P)
Constant	11.612500	2.74	
X ₁	-2.767917	-1.60	
X ₂	-0.485417	-0.28	
X ₃	-5.742083	-3.31	<0.1
X ₄	-3.534583	-2.04	
X ₁ X ₁	1.969688	1.14	
X ₂ X ₁	2.473125	1.16	
X ₂ X ₂	1.600938	0.92	
X ₃ X ₁	4.255625	2.00	
X ₃ X ₂	1.195625	0.56	
X ₃ X ₃	2.005937	1.16	
X ₄ X ₁	2.239375	1.05	
X ₄ X ₂	1.721875	0.81	
X ₄ X ₃	2.744375	1.29	
X ₄ X ₄	0.558437	0.32	
R ²			0.6926
F			2.09
Probability			0.0962

¹⁾ X₁: DH, X₂: glucose, X₃: cysteine, X₄: thiamine

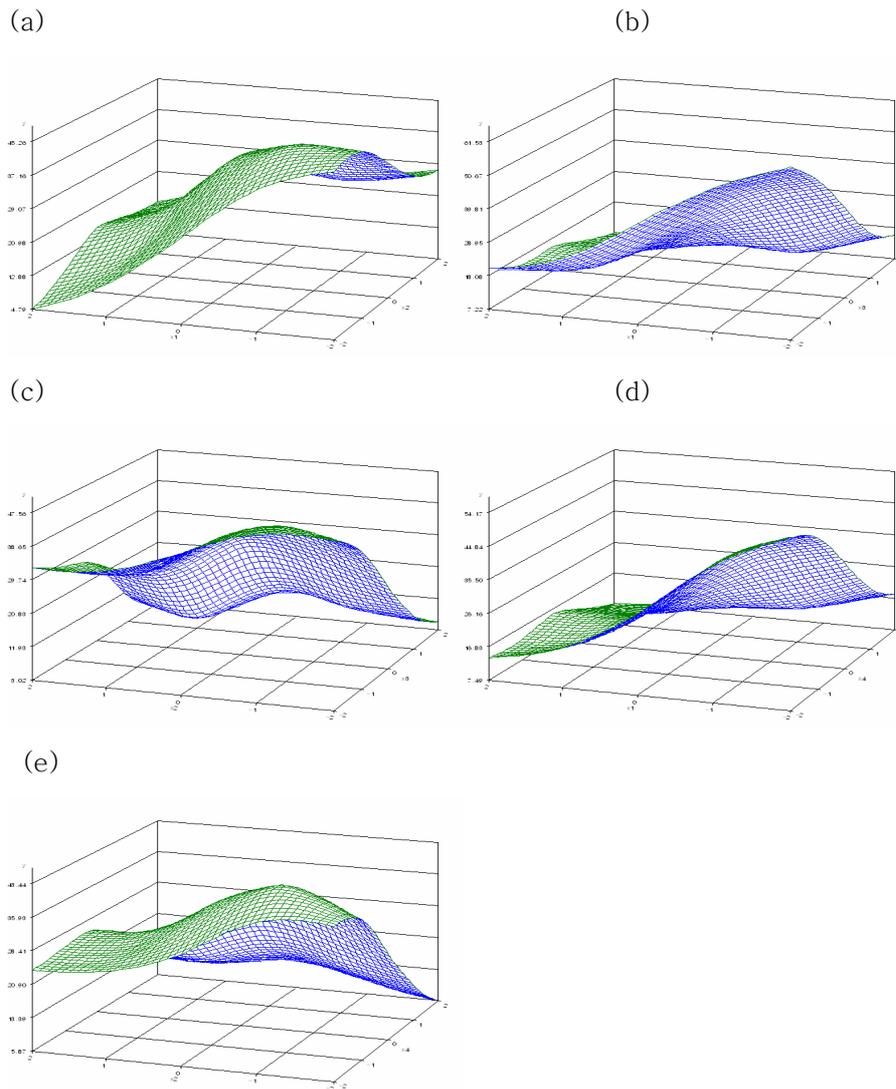


Figure 45. Response surface on the Superoxide dismutase(SOD)–liked activity(%) of the soy protein hydrolysate by flavourzyme 0.5% / g protein; (a) X_1 :DH, X_2 :glucose (b) X_1 :DH,, X_3 :cysteine (c) X_2 :glucose, X_3 :cysteine (d) X_1 :DH,, X_4 :thiamine (e) X_2 :glucose, X_4 : thiamine.

다) 대두단백질가수분해반응향의 암세포독성 효과 조사

대두단백질 가수분해시 이용되는 효소별(protamex와 flavourzyme)로 이들 대두단백질가수분해반응향의 항암효과에 영향을 미치는 DH, glucose, cysteine 및 thiamine을 독립변수로 설정하여 28개 실험구의 항암효과는 Table 47에 나타내었다. 본 연구에서는 Human tumor cell line인 HT1080(null fibrosacroma)에 대해 세포독성 효과를 측정하였으며 그 결과 가수분해 처리시 protamex로 사용한 경우보다 flavourzyme을 사용한 경우 세포독성 효과가 더 높은 것으로 나타났다.

대두단백질가수분해반응향의 암세포독성 효과에 대한 반응표면 분석결과, Protamex로 가수분해 처리한 대두 대두단백질가수분해반응향의 항암효과에 대한 통계처리 결과는 Table 48과 같다. 4가지 독립변수에 대한 세포독성 효과를 종속변수로 설정하여 다중 회귀분석을 실시하였으며 90% 수준에서 유의수준을 나타내는 것을 채택하고 나머지는 기각하여 다음의 다항 회귀식을 얻었다.

$$Y(\%) = 12.49 - 1.89X_1 - 2.27X_3 - 1.56X_4 - 2.94X_2X_1 + 1.38X_2X_2 + 1.29X_3X_2$$

Protamex에 의한 대두단백질가수분해반응향의 항암효과에 대한 회귀식의 결정계수는 0.8241이고 유의성은 0.0059로 10% 수준에서 인정되었다. 여기에서 독립변수 중 X_1 (DH)이 증가할수록 암세포독성 효과가 증가하였으며, X_2 (glucose)의 비율은 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

Flavourzyme으로 가수분해한 대두단백질가수분해반응향의 항암효과 또한 위와 동일한 방법에 의해 다항 회귀식 $Y(\%) = 16.52 - 5.63X_1 - 5.28X_3 - 5.10X_4 + 4.02X_3X_1 + 4.96X_4X_1 + 3.72X_4X_3$ 을 얻었으며, 이때 회귀식의 결정계수는 0.8590이고 유의성은 0.0017로 10% 수준에서 인정되었으며, 독립변수 중 X_3 (cysteine)의 비율이 유의적인 상관관계를 보였다(Table 49).

다중 회귀분석에 의해 설정된 모델식을 이용하여 두 독립변수의 상호간의 관계를 3차원으로 도식화하여 나타내었다(Figure 46와 47).

Table 47. Response of independent variables to the experiment for the MTT assay of the soy protein hydrolysates

Run number	Coded variable ¹⁾				Dependent variable (growth inhibition effect(%) / 100ug protein)	
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	P ²⁾	F ³⁾
	1	-1	-1	-1	-1	22.20
2	-1	-1	-1	1	16.00	15.56
3	-1	-1	1	-1	20.83	16.58
4	-1	-1	1	1	12.57	11.35
5	-1	1	-1	-1	28.21	55.42
6	-1	1	-1	1	23.38	14.48
7	-1	1	1	-1	18.84	14.85
8	-1	1	1	1	17.77	12.94
9	1	-1	-1	-1	23.30	17.15
10	1	-1	-1	1	22.38	17.98
11	1	-1	1	-1	16.34	13.29
12	1	-1	1	1	19.31	15.04
13	1	1	-1	-1	15.31	12.44
14	1	1	-1	1	14.43	14.37
15	1	1	1	-1	13.00	12.96
16	1	1	1	1	8.13	10.05
17	-2	0	0	0	20.63	36.44
18	2	0	0	0	11.75	5.34
19	0	-2	0	0	13.84	13.26
20	0	2	0	0	19.88	22.29
21	0	0	-2	0	20.52	36.92
22	0	0	2	0	12.48	16.27
23	0	0	0	-2	19.83	38.02
24	0	0	0	2	13.14	14.82
25	0	0	0	0	14.95	17.15
26	0	0	0	0	14.53	16.02
27	0	0	0	0	8.66	15.81
28	0	0	0	0	11.85	17.11

¹⁾ X₁: DH, X₂: glucose, X₃: cysteine, X₄: thiamine

²⁾ P: soy protein hydrolysate using Protamex 0.5%

³⁾ F: soy protein hydrolysate using Flavourzyme 0.5%

Table 48. Values of regression coefficient calculated for the MTT assay of the soy protein hydrolysate by protamex 0.5% / g protein

Independent variable ¹⁾	Coefficient	t-Value	Significant level(P)
Constant	12.497500	8.55	
X ₁	-1.890000	-3.17	<0.1
X ₂	-0.074167	-0.12	
X ₃	-2.270833	-3.80	<0.1
X ₄	-1.560000	-2.61	<0.1
X ₁ X ₁	1.213333	2.03	
X ₂ X ₁	-2.941250	-4.02	<0.1
X ₂ X ₂	1.380833	2.31	<0.1
X ₃ X ₁	0.071250	0.10	
X ₃ X ₂	-0.547500	-0.75	
X ₃ X ₃	1.290833	2.16	<0.1
X ₄ X ₁	1.041250	1.42	
X ₄ X ₂	0.047500	0.06	
X ₄ X ₃	0.100000	0.14	
X ₄ X ₄	1.287083	2.16	
R ²			0.8241
F			4.35
Probability			0.0059

