

11-15430
00-00219
6-01

발간등록번호

11-1543000-002196-01

농·축 부산물 활용을 위한 산업연미

소재 개발 및 산업화 최종보고서

2018

농림축산식품부

고부가가치식품기술개발사업 R&D Report

농·축 부산물을 활용한 산업용 염미소재 개발 및 산업화 최종보고서

2018. 04. 06.

주관연구기관 / (주)케이엠에프
협동연구기관 / 계명대학교
협동연구기관 / 한국식품연구원

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “농·축 부산물을 활용한 산업용 엽미소재 개발 및 산업화” (개발기간 : 2016. 07. 07. ~ 2017. 12. 31.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017. 12. 31.

주관연구기관명	:	(주)케이엠에프	정용진	(인)
협동연구기관명	:	계명대학교	권택규	(인)
협동연구기관명	:	한국식품연구원	류미라	(인)
참여기관명	:	알알이식품	허재필	(인)
참여기관명	:	(주)큐비엠	전병엽	(인)
참여기관명	:	(주)모아	최경숙	(인)
참여기관명	:	태경농산(주)	전남배	(인)

주관연구책임자 : 정용진
협동연구책임자 : 권택규
협동연구책임자 : 류미라
참여기관책임자 : 허재필
참여기관책임자 : 전병엽
참여기관책임자 : 최경숙
참여기관책임자 : 전남배

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의
합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	316053-02	해 당 단 계 연구 기 간	2016.07.07. - 2017.12.31	단 계 구 분	2차년/ 2차년
연구사업명	단 위 사 업	농림축산식품부			
	사 업 명	고부가가치식품기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	농·축 부산물을 활용한 산업용 엽미소재 개발 및 산업화			
	세 부 과 제 명	○ 1세부과제 : 농·축부산물을 활용한 산업용 엽미소재 개발 및 산업화 ○ 1협동과제 : 엽미성 펩타이드 분리 및 분석법 개발 ○ 2협동과제 : 미각수용체를 이용한 엽미성 펩타이드의 효능 평가			
연구책임자	정용진	해당단계 참 여 연구원 수	총: 21 명 내부: 10 명 외부: 11 명	해당단계 연구 개발 비	정부:300,000천원 민간:100,000천원 계:400,000천원
		총 연구기간 참 여 연구원 수	총: 21 명 내부: 10 명 외부: 11 명	총 연구개발비	정부:510,000천원 민간:170,000천원 계:680,000천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)케이엠에프 계명대학교 한국식품연구원			참여기업명 알알이식품 (주)큐비엠 (주)모아 태경농산(주)	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	
<input type="checkbox"/> 1세부과제 : 농·축부산물을 활용한 산업용 엽미소재 개발 및 산업화 - 관능평가 및 품질 특성분석을 통한 가수분해물의 최적 배합비의 선정 - 최적 가수분해물의 생산조건 설정 : 제조공정별 품질평가 및 표준화 지표 설정 - 엽미성 펩타이드 조성물 홍보 : 식품 및 첨가물 국내외 박람회 참가로 제품 홍보 - 최적 조성물의 안전성 평가 설치류 대상 1회 단일 투여 독성 평가 완료 - 엽미 증강 펩타이드 활용 제품 개발 및 특허 출원 <input type="checkbox"/> 1협동과제 : 엽미성 펩타이드 분리 및 분석법 개발 - 엽미성 펩타이드의 데이터 베이스 구축 : Nanosep을 이용하여 펩타이드 분리완료 - 엽미성 펩타이드 분석법 개발 : Benzyl bromid 이용하여 분리능 개선 확인 및TLC, LC-MS/MS를 이용한 지표 성분 분석 및 밸리데이션 완료 <input type="checkbox"/> 2협동과제 : 미각수용체를 이용한 엽미성 펩타이드의 효능 평가 - 산성 펩타이드로 유발되는 pH 변화 효과 배제를 위한 assay 조건 최적화 - 엽미성 펩타이드의 맛 수용체 활성화 작용 평가 : TRPV1, CaSR 수용체 작용제로서의 효능 평가 완료 - 지미성 펩타이드에 대한 맛 수용체 활성화 작용 평가 : TRPV1, CaSR 수용체 작용제로서의 효능 평가 완료 - 맛 수용체 발현 세포모델에서의 활성 펩타이드의 작용 평가 : 펩타이드의 TRPV1, CaSR 맛 수용체맛 수용체 활성화 작용 평가 - 엽미성 펩타이드의 맛 상승 메카니즘 도출 :활성 펩타이드의 미각수용체 작용 모델 제시 <input type="checkbox"/> 연구결과 - 특허출원 1건, 기술실시 2건, 기술료 20,000,000원, 제품화 12건, 논문(SCI) 4건, 논문(비SCI) 2건, 학술발표 2건, 고용창출 5건, 홍보전시 15건 완료				보고서 면수 175 면	

국문 요약문

		코드번호	D-01			
연구의 목적 및 내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 천연 염미성 펩타이드를 활용한 염미대체기술 확보 ○ 염미성 펩타이드의 기능 평가 및 염미 발현 메커니즘 구명 ○ 천연 염미성 펩타이드 소재 대량 생산 기술 개발 ○ 품질 및 경제성 있는 천연 염미증진 조성물의 개발 ○ 전통·가공식품용 염미제품 개발 및 상품화 ○ 국민 염미섭취 감소에 기여 					
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 농·축산 부산물유래 천연 염미성 펩타이드 소재 및 유효조합물의 선정 <ul style="list-style-type: none"> - 부산물 유래 가수분해물의 라이브러리 구축 - 부산물 유래 가수분해물의 관능평가 - 부산물 유래 가수분해물의 암모니아태 질소 함량 분석 - 경제성 평가를 통한 최적 조합물 선정 ○ 농·축산 부산물유래 천연 염미성 펩타이드의 분리 및 동정 <ul style="list-style-type: none"> - 최적 조합물에서의 염미성 펩타이드 분리 및 동정 - 최적 조합물에서의 펩타이드 함량 분석법 개발 - 최적 조합물에서의 펩타이드 및 아미노산 함량 평가 - 염미성 펩타이드의 합성 기술 확보 ○ 천연 염미성 펩타이드의 미각수용체 세포모델에서의 효능 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 염미성 및 지미성 펩타이드의 맛 수용체 작용 평가 - 맛 수용체 발현 세포 모델을 이용한 활성 펩타이드의 효능 평가 - 활성 펩타이드의 맛 수용체 내 염미증강 주요 메커니즘 구명 - 활성 펩타이드의 미각수용체 작용 모델 및 활용방안 제시 ○ 염미 펩타이드의 안전성평가 <ul style="list-style-type: none"> - 염미성 펩타이드의 최대 일일 허용량 (LD50 값) 평가 ○ 천연 염미 펩타이드 소재 생산 최적화 <ul style="list-style-type: none"> - Lab Scale에서 생산공정 최적화 - Mass Scale에서 생산공정 표준화 - 제조공정 단계별 물리적, 미생물학적 및 화학적 품질기준 설정 ○ 저염 전통 제품 및 일반가공식품의 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 경제성 있는 염미대체체 첨가량 설정 및 생산 공정 개발 - 저염 제품의 관능 평가 ○ 완제품(저염미제)의 시제품 적용연구를 통한 산업화 <ul style="list-style-type: none"> - 저염 장류/김치/소금/시즈닝/HMR의 시생산을 통한 물리적, 미생물학적 및 화학적 품질기준 평가 - 가공 제품의 특성에 따른 정성 평가 및 산업화를 위한 총괄 경제성 분석 - 박람회 등 참가로 저염 제품 홍보 <p><개발성과></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ (기술평가 지표) 특허 출원 1건 이상, 저염화 기술 이전 2건 이상 ○ (제품 지표) 20% 이상 저염 제품 출시 12건 ○ (산업 지표) 신규 채용 창출 5명, 매출 2천만 ○ (연구기반 지표) SCI(E) 4편 제출, KCI급 2편 제출 ○ (홍보지표) 홍보전시 15건 					
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 활성 펩타이드의 맛 수용체 작용 구명으로 과학적 근거 확보 ○ 염미성 펩타이드 품질 균일성 확보로 글로벌 시장 개척 ○ 전통장류업체로의 저염제품 개발 기술 지도 및 기술 이전 ○ 김치업체로의 저염제품 개발 기술 지도 및 학교 급식 등으로 섭취 유도 ○ 박람회 참가로 저염 제품 및 기술 홍보 ○ 저염 기술개발로 식품업체의 기술적 진보에 기여 ○ 염 섭취 감소로 국민 건강 개선에 기여 					
중심어 (5개 이내)	농·축산부산물 Byproduct	염미성 펩타이드 Salty peptides	저염 Low salt	맛수용체 taste receptor	대량생산 Mass scale production	

〈 SUMMARY 〉

	코드번호	D-02
Purpose& Contents	<ul style="list-style-type: none"> ○ Acquired alternative technology using natural salt peptide ○ Functional evaluation of saline peptides and mechanism of salt expression ○ Mass production technology of natural salt peptide ○ Development of quality and economical natural saltiness enhancing composition ○ Development and commodification of salted products for traditional and processed foods ○ Contribution to reduction of consumption of national salt 	
Results	<ul style="list-style-type: none"> ○ Selection of natural salt-derived peptide material and effective combination derived from agricultural and livestock byproducts <ul style="list-style-type: none"> - Library construction of hydrolysates derived from byproducts - Sensory evaluation of hydrolysates derived from byproducts - Analysis of Ammonia Nitrogen Content of Hydrolysates Derived from Byproducts - Selection of optimal combination through economic evaluation ○ Isolation and identification of natural salt-derived peptides derived from agricultural and livestock by-products <ul style="list-style-type: none"> - Isolation and identification of saline peptides in the optimal combination - Development of assay method for peptide content in optimal combination - Assessment of peptide and amino acid content in the optimal combination - Acquisition of synthesis technology of saltous peptide ○ Assessment of efficacy in taste receptor cell model of natural salt peptide <ul style="list-style-type: none"> - Assessment of taste receptor action of saline and lipid peptides - Evaluation of efficacy of active peptides using taste receptor expression cell model - Main Mechanism of Increasing Salinity in Taste Receptors of Active Peptides - Model of taste receptor activity of active peptide ○ Safety assessment of salt peptides <ul style="list-style-type: none"> - Assessment of maximal daily tolerance (LD50 value) of saline peptides ○ Optimization of natural salt production of peptide material <ul style="list-style-type: none"> - Optimize production process in Lab Scale - Standardize production process in Mass Scale - Establishment of physical, microbiological and chemical quality criteria by manufacturing process step ○ Development of low-salt traditional products and general processed foods <ul style="list-style-type: none"> - Establishment of economical substitution of salt substitute and development of production process - Sensory evaluation of low salt product ○ Industrialization through study of prototype product of finished product (low-salt product) <ul style="list-style-type: none"> - Assessment of physical, microbiological and chemical quality standards through the production of low-salt flour / kimchi / salt / seasoning / HMR - Overall economic analysis for qualitative evaluation and industrialization according to the characteristics of processed products - Promoting low-salt products by participating in exhibitions <p><Development performance></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ (Technology evaluation index) More than one patent application, more than 2 cases of low chlorination technology transfer ○ (Product indicator) 20% or more low-salt product launch 12 ○ (Industrial Indicators) 5 new recruiters, 20 million sales ○ (Research-based index) Submission of 4 SCI (E) and 2 submission of KCI ○ (publicity index) Publicity exhibition 15 cases 	
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> ○ Scientific evidence for active receptor peptide action ○ Pioneering the global market by securing uniformity of salt quality peptides ○ Technical guidance and technology transfer of low salt product development to traditional confectionery companies ○ Guidance on the development of low-salt products as a kimchi company and induction of ingestion through school meals ○ Participate in exhibitions to promote low-salt products and technology ○ Contribution to technological progress of food industry by development of low salt technology ○ Contribution to national health improvement by reduction of salt intake 	
Keywords	Byproduct	Salty peptides
	Low salt	Taste receptor
		Mass scale production

CONTENTS

1. Outline of R&D project	1
2. Status of domestic and overseas technology development	4
3. 1st year Research content and results	16
4. 2st year Research content and results	73
5. R&D achievements	152
6. Achievement of goal and contribution to related field	161
7. Plan to use research results	164
8. Overseas Science and Technology Information	166
9. Security rating of R&D achievement	167
10. Research facilities registered in the National Science and Technology Comprehensive Information System.	168
11. Implementation of safety measures in laboratories based on R&D tasks	169
12. Representative Research Results of R&D Projects	171
13. Etc	172
14. references	173

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	1
2. 국내·외 기술개발 현황	4
3. 1차년도 연구수행 내용 및 결과	16
4. 2차년도 연구수행 내용 및 결과	73
5. 연구개발성과	152
6. 목표달성도 및 관련분야 기여도	161
7. 연구결과의 활용계획	164
8. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	166
9. 연구개발결과의 보안등급	167
10. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	168
11. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	169
12. 연구개발과제의 대표적 연구실적	171
13. 기타사항	172
14. 참고문헌	173

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치 식품개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치 식품 개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.

제1장. 연구개발과제의 개요

제1절. 연구개발 목적

- 천연 염미성 펩타이드를 활용한 염미대체기술 확보
- 염미성 펩타이드의 기능 평가 및 염미 발현 메커니즘 구명
- 천연 염미성 펩타이드 소재 대량 생산 기술 개발
- 품질 및 경제성 있는 천연 염미증진 조성물의 개발
- 전통·가공식품용 염미제품 개발 및 상품화
- 국민 염미섭취 감소에 기여

제2절. 연구개발의 필요성

- 연구개발 개요 :
농·축산 부산물을 이용하여 염미를 증강시키는 펩타이드로 최적 염미 증강 조성물 개발하여 산업적으로 대량생산 할 수 있는 기반 구축하고 이를 활용하여 저염브랜드를 리드할 경쟁력 있는 다양한 저염제품을 개발하는 것



제3절 연구개발의 중요성

○ 세계적으로 경쟁력 있는 염미증강소재의 부재

- 쓴맛을 가지는 화학적 염미대체제와는 달리 염미와 함께 감칠맛을 상승시키면서, 산업적으로 적용 범위가 넓은 천연 펩타이드계 염미대체제가 필요한 실정임
- 따라서 짠맛을 유지하면서 화학적 염미대체제의 쓴맛을 마스킹할 수 있는 천연 펩타이드계 염미대체제 개발이 필요함.
- 합성아미노산계열은 소비자들에게 외면되고 있음

○ 천연원료로 소비자로부터 선택되는 저염 제품의 개발 필요

- 합성펩타이드로 염미효과를 올려도 시장에서 소비자로부터 선택되지 않음
- KCl, L-라이신, L-글루탐산 등 염미 부스팅에 효과가 있다고 알려진 합성물질들의 시장성이 떨어짐
- MSG는 단일원료로 화학적으로 생성된다는 이미지가 확고해 소비자들에게 외면되고 있음
- 소비자들에게 선택되는 천연 펩타이드 조성물로 저염 효과 증대

○ 중소기업의 나트륨 저감 제품 개발 여건 부족한 상황, 중소기업과 상생할 수 있는 제품 개발 필요

- 중소기업생산 김치류와 장류는 주로 업소에 공급하고 있어, 외식, 급식에서의 나트륨 저감화에 중요한 비중을 차지
- 김치류, 장류, 절임류의 저염 제품에 대한 시장변화, 즉 소비자 트렌드의 변화로 나트륨 저감화 제품 개발 필요성 증가
- 중소기업의 기술 개발 여건이 대기업의 제품 수요를 만족시키기에 부족한 상황
- 개발 펩타이드 조성물의 제품 개발로의 개발기간, 비용 등의 측면을 절약할 수 있는 원료 제품의 상생형 연구 필요
- 저감화 소재 개발 기술을 활용한 저염 기반 제품의 산업화 기술 지원이 필요

○ 저염 전통 식품 개발 필요

- 김치 숙성 저장장치의 보급으로 많은 양의 소금을 쓸 필요성이 적어져, 김치의 좋은 영양소, 맛, 풍미는 유지하면서 소금의 양을 줄인 저염 김치의 필요성이 계속 증가하는 실정.

- 된장은 콩을 이용한 발효식품으로 우수한 콩단백질의 분해로 얻어지는 아미노산 공급과 함께 항종양, 항동맥경화, 항혈전용해효과 및 면역증진에 기여하는 여러 생리활성물질을 함유하고 있는 것으로 이러한 좋은 기능과 깊은 맛을 유지하면서 소금의 양을 줄인 저염 된장의 필요성도 증가하고 있는 추세

○ 염미증강 조성물의 염미성 펩타이드 규명으로 과학적 근거 확보

- 과학적으로 염미증강 펩타이드의 규명 및 기준 규격 설정하여야 산업적 활용 가능
- 과학적 근거의 뒷받침으로 글로벌 시장에서의 경쟁력 확보에 도움

○ 맛 소재의 맛 수용체에 대한 정량적, 정성적 작용 분석 필요

- 맛 소재의 맛 물질 감지 수용체에 대한 작용 구명을 통해 개발 소재의 작용 메카니즘 구명 및 이를 통한 소재의 최적 활용 방안 도출 필요
- 아밀로라이드 비감수성 이온채널의 하나로 추정되고 있는 TRPV1 (Transient receptor potential cation channel, subfamily V member 1) 수용체 및 감칠맛 증강 효능을 나타내는 물질의 수용체로 알려진 CaSR (Calcium sensing receptor)에 대한 활성 펩타이드의 작용 평가 필요

○ 분석법 기술 개발 필요

- 염미성 펩타이드는 상업적으로 판매되지 않으며, 염미성 펩타이드의 정성적 또는 정량적 분석 기술이 전무한 상태임.

제4절. 연구개발 범위

- 염미성 증강 펩타이드 조성물 대량 생산 기술
- 염미성 펩타이드 조성물 함유 제품 개발 기술
- 염미성 펩타이드 조성물의 맛 수용체 평가 모델에서의 염미 증강을 평가 기술
- 염미성 펩타이드 조성물 합성 및 함량 평가 기술

제2장. 국내외 기술개발 현황

코드번호

D-04

제1절. 국내 기술 수준 및 시장 현황

1. 기술현황

(염미대체제)

- 염미대체제로 농 축부산물을 기원으로 하는 천연 펩타이드성 염미대체제 산업화된 바 없음.
- 염미대체제로 천연소재류로는 효모추출물, 소금, MSG임.
- 염미증강제로 현재 사용되는 합성물질류
 - 핵산계열 : 5-리보뉴클레오타이드, 구아닐산 이나트륨, 이노신산 이나트륨, 이노신5'-1 인산, 타우린
 - 아미노산/유기산 계열 : 글리신모노에칠에스테르, 글루타민산소다, 오르니틴-알파-알라닌, L-리신, L-아르기닌, 알라닌, L-오르니틴, 젯산염
 - 금속염 계열 : 염화칼륨, 젯산칼륨, 염화칼슘, 염화마그네슘, 황산마그네슘 등 각종금속 이온대체물
- 합성 염미증강제는 맛을 마스킹 하는 원료로 사용하고 있는 실정이나, 크게 개선하지 못한 실정이며, 미국 소금협회에서 독성관련 우려를 보고해, 웰빙용 제품에 부적합한 실정.
- 류미라 등 조선 간장에서 감칠맛 증강 산성계 펩타이드 분리 보고 2011 (과제 2협동기관 책임)
- 조형용 등 시판액젓 및 어간장으로부터 짠맛 증진 물질에 관한 보고 2015
- 오남순 등 L-아르기닌과 L-아스파라긴산 혼합이 NaCl 짠맛 향상에 미치는 영향 보고 2014
- 농립축산식품, 효모추출물, 식물단백질 가수분해물, 건조효모, MSG 등을 이용하여 가공 공정 개선에 의한 나트륨 저감화 개발 방법 2016
- 김진선 등 분리대두 단백질 가수분해물의 강도평가를 통한 짠맛 증진 효과 연구 2017
- 쓴 맛을 가지는 화학적 염미대체제와는 달리 염미와 함께 감칠맛을 상승시키면서, 산업적으로 적용 범위가 넓은 천연 펩타이드계 염미대체제가 필요한 실정임

2. 시장현황

(저염제품)

- 2007년부터 웰빙 열풍이 불면서 천연 염미대체제로서 L-글루타민산 나트륨(MSG)뿐만 아니라 핵산·합성향 등 화학적 합성첨가물을 뺀 자연조미료 제품의 비중이 크게 늘어나고 있음.
- 자연조미료에는 음식의 풍부한 맛을 내기 위해 효모엑기스, 쌀가루, 쇠고기, 해물분말,

양파, 마늘, 표고 등의 건조분말 등 100% 천연재료로 사용하여 소비자용 제품 출시 (맛선생'과 '산들애'란 브랜드의 자연조미료 제품 출시)

- 자연조미료 시장은 양사간 경쟁이 본격적으로 시작된 2008년 151억3,200만원의 매출규모에서 215억2,600만원으로 무려 42.3% 증가함(시장조사전문기관인 링크아즈텍이 2016년 2월 POS 데이터기준)
- 저염을 위하여 활용하는 저염 소금도 연령대가 높아질수록 선호도가 높아지고 있음
- 국내 소금시장의 규모는 2010년 기준 1,300억원이며, 전 세계적으로 나트륨 대체 염미제의 시장 수요는 절실히 필요한 실정임.

표 1. 주로 구입하는 식염 종류

구입 종류	전체			연령별 ¹⁾			
	1순위 (n=344)	2순위 (n=344)	합계	20대 (n=69)	30대 (n=102)	40대 (n=100)	50대 (n=73)
천일염	39.5	27.0	66.6	55.1	64.7	70.0	75.3
구운 소금	13.7	26.2	39.8	29.0	39.2	41.0	49.3
맛소금	24.7	14.0	38.7	63.8	35.3	29.0	32.9
꽃소금	14.2	12.5	26.7	24.6	28.4	31.0	20.5
허브 맛 소금	2.6	10.5	13.1	18.8	16.7	13.0	2.7
저염 소금	4.4	7.8	12.2	4.3	12.7	13.0	17.8
기타	0.9	2.0	2.9	4.3	2.9	3.0	1.4

- 최근 2,000억 원대 규모(시장조사업체 AC닐슨 자료)를 유지하고 있는 간장 시장에서 염도를 낮춘 '저염 간장' 매출 성장세. 롯데마트에서 2012년 1~4월 양조간장 매출은 전년 동기 대비 1.8% 감소했지만, 저염 양조간장 매출은 158.2%로 증가 (출처:롯데마트)

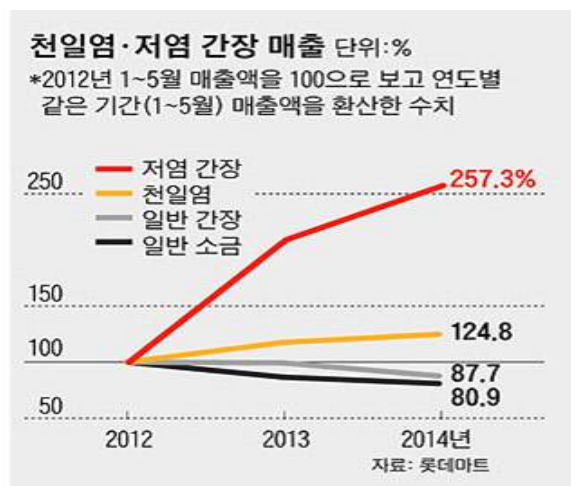


그림 1. 천일염·저염 간장 매출

- CJ의 경우 핀란드의 팬솔트를 수입하여 국내에 판매하고 있으나 KCI의 쓴맛의 영향으

로 짠맛에 길들여진 소비자의 기호에 미흡한 실정.

- 본 과제 성과물로 저염소금의 쓴맛은 줄이고, 감칠맛은 높은 저염소금 ‘짤트’ 시리즈를 출시함.

짠맛을 유지하면서 화학적 염미대체제의 쓴맛을 마스킹 할 수 있는 천연 펩타이드 조성물을 함유시킨 소금을 개발함.

3. 경쟁기관현황

- 천연 염미성 펩타이드 기술 및 생산력 보유한 타회사는 없음
- 염미대체제 자연조미료로 CJ제일제당은 2007년 4월 산들애'출시, 대상은 2007년 11월 '맛선생' 출시
- 저염 소금으로 CJ제일제당에서 핀란드로부터 50% 저염 '팬솔트' 직수입·판매, 대상에서는 NaCl을 50% KCl로 대체한 '1/2나트륨' 출시
- 저나트륨 소금 333 등 국내 정보 수집 추가 (저염 컨설팅 보고서 자료 참조)
- 산업체에서는 감칠맛 증진 소재로 효모추출분말을 사용하며, 효모로에서 출시하고 있는 효모추출물 분말과 중국 Angel 사 효모추출분말(Yeast extract KA02) 등이 있음
- 신아로 사에서는 효모를 베이스로 하여 다양한 식품 유형에 맞는 염미소재를 개발 및 판매를 하고 있음

4. 지식재산권현황 (등록, 공개특허)

- 펩타이드성 염미증강제 특허를 출원한 기관은 세부기관인 한식연에서 특허 출원
- 지미성분으로 알려진 글루탐산, 라이신을 활용한 지미 증강을 통한 염미증가기술관련 특허를 국내기업에서 출원하였음
- 청국장, 구기자를 활용한 천연 조미료 개발 특허(전남생물산업진흥)를 출원하였음
- 산업적으로 활용할 수 있는 펩타이드성 천연 염미 증강용 조성물관련 특허기술은 주관 기관인 KMF에서 출원함 현재 비공개상태) 특허 출원번호 : 10-2015-0041749, PCT출원번호 : PCT/KR2016/002930
- 본 과제 성과물을 이용하여 산업적으로 활용할 수 있는 경쟁성 있는 펩타이드성 염미조성물에 대한 기술개발이 필요함.
- 염미증강 조성물로 출원, 특허 회피 전략이 필요하며, 국내 전통 제품에의 적용 특허로 출원하여 보호받는 전략이 동시에 진행되어야 함.
- 본 과제수행 결과로 염미성 펩타이드를 함유한 저염소금을 활용하여 저염화 기술이 필요한 발효장류에 적용하여, 감칠맛은 높이면서, 소금의 섭취를 줄일 수 있는 된장 제조방법에 대한 특허 '대체염 및 염미성 콩 발효물을 활용한 나트륨 저감화 된장의 제조방법'을 출원(10-2017-017683)하였음.

표 2. 국내 지식재산권 현황

특허명 및 등록일	주요내용	보유국	기관
흑초 유래 펩타이드를 포함하는 염미 증강제 공개 2015년05월27일	흑초로부터 분리한 분자량 500 Da 이하의 펩타이드 분획을 포함하는 염미(Saltiness) 증강용 조성물	한국	한식연
L-글루탐산 및 염기성 아미노산을 포함하는 아미노산 조미료 조성물 공개2013년04월09일	L-글루탐산 아미노산의 기본 성분으로 하고 L-글루탐산과 조합을 이루어 관능과 염미가 개선된 복합 조미료 성분	한국	대상
유리 아미노산을 포함하는 식품 또는 아미노산 조미료 조성물의 짠맛 증강 방법 공개 2015년06월26일	L-글루탐산 및 L-라이신의 비율을 조정함으로써 아미노산 조미료 조성물의 짠맛 증강 방법에 관한 것	한국	대상
L-글루탐산 및 L-라이신을 포함하는 아미노산 조미료 조성물 공개 2013년07월08일	L-글루탐산 및 L-라이신을 주성분으로 포함하고, 조미소재용 필수 아미노산, 핵산 및 유기산으로 구성된 구으로부터 선택되는 최소 1종의 조미 소재를 보조적으로 포함하는 아미노산 조성물	한국	대상
쓴맛 및 떫은맛이 감소된 조미료 조성물 공개 2015년11월05일	염화칼륨, 염화마그네슘 및 염화암모늄으로 구성되는 구에 L-글루타미산 및 L-라이신을 포함하는 아미노산 혼합물을 포함하는 조미료 조성물	한국	대상
칭국장을 유효성분으로 하는 염미 증강제 조성물 및 이를 포함하는 저나트륨 천연 조미료 조성물 공개 2015년07월13일	칭국장을 유효성분으로 하는 염미 증강제 조성물 및 이를 포함하는 저나트륨 천연 조미료 조성물	한국	전남생물산업진흥원
구기자를 유효성분으로 하는 염미 증강제 조성물 및 이를 포함하는 저나트륨 천연 조미료 조성물 공개 2015년07월13일	구기자를 유효성분으로 하는 염미 증강제 조성물 및 이를 포함하는 저나트륨 천연 조미료 조성물에	한국	전남생물산업진흥원
천연 염미 증진제 및 그 제조방법 공개 2016년04월21일	어패류로부터 염미증진물질을 추출한 천연 염미 증진제 및 그 제조방법에 관한 것	한국	차의과대학교 산학협력단
염미 증가 효과를 갖는 시즈닝 조성물 및 그의 제조 방법 공개 2017년07월10일	염화암모늄, 효모추출물 및 말토덱스트린을 주성분으로 포함하고, 분말결정포도당, 베타글루칸을 일정 함량비로 포함한 염미 및 감칠맛을 내는 시즈닝 조성물	한국	롯데푸드
쌀겨 발효물의 효소부해물을 포함하는 염미증강소재 및 이를 이용하는 저염 조미료 공개 2017년12월08일	쌀겨 발효추출물의 효소부해물을 이용한 염미 증강용 조성물 및 저염 조미료 조성물	한국	에스.앤.디

5. 표준화 현황

- 식약처 나트륨 함량 비교 표시제 도입하여 2017년 5월부터 시행함.
- 1회 제공량 나트륨 함량이 1,300 mg 미만의 메뉴가 전체의 20% 이상인 외식 및 급식업체 운영지침 도입(그림 2).

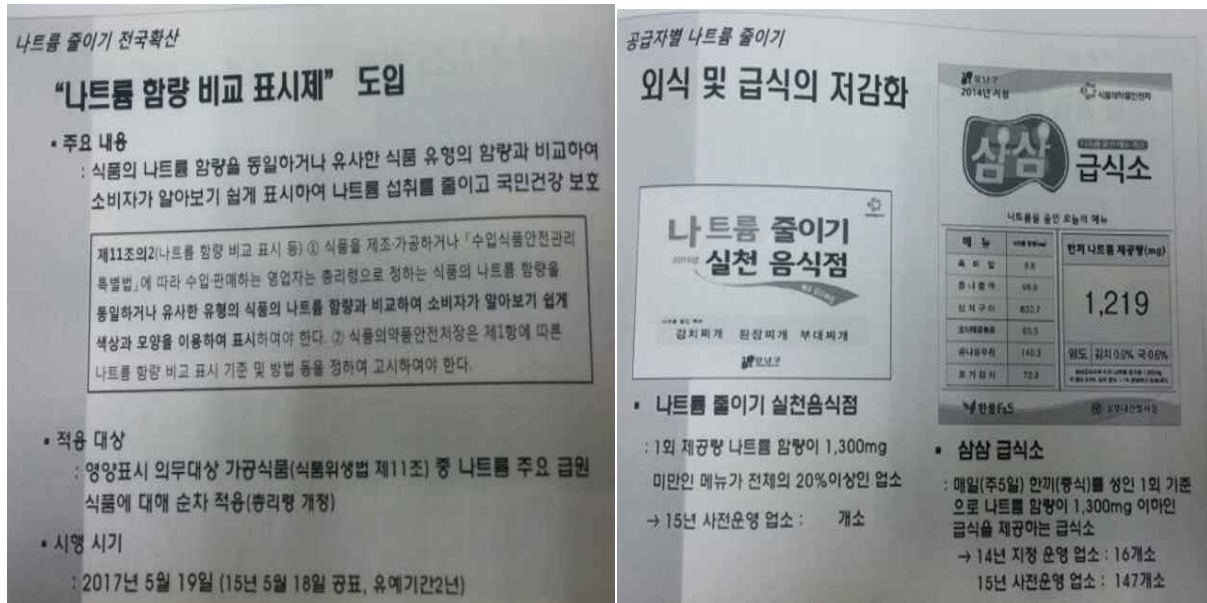


그림 2. 식약처 나트륨 함량 비교 표시제 및 저감화 운영지침

- 장류, 김치, 절임식품 등의 가공식품은 일반 국민의 식탁에서 거의 매끼 섭취되고 있는 품목으로 우수한 발효식품이나 소금 과다 섭취에 큰 요인 중의 하나임.
- 중소기업에서 생산하는 김치류와 장류는 주로 업소로 제품을 공급하고 있어, 외식, 급식에서의 나트륨 저감화에 중요한 비중을 차지하고 있음.
- 장류, 김치, 절임식품을 생산하는 저염 제품에 대한 시장변화, 즉 소비자 트렌드의 변화로 나트륨 저감화 제품 개발 필요성이 증가하고 있으나 중소기업의 제품 개발 기술 및 생산능력 부족한 상황임.
- 천연 염미대체체를 활용한 전통 장류, 김치에의 적용이 가능한 제품 개발 지원이 시급함.

6. 기타현황

- 우리나라 국민 평균 나트륨 섭취량을 2009년 기준 4.7 g 에서 3 g 으로 낮출 경우, 사회·경제적 총 편익은 연간 12조 6,000억 원에 달하는 것으로 추정됨
- 2013년 국민건강영양조사 결과 우리나라 국민의 하루 평균 나트륨 섭취량은 남자 4,659 mg, 여자 3,348 mg으로 세계보건기구 (WHO) 권고 상한치 (2,000 mg, 소금 5 g)의 2배가 되는 것으로 보고.

- 나트륨 소비가 많은 나라에 속하는 우리나라 사람들의 나트륨 제1 급원 식품은 소금이었으며, 그 다음이 배추김치였으며, 간장, 된장, 라면, 고추장, 국수 등이 그 뒤를 이음



그림 3. 나트륨 주요 급원식품

- 따라서, 국물문화인 우리나라의 요리문화에 맞는 맛있는 저염소금의 개발이 필요하며, 저염김치, 저염장류의 개발로, 국민 나트륨 섭취 절감에 기여할 기술 개발이 필요함.
- 나트륨의 과다 섭취가 고혈압 등 여러 심혈관계 질환의 주요 원인중의 하나로 밝혀지면서 세계 여러 나라에서도 다각적으로 나트륨 섭취를 줄이는 정책이 오래전부터 실시되고 있음. 우리나라에서도 보건복지부, 식약처 등 정부 부처를 중심으로 여러 정책이 실시되고, 식품업계, 외식업계에서도 소비자의 필요성에 따라 나트륨 저감화 제품 개발이 이루어지고 있음.
- 2012년 3월에 보건복지부와 식품의약품안전처에서 ‘나트륨 줄이기 운동본부’를 발족하여 2020년까지 나트륨 일일 섭취량을 20% (약 2.5 g)까지 줄이는 노력을 기울이고 있음.
- 또한 매년 ‘범국민 나트륨 줄이기 실천 행사’를 서울 및 6개 지방청을 중심으로 개최하여 일반 국민들이 저감화 동참 서명, 짠맛 미각 테스트 등 관련 활동에 참여함으로써 나트륨 저감화 필요를 체감하도록 하고 있고 나트륨 줄이기 아이디어 공모전, 삼삼한 전국 요리경연대회, 나트륨 줄이기 서포터즈 활동 등을 통해서 국민들이 직접 나트륨 저감화에 참여하게 하여 국민들의 인식개선을 확대해 가고 있음.
- 2012년부터 가공식품에서의 나트륨 저감화 가이드라인 설정에 관한 연구가 진행되고 있으며, 2015년에 식약처에서는 김치류, 장류, 절임류에 대한 중소기업 나트륨 저감화 기술 지원사업을 추진하여오고 있음.

제2절. 국외 기술 수준 및 시장 현황

1. 기술현황

(염미대체제)

- 최근 발효와 효소를 이용하는 단백질가수분해물의 짠맛 증진 효과에 대한 연구가 매우 활발하게 추진되고 있음
- 미국 Kraft사는 L-aspartic과 L-arginine을 이용하여 염분의 섭취를 줄이는 기술 보고
- Okia H. 등 일본간장에서 12개의 감칠맛 및 염미 증강 펩타이드 보고 (Asp-Asp, Asp-Glu, Glu-Asp, Glu-Glu, Asp-Asp-Asp, Asp-Asp-Glu, Asp-Glu-Asp, Glu-Asp-Asp, Asp-Glu-Glu, Glu-Asp-Glu, Glu-Glu-Asp, Glu-Glu-Glu)/ 1995
- Thomas Frank Hofmann은 다양한 구조의 펩타이드와 S-/O-carboxyalkyl 펩타이드를 이용하여 염미성 상승시키는 기술 보고
- Lioe 등 콩단백질을 발효제조된 일본식 간장에서 저분자 펩타이드가 짠맛과 우마미를 가지고 있다고 보고 / 2007/2010
- Sugiyama 등 어류단백질의 효소가수분해물이 짠맛을 증진한다는 연구결과 보고 2009
- Zhuang M 등 중국된장에서 4개의 감칠맛 및 염미 증강 펩타이드 보고 (Lys-Gly-Asp-Glu-Ser-Leu-Leu-Ala, Ser-Glu-Glu, Glu-Ser, and Asp-Glu-Ser) / 2016
- Nishimura 등 일본된장에서 5개의 감칠맛 및 염미 증강 펩타이드 보고 /2011
- Schindler 등 어간장으로부터 sensomics approach로 짠맛을 증가시킬 수 있는 arginyl dipeptides 물질 보고 /2011

(저나트륨제품)

- 염화칼륨이 1982년에 식품첨가물로 지정된 이래, 소금에 염화칼륨을 50% 첨가한 제품이 사용상의 주의 사항을 기재 후, 시판되기 시작함.
- 핀란드의 경우 정부와 헬싱키 의대가 공동 개발한 올리올라사의 팬솔트'를 상용화하였는데 일반 정제염이 약 40%가량 감소 된 것으로 현재 핀란드 3대 식품으로 취급되며 전 세계 16개국 특허를 받았고 국내를 포함하여 20여 나라에 판매됨.
- 미국의 모튼솔트사의 경우 다양한 결정구조의 특수소금을 전 세계로 제조·판매하고 있음

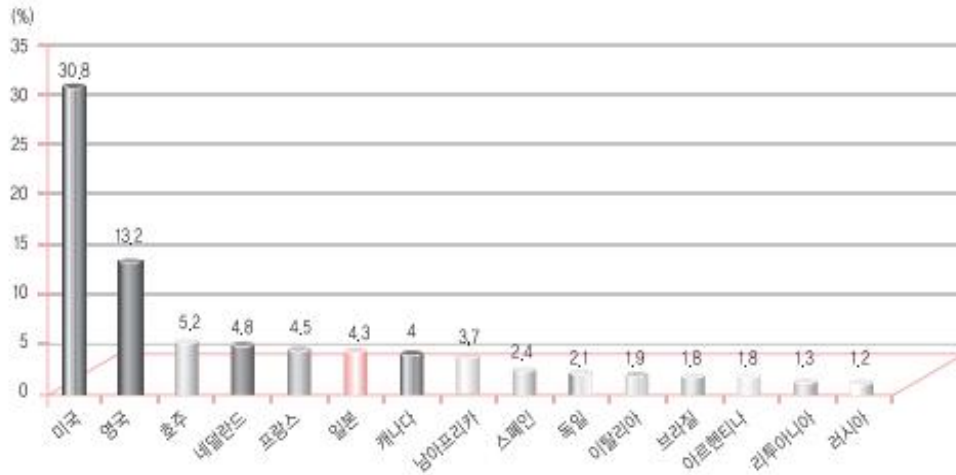


그림 1. 국가별 나트륨 저감 제품 출시 현황
(2008~2010년, 출처: Innova database)

- 카길사의 경우 소금 결정체의 표면적을 증가시켜 짠맛을 쉽게 느낄 수 있도록 만든 박편소금제품 등이 있음.
- 칼륨염을 이용한 소금 대체물이 저염제품의 대표적인 제품이지만, 염미는 식염의 염미와는 달라, 맛의 문제가 있음
- 중화소금 핵산을 주요 성분으로 하는 조성물들은 염분을 줄이는 효과는 인정되나 감칠맛을 동시에 향상 시키지 못하며 산업의 관점에서 경제성이 부족하다는 문제점이 있음.

2. 시장현황

- 전 세계 저염 식품 시장은 약 368억 유로, 즉 54조원의 규모를 가지고 있는 것으로 추정되며, 그중 대체소재 및 조미료 사용을 통한 No salt 표시 식품은 17조원 규모를 가지고 있는 것으로 추산되는 거대한 시장(출처 : Prepared Foods 2011)
- 시장조사 기관인 후지경제에 따르면 2014년 일본의 저염시장 규모는 2012년 대비 13% 성장한 447억 엔에 이를 것으로 전망했으며, 신제품의 확대가 큰 역할을 하는 것으로 분석(출처; Globalwindow)
- 소금의 시장은 인류의 존재와 함께 이어진 것으로 시장의 안전성은 매우 큰 편이며 향후 프리미엄급 소금 시장이 커질 것으로 전망됨.
- 2000년대 대륙별 소금 생산량의 변화 조사결과 아시아의 경우 생산량 증가율이 6.1%, 유럽 2.6%, 북미 3.1% 등으로 모든 대륙에서 연평균 4% 이상의 성장률을 기록하고 있음(World Salt to 2015, The Freedonia Group)
- 세계적으로 소금 생산국가는 최소 100여 개국 이상인 것으로 파악되고 있음. 전체 생산량 대비 중국 생산량이 21.1%로 가장 많이 집계되고 있으며 미국 18.0%, 독일 7.4%, 인도 6.1% 및 캐나다 5.2%로 집계되고 있음
- 전 세계적으로 소금대체 및 보완제 시장 수요는 급격하게 증가하고 있으나 아직까지는 상용화가 가능한 제품은 부족한 실정

- 본 과제에서 개발한 소금대체 염미성 펩타이드함유 제품은 저염 식품 및 환자용 식이 등 고부가가치 의료용 소재로 시장성이 매우 높음.

표 1. 세계 소금 시장 현황

구 분		현재	예상 (단위 : 억원)					
		(2014년)	(2015년)	(2016년)	(2017년)	(2018년)	(2019년)	(2020년)
해외시장	규모	139,360	143,540	147,846	155,238	163,000	171,150	179,707
	성장율	2.9%	3.0%	3.0%	3.0%	3.0%	3.0%	3.0%
국내시장	규모	1,300	1,365	1,433	1,505	1,580	1,659	1,742
	성장율	약 5.0%	5.0%	5.0%	5.0%	5.0%	5.0%	5.0%
합계	규모	140,660	146,286	152,137	158,223	164,552	171,134	177,979
	성장율	4.0%	4.0%	4.0%	4.0%	4.0%	4.0%	4.0%

※ 산출근거 : World Salt to 2015(The Freedonia Group), 연합뉴스(2010.03.30.), 뉴스토마토(2014.04.07.)

3. 경쟁기관현황

- 미국의 Kraft사는 1992년 미국특허(US5145707)에서 L-aspartic과 L-arginine을 이용하여 염분의 섭취를 줄이는 기술 보고
- 일본의 기린 교와 푸드(식)는 솔트테이스트-저염소금 출시 : 나트륨(소금) 절감 50%, 염화 칼륨 30%, L- 아르기닌, L- 글루탐산 나트륨 등의 화학 성분이 가하여 개발
- 핀란드의 올리올라사에서 제조 및 판매되는 펜솔트(나트륨 50% 절감, 염화칼슘50%)가 전 세계적으로 판매되고 있음.
- 산업체에서는 감칠맛 증진 소재로 효모추출분말을 사용하며, 효모로에서 출시하고 있는 효모추출물 분말과 중국 Angel 사 효모추출분말(Yeast extract KA02) 등이 있음
- 신아로 사에서는 효모를 베이스로 하여 다양한 식품 유형에 맞는 염매소재를 개발 및 판매를 하고 있음.
- 효모를 활용한 지미 증진 기술 이외의 기술이 없는 상황임.

4. 지식재산권현황

- 저나트륨 식품관련 특허는 전 세계적으로 2002년 이후 급격히 증강추세
- 발효식품-미소된장 간장 문화가 발달된 일본에서 펩타이드성 물질의 규명과 활용이 활발

표 2. 해외 지식재산권 현황

특허명 및 등록일	주요내용	보유국	기관
풍미 조성물 및 정미(呈味) 증강 방법/공개 2016.03.09	풍미 조성물이 해산물(sea food)용 풍미 조성물인 것을 특징으로 하는 풍미 조성물	일본	다카사고고료고교(주)
소금 및 염미증강제를 함유하는 식염대체조미료 /공개 2011.3.31	해산물 추출물과 식물성 단백질 가수분해물로부터 염미증강제 개발	일본	日本水産(주)
짜맛 증강제 및 이것을 포함한 다시마 추출물 국내공개/2016.01.15. 일본공개/2011.11.17.	취발 성분을 포함한 짠 맛 증강제 제조기술	일본	高砂香料工業(株)
Method of strengthening the taste of sodium chloride, agent for strengthening the taste of sodium chloride, sodium chloride-taste seasoning and food having strengthened taste of sodium chloride WO2001039613 A1/Jun 7, 2001	산성 펩타이드 또는 단백질을 가수분해 처리 및 탈아미드 처리하여 제조된 펩타이드를 식염 함유 음식물에 첨가하는 것을 특징	일본	K y o w a H a k k o Kogyo (주)
Method for improving salty taste of food and beverage and agent for improving salty taste of food and beverage WO2012017710 A1/Feb 9, 2012	난소화성 텍스트린, 분기 말토 텍스트린, 이눌린 및 폴리텍스트로스 등의 수용성 식이 섬유를 음식물에 첨가 염미 증강 및 칼륨염의 거친 맛개선(마스킹)	일본	Matsutani Chemical Industry Co
Seasoning composition, salty taste-like taste enhancer and method for enhancing salty taste-like taste of food and drink/Oct 23, 2008	5'-리보뉴클레오티드류와 분기쇄 아미노산을 배합한 짠맛 증강제	일본	J a p a n Tobacco (주)
Salty taste enhancer and food or drink containing the same	글루탐산을 함유하는 펩타이드 조성물	일본	M a s a s h i Shimono, et al.
Salty taste-enhancing agent and manufacturing method therefore/Aug 26, 2015	hydrocarbon group을 가지는 염미증강아미드	일본	Nissin Foods Holdings (주)
Method of enhancing salty taste, salty taste enhancer, salty taste/Dec 13, 2005	산성 펩타이드 또는 단백질을 가수분해 처리 및 탈아미드 처리하여 제조된 펩타이드를 식염 함유 음식물에 첨가하는 것을 특징	일본	K y o w a H a k k o Kogyo (주)
Salt enhancer/Sep 8, 1992	L-aspartic acid, L-arginine, sodium chloride을 구성성분으로 하는 염미증진제	미국	K r a f t General Foods
Salt Enhancing Compounds and Use /Jun. 18, 2009	S- or O-carboxyalkylated amino acids 구조를 가지는 염미성분	미국	Hofmann et al.

5. 표준화 현황

- 일본

- 우리나라 보다 저염 식품이 보편화된 일본에서는 더욱 강력한 나트륨 저감화 정책 실시.
- 일본 후생노동성은 2015년 4월부터 일인 나트륨 소비 권장량을 18세 이상 성인 남성의 경우 9 g 에서 8 g 으로, 여성의 경우 7.5 g 에서 7 g 으로 개정.
- 일본식품업계도 정책 변화에 따른 대응책을 마련 중임.
- 2014년 11월부터 국립순환기병 연구센터에서 인증 제도를 실시하여 기존식품보다 나트륨 함량이 30% 감소된 제품이 인증받음.

(<http://www.globalwindow.org/gw/overmarket/GWO>)

- 에이스코쿠, 아지노모토 등 신제품 속속 발표 속 저염 식품 위한 인증 등장.



자료원: 에이스코쿠, 아지노모토, 국립 순환기병 연구센터 홈페이지

그림 2. 일본의 저염 식품 인증 마크

표 3. 식품 메이커 별 저염식품 확대 계획

에이스코쿠	국립 순환기병 연구센터 ‘가라시오’ 인증 취득 신제품 5종 발표
아지노모토	조미료 ‘혼다시’ 저염제품의 염분 축소비율을 확대 (30→40%)
마루다이식품	저염식품 라인인 ‘우스시오’ 시리즈 품목 수를 3배 이상 확대
미즈칸	식초를 이용해 염분을 줄이는 메뉴 레시피 사이트를 개설
에스비식품	염분을 줄인 (1 g/1인분) 염소용 카레 개발, 패밀리레스토랑 납품 예정
카코메	간장, 미소를 토마토 케첩으로 바꾸는 레시피 개발, 제안

자료원: 니혼게이지아이신문

6. 기타현황

- 미국, 캐나다, 핀란드, 영국, 일본 등 여러 나라에서 국민의 건강 증진 및 예방의 차원에서 나트륨 저감화 정책을 펼치고 있음. (출처; World Action on Salt & Health, WASH)
- 핀란드에서는 이미 1970년부터 국민에 대한 꾸준한 나트륨 저감화 교육과 식품업계와의 공동 노력으로 2008년 핀란드인의 평균 나트륨 섭취량은 40% 이상 감소되었고, 뇌졸중으로 인한 사망은 80%나 감소되었다고 보고됨.

- 미국에서는 1980년부터 나트륨 저감화의 중요성을 인식하였으나 별다른 효과가 없다가 2000년부터 비영리 건강 시민 참여 기구인 Center for Science in the Public Interest (CSPI)의 노력으로 여러 정책들이 실시되어 실효를 거두고 있음.
- 2011년 메릴랜드 베데스다에서 열린 National Nutrient Databank conference에서는 주요 식품 업체들이 참여하여 나트륨 저감화 실태가 보고되었는데, 지난 10년간 꾸준히 가공 식품에서의 나트륨 함량이 저하되었으며, 특히 통조림류와 감자스낵 식품에서 40%이상 저감화를 이루었다고 보고됨.
- 미국에서는 2020년까지 국민 일일평균 섭취량을 1,500 mg로 낮추는 정책이 계속적으로 진행되고 있음.
- 캐나다에서는 2007년 나트륨 저감화 정책을 실행을 위해 Sodium Working Group (SWG)을 구성하여 다각적인 정책을 펼치고 있음. SWG의 권고 사항에는 나트륨 저감화 식생활에 대한 교육뿐만 아니라 식품 제조업체들에게 나트륨 저감화 제품을 생산하도록 강력히 권고하고 있음.
- 영국은 식품기준청(FSA)이 주축이 되어 2003년부터 국가적 차원에서 저감 정책을 시작하였으며 주요 식품군 10종의 소금 함량 감소, 나트륨 과다 함량 식품의 신호등 라벨 표시제 실시, 대국민 교육홍보 활동 등을 추진하여 왔음.
- 남아공 보건부는 2016년 6월 30일부터 가공식품 내 나트륨 함유량을 저감하는 규제법을 시행하였음. 규제 대상 식품은 남아공에서 판매되는 모든 시리얼, 빵, 버터 및 마가린, 그 레이비, 수프, 감자칩, 가공육류 등으로 수입품목도 해당함. 보건부는 남아공 식품 가공업체들의 규제 준수를 돕고, 소비자들의 입맛이 익숙해질 수 있도록 규제 시행을 점진적으로 도입함.
- 뉴욕시는 미국 내 최초로 15개 이상의 매장을 운영하는 식당체인점에 연방 식품의약청 (FDA)의 일일 나트륨 권장량을 초과하는 음식 메뉴에 경고 표시를 의무화하도록 규정하고, 이를 2015년 12월 1일부터 시행되고 있음.

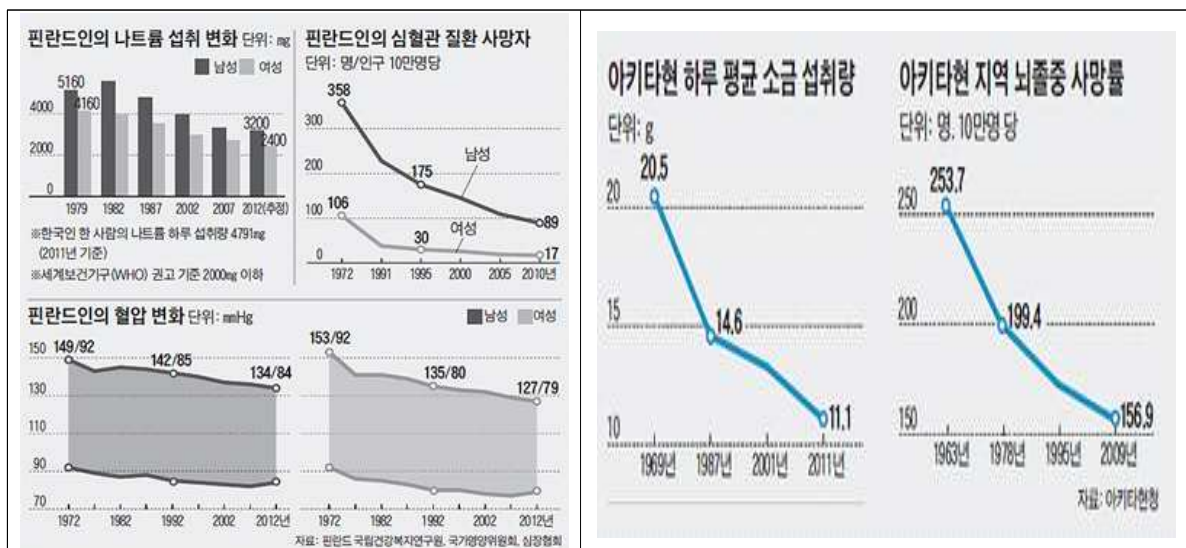


그림 3. 해외의 나트륨 섭취율에 따른 관련 질병 현황

제3장. 1차년도 연구 수행 내용 및 결과

코드번호 D-05

제1절 연구개발 수행 내용

1. 연구개발 수행내용

가. 케이엠에프

구분	세부과제명	세부연구내용	연구개발 수행내용
1 차 년 도	천연 엽미성 펩타이드를 활용한 엽미대체기술 확보	1. 관능평가를 통한 최적 가수분해물 배합비의 선정	1) 식물성 및 동물성 원료의 배합을 통한 가수분해물 조제 <ul style="list-style-type: none"> · 식물성 펩타이드 가수분해물 조제 · 식물성 펩타이드 가수분해물 + 소고기부산물 가수분해물 조제 · 식물성 펩타이드 가수분해물 + 닭고기부산물 가수분해물 조제 · 식물성 펩타이드 가수분해물 + 돼지고기부산물 가수분해물 조제 2) 품질특성 분석을 통한 최적 배합비의 선정 <ul style="list-style-type: none"> · 가수분해물 조성물의 관능평가로 선정 · 아미노산 분석을 통한 품질평가로 선정 · 암모니아태 질소 분석을 통한 품질평가로 선정 · 이화학적 품질특성과 경제성 평가로 최적 배합비 선정
		2. 최적 가수분해물의 생산 조건 설정	1) Lab scale에서의 생산 효소 설정 2) 제조공정별 품질 평가 <ul style="list-style-type: none"> · 가수분해 효소, 시간 및 온도 설정 · 농축 시간 및 온도 설정 · 제품 수율 지표 설정 3) 엽미성 펩타이드 조성물로서의 표준화 지표 설정 4) Pilot scale에서의 생산 및 품질 평가 5) 엽미기능 평가 : <i>in vivo</i> 관능검사
		3. 저염 펩타이드 조성물 홍보	식품 및 첨가물 국내외 박람회 참가로 제품 홍보

나. 계명대학교

구분	세부과제명	세부연구내용	연구개발 수행내용
1 차 년 도	염미성 펩타이드 분리 및 분석법 개발	1. 염미성 펩타이드의 데이터 베이스 구축	· Nanosep을 이용하여 SAP(1 mg/ml)을 3 kDa보다 큰 사이즈와 작은 사이즈로 분리하여 전기영동 후 Coomassie brilliant blue(CBB)염색으로 확인
		2. 염미성 펩타이드 합성 전략 기술 개발	· HPLC 분리능을 개선하기 위해서 염미성 펩타이드 시료 SAP(1 mg/ml)를 Nanosep을 이용하여 분리된 3 kDa 보다 작은 시료에 benzyl bromide를 처리 · 표준시료중 하나인 L-Lys-Gly-OH에 동일한 조건 하에 benzyl bromide 처리

다. 한국식품연구원

구분	세부과제명	세부연구내용	연구개발 수행내용
1 차 년 도	미각수용체를 이용한 염미성 펩타이드의 효능 평가	1. 염미성 펩타이드의 맛 수용체 활성화 작 용 평가	실험조건 확립 · 산성 펩타이드로 유발되는 pH 변화 효과 배제를 위한 assay 조건 최적화
			TRPV1 수용체 작용제로서의 효능 평가 · 염미성 펩타이드(AR 등)는 TRPV1을 활성화시키 며 그 활성화는 TRPV1 특이저해제 capsazepine에 의 해 유의적으로 저해되어 TRPV1 수용체 직접 작용 가능성 확인
		2. 지미성 펩타이드에 대한 맛 수용체 활성 화 작용 평가	CaSR 수용체 작용제로서의 효능 평가 · 염미성 펩타이드(7종)는 CaSR 활성화에 관여하지 않으나 작용제(NPS R-568, glutathione) 조절작용 확인
			TRPV1 수용체 작용제로서의 효능 평가 · 지미성 펩타이드(ED 등)는 TRPV1을 활성화시키 며 그 활성화는 capsazepine으로 저해되어 TRPV1 작 용제로 수용체에 직접 작용 가능
		CaSR 수용체 작용제로서의 효능 평가 · 지미성 펩타이드(ED 등)는 CaSR 활성화에 관여함	

2. 추진체계 및 전략

<연구개발 추진방법>

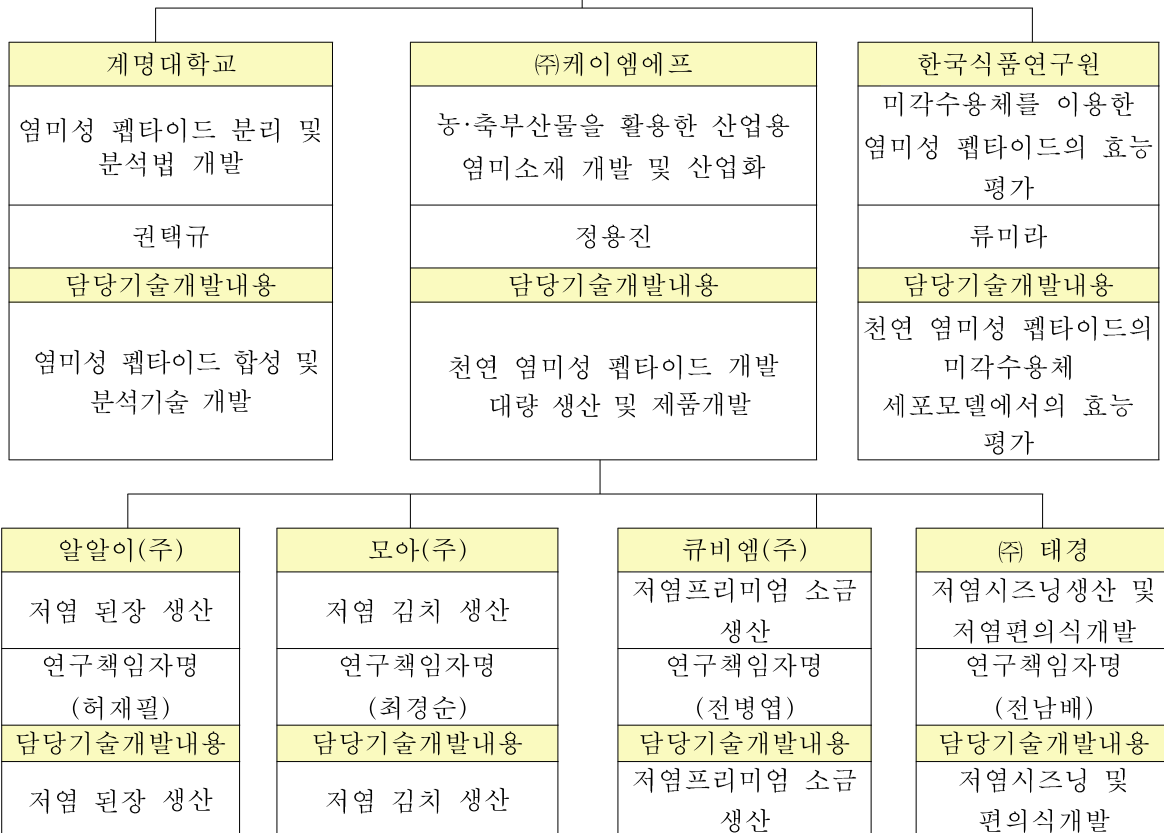
- **기 보유한 염미성 식물성(농부산물) 펩타이드 조성물을 기반으로 동물성(축부산물)을 보강 개발 추진**
 - KMF(주관기관)에서 관능평가를 통한 최적 가수분해물 배합비 선정
 - 계명대(1협동-대학)에서 염미성 펩타이드의 데이터 베이스 구축
 - 한식연(2협동_출연연)에서 염미성 펩타이드의 맛 수용체 활성화 작용 평가
- **신규 펩타이드 조성물의 효능평가 및 구조분석 추진**
 - KMF(주관기관)에서 기 보유 염미성 펩타이드 조성물로부터 효능 보강된 신규 펩타이드 조성물의 제조 담당
 - 계명대(1협동-대학)에서 염미성 펩타이드 분석 및 합성기술 담당
 - 한식연(2협동_출연연)에서 염미성 펩타이드의 맛 수용체 활성화 작용 평가
- **염미 증진 펩타이드 조성물 함유 기능성 저염 제품의 개발 추진**
 - 참여기업 (주)알알이에서 저염 된장 시생산 담당
 - 참여기업 (주)모아에서 저염 김치 시생산 담당
- **나트륨 저감화 식약처 담당 부처로부터 저염 소재 필요업체로의 컨설팅 추진**
 - 식약처에서 중부 영남 호남 3권역으로 나누어 실시하는 나트륨 저감화 컨설팅에서 저감화에 참여하는 업체와의 협력 추진
- **박람회 참가로 저감화 소재 및 저염 제품의 홍보 추진**
 - 식품 및 첨가물 국내외 박람회 참가 및 세미나로 소재의 홍보와 저염제품의 시식을 통한 저염제품 선호도 조사

가. 1차년도 추진전략

연구개발과제	
과제명	농 축 부산물을 활용한 산업용 엮미소재 개발 및 산업화

총 참여 연구원
주관연구책임자(정용진)외 총 22명

기관별 참여 현황		
구 분	연구기관수	참여연구원수
중소기업	4	14
대 학	1	4
출 연 (연)	1	4
기 타(중견기업)	1	1



나. 1차년도 추진일정

1차년도																
일련번호	연구내용	월별 추진 일정												연구개발비 (단위:천원)	책임자 (소속기관)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1	동물성 원료 혼합 가수분 해물 배합비 의 선정														44,250	KMF
2	배합비별 품 질특성 평가														44,250	KMF
3	최적 가수분 해물의 생산 조건 설정														44,250	KMF
4	최적 가수분 해물의 품질 평가 및 제품 홍보														44,250	KMF
5	최적 조합물 에서의 염미 성 펩타이드 분리 및 동정														20,000	계명대
6	최적 조합물 에서의 펩타 이드 함량 분 석법 개발														20,000	계명대
7	염미성 펩타 이드의 맛 수 용체 활성화 작용 평가														31,000	한식연
8	지미성 펩타 이드에 대한 맛 수용체 활 성화 작용 평 가														32,000	한식연

제2절. 제1세부: 천연 염미성 펩타이드를 활용한 염미대체기술 확보 (KMF)

1. 재료 및 실험방법

가. 관능평가를 통한 염미성 최적 가수분해물 배합비의 선정

(1) 식물성 및 동물성 원료의 배합을 통한 가수분해물 조제

- 본 실험에 사용된 분리대두단백(Isolated Soy Protein, 이하 ISP)은 식품유형 두류가공품으로 대한제당(주)에서 구입하여 사용하였음.
- 가수분해 식물성 펩타이드 조제는 그림 1의 방법으로 진행되었으며 분리대두단백(Isolated soy protein)을 효소를 이용하여 단백질을 가수분해 하였으며, 그 분해물을 농축하여 동결건조(DRC-1000, Eyla, Japan)하였음.

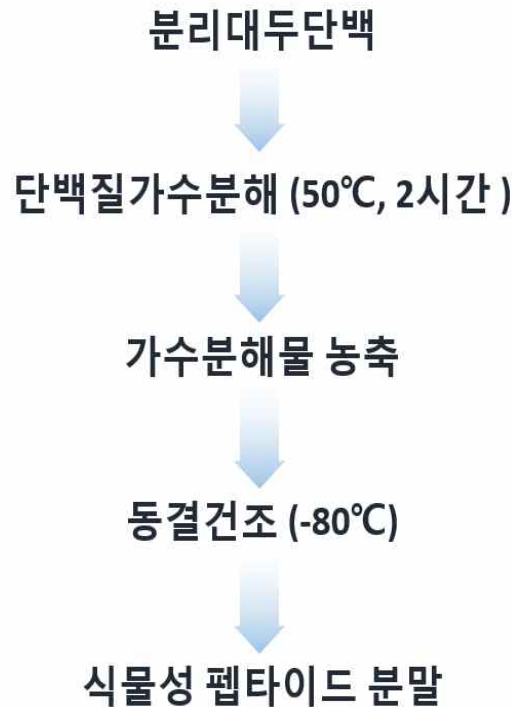


그림 1. 식물성 펩타이드 분말 공정

- 분리대두단백과 글루텐을 특정비율로 혼합하여 총 함량이 900 g이 되도록 함. 원재료에 정제수를 25배 첨가하고 KMF-14효소를 원재료의 0.3%가 되도록 첨가함. 잘 교반한 후에 50°C에서 2시간동안 가수분해 함. 농축단계에서는 60°C에서 90분 동안 농축하도록 하며, 정제수가 약 50%가 증발되도록 농축함. 보관을 위하여 총 부피의 4%의 양이 되도록 식초를 첨가하고, NaCl 을 33.33% 첨가하여 살균과정을 거침. 살균과정은 100°C에서 20분동안 진행하며, 살균이 완료되면 동결건조하여 분말화 함. 동결건조가 끝난 분말에

NaCl을 ISP와 글루텐의 총량의 200%(w/w)가 되도록 혼합하여 잘 섞어 보관함.

- 본 연구에 사용된 닭고기, 돼지고기, 소고기 효소가수분해물은 참여연구기관인 태경농산(주)에서 제공하였음.

(2) 품질특성 분석을 통한 최적 배합비의 선정

(가) 식물성 펩타이드 가수 분해물과 축산물의 배합을 통한 최적 배합비 선정

① 가수분해물 조성물의 관능평가

- 리커트 척도의 5점 척도를 사용하였음. ‘매우 좋음, 좋음, 보통, 나쁨, 매우 나쁨’으로 범주를 설정하여 ‘매우 좋음’을 5점, ‘좋음’을 4점, ‘보통’을 3점, ‘나쁨’을 2점, ‘매우 나쁨’을 1점으로 하여 점수 환산하였으며, 평균값이 가장 높은 실험 군을 최적배합비로 선정함

② 아미노산 분석을 통한 품질평가

- 유리아미노산 함량은 시료를 8,000 rpm에서 20분간 원심분리 후 상등액을 취해 0.45 μ m membrane filter (PVDF-2545, Chemco Scientific, Osaka, Japan)로 여과한 용액을 유리아미노산 측정시료로 사용하였으며, Amino Acid Analyzer (L-8900, Hitachi, Tokyo, Japan)로 분석하였음.
- 구성아미노산 함량은 시료를 500 mg 칭량하여 6 N HCl을 1 ml을 가해 질소로 충전한 후 110°C에서 24시간 동안 가수분해한 시료를 80°C에서 건조시킨 후 0.02 N HCl 1 ml을 가하여 잘 교반하며 추출한 후 0.45 μ m 필터(PVDF-2545, Chemco Scientific, Osaka, Japan)로 여과하여 0.02 N HCl로 희석하여 사용하였으며, Amino Acid Analyzer (L-8900, Hitachi, Tokyo, Japan)로 분석하였음.

③ 암모니아태 질소 분석을 통한 품질평가

- 아미노산성 질소 (NH₂-N)는 식품공전에 준하여 포르몰(Formol)적정법에 의하여 측정하였음. 시료 10 g에 증류수 100 ml을 가하여 균질화한 후 4,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 그 상등액을 시료로 사용하였으며, 상등액 5 ml에 formaldehyde 용액 10 ml를 가하여 0.1 N NaOH 용액으로 pH 8.3이 되도록 중화적정. 공시험은 상등액 대신 증류수 5 ml을 이용하였으며 그 값을 이용하여 보정하였음.

④ 이화학적 품질특성과 경제성 평가로 최적 배합비 선정

- 염도는 시료 10 g에 증류수 90 ml을 가하여 잘 교반 한 뒤 염분농도계(PAL-03S, ATAGO, Japan)를 사용하여 측정한 후 희석배수를 보정하였음. 수분함량은 균일하게 마쇄한 분말을 1.5 g~2 g 계량하여 105°C 적외선수분계(FD-220, Kett, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였음.

(3) 식물성 펩타이드 가수분해물의 감칠맛 상승을 위한 배합비 선정

- 식물성 펩타이드를 활용한 최적 배합비를 선정한 후, 경제성 및 관능적 품질을 고려하여 추가적인 배합비를 설정하였음. 감칠맛을 상승시키면서도 가격경쟁에서도 뒤처지지 않을 수 있는 소재를 선별하고자 하였으며, 효모추출물을 추가 부재료로 선정하였음. 시중에 판매되고 있거나, 시중 제품에 사용하고 있는 효모추출물을 선별하여 기존에 선정된 배합비에 적용하였으며 관능평가 결과에 따라 최적 배합비를 선정하였음.
- 효모의 경우 참여기업인 태경농산에서 2종을 제공하였고, 안산에 소재하고 있는 태경식품에서 효모추출물 2종을 구입하였으며, 효모로에서 출시하고 있는 효모추출물과 IC food에서 중국 Angel 사에서 수입하고 있는 효모추출물 (Yeast extract KA02)을 구입하여 사용함.
- 관능평가 방법으로는 리커트 척도의 5점 척도를 사용하였음. ‘매우 좋음, 좋음, 보통, 나쁨, 매우 나쁨’ 으로 범주를 설정하여 ‘매우 좋음’을 5점, ‘좋음’을 4점, ‘보통’을 3점, ‘나쁨’을 2점, ‘매우 나쁨’을 1점으로 하여 점수 환산하였으며, 평균값이 가장 높은 실험 군을 최적배합비로 선정함

나. 최적가수분해물의 생산 조건 설정

(1) Lab scale에서의 생산 효소 설정

- 본 실험에 사용된 효소는 현재 시판되는 Alcalase, Neutrase, Protex 40L, PTPF-1430 및 KMF-1 등의 5가지 효소를 사용하였음. Alcalase, Neutrase는 Novo사 (Novo Nordisk, Bagsvared, Denmark)에서 구입하여 사용하였고, Protex 40L, PTPF-1430 및 KMF-1은 (주)세인코퍼레이션에서 제공받아 사용하였음.
- 실험실용 가수분해에 사용된 진탕배양기(HB 205SWM, Hanbeak Scientific Co., Korea)에서 5개 효소의 최적 가수분해 조건인 50℃에서 0.5%로 2시간 가수분해 하였으며, 그에 따른 고형분함량을 비교하여 가장 저분자화가 되어 높은 고형분 함량을 가지는 실험군의 효소를 선정하였음
- 식물성 펩타이드 가수분해물 조제에 적합한 효소의 농도를 선정하기 위하여, 각 효소를 농도별로 처리하여 50℃에서 2시간 동안 가수분해하였으며, 고형분 함량이 가장 높은 실험군의 효소농도를 최종 선정하였음.

(2) 제조공정별 품질평가

- 품질평가 기준을 선정하기 위하여 ISP의 가수분해 전, 후의 성상을 비교하였음. 차이를 보이는 성상은 총고형분 함량으로 비교 할 수 있었음. 따라서, brix를 품질평가 지표로 선정하고 digital refractometer (PR-101, ATAGO Co., Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였음.
- 성상비교를 위하여 정제수에 ISP 10%를 첨가하여 대조구로 하고, 정제수에 ISP 10%첨가 후 KMF-14을 0.3%첨가하여 각각 50℃에서 2시간 가수분해 후 성상을 비교하였음.

다. 식물성 펩타이드 가수분해물과 수용성 식물성 펩타이드 가수분해물의 비교

(1) 수용성 식물성 펩타이드 제조

- 식물성 펩타이드를 제조하였으나 발효 원물 상태로 동결건조를 진행하였기 때문에, 수용성이 아니라는 단점을 보완하여 수용성 식물성 펩타이드 분말을 제조하고자 함. 그림 2에 도식화하였음.
- ISP 에 글루텐을 특정비율로 혼합하여 총 900 g이 되게 한 다음 분말 상태로 잘 섞음. 정제수 약 15배 넣어 호모믹서로 골고루 섞이게 한 다음, 효소 2.7 g을 넣어 교반함. 그런 다음 50°C의 항온수조(HB 205SWM, Hanbeak Scientific Co., Korea)를 이용하여 2 시간 동안 가수분해함.
- 가수분해 종료 후 재처리하여 분말 상태의 수용성 식물성 펩타이드 분말을 얻었음.
- 단가문제로 인하여 제품화, 산업화에는 일반 식물성 펩타이드 제조과정에 따른 분말이 이용되었으며, 수용성에 대한 니즈가 있는 곳에 수용성 식물성 펩타이드를 제공하고자 하였음.

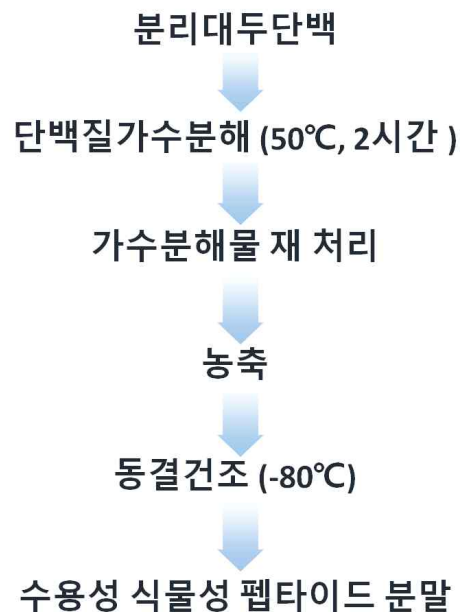


그림 2. 수용성 식물성펩타이드 분말 제조과정

(2) 수용성 식물성 펩타이드와 기존 펩타이드의 비교

(가) 유리아미노산 분석

- 유리아미노산 함량은 시료를 8,000 rpm에서 20분간 원심분리 후 상등액을 취해 0.45 μm membrane filter (PVDF-2545, Chemco Scientific, Osaka, Japan)로 여과한 용액을 유리아미노산 측정시료로 사용하였으며, Amino Acid Analyzer (L-8900, Hitachi, Tokyo, Japan)로 분석하였음.

(나) 구성아미노산 분석

- 구성아미노산 함량은 시료를 500 mg 칭량하여 6 N HCl을 1 ml을 가해 질소로 충전

한 후 110℃에서 24시간 동안 가수분해한 시료를 80℃에서 건조시킨 후 0.02 N HCl 1 ml을 가하여 잘 교반하며 추출한 후 0.45 μm 필터(PVDF-2545, Chemco Scientific, Osaka, Japan)로 여과하여 0.02 N HCl로 희석하여 사용하였으며, Amino Acid Analyzer (L-8900, Hitachi, Tokyo, Japan)로 분석하였음.

(다) 수용성 SAP의 사용량 설정

- 관능평가에 사용한 간장은 샘플 양조간장은 사용하였으며, 간장을 정제수로 15배 희석하여 관능평가용 용매로 사용하였으며, SAP는 0.01%~1.00%가 되도록 간장에 녹여 관능평가 샘플로 사용하였음.
- 리커트 척도의 5점 척도를 사용하였음. ‘매우 좋음, 좋음, 보통, 나쁨, 매우 나쁨’ 으로 범주를 설정하여 ‘매우 좋음’을 5점, ‘좋음’을 4점, ‘보통’을 3점, ‘나쁨’을 2점, ‘매우 나쁨’을 1점으로 하여 점수 환산하여 최적 사용량을 설정하였음.

2. 연구개발 수행결과

가. 관능평가를 통한 최적 가수분해물 배합비의 선정

(1) 식물성 및 동물성 원료의 배합을 통한 가수분해물 조제

(가) 식물성 펩타이드 가수분해물 조제

- 식물성 펩타이드 가수분해물 조제를 위하여 발효공정 과정에서 용이한 내열성 단백질 분해효소인 KMF-14을 선정하였음. 효소처리에 따른 식물성 펩타이드 가수분해물의 품질특성 결과는 표1에 나타내었음.
- 실험 조건은 50℃에서 0.5%로 2시간 가수 분해하였으며, 효소를 무첨가한 분리대두단백의 경우 총고형분 함량이 2.9%로 가수분해 전후가 차이가 없었지만, KMF-14효소에서 9.7±0.01%로 가장 높은 총 고형분 함량을 나타내었고 이어 Protex 40L에서 9.6±0.04, PTPF-1430에서 9.0±0.08%를 나타냄.

표 1. 효소 처리에 따른 식물성 펩타이드 가수분해물의 품질특성

효소제	가수분해 전 총 고형분 함량 (%)	가수분해 후 총 고형분 함량 (%)
Control		2.9±0.04
Alcalase		3.1±0.08
Neutrase	2.9±0.04	3.0±0.04
Protex 40L		9.6±0.04
PTPF-1430		9.0±0.08
KMF-14		9.7±0.01

1) Values are mean ± S.D. (n=3)

- 식물성 펩타이드 가수분해물 조제에 적합한 KMF-14의 사용농도 설정을 위하여 50℃에서 2시간 동안 효소처리농도에 따라 가수 분해하여 그 품질특성을 파악하였음. 그 결과는 표 2와 같음. 0.3%, 0.4%의 KMF-14 처리구에서 총고형분 함량 9.6±0.01%로 가장 높은 함량을 보였으며, 0.3%와 0.4% 농도에 따라 총고형분 함량의 차이가 없으므로, 효소의 처리 농도는 0.3%로 설정.