¹⁾ X₁: DH, X₂: glucose, X₃: cysteine, X₄: thiamine

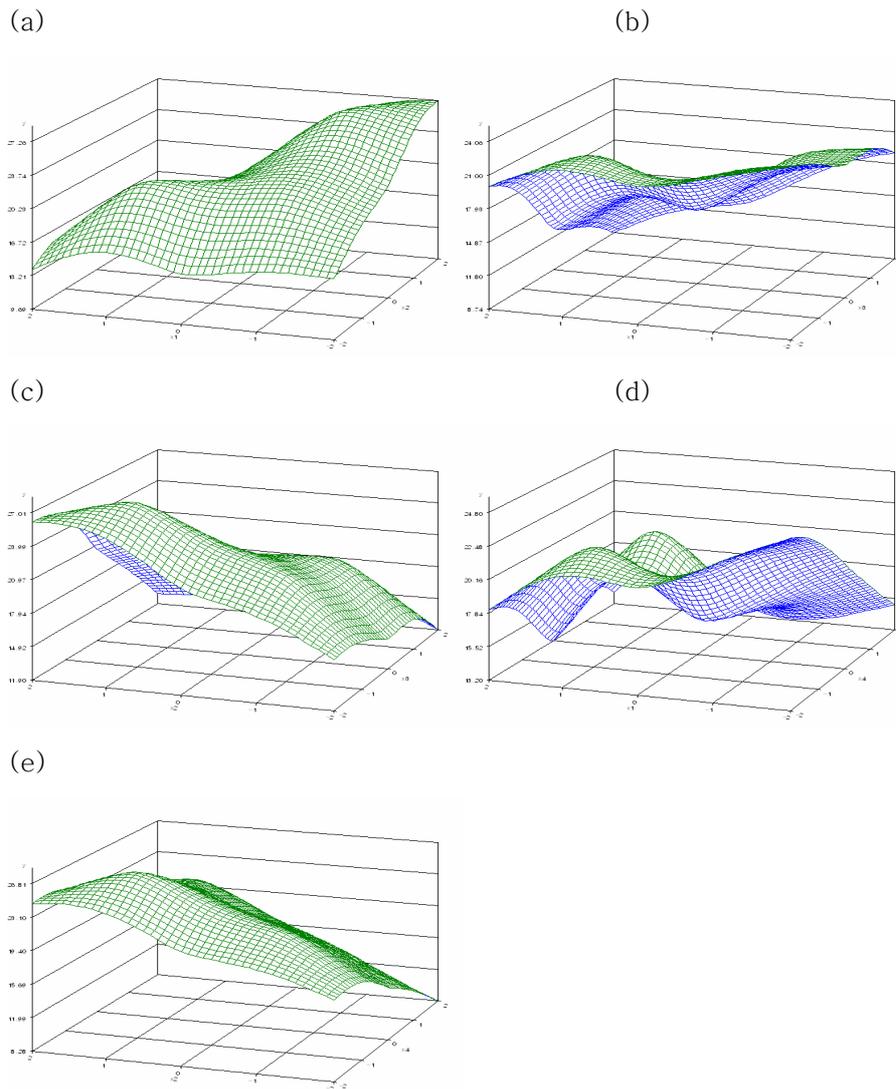


Figure 46. Response surface on the HT 1080 cell growth inhibition effect(%) of the soy protein hydrolysate by protamex 0.5% / g protein; (a) X_1 :DH, X_2 :glucose (b) X_1 :DH,, X_3 :cysteine (c) X_2 :glucose, X_3 :cysteine (d) X_1 :DH,, X_4 :thiamine (e) X_2 :glucose, X_4 : thiamine.

Table 49. Values of regression coefficient calculated for the MTT assay of the soy protein hydrolysate by flavourzyme 0.5% / g protein

Independent variable ¹⁾	Coefficient	t-Value	Significant level(P)
Constant	16.522500	5.25	
X ₁	-5.639583	-4.39	<0.1
X ₂	0.557083	0.43	
X ₃	-5.287083	-4.11	<0.1
X ₄	-5.107083	-3.97	<0.1
X ₁ X ₁	0.393854	0.31	
X ₂ X ₁	-1.411875	-0.90	
X ₂ X ₂	-0.384896	-0.30	
X ₃ X ₁	4.024375	2.56	<0.1
X ₃ X ₂	-0.389375	-0.25	
X ₃ X ₃	1.820104	1.42	
X ₄ X ₁	4.960625	3.15	<0.1
X ₄ X ₂	-0.718125	-0.46	
X ₄ X ₃	3.723125	2.36	<0.1
X ₄ X ₄	1.776354	1.38	
R ²			0.8590
F			5.66
Probability			0.0017

¹⁾ X₁: DH, X₂: glucose, X₃: cysteine, X₄: thiamine

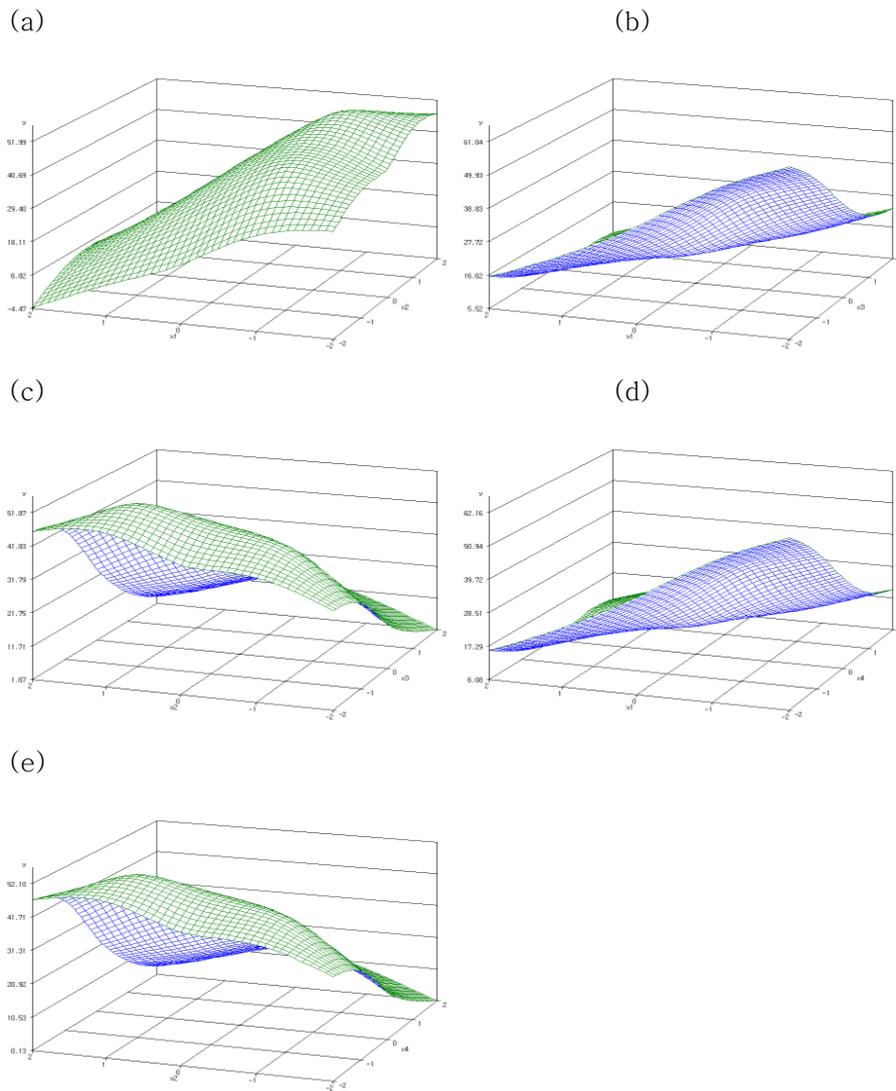


Figure 47. Response surface on the HT 1080 cell growth inhibition effect(%) of the soy protein hydrolysate by flavourzyme 0.5% / g protein; (a)X₁:DH, X₂:glucose (b)X₁:DH,, X₃:cysteine (c)X₂:glucose, X₃:cysteine (d)X₁:DH,, X₄:thiamine (e)X₂:glucose, X₄: thiamine.

나. 생리활성 우수 펩타이드 분리, 정제 및 아미노산 조성 분석

1) 최적화된 대두단백질가수분해반응향의 일반성분 및 분자량 분포 특성분석

가) 일반성분 분석

최적화된 대두단백질가수분해반응향의 일반성분 조성은 조단백질은 84.82%, 조지방은 0.12%, 조회분은 5.07%로 나타났다.

나) 분자량 분포 분석

최적화된 대두단백질가수분해반응향의 평균분자량 및 분자량 분포는 gel filtration chromatography를 이용하여 표준물질로부터 얻은 chromatogram의 피크 면적을 계산하고 시료와의 머무름 시간을 비교하여 계산하였다. 최적화된 대두단백질가수분해반응향의 평균 분자량은 5 kDa이고, 분자량 분포를 분석한 결과 10 kDa 이상이 76.44%로 가장 많은 부분을 차지한 반면, 3-10 kDa과 3 kDa 이하가 각각 16.82와 17.04%로 유사한 부분을 차지하고 있어 대부분 10 kDa 이상의 고분자로 구성되어 있음을 알 수 있었다(Table 50).

2) 최적화된 대두단백질가수분해반응향의 생리활성 (*in vitro*) 조사

ACE 저해능에 대한 대두단백질가수분해반응물 제조조건을 최적화한 결과, Protamax로 가수분해한 대두단백질가수분해물의 최적조건으로 X₁(DH): 2.22(%), X₂(Glucose): 6.66(%), X₃(Cystein): 1.35(%), X₄(Thiamin): 1.15(%)의 조건에서 시료를 제조하였다. 최적조건에서 제조된 대두단백질가수분해물의 여러 생리활성을 탐색한 결과, ACE 저해능 52.25%와 SOD 유사활성 47.56%를 나타내었고, TBA와 Ferric thiocyanate은 활성이 나타나지 않았다. 따라서 이 후 대두단백질가수분해반응물(savory향)로부터 ACE 저해 peptide를 분리 및 정제하였다.