표 2. 효소처리농도에 따른 식물성 펩타이드 가수분해물의 품질특성

효소처리농도 (%, w/v)	총 고형분 함량 (%)
0	2.9±0.04
0.1	4.8±0.10
0.2	6.9±0.07
0.3	9.6±0.01
0.4	9.6±0.01

¹⁾Values are mean ± S.D. (n=3)

- 대두분리단백에 효소처리 하여 그림3과 같은 식물성 펩타이드 가수분해물을 조제하였음.

(나) 동물성 펩타이드 가수분해물 조제

- 식염이 첨가된 동물성 원료인 닭고기 효소분해물, 돼지고기 효소분해물, 소고기 효소분해물은 태경농산에서 제공하였으며 그림 4와 같음.



그림 3. 식물성 엽미펙타이드

- 태경농산에서 보유한 효소를 활용하여 가수분해함.



그림 4. 식염이 첨가된 닭고기, 소고기 가수분해 분말

- 제공받은 닭고기 효소분해물, 소고기 효소분해물, 돼지고기 효소분해물의 분말을 활용하여 케이엠에프에서 제조된 식물성 펩타이드 가수분해물과 배합하였으며, 그 배합비에 따른 관능평가를 실시하였으나, 염의 첨가로 인하여 정확한 관능평가가 불가능하였음
- 따라서 축산물을 활용한 효소분해물을 태경농산에서 무염상태로 제조하여 제공받았으며, 그림 5에 나타내었음.



그림 5. 무염상태의 축산물을 활용한 효소분해물

(다) 식물성 펩타이드 가수분해물과 소고기 부산물 가수분해물 혼합조제

- 식물성가수분해물이 0.006%가 첨가된 1% 소금용액에 무염 상태의 소고기 부산물 가수분해물을 1% 첨가하여 관능평가 하였으며, 관능평가를 했을 때 특유의 향과 맛이 강하여, 최소량을 첨가한다고 하여도 관능적으로 문제가 있어 보이며 총고형분 함량은 40%으로 나타내었음.

(라) 식물성 펩타이드 가수분해물과 닭고기 부산물 가수분해물 혼합조제

- 식물성가수분해물이 0.006%가 첨가된 1% 소금용액에 무염 상태의 닭고기 부산물 가수분해물을 1% 첨가하여 관능평가 하였으며, 닭고기 효소분해물이 다른 축산물 가수분해물보다 관능적으로 가장 우수하였음. 사용된 닭고기 효소분해물은 총 고형분 함량이 40%를 나타내었음.

(마) 식물성 펩타이드 가수분해물과 돼지고기 부산물 가수분해물 혼합조제

- 식물성가수분해물이 0.006%가 첨가된 1% 소금용액에 무염 상태의 돼지고기 부산물 가수분해물을 1% 첨가하여 관능평가 하였으며, 돼지고기 부산물 가수분해물의 경우 특유의 역한 향과 맛이 강했으며, 사용량을 최소화하여도 맛의 마스킹에 문제가 있어 보인다고 판단 됨. 돼지고기 부산물 가수분해물은 총 고형분 함량이 40%를 나타내었음.

(2). 품질특성 분석을 통한 최적 배합비의 선정

(가) 식물성 펩타이드 가수분해물과 축산물의 배합을 통한 최적 배합비 선정

① 가수분해물 조성물의 관능평가로 선정

- 제조된 식물성 펩타이드를 활용하여 간장 베이스로 관능평가를 수행하였음. 간장 10배 희석액을 이용하였으며, 실험구간은 표 3에 나타내었음

표 3. 식물성 펩타이드 가수분해물 첨가량 구간

실험구간	식물성 펩타이드 가수분해물 첨가량 (%)
(A)	대조구
(B)	0.002
(C)	0.004
(D)	0.006
(E)	0.008

- 실험결과 식물성 펩타이드 가수분해물을 간장 10배 희석액에 0.006% 첨가시 염미성 증진에 효과가 있음을 확인하였으며, 그 상세 결과는 표 4와 대조구에 비하여 유의적으로 염미, 무게감, 지미가 확연히 상승되었고, 특히 0.006%~0.008% 식물성 펩타이드

가수분해물 처리구간에서 염미, 무게감, 지미강도가 유의적으로 높게 나타남. 이는 염미성 강화 및 부스팅 효과에 유리할 것으로 판단됨

표 4. 식물성 펩타이드 가수분해물의 처리농도 구간에 따른 관능평가

Sample	Salty taste intensity	Body intensity	Umami taste intensity
(A)	3.14±0.64	2.63±0.60	2.86±1.01
(B)	3.71±0.60	3.71±0.60	3.71±0.93
(C)	4.00±0.39	3.37±0.59	3.71±0.78
(D)	4.43±0.60	4.21±0.51	4.46±0.31
(E)	4.29±0.00	3.60±0.51	4.29±0.51

¹⁾Values are mean ± S.D. (n=7)

- 염미성 부스팅 효과를 확인 및 식물성 펩타이드 가수분해물의 최소 및 최대 영향 농도를 확인하기 표 5와 같이 1%의 식염용액(한주소금)에 식물성 펩타이드 가수분해물을 농도별 각각 첨가하여 관능평가를 수행하였음.

표 5. 식물성 펩타이드 가수분해물의 처리농도 구간

실험구간	식물성 펩타이드 가수분해물 첨가량 (%)
(A)	0.000
(B)	0.002
(C)	0.004
(D)	0.006
(E)	0.008
(F)	0.010

- 표 5의 실험구간에 따른 관능평가 결과는 그림 6과 같으며, 0.006%에서 염미성 증진에 효과가 있음을 확인하였음. 농도에 따라 염미 증진 정도가 비례하지만, 0.006% 이상 첨가구에서는 큰 차이가 없다고 판단됨.

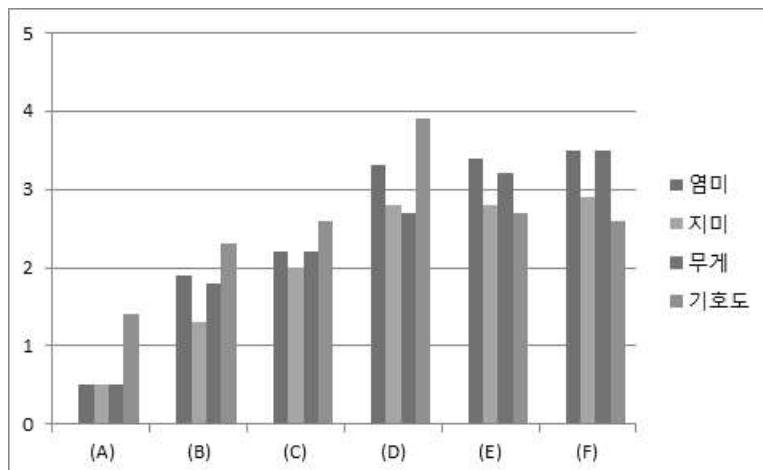


그림 6. 식물성 펩타이드 가수분해물의 처리 농도구간에 따른 1% 소금용액의 관능평가 기호도

- 표 5의 실험구간에 따라 염도를 측정된 결과는 표 6과 같음. 식물성 펩타이드 가수분해물 함량이 0.01%까지는 염도에서는 큰 차이가 없음을 확인하였음. 염도는 상승하지 않으면서 염미, 지미, 무게, 기호도가 상승하는 효과가 있음.

표 6. 식물성 펩타이드 가수분해물의 처리농도에 따른 1% 소금용액의 염도

실험구간	염도 (%)
(A)	1.10
(B)	1.10
(C)	1.10
(D)	1.10
(E)	1.10
(F)	1.10

- 식염이 첨가된 동물성원료와 식물성 펩타이드를 배합하여 관능평가를 수행하여 배합비를 찾고자 하였으나, 두 원료 모두 식염을 포함하고 있으므로, 염도가 큰 원료의 함량 증가와 관능적 기호도가 비례 하였으므로, 무염 소재의 축산물 소재 가수분해물을 이용하여 실험을 진행하고자 하였음.
- 식물성 가수분해물이 0.006%가 첨가된 1% 소금용액에 무염 상태의 축산물을 각각 1% 첨가하여 관능평가 하였으며, 닭고기 효소분해물이 관능적으로 가장 우수하였음. 사용된 닭고기 효소분해물은 총고형분 함량이 40%를 나타내었음.
- 선정된 닭고기 효소분해물 첨가량에 따라 염도를 측정하였으며, 그 결과는 표 7과 같음. 식물성 펩타이드 가수분해물 함량에 따라 염도가 차이가 났으며, 닭고기 효소분해물이 무염으로 제조되었으므로, 그 농도 차이에 따른 염도 변화는 없었음.

표 7. 식물성 펩타이드 가수분해물과 무염 닭고기 효소분해물 배합에 따른 염도

식물성 펩타이드 가수분해물 농도 (%)	무염 닭고기 효소분해물함량 (%)			
	0.1	0.5	1	2
1	0.7	0.7	0.7	0.7
1.5	1.1	1.1	1.1	1.1
2	1.4	1.4	1.4	1.4

- 닭고기 효소분해물 첨가량에 따라 구성된 배합비에 대하여 실시한 관능평가 결과는 표 8과 같으며, 종합적 기호도가 식물성펩타이드 가수분해물 1.5%에, 무염 닭고기 효소분해물 1.0%의 농도로 첨가 시에 4.33으로 가장 높았음.

표 8. 식물성 펩타이드 가수분해물과 무염 닭고기 효소분해물 배합에 따른 종합적 기호도

식물성 펩타이드 가수분해물 함량(%)	무염 닭고기 효소분해물함량 (%)			
	0.1	0.5	1	2
1	1.00	1.00	1.33	1.33
1.5	1.67	1.67	4.33	4.00
2	2.33	2.67	3.00	2.67

○ 관능평가 기호도 평가에 따른 그래프는 그림 7과 같음.

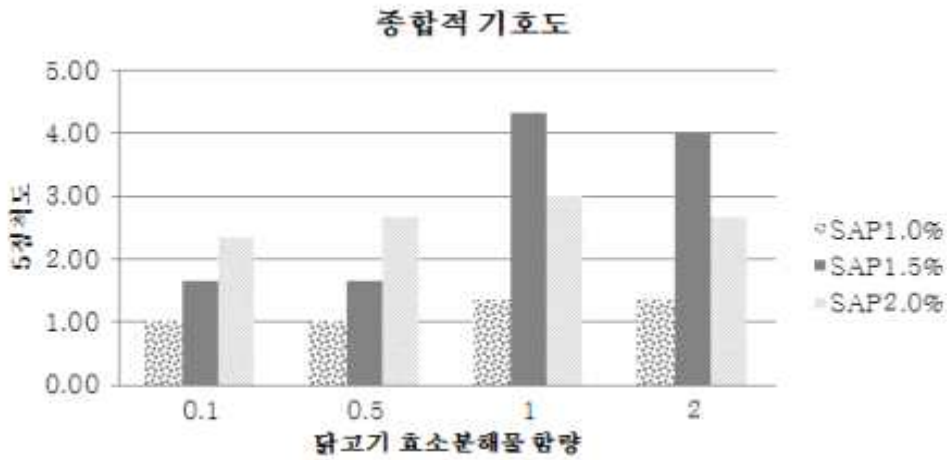


그림 7. 식물성 펩타이드 가수분해물과 무염 닭고기 효소분해물 배합에 따른 종합적 기호도

○ 최종적으로 식물성 펩타이드 가수분해물 1.5%와 닭고기 효소분해물 1%함량에서 가장 높은 기호도를 나타내었으며, 최종배합비는 표 9와 같이 식물성 펩타이드 가수분해물 60%와 닭고기 효소분해물 40%로 설정되었음.

표 9. 농·축부산물을 활용한 염미소재 배합비

원 료	함량 (%)
식물성 펩타이드가수분해물	60
닭고기 효소분해물	40

○ 추후 식물성, 동물성 가수분해물의 배합을 보완을 위하여 효모베이스를 추가 선택 함. 효모 엑기스는 태경농산에서 제조하여 제공하였으며, 그 제품의 성상 및 총 고형분 함량은 표 10에 나타내었음.

표 10. 태경농산에서 제공한 효모엑기스의 특성

	태경농산 효모 엑기스1	태경농산 효모 엑기스2
제품성상		
총 고형분 함량 (%)	88	80
Glutamic acid 함량(%)	2.041	1.947

- 태경농산 효모 엑기스 중 총 고형분 함량 및 glutamic acid 함량이 높은 것을 2종 선정하여 기존에 확립된 최종 배합비에 적용하여 최적 배합비를 수립하고자 하였으며, 그 배합비에 따른 실험구간은 표 11에 나타내었음.

표 11. 식물성, 동물성 가수분해물과 효모엑기스 배합비에 따른 실험구간

단위 %	(A) (효모0.1%)	(B) (효모0.2%)	(C) (효모0.5%)	(D) (효모1%)
태경농산 효모 엑기스	0.1	0.2	0.5	1
식물성 펩타이드가수분해물	1.5	1.5	1.5	1.5
태경농산 닭효소분해물	1	1	1	1
정제수	97.4	97.3	97	96.5
합계	100	100	100	100

- 각 배합비에 따른 실험구간의 염도는 표 12에 나타내었으며, 염도는 효모의 함량과 비례 함

표 12. 배합비가 다른 시험구간에 따른 염도

	염도(%)			
	(A)	(B)	(C)	(D)
	(효모0.1%)	(효모0.2%)	(효모0.5%)	(효모1%)
태경농산 효모 엑기스1	1.7	1.8	2.1	2.4
태경농산 효모 엑기스2	1.7	1.8	2.0	2.4

- 각 배합비에 따른 관능평가 결과 시험구간 (C)가 최종 선정되었으며, 천연소재를 활용한 가수분해물의 최적의 배합비는 표 13과 같이 선정되었음.

표 13. 가수분해물을 활용한 최적 배합비

원료	비율
식물성 펩타이드가수분해물	1.5
닭고기 효소분해물	1.0
효모엑기스	0.5

② 질소함량 및 조단백질 함량을 통한 품질평가로 선정

- 식물성 펩타이드 가수분해물의 질소함량 및 조단백질 함량을 분석하였으며, 그 결과는 표 14와 같음. 식물성 펩타이드 가수분해물은 질소함량은 6.6%이고, 조단백질 함량은 41.27% 측정되었고, 효모 엑기스는 질소함량은 11.7%이고, 조단백질 함량은 69.78%로 측정됨.

표 14. 식물성 펩타이드 가수분해물 총 질소함량(%) 및 조단백질 함량(%)

구분	식물성 펩타이드 가수분해물	효모 엑기스
질소함량(%)	6.60	11.70
조단백질 함량(%)	41.27	69.78

③ 아미노산 분석을 통한 품질평가로 선정

- 식물성 펩타이드 가수분해물의 구성아미노산을 평가하였으며, 그 결과는 표 15와 같다. Aspartic acid 및 glutamic acid 함량이 각각 179.38 mg/g, 69.19 mg/g 으로 타 아

미노산에 비해 높은 함량을 보임.

표 15. 식물성 펩타이드가수분해물의 구성 아미노산 결과

구분	함량 (mg/g)	함량 (mole)	
Non polar	Alanine	8.40	0.0942
	Glycine	6.80	0.0905
	Isoleucine	11.34	0.0865
	Leucine	37.89	0.2888
	Methionine	ND	ND
	Proline	12.36	0.1073
	Valine	8.37	0.0714
Polar	Serine	9.30	0.0885
	Threonine	5.38	0.0451
	Cystein	3.38	0.0141
Basic	Lysine	36.40	0.2490
	Arginine	0.02	0.0001
	Histidine	15.04	0.0969
Acid	Aspartic acid	179.38	1.3477
	Glutamic acid	69.19	0.4703
Aromatic	Phenylalanine	43.19	0.2615
	Tyrosine	0.01	0.0001
Total amino acid contents		446.42	3.312

○ 식물성 펩타이드 가수분해물의 유리아미노산을 분석하였으며, 그 결과는 표 16에 나타내었음.

표 16. 식물성 펩타이드 가수분해물의 유리아미노산 함량

구분		함량 (mg/g)	함량 (mole)
Non-polar	Alanine	5.333	0.060
	Glycine	18.059	0.240
	Isoleucine	5.967	0.045
	Leucine	9.589	0.073
	Methionine	2.412	0.016
	Proline	1.281	0.011
	Valine	4.913	0.042
Polar	Serine	1.776	0.017
	Threonine	3.458	0.029
	Cystein	ND	ND
Basic	Lysine	27.411	0.187
	Arginine	18.689	0.107
	Hstidine	2.312	0.015
Acid	Aspartic acid	4.515	0.034
	Glutamic acid	0.980	0.007
Aromatic	Phenylalanine	7.537	0.046
	Tyrosine	5.731	0.032
	Ethanol amine	2.137	0.035
	α -amino-n-butyr ic acid	1.422	0.014
	β -aminoisobutyri c acid	19.970	0.194
Total amino acid contents		143.49	1.2

- 닭고기 효소분해물의 유리아미노산을 분석 하였으며, 그 결과는 표 17에 나타내었음. 닭고기 효소분해물의 유리아미노산 및 식물성 펩타이드 가수분해물의 아미노산 함량 중 라이신, 히스티딘, 아르기닌 함량을 아스파르트산, 글루타민산의 비율을 확인했을 때 닭고기 효소분해물이 식물성 펩타이드 가수분해물의 비율을 보정하여 감칠맛을 상승 시켜줄 것으로 예상됨.

표 17. 닭고기 효소분해물의 유리아미노산 아미노산 함량

구분	함량 (mg/g)	함량 (mole)	
Non polar	Alanine	85.212	0.9564
	Glycine	28.650	0.3815
	Isoleucine	72.509	0.5527
	Leucine	156.736	1.1946
	Methionine	51.367	0.3443
	Proline	31.319	0.2721
	Valine	75.471	0.6439
Polar	Serine	37.339	0.3553
	Threonine	60.936	0.5116
	Cystein	17.756	0.0739
Basic	Lysine	125.297	0.8570
	Arginine	109.201	0.6269
	Histidine	32.576	0.2099
Acid	Aspartic acid	78.177	0.5874
	Glutamic acid	139.584	0.9489
Aromatic	Phenylalanine	87.830	0.5317
	Tyrosine	32.047	0.1769
Total amino acid contents		1222.006	9.2248

④ 암모니아태 질소 분석을 통한 품질평가로 선정

○ 식물성 펩타이드 가수분해물의 암모니아태 질소를 분석하였으며, 그 결과는 표 18에 나타내었다. 생산 제조 공정 확립 전, 후의 함량을 비교 해봤을 때 생산 제조 공정 확립 전 함량이 442.2 mg%, 생산 제조 공정 확립 후 1,092.7 mg%, 수용성 식물성 펩타이드 가수분해물 1,841.5 mg%으로 생산 제조 공정이 확립 후 4.1 배가 증가됨.

표 18. 원료의 암모니아태 질소 함량 (mg%)

원료	암모니아태 질소 함량
생산 제조 공정 확립 전	442.2
생산 제조 공정 확립 후	1092.7
수용성 식물성 펩타이드 가수분해물	1841.5

⑤ 이화학적 품질특성과 경제성 평가로 최적 배합비 선정

○ 각 원료에 대한 품질특성 조사 결과는 표 19에 나타내었음.

표 19. 원료의 수분함량

원 료	수분함량(%)
식물성 펩타이드 가수분해물	1.2
닭고기 효소분해물	41.1




(3) 식물성 펩타이드 가수분해물의 감칠맛 상승을 위한 배합비 선정

○ 농·축부산물물을 배합하여 활용하였을 때, 경제성이 다소 떨어진다고 판단하여, 단가를 절감할 수 있는 방법으로써 식물성 펩타이드 가수분해물을 적극 활용하고자 함. 그 방법으로 식물성 펩타이드 가수분해물에 미량을 첨가하여 식물성 펩타이드 가수분해물의 감칠맛을 부스팅 할 수 있는 소재를 찾고자 하였으며, 그 소재로써 효모 추출물 혹은 효모 베이스 등 효모를 기본으로 하는 파우더 형태의 소재가 채택되었음

(가) 효모추출물의 선정

○ 태경농산에서 제공한 두 종류의 효모엑기스와 시중에 판매하는 샘플을 확보하였음. 그 효모 베이스 제품들의 특성은 표 20와 같음.

표 20. 효모 관련 제품의 특성

판매사	성상	수분함량 (%)	염도 (%)
태경농산1		6.0	7.8
태경농산2		4.4	7.7.
태경식품1		5.3	9.2

태경식품2



3.3

9.3

효모로



5.8

8.2

IC food



3.9

2

○ 각 효모베이스에 따른 아미노산함량을 조사하였으며, 그 내용은 표 21과 같음.

표 21. 효모 관련 제품의 아미노산 특성

구분 (Mole)		태경농산1	태경농산2	태경식품1	태경식품2	효모로	IC food
Non-polar	Alanine	0.24	0.31	0.22	0.17	0.12	0.71
	Glycine	0.07	0.06	0.06	0.05	0.01	0.12
	Isoleucine	0.08	0.08	0.04	0.04	0.02	0.14
	Leucine	0.14	0.15	0.07	0.07	0.03	0.23
	Methionine	0.03	0.03	0.02	0.01	0.01	0.05
	Proline	0.04	0.06	0.02	0.06	0.01	0.08
	Valine	0.12	0.11	0.06	0.06	0.03	0.19
Polar	Serine	0.08	0.08	0.04	0.05	0.01	0.13
	Threonine	0.07	0.07	0.04	0.04	0.01	0.11
	Cystein	ND	0.01	ND	ND	ND	0.01
Basic	Lysine	0.08	ND	ND	0.44	0.20	4.09
	Arginine	0.07	0.00	0.03	0.04	0.02	0.11
	Histidine	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.02
Acid	Aspartic acid	0.08	0.07	0.05	0.09	0.03	0.12

	Glutamic acid	0.14	0.13	0.09	0.11	0.08	0.23
	Phenylalanine	0.07	0.07	0.03	0.03	0.01	0.11
	Tyrosine	0.04	0.04	0.02	0.02	0.01	0.06
Aromatic	Ethanol amine	ND	ND	ND	0.00	ND	ND
	α -amino-n-butyracacid	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	β -aminoiso butyracacid	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.03

- 확보된 효모추출물 중 식물성 펩타이드 가수분해물과 가장 배합이 원활한 소재를 찾기 위하여 액기스 형태의 제품은 동결건조, 스프레이건조를 통하여 파우더 형태로 다시 제조하였음. 파우더 형태에서도 흡습성이 강하여 배합에 사용할 수 없었으며, 파우더 형태로 판매가 되는 그림 8에 나타난 아이씨푸드(IC food)를 최종 선택하였음.

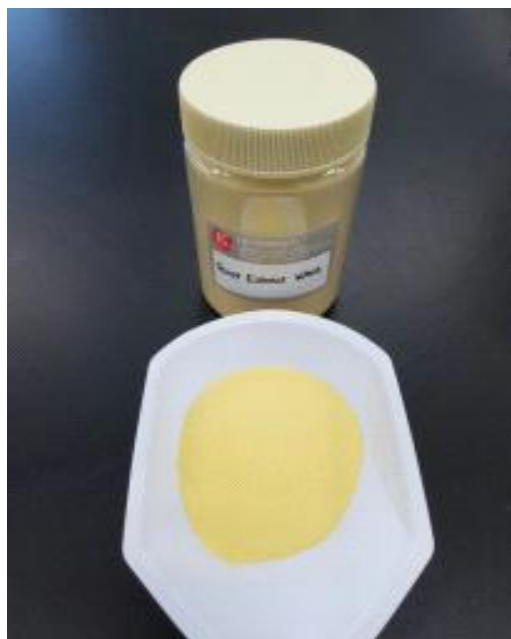


그림 8. 아이씨푸드(IC food) 효모 추출물

- 그림 9는 아이씨푸드 효모제품의 스펙을 나타냄. 다음 그림에서처럼 아이씨푸드 효모추출물은 NaCl 함량이 2.0% 이하이며, 수분함량이 6.0% 이하이다. 식물성 펩타이드의 수분함량은 1.2% 수준으로 배합에 적합하여, 또한 두 원료 모두 건조하고 선선한 곳에서 저장되어야 하므로 그 또한 적합하다고 볼 수 있음.
- 식물성 펩타이드 가수분해물은 유통기한이 제조일로부터 36개월로 설정되어있으나, 아이씨푸드(IC Food)효모추출물은 18개월로 차이를 보이고 있어 배합한 시료의 유통기

한설정이 필요할 것으로 생각되어짐.



ANGEL YEAST CO., LTD.
168 Chengdong Avenue, Yichang, Hubei, China.

SPECIFICATION

PRODUCT NAME: Angel yeast extract KA02

Specific Properties

Visual Description	Light yellow to yellow, powder
Odour	Typical smell of yeast extract
Total nitrogen(on dry)	More than 10.0%
Amino nitrogen(on dry)	More than 4.0%
Moisture	Less than 6.0%
NaCl	Less than 2.0%
PH value	Between 4.5 and 6.5(2% aqueous solution)

Heavy Metals

Lead	Less than 2.0 mg/kg
Arsenic	Less than 2.0 mg/kg

Microbiological Specification

Aerobic count	$\leq 1 \times 10^4$ cfu/g
Coliforms	≤ 30 MPN/ 100g
Salmonella	Not Detected
Staphylococcus aureus	Not Detected
Shigella	Not Detected

Ingredients

Yeast extract

Packaging

20kg/bag
outside packing: kraft paper bag
inside packing : PE bag

Storage

Cool and dry place

Shelf time

18 Months

Angel Yeast Co., Ltd.
address: 168 Chengdong Avenue, Yichang, Hubei, China. 443003
Tel: 86-717-6368964
E-mail: zhaowx@angelyeast.com web site: <http://www.angelyeast.com>

그림 9. 아이씨푸드(IC food) 효모추출물 정보

(나) 효모추출물과의 배합을 통한 감칠맛 상승

- 조사 된 효모베이스 제품 중 배합에 가장 적합한 성상을 가진 (식물성 펩타이드 가수분해물과 가장 배합이 잘 되는) 효모베이스 (IC Food)를 선정하여 식물성 펩타이드 가수분해물과 배합하여 관능평가를 진행하였으며, 식물성 펩타이드 가수분해물을 대조

구로 하였을 때, 효모추출물 2%가 첨가 된 실험구에서 감칠맛을 많이 낸다는 것을 확인하였음.

- 최종으로 선정 된 배합비는 표 22과 같으며, 식물성 펩타이드 가수분해물 98%, 아이씨푸드(IC Food)효모추출물 2%를 파우더끼리 섞어 핸드믹서로 혼합하였음.

표 22. 식물성펩타이드 가수분해물 부스팅을 위한 최적 배합비

원료	(%)
식물성펩타이드 가수분해물	98
아이씨푸드 효모추출물	2

- 관능평가는 최종 염도가 1~2% 이내가 되도록 진행하였으며, 배합한 파우더를 물에 1.5% 희석하면 관능평가에 적절한 염도가 됨을 확인하였음. 그 결과는 표 23에 나타내었다. 또한 식물성펩타이드 가수분해물로써 100%인 파우더를 대조구로 하였을 때, 효모추출물을 첨가한 실험군과 염도 차이는 없다는 것을 확인할 수 있었음.

표 23. 효모추출물과 식물성 펩타이드 가수분해물 배합파우더 농도에 따른 염도

배합 파우더 첨가량 (%)	염도 (%)	
	A	대조구
1.0	0.5	0.6
1.5	1.0	1.1
2.0	1.3	1.3

나. 최적가수분해물의 생산조건 설정

(1) Lab scale에서의 생산 효소 설정

- 표 1, 표 2 실험 내용에 따라 내열성이 강하고, 단백질 분해능력이 강한 KMF-14 효소를 선정하였으며, KMF-14 효소의 처리농도는 0.3%, 가수분해 온도 50℃, 가수분해 시간 2 시간으로 최적 조건 설정하였음.

(2) 제조공정별 품질평가

- Lab scale에서 제조한 식물성 펩타이드 가수분해물의 제조공정도는 그림 10과 같음.

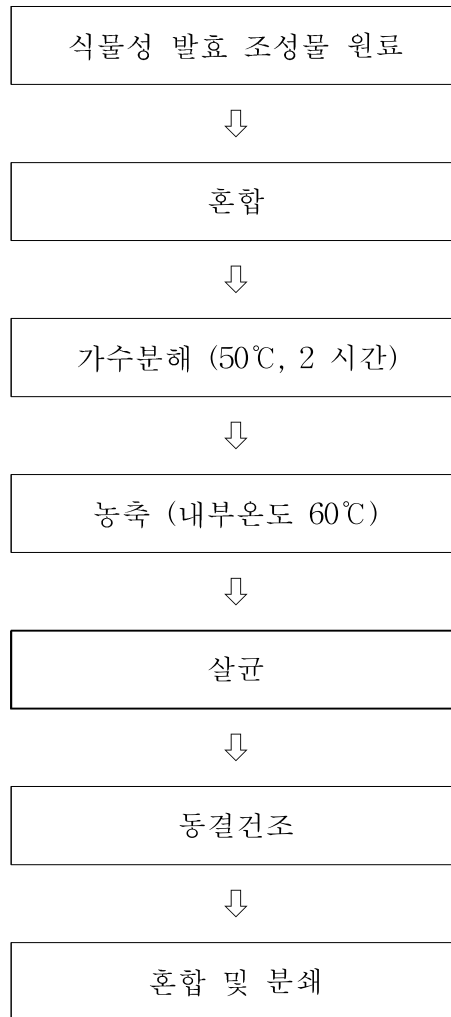


그림 10. Lab scale의 식물성 펙타이드 가수분해물 제조공정도

- 분리대두단백의 가수분해 전후의 성상이 그림 11와 같이 달라짐에 따라 총 고형분 함량을 각 공정에 따른 품질평가 기준으로 선정하였음.



(가수분해 전)

(가수분해 후)

그림 11. 가수분해 전후에 따른 분리대두단백의 성상

- 각 제조공정에 대한 평가 수준은 표 24에 나타내었음.

표 24. 각 제조공정에 따른 품질 평가

공정순서	총 고형분 함량 (%)	염도 (%)
재료혼합 후	3.0	-
가수분해 후	5.2	-
농축 후	10.8	-
기타재료 혼합	14.8	1.1
동결건조	48시간 이상 진행	
분쇄	입도 균일에 주의	

(3) 염미성 펩타이드 조성물로서의 표준화 지표 설정

- 염미성 펩타이드 조성물의 Glutamic acid 함량을 표준화 지표로 설정하기 위해 다양한 시도를 했으나, 가수분해의 특성상 유리아미노산 함량의 편차가 크다. 이를 해결할 방안을 모색하거나, 다른 지표 설정을 위한 조사가 필요할 것으로 사료 되어짐.
- 식물성 펩타이드 가수분해물 혹은 축산물과의 배합을 통한 조성물에 대하여 그 기준 및 규격은 식품의 기준 및 규격 (2016.12.29.전부개정기준) > 제4. 식품별 기준 및 규격 > 12-2소스류>(4)복합조미식품을 따르며 그 내용은 다음과 같음.

12-2 소스류

(4) 복합조미식품

1) 정의

식품에 당류, 식염, 향신료, 단백가수분해물, 효모 또는 그 추출물, 식품첨가물 등을 혼합하여 분말, 과립 또는 고형상 등으로 가공한 것으로 식품에 특유의 맛과 향을 부여하기 위해 사용하는 것을 말한다.

2) 규격

- (1) 수분(%) : 8.0 이하(복합조미식품에 한한다.)
- (2) 대장균군 : n=5, c=1, m=0, M=10(살균제품에 한한다)
- (3) 대장균 : n=5, c=2, m=0, M=10(비살균제품에 한하며, 복합조미식품은 n=5, c=2, m=0, M=10으로 한다.)
- (4) 세균수 : n=5, c=0, m=0(멸균제품에 한한다.)
- (5) 타르색소 : 검출되어서는 아니 된다.
- (6) 보존료(g/kg) : 다음에서 정하는 것 이외의 보존료가 검출되어서는 아니 된다.

파라옥시안식향산메틸 파라옥시안식향산에틸	0.2 이하(파라옥시안식향산으로서, 소스에 한한다.)
소브산 소브산칼륨 소브산칼슘	0.5 이하(소브산으로서, 토마토케첩에 한한다.)

6) 시험방법

(1) 수분

제7. 일반시험법 2. 식품성분시험법 2.1.1 수분에 따라 시험한다.

(2) 대장균군

제7. 일반시험법 4. 미생물시험법 4.7 대장균군에 따라 시험한다.

(3) 대장균

제7. 일반시험법 4. 미생물시험법 4.8 대장균에 따라 시험한다.

(4) 세균수

제7. 일반시험법 4. 미생물시험법 4.5.1 일반세균수에 따라 시험한다.

(5) 타르색소

제7. 일반시험법 3.4 착색료에 따라 시험한다.

(6) 보존료

제7. 일반시험법 3.1 보존료에 따라 시험한다.

(4) Pilot scale에서의 생산 및 품질 평가

○ Pilot scale에서의 생산 공정 도 및 조건은 그림 12에 나타내었음.

그림 12. Pilot scale 에서의 제조공정도 및 제조 조건

원료 혼합	*lab : 소량으로 배합하여 Brix 측정 유무 및 성상 파악 *생산: pilot 생산 증자술 1 개 분량
가수 분해	*lab: 소량으로 배합하여 Brix 측정 유무 및 성상 파악
효소실활 (효소 활성 종료)	*lab: 가수분해가 끝난 sample 실활하여 brix측정
농축	*lab: 효소 실활 후 증탕하여 50% 농축 후 brix 측정
식초 및 NaCl혼합	*lab: 혼합 후 sample 채취 및 brix 측정
살균	*lab:brix측정
소분 및 이송	*lab: sample 채취 및 brix 측정 *생산: 3회 pilot 생산
동결 건조 후 균일성 test	*생산: 균일성test에서 맛이 균일하지 않다면 농축 후 방치 4 hr하여 3회 pilot생산
방치test	
동결 건조 후 균일성 test	*생산: 3회 pilot 생산

▼ 검토	
▼ 본생산	

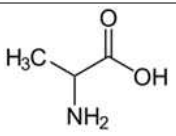
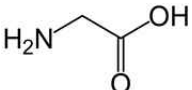
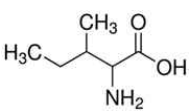
다. 식물성 펩타이드 가수분해물과 수용성 식물성 펩타이드 가수분해물의 비교

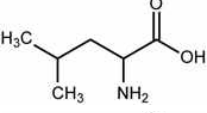
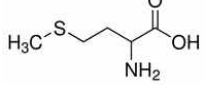
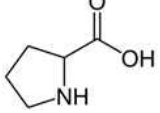
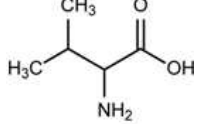
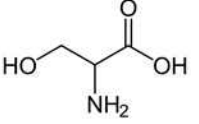
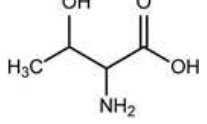
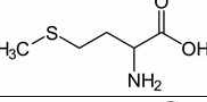
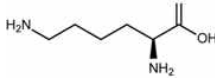
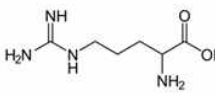
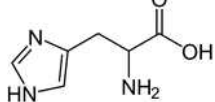
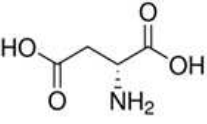
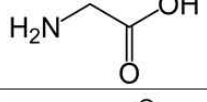
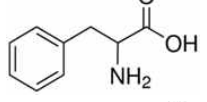
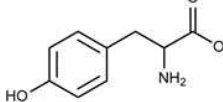
(1) 수용성 식물성 펩타이드와 기존 펩타이드의 비교

(가) 유리아미노산 분석

- 맛은 단맛, 짠맛, 신맛, 감칠맛, 쓴맛으로 나눌 수 있음. 짠맛은 나트륨의 이온, 신맛은 수소이온의 맛이므로 단맛, 감칠맛, 쓴맛이 아미노산이 가지는 맛이라 볼 수 있음. 맛 물질은 대개 물에 잘 녹으면 단맛을 띠는 경우가 많고, 물에 약간 녹는 경우 쓴맛인 경우가 많음. 아미노산 중에 분자량이 작거나, 친수기(-OH)가 있는 아미노산은 단맛으로 볼 수 있음.
- 산성아미노산은 물에서 전기적 반발력으로 잘 녹을 수 있음. Glutamic acid와 aspartic acid가 유일한 산성아미노산이며, 이것이 감칠맛을 나타냄. glutamic acid는 aspartic acid 보다는 분자량이 크고 길이가 길어 감칠맛 또한 3배 이상이 강함. 따라서 glutamic acid 함량이 높을수록 감칠맛이 높다고 할 수 있음.
- 앞서 제조되었던 복합조미식품에 해당되는 식물성 펩타이드 가수분해물에 염을 첨가한 SAP(이하 기존SAP)와 새롭게 제조된 수용성 분말인 수용성 SAP의 유리아미노산 함량을 분석하였으며 그 결과 표 25와 같음. 유리아미노산 양이 수용성 SAP가 541.43 mg/g 으로 기존에 제조된 SAP 115.60 mg/g 보다 약 4.7배가 증가되었음. 수용성 SAP는 약 60%의 다른 부산물이 첨가된 기존 SAP에 비하여 유리아미노산 함량이 높으며, 각 아미노산 별 증가 배수를 확인 하였을때 불용성 SAP 대비 관능이 우수 할 것이라 판단 됨.

표 25. 기존 SAP 및 수용성 SAP의 유리아미노산 비교

구분 (Mole)	분자량 (M.W)	구조식	맛	기존 SAP	수용성 SAP	증가배수
Alanine	89.09		단맛	0.060	0.407	6.81
Glycine	75.07		단맛	0.240	0.136	0.56
Non-polar						
Isoleucine	131.17		쓴맛	0.045	0.188	4.13

	Leucine	131.17		쓴맛	0.073	0.532	7.28
	Methionine	149.20		쓴맛	0.016	0.137	8.47
	proline	115.13		쓴맛	0.011	0.059	5.29
	valine	107		쓴맛	0.042	0.309	7.38
Polar	Serine	105.09		단맛	0.017	0.142	8.42
	Threonine	119.12		단맛	0.029	0.130	4.49
	Cystein	121.15		-	ND	ND	ND
Basic	Lysine	146.19		쓴맛	0.128	0.353	2.76
	arginine	174.20		쓴맛	0.157	0.457	2.91
	histidine	155.16		쓴맛	0.015	0.098	6.59
Acid	aspartic acid	133.1		감칠맛	0.034	0.078	2.31
	glutamic acid	147.13		감칠맛	0.007	0.119	17.90
Aromatic	phenylalanine	165.19			0.046	0.396	8.69
	Tyrosine	181.19			0.032	0.01	5.03
Total amino acid contents (mole)					0.952	3.703	3.89

○ 아미노산에 따른 맛의 변화에 참고하기 위하여 맛의 종류에 따른 아미노산을 표 26에 나타내었음. 표 25와 같이 감칠맛을 대표하는 글루탐산 함량이 기존의 SAP 0.007

mole 보다 수용성 SAP가 0.119 mole로 약 18배가 증가하였고, 아스파르트산이 0.034 mole 에서 0.078 mole로 약 2.31배 증가 하였으므로, 산성아미노산의 총 함량만을 비교하였을 때 기존 SAP의 경우 0.041 mole, 수용성 SAP의 경우 0.197 mole로 약 5배가 증가되었음을 확인 할 수 있음. 이는 표 25의 내용으로 미루어 보아 감칠맛이 수용성 SAP가 기존의 SAP보다 상승했을 것이라 추측 할수 있음.