3) 최적화된 대두단백질가수분해반응향로부터 ACE저해 peptide의 분리 및 정제

가) 한외 여과법(Ultrafiltration)

Ultrafiltration membrane system을 이용하여 한외 여과한 3개의 fraction과 대두단백질가수분해반응향의 ACE 저해 활성을 비교한 결과는 Figure 48에 나타내었다. ACE 저해활성은 대두단백질 가수분해 반응향 0.53%/ug protein, 10 kDa 이상

Table 50. Molecular weight distribution of soy protein isolate hydrolysate

Molecular weight (kDa)	Distribution (%) ¹⁾
>10	76.44
10-3	16,82
<3	17.04

¹⁾Degree of molecular weight distribution was expressed as the yield of each fraction obtained by soy protein isolate hydrolysate through ultrafiltration.

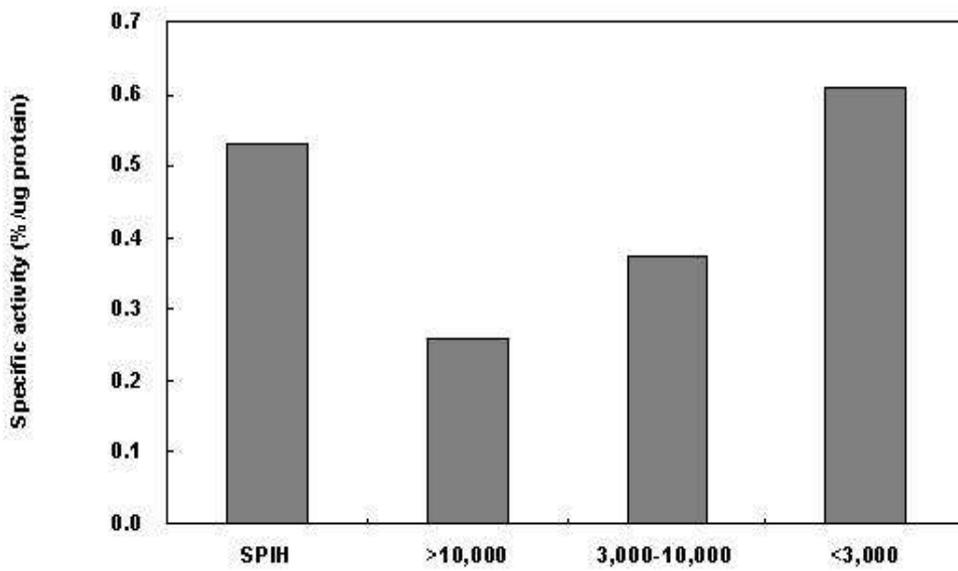


Figure 48. Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activities of soy protein isolate hydrolysate (savory flavor) and fractions obtained from soy protein isolate hydrolysate (savory flavor) through ultrafiltration (UF) membrane system.

0.26%/ug protein, 3-10 kDa 0.37%/ug protein, 3 kDa이하 0.60%/ug protein로 분자량이 작아질수록 ACE 저해활성은 증가하는 경향을 보여 분자량 3 kDa 이하에서 가장 높은 ACE 저해 활성을 나타내었다.

지금까지 밝혀진 대부분의 ACE 저해 펩타이드의 특성은 저분자량으로 알려져 있으며 이와 일치하는 많은 연구결과가 보고되고 있다(Astawan et al., 1995; Gomez-Ruiz et al., 2002). Jang과 Lee(2005)의 육류 가수분해물과 Kim 등(2005)의 김 가수분해물에 대한 연구에서 3 kDa 이하의 분자량을 가진 저분자 펩타이드가 높은 활성을 보였다고 하였다. Byun과 Kim(2001)은 명태 가수분해물을 분자량 10, 5, 1 kDa의 한외 여과막으로 분리하여 ACE 저해활성을 측정한 결과, 분자량이 낮을수록 ACE 저해 활성이 현저하게 증가하였다고 보고하여 본 연구 결과와 일치함을 알 수 있었다. 따라서 가장 높은 ACE 저해 활성을 보인 분자량 3 kDa이하의 fraction을 얻어 ACE 저해 펩타이드의 분리 및 정제에 사용하였다.

나) Gel filtration chromatography

Ultrafiltration membrane system을 이용하여 한외여과한 3개의 fraction (<3kDa, 3-10kDa, >10kDa)중에서 ACE 저해 활성이 가장 높은 분자량 3 kDa 이하를 동결건조한 후 Superdex Peptide 10/300 GL column을 이용하여 gel filtration chromatography를 수행한 결과, 5개의 fraction(G1-G5)을 얻었다(Figure 49). 이 동상으로 30% Acetonitrile을 사용하여 분리한 각 fraction의 단백질 함량과 ACE 저해 활성을 측정한 결과, G1-G5의 ACE 저해활성은 각각 0.54, 0.68, 0.16, 0.79, 그리고 0.21%/ug protein로 나타나 G4가 가장 높은 ACE 저해 활성을 보였다.

다) Re-gel filtration chromatography

Superdex Peptide 10/300 GL column에 의해 얻어진 ACE 저해활성이 가장 높은획분인 G4을 취하여 농축한 후 적정 농도로 제조하여 0.2 μ m로 filter한 후 gel filtration chromatography를 이용하여 2차 분리를 수행하였다. 1차와 동일한 조건에서 분리한 결과, 4개의 fraction(RG1-RG3)을 얻었다(Figure 50). Re-chromatography에서 얻은 RG1-RG3의 ACE 저해활성은 각각 0.87, 1.15, 그리고 0.19%/ug protein로 나타났다. 이와 같이 분자량이 가장 작은 범위인 RG2에서 가장 높은 ACE 저해활성을 보였다.

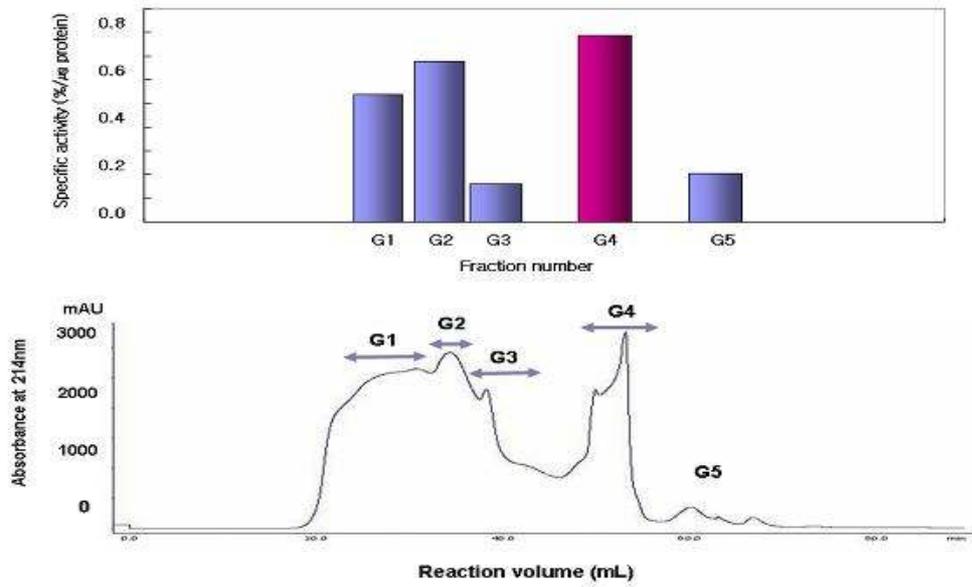


Figure 49. Chromatogram on Superdex Peptide10/300 GL gel filtration column (lower) and ACE inhibitory activity of fraction (upper) from <3 kDa active fraction obtained by ultrafiltration (UF) membrane system.

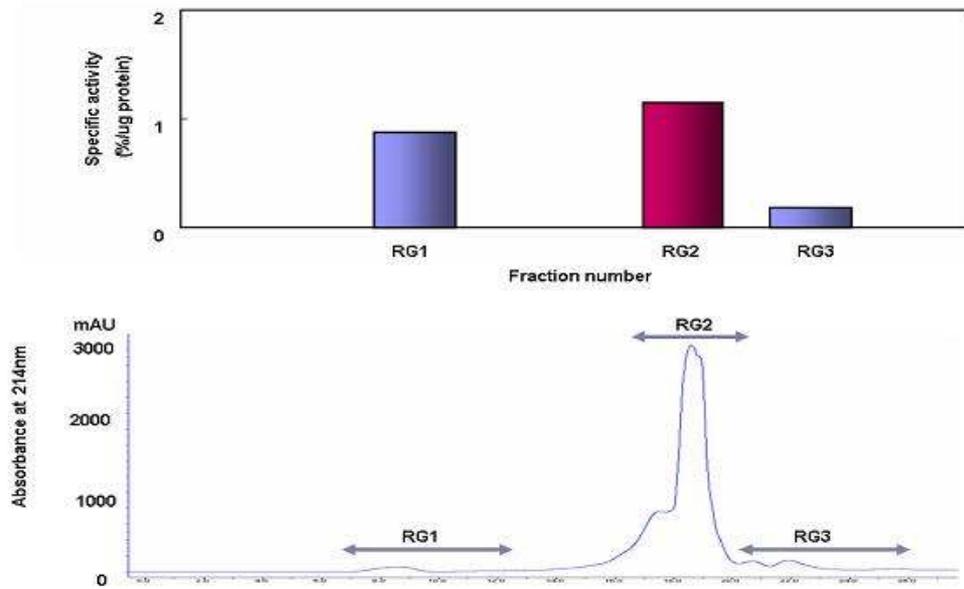


Figure 50. Re-chromatogram on Superdex Peptide 10/300 GL gel filtration column (lower) and ACE inhibitory activity of fraction (upper) from G1 active fraction obtained by gel filtration chromatography.

라) Reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC)

Re-chromatography에 의해 얻어진 ACE 저해활성이 가장 높은 획분인 RG2를 분취하여 농축한 후 적정 농도로 제조한 시료용액을 0.4 μ m syringe filter를 이용하여 불순물을 제거하여 분리에 사용하였다. 펩타이드의 소수성에 따른 분리를 위하여 μ BondapakTM C₁₈ column을 이용하여 분리한 결과는 Figure 51과 같다. RP-HPLC에 의해 분리된 세 부분의 peak(P1-P3)의 ACE 저해활성은 각각 0.38, 1.60 그리고 4.69%/ug protein로 나타났다. 이와 같이 P3의 경우 가장 높은 ACE 저해 활성을 보였으며 대두단백질가수분해반응물향의 specific activity 값인 0.53%/ug protein에 비해 8.87배의 정제도를 보였다.