표 26. 아미노산의 종류와 맛

맛의 종류	아미노산
단맛	극성아미노산 : 트레오닌, 세린 소형 아미노산 : 글리신, 알라닌
감칠맛	산성 아미노산 : 글루탐산, 아스파르트산
쓴맛	염기성 아미노산 : 아르기닌, 라이신, 히스티딘 비극성 아미노산 : 페닐알라닌, 트립토판, 루신, 메티오닌, 이소루신

(나) 수용성 SAP의 사용량 설정

- 시중에 판매하는 간장을 염도가 2.1%가 되도록 희석하여, 수용성 SAP를 농도별로 첨가하여 염미가 부스팅되는 최적의 농도를 찾고자 하였으며, 수용성 SAP 0.01%~1%의 용액을 제조하여 관능평가 하였음
- 수용성 SAP의 경우 염미의 부스팅 정도가 첨가 농도에 비례하였으며, 기호도에 따라서 첨가하는 것이 좋을 것이라 생각됨.
- 수용성 SAP를 가루 형태로 섭취하였을 때에는, 단맛과 쓴맛이 동시에 있으며, 특유의 감칠맛이 있다는 최종 평가가 있었음. 국이나 시즈닝 등에 활용 가능성이 있을 것이라 생각됨.
- 수용성 SAP는 그림 13에 나타내었음



그림 13. 제조된 수용성 SAP 분말

제3절. 제 1협동: 염기성 펩타이드 분리 및 분석법 개발 (계명대)

1. 실험방법

가. 염기성 펩타이드의 데이터 베이스 구축

(1) 전기영동을 통한 염기성 펩타이드 데이터 베이스 구축

- SAP를 녹여서 Nanosep에 넣어주고 centrifuge를 14000 x g에서 30 분 돌린 후 아래쪽에 있는 부분을 3 kDa보다 작은 물질이 포함된 샘플로, filter 위의 부분을 3 kDa보다 작은 물질이 포함된 샘플 사용함. 샘플에 샘플 buffer를 넣어 끓여주고 12 % acrylamide가 포함된 겔에 전기 영동하여 겔을 coomassie blue로 염색함.

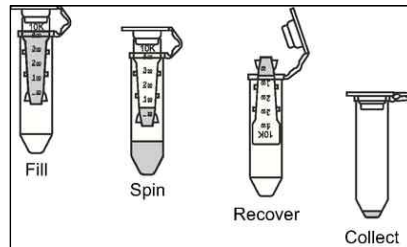


그림 1. Nanosep 분리 방법

나. 염기성 펩타이드 합성 전략 기술 개발

(1) HPLC 분석을 통한 peptide 정량

(가) 염기성펩타이드 분리능 개선을 위한 Benzyl bromide 처리

- SAP 10 mg을 200 μ l acetonitrile/ H₂O (5:5, v/v)로 녹인 후, 필터를 사용하여 정제한 용액을 liquid chromatography (LC) 표준시료로 사용함. 또한, 아미노산 정량을 위해 아민(-NH₂)기를 중성 조건과 염기성 조건에서 benzyl chloride로 capping 한 시료를 함께 분석하였고, Capping된 시료는 SAP 10 mg을 200 μ l acetonitrile/ H₂O(5:5, v/v)로 녹여 benzyl bromide 10 mg을 추가하여 12시간 교반 하였고, 반응 종료 후 남은 benzyl bromide 제거를 위해 16시간 동결건조 하였음. 준비된 시료는 HPLC는 Shimadzu (Japan)사의 LC-6AD 시스템하에서 고정상으로는 Shimadzu (Japan)사의 VP-ODS (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m)을 사용하였으며, 40 $^{\circ}$ C 오븐에서 유속은 1.0 mL/min, injection volume은 10 μ l으로 설정하였음. 이동상으로는 0.1% trifluoroacetic acid (TFA)가 포함된 H₂O(A)와 acetonitrile (B)을 사용하였으며. 최초 100% (A)로 시작하여 40분 후 100% (B)가 되도록 gradient를 준 후 10분간 유지하는 조건을 설정하여 실험하였음.

HPLC Condition			
Column type	C18 column, dp=5 μ, 4.6 mmx25 cm		
Temperature (°C)	40		
Injection (mL)	10		
Flow rate(mL/min)	1		
mobile phase	A: water, 0.1% TFA B: acetonitrile, 0.1% TFA		
gradient	time(min)	% A	% B
	0.01	100	0
	5.00	100	0
	40.00	0	100
	50.00	0	100
	50.01	5	95
	60.00	controller stop	

그림 2. 염미성 펩타이드의 염기성 조건에서 HPLC 분석 방법

2. 실험결과

가. 염미성 펩타이드 분석

(1) 염미성 펩타이드 분리

- 현재까지 보고된 염미성 펩타이드에는 L-Orn-Gly-OH, L-Lys-Gly-OH, L-Orn-b-Ala-OH, L-Orn-g-Ala-OH, L-Orn-Tau, L-Lys-Tau이 해당함.
- 구조적으로 5종의 염미성 펩타이드는 천연 아미노산 (Gly, Lys, Ala) 혹은 비천연 아미노산 (Orn, Tau)으로 구성된 dipeptide로 구성되어 있음.
- 특히 아미노산을 활용한 짠맛 증강소재로는 L-arginine (L-Arg), L-lysine (L-Lys) 등의 아미노산이 보고되어 있으며, 특히 L-Arg을 포함한 펩타이드들의 구아니딜 그룹은 Na⁺-channel과 상호작용하여 Na⁺ ion의 유입을 향상시켜 짠맛을 증강시키는 것으로 보고 되어있음 (그림 3).
- 이들 염미성 펩타이드는 상업적으로 판매되지 않고 있으며, 염미성 펩타이드의 정성적 또는 정량적 분석 기술이 전무한 상태임.

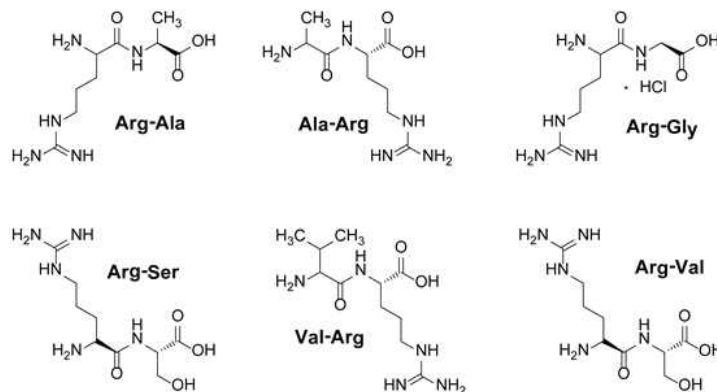


그림 3. 염미 증강제기능을 가진 펩타이드의 화학 구조식

- 합성된 염미성 펩타이드 L-Lys-Gly-OH를 지표성분으로 콩발효 및 가수분해를 통해 생산된 염미성 펩타이드를 분석함 (그림 4).
- 합성된 지표성분 염미성 펩타이드 L-Lys-Gly-OH는 LC-MS를 통해 순도 99% 이상임을 확인함.
- Silica gel (SiO₂)를 고정상으로 한 Thin layer chromatography (TLC)와 메탄올과 물 1:1 혼합용액을 이동상으로 이용하여 콩발효 및 가수분해를 통해 생산된 염미성 펩타이드를 분석함.

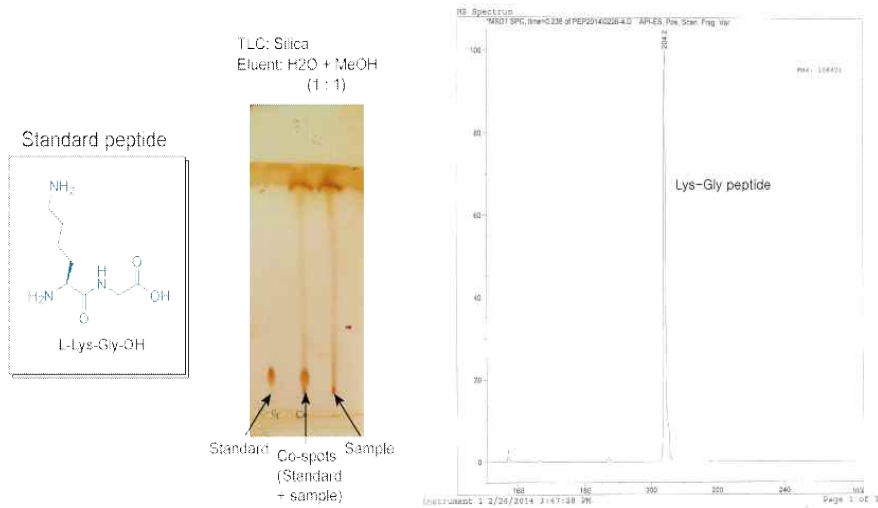


그림. 4 콩발효물 및 가수분해를 통한 염미성 펩타이드 분석

- LC-MS/MS을 이용하여 콩발효 및 가수분해를 통해 생산된 펩타이드에 염미성 펩타이드 L-Lys-Gly-OH가 포함되어 있는 것을 확인함. (그림 5)
- 콩발효 및 가수분해를 통해 생산된 펩타이드의 정밀한 정성 및 정량 분석을 위해서는 기존의 보고된 염미성 펩타이드의 합성 및 분석기술 확립이 필수적으로 요구됨.

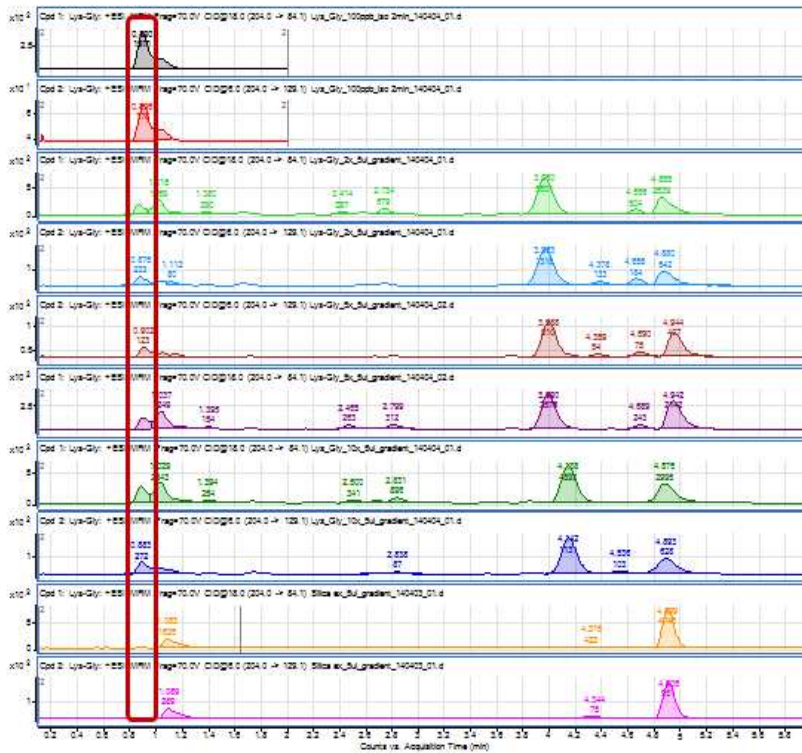


그림 5. 쿡발효 및 가수분해를 통한 염기성 펩타이드에 L-Lys-Gly-OH 포함 확인

(2). 전기영동을 통한 염기성 펩타이드 데이터 베이스 구축

- Nanosep을 이용하여 SAP(1 mg/ml)을 3 kDa보다 큰 사이즈와 작은 사이즈로 분리하여 그림 6와 같이 전기영동 후 Coomassie brilliant blue(CBB)염색으로 확인해 본 결과 3 kDa보다 큰 사이즈에 단백질이 많이 보임

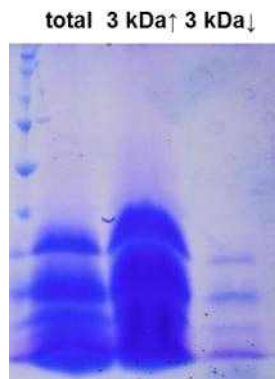


그림 6. 전기영동 후 Coomassie brilliant blue(CBB)염색

제4절. 제2협동 : 미각수용체를 이용한 염미성 펩타이드의 효능 평가 (한식연)

1. 실험방법

가. Ca²⁺ signaling assay를 이용한 TRPV1 활성화 정량 반응 측정

- TRPV1 발현 세포주는 human TRPV1 expression plasmid를 lipofectamine 2000 (Invitrogen)을 이용해서 HEK293T 세포에 co-transfection시킨 뒤 24-h 후 실험에 사용하였다.
- TRPV1 agonist 및 antagonist에 반응하여 TRPV1 발현 세포에서 방출되는 Ca²⁺의 양을 정량적으로 신속하게 분석 가능하도록 FLEX system을 구축하였다. 세포내 Ca²⁺ 측정은 FlexStationIII™ (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)을 이용하여 실시하였다. 세포는 측정 24시간 전에 96-well black-wall CellBIND surface plates (Corning, NY, USA)에 분주 하고, 세포내 칼슘양의 변화를 측정하기 위한 표식자로 5 μM Fluo-4-AM(Molecular Probes, Eugene, OR, USA)를 처리하여 27 °C에서 30분간 반응하였다. 그 후, 세포는 assay buffer (130 mM NaCl, 10 mM glucose, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, and 100 mM HEPES, pH 7.4)로 세정한 뒤 100 uL의 assay buffer 를 첨가하여 실온에서 15분간 방치한 후, 각각의 펩타이드를 처리하여, 486 nm와 516 nm 에서 (F486, F516)형광흡광도를 120초 동안 측정하였다.
- 시료는 기저 측정 17초 후에 처리되었고, 형광강도의 변화는 2.1초 간격으로 120초 동안 측정되었다(485 nm 흡광, 525 nm 흡광). 가장 큰 형광 강도 값에서 baseline 형광 강도 값을 뺀 값을 데이터로 사용하였다.

나. Ca²⁺ signaling assay를 이용한 CaSR 활성화 정량 반응 측정

- CaSR 발현 세포주는 human CaSR (hCaSR) expression plasmid와 Ga16gust44를 lipofectamine 2000 (Invitrogen)을 이용해서 HEK293T 세포에 co-transfection시킨 뒤 24-h 후 실험에 사용하였다.
- 세포내 Ca²⁺ 측정은 FlexStationIII™ (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)을 이용하여 실시하였다. 세포는 측정 24시간 전에 96-well black-wall CellBIND surface plates (Corning, NY, USA)에 분주 하고, 세포내 칼슘양의 변화를 측정하기 위한 표식자로 5 μM Calcium 4 dye(Molecular Devices, USA)를 처리하여 27°C에서 30분간 반응 하였다. 그 후, 세포는 assay buffer (130 mM NaCl, 10 mM glucose, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, and 100 mM HEPES, pH 7.4)로 세정한 뒤 100 uL의 assay buffer 를 첨가하여 실온에서 15분간 방치한 후, 각각의 펩타이드를 처리하여, 486 nm와 516 nm 에서 (F486, F516)형광흡광도를 120초 동안 측정하였다.
- 세포내 칼슘양의 변화는 ΔRFU로 표시하고, Softmax software (Molecular devices,

Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 분석하였다.

2. 실험결과

가. 염미성 펩타이드의 맛 수용체 활성화 작용 평가

- 관능검사법을 이용한 기존연구에서 arginine을 함유하는 dipeptide, Ala-Arg, Arg-Ala, Arg-Gly, Arg-Met, Arg-Ser, Arg-Val, Val-Arg가 짠맛 증강효과를 나타낸다 (Schindler A 등, 2011).
- 본 연구 대상물질인 천연 펩타이드 혼합물에서도 동일한 펩타이드의 작용가능성을 고려하여 우선, 이들 7종의 염미성 펩타이드를 합성하고(순도 95% 이상), 이에 대해 TRPV1 수용체와 CaSR 수용체가 발현된 세포를 이용하여 각 수용체의 작용제 (agonist) 또는 agonist 활성 증강제로서의 특성을 측정하였다.

(1) TRPV1 수용체에 대한 작용 평가

(가) 염미성 펩타이드 Ala-Arg의 TRPV1 수용체 활성화 증강제로서의 효능 평가

- **Ala-Arg**을 TRPV1이 발현된 세포에 1, 3, 5 mM 농도로 처리하였을 때, Ala-Arg 농도 증가에 따라 세포내 Ca^{2+} 농도를 증가되었으며, Ala-Arg 처리로 증가된 세포내 Ca^{2+} 량은 TRPV1의 specific antagonist인 capsazepine에 의해 유의적으로 저해되었다.
- 이 결과는 염미성 펩타이드 Ala-Arg은 TRPV1 수용체에 agonist와 유사하게 작용함으로써 amiloride 비감수성 짠맛인지에 관여할 가능성을 시사한다.

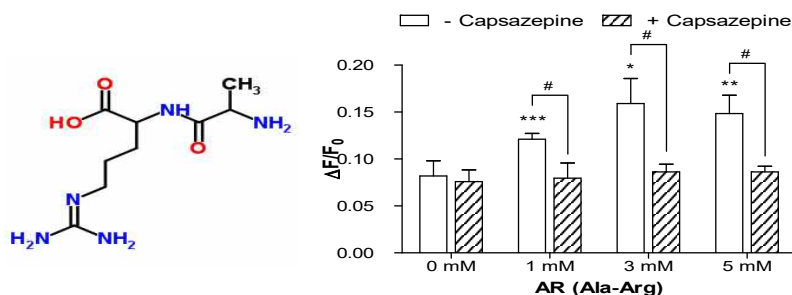


그림 1. TRPV1이 발현된 세포에서의 Ala-Arg의 효과

- **Arg-Ala**을 TRPV1 발현 세포에 1, 3, 5 mM 농도로 처리하였을 때, Arg-Ala 농도 증가에 따라 세포내 Ca^{2+} 농도가 증가되었으며, 이 현상은 capsazepine 처리에 의해 저해되었다.
- 이 결과는 Arg-Ala은 TRPV1에 agonist와 유사하게 작용함으로써 amiloride 비감수성 짠맛인지에 관여할 가능성을 시사한다.

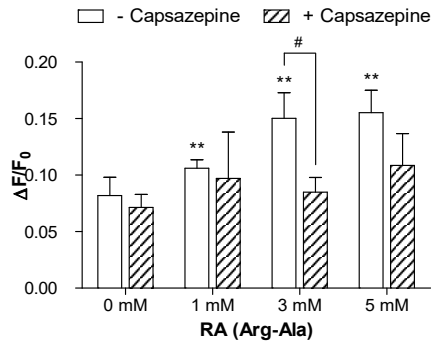
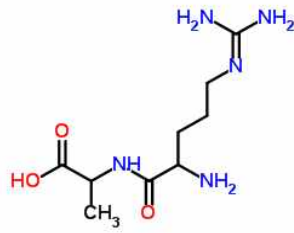


그림 2. TRPV1이 발현된 세포에서의 Arg-Ala의 효과

- **Arg-Gly** (1, 3, 5 mM)을 TRPV1 발현 세포에 처리하였을 때, Arg-Gly 농도 증가에 따라 세포내 Ca^{2+} 농도가 증가되었으며, 이 증가는 capsazepine에 의해 유의적으로 저해되었다.
- 이 결과는 Arg-Gly은 TRPV1 수용체에 agonist와 유사하게 작용함으로써 amiloride 비감수성 짠맛인지에 관여할 가능성을 시사한다.

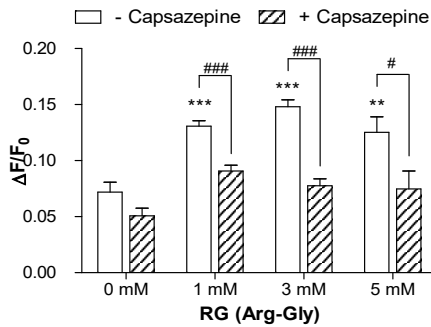
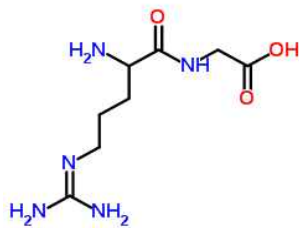


그림 3. TRPV1이 발현된 세포에서의 Arg-Gly의 효과

- **Arg-Met** (1, 3, 5 mM)을 TRPV1 발현 세포에 처리하였을 때 Arg-Met에 의한 세포내 Ca^{2+} 농도변화는 관찰되지 않았으며 capsazepine 처리에 의한 반응변화도 나타내지 않았다.
- 이 결과는 Arg-Met은 TRPV1에 agonist와 유사하게 작용하지 않으며 따라서 amiloride 비감수성 짠맛인지에 직접 관여할 가능성이 낮음을 시사한다.

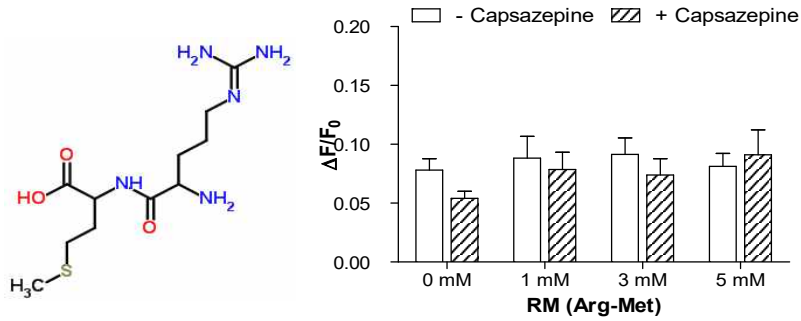


그림 4. TRPV1이 발현된 세포에서의 Arg-Met의 agonist 효과

- Arg-Ser (1, 3, 5 mM)을 TRPV1 발현 세포에 처리하였을 때 Arg-Ser에 의한 세포 내 Ca^{2+} 농도 증가는 관찰되었으나 Arg-Ser 농도의존성은 뚜렷이 나타나지 않았으며 capsazepine 처리에 의한 유의적인 저해현상 또한 관찰되지 않았다.
- Arg-Ser이 TRPV1을 경유한 amiloride 비감수성 짠맛인지에 관여 가능성이 낮음을 시사한다.

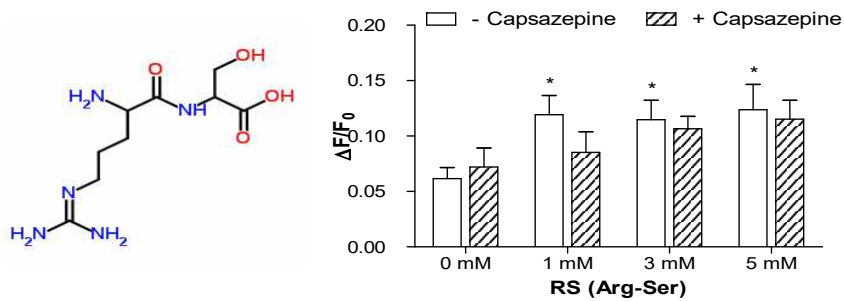


그림 5. TRPV1이 발현된 세포에서의 Arg-Ser의 agonist 효과

- Arg-Val (1, 3, 5 mM)을 TRPV1 발현 세포에 처리하였을 때 Arg-Val 농도 증가에 따른 활성증가가 관찰되었으나 이 증가는 capsazepine에 의해 전혀 영향을 받지 않아 TRPV1 특이적 증가작용이 아닌 것으로 확인되었다.
- 이 결과는 Arg-Val이 TRPV1을 경유한 amiloride 비감수성 짠맛인지에 관여 가능성이 낮음을 시사한다.

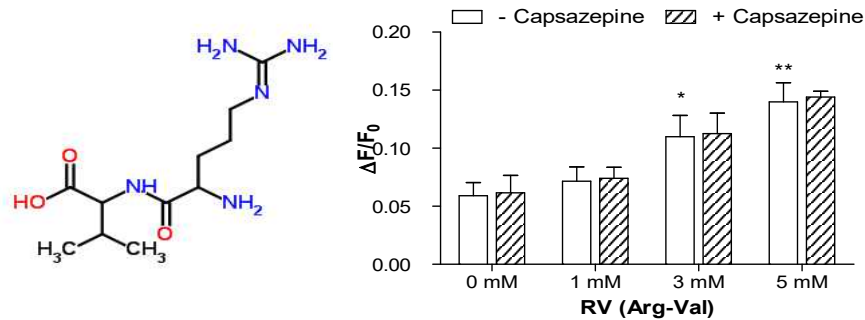


그림 6. TRPV1이 발현된 세포에서의 Arg-Val의 agonist 효과

- **Val-Arg** (1, 3, 5 mM)을 TRPV1 발현 세포에 처리하였을 때, Val-Arg 농도 증가에 따라 세포내 Ca^{2+} 농도가 증가되었고, 증가된 세포내 Ca^{2+} 량은 capsazepine에 의해 저해되었다.
- 이 결과는 Val-Arg이 TRPV1 agonist와 유사하게 작용함으로 amiloride 비감수성 짝맛인지에 관여할 가능성을 시사한다.

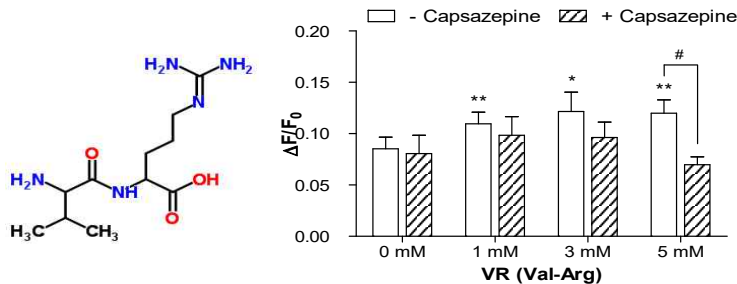


그림 7. TRPV1이 발현된 세포에서의 Val-Arg의 효과

- 기존 연구에서 제시된 7종의 염미성 펩타이드, Ala-Arg, Arg-Ala, Arg-Gly, Arg-Met, Arg-Ser, Arg-Val, Val-Arg의 TRPV1 발현 세포에 미치는 영향을 측정 한 결과 Ala-Arg, Arg-Ala, Arg-Gly 3종은 TRPV1에 작용제로 작용함으로써 amiloride 비감수성 짝맛인지에 관여할 가능성이 시사되었다.
 - Arg-Met은 TRPV1 작용제로서 작용하지 않았다.
 - Arg-Ser, Arg-Val, Val-Arg 3종은 TRPV1에 작용제로 활성을 나타낸 반면 antagonist인 capsazepine에 영향 받지 않아 TRPV1 특이적 작용은 아닌 것으로 확인 되었다.

(나) 7종의 염미성 펩타이드의 TRPV1 수용체 활성화 증강제로서의 효능평가

- 7종의 염미성 펩타이드, Ala-Arg, Arg-Ala, Arg-Gly, Arg-Met, Arg-Ser, Arg-Val, Val-Arg의 중 TRPV1 agonist 유사활성을 나타내지 않는 **Arg-Met**에 대해 agonist의 작용을 증강시키는 TRPV1 활성 증강제로서의 효능을 확인하였다.
- TRPV1 발현 세포에 TRPV1 작용제 capsaicin (0.01 μ M)을 작용시키고, 동시에

capsaicin에 Arg-Met 1, 3, 5 mM 농도로 첨가하여 반응시킨 결과, capsaicin 만을 반응시켰을 때에 비해 세포 내 Ca^{2+} 유입량이 오히려 감소하였으며 감소 정도는 Arg-Met 농도가 증가할수록 커지는 것으로 나타났다.

- 이 결과는 Arg-Met은 TRPV1 agonist 작용 증강제로서 작용하지 않음을 시사한다.

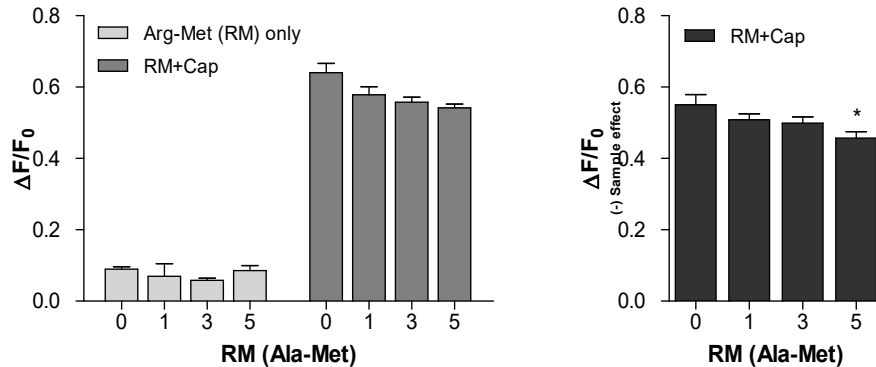


그림 8. TRPV1이 발현된 세포에서의 Ala-Met과 capsaicin 과의 상호작용 효과

- 기존연구에서 제시된 7종의 염미성 펩타이드 중 TRPV1 작용제로 작용하지 않은 Arg-Met에 대해 agonist의 활성을 증가시키는 활성증가제로서의 영향을 측정된 결과 Arg-Met은 TRPV1 agonist 유사활성을 나타내지 않을 뿐 아니라 agonist 작용 증강제로서도 작용하지 않는 것으로 확인되었다.
- 이 결과는 펩타이드의 짠맛증강효능이 관능검사를 통한 평가와 맛 수용체 발현 세포에서의 평가와 같은 방법적 차이에 따라 일치하지 않는 것으로 해석될 수 있으나, 관능검사를 이용한 평가에서 짠맛 역치산출 등 보다 구체적인 실험이 수행되어야 그 활성유무를 명확히 판단할 수 있을 것으로 사료된다.

(2) CaSR 수용체에 대한 작용 평가

(가) CaSR 수용체 작용제로서의 효능 평가

- CaSR이 발현된 세포에 7종의 염미성 펩타이드 Ala-Arg, Arg-Ala, Arg-Gly, Arg-Met, Arg-Ser, Arg-Val 및 Val-Arg을 각각 0.1, 0.3, 1, 3, 5 mM 농도로 처리하였다.
- 시험한 모든 펩타이드는 세포내 Ca^{2+} 유입을 유도하지 않았으며 각 펩타이드의 농도 증가에 따른 변화 또한 관찰되지 않았다.
- 이 결과는 기존 연구에서 염미성 펩타이드로 제안된 7종의 arginyl dipeptide는 CaSR 수용체에 agonist로 작용하지 않으며 이들 펩타이드는 CaSR을 통한 짠맛증강작용에 관여하지 않음을 시사한다.

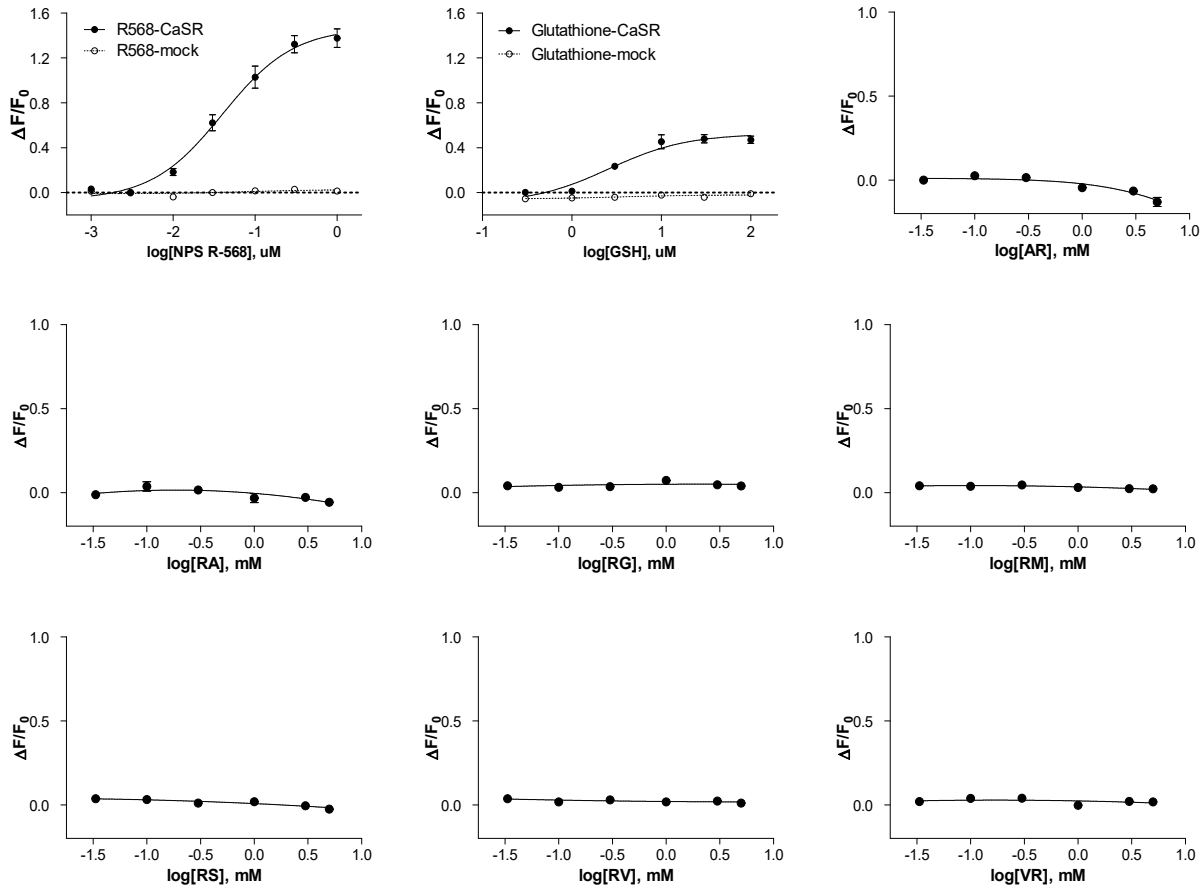


그림 9. CaSR agonist인 NPS R-568과 glutathione 및 염미성 펩타이드의 효과

- 기존 연구에서 제시된 7종의 염미성 펩타이드, Ala-Arg, Arg-Ala, Arg-Gly, Arg-Met, Arg-Ser, Arg-Val, Val-Arg의 CaSR 발현 세포에 미치는 영향을 측정된 결과, 7종의 염미성 펩타이드는 CaSR에 작용제로서 작용하지 않았다.

(나) CaSR 수용체 활성화 작용 증강제로서의 효능 평가

- CaSR 수용체의 대표적인 agonist로는 *N*-(3-[2-Chlorophenyl]propyl)-(*R*)- α -methyl-3-methoxybenzylamine (NPS R-568)과 glutathione (GSH)이 알려져 있으며, 이들 작용제의 CaSR 수용체 내 작용 부위는 서로 다른 것으로 알려져 있다.
- 본 연구에서는 CaSR 발현 세포를 이용하여 7종 염미성 펩타이드가 NPS R-568 및 GSH의 agonist 작용을 증가시키는 증강제로서의 효능을 확인하였다.
- **Ala-Arg** (0.1, 0.3, 1, 3, 5 mM)를 CaSR 작용제 NPS R-568 (0.1 μ M)과 함께 반응시킨 결과, NPS R-568만을 반응시켰을 때에 비해 세포 내 Ca^{2+} 유입량이 오히려 감소하였으며 감소 정도는 Ala-Arg 농도가 증가할수록 커지는 것으로 나타났다.
 - 한편 Ala-Arg (0.1, 0.3, 1, 3, 5 mM)을 GSH (1 μ M)과 함께 반응시킨 결과, GSH만 작용시켰을 때와 세포 내 Ca^{2+} 유입량에 변화가 없었으며 Ala-Arg 농도 증가에도

영향을 받지 않는 것으로 나타났다.

- 이 결과는 Ala-Arg은 CaSR 수용체에 작용 증강제로도 작용하지 않으며, 따라서 CaSR을 통한 짠맛증강작용에 관여하지 않음을 시사한다.

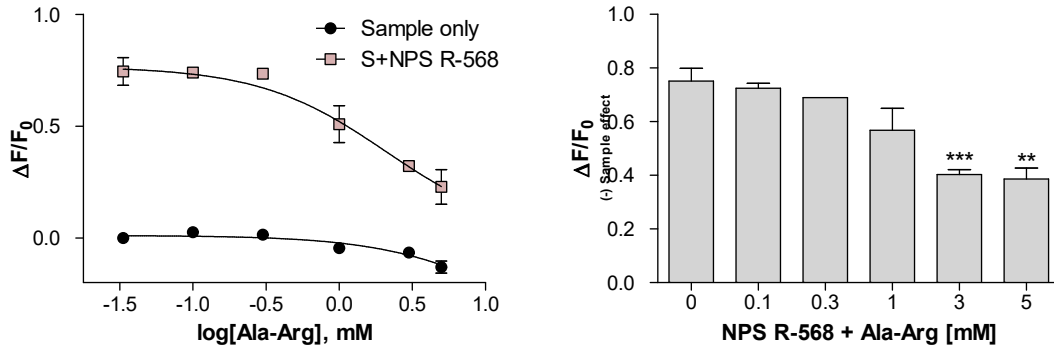


그림 10. CaSR이 발현된 세포에서의 Ala-Arg과 NPS R-568과의 상호작용

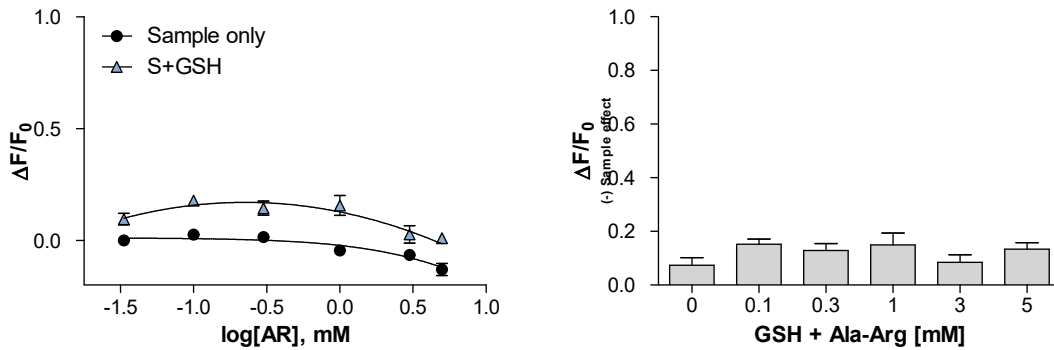


그림 11. CaSR이 발현된 세포에서의 Ala-Arg과 glutathione와의 상호작용

- **Arg-Ala** (0.1, 0.3, 1, 3, 5 mM)를 CaSR 작용제 NPS R-568 (0.1 μM)과 함께 반응시킨 결과, NPS R-568만을 반응시켰을 때에 비해 세포 내 Ca^{2+} 유입량이 오히려 감소하였으며 감소 정도는 Ala-Arg 농도가 증가할수록 커지는 것으로 나타났다.
- 한편 Arg-Ala (0.1, 0.3, 1, 3, 5 mM)을 GSH (1 μM)과 함께 반응시킨 결과, GSH 만 작용시켰을 때와 세포 내 Ca^{2+} 유입량에 변화가 없었으며 Ala-Arg 농도 증가에도 영향을 받지 않는 것으로 나타났다.
- 이 결과는 Arg-Ala은 CaSR 수용체에 작용 증강제로도 작용하지 않으며, 따라서 CaSR을 통한 짠맛증강작용에 관여하지 않음을 시사한다.

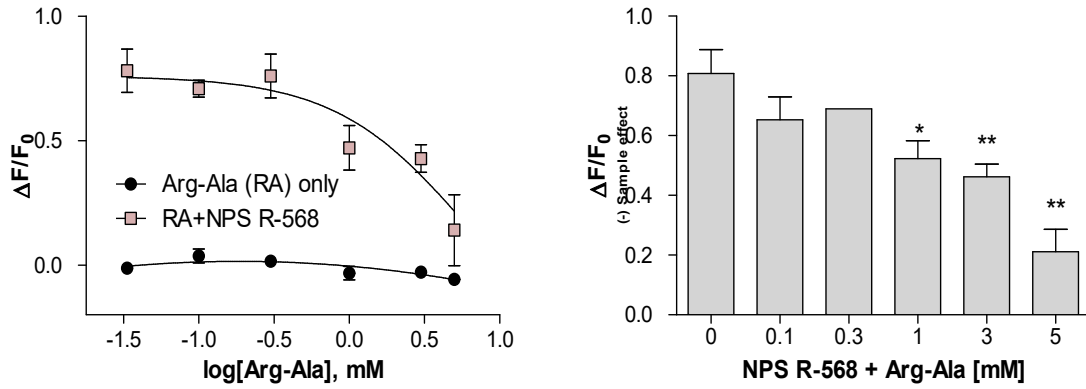


그림 12. CaSR이 발현된 세포에서의 Arg-Ala과 NPS R-568과의 상호작용

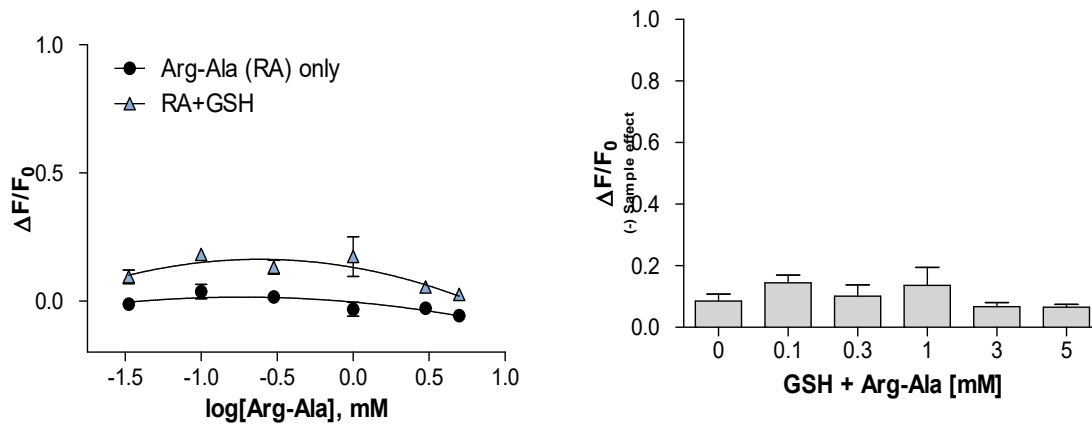


그림 13. CaSR이 발현된 세포에서의 Arg-Ala과 NPS R-568과의 상호작용

- **Arg-Gly** (0.1, 0.3, 1, 3, 5 mM)를 CaSR 작용제 NPS R-568 (0.1 μM)과 함께 반응시킨 결과, NPS R-568만을 반응시켰을 때에 비해 세포 내 Ca^{2+} 유입량이 오히려 감소하였으며 감소 정도는 Arg-Gly 농도가 증가할수록 커지는 것으로 나타났다.
- 한편 Arg-Gly (1, 3, 5 mM)을 GSH (1 μM)과 함께 반응시켰을 때 5 mM의 Arg-Gly를 처리한 경우에서 GSH만 작용시켰을 때보다 세포 내 Ca^{2+} 를 유의적으로 증가시켰다.
- 이 결과는 Arg-Gly가 비교적 고농도에서 CaSR 수용체를 통한 짠맛 증강 작용에 관여할 가능성이 있음을 시사한다.

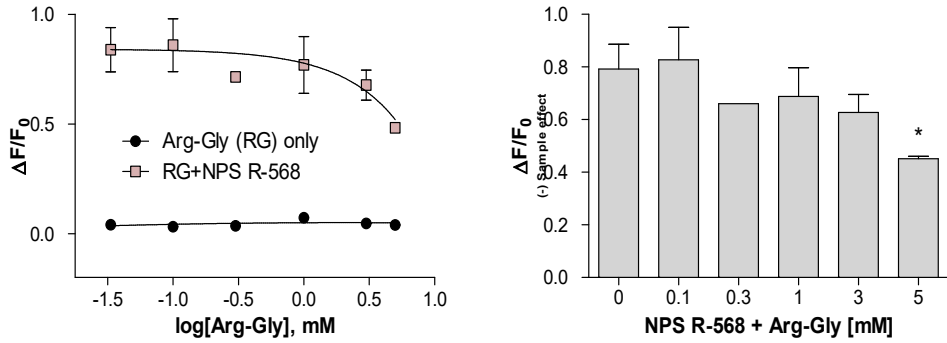


그림 14. CaSR이 발현된 세포에서의 Arg-Gly과 NPS R-568과의 상호작용

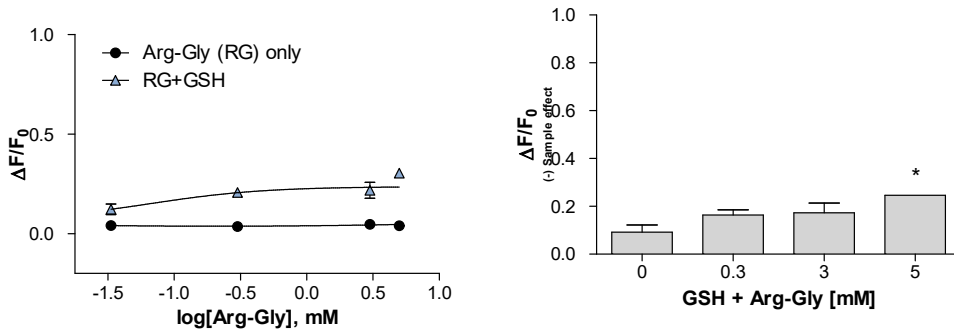


그림 15. CaSR이 발현된 세포에서의 Arg-Gly과 NPS R-568과의 상호작용

- **Arg-Met** (0.1, 0.3, 1, 3, 5 mM)를 CaSR 작용제 NPS R-568 (0.1 μ M)과 함께 반응시켰을 때, NPS R-568만 반응시켰을 때에 비해 세포 내 Ca^{2+} 유입량이 오히려 감소하였으며 감소 정도는 Arg-Met 농도가 증가할수록 커지는 것으로 나타났다.
- 한편 Arg-Met (0.1, 0.3, 1, 3, 5 mM)를 GSH (1 μ M)과 함께 작용시켰을 때, 세포 내 Ca^{2+} 유입량에 변화가 없었으며 Arg-Met 농도 증가에도 영향을 받지 않았다.
- 이 결과는 Arg-Met는 CaSR 수용체에 agonist 작용 증강제로도 작용하지 않으며, 따라서 CaSR을 통한 짠맛증강작용에 관여하지 않음을 시사한다.

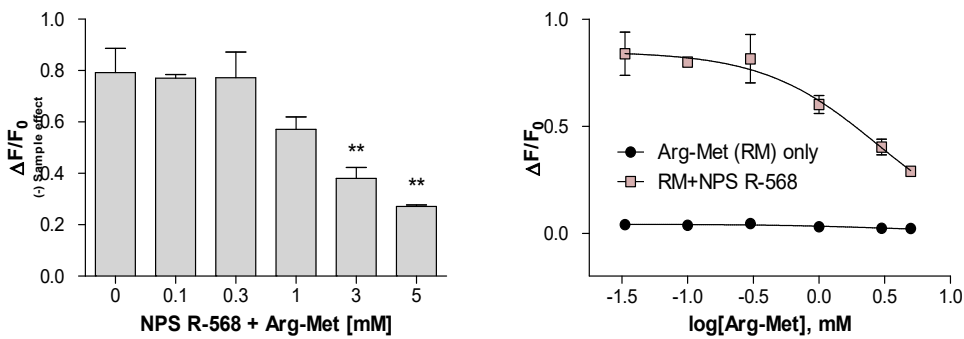


그림 16. CaSR이 발현된 세포에서의 Arg-Met과 NPS R-568과의 상호작용

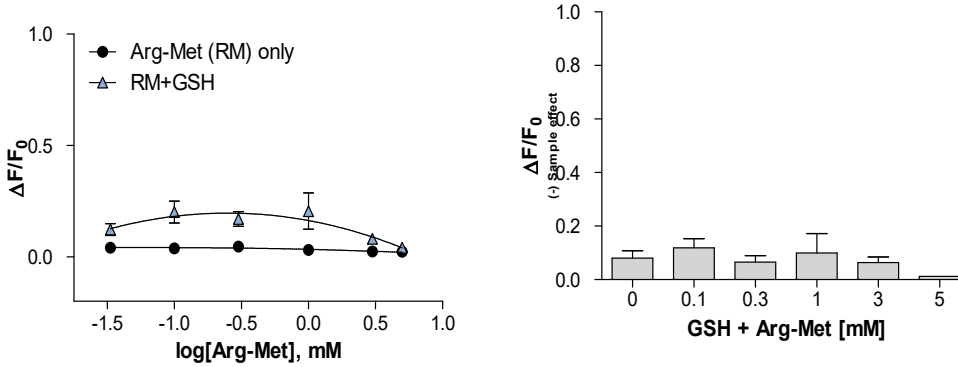


그림 17. CaSR이 발현된 세포에서의 Arg-Met과 NPS R-568과의 상호작용

- **Arg-Ser** (0.1, 0.3, 1, 3, 5 mM)을 CaSR 작용제 NPS R-568 (0.1 μM)과 함께 반응시킨 결과, NPS R-568만을 반응시켰을 때에 비해 세포 내 Ca^{2+} 유입량이 오히려 감소 하였으며 감소 정도는 Arg-Ser 농도가 증가할수록 커지는 것으로 나타났다.
- 한편 Arg-Ser (0.1, 0.3, 1, 3, 5 mM)을 GSH (1 μM)과 함께 반응시킨 결과, 세포 내 Ca^{2+} 유입량에 변화가 없었으며 Arg-Ser 농도 증가에도 영향을 받지 않았다.
- 이 결과는 Arg-Ser은 CaSR 수용체에 agonist 작용 증강제로도 작용하지 않으며, 따라서 CaSR을 통한 짠맛증강작용에 관여하지 않음을 시사한다.

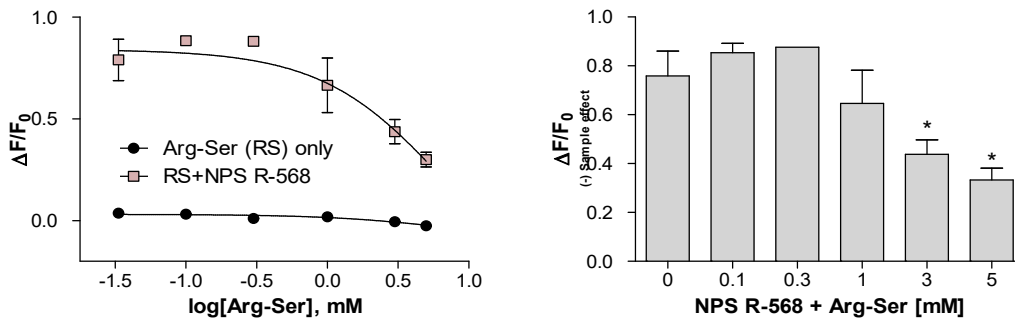


그림 18. CaSR이 발현된 세포에서의 Arg-Ser과 NPS R-568과의 상호작용

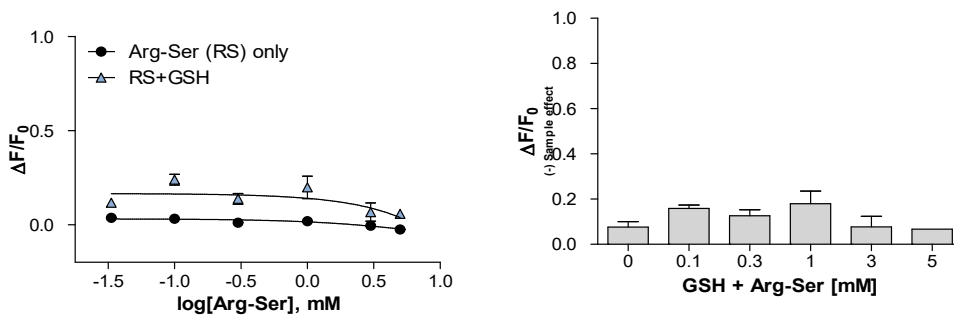


그림 19. CaSR이 발현된 세포에서의 Arg-Ser과 NPS R-568과의 상호작용

- **Arg-Val** (0.1, 0.3, 1, 3, 5 mM)을 CaSR 작용제 NPS R-568 (0.1 μ M)과 함께 반응시켰을 때 NPS R-568만 반응시켰을 때 보다 세포 내 Ca^{2+} 유입량이 오히려 감소하였으며 감소 정도는 Arg-Val 농도가 증가할수록 커지는 것으로 나타났다.
- 한편 Arg-Val (0.1, 0.3, 1, 3, 5 mM)을 GSH (1 μ M)과 함께 반응시킨 결과, 세포 내 Ca^{2+} 유입량에 변화가 없었으며 Arg-Val 농도 증가에도 영향을 받지 않았다.
- 이 결과는 Arg-Val은 CaSR 수용체에 agonist 작용 증강제로도 작용하지 않으며, 따라서 CaSR을 통한 짠맛증강작용에 관여하지 않음을 시사한다.

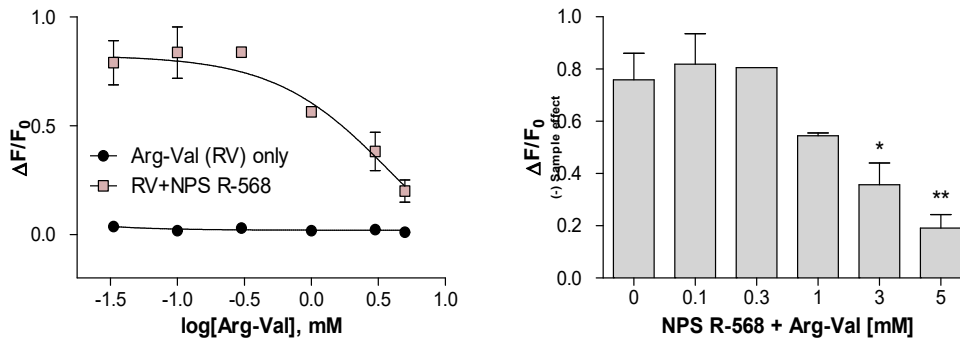


그림 20. CaSR이 발현된 세포에서의 Arg-Val과 NPS R-568과의 상호작용

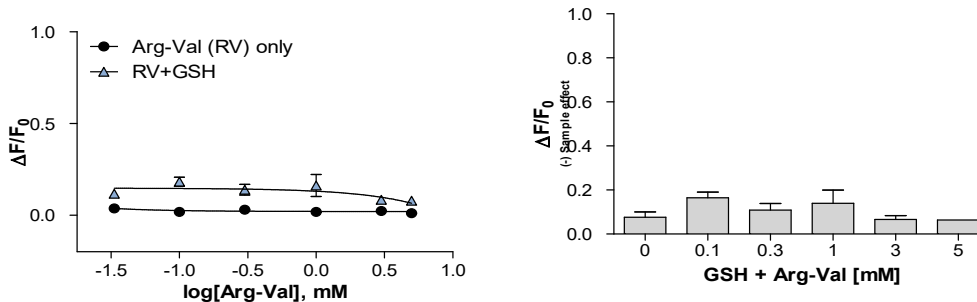


그림 21. CaSR이 발현된 세포에서의 Arg-Val과 NPS R-568과의 상호작용

- **Val-Arg**(0.1, 1, 3, 5 mM)을 CaSR 작용제 NPS R-568 (0.1 μ M)과 함께 반응시킨 결과, NPS R-568만을 반응시켰을 때에 비해 세포 내 Ca^{2+} 유입량이 오히려 감소하였으며 감소 정도는 Val-Arg 농도가 증가할수록 커지는 것으로 나타났다.
- 한편 Arg-Val(0.1, 0.3, 3, 5 mM)을 GSH (1 μ M)과 함께 반응시켰을 때 세포 내 Ca^{2+} 유입량에 변화가 없었으며 Val-Arg 농도 증가에도 영향을 받지 않았다.
- 이 결과는 Val-Arg은 CaSR 수용체에 작용 증강제로도 작용하지 않으며, 따라서 CaSR을 통한 짠맛증강작용에 관여하지 않음을 시사한다.

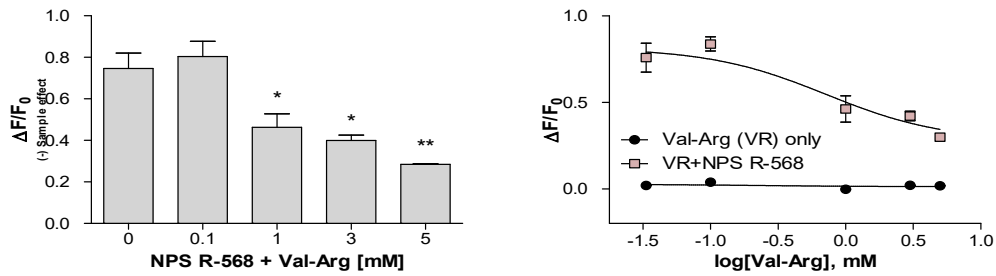


그림 22. CaSR이 발현된 세포에서의 Val-Arg과 NPS R-568과의 상호작용

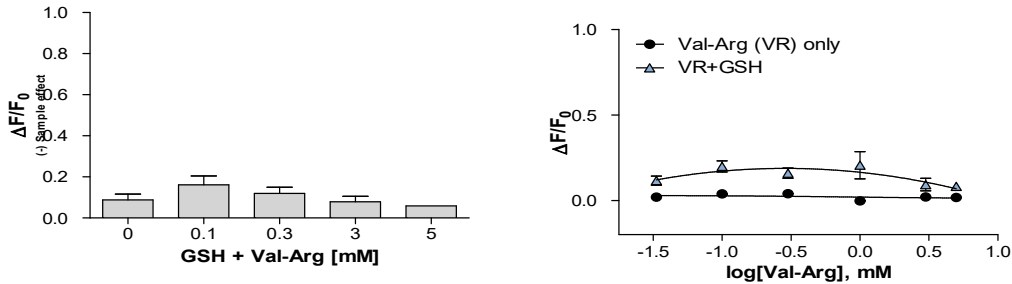


그림 23. CaSR이 발현된 세포에서의 Val-Arg과 NPS R-568과의 상호작용

○ 기존연구에서 제시된 7종의 염미성 펩타이드, Ala-Arg, Arg-Ala, Arg-Gly, Arg-Met, Arg-Ser, Arg-Val 및 Val-Arg의 CaSR agonist 작용 증강제로서의 영향을 측정한 결과 Arg-Gly 만 CaSR agonist 중 하나인 glutathione 작용 증강효과를 나타냄으로써 CaSR을 경유한 짠맛 증강 작용에 관여할 가능성이 시사되었다.

나. 지미성 펩타이드에 대한 맛 수용체 활성화 작용 평가

○ 지미성 펩타이드 구조에 대해서는 평가기준에 따라 논란이 있는 것도 있으나, glutamic acid를 포함하는 di- 및 tripeptide, 특히 Glu-Asp, Glu-Glu, Glu-Ser, Asp-Glu-Ser, Glu-Gly-Ser의 지미성에 대해서는 비교적 일치된 견해를 보이고 있다. 본 연구에서는 이들 5종의 지미성 펩타이드에 대해 TRPV1과 CaSR이 발현된 세포내에서의 작용제 또는 작용증강제로서의 영향을 측정하였다.

(1) TRPV1 수용체에 대한 작용 평가

(가) 염미성펩타이드 Ala-Arg의 TRPV1 수용체 작용제로서의 효능 평가

○ **Glu-Asp**을 TRPV1이 발현된 세포에 1, 3, 5 mM 농도로 처리하였을 때, Glu-Asp 농도 증가에 따른 세포 내 Ca²⁺ 농도변화는 관찰되지 않았다.

○ 이 결과는 Glu-Asp가 TRPV1에 agonist로 작용하지 않으며, amiloride 비감수성 짠맛 인지에 직접 관여할 가능성이 낮음을 시사한다.

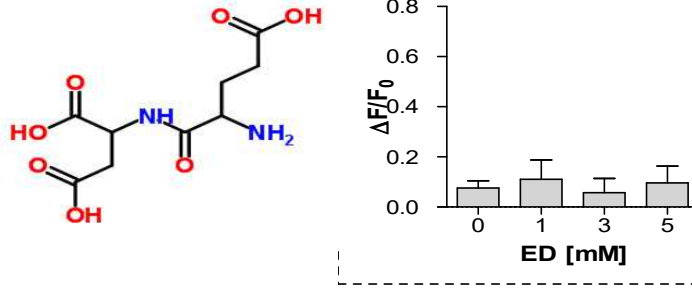


그림 24. TRPV1이 발현된 세포에서의 Glu-Asp (ED)의 효과

- Glu-Glu를 TRPV1이 발현된 세포에 1, 3, 5 mM 농도로 처리하였을 때, Glu-Glu 농도 증가에 따른 세포 내 Ca^{2+} 농도변화는 관찰되지 않았다.
- 이 결과는 Glu-Glu가 TRPV1에 agonist로 작용하지 않으며, amiloride 비감수성 짠맛 인지에 직접 관여할 가능성이 낮음을 시사한다.

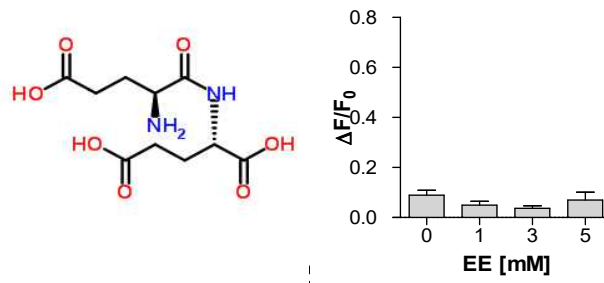


그림 25. TRPV1이 발현된 세포에서의 Glu-Glu (EE)의 효과

- Glu-Ser을 TRPV1이 발현된 세포에 1, 3, 5 mM 농도로 처리하였을 때, Glu-Ser 농도 증가에 따른 세포 내 Ca^{2+} 농도변화는 관찰되지 않았다.
- 이 결과는 Glu-Ser이 TRPV1에 agonist로 작용하지 않으며, amiloride 비감수성 짠맛 인지에 직접 관여할 가능성이 낮음을 시사한다.

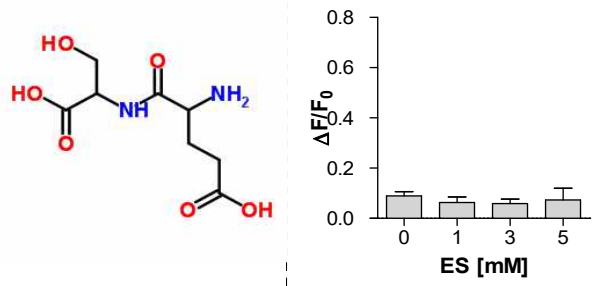


그림 26. TRPV1이 발현된 세포에서의 Glu-Ser (ES)의 효과

- Glu-Gly-Ser을 TRPV1이 발현된 세포에 1, 3, 5 mM 농도로 처리하였을 때, Glu-Gly-Ser 농도 증가에 따른 세포 내 Ca^{2+} 농도변화는 관찰되지 않았다.

- 이 결과는 Glu-Gly-Ser이 TRPV1에 agonist로 작용하지 않으며, amiloride 비감수성 짠맛인지에 직접 관여할 가능성이 낮음을 시사한다.

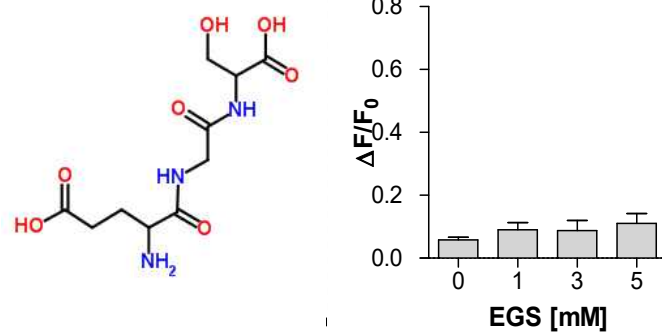


그림 27. TRPV1이 발현된 세포에서의 Glu-Gly-Ser (EGS)의 효과

- **Asp-Glu-Ser**을 TRPV1이 발현된 세포에 1, 3, 5 mM 농도로 처리하였을 때, Asp-Glu-Ser 농도 증가에 따라 세포내 Ca²⁺ 농도를 증가되었으며, 증가된 세포내 Ca²⁺량은 capsaizepine에 의해 저해되었다.
- 이 결과는 염미성 펩타이드인 Asp-Glu-Ser은 TRPV1 수용체에 agonist로 작용함으로써 amiloride 비감수성 짠맛인지에 관여할 가능성을 시사한다.

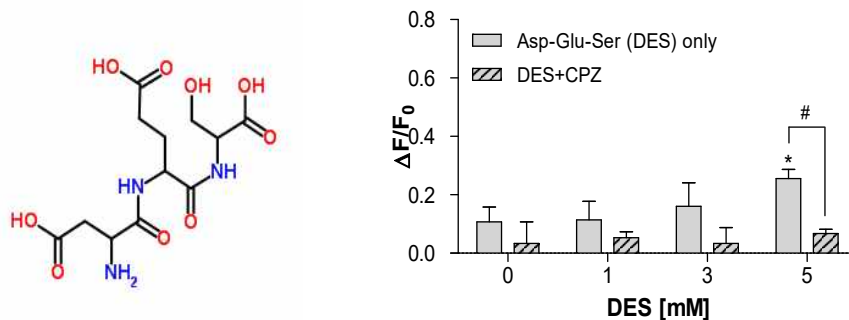


그림 28. TRPV1이 발현된 세포에서의 Asp-Glu-Ser (DES)의 효과

- 기존연구에서 제시된 5종의 지미성 펩타이드, Glu-Asp, Glu-Glu, Glu-Ser, Glu-Gly-Ser, Asp-Glu-Ser의 TRPV1 발현 세포에 미치는 영향을 측정한 결과 Asp-Glu-Ser은 TRPV1에 작용제로 작용함으로써 amiloride 비감수성 짠맛인지에 관여할 가능성이 시사되었다.
- Glu-Asp, Glu-Glu, Glu-Ser, Glu-Gly-Ser은 TRPV1 작용제로서 작용하지 않았다.

(나) 7종의 염미성 펩타이드의 TRPV1 활성화 작용 증강제로서의 효능 평가

- 지미성 펩타이드 중 TRPV1 agonist로 작용하지 않은 Glu-Asp, Glu-Glu, Glu-Ser,

Glu-Gly-Ser에 대해 agonist의 효능을 증가시키는 TRPV1 활성 증강제로서의 효능을 확인하였다.

- **Glu-Asp**(1, 3, 5 mM)를 TRPV1 agonist인 capsaicin (0.01 μ M)과 함께 반응시킨 결과, capsaicin만을 반응시켰을 때에 비해 세포 내 Ca^{2+} 유입량이 오히려 감소하였으며 감소 정도는 Glu-Asp 농도가 증가할수록 커지는 것으로 나타났다.
- 이 결과는 Glu-Asp는 TRPV1에 작용 증강제로도 작용하지 않으며, 따라서 TRPV1을 통한 짠맛증강작용에 관여하지 않음을 시사한다.

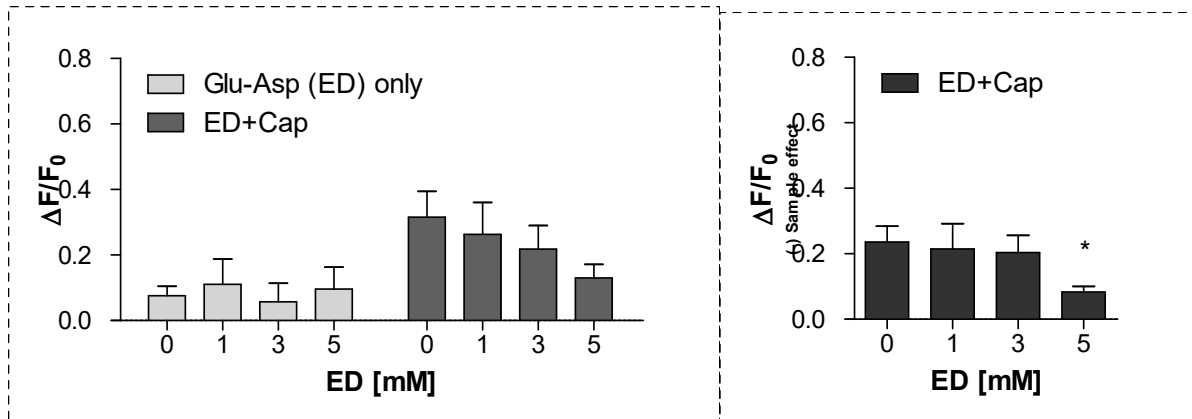


그림 29. TRPV1이 발현된 세포에서의 Glu-Asp와 capsaicin과의 상호작용

- **Glu-Glu**(1, 3, 5 mM)를 TRPV1 agonist인 capsaicin (0.01 μ M)과 함께 반응시킨 결과, capsaicin만을 반응시켰을 때에 비해 세포 내 Ca^{2+} 유입량이 오히려 감소하였으며 감소 정도는 Glu-Glu 농도가 증가할수록 커지는 것으로 나타났다.
- 이 결과는 Glu-Glu는 TRPV1에 작용 증강제로도 작용하지 않으며, 따라서 TRPV1을 통한 짠맛증강작용에 관여하지 않음을 시사한다.

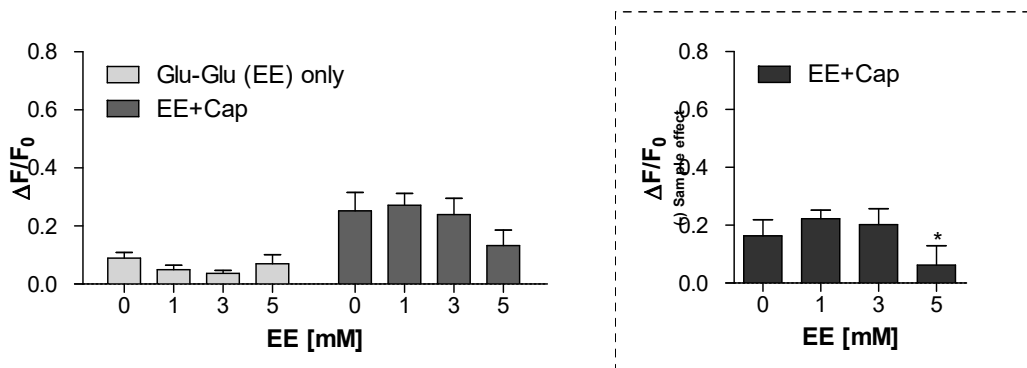


그림 30. TRPV1이 발현된 세포에서의 Glu-Glu와 capsaicin과의 상호작용

- **Glu-Ser**(1, 3, 5 mM)를 TRPV1 agonist인 capsaicin (0.01 μ M)과 함께 반응시킨 결과, capsaicin만을 반응시켰을 때에 비해 세포 내 Ca^{2+} 유입량이 오히려 감소하였으며 감소 정도는 Glu-Ser 농도가 증가할수록 커지는 것으로 나타났다.

- 이 결과는 Glu-Ser는 TRPV1에 작용 증강제로도 작용하지 않으며, 따라서 TRPV1을 통한 짠맛증강작용에 관여하지 않음을 시사한다.

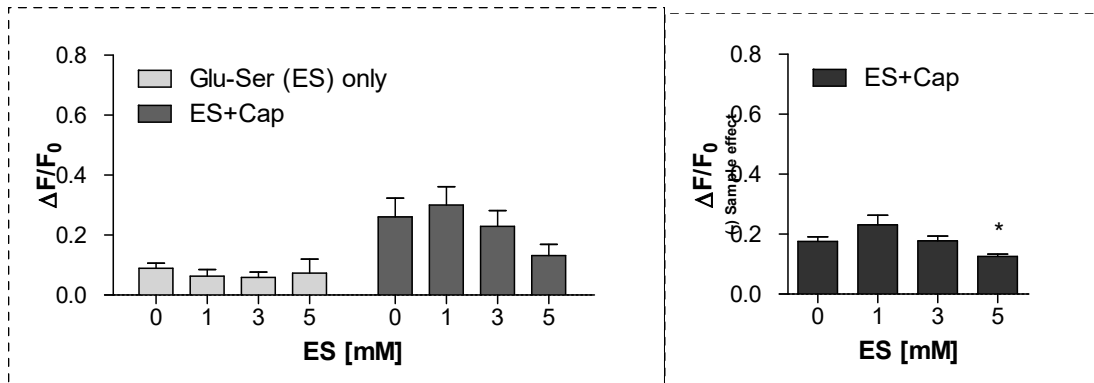


그림 31. TRPV1이 발현된 세포에서의 Glu-Ser와 capsaicin과의 상호작용

- **Glu-Gly-Ser**(1, 3, 5 mM)를 TRPV1 agonist인 capsaicin (0.01 μM)과 함께 반응시킨 결과, capsaicin만을 반응시켰을 때에 비해 세포 내 Ca²⁺ 유입량이 오히려 감소하였으며 감소 정도는 Glu-Gly-Ser 농도가 증가할수록 커지는 것으로 나타났다.
- 이 결과는 Glu-Gly-Ser는 TRPV1에 작용 증강제로도 작용하지 않으며, 따라서 TRPV1을 통한 짠맛증강작용에 관여하지 않음을 시사한다.

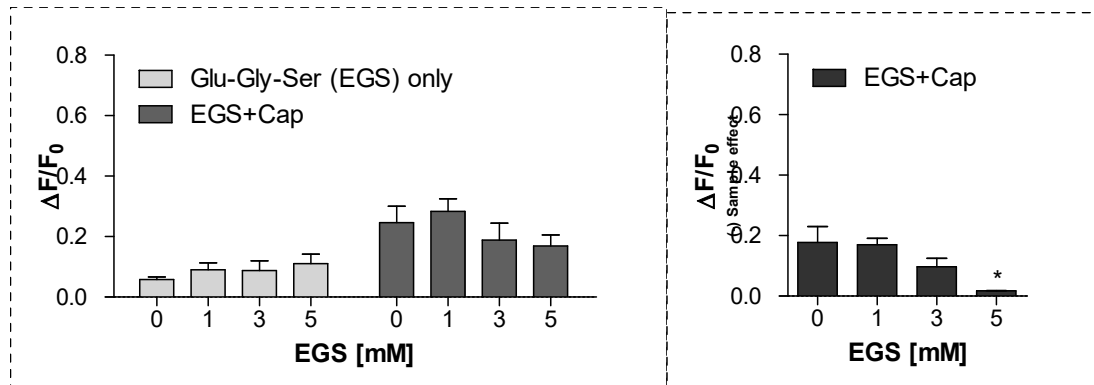


그림 32. TRPV1이 발현된 세포에서의 Glu-Gly-Ser와 capsaicin과의 상호작용

- 기존 연구에서 제시된 5종의 지미성 펩타이드 중 agonist로 작용하지 않는 Glu-Asp, Glu-Glu, Glu-Ser, Glu-Gly-Ser에 대해 CaSR 발현 세포에 활성제 작용 증강제로서 미치는 영향을 측정한 결과, Glu-Asp, Glu-Glu, Glu-Ser, Glu-Gly-Ser은 CaSR 작용 증강제로서 작용하지 않았다.

(2) CaSR 수용체에 대한 작용 평가

(가) CaSR 작용제로서의 효능 평가

- **Glu-Asp**을 CaSR이 발현된 세포에 1, 3, 5 mM 농도로 처리하였을 때, Glu-Asp 농도 증가에 따른 세포 내 Ca^{2+} 농도는 증가되었으며, 고농도(5 mM)의 Glu-Asp의 효과는 저해하지 못했지만 3 mM의 Glu-Asp의 증가의 antagonist인 *N*-((*R*)-2-hydroxy-3-(2-cyano-3-chlorophenoxy)propyl)-1,1-dimethyl-2-(2-naphthyl)ethylamine (NPS 2143)에 의해 유의적으로 저해되었다.
- 이 결과는 지미성 펩타이드인 Glu-Asp가 CaSR에 agonist로 작용함으로써 CaSR 관련 짠맛인지에 관여할 가능성을 시사한다.

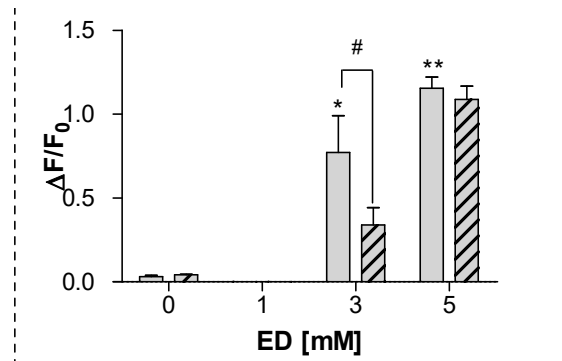


그림 33. CaSR이 발현된 세포에서의 Glu-Asp의 agonist 효과

- **Glu-Glu**(1, 3, 5 mM)를 CaSR이 발현된 세포에 처리하였을 때, 세포 내 Ca^{2+} 농도변화는 관찰되지 않았다.
- 이 결과는 Glu-Glu가 CaSR에 agonist로 작용하지 않으며, CaSR 관련 짠맛인지에 직접 관여할 가능성이 낮음을 시사한다.