마) 단계별 ACE 저해활성

단계별로 분획한 fraction의 ACE 저해활성과 이에 따른 정제도에 대한 결과는 Table 51에 나타내었다. 대두단백질가수분해반응향으로부터 다양한 chromatography를 이용하여 ACE 저해활성 물질을 분리한 결과, 대두단백질가수분해반응향의 활성에 비해 RP-HPLC에서 얻은 P3의 경우 8.87배 정도 정제되었음을 알 수 있었다. 다양한 방법을 이용하여 최종획분에 대한 구조동정을 시도하였으나 단일서열을 얻지 못하여 분획별 아미노산 조성 변화로 이를 대체하여 분석하였다.

현재까지 다양한 단백질 가수분해물로부터 ACE 저해활성 물질이 분리 정제되었으며 이들의 정제는 낮게는 5.25에서 높게는 468배까지 다양하게 보고되고 있다(Byun and Kim, 2001; Lee et al., 1999; Lee et al., 2006; Ma et al., 2006; Shin et al., 1995; Shin, 2006). 이상과 같이, ACE 저해 활성도를 기준으로 우수한 정제도를 고려할 때 gel filtration chromatography와 RP-HPLC를 이용한 ACE 저해활성 물질의 분획은 효과적인 방법임을 알 수 있었으며, 추후 동일 조건에서의 re-chromatography 방법이나 다른 종류의 column을 이용하여 ACE 저해 펩타이드를 분리하고 구조를 동정할 수 있을 것으로 기대된다.

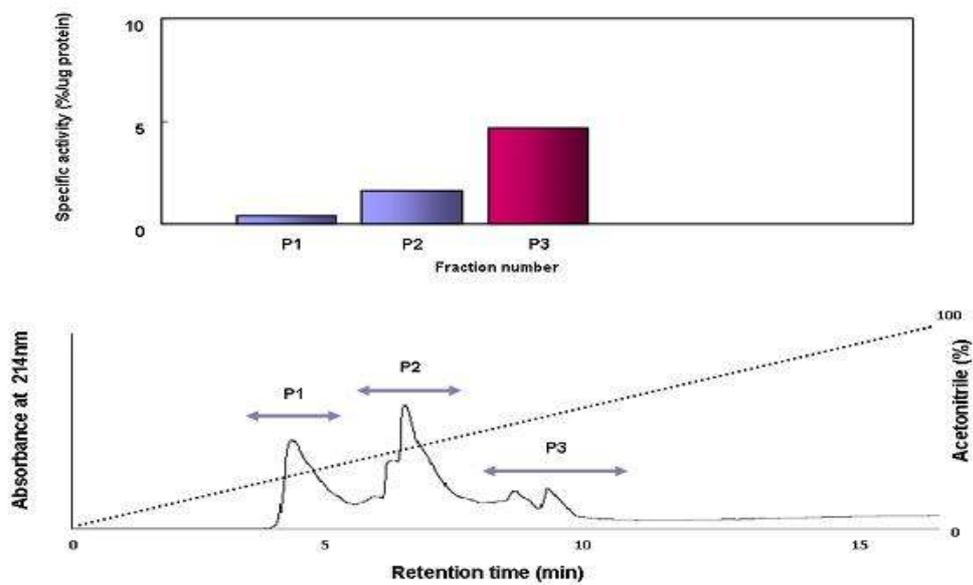


Figure 51. Chromatogram on μ BondapakTM C₁₈ column (lower) and ACE inhibitory activity of fraction (upper) from RG2 active fraction obtained by gel filtration re-chromatography.

Table 51. Purification of ACE inhibitory peptide from soy protein isolate hydrolysate (savory flavor)

Purification step	Specific activity (%/ug protein) ¹⁾	Purification fold ²⁾
SPIH(savory flavor)	0.53	1.00
Ultrafiltration (< 3 kDa)	0.61	1.15
Gel filtration (G4)	0.79	1.49
Re-Gel filtration (RG2)	1.15	2.18
RP-HPLC (P3)	4.69	8.87

¹⁾ Specific activity defined as the protein weight which required the activity.

²⁾ Relative value of reciprocal of ACE inhibitory specific activity.

4) 아미노산 조성 분석

본 연구에서는 pico-tag법을 이용하여 아미노산 조성을 분석하였는데, 이 분석방법에 따르면, Asp와 Asn 그리고 Glu와 Gln의 retention time이 거의 비슷하여 구분이 될 수 없으며, Cys와 Trp는 분석할 수 없었다. 대두단백질가수분해반응향의 아미노산 조성을 분석한 결과, glutamic acid(21.4%), aspartic acid(13.8%), arginine(8.2%), leucine(6.8%), lysine(6.4%)의 순으로 나타났다. 콩에서 함량이 높은 glutamic acid는 메주, 간장 및 된장에서도 많이 함유되어 있다고 하였다(Lee, 1973). 본 연구의 시료인 대두단백질가수분해반응물향의 아미노산 조성도 glutamic acid의 함량이 높게 나타났다. 각 단계 별 아미노산 조성을 분석한 결과로 <3kDa에서는 Asp/Asn조성이 상대적으로 높게 나타났다. FPLC 단계를 거친 활성이 가장 높은 RG2에서는 산성 및 친수성 아미노산들인 Asp/Asn의 함량이 감소된 반면, Glu/Gln의 함량은 두드러지게 증가하였다. HPLC단계에서는 전반적으로 Asp/Asn와 Glu/Gln의 함량은 두드러지게 증가하였고 활성이 가장 높았던 P3의 경우 His의 함량이 다소 증가함을 알 수 있었다. ACE저해물질이 peptide라는 것은 많은 연구결과에서 밝혀졌고, 이 peptide들의 C말단에는 tryptophan, phenylalanine, tyrosine, proline등, N말단에는 histidine을 비롯한 여러 방향족 아미노산들이 있으며, 이 peptide들은 ACE에 대해 angiotensin-I와 경쟁적으로 결합함으로써 ACE의 활성을 감소시키는 것으로 추정되고 있다(Kim et al., 1994; Cheung et al., 1980). Shin등(1995)은 ACE저해활성이 가장 높은 분획에서 아미노산 조성을 분석한 결과 염기성 아미노산인 histidine의 함량이 86.6%로 가장 높게 나타났다. 따라서 본 연구의 전반적인 아미노산 조성 분석 결과 대두단백질 가수분해반응향에 비하여 8.87배 정제된 최종 획분인 P3에서 염기성 아미노산인 histidine의 함량이 9.3%로 다소 증가한 것으로 보았을 때 본 시료가 나타내는 ACE저해활성이 시료의 주성분인 histidine과 깊은 관련을 가진다고 예측되었다(Table 52). 그러므로 본 연구 결과 대두단백질 가수분해반응향은 식품에서의 다양한 활용과 함께 항고혈압관련 건강기능성 물질의 개발을 위한 신소재로서의 활용 가능성이 높을 것이라 생각된다.

Table 52. Amino acid composition of Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from the active fraction

(Unit: %)

Amino acid	SPIH	<3kDa	G4	RG2	P1	P2	P3
Asp	13.8	51.1 (Asp+Asn)	24.7 (Asp+Asn)	4.4 (Asp+Asn)	77.4 (Asp+Asn)	72.3 (Asp+Asn)	62.7 (Asp+Asn)
Thr	3.8	2.7	2.1	1.5	1.6	1.6	1.5
Ser	6.2	3.5	4.2	2.2	2.1	2.8	2.0
Glu	21.4	9.9 (Glu+Gln)	19.5 (Glu+Gln)	58.3 (Glu+Gln)	5.3 (Glu+Gln)	6.5 (Glu+Gln)	1.6 (Glu+Gln)
Pro	5.4	3.2	1.8	6.6	0.9	1.8	3.1
Gly	4.2	3.6	5.0	3.9	2.1	2.7	3.2
Ala	4.6	5.6	6.0	3.4	2.8	1.9	2.1
Cys	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Val	3.2	3.1	6.5	4.3	1.2	1.5	2.0
Met	1.4	0.7	1.8	1.2	0.0	0.0	0.6
Ile	3.6	2.5	4.4	3.3	0.0	0.0	1.0
Leu	6.8	4.4	8.0	5.6	1.8	3.1	3.5
Tyr	2.0	1.0	1.8	0.0	0.5	0.7	1.8
Phe	4.8	3.2	3.6	2.4	0.8	2.0	2.6
His	2.4	1.1	2.1	1.3	0.5	0.0	9.3
Lys	6.4	1.7	3.6	1.2	1.5	0.8	1.9
NH3	1.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Arg	8.2	2.6	4.7	0.0	1.5	2.4	1.3
Total	100	100	100	100	100	100	100

다. 우수한 생리활성을 갖는 펩타이드 및 아미노산 가공적성 연구

1) 대두단백질가수분해반응향의 pH와 열처리에 따른 ACE 저해활성 변화

가) 대두단백질가수분해반응향의 pH에 따른 ACE활성 변화

기능성 펩타이드의 식품소재화에 있어서의 문제점은 정제과정에서의 수율 저하와 가공처리에 따른 단백질 변성에 의한 활성저하 등이다. 따라서 본 연구에서는 pH와 열처리에 따른 단백질의 변성이 ACE 저해활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 대두단백질가수분해반응향의 한외여과 fraction 중 활성이 우수한 3 kDa이하 시료를 pH 2.0, 3.0, 7.0, 10.0, 12.0 에서 변성을 유도한 후 ACE 저해활성을 측정하였다(Figure 52). pH가 산성에서 중성으로 변함에 따라 ACE 저해활성은 증가하였고 이후 알칼리성이 강해짐에 따라 다시 감소하는 경향을 보였다. 그러나 변성을 유도하지 않은 시료에 비해 pH에 따른 변성이 유도됨으로써 ACE 저해활성은 유의적($p < 0.05$)으로 증가되는 것을 알 수 있었다. 또한 pH 7에서 변성된 경우 1.31%/ug protein의 ACE 저해활성을 보여 유의적으로 산성이나 알칼리 환경보다는 중성에서 ACE 저해활성의 증가가 최대화됨을 알 수 있었다($p < 0.05$). 이와 같이 pH에 의한 변성에 의해 단백질 함량은 감소함에도 불구하고 ACE 저해활성이 증가하는 이유는 pH별로 용출되는 아미노산 및 펩타이드 종류의 차이, 활성 펩타이드의 등전점, 비단백 활성물질의 존재유무, 변성에 따른 펩타이드의 활성 및 구조변화 등으로 사료된다.