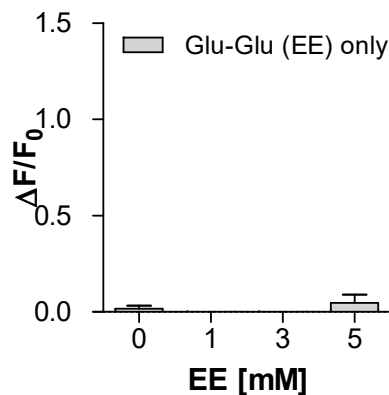


그림 34. CaSR이 발현된 세포에서의 Glu-Glu의 agonist 효과

- **Glu-Ser**을 CaSR이 발현된 세포에 1, 3, 5 mM 농도로 처리하였을 때, Glu-Ser 농도 증가에 따른 세포 내 Ca^{2+} 농도변화는 관찰되지 않았다.
- 이 결과는 Glu-Ser이 CaSR에 agonist로 작용하지 않으며, CaSR 관련 짠맛인지에 직접 관여할 가능성이 낮음을 시사한다.

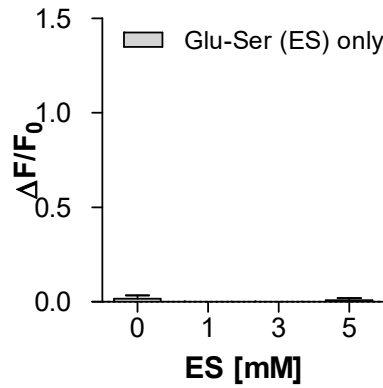


그림 35. CaSR이 발현된 세포에서의 Glu-Ser의 agonist 효과

- **Glu-Gly-Ser**을 CaSR 발현 세포에 1, 3, 5 mM 농도로 처리하였을 때 Glu-Gly-Ser 농도 증가에 따른 활성증가가 관찰되었으나 이 증가는 NPS 2143에 의해 저해되지 않아 CaSR 특이적 증가작용이 아닌 것으로 확인되었다.
- 이 결과는 Glu-Gly-Ser이 CaSR을 경유한 amiloride 비감수성 짠맛인지에 관여 가능성이 낮음을 시사한다.

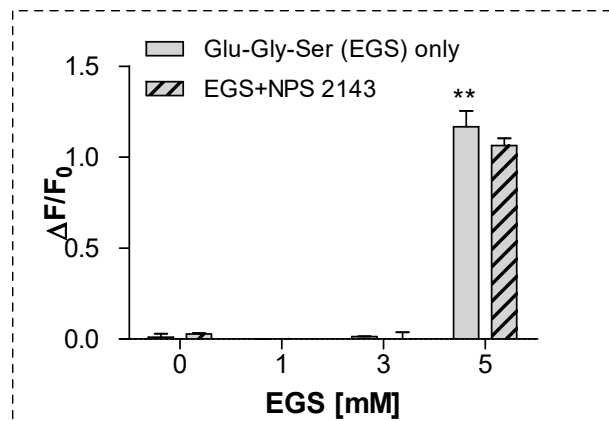


그림 36. CaSR이 발현된 세포에서의 Glu-Gly-Ser의 agonist 효과

- **Asp-Glu-Ser**을 CaSR 발현 세포에 1, 3, 5 mM 농도로 처리하였을 때 Asp-Glu-Ser 농도 증가에 따른 활성증가가 관찰되었으나 이 증가는 NPS 2143에 의해 저해되지 않아 CaSR 특이적 증가작용이 아닌 것으로 확인되었다.
- 이 결과는 Asp-Glu-Ser 이 CaSR을 경유한 amiloride 비감수성 짠맛인지에 관여 가능성이 낮음을 시사한다.

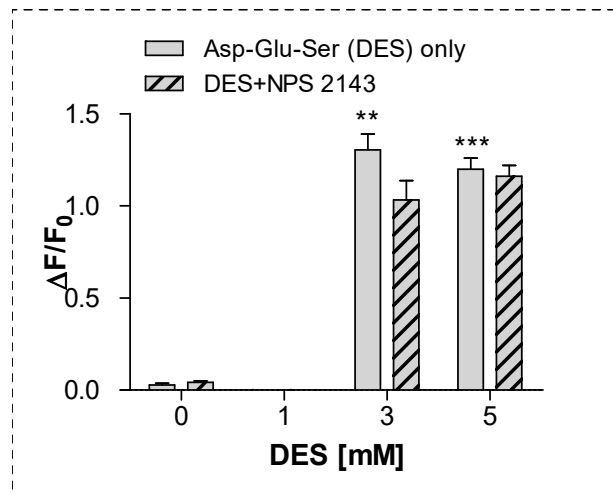


그림 37. CaSR이 발현된 세포에서의 Asp-Glu-Ser의 agonist 효과

- 기존 연구에서 제시된 5종의 지미성 펩타이드, Glu-Asp, Glu-Glu, Glu-Ser, Glu-Gly-Ser, Asp-Glu-Ser의 CaSR 발현 세포에 미치는 영향을 측정된 결과 Glu-Asp는 CaSR에 agonist로 작용함으로써 CaSR 관련 짠맛인지에 관여할 가능성이 시사되었다.
- Glu-Glu, Glu-Ser은 CaSR agonist로서 작용하지 않았다.
- Glu-Gly-Ser, Asp-Glu-SerArg-Ser은 CaSR에 agonist로 활성을 나타낸 반면 antagonist인 NPS 2143에 영향 받지 않아 CaSR 특이적 작용은 아닌 것으로 확인되었다.

(나) CaSR 활성화 작용 증강제로서의 효능 평가

- 지미성 펩타이드 중 agonist로서의 효과를 나타내지 않았던 2종 펩타이드 (Glu-Glu, Glu-Ser)를 CaSR agonist인 NPS R-568을 지미성 펩타이드와 함께 처리하여 작용증강제로서의 효능을 평가 하였다.
- **Glu-Glu**(1, 3 mM)를 CaSR agonist NPS R-568 (0.1 μM)과 함께 반응시킨 결과, NPS R-568만을 반응시켰을 때에 비해 세포 내 Ca²⁺ 유입량이 오히려 감소하였으며 감소 정도는 Glu-Glu 농도가 증가할수록 커지는 것으로 나타났다.
- 이 결과는 Glu-Glu은 CaSR 수용체에 작용 증강제로도 작용하지 않으며, 따라서 CaSR을 통한 짠맛증강작용에 관여하지 않음을 시사한다.

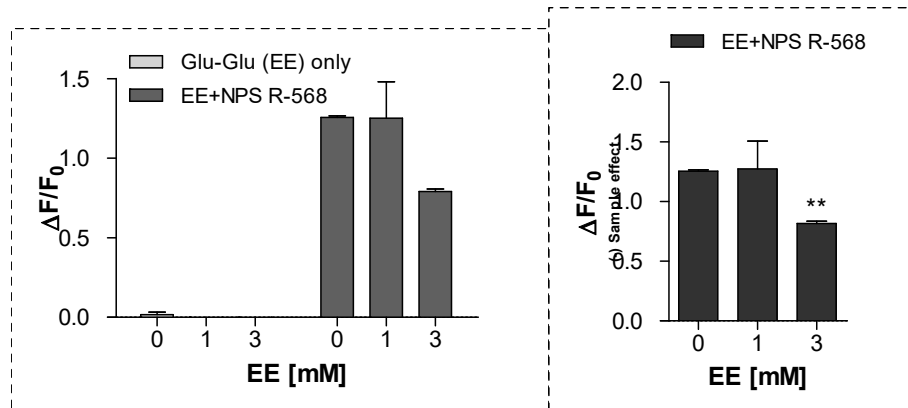


그림 38. CaSR이 발현된 세포에서의 Glu-Glu와 CaSR agonist와의 상호작용

- **Glu-Ser**(1, 3 mM)를 CaSR agonist NPS R-568 (0.1 μM)과 함께 반응시킨 결과, NPS R-568만을 반응시켰을 때와 세포 내 Ca²⁺ 유입량에 변화가 없었으며 Glu-Ser 농도 증가에도 영향을 받지 않는 것으로 나타났다.
- 이 결과는 Glu-Ser은 CaSR 수용체에 작용 증강제로도 작용하지 않으며, 따라서 CaSR을 통한 짠맛증강작용에 관여하지 않음을 시사한다.

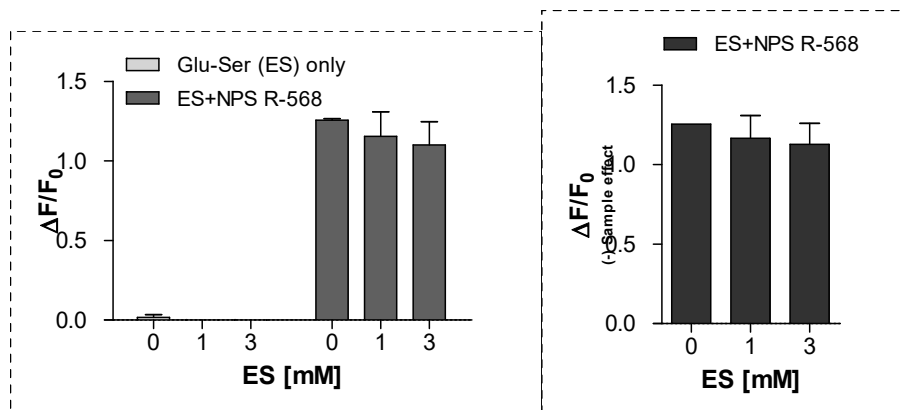


그림 39. CaSR이 발현된 세포에서의 Glu-Ser와 CaSR agonist와의 상호작용

- 기존연구에서 제시된 5종의 지미성 펩타이드 Glu-Asp, Glu-Glu, Glu-Ser, Glu-Gly-Ser, Asp-Glu-Ser의 CaSR 발현 세포에 agonist로 작용하지 않는 Glu-Glu와 Glu-Ser의 CaSR 활성 작용제로서 미치는 영향을 측정된 결과, Glu-Glu 및 Glu-Ser은 CaSR 작용 증강제로서 작용하지 않았다.

제4장. 2차년도 연구 수행 내용 및 결과

코드번호

D-05

제1절 연구개발 수행 내용

1. 연구개발 수행내용

가. 케이엠에프

구분	세부과제명	세부연구내용	연구개발 수행내용
2 차년 도	천연 엽미성 펩타이드 대량 생산 기술 확보 및 제품화	1. 최적 가수분해물의 대량생산 조건 설정	1) Mass scale에서의 시생산 3회를 통한 품질 평가 기준 확보 2) Mass scale에서의 표준공정 설정 · 가수분해 시간 및 온도 설정 · 농축 시간 및 온도 설정 · 제품 수율 지표 설정 3) 엽미성 펩타이드의 원료로써의 표준지표 설정 · 고형분 함량, 가수분해도, 유리아미노산 등 이화학적 기준 설정 · 엽미기능 평가 : <i>in vivo</i> 관능검사
		2. 최적 조성물의 안 전성 평가	설치류 대상 1회 단일 투여 허용치 LD50 값 평가 로 조성물의 독성 평가(GLP기관)
		3. 엽미 증강 펩타이 드 활용 제품 개발	1) 엽미 증강 펩타이드 함유 조성물 제품 개발 · 엽미성 펩타이드 함유 25% 저염소금 3종 · 엽미성 펩타이드 함유 엽미성 콩발효물 1종 2) 소금 대체 소재 적용 저염 된장 개발 · 25% 저염소금을 이용한 저염 된장의 개발 · 엽미성 콩발효물 블렌딩 저염 된장의 개발 · 저염 된장의 이화학적 특성 분석 · 제조 단계별 나트륨 저감화 공정 설계 · 저염 된장의 관능적 특성 분석 3) 소금 대체 소재 적용 저염 김치 개발 · 저염 소재 첨가 및 소금 함량에 따른 배합비 설계 · 저염 김치의 이화학적 특성 분석 · 김치 제조 단계별 저감화 공정 설계 · 저염 김치의 관능적 특성 분석

			<p>4) 소금 대체 소재 적용 일반 가공품 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> · 해양심층수 함유 프리미엄 저염 소금 개발 · 환자용 기능성 저염 소금 개발 · 저염 후라이드치킨용 저염튀김가루 개발 <p>5) 염미성 펩타이드 함유 제품 디자인 및 홍보</p> <ul style="list-style-type: none"> · 출시제품 라벨 디자인 및 품목제조신고 · 홍보자료 디자인 · 제품 홍보 세미나 개최 · 식품 및 첨가물 국내외 박람회 참가로 제품 홍보 <p>6) 저염화 기술을 활용한 노하우 컨설팅</p> <ul style="list-style-type: none"> · 저염 된장제조법 컨설팅 실시 및 기술이전
--	--	--	--

나. 계명대학교

구분	세부과제명	세부연구내용	연구개발 수행내용
2 차 년 도	염미성 펩타이드 합성 및 분석기술 개발	1. 염미성 펩타이드 구조분석 및 합성기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> · 고체상 펩타이드 합성법을 통해 염미성 펩타이드 합성 · 합성된 염미성 펩타이드의 특성 규명(분자량, 용해도 등등)
		2. 염미성 펩타이드 분석법 개발	<ul style="list-style-type: none"> · 염미성 펩타이드 분석법 - TLC, LC-MS/MS를 이용한 지표 성분 분석 및 벨리데이션 · 펩타이드 분석법 벨리데이션 보고서 작성

다. 한국식품연구원

구분	세부과제명	세부연구내용	연구개발 수행내용
2차 년도	염미성 펩타이드 기능평가	1. 수용체 발현 세포 모델에서의 활성 펩타이드의 작용 평가	<p>1) 펩타이드의 TRPV1 및 수용체 활성화 작용 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> · TRPV1 수용체에 대한 활성 펩타이드의 작용 평가 · 활성 펩타이드의 TRPV1 수용체 작용제와의 상호 작용 평가

		2) 펩타이드의 CaSR 맛 수용체 활성화 작용 평가 · CaSR (Calcium sensing receptor) 수용체에 대한 활성화 펩타이드의 작용 평가 · 활성화 펩타이드의 CaSR 수용체 작용제와의 상호 작용 평가
	2. 염미성 펩타이드의 맛 상승 메카니즘 도출	1) 활성화 펩타이드의 미각수용체 작용 모델 제시 2) 작용 메카니즘에 근거한 소재의 활용방안 제시

2. 추진체계 및 전략

<연구개발 추진방법>

○ 기 보유한 염미성 식물성(농부산물) 펩타이드 조성물을 기반으로 동물성(축부산물)을 보장 개발 추진

- KMF(1세부기관)에서 배합비별 품질 평가 담당
- 계명대(1협동-대학)에서 염미성 펩타이드 분석기술 개발
- 한식연(2협동_출연연)에서 맛 수용체 발현 세포모델에서의 활성화 펩타이드의 작용 평가 담당

○ 신규 펩타이드 조성물의 효능평가 및 구조분석 추진

- KMF(1세부기관)에서 기 보유 염미성 펩타이드 조성물로부터 효능 보장된 신규 펩타이드 조성물의 대량생산 공정 및 제조 담당
- 계명대(1협동-대학)에서 염미성 펩타이드 분석 및 합성기술 담당
- 한식연(2협동_출연연)에서 염미성 펩타이드의 맛상승 메카니즘 도출 담당
- 바이오독스텍에서 조성물의 독성 평가 외부의뢰

○ 염미 증진 펩타이드 조성물 함유 기능성 저염 제품의 개발 추진

- KMF(1세부기관)에서 염미성 펩타이드 대량 생산 담당
- KMF(1세부기관)에서 염미성 펩타이드 표준화 담당

○ 박람회 참가로 저감화 소재 및 저염 제품의 홍보 추진

- 식품 및 첨가물 국내외 박람회 참가 및 세미나로 소재 및 저염 제품 홍보 실시

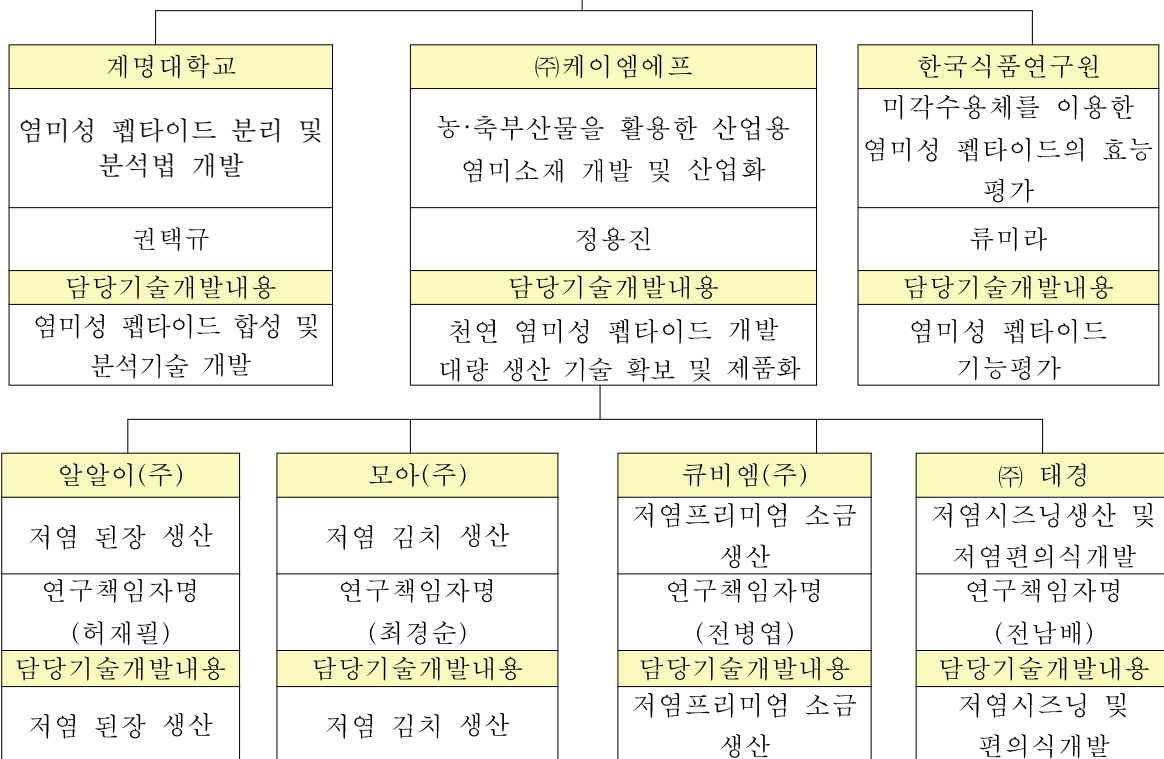
○ 저염화 기술 필요한 전통 된장 기업체로의 노하우 기술이전 추진

- 식약처의 저감화 사업으로 장류, 김치, 절임류 대상으로 중소기업대상 저감화 기술이 필요한 업체에 본 과제의 성과물을 활용한 저염화 기술의 컨설팅을 실시하고, 기술이전이 필요한 업체에 기술 이전을 실시하며, KMF기술을 접목한 저염 제품의 출시에 소재 및 기술을 접목하여 제품을 출시할 수 있도록 추진함.

가. 2차년도 추진전략

연구개발과제		총 참여 연구원
과제명	농 축 부산물을 활용한 산업용 염미소재 개발 및 산업화	주관연구책임자(정용진)외 총 22명

기관별 참여 현황		
구 분	연구기관수	참여연구원수
중소기업	4	14
대 학	1	4
출 연 (연)	1	4
기 타(중견기업)	1	1



나. 2차년도 추진일정

1차년도																
일련번호	연구내용	월별 추진 일정												연구개발비 (단위:천원)	책임자 (소속기관)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1	최적 가수분해 물의 대량생산 조건 설정	■	■	■	■										66,750	KMF
2	제품별 품질 특성 평가		■	■	■	■	■								66,750	KMF
3	최적 조성물의 안전성 평가				■	■	■	■	■						57,750	KMF
4	제품 사업화 및 제품홍보				■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	75,750	KMF
5	염미성 펩타이드 구조분석 및 합성기술개발	■	■	■	■	■	■								20,000	계명대
6	염미성 펩타이드 분석법 개발							■	■	■	■	■	■	■	20,000	계명대
7	맛 수용체 발현 세포모델에서의 활성 펩타이드의 작용 평가	■	■	■	■	■	■								47,000	한식연
8	염미성 펩타이드의 맛 상승 메커니즘 도출							■	■	■	■	■	■	■	46,600	한식연

제2절. 제 1세부: 천연 염미성 펩타이드 대량 생산 기술 확보 및 제품화 (KMF)

1. 재료 및 실험방법

가. 최적 가수분해물의 대량생산 조건 설정

(1) Mass scale 3회의 시생산을 통한 품질 평가 기준 확보

- 각 공정에 따른 품질평가로 Brix와 pH를 측정하였음. pH의 측정은 pH meter (Metrohm 691, Herisau, Switzerland)로 실온에서 측정하였음. brix는 digital refractometer (PR-101, ATAGO Co., Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였음.
- 공정과정은 분리대두단백을 포함하는 여러 재료를 혼합하여 KMF-14을 활용하여 가수분해를 진행하고, 살균공정을 거쳐 저장성에 용이하도록 제조하여 총 3번의 시생산을 수행하였음.

(2) Mass scale 표준공정 설정

- 시생산 결과를 참고하여 적합한 시간을 설정하고자 하였으며, 대량생산을 위하여 fermenter 3대를 이용하였음. 농축시간 또한 각 fermenter에서 농축기로 이동되는 소요시간을 계산하였으며, fermenter 3대에서 큰 문제없이 모두 농축기로 이송될 수 있는 효소 실험 조건을 설정하였음. 효소 실험은 100℃에서 약 20분 진행되었음.
- 제품 수율지표 설정을 위하여 SAP를 직접 생산하여 생산 보고서를 작성하였으며, 그 지표로는 당도로써 실험실용 당도와 실 생산시의 당도를 비교하고자 하였음. 당도는 digital refractometer (PR-101, ATAGO, Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였음. SAP의 직접 생산은 총 3차까지 진행하였음.
- 생산된 SAP의 균일한 분말화를 위하여 열풍건조 조건 설정을 하고자 하였으며, 열풍건조의 공정 순서, 온도 및 시간을 설정하였음. 단백질 변성 방지를 위하여 온도조건은 50~60℃로 지정하였으며, 1일~7일의 조건에서 비교하였음.

(3) 염미성 펩타이드의 원료로써의 표준지표 설정

(가) 이화학적 기준 설정

① 염미성 펩타이드의 원료로써의 유리아미노산 함량

- 유리아미노산 함량은 각 시료를 8,000 rpm에서 20분간 원심분리 후 상등액을 취해 0.45 μ m membrane filter (PVDF-2545, Chemco Scientific, Osaka, Japan)로 여과한 용액을 유리아미노산 측정시료로 사용하였으며, Amino Acid Analyzer (L-8900, Hitachi, Tokyo, Japan)로 분석하였음.

② 염미기능 평가 : *in vivo* 관능검사

- 리커트 척도의 5점 척도를 사용하였음. ‘매우 좋음, 좋음, 보통, 나쁨, 매우 나쁨’ 으로 범주를 설정하여 ‘매우 좋음’을 5점, ‘좋음’을 4점, ‘보통’을 3점, ‘나쁨’을 2점, ‘매우 나쁨’을 1점으로 하여 점수 환산하였으며, 평균값이 가장 높은 실험 군을 최적배합비로 선정함
- SAP와 MSG의 관능 비교 검사를 계명대학교 학생을 대상으로 실시함.
- SAP의 감칠맛 증강효과를 간장 전문 패널 대상으로 실시함.
- SAP의 라면스프 염미증강효과를 라면제조사 연구원 대상으로 실시함.

나. 최적 조성물의 안전성 평가

- (1). 설치류 대상 1회 단일 투여 허용치 LD50 값 평가로 조성물의 독성 평가(GLP기관)

다. 염미 증강 펩타이드 활용 제품 개발

- (1) 염미증강 펩타이드 함유 조성물 제품 사업화

(가) SAP혼합 염미성 펩타이드 조성물 함유 제품 개발

① 저염 소금개발

- 저염 소금개발을 위하여 본 연구과제에서 도출된 염미성 식물성 펩타이드 가수분해물인 SAP를 활용하였으며, 장류용, 김치 절임용, 김치 양념용, 일반 소금용 등 다양하게 활용 할 수 있는 방안을 구상하였음.
- 저염 소금 중 25%나트륨 저감 컨셉의 ‘짤트’를 개발하였으며, 개발한 염미성 펩타이드 가수분해물을 첨가하여 염미가 상승되게 하였으며, KCl을 활용하여 Na 함량을 줄이도록 하였음.

(2) 저염 장류 제품 개발

- 소금의 주된 섭취 급원인 장류의 저염화를 위하여 나트륨은 내리고, 감칠맛은 그대로 유지하는 된장의 개발을 위하여 된장 담금수의 저염화하는 방법으로 된장을 담그어 저염 화율 및 특성을 분석하였음.

(가) 저염 소재 첨가 및 소금 함량에 따른 원료 배합비 설계

① 25% 저염소금을 이용한 저염 된장의 개발

- 본 연구를 통해 개발된 염미소재를 활용하여 나트륨 저감화 된장을 개발하였음. 된장의 담금은 경북지역 업체에서 담금하는 방법에 준하여 개량식 메주(알알이 메주)를 사용하였음.
- 된장을 담금 할 때 소금의 종류에 따른 나트륨 함량이 25%저감하여 개발한 소금을 사용하였음. 콩은 경북 청송지역에서 생산되는 메주콩(백태)를 구입·사용하였음.
- 개량식 된장의 담금은 국산콩으로 만든 개량식 메주에 정제염을 대조구로 하여 12.5%, 25.0%, 37.5%, 50.0%의 나트륨을 감소하도록 25% 저염 소금을 사용하여 배합하였음.
- 메주와 소금물의 비율은 1대 3으로 각각 담금 하여 60일 동안 실온에서 발효하여 간장과 된장으로 분리하여 된장을 1년간 숙성한 후 시료로 사용하였음. 사용된 된장은 핸드블랜더를 활용하여 모두 균일하게 분쇄하여 재료로 사용하였음.

② SAP함유 염미성 콩발효물을 활용한 저염 된장의 개발

- SAP를 첨가하여 염미를 높이고, 콩을 발효하여 아미노산성 질소함량을 높인 후 건조한 염미성 콩발효물을 개발하였으며, 이는 숙성된 된장의 저장성을 유지하면서, 이미 염도가 높은 된장과 염미성 콩발효물을 블렌딩하여, 저염화함. 시중에 판매되는 일반된장을 사용하였음. 일반 된장 90%와 염미성 콩발효물 10 %이 사용되었음.

(나) 나트륨 저감소재 적용 저염된장의 이화학적 특성 분석

① 염도 및 수분 분석

- 염도는 시료 10 g에 증류수 90 ml을 가하여 잘 교반 한 뒤 염분농도계(PAL-03S, ATAGO, Japan)를 사용하여 측정하였음. 수분함량은 균일하게 마쇄한 된장을 1.5 g~2 g 계량하여 105℃ 적외선수분계(FD-220, Kett, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였음.

② pH, 총 고형분 함량 및 색도 측정

- pH의 측정은 pH meter (Metrohm 691, Herisau, Switzerland)로 실온에서 측정하였음. 총 고형분 함량은 digital refractometer (PR-101, ATAGO Co., Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였음. 색도의 경우 UV-spectrophotometer (UV-visible spectrophotometer 1601, Shimadzu, Kyoto, Japan)을 사용하여 명도(L), 적색도(a), 황색도(b)값을 측정하여 Hunter' color value로 나타내었으며, 이때 대조구는 증류수 (L=99.99, a=0.06, b=-0.08)를 사용하였음.

③ 산도의 측정

- 적정산도는 blender로 간 반죽상태의 시료 약 1 g을 정확히 달아 적당히 희석(100 mL) 하여 여과(Toyo no. 1)한 여과액 20 mL에 0.01N NaOH 용액으로 pH가 8.3이 될

때까지 적정하여 소비된 0.01 N NaOH 용액 소비량을 구한 후 다음의 식으로 계산하였음.

$$\text{산도}(\%) = \frac{\text{소비된 NaOH}(mL) \times 0.0009 \times \text{NaOH factor} \times 5 \times \text{희석부피}(mL)}{\text{시료량}(g \text{ 또는 } mL)}$$

④ 아미노산성 질소

- 된장중의 아미노산성 질소 (NH₂-N)는 식품공전에 준하여 포르몰(Formol)적정법에 의하여 측정하였음. 시료 10 g에 증류수 100 ml을 가하여 균질화 한 후 4,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 그 상등액을 시료로 사용하였으며, 상등액 5 ml에 formaldehyde 용액 10 ml를 가하여 0.1 N NaOH 용액으로 pH 8.3이 되도록 중화적정. 공시험은 상등액 대신 증류수 5 ml을 이용하였으며 그 값을 이용하여 보정함.

⑤ 나트륨 함량

- 나트륨 함량은 습식분해법(Wet Digestion Method)으로 분석하였음. 시료 1 g에 65%의 HNO₃ 6 mL와 30% H₂O₂ 1 mL를 teflon bottle에 담은 후 이를 전처리 시험용액으로 하며, microwave digestion system(Ethos-1600, Milestone, Sorisole, Italy)을 이용하여 최고 600 W로 총 20분간 산분해를 실시를 하였음. 전처리 과정을 거친 시료용액은 0.45 μm membrane filter(Milipore, Massachusetts, USA)로 여과하여 Inductively coupled plasma spectrometer(ICP-IRIS, Thermo Elemental, Massachusetts, USA)로 분석하였음.

⑥ 유리아미노산 함량 측정

- 유리아미노산 함량은 각 시료를 8,000 rpm에서 20분간 원심분리 후 상등액을 취해 0.45 μm membrane filter (PVDF-2545, Chemco Scientific, Osaka, Japan)로 여과한 용액을 유리아미노산 측정시료로 사용하였으며, Amino Acid Analyzer (L-8900, Hitachi, Tokyo, Japan)로 분석하였음.

⑦ 구성아미노산 함량 측정

- 구성아미노산 함량은 시료를 500 mg 칭량하여 6 N HCl을 1 ml을 가해 질소로 충전한 후 110°C에서 24시간동안 가수분해한 시료를 80°C에서 건조시킨 후 0.02 N HCl 1 ml을 가하여 잘 교반하며 추출한 후 0.45 μm 필터(PVDF-2545, Chemco Scientific, Osaka, Japan)로 여과하여 0.02 N HCl로 희석하여 사용하였으며, Amino Acid Analyzer (L-8900, Hitachi, Tokyo, Japan)로 분석하였음.

(3) 소금 대체 소재 적용 저염 김치 제품 개발

(가) 저염김치의 담금

- 본 연구를 통해 개발된 염미소재를 활용하여 나트륨 저감화 김치를 개발하였음. 염미소재를 활용한 저염 김치의 제조과정은 입고 -> 정선 -> 1차 세척 -> 절임 -> 탈수 -> 기타농산물세척, 전처리 -> 분쇄 -> 양념제조 -> 절임배추에 양념 속 넣기 ->

예냉(숙성) -> 내포장 -> X-ray 이물선별 -> 외포장 -> 출고의 공정을 거침

- 절임수 사용시에 소금을 25% 저염 소금으로 사용하였음. 멸치액젓을 25% 감량하고 본 실험에서 제조된 염미증강 소재를 별도 첨가하였음.

(나) 저염김치의 이화학적 특징 분석

- 염미증강소재를 활용하여 만든 저염 김치는 담금 직후의 염도, 당도, pH, 산도, 나트륨 함량, 미생물 특성, 관능평가를 실시하였음.
- 미생물 함량 평가를 위한 총 젖산균은 시료 10 g에 0.85% NaCl 90 mL를 가하여 1분간 stomaching하여 단계별로 희석한 다음 MRS agar (Lactobacilli MRS agar, Difco)에 BCP (bromocresol purple) 지시약을 25 ppm으로 넣어 제조한 배지를 사용하여 단계별로 희석한 시료를 접종한 후 pouring culture method로 30°C에서 48시간 배양하고 총 colony와 yellow 발색 반응을 나타낸 colony(유기산 생산균)를 계수함.

(4) 프리미엄 저염 소금개발

- 프리미엄 컨셉을 가지는 저염 소금을 개발하고자 하였으며, 염화칼륨대신에 사용된 함초는 '가루나라'에서 구입하여 이용하였음. 정제염은 죽염을 이용하였으며, 미네랄 보충을 위하여 해양심층수 농축분말, 이스트익스트랙트, 케이킹 현상 방지를 위하여 식염용 이산화규소를 이용하였음.

(5) 염미소재 활용 저염 튀김가루의 제조

- 본 연구에서 개발된 염미성 펩타이드 소재를 활용하여 (주)삼미식품 나트륨이 저감화된 치킨파우더를 제조 및 개발하였으며, 내부관능평가를 실시하였음. 7점척도 법을 이용하였으며, 치킨파우더를 이용하여 후라이드치킨을 튀겨내어 관능평가를 실시하였음. 참여한 패널은 27명임.

라. 염미소재 활용 저염제품에 대한 소비자 설문조사

- 본 연구에서 개발된 염미성 펩타이드 소재를 활용하여 나트륨이 저감화된 된장과 김치를 제조하였으며, 산업화를 위하여 시식을 진행하고 맛 평가, 염도 평가, 구매의향을 분석하였음.

(1) 저염된장 설문조사 문항

일반된장과 저염된장 비교 설문

문항 : 4 문항

대상 : 박람회 참가자 100명

설문 방법 : A된장(나트륨저감화된장)과 B된장(일반된장)의 맛 평가, 염도 평가, 구매 의향(정보제공전), 구매의향(정보제공후) 척도점수와 O,X 점수를 통계내어 평가한다.

1.A된장과 B된장의 맛을 보고 짠 정도를 평가하여 스티커를 붙여주세요.

척도	A된장	B된장
매우짜다		
짜다		
보통이다		
싱겁다		
매우싱겁다		

1.A된장과 B된장의 맛을 보고 감칠맛 정도를 평가하여 스티커를 붙여주세요

척도	A된장	B된장
매우감칠맛이 돈다		
감칠맛이 돈다		
보통이다		
감칠맛이 낮다		
매우 감칠맛이 낮다		

3. A된장과 B된장 두 가지 중 선호하는 된장은 무엇입니까? (정보제공 전)

4. A된장과 B된장 두 가지 중 다시 먹을 의향이 있는 것은 무엇입니까?(정보제공 후)

(2). 저염된장 평가방법

(가) 1번 문항

- 평균비교 방법 중 독립표본검정 방법을 이용하였으며, 설문의 척도 및 환산 기준은 다음 그림에 나타냄.



(나) 2번 문항

- 평균비교 방법 중 독립표본검정 방법을 이용하였으며, 설문의 척도 및 환산 기준은 다음 그림에 나타냄



(다) 3번, 4번 문항

- 기술통계 방법 중 빈도분석 방법을 이용하였으며, 각 변수 내 각 범주에 속해있는 분포적 특성을 파악하는 방법으로 빈도수 및 응답의 비율을 파악하였음

(3) 저염김치 평가방법

일반김치와 저염김치 비교 설문

문항 : 4 문항
 대상 : 박람회 참가자 100명
 설문 방법 : A김치(나트륨저감화 김치)과 B김치(일반김치)의 맛 평가, 염도 평가, 구매의향(정보제공전), 구매의향(정보제공후) 척도점수와 O,X 점수를 통계내어 평가한다.

1.A김치과 B김치의 맛을 보고 짠 정도를 평가하여 스티커를 붙여주세요.

척도	A김치	B김치
매우짜다		
짜다		
보통이다		

싱겁다		
매우싱겁다		

1.A김치과 B김치의 맛을 보고 익은 정도를 평가하여 스티커를 붙여주세요

척도	A김치	B김치
매우좋다		
좋다		
보통이다		
덜익었다		
매우덜익었다		

3.A김치과 B김치 두 가지 중 선호하는 김치는 무엇입니까? (정보제공 전)

4.A김치과 B김치 두 가지 중 다시 먹을 의향이 있는 것은 무엇입니까?(정보제공 후)

(가) 1번 문항

- 평균비교 방법 중 독립표본검정 방법을 이용하였으며, 설문지의 척도 및 환산 기준은 다음 그림에 나타냄.



(나) 2번 문항

- 평균비교 방법 중 독립표본검정 방법을 이용하였으며, 설문지의 척도 및 환산 기준은 다음 그림에 나타냄



(다) 3번, 4번 문항

- 기술통계 방법 중 빈도분석 방법을 이용하였으며, 각 변수 내 각 범주에 속해있는 분포적 특성을 파악하는 방법으로 빈도수 및 응답의 비율을 파악하였음

2. 연구개발 수행결과

가. 최적 가수분해물의 대량생산 조건 설정

(1). Mass scale에서의 시생산 3회를 통한 품질평가 기준 확보

(가) 1차 시생산을 통한 품질 평가

- Lab. scale에서 확정 되었던 효소 KMF-14를 이용하여 1차 시생산을 진행하였으며, 각 공정에 따른 품질평가로 Brix와 pH를 측정하였음. 공정과정은 분리대두단백을 포함하는 여러 재료를 혼합하여 KMF-14를 활용하여 가수분해를 진행한 후, 농축하여 가수분해 시 사용하였던 정제수를 증발시킴. 그 후 살균공정을 거쳐 저장성에 용이하도록 제조함. 각 공정에 따른 품질평가 내용은 표 1에 표시하였음.

표 1. 1차 시생산 공정과정 및 그에 따른 품질평가

공정과정	제조온도 (°C)	품질평가	
		Brix	pH
혼합		3.08	7
가수분해	50	4.72	6.35
효소실활	100	5.08	6.47
농축	-	11.26	6.41
2차 부재료 혼합		14.16	4.61
살균	100	14.08	4.67

(나) 2차 시생산을 통한 품질 평가

- 1차 시생산과 공정과정과 사용한 효소는 같으나 가수분해 시간을 달리하였음. 1차 시에는 가수분해 시간에 따라 다음 공정으로 연결될 때 문제가 있어 2차 시생산 시에 가수분해 시간을 조정하였음. 각각 공정에 따른 품질 평가를 1차 시생산과 같이 진행하였으며, 품질평가 결과는 표 2에 나타내었음. 1차 시생산에 2시간 가수분해 후 4.72 brix, 2차 시생산에서 4시간 가수분해 후 4.92 birx로 2시간과 4시간에 따른 분해 정도에는 큰 변화가 없었다고 볼 수 있음.

표 2. 2차 시생산 공정과정 및 그에 따른 품질평가

공정과정	제조온도 (°C)	품질평가	
		Brix	pH
혼합		3.14	6.94
가수분해	50	4.92	6.40
효소실활	100	5.26	6.37
농축	-	13.0	6.34
2차 부재료 혼합		15.42	4.74
살균	100	15.9	4.63

(다) 3차 시생산을 통한 품질평가

- 1, 2차 시생산과 공정과정 및 재료의 양은 같으나, 가수분해 시간을 수정하여 진행하였음. 이는 1, 2차 시의 가수분해 시간에 따라 brix의 정도가 크게 차이 나지 않아 대두분리단백의 단백질 분해를 완전히 하고자 함이었으며, 그에 따른 품질평가 내용은 표 3에 표시하였음. 가수분해 후 brix가 5.22 °로 최종 분말형에서 쓴맛이 많이 느껴졌음.