나) 대두단백질가수분해반응향의 열처리에 따른 ACE활성 변화

가장 높은 ACE 저해활성 변화를 나타낸 pH 7 환경에서 가열(30, 50, 70, 100°C에서 10분간)에 따른 변성을 유도한 후 ACE 저해 활성을 측정한 결과는 Figure 53과 같다. 가열에 따른 변성은 모든 온도구간에서 유의적인 차이를 보이지 않았다($p < 0.05$). 70°C에서 변성을 유도한 시료의 경우 0.55%/ug protein의 높은 ACE 저해활성을 보였으나 유의적인 차이는 없었다($p < 0.05$). 이는 본 연구에서 사용한 대두단백질가수분해반응향이 이미 80°C에서 진공 건조되는 과정에서 열에 민감한 부분은 변성이 완료되고 열에 강한 특성을 가진 활성 펩타이드만이 존재하기 때문으로 사료된다.

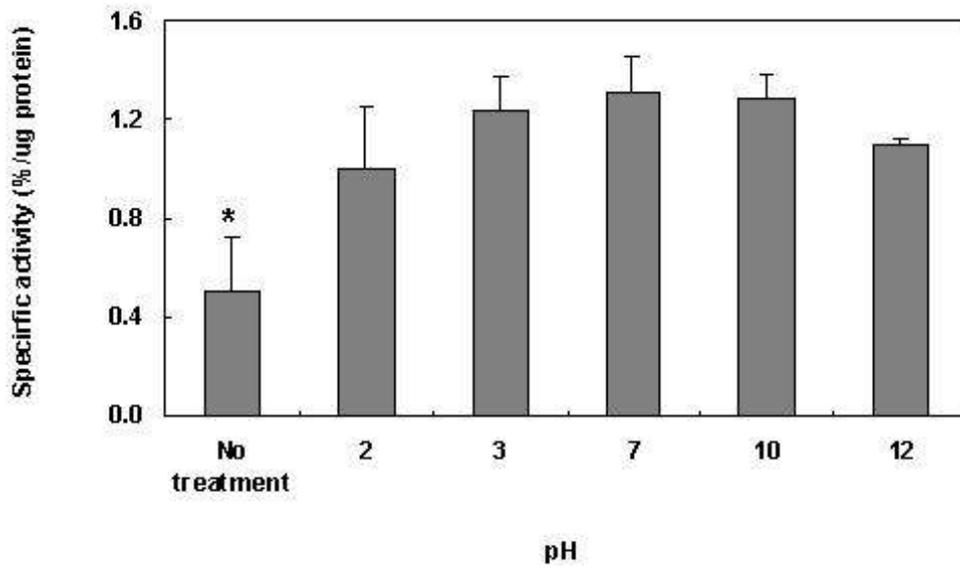


Figure 52. Effect of pH on the Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity.

Error bars indicates standard deviation of mean.

*No treatment means intact UF fraction (< 3 kDa) obtained from soy protein isolate hydrolysate (savory flavor) through ultrafiltration.

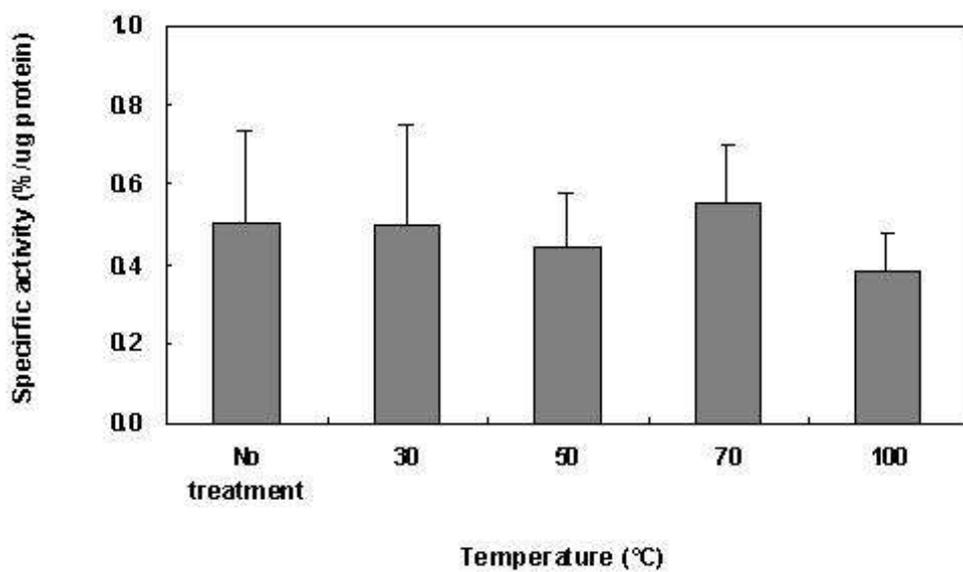


Figure 53. Effect of heating temperature on the Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity. Error bars indicates standard deviation of mean.

*No treatment means intact UF fraction (< 3 kDa) obtained from soy protein isolate hydrolysate (savory flavor) through ultrafiltration.

2) 대두단백질가수분해반응향의 pH와 열처리에 따른 수용성 용해도 지수 측정

대두단백질가수분해반응향의 pH 변화가 용해도에 영향을 미치는지 알아보기 위하여 대두단백질가수분해반응향의 한외여과 fraction 중 활성이 우수한 3 kDa 이하 시료를 pH 3, 7, 10에서 변성을 유도한 후 용해도변화를 측정한 결과는 Figure 54에 나타내었다. 각각의 pH에서 75.58%, 77.52%, 79.01%로 pH가 증가함에 따라 용해도가 조금씩 증가함을 보였으나 유의적인 차이는 없었다($p < 0.05$).

따라서 pH 7 환경에서 가열(30, 70, 100°C에서 10분간)에 따른 변성을 유도한 후 용해도변화를 측정한 결과는 Figure 55에 나타내었다. 각각의 온도구간에서 91%, 90%, 92%로 가열에 따른 변성은 모든 온도구간에서 유의적인 차이를 보이지 않았다($p < 0.05$).

이상과 같이 대두단백질가수분해반응향의 UF 활성분획인 분자량 3kDa이하 시료는 pH와 가열처리 등에 의하여 용해도 지수가 일정하게 유지됨을 알 수 있었다. 따라서 본 연구에서 분리한 ACE 저해활성 펩타이드는 우수한 생리활성뿐 아니라 안정된 가공적성 특성을 보임으로써 추후 기능성 식품 소재화로서의 가능성을 확인하였다.

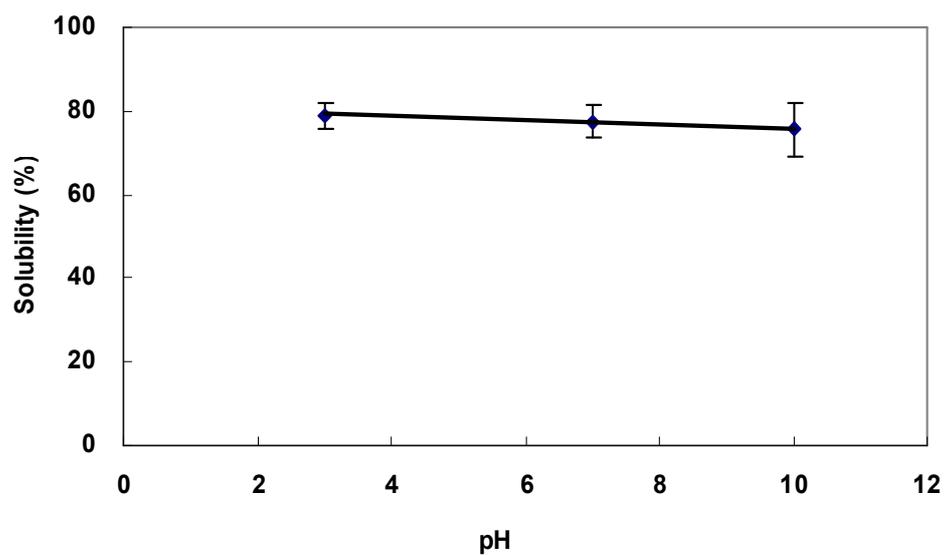


Figure 54. Solubility profiles of UF fraction (< 3 kDa) obtained from soy protein isolate hydrolysate (savory flavor) through ultrafiltration of pH. Error bars indicates standard deviation of mean.