표 3. 3차 시생산 공정과정 및 그에 따른 품질평가

공정과정	제조온도 (°C)	품질평가	
		Brix	pH
혼합		3.10	6.97
가수분해	50	5.22	6.33
효소실활	100	5.54	6.31
농축	-	14.92	6.33
2차 부재료 혼합		17.44	4.66
살균	100	18.26	4.70

(2) Mass scale 표준공정 설정

(가) 가수분해 시간 및 온도 설정

- 위 시생산을 통해 확인하였던 표 1, 2, 3의 품질평가 자료를 활용하여 Mass scale에서의 가수분해 시간 및 온도를 설정하고자 하였으며 2시간이 가장 적합하다는 것을 확인하였음.
- 표 4에 가수분해 시간 설정을 위한 Mass scale에서의 세부 공정 내용을 표시하였음. 1차년도 Lab scale에서 선별되었던 단백질 가수분해 효소인 KMF-14를 0.3% 첨가하여, 50°C에서 2시간 가수분해하는 조건을 최종 설정함.

표 4. Mass scale에서의 표준공정 설정_가수분해 시간 및 온도

기본공정	세부 공정
혼합과정	찬물로 분리대두 단백질과 부재료를 각각 따로 녹임
가수분해	KMF-14 0.3% 첨가, 50℃, 2시간

○ Mass scale에 사용되었던 fermenter 1번, 2번, 3번은 그림 1에 나타내었음



그림 1. 식물성 가수분해물 제조에 사용된 Fermenter

(나) 농축 시간 및 온도 설정

- Mass scale에서의 농축 시간 및 온도 설정을 위하여 총 3대의 fermenter를 이용하여 가수분해를 진행하였음. Scale이 증가하면서 생기는 문제점을 해결 및 보완하기 위하여 각 fermenter에서 이송되는 시간까지 고려하였으며, 농축 온도 및 시간을 설정하고자 하였음.
- Mass scale에서의 농축 시간 및 온도 설정에 따른 세부공정은 표 5에 나타내었음. 농축 공정에서의 온도는 60℃로 설정하여 농축하였고, 가수분해액 부피에 대비하여 40~50%가 되도록 농축한 후 효소를 실활 시킴.
- 효소실활은 100℃에서 20분간 진행하며, 가수분해 후 각각 종료시간에 맞추어 효소를 실

활 하는 과정을 거침.

- 2차 재료는 유통의 안전성을 위해 NaCl을 첨가하는 과정이며, 적당히 순환되게 하여 교반하여야 함. 이후 100℃에서 20분가량 살균하고, 75℃로 식혀 포장하여 이송함.

표 5. Mass scale에서의 농축 시간 및 온도 설정에 따른 세부공정

기본공정	온도 (℃)	시간 (분)	세부공정
효소실활	100	20	노하우
농축	60	80	노하우
2차 재료 혼합		10	노하우
살균	100	20	노하우
소분 및 이송		40	노하우

(다) 제품 수율 지표 설정

- 제품의 수율 지표 설정을 위하여 SAP를 제조시 마다 생산 보고서를 작성하였음. 확정된 공정 방법에 맞추어 제품 생산하였으며, 수율지표는 가수분해 정도를 알아보기 위해 brix로 와 pH로 측정하였음. 각 단계별로 표준 brix와 pH는 표 6과 같음.

표 6. SAP제조 공정과정에 따른 지표 기준





공정과정	품질평가	
	Brix	pH
혼합	3~4	7
가수분해	4~5	6.0~6.5
효소실활	5.0~5.5	6.0~6.5
농축	12~13	4.5~5.0
2차 부재료 혼합	15~16	4.5~5.0
살균	15~16	4.5~5.0

(라) 열풍건조 조건설정

- 혼합, 가수분해, 효소실활, 농축, 2차 혼합, 살균과정을 거친 액상형태의 식물성 펩타이드를 균일한 분말형태로 만들기 위하여 열풍건조 방법을 선택하였으며, 열풍건조 공정의 순서, 온도 및 시간을 설정하기 위해 진행하였음.

- 단백질의 변성될 가능성을 고려하여 열풍 건조 조건은 50℃~60℃로 지정하였으며, 열풍 건조 시간을 달리하여 실험을 진행하였으며 그 결과는 표 7에 나타냄. 농축 2차 재료를 모두 첨가하여 60℃에서 6일간 건조시킨 A에서는 완전하게 건조되었으나 맛이 균일하지 못했고, 50℃에서 6일 건조시킨 B에서는 완전히 건조되지 않아 꾸덕한 형태를 보였음. 농축 후 2차 부재료 첨가 후 60℃에서 1일 건조시킨 C에서는 전혀 건조가 되지 않았음. 50℃에서 7일간 열풍건조를 진행한 D군에서는 색이 완전히 탁해지면서 식품에 사용할 수 있는 용도와는 맞지 않음.
- 이처럼 열풍건조는 많은 시간이 소요되고, 이는 단가의 상승을 초래하므로 이 점을 고려하여, 다른 스프레이 건조법, 동결건조법 등 다른 방법을 선택할 필요가 있음.

표 7. 열풍건조 온도 및 시간에 따른 변화

	설명	사진	온도 (°C)	시간	관능
A	농축 후 소금, 식초 첨가 균		60	6	맛이 균일하지 않음
B	농축 후 식초, 소금 첨가 균		50	6	탄 맛이 있음 꾸덕한 형태로 완전건조 되지 않음
C	농축 식초, 소금 첨가 균		60	1	건조시간이 짧아 상부는 증발되었으나, 내부는 액상
D	농축 후 식초, 소금 첨가 균		50	7	색이 탁해짐

(3) 염미성 펩타이드 원료의 표준지표 설정

(가) 이화학적 기준 설정

① 염미성 펩타이드 원료의 유리아미노산 함량

- 생산된 SAP의 생산 Lot.에 따른 유리아미노산 data는 표 8과 같음.
- Lot별 생산된 SAP의 아미노산 함량을 분석한 결과 산성 아미노산 및 염기성 아미노산 함량 비율이 약 1:1로 유지되는 것을 확인함.

표 8. 식물성 펩타이드 가수분해물의 유리아미노산 함량

구분 (mg/g)	Lot.1	Lot.2	Lot.3	Lot.4	Lot.5	Lot.6	Lot.7	Lot.8	Lot.9	Lot.10	
Non-polar	Alanine	3.9	3.5	3	3.1	2.7	4.4	4	4	5.3	7
	Glycine	1.6	1.5	1.1	1.1	1.1	1.7	1.6	1.6	1.8	2.6
	Isoleucine	3.9	trace	trace	trace	3.6	5.4	5.1	5.2	4.8	6.2
	Leucine	6.4	5.5	4.9	5.2	4.4	5.4	5.1	5	7.6	14.4
	Methionine	2.2	trace	trace	trace	1.3	1.7	1.6	1.6	2.6	4.1
	proline	1.9	1.8	1.7	1.9	1	1.5	1.3	1.3	2.4	3.2
	valine	3.6	3.8	3.6	3.6	2.7	4.2	3.9	3.9	4.5	5.7
Polar	Serine	1.7	1.3	1.1	1.1	0.9	1.4	1.4	1.3	2	3.6
	Threonine	2.4	1.9	1.8	1.8	1.6	2.1	2	1.9	3	4.3
	Cystein	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace
Basic	Lysine	3.5	trace	trace	trace	trace	trace	2.1	3.2	4.8	4.1
	arginine	trace	3.5	3.5	3.2	3.5	3.1	3.3	3.1	trace	trace
	histidine	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace
Acid	aspartic acid	3.3	3.9	3.8	3.7	4.3	6.3	5.9	6	3.8	3.2
	glutamic acid	1.1	1.2	0.5	0.5	0.9	1.5	1.3	1.3	1.4	2
Aromatic	phenylalanine	5.3	3.9	3.6	3.8	3.3	3.7	3.4	3.4	7.6	13.9
	Tyrosine	4.6	3.7	3.4	3.6	2.9	3.4	3.3	3.3	4.6	8.6
Total amino acid contents (mg/g)		45.4	32	32	32.6	30.7	42.7	39.9	39.8	56.2	92.9

② 염미기능 평가 : *in vivo* 관능검사

㉔ 생산된 SAP의 염미성 기능평가

- 생산된 SAP의 염미성 기능 평가를 확인하기 위해 1%의 식염용액(한주소금)에 식물성 펩타이드 가수분해물을 농도별 첨가하여 관능평가를 수행하였음. 실험 구간은 표 9와 같음

표 9. 식물성 펩타이드 가수분해물의 처리농도 구간

실험구간	식물성 펩타이드 가수분해물 첨가량 (%)
(A)	0.00
(B)	0.002
(C)	0.004
(D)	0.006
(E)	0.008
(F)	0.010

- 표 9의 실험구간에 따른 관능평가 결과는 표 10과 같으며, 0.006%에서 염미성 증진에 효과가 있음을 확인하였음. 농도에 따라 염미 증진 정도가 비례하지만, 0.006% 이상 첨가구에서는 큰 차이가 없다고 판단됨.

표 10. 식물성 펩타이드 가수분해물의 처리농도 구간에 따른 관능평가

Sample	Salty taste intensity	Body intensity	Umami taste intensity
(A)	0.5±0.02	0.5±0.02	0.5±0.55
(B)	1.9±0.25	1.8±0.04	1.3±0.25
(C)	2.2±0.58	2.2±0.21	2.0±0.41
(D)	3.3±0.04	2.7±0.24	2.8±0.54
(E)	3.4±0.10	3.2±0.42	2.8±0.56
(F)	3.5±0.28	3.5±0.25	2.9±0.25

¹⁾Values are mean ± S.D. (n=7)

- 표 9의 실험구간에 따라 염도를 측정된 결과는 표 11과 같음. 식물성 펩타이드 가수분해물 함량이 0.01%까지는 염도에서는 큰 차이가 없음을 확인하였음. 염도는 상승하지 않으면서 염미, 지미, 무게, 기호도가 상승하는 효과가 있음.

표 11. 식물성 펩타이드 가수분해물의 처리농도에 따른 1% 소금용액의 염도

실험구간	염도 (%)
(A)	1.10
(B)	1.10
(C)	1.10
(D)	1.10
(E)	1.10
(F)	1.10

- SAP 및 시판 조미료와의 관능평가 비교 실험결과는 그림 2에 나타내었으며, SAP의 염미강도가 5.0으로 가장 높았고, MSG에서 4.89로 두 번째로 높게 나타났음. 무게감 및 지미강도 역시 SAP 및 MSG에서 가장 높게 나타났음. 지미의 경우는 MSG에서 가장 높게 나타났음. 이 결과는 SAP가 MSG를 충분히 대체 할 수 있는 ‘염미 맞춤형 소재’라는 것을 확인할 수 있는 결과임. 이 관능평가는 계명대학교 식품가공학과 학생 20명을 대상으로 블라인드 테스트를 한 것이며, 7점 척도평가로 진행되었음.

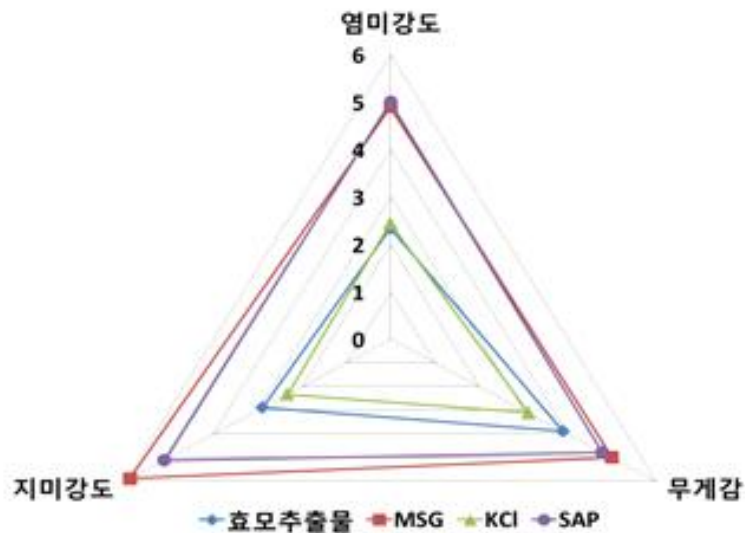


그림 2. SAP와 MSG의 관능특성 비교

- 전문적인 관능평가 결과를 얻기 위하여, 국내 최대 간장회사 S식품에 SAP에 대한 검증을 의뢰하였으며 그 검증 조사결과는 그림 3에 나타내었음. SAP를 간장에 희석하여 관능평가 하였으며, 동일한 염농도를 가진 간장에 SAP 첨가결과 짠맛을 유의적으로 상승하지는 않았으나, 감칠맛, 신맛, 쓴맛 등이 강하여 전반적인 맛의 강도가 높게 느껴진다

는 평가가 있었음. 이 평가의 경우 고도로 훈련된 패널의 관능평가로 다른 맛과의 연관성을 일절 배제하여 짠맛에 대하여서만 객관적으로 평가한 결과지만, 일반 소비자의 경우 전체적인 맛의 상승으로 인하여 맛이 증진되었다거나 짠맛이 더 강하다고 인지할 것으로 판단됨.

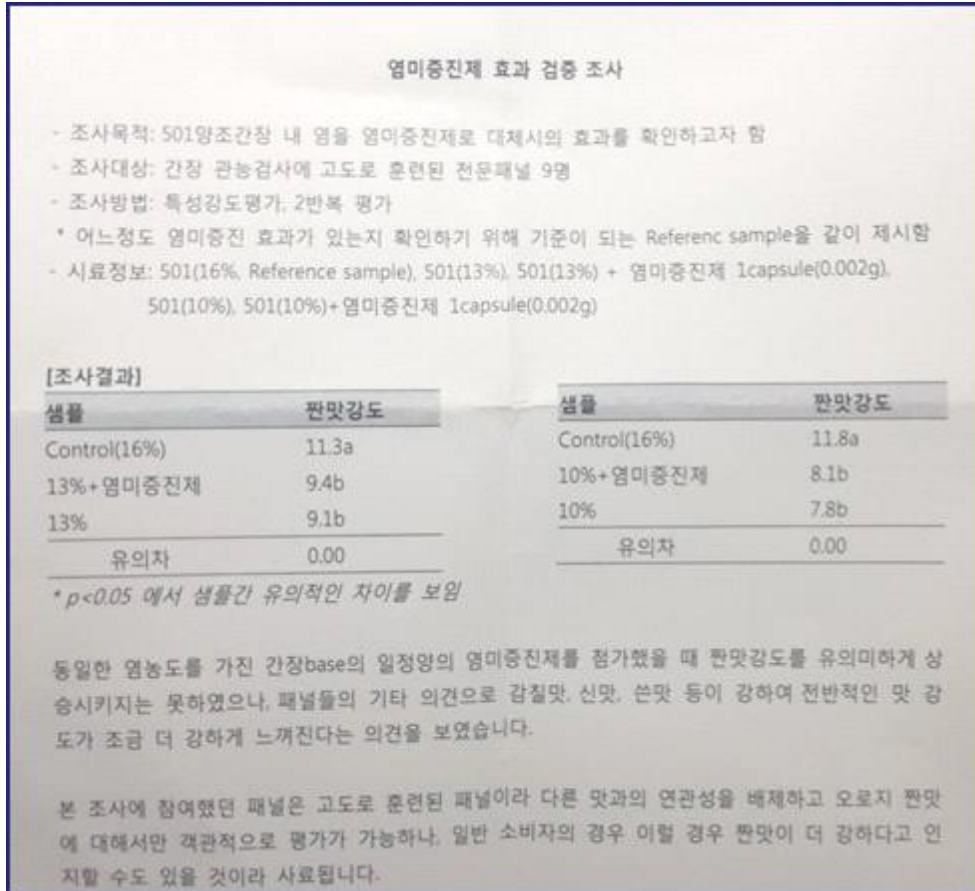


그림 3. 간장제조 S사의 SAP의 검증 조사 결과

- 라면스프 등의 적용 가능성에 대하여 평가하기 위하여 라면제조사인 N사에 의뢰하여 사용가능성을 평가받았으며, 조미소재 전문 연구원 10에 의하여 관능평가 되었음. 그 결과는 그림 4에 나타내었으며, control은 sap가 첨가되지 않은 염도 16% 간장을 10배 희석한 용액이며, 0.004%, 0.008%는 각각 16%의 간장 10배 희석액에 포함된 SAP의 함유량을 의미함. 그림 4와 같이 control의 염미강도가 5.00일 때, SAP 0.004% 첨가군이 5.40, 0.008% 첨가군 5.31로 무첨가에 비해 높은 점수를 나타냈음. 패널들의 의견을 종합한 결과 SAP 첨가군에서 신맛, 감칠맛 등의 맛이 더욱 강하게 느껴서 전반적인 맛이 상승되는 효과를 보이는 것으로 평가됨.

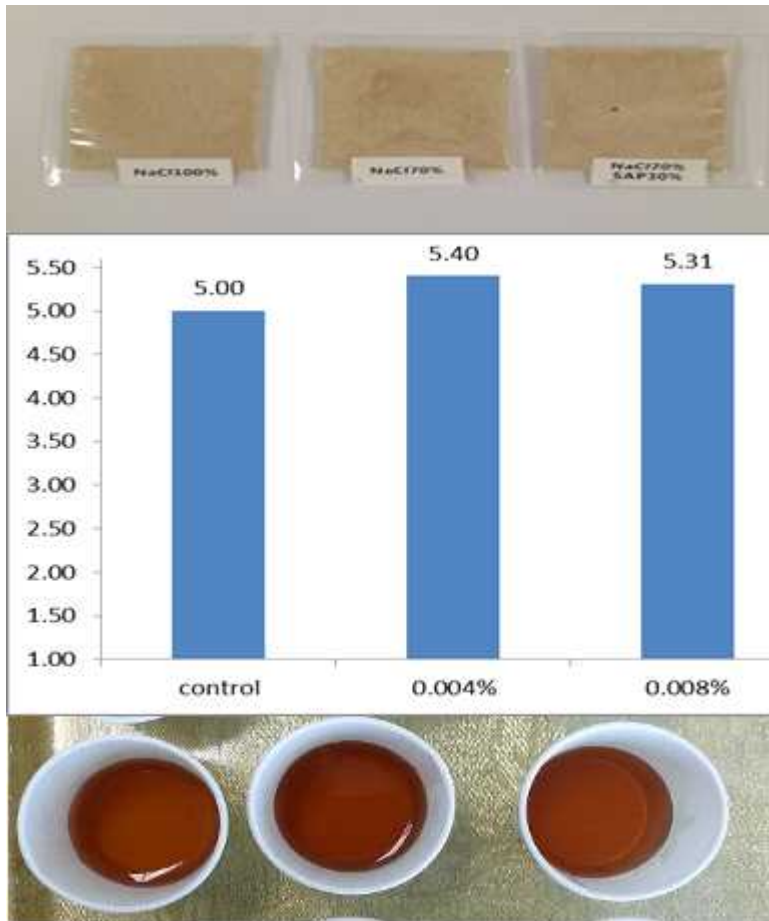


그림 4. 라면제조 N사의 SAP 관능평가

나. 최적 조성물의 안전성 평가

(1) 설치류 대상 1회 단일 투여 허용치 LD50 값 평가로 조성물의 독성 평가(GLP기관)

- 국내 GLP기관인 (주)바이오독스텍에 Salt alternative product (SAP)의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험 평가를 의뢰함.
- 본 시험은 시험물질인 Salt alternative product (SAP)를 Sprague-Dawley 계 암수 6주령 랫드에 단회 경구투여 시 나타나는 독성을 평가하고, 개략의 치사량을 구하기 위하여 실시하였다. 군 구성은 시험물질 5,000 mg/kg 의 용량 및 대조군 (주사용수)의 2군으로 하고, 암수 각각 5 마리씩 단회 경구투여 함.

표 12. 설치류 군 구성

군	투여용량 (mg/kg)	투여액량 (mL/kg)	동물수 (개체번호)	
			수컷	암컷
G1 대조군	0	10	5 (1101 ~ 1105)	5 (2101 ~ 2105)
G2 시험물질 투여군	5,000	10	5 (1201 ~ 1205)	5 (2201 ~ 2205)

- 투여 후 14 일 동안, 일반증상의 관찰 및 체중측정을 실시하였고, 관찰기간 종료 시에 안락사시켜 부검하였다. 암수 5,000 mg/kg 투여군에서 사망례는 관찰되지 않았다. 또한, 일반증상, 체중 및 부검에서 시험물질 투여에 의한 영향은 인정되지 않음.
- 본 시험의 조건 하에서 Salt alternative product (SAP)를 랫드에 단회 경구투여한 결과, 대략의 치사량은 암수 모두 5,000 mg/kg 을 상회하는 것으로 판단됨.

다. 염미 증강 펩타이드 활용 제품개발

(1) 염미 증강 펩타이드 함유 조성물 제품 사업화

(가) SAP혼합 염미성 펩타이드 조성물 함유 제품개발

① 저염소금 개발

- 25% 저나트륨의 소비자용 소금, 기업체용 소금을 각각 구분하여 개발함.
- 염화칼륨 소재의 쓴맛을 마스킹한 것이 특징임.
- 일반 소금과 동량 사용하면 25% 나트륨이 저감화됨.

표 13. SAP함유 저염소금 3종

제품명	사진	제품소개
짬트		천일염에 염화칼륨 25%을 첨가하여 염화나트륨의 함량을 내리고, 염화칼륨의 금속성 맛을 줄이기 위하여 염미성 펩타이드 조성물, 발효식초를 첨가하여, 감칠맛과 염미를 부스팅 시킨 소비자형 25% 나트륨 저감화 소금
짬트75		천일염에 염화칼륨 25%을 첨가하여 염화나트륨의 함량을 내리고, 염화칼륨의 금속성 맛을 줄이기 위하여 염미성 펩타이드 조성물, 발효식초를 첨가하여, 감칠맛과 염미를 부스팅 시킨 B to B용 25% 나트륨 저감화 소금

짤트 75P



정제염에 염화칼륨 25%을 첨가하여 염화나트륨의 함량을 내리고, 염화칼륨의 금속성 맛을 줄이기 위하여 염미성 펩타이드 조성물, 발효식초를 첨가하여, 감칠맛과 염미를 부스팅 시킨 B to B용 25% 나트륨 저감화 소금

- 개발된 저염소금인 짤트와 국내산 천일염 및 국내산 정제염의 품질을 비교하였으며, 그 결과는 표 14에 나타내었음. 짤트의 염화나트륨(NaCl)함량이 73%로 정제염 90%에 비하여 과 천일염에 비하여 19%의 염화나트륨이 저감되었으며, 정제염 99% 염화나트륨에 비하여 27%의 염화나트륨이 저감되었음.

표 14. 저염소금 짤트와 천일염 정제염과의 품질특성 비교

	천일염	정제염	짤트
염화나트륨(%)	90	99	73
총염소(%)	54	60	56
수분(%)	4.40	0.04	0.50
불용분(%)	0.02	0.00	0.00
황산이온(%)	2.60	0.04	0.60
사분(%)	0.10	0.00	0.00

- 짤트의 시험검사 성적서를 그림 5에 첨부하였으며, 가공소금의 검사항목인 염화나트륨, 총 염소, 수분, 황산이온, 비소, 카드뮴, 수은, 페로시아나화이온에 대하여 모두 적합판정을 받았음.



시험 · 검사성적서

발행번호	R20160422-0044	접수번호	160100586001	
검사일	2016-04-22	접수연월일	2016-04-12	
제품명	팥(280)			
(품목)제조번호				
유형 · 재질 · 품목명	가공소곡			
제조(수입)일	2016-04-07	유통(품질유지)기한	2019-04-06	
성명	정용진	임재명	(주)케이엠에프	
의뢰자	(41065)대구광역시 동구 돌암로 12 (물암동)			
소재지	전화번호: 053-592-1282	팩스번호: 053-584-6524	전자우편: fuhny2p@naver.com	
입재일		제조국		
제조원				
소재지				
시험 · 검사목적	식품 1 자가품질위탁검사			
시험 · 검사 항목 및 결과				
시험 · 검사 항목	시험 · 검사 기준	시험 · 검사 결과	판정	비고
염화나트륨(%)	35.00이상	80.2	적합	
출 염소(%)	20.00이상	69.1	적합	
수분(%)	5.5이하	0.2	적합	
황산이온(%)	5.0이하	0.1	적합	
비소(mg/kg)	0.5이하	0.0	적합	
카드뮴(mg/kg)	0.5이하	0.0	적합	
수은(mg/kg)	0.1이하	불검출	적합	
페르시아안화이온(mg/kg)	0.010이하	불검출	적합	

COPY

본 문 증명서는 공인정보를 담고있으며, 무단복제를 통해 위변조 여부를 확인할 수 있습니다. 또한, 문서당근과 배너 등으로 권리확인(스캐너를 문서확인프로그램)할 수 있습니다. Page 1 of 2

그림 5. 팥트 시험 검사 성적서

② SAP를 함유한 염미성 콩발효물

- 저염된장의 개발을 위하여 된장과 혼합할 수 있는 SAP 함유 염미성 콩발효물
 - 나트륨 섭취의 주된 급원으로 꼽힌 된장의 나트륨 함량을 감소시키기 위하여 저염 된장에 염도 감소시 발생하는 저장성 문제와 관능저하의 문제를 해결하기 위하여 염미성 펩타이드를 첨가하여 만든 염미성 콩발효물 개발함

표 15. SAP 함유 염미성 콩발효물

제품명	사진	제품소개
염미성 콩발효물		된장의 저염화를 위하여 SAP첨가하여 만든 염미성콩발효물

(2) 저염 장류 제품 개발

(가) 저염 소재 첨가 및 소금 함량에 따른 원료 배합비 설계

① 25% 저염소금을 이용한 저염 된장의 개발

○ 저염 된장을 담그기 위한 담금비율은 표 16에 나타내었음. 알알이 메주를 이용한 개량식 된장 담그는 법에 대한 배합이며, 25%의 나트륨이 저감된 '짬트 75P'을 이용하여 저염 된장을 담그고자 하였으며, 정제수 10 L, 메주 3 kg, 소금 3.5 kg이며 담금의 초기 염수 농도를 19%로 설정하였음. 표 16의 배합비로 경북에 있는 본 과제의 참여기업인 '알알이'에서 된장을 담금 하였음.

표 16. 개량식 된장의 담금 비율

원료	배합량
정제수	10 L
메주	3 kg
짬트 75P (25% 저염소금)	3.5 kg
염도	19 %

○ 기존의 방법대로 담근 된장과, 저염소금을 활용한 저염된장의 관능평가 설문조사를 위하여 두 방법으로 모두 된장을 담그었으며, 숙성 후 두 된장의 품질을 비교 분석하였음.

② SAP함유 염미성 콩발효물을 활용한 저염 된장 개발

○ 염미성 콩발효물 블렌딩을 통한 저염 된장을 담그기 위한 담금비율은 표 17에 나타내었음. 본사에서 개발한 염미성 콩발효물을 이용하여 저염된장을 담그고자 하였으며, 시중에 판매되는 일반된장을 사용하였음. 일반 된장 90%와 염미성 콩발효물 10 %이 사용되었음. 혼합 저염 된장은 KMF에서 제조하였음.

표 17. 블렌딩 저염 된장의 담금 비율

원 료	배합량
시판된장	450.00 Kg
염미성 콩발효물(SAP함유)	50.00 Kg
합계	500.00 Kg

○ 표 18와 같이 염미성 콩발효물을 블랜딩 하여 저염된장을 제조하였음

표 18. 염미성 콩발효물 블랜딩 저염된장 제품의 제조공정

연번	공정명	작업내용 및 방법
1	입고 및 보관	원부재료가 기준 규격에 적합한지 검토하고 이상 없을 시 입고
2	부재료 혼합	염미성 콩발효물 투입한 후 잘 혼합
3	주재료 혼합	된장 혼합
4	한식된장 혼합	생수+천일염을 녹여 불순물 제거.
5	부재료 첨가	된장 위에 초지를 덮고 가스흡수제 넣음
6	숙성	일정 기간 숙성한 후 출하

○ 기존의 방법대로 담근 된장과, 염미성 콩발효물을 활용한 저염된장의 숙성 후 두 된장의 품질을 비교 분석 하였음.

표 19. SAP함유 염미성 콩발효물 블랜딩 저염된장

제품명	사진	제품소개
식이천 된장		기존 된장의 나트륨함량을 감소시키기 위하여 기존 된장과 SAP를 첨가하여 제조한 염미성 무염콩발효물을 혼합하여 관능 및 품질적으로 저장성이 우수한 혼합된장을 개발함.
유니웰 된장차		저염 된장을 동결건조 된장의 섭취방법을 다양화한 제품

(나) 나트륨 저감 소재 적용 저염 된장의 이화학적 특징 분석

① 일반분석

○ 일반분석 결과는 표 20과 같으며 나트륨이 저감화된 된장과 일반 된장을 비교 분석하였

- 음. pH, 산도, 수분함량에서는 나트륨 저감화 된장과 일반된장의 차이가 크게 없었음
- 염도는 나트륨 저감화된장 12.4%, 일반된장 13.4%로 염도가 낮아졌음을 확인하였음. 된장의 풍미의 지표가 되는 아미노산성 질소의 경우 나트륨 저감된장이 694.4 mg%, 일반된장이 1,276.8 mg%로 나트륨 저감된장이 더 낮았으나 이는 숙성기간의 차이가 있는 것으로 보아야 함. 보통 500 mg% 이상의 된장이 풍미가 좋은 된장으로 구분함.

표 20. 나트륨저감화 된장과 일반 된장의 일반분석

구분	종 류	
	나트륨저감화된장	일반된장
pH	5.03	5.00
산도	2.245	2.245
염도	12.4	13.4
나트륨함량 (mg/100g)	4017.3	4463.7
수분 (%)	55.78	55.57
아미노산성질소 (mg%)	694.4	1276.8

② 나트륨 저감율에 따른 된장의 품질 특성

㉠ 나트륨 저감율에 따른 pH 특성변화

- pH와 산도는 장류 숙성 중에 미생물의 성장에 따라 변화되며 그 때문에 대부분의 업체가 품질 상 문제가 되는 요인으로 산패를 꼽고 있음. pH를 분석한 결과는 그림 6과 같음. 나트륨을 저감하지 않은 일반된장인 대조구가 pH 5.27, 12.5%~50.0%까지 나트륨 저감화된 된장의 경우 pH 5.07~5.54 범위에 있음.

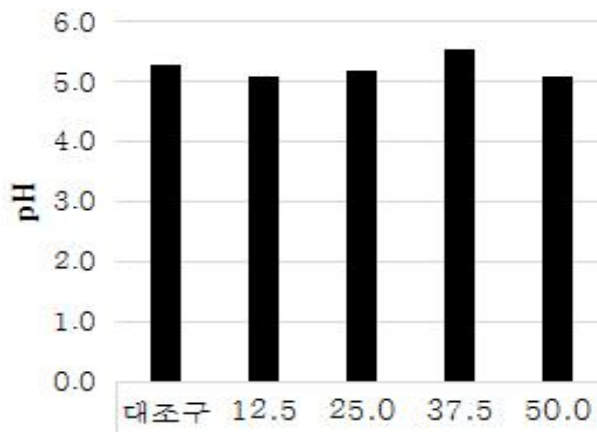


그림 6. 나트륨저감율에 따른 개량식된장과 재래식된장의 pH 변화

㉔ 나트륨 저감율에 따른 수분 및 염도 함량 변화

○ 된장의 염도는 그림 7과 그림 8에 나타내었다. 염도는 나트륨이 저감된 된장 실험구에서 그 결과 값이 2.20%~2.47%로 대조구 보다는 그 함량이 낮았으며, 수분함량은 그림 38에 나타내었으며 대조구에 비해 크게 증감이 없어 수분함량에는 나트륨의 함량이 크게 영향을 미치지 않음을 확인함.

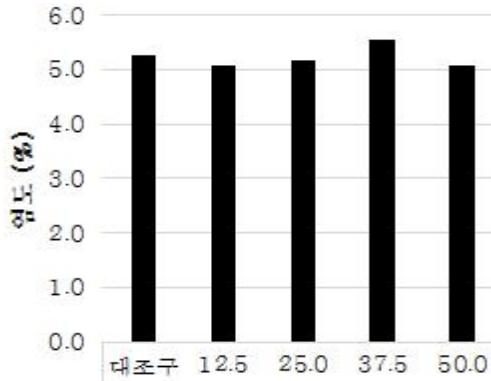


그림 7. 나트륨저감율에 따른 개량식 된장과 재래식된장의 염도 변화

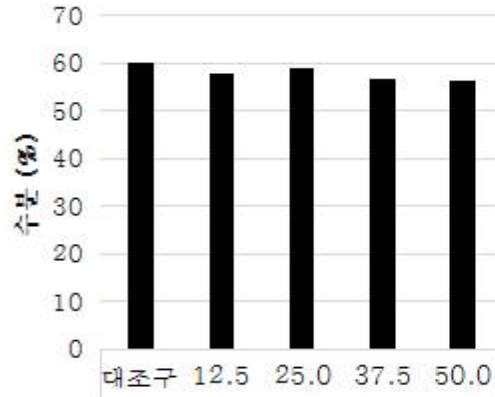


그림 8. 나트륨저감율에 따른 개량식된장과 재래식된장의 수분 변화

㉕ 나트륨 저감율에 따른 나트륨 함량 및 아미노태 질소함량

○ 나트륨 저감 정도에 따른 나트륨 함량은 그림 9에 나타내었다. NaCl에서 나트륨은 약 40%를 차지하므로, 소금 100 g에 약 40 g의 나트륨이 함유되어있다고 볼 수 있으며, 나트륨 25%의 저감시에는 소금 100 g중 30 g을 나트륨이 차지하게 됨. 된장의 경우 대조구는 7.75%의 나트륨을 함유하고, 12.5% 저감 된장에서는 6.22%의 나트륨 함량을 나타내어 대조구에 대비하여 약 19%의 나트륨이 저감되었고, 25% 나트륨저감 된장에서는 나트륨 함량이 6.20%로 약 20%의 나트륨이 줄었다는 결과를 얻었음. 37.5%가 저감된 된장에서는 4.84%로 37%의 나트륨 저감이 이루어졌고, 50%가 저감된 된장에서는 4.47%의 나트륨 함량으로 대조구 대비하여 42%의 나트륨이 줄어들었음을 확인하였음. 나트륨의 감소에도 불구하고 그림 10와 같이 아미노태 함량은 비슷하게 유지되는 것을 확인함.

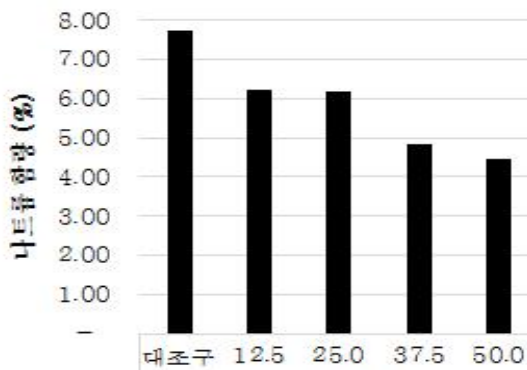


그림 9. 나트륨 저감율에 따른 나트륨 함량

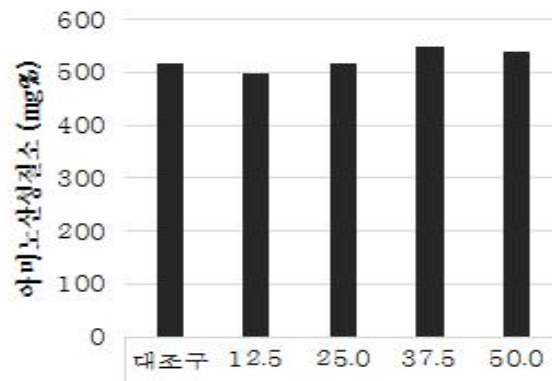


그림 10. 나트륨 저감율에 따른 아미노산성 질소 함량

㉠ 나트륨 저감율에 따른 색도

○ 색도를 나타낸 결과는 표 21과 같음. 대조구는 L값(명도)은 56.10, 나트륨 저감화 된 된장은 58.94~65.49이며, a값(적색도)은 대조구가 1.26, 실험구가 -0.23~1.42로 큰 차이를 보이지 않았으며, b값(황색도)은 대조구가 18.35, 실험구가 16.63~21.54로 나트륨 저감도에 따른 색도차이를 보이지 않았음.

저염된장은 숙성과정에서 효소 작용으로 당, 아미노산 등이 분해되는 과정에서 다양한 인자에 의하여 갈변현상을 초래 할 수 있으며, 이는 상품의 저하로 이어질 수 있는 문제로 간주 됨. 본 연구에서는 나트륨 저감화에도 큰 색차가 없음을 확인하였음.

표 21. 나트륨 저감율에 따른 색도

나트륨저감율		L	a	b	ΔE
	대조구	56.10±1.502)	1.26±0.04	18.35±0.43	47.61±1.23
	12.5	65.49±6.24	-0.01±0.31	19.70±1.33	39.88±4.87
된장	25.0	58.94±0.47	1.39±0.08	21.54±0.08	46.87±0.37
	37.5	60.41±0.31	1.42±0.12	20.36±0.11	45.50±0.23
	50.0	65.33±0.41	-0.23±0.08	16.63±0.07	38.46±0.34

1) Values are mean ±S.D. (n=3), p<0.05

㉡ 나트륨 저감율에 따른 유리아미노산

○ 유리아미노산은 된장의 발효과정 중에서 대두단백질이 펩타이드형태에서 아미노산으로 분해되면서 측정되는 값으로 된장의 발효된 정도를 알 수 있는 결과로써 표 22에 나타냄. 일반 된장의 대조구 총 아미노산 함량은 36.86 mg/g, 필수아미노산은 16.83 mg/g, 비필수아미노산은 20.03 mg/g 이었으며, 12.5%저감 된장의 총아미노산 함량은 38.72 mg/g, 25% 나트륨저감 된장은 24.42 mg/g, 37.5% 나트륨 저감된장은 36.35, 50% 나트륨 저감된장은 37.78 mg/g 이었음.

○ 대조구를 기준으로 나트륨 함량의 변화에 따른 유리아미노산의 함량 차이가 크다고 볼 수 없었으므로, 나트륨의 저감이 유리아미노산 함량에는 큰 영향을 미치지 않는다고 볼 수 있음.

표 22. 나트륨 저감율에 따른 유리아미노산 함량

유리아미노산 (mg/g)	된장의 나트륨 저감율(%)					
	대조구	12.5	25.0	37.5	50.0	
필수 아미노산	Isoleucine	2.39	2.53	0.85	3.09	2.53
	Leucine	3.81	4.06	1.39	4.79	4.10
	Lysine	2.85	3.06	3.40	3.67	3.01
	Methionine	0.80	0.83	0.66	0.82	0.85
	Threonine	1.69	1.87	0.06	0.09	1.85
	Phenylalanine	2.53	2.71	2.08	2.62	2.67
	valine	2.37	2.55	1.60	3.19	2.54
	Histidine	0.39	0.47	0.13	0.01	0.42
총 필수 아미노산	16.83	18.07	10.18	18.29	17.97	
비필수 아미노산	Alanine	2.63	2.63	2.77	6.79	3.44
	Arginine	0.60	0.65	trace	trace	0.45
	Aspartic acid	2.92	3.25	2.19	0.47	2.38
	Cysteine	0.21	0.21	0.17	0.27	0.24
	Glutamic acid	6.11	6.25	5.98	6.03	6.75
	Glycine	1.18	1.20	1.68	1.88	1.31
	Proline	1.47	1.56	0.72	1.24	1.53
	Serin	2.25	2.38	0.03	0.02	2.42
Tyrosine	2.68	2.52	0.71	1.38	1.29	
총 비필수 아미노산	20.03	20.65	14.25	18.06	19.81	
총 아미노산	36.86	38.72	24.42	36.35	37.78	

㉞ 나트륨 저감율에 따른 구성아미노산

- 구성아미노산 분석결과 총 17종이 검출되었으며, 각 함량은 표 23에 나타냄. 일반된장의 대조구의 총 구성아미노산 함량은 52.72 mg/g이며, 대조구에 대비하여 개량식된장의 나트륨이 저감된 실험구에서는 38.71 mg/g~51.35 mg/g 수준이었음.