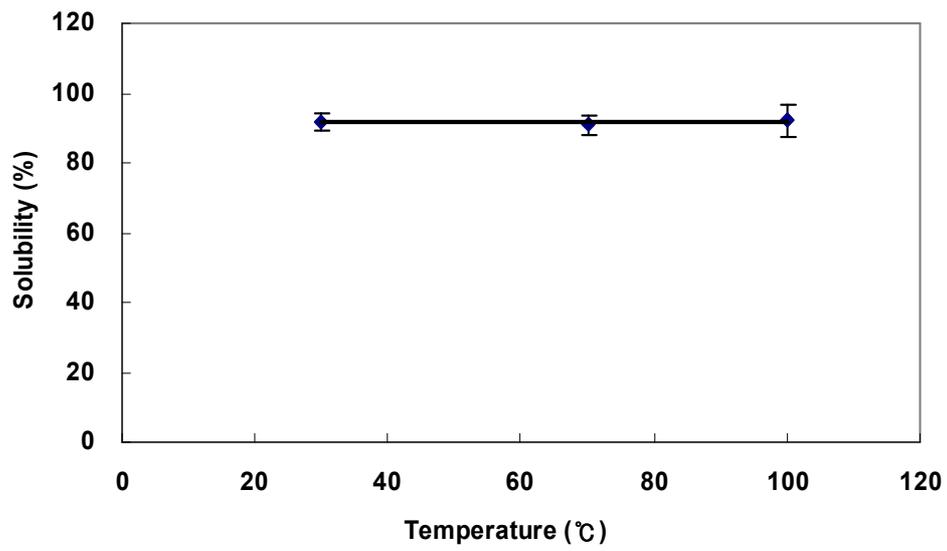


Figure 55. Solubility profiles of UF fraction (< 3 kDa) obtained from soy protein isolate hydrolysate (savory flavor) through ultrafiltration of Temperature. Error bars indicates standard deviation of mean.

제4장 목표달성도 및 관련 분야에의 기여도

주관연구기관에서는 반응향 기술을 이용하여 대두 단백질로부터 신개념 savory향 및 기능성 식품 개발 연구를 수행하였다. 대두 단백질 가수분해물을 이용하여 savory향 및 기능성 식품 개발 연구의 목표를 달성하였다. 상업용 효소를 이용하여 대두 단백질 가수분해물을 제조하고 각각의 효소에 따른 가수분해도를 TNBS 법을 이용하여 측정하였다. 6가지 상업용 효소(Flavourzyme, Protamex, Bromelain, Neutrase, Papain, Alcalase)를 시간에 따른 가수분해도를 측정하였고, 각각의 가수분해물의 쓴맛을 TDA 법을 이용하여 측정하여 효소선발을 이용하였다. 이 결과 Flavourzyme과 Protamex를 대두 단백질 분해효소로 선발하여 최적화 연구에 사용하였다. Savory향 생성 반응조건 최적화하기 위해 위의 연구를 통하여 선발된 Flavourzyme과 Protamex로부터 생산된 가수분해물 및 전구물질을 이용하여 반응표면분석법의 중심합성설계를 하고 이를 이용하여 반응표면분석을 실시하였다. 종속변수인 기호도 및 쓴맛에 영향을 미치는 변수간의 관계를 분석하였다. Regression equation을 이용하여 contour plot을 그려 각각의 독립변수의 영향을 분석하였다. Savory 향 생성의 최적조건은 종속변수에 따라 최적조건을 확인하였다. 기호도에 미치는 영향은 Flavourzyme을 사용한 경우는 DH, cysteine, glucose, thiamine의 순으로 나타났으며, 특히 DH와 cysteine이 기호도에 크게 영향을 미치는 인자로 생각되어 진다. Protamex의 경우는 cysteine, glucose, thiamine, DH 순으로 나타났으며, cysteine과 glucose 함량이 기호도에 큰 영향을 미치는 인자로 생각되어 진다. Flavourzyme으로 효소 처리한 가수분해물을 이용하여 향 제조 시 DH의 경우에는 대부분 DH가 10% 이하에서 최적의 기호도를 나타내었다. 또한 DH와 함께 큰 영향을 나타내는 cysteine의 함량은 2% 부근에서 가장 높은 기호도를 나타내었는데 DH와 cysteine의 함량의 변화를 이용하여 나타낸 contour plot을 확인해 보면 DH 7.2%, cysteine 1.8%에서 가장 높은 기호도를 나타내었다. 쓴맛의 강도에 미치는 영향은 Flavourzyme을 사용한 경우는 DH, glucose, cysteine, thiamine의 순으로 나타났다. 쓴맛의 경우는 기호도와는 달리 다른 독립변수에 비하여 DH가 큰 영향을 나타내는 것으로 확인되었다. 이는 Protamex의 경우에서도 마찬가지로 확인되었으며 Protamex의 경우 DH, cysteine, glucose, thiamine 순으로 나타났다. 그러나 Flavourzyme 처리와는 달리 cysteine 또한 쓴맛에 큰 영향을 나타냄을 확인 할 수 있었다. Protamex로 효소 처리한 가수분해물을 이용하여 향 제

조 시 가장 높은 영향을 나타내는 cysteine의 경우에는 2%에서 부근에서 최적의 기호도를 나타내었다. 그러나 2% 이상이거나 그 이하에서는 기호도가 크게 감소하는 경향을 보였다. Glucose 함량은 cysteine과 마찬가지로 coded level이 0(5%)에서 가장 높은 기호도를 나타내었으나 다른 범위에서는 기호도의 감소를 나타내었다. Cysteine과 glucose의 함량의 변화를 이용하여 나타낸 contour plot을 확인해 보면 cysteine 1.8%, glucose 4.5%에서 가장 높은 기호도를 나타내었다. 최적화된 대두 단백질가수분해반응물의 휘발성 성분을 SAFE를 이용하여 추출하고 GC-MS를 이용하여 분석한 결과 Protamex를 이용하여 제조된 savory 향에서는 81개, Flavourzyme을 이용한 경우 93개의 휘발성 성분이 동정되었다. 이 중 GC-O를 통하여 최적화된 대두단백질가수분해반응물의 특징적인 향기성분을 동정한 결과 methional(no. 22, potato-like)이 가장 큰 log₃FD 값을 나타내어 최적화된 대두단백질가수분해반응물에서 중요한 향기성분으로 확인되었으며, 이외에 , 2-methyl-3-furanthiol(no. 1, meat-like), diacetyl(no. 1, buttery), 2-ethyl-3,5 -dimethyl pyrazine(no. 49, nutty), phenylacetaldehyde(no. 42, floral)도 중요한 향기성분으로 확인되었다. 대두 단백질 가수분해물의 가수분해도 및 전구물질에 따른 향기성분의 변화를 분석하기 위하여 반응표면분석법을 사용하여, 종속변수인 methional, 2,4-dimethyl pyrazine, phenylacetaldehyde, 2-ethyl-3,5-dimethyl pyrazine의 생성에 미치는 영향을 확인하였다. Protamex의 경우 methional의 glucose 4.5~5.5%, cysteine 1.6~2.0%, DH 9~10%의 범위에서 최대의 함량을 나타내었다. 이외의 향기성분에서는 DH가 높을수록, glucose의 첨가량이 많을수록 생성되는 양이 증가하였으나 cysteine 함량은 coded level 0 부근에서 낮은 함량이 생성되는 것으로 확인 되었다. Flavourzyme으로 처리 시, 4가지 모든 향기성분에서 동일한 결과를 나타내었다. DH가 높을수록, glucose의 첨가량이 많을수록 생성되는 양이 증가하였으나 cysteine 함량은 coded level 0 부근에서 낮은 함량이 생성되는 것으로 확인 되었다. 음료 제조에 필요한 전구물질을 선정하기 위하여 대두단백질 가수분해물, glucose와 아미노산(glycine, lysine, proline, isoleucine, tyrosine, serine, alanine)을 이용하여 시료를 제조하였다. 관능검사를 통하여 향(flavor), 맛(taste), 전체적인 기호도를 다른 아미노산 첨가 시료의 비해 serine 및 glycine을 각각 첨가한 시료가 향, 맛, 전체적인 기호도의 선호도가 가장 높은 것으로 나타났다. SPI 가수분해물을 이용한 기능성 음료 제조를 최적화하기 위해 반응표면분석법을 이용하였다. 전체적인 기호도에서 serine을

사용한 시료에서는 serine과 glucose 함량이 증가할수록 맛에 대한 선호도도 증가하였으며, 특히 28% glucose를 첨가하였을 때 (coded level=0.8) serine의 함량이 증가할수록 맛에 대한 선호도도 크게 증가하였다. 또한 28% glucose 첨가 시 (coded level=0.8) 반응 3시간일 때 (coded level=0) 가장 높은 맛의 선호도를 나타내었다. 이는 serine 첨가 시 맛에 대한 선호도의 결과와 유사하며, 이러한 결과를 통해 serine의 전체적인 기호도는 맛에 대한 선호도에 많은 영향을 받는다고 생각되어 진다. Glycine으로 제조한 시료의 경우 10% 이상의 glucose 첨가량의 범위 (coded level=-1 이상)에서는 glycine 함량이 증가할수록 전체적인 기호도도 증가하였다. 또한 3시간 이하의 반응시간(coded level=0 이하)에서는 glucose 함량이 증가할수록 전체적인 기호도도 증가하였다. 천연과즙 농축액을 첨가하여 대두단백질 함유 기능성 음료를 제조하여 관능검사를 실시하였다. 향의 경우 자몽과 사과 농축액을 첨가한 시료의 선호도가 가장 좋았지만, 복숭아, 레몬 및 오렌지를 첨가한 시료와 매실 농축액을 첨가한 시료는 통계적으로 유의적 차이를 나타내지 않았다. 전체적인 기호도에서는 매실을 첨가한 시료를 제외하고 통계적으로는 유의적 차이는 나타나지 않았지만, 대추를 첨가한 시료가 높은 선호도를 나타내었다. 이것으로 보아 향을 제외한 맛이나 전체적인 기호도의 선호도는 대추를 첨가한 시료에서 높게 나타난 것으로 확인되었다. Flavourzyme과 Protamex를 사용하여 제조한 대두 단백질 가수분해물의 savory향 소재를 원우테크에서 제조되는 소고기 전골풍미제품에 소고기 향 대신 10% 대치하여 제품화 하여 관능검사를 실시하였다. 그 결과 단백질 가수분해물을 대치한 제품이 기존 제품에 비하여 높은 기호도를 나타내었으며, 대두 단백질 가수분해물 savory향 제품은 기존제품을 대신하여 savory향 소재로서의 가능성을 확인할 수 있었다.