표 23. 나트륨 저감율에 따른 구성아미노산 함량

구성아미노산 (mg/g)	된장의 나트륨 저감율(%)					
	대조구	12.5	25.0	37.5	50.0	
필수 아미노산	Isoleucine	3.94	4.69	2.49	4.55	3.77
	Leucine	5.57	6.63	3.73	6.76	5.22
	Lysine	3.32	3.75	3.70	4.06	2.43
	Methionine	1.02	1.14	0.99	1.03	0.95
	Threonine	2.14	2.28	0.91	1.11	1.73
	Phenylalanine	4.21	4.65	3.62	4.06	3.78
	valine	4.18	5.01	3.43	4.98	4.06
	Histidine	1.37	1.56	1.00	1.02	1.18
	총 필수 아미노산	25.74	29.69	19.85	27.57	23.12
비필수 아미노산	Alanine	3.99	4.71	3.73	6.42	4.33
	Arginine	1.96	2.37	1.26	1.55	1.55
	Aspartic acid	4.08	3.78	2.58	2.25	2.76
	Cysteine	0.91	1.00	3.21	3.65	0.77
	Glutamic acid	4.45	3.25	2.07	2.50	2.65
	Glycine	1.61	1.74	1.71	2.23	0.84
	Proline	3.45	3.76	2.22	2.99	3.29
	Serin	1.27	1.11	0.39	0.47	0.87
	Tyrosine	5.26	2.93	1.70	1.73	4.29
총 비필수 아미노산	26.97	24.63	18.86	23.79	21.34	
총 아미노산	52.72	54.32	38.71	51.35	44.46	

③ 염미성 콩발효물 블렌딩 저염된장의 품질 특성

㉞ 일반된장과 염미성 콩발효물 혼합 저염된장의 숙성에 따른 산도, pH 특성변화

○ pH와 산도는 장류 숙성 중에 미생물의 성장에 따라 변화되며 그 때문에 대부분의 업체가 품질 상 문제가 되는 요인으로 산패를 꼽고 있음. 일반된장과 염미성 콩발효물 혼합 저염된장의 pH를 분석한 결과는 그림 11과 같음. 나트륨을 저감하지 않은 일반된장인 대조구가 pH 5.67 산도 2.56, 10% 나트륨 저감화된 염미성 콩발효물 혼합 저염된장의 경우 pH 6.29~6.37, 산도 1.1~1.35 범위에 있음. 일반적으로 된장의 pH가 4.5 이하일 때, 정상 된장에 비하여 신맛이 문제가 될 수 있을 것으로 판단하는 것으로 미뤄 보아 염미성 콩발효물 혼합으로 나트륨이 저감된 된장은 오히려 pH를 올려 주고 산도를 낮추어 주어 신맛 감소 효과를 미치는 것을 확인함. 염도가 낮을수록 pH가 낮아진다는 보고가 있으나, 본 연구에서 설정한 숙성 구간에서는 pH의 변화 및 차이는 크지 않음.

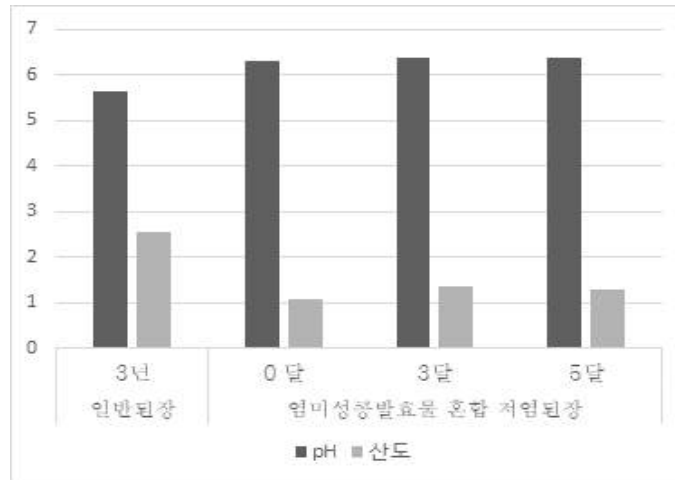


그림 11. 숙성기간에 따른 염미성 콩발효물 혼합 저염된장의 pH, 산도 변화

- ㉞ 염미성 콩발효물 블렌딩 저염된장의 숙성에 따른 수분 및 염도, 나트륨 함량 변화
 - 일반된장과 염미성 콩발효물 블렌딩 저염된장의 염도와 나트륨 함량은 표 24에 나타내었다. 염도는 염미성 콩발효물 블렌딩 저염된장 실험구에서 그 결과 값이 12.9%~13.1%로 대조구보다는 그 함량이 유사했으며, 나트륨 함량은 염미성 콩발효물을 혼합한 비율만큼 감소됨을 확인함. 수분함량은 표 24에 나타내었으며 염미성 콩발효물 혼합 저염된장의 경우 혼합 직후에는 대조구에 비해 수분함량이 낮았지만 숙성이 진행됨에 따라 대조구와 유사한 수분함량으로 복원을 확인함. 일반적으로 수분함량은 장류의 제품화와 사용 시 편의성과, 관능적 품질에 영향을 주고, 숙성 과정에서 미생물의 성장조건에 영향을 미치는 중요 요인으로 평가되며 55% 수준에서 유지되는 것이 보편적임. 하지만 본 실험에 사용된 모든 실험구의 된장은 55.83% 범위로 일반적인 된장의 평균 수분함량과 비슷한 수치를 보임.

표 24. 숙성기간에 따른 염미성 콩발효물 블렌딩 저염된장의 염도, 나트륨함량, 수분 변화

항목	일반된장	염미성 콩발효물 블렌딩 저염된장		
		0 달	3달	5달
숙성기간	3년	0 달	3달	5달
염도(%)	12.98	12.9	13.1	13.1
나트륨함량 (mg/100g)	4246.7	3653.9	3266	3355
수분 (%)	54.7	51.2	53.4	55.8

- ㉞ 숙성에 따른 아미노산성 질소함량
 - 된장의 숙성 과정에서 단백질로부터 생성되는 아미노산의 함량이 된장의 맛을 좌우함. 아미노산성 질소 함량은 장류의 감칠맛을 대표 할 수 있는 지표이며, 된장 관능적 품

질을 대변할 수 있음. 이는 된장의 발효과정 중 콩 단백질이 가수분해 되는 중 구수한 맛을 내는 아미노산을 형성하기 때문임. 숙성 기간에 따라 아미노산성 질소함량이 지속적으로 증가한다는 보고가 있고 한국전통식품규격에서는 아미노산성 질소함량이 300 mg% 이하의 품질이 떨어지는 된장으로 평가하고 있으며, 500 mg%이상일 때, 숙성도가 높은 된장으로 평가함.

- 염미성 콩발효물 블렌딩 저염된장의 경우는 대조구에 비하여 염미성 콩발효물 혼합비율 만큼 아미노산성 질소 함량이 감소함. 하지만 1,173 mg%~1,179 mg% 수준의 아미노산성 질소함량을 나타내었기 때문에 그림 12와 같이 대조구와 관능 비교시 큰 차이가 없는 것으로 확인함.

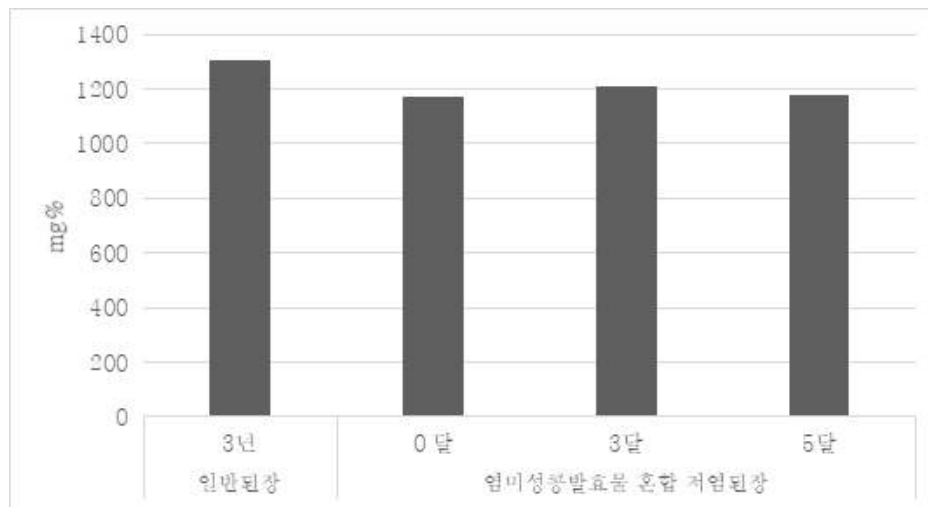


그림 12. 숙성기간에 따른 염미성 콩발효물 블렌딩 저염된장의 아미노산 질소함량 변화

(3) 소금 대체 소재 적용 저염 김치 제품 개발

(가) 저염 김치의 담금

① 저염 소재 첨가 및 소금 함량에 따른 배합비 설계

- 김치 양념의 저염화를 통해 제조한 저염김치의 관능을 평가하여 저염김치를 위한 양념배합비를 개발하는 것을 목적으로 하였음. 양념 배합 후 하루 숙성 후 절임 배추와 혼합. 실험 구간을 총 7구간으로 나누어 염도를 나타내는 젓갈류를 1.16%감소하고, 소금을 0.57% 감소시켜 염도를 25~28% 감소시킨 양념배합구간을 설정하였음. 실험구간에 대한 내용은 표 25에 자세히 나타내었으며, 실험구간에 따른 배합비는 표 26에 나타내었음.

표 25. 저염 소재 적용 김치 제조 실험구간

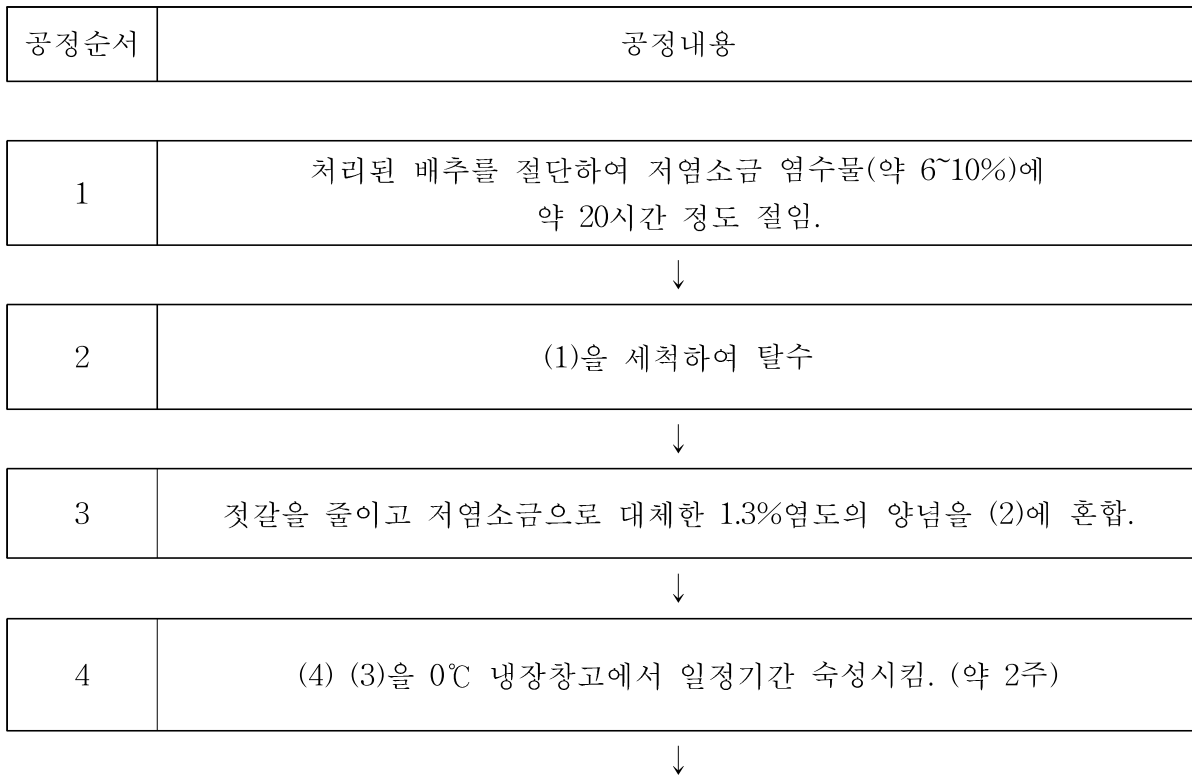
구간	실험내용	예상염도(%)	저감화율(%)
A	대조구 (기존김치)	3.56	기준
C	양념 배합비 변경	2.67	25.0
E	25% 저염소금 사용	2.53	28.6

표 26. 실험구간에 따른 배합비

실험구간	젓갈류	소금	25%저염소금	물	총합계
A 기존김치	9.24%	1.15%	-	-	9.24%
C 양념변경	8.08%	0.58%	-	1.73%	8.08%
E 저염소금	8.08%	-	0.58%	1.73%	8.08%

② 김치제조 단계별 저감화 공정 설계

○ 김치 제조에 따른 단계별 저감화 공정 설계도는 그림 13에 나타내었음.



5	제품 출고
---	-------

그림 13. 김치 제조 단계별 저감화 공정과정

③ 절임 배추의 염도 저감

○ 대량생산 절임수 제조방법은 절임세척실 현장관리자가 당일 사용할 배추의 두께 등의 상태를 확인 후 염숫물의 농도와 건염여부를 결정하는 것으로 하였으며, 저염김치에 쓰일 절임배추의 경우 당일 현장 염숫물 농도와 동일한 %로 맞추어 약 20시간 이상 절이며, 이때 건염은 치지 않음. 자세한 조건은 표 27에 나타내었음.

표 27. 절임배추 조건

	절임시간	절임수온도	세척수온도	절임수염도	배추 품온	절임배추 염도
절임배추	약 20시간	15~17℃	24.3℃	8%	14.9℃	1.45%

(나) 저염김치의 이화학적 특징 분석

① 담금 직후 김치 염도 및 당도 결과

○ 담금 직후 김치의 염도 및 당도의 결과는 표 28에 나타냄. 실험구간에서 젓갈류를 1.16%감소하고, 소금을 0.57% 감소시켜 염도를 25~28% 감소시킨 양념과 배추를 3 : 7의 비율로 혼합하여 제조한 김치의 염도는 1.55~1.75% 대로 나타났으며, 저염 율은 4.8~15.8%로 나타남.

표 28. 담금 직후 김치의 염도 및 당도

구분	기존 김치	양념 배합비 변경	25% 저염소금 사용 (짤트75P)
	A	C	E
실측염도	1.84 %	1.55 %	1.75 %
저염율	-	15.8 %	4.89 %
당도	8.0 brix	7.1 brix	7.7 brix

② 숙성 중 김치 pH 변화

○ 숙성 중인 김치의 pH는 김치의 숙성도를 대변하는 결과로 표 29에 표시하였음. 숙성 1

주차에는 대조구보다 저염구간에서 pH가 다소 높은 경향을 나타냄. 숙성 2주차에는 25%저염 소금 사용구간의 pH가 높은 편으로 숙성이 느리게 진행됨을 알 수 있었고, 숙성 3주차에는 대조구나 저염김치 pH가 동일한 경향을 나타냄.

표 29. 숙성 중의 김치 pH 변화

pH	기존의 일반김치	양념 배합비 변경	25%저염 소금 사용
	A	C	E
숙성1주차	5.24	5.29	5.22
숙성2주차	4.82	4.74	4.93
숙성3주차	3.89	3.88	3.88

③ 저염 김치의 미생물학적 특성

표 30. 저염 김치의 미생물학적 특성

시료 구분	젖산균 (단위 : log CFU/g)
일반김치	6.58±0.031
저염김치	5.50±0.05

1)All values are mean±SD.

(4) 프리미엄 저염 소금 개발

(가) 해양 심층수 함유 프리미엄 저염 소금 개발

○ SAP를 기반으로 하여 해양심층수분말을 특정비율로 섞어서 표 31와 같이 활용하였음.

표 31. 해양 심층수 함유 프리미엄 소금 제조

원료명	비율(%)
정제염	82.25
SAP	0.06
해양심층수 농축분말	17.69
합계	100.00

○ 표 31의 배합비로 제조한 해양 심층수 유래 미네랄 함유 프리미엄 소금이 맛에서 경쟁력

이 있음을 확인하기 위하여 동일한 소금용액을 대조구로 하여 프리미엄소금을 관능평가 하였음. 관능평가 실험구간은 표 32에 나타내었음. A의 경우 해양 심층수 유래 미네랄 보강 프리미엄 소금을 1% 수용액이며, 표 31의 배합비에 따라 A 1% 수용액에는 소금이 0.822%가 함유되어있음. B와 C는 0.822%의 소금물이며 신뢰도를 높이기 위하여 동일한 소금용액을 2개 배치하였음. D의 경우 1%의 소금물로 양성대조구로 이용하였음.

표 32. 관능평가 실험구간 설정

실험구간	재료	수용액 중의 함량 (%)
A	프리미엄소금	1.000
B	일반소금	0.822
C	일반소금	0.822
D	일반소금	1.000

- 표 32에 대한 관능평가 결과는 표 33에 나타내었음. 짠맛이 느껴지는 정도를 소금 1%인 D를 대조구로 0점이라 설정하였을 때, 다른 실험구간에 대하여 0점에서 3점까지 점수를 부여하도록 하였음. 소금함량이 0.822%의 프리미엄소금의 짠 강도에 대한 종합점수는 3점 만점에 2.1점이며 1%의 소금물 2.56점에 비교하였을 때 약 82%의 수준으로 크게 뒤처지지 않음을 알 수 있었음. 일반소금의 경우 0점에서 1.22점으로 하위 1,2순위를 차지하였음. 이 결과로 미뤄보아 프리미엄 소금은 동일한 소금함량을 가지는 일반소금에 비하여 높은 염미도를 가짐을 확인 할 수 있음.

표 33. 관능평가 실험구간 설정

실험구간	재료	짠 강도에 대한 점수
A	프리미엄소금	2.1
B	일반소금	0.00
C	일반소금	1.22
D	일반소금	2.56

(나) 환자용 기능성 저염 소금 개발

- 죽염과 SAP를 기반으로 하여 함초와 이산화규소, 구연산, 미배아대두발효추출물 분말을 특정비율로 섞어서 활용하였음. 기존 찹트와의 차별성으로 염화칼륨을 사용하지 않고, 25% 저감이 되면서, 감칠맛을 올릴수 있도록, 함초와 yeast extract를 첨가함. 신장병 관련 질환자 및 칼륨 섭취에 주의해야 하는 환자용 기능성 저염소금으로 개발함. sape는 SAP와 yeast extract의 합성어이며, 각각을 특정비율로 섞어서 사용하였음.

표 34. 프리미엄 소금 제조

원료명	비율(%)
죽염	82.25
SAP	
구연산	
이산화규소	17.75
미배아대두발효추출 분말	
함초	
합계	100.00

○ 표 34의 배합비로 제조한 환자용 소금이 맛에서 경쟁력이 있음을 확인하기 위하여 동일한 소금용액을 대조구로 하여 관능평가 하였음. 관능평가 실험구간은 표 35에 나타내었음. A의 경우 환자용 소금을 1% 수용액이며, 표 34의 배합비에 따라 A 1% 수용액에는 소금이 0.822%가 함유되어있음. B와 C는 0.822%의 소금물이며 신뢰도를 높이기 위하여 동일한 소금용액을 2개 배치하였음. D의 경우 1%의 소금물로 양성대조구로 이용하였음.

표 35. 관능평가 실험구간 설정

실험구간	재료	수용액 중의 함량 (%)
A	환자용 기능성 소금	1.000
B	일반소금	0.822
C	일반소금	0.822
D	일반소금	1.000

○ 표 35에 대한 관능평가 결과는 표 36에 나타내었음. 짠맛이 느껴지는 정도를 소금 1%인 D를 대조구로 0점이라 설정하였을 때, 다른 실험구간에 대하여 0점에서 3점까지 점수를 부여하도록 하였음. 소금함량이 0.822%의 프리미엄소금의 짠 강도에 대한 종합점수는 3점 만점에 2.22점이며 1%의 소금물 2.56점에 비교하였을 때 약 87%의 수준으로 크게 뒤쳐지지 않음을 알 수 있었음. 일반소금의 경우 0점에서 1.22점으로 하위 1,2순위를 차지하였음. 이 결과로 미뤄보아 프리미엄 소금은 동일한 소금함량을 가지는 일반소금에 비하여 높은 염미도를 가짐을 확인 할 수 있음.

표 36. 관능평가 결과

실험구간	재료	짠 강도에 대한 점수
A	환자용 기능성 소금	2.22
B	일반소금	0.00
C	일반소금	1.22
D	일반소금	2.56

(5) 염미소재 활용 저염 튀김 가루의 제조

○ 후라이드 치킨용 저염 튀김과우더를 개발하고자 하였으며, 핫크리스피 파우더와 우리밀 오곡파우더 두가지 종류를 개발하였음. 후라이드 파우더의 나트륨 저감화 내부 관능평가를 실시하였음. 27명의 패널에 의하여 7점 척도로 평가되었음. 완제품 사진은 그림 14와 같고, 관능평가 결과는 그림 15에 나타냄. 색상을 나타내는 외관만족도를 제외하고는 식감, 풍미, 염미의 강도, 염미 만족도, 전반적인 기호도 모두 기존의 파우더보다 저감화 시즈닝이 높은 결과를 보였음.



그림 14. 후라이드치킨용 저염 파우더

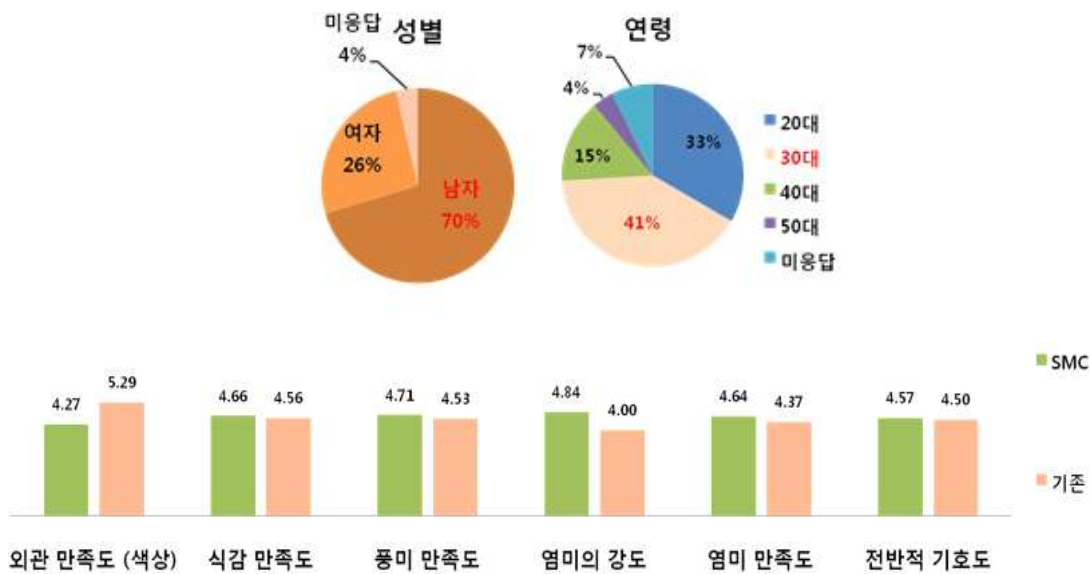


그림 15. 후라이드 치킨용 저염파우더의 관능평가 결과

라. 염미소재 활용 저염 제품에 대한 소비자 설문 조사

(1) 저염된장 설문 조사

○ 관능평가는 각각 기존 된장과 25% 나트륨 저감 된장을 비교하였음.

(가) 나트륨 저감화 된장과 일반된장의 염도에 대한 척도 평가

○ 나트륨 저감화 된장과 일반된장의 염도에 대한 척도 평가 기술통계량과 독립표본t검정 결과는 표 37에 나타내었음. 표 37에서와 같이 t-test에서 $p < 0.001$ 이므로 나트륨 저감화 된장과 일반된장의 염도는 유의적으로 차이가 있음을 알 수 있음. 표 37에 따라 평균을 비교하였을 때 나트륨 저감화 된장은 평균 3.35, 일반된장은 평균 3.98로 나트륨 저감화 된장이 염도가 ‘보통이다’에 더 가까운 수치를 보였음. 일반된장은 염도가 ‘짜다’에 더 가까운 수치를 보였음. 도식화 하여 그림 16에 나타내었음.

표 37. 나트륨 저감화 된장과 일반된장의 염도에 대한 독립표본 검정

집단	사례수	평균	표준편차	평균의 표준오차	p	t
나트륨 저감화 된장	159	3.35	0.720	0.057	0.000	-6.873*
일반된장	151	3.98	0.890	0.072		

* $p < 0.001$

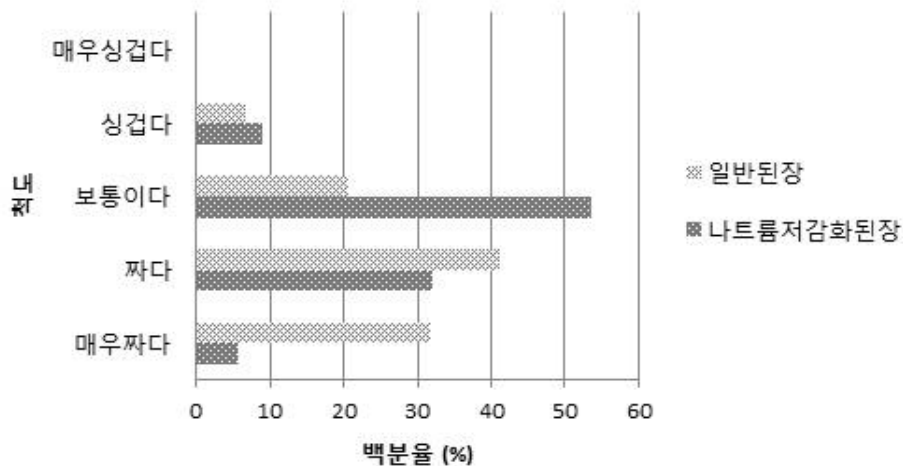


그림 16. 나트륨 저감화 된장과 일반된장의 염도에 대한 척도평가

(나) 나트륨 저감화 된장과 일반된장의 감칠맛에 대한 척도 평가

○ 나트륨 저감화 된장과 일반된장의 감칠맛에 대한 척도 평가 기술통계량 및 t-test결과는 표 38에 나타내었음. 표 38에서와 같이 t-test에서 $p > 0.001$ 이므로 나트륨 저감화 된장과 일반된장의 감칠맛은 유의적으로 차이가 없음을 알 수 있음. 표 38에서처럼 염도에 대하여서는 유의적인 차이가 있지만, 감칠맛에서는 일반된장과 저염된장의 유의적인 차이가 없으므로 나트륨 저감 된장제조에 있어서 의미있는 결과로 볼 수 있음. 표 38에 따라 평균을 비교하였을 때 나트륨 저감화 된장은 평균 3.81로 ‘감칠맛이 돈

다’에 근접하였으며, 일반된장은 평균 3.51로 ‘감칠맛이 돈다’와 ‘감칠맛이 보통이다’의 가운데 있다고 볼 수 있음. 이는 나트륨 저감화 된장이 일반된장보다 더 나은 감칠맛을 가지고 있음을 확인 할 수 있음. 이를 도식화 하여 그림 17에 나타내었음.

표 38. 나트륨 저감화 된장과 일반된장의 감칠맛에 대한 척도 평가 t-test 결과

집단	사례수	평균	표준편차	평균의 표준오차	p	t
나트륨저감화 된장	161	3.81	0.919	0.072	0.005	2.800*
일반된장	143	3.51	0.943	0.079		

*p>0.001

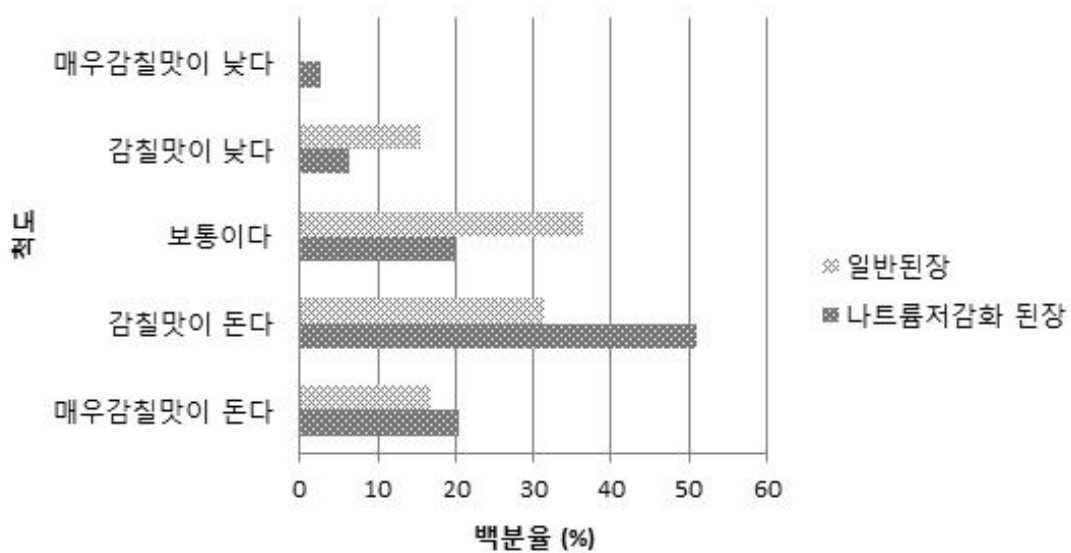


그림 17. 나트륨 저감화 된장과 일반된장의 감칠맛에 대한 척도평가

(다) 나트륨 저감화 된장과 일반된장 중 선호도

○ 나트륨 저감화 된장과 일반된장의 선호도 조사결과는 표 39에 나타냄. 나트륨 저감화 된장의 경우 77.53%의 응답자가 선호한다고 답하였으며, 22.47%가 일반된장을 더 선호한다고 하였음. 본 문항에 대한 설문조사는 일반된장과 나트륨 저감화 된장이라는 정보를 제공하지 않은 채 진행이 되었음이 의미 있음. 나트륨이 저감화된 된장이 3배 이상의 선호도를 보인 것으로 보아 적극적인 상업적 활용이 가능할 것으로 사료됨.

표 39. 나트륨 저감화 된장과 일반된장의 선호도

선호도	나트륨 저감화 된장	일반된장	합
빈도수	138	40	178
백분율 (%)	77.53	22.47	100

(라) 나트륨 저감화에 대한 정보제공을 받은 후 재구매 의향

- 나트륨 저감화 된장과 일반된장의 재구매 의향을 비교한 결과는 표 40에 나타내었음. 본 문항은 ‘나트륨 저감화 된장과 일반 된장 중 선호도’ 조사 후 설문자에게 나트륨 저감화 된장에 대한 정보를 제공한 후 진행되었음. 나트륨 저감화 된장을 재구매하겠다는 응답이 81.18%로 일반된장을 구매하겠다는 18.82%에 비하여 높은 결과를 보였음.

표 40. 나트륨 저감화 정보제공 후 재구매 의향

재구매 의향	나트륨 저감화 된장	일반된장	합
빈도수	138	32	170
백분율 (%)	81.18	18.82	100

(2) 저염김치 설문조사

(나) 관능평가 결과 (설문조사)

① 나트륨 저감화 김치와 일반김치의 염도에 대한 척도 평가

- 나트륨 저감화 김치와 일반김치의 염도에 대한 척도 평가 기술통계량과 독립 표본 t 검정결과는 표 41에 나타내었음. 표 41에서와 같이 t-test에서 $p < 0.001$ 이므로 나트륨 저감화 된장과 일반된장의 염도는 유의적으로 차이가 있다는 것을 알 수 있음. 표 41에 따라 평균을 비교하였을 때 나트륨 저감화 김치는 평균 2.44로 ‘싱겁다’에 가까운 수치를 나타냈으며, 일반김치는 평균 3.41로 염도가 ‘보통이다’에 더 가까운 수치를 보였음. 도식화 하여 그림 18에 나타내었음.

표 41. 나트륨 저감화 김치와 일반김치의 염도에 대한 독립표본t검정 결과

집단	사례수	평균	표준편차	평균의 표준오차	p	t
나트륨 저감화 김치	73	2.44	0.913	0.107	0.000	-6.412*
일반김치	97	3.41	1.028	0.104		

*p<0.001

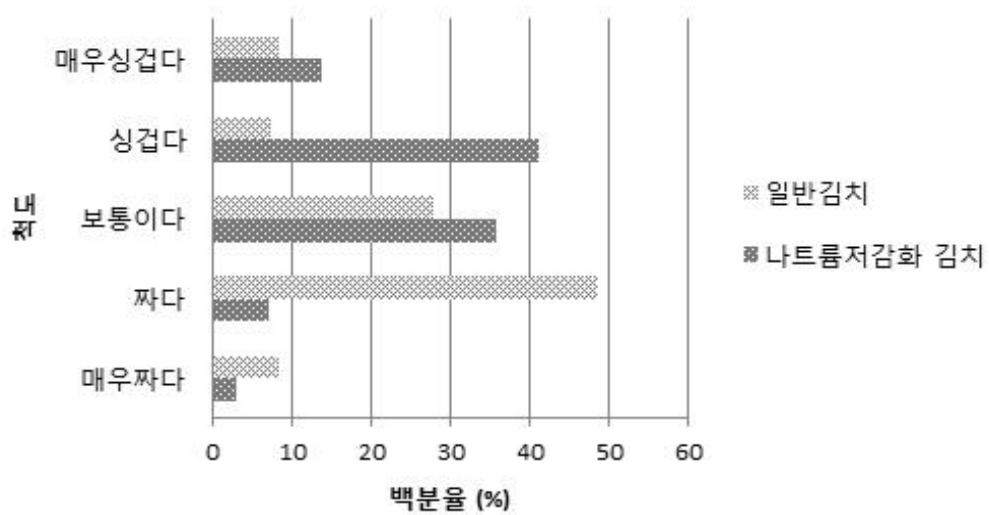


그림 18. 나트륨 저감화 김치와 일반김치의 염도 척도 평가

② 나트륨 저감화 김치와 일반김치의 선호도

○ 개량식 나트륨 저감화 김치와 일반김치의 선호도 조사결과는 표 42에 나타냄. 나트륨 저감화 김치의 경우 44%의 응답자가 선호한다고 답하였으며, 41.12%가 일반김치를 더 선호한다고 하였음. 본 문항에 대한 설문조사는 일반김치와 나트륨 저감화 김치라는 정보를 제공하지 않은 채 진행이 됨.

표 42. 나트륨 저감화 김치와 일반김치의 선호도

선호도	나트륨 저감화 김치	일반김치	합
빈도수	44	63	107
백분율 (%)	41.12	58.88	100

마. 염미성 펩타이드 함유 제품 디자인 및 홍보

(1) 라벨 디자인 및 품목제조신고

(가) SAP

- SAP만으로도 맛 증진이 가능하여, SAP를 복합조미소재로 품목제조신고 하였으며 품목 제조보고서를 그림 19에 나타내었음.

■ 식품위생법 시행규칙 [별지 제45호서식] <개정 2014.5.9>

품목제조보고사항 변경보고서


※ []에는 해당되는 곳에 √표를 합니다.

보고인	성명 정용진	생년월일
	주소	
영업소	명칭(상호) ㈜케이엠에프	
	소재지 대구광역시 동구 을암로 12 (을암동)	
영 업	영업의 종류	식품제조가공업
	고열량·저지방 식품 해당 여부	[]예 []아니오 [√]해당 없음
	영업신고 번호	제 2010-0182300 호
변경사항	변경 전	변경 후
제품명	에스에이피 (SAP)	에스에이피 (SAP)
원재료 또는 성분명 및 배합비율	분리대두단백(식용대두박 100%) 22.2%, 활성글루텐(소맥분 100%) 11.1%, 징제소금 66.7%	비밀처리천미생식초(비밀처리천미생초 95%, 천미담화액5%) 20.8%, 분리대두단백(식용 대두박 100%) 17.6%, 활성글루텐(소맥분 100%) 8.8%, 징제소금 52.8%
유통기한	제조일로부터 3년	제조일로부터 3년
변경사유	원재료 및 배합비율 변경	

「식품위생법」 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제46조제1항에 따라 식품(식품첨가물)품목제조 보고사항을 변경하기 위하여 보고합니다.

2015 년 06 월 3 일

보고인 김 용 진

동구청장 귀하 

위 사본을 확인함
지방보건주소 이 상 기

첨부서류	1. 품목제조보고서 사본 2. 유통기한 연장사유서(유통기한을 변경하려는 경우에만 제출합니다)
------	--

그림 19. SAP의 품목제조보고사항

(나) 짬트

- 나트륨이 25% 저감 되었음을 강조하는 저염소금. 그림 20와 같이 제품의 로고를 디자인하여 적용하였음



그림 20. 나트륨 저감 로고

- ‘소금대신 짬트하자’ 컨셉의 저염소금을 개발하였음. 슬로건은 ‘나트륨은 줄이고, 짬맛은 그대로!’로 설정하여 그림 21, 22와 같이 적용하였음.

소금대신 짬트하자!

*
Zait

건강발효소금 짬트

나트륨은 줄이고,
짬맛은 그대로!

그림 21. 짬트 슬로건



그림 22. 짤트 제품

○ 짤트(ZALT) 상품명은 ‘Zero’와 ‘Salt’의 합성어로서, 소금의 나트륨함량을 최대한 낮추어 세계인의 건강한 식생활을 선도하고자 하는 의미를 담았음.

(다) 저염된장

○ 기존 된장의 나트륨함량을 감소시키기 위하여 기존 된장과 SAP를 첨가하여 제조한 염미성 콩발효물을 혼합하여 관능 및 품질적으로 저장성이 우수한 혼합된장을 그림 23와 같이 개발함



발급번호 : 12P0-0H02-0YJN-4X2K-02KM 식품(식품첨가물) 품목제조보고서	
보고인 성명(법인명) 정용진 주소 대구광역시 동구 울암로 12(울암동)	생년월일(법인번호) 1964년 03월 28일 전화번호 070 42586335 휴대전화
영업소 영칭(상호) (주)케이엠에프 소재지 대구광역시 동구 울암로 12(울암동)	영업등록번호 20100182300
제품정보 식품의 유형 혼합장 제품명 식이천 된장 유통기한 제조일로부터 12월(실온보관) 품질유지기한 원재료 또는 성분명, 