제 2 협동과제는 효소 종류별, 가수분해도별에 따른 대두단백질 가수분해물의 생리활성(*in vitro*)조사하기 위하여 대두단백질 가수분해물의 ACE 저해능, 항암활성, 항산화 활성(TBA, Ferric, SOD유사활성)을 측정하였다. RSM을 이용하여 ACE 저해능에 대한 대두단백질가수분해반응향의 제조조건을 최적화한 결과, Protamax로 가수분해한 대두단백질가수분해반응향의 최적조건으로 X_1 (DH): 2.22(%), X_2 (Glucose): 6.66(%), X_3 (Cystein): 1.35(%), X_4 (Thiamin): 1.15(%)의 조건에서 시료를 제조하였다. 최적조건에서 제조된 대두단백질 가수분해반응향의 여러 생리활성을 탐색한 결과, ACE 저해능 52.25%와 SOD 유사활성 47.56%를 나타내었고, TBA와 Ferric thiocyanate은 활성이 나타나지 않았다. 따라서 이 후 대

두단백질가수분해반응물(savory향)로부터 ACE 저해 peptide를 분리 및 정제하였다. 최적화된 대두단백질 가수분해반응향으로부터 단계별로 분획한 fraction(분획전, <3kDa, G4, RG2, P3)별의 ACE 저해활성물질을 분리한 결과, 0.53, 0.61, 0.79, 1.15과 4.69%/ug protein을 나타내었다. 따라서 대두단백질 가수분해반응향(0.53)의 활성에 비해 RP-HPLC에서 얻은 P3(4.69)의 경우 8.87배 정도 정제되었음을 알 수 있었다. 최종획분에 대한 구조동정을 시도하였으나 단일서열 구조 분석이 불가하여 분획별 아미노산 조성 변화로 분석 대체하였다. 대두단백질가수분해반응향의 아미노산 조성을 분석한 결과 Histidin이 항고혈압관련 물질로 밝혀졌으며, 대두단백질 가수분해반응향은 식품에서의 다양한 활용과 함께 항고혈압관련 건강기능성 물질의 개발을 위한 신소재로서의 활용 가능성이 높을 것이라 예측하였다. 대두단백질가수분해 반응물향의 pH와 온도에 따른 ACE 저해활성 변화 및 용해도 지수 조사한 결과 pH 7에서 변성된 경우 1.31%/ug protein의 가장 높은 ACE 저해활성을 보여 유의적으로 산성이나 알칼리 환경보다는 중성에서 ACE 저해활성의 증가가 최대화됨을 알 수 있었고($p < 0.05$), 가열에 따른 ACE 저해활성 변화와 용해도 지수는 모든 온도구간에서 유의적인 차이($p < 0.05$)를 보이지 않음으로 써 안정된 가공특성을 보임을 확인하였다.

제5장 연구개발결과의 활용계획

- 대두 단백질 가수분해물을 이용한 기능성 가공식품소재로서 개발
 - Savory 향 소재로서 이용
 1. 스낵용 조미료에 이용 : 독특한 Savory 향을 이용하여 분말 조미료에 원료로서 사용할 경우 기능성 및 기호도를 나타낼 수 있는 새로운 스낵의 개발이 가능
 2. 인스턴트 제품에 savory 향의 원료 소재로서 이용 : Beef-free한 새로운 인스턴트 제품의 향 소재로서 개발이 가능
 3. 기타 외식업체 양념으로 시장개척 및 활용 가능
 4. 가공공정 개선에 따른 신제품 개발 : 기능성이 부가된 새로운 형태의 식품조미료 개발, 타제품에 일정 함량을 대체한 향료 개발

- 건강 기능성 가공식품의 소재로 활용
 - 건강 기능성 음료 개발
 1. 반응향 기술을 이용한 건강 기능성 음료 개발
 2. 천연 과즙 농축액을 첨가하여 다양한 맛을 나타내는 건강 기능성 음료 개발 : 다양한 맛을 통해 소비자 기호도를 만족시킬 수 있는 음료 개발
 - 기능성 헬스 보조제로서 이용

- 영양강화 식품 및 의약품소재로 활용

제6장 참고문헌

Adler-Nissen J. Enzymatic hydrolysis of food proteins. New York: Elsevier Applied Science Publishers (1986)

AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC Intl. 15th ed.; Kenneth, H., Ed.; Chapter 11. pp. 1-31. Association of Official Analysis Chemists, Washington, DC, USA (1990)

Aoyama T, Fukui K, Takamatsu K, Hashimoto Y, Yamamoto T. Soy protein isolate and its hydrolysate reduce body fat of dietary obese rats and genetically obese mice (Yellow KK). *Nutrition* 16: 349-354 (2000)

Archer MC, Ragnarsson JO, Tannenaum SR, Wang DIC. Enzymatic solubilization of an insoluble substrate, fish protein concentrate: Process kinetic considerations. *Biotechnol Bioeng* 15: 181-196 (1973)

Astawan M, Wahyuni M, Yasuhara T, Yamada K, Tadokoro T, Maekawa A. Effects of angiotensin I-converting enzyme inhibitory substances derived from Indonesian dried-salted fish on blood pressure of rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59(3): 425-429 (1995)

Baek HH, Cadwallader KR. 1995. Enzymatic hydrolysis of crayfish processing by-products. *J Food Sci* 60: 929-935.

Bakhit RM, Klein BP, Essex-Sorlie D, Ham JO, Erdman JW, Potter SM. Intake of 25g of soybean protein with or without soybean fiber alters plasma lipids in men with elevated cholesterol concentrations. *J Nutr* 124: 213-222 (1994)

Bolton, T.A., Reineccius, G.A., Liardon, R. and Ba, T.H. Role of cysteine in the formation of 2-methyl-3-furanthiol in a thiamin-cysteine model reaction, pp. 270-278. In: *Thermally Generated Flavors: Maillard*,

- Microwave, and Extrusion Processes. Parliment, T.H., Morello, M.J. and McGorin, R.J. (eds.). American Chemical Society, Washington, DC, USA (1994)
- Borneo R, Khan K. Protein changes during various stages of breadmaking of four spring wheats: Quantification by size-exclusion HPLC. *Cereal Chem.* 76(5): 711-717 (1999)
- Byun HG, Kim SK. Purification and chracterization of angiotensin I convertign enzyme ACE) inhibitory peptides from Alaska pollack (Theragra chalcogramma) skin. *Proc. Biochem.* 36: 1155-1162 (2001)
- Cheung HS., Wang FL., Ondetti MA., Sabo EF., and Cushman DW. Binding of peptides substrates and inhibitors of angiotensin converting enzyme. *J. Biol. Chem.* 255(2): 401 (1980)
- Chiang WD, Shin CJ, Chu YH. Optimization of acid hydrolysis conditions for total isoflavones analysis in soybean hypocotyls by using RSM. *Food Chemistry.* 72: 499-503(2001)
- Cho HY, Ahn CB. Production and characteristics of protein hydrolysate from sharp toothed eel (*Muraenesox cinereus*). *J Korean Fish Soc* 35: 97-104 (2002)
- Cho MJ, Unklebay N, Hsieh FH, Clarke AD. Hydrophobicity of bitter peptides from soy protein hydrolysates. *J Agric Food Chem* 52: 5895-5901 (2004)
- Constantinides A, Adu-Amankwa B. Enzymatic modification of vegetable protein: mechanisms, kinetics, and production of soluble and partially soluble protein in batch reactor. *Biotechnol Bioeng* 23: 1543-1565 (1980)
- Cushman DW, Cheung HS. Spectrophotmetric assay and properties of the

- angiotensin I-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol.* 20: 1637–1648 (1971)
- Czepa A, Hofmann T. Structural and sensory characterization of compounds contributing to the bitter off-taste of carrots (*Daucus carota* L.) and carrot puree. *J Agric Food Chem* 51: 3865–3878 (2003)
- Farmer LJ, Mottram DS, Whitfield FB. Volatile compounds produced in Maillard reactions involving cysteine, ribose and phospholipid. *J. Sci. Food Agric.* 49: 347–368 (1989)
- Frank O, Ottinger H, Hofmann T. Characterization of an intense bitter-tasting 1H,4H-Quinolizinium-7-olate by application of the taste dilution analysis, a novel bioassay for the screening and identification of taste-active compounds in foods. *J Agric Food Chem* 49: 231–238 (2001)
- Gibbs BF, Alexandre Z, Robert M, Catherine M. Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. *Food Res. Intern.* 37: 123–131 (2004)
- Grosch, W. and Zeiler-Hilgart, G. Formation of meatlike flavor compounds, pp. 183–192. In: *Flavor Precursors: Thermal and Enzymatic Conversions*. Teranishi, R., Takeoka, G.R. and GIntert, M. (eds.). American Chemical Society, Washington, DC, USA (1992)
- Grosch W. Detection of potent odorants in foods by aroma extract dilution analysis. *Trends Food Sci Technol* 4: 68–73 (1993)
- Guerad F, Guimas L, Binet A. Production of tuna waste hydrolysates by commercial neutral protease preparation. *J Mol Catal B Enzymol* 19: 489–98 (2002)
- Hofmann T. Characterization of the most intense colored compounds from

- Maillard reactions of pentoses by application of color dilution analysis. *Carbohydr Res* 313: 203–213 (1998)
- Hofmann, T. and Schiberle, P. Evaluation of the key odorants in a thermally treated solution of ribose and cysteine by aroma extract dilution techniques. *J. Agric. Food Chem.* 43: 2187–2194 (1995)
- Iritani N, Hosomi H, Fukuda H, Tada K, Ikeda H. Soybean protein suppresses hepatic lipogenic enzyme gene expression in wistar fatty rats. *J Nutr* 126: 380–388 (1996)
- Jang A, Lee M. Purification and identification of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from beef hydrolysates. *Meat Sci.* 69: 653–661 (2005)
- Johnson EA, Vickers Z. The effectiveness of palate cleansing strategies for evaluating the bitterness of caffeine in cream cheese. *Food Qual Prefer* 15: 311–316 (2004)
- Jung S, Murphy PA, Johnson LA. Physicochemical and functional properties of soy protein substrates modified by low levels of protease hydrolysis. *J Food Sci* 70: 180–187 (2005)
- Kang YJ. Enzymatic modification of soy proteins: Effects of functional properties of soy isolate upon proteolytic hydrolysis. *Korean J Food Sci Technol* 16: 211–217 (1984)
- Karen B, Henry PR, Slusardhyk DS. Muracein–muramyl peptides produced by *Nocardia orientalis* angiotensin converting enzyme inhibitors. *J. Antibiotics* 37: 330 (1984)
- Kim CH, Kim MR, Lee CH. Effect of type of enzyme on the bitterness of partial hydrolyzates of soybean protein. *Food Biotech* 1: 79–84 (1992)

- Kim CH, Kim MR, Lee CH. The bitterness of the enzymatic hydrolysate of soybean protein and the amino acid composition of the UF filtrate. *Food Biotech* 6: 244–249 (1997)
- Kim DH, Kim SH. Biochemical characteristics of whole soybean cereals fermented with *Mucor* and *Rhizopus* strains. *Korean. J. Food Technol.* 31: 176–182 (1999)
- Kim SH, Lee YJ, Kwon DY. Isolation of angiotensin converting enzyme inhibitor form doenjang. *Korean. J. Food Sci. Technol.* 31: 848–854 (1999)
- Ko SN, Nam HS, Kim WJ. Development of meat-like flavor by Maillard reaction with addition of natural flavoring materials. *Korean J. Food Sci. Technol.* 29: 839–846 (1997)
- Ko SN, Yoon SH, Yoon SK, Kim WJ. Development of meat-like flavor by Maillard reaction of model system with amino acids and sugars. *Korean J. Food Sci. Technol.* 29: 827–838 (1997)
- Kukman IL, Zelenik M, Abram V. Bitterness intensity of soybean protein hydrolyzates. *Z Lebensm Unters Forsch* 203: 272–276 (1996)
- Lee JR, Kwon DY, Shin HK, Yang CB. Purification and identification of angiotensin-I converting enzyme inhibitory ptpeide from kidney bean protein hydrolyzate. *Food Sci. Biotechnol.* 8: 172–176 (1999)
- Lim SJ. A sensory evaluation of the bitter compounds from *Ixeris dentate* Nakai. *Korean J Soc Food Sci* 12: 115–121 (1996)
- Linder M, Fanni J, Parmentier M. Functional properties of veal bone hydrolysates. *J Food Sci* 61: 712–720 (1996)
- Lin LJ. Regulatory status of Maillard reaction flavors, pp. 7–15. In:

Thermally Generated Flavors: Maillard, Microwave, and Extrusion Processes. Parliment TH, Morello MJ, McGorin RJ. (eds.). American Chemical Society, Washington, DC, USA (1994)

Lopez R, Mateo-Vivaracho L, Cacho J, Ferreira V. Optimization and validation of a taste dilution analysis to characterize wine taste. *J Food Sci* 72: 345–351 (2007)

MacLeod, G. The scientific and technological basis of meat flavors, pp. 191–223. In: *Developments in Food Flavors*. Birch, G.G. and Lindley, M.G. (eds.). Elsevier Applied Science, London, UK (1986)

Manley CH. Process flavors, pp. 139–154. In: *Source Book of Flavor*. Reineccius, G.R. (ed.). Chapman and Hill, New York, NY, USA (1994)

Manley CH, Ahmedi S. The development of process flavors. *Trends Food Sci. Technol.* 6: 46–51 (1995)

Mannheim A, Cheryan M. Continuous hydrolysis of milk protein in a membrane reactor. *J Food Sci* 55: 381–385 (1990)

Markhund S, Markhund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallo and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 47: 469–474 (1974)

Matoba T, Hata H. Relationship between bitterness of peptides and their chemical structures. *Agric Biol Chem* 36: 1423–1431 (1972)

Messina MJ, Persky V, Setchell KD, Barnes S. Soy intake and cancer risk. *Nutr Cancer* 21: 113–131 (1994)

Mitsuda H, Yasumoto K, Iwami K. Antioxidative action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid. *Eiyo Shokuryo.* 19:

210–214(1966)

Mottram DS, Edwards RA. The role of triglycerides and phospholipids in the aroma of cooked beef. *J. Sci. Food Agric.* 34: 517–522 (1983)

Myers RH. *Response Surface Methodology*. Allyn and Bacon Inc., Boston, USA (1971)

Mouquet C, Dumas JC, Guilbert S. Texturization of sweetened mango pulp: optimization using response surface methodology. *J. Food Sci.* 57: 1395–1400 (1992)

Nagodawithana, T.W. *Savory Flavors*. pp. 164–224. Esteekay Associate, Inc., Milwaukee, WI, USA (1995)

Netto FM, Galeazzi MAM. Production and characterization of enzymatic hydrolysate from soy protein isolate. *Lebensm Wiss Technol* 31: 624–631 (1998)

Ney KH. Prediction of bitterness of peptides from their amino acid composition. *Z Lebensm Unters Forsch* 147: 64–68 (1971)

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95: 351–358 (1979)

Osawa T, Namiki M. A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of Eucalyptus leaves. *Agric. Biol. Chem.* 45(3): 735–739(1981)

Ottinger H, Bareth A, Hofmann T. Characterization of natural "cooling" compounds formed from glucose and L-proline in dark malt by application of taste dilution analysis. *J Agric Food Chem* 49: 1336–1344 (2001)

Ottinger H, Soldo T, Hofmann T. Discovery and structure determination of a

novel Maillard-derived sweetness enhancer by application of the comparative taste dilution analysis (cTDA). *J Agric Food Chem* 51: 1035–1041 (2003)

Park JR, Choi SH. Effects of sulfur-containing amino acids on lipid metabolism in rats. *Korean. J. Soc. Food Nutr.* 24(6): 978–983 (1995)

Park, NY, Kwon JH, Kim HK, Optimization of extraction conditions for ethanol extracts from *Chrysanthemum morifolium* by response surface methodology. *Korean J. Food Sci. Technol.* 30: 1189–1196 (1998)

Saha BC, Hayashi K. Debittering of protein hydrolyzates. *Biotech Adv* 19: 355–370 (2001)

SAS Institute, Inc. SAS User's Guide. Statistical Analysis Systems Institute, Cary, NC, USA (1990)

Shin, JH, Rheem S, Seo JK, Lee SK, Shim JH, Kim SK, Baek YJ. Optimization minimum degradation condition of red pigments in red bell pepper (*Capsicum annuum* L.) using response surface methodology. *Food Sci. Biotechnol.* 8: 351–356 (1999)

Shin ZI, Ahn CH, Nam HS, Lee HJ, Lee HJ, Moon TH. Fractionation of angiotensin converting enzyme(ACE) inhibitory peptides from soybean paste. *Korean. J. Food Technol.* 27 (2): 230–234 (1995)

Shu CK, Hagedorn ML, Ho CT. Two novel thiophenes identified from the reaction between cysteine and 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone. *J. Agric. Food Chem.* 34: 344–346 (1985)

- Shu CK, Ho CT. Parameter effects on the thermal reaction of cystine and 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone, pp. 229-241. In: Thermal Generation of Aromas. Parliment, T.H., McGorin, R.J. and Ho, C.T. (eds.). ACS Symposium Series 409, American Chemical Society, Washington, DC, USA (1989)
- Shu CK, Mookherjee BD, Ho CT. Volatile components of the thermal degradation of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone. J. Agric. Food Chem. 33: 446-448 (1985)
- Singh TK, Young ND, Drake M, Cadwallader KR. 2005. Production and sensory characterization of bitter peptide from β -casein. J Agric Food Chem. 53: 1185-1189.
- Sung MJ, Park YS, Chang, HG. Quality characteristics of sponge cake supplemented with soy protein concentrate. Food Sci Biotechnol. 15: 860-865 (2006)
- Swaine, Jr. R.L. Hydrolyzed vegetable protein as a flavoring agent. Perfumer Flavorist 18: 35-38 (1993)
- Tilgner DJ. Dilution tests for odor and flavor analysis. Food Technol 16: 26-29 (1962)
- Tilgner DJ. Flavor dilution profilograms. Food Technol 19: 25-29 (1965)
- Tonsbeek CHT, Plancken AJ, Van de Weerdhof T. Components contributing to beef flavor. Isolation of 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone and its 2,5-dimethyl homolog from beef broth. J. Agric. Food Chem. 16: 1016-1021 (1968)

- Tsumura K, Saito T, Tsuge K, Ashida H, Kugimiya W, Inouye K. Functional properties of soy protein hydrolysates obtained by selective proteolysis. *Lebensm Wiss Technol* 38: 255–261 (2005)
- Whitfield FB, Mottram DS, Brock S, Puckey DJ, Salter LJ. Effect of phospholipid on the formation of volatile heterocyclic compounds in heated aqueous solutions of amino acids and ribose. *J. Sci. Food Agric.* 42: 261–272 (1988)
- Wu YF, Baek HH, Cadwallader KR. Development of a meat-like process flavoring from soybean-based enzyme-hydrolyzed vegetable protein (E-HVP). *J. Food Sci.* 65: 1220–1227 (2000)
- Yeum DM. Functional properties of food protein hydrolysate by protease. PhD thesis, Pukyong National University, Busan, Korea (1991)
- Yu RN, Park SA, Chung DK, Nam HS, Shin ZI. Effect of soybean hydrolysate on hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Korean J. Soc. Food Sci. Nutr.* 25: 1031–1036 (1996)
- 김선봉, 이태기, 박영범, 염동민, 김외경, 도정룡, 박영호. 멸치육 단백질 가수분해물로부터 angiotensin-I 전환효소 저해제의 분리 및 그 특성. *한국수산학회지.* 27(1): 1 (1994)
- 이기동, 이정은, 권중호. 식품공업에서 반응 표면분석의 응용. *식품과학과 산업.* 33(1): 33–45

제7장 부록



Appendix 1. Soy peptide-containing functional beverage.



Appendix 2. Soy peptide-containing functional beverage using jujube extract.



Appendix 3. Soy peptide-containing savory flavor.



Appendix 4. Soy peptide-containing savory flavor product.

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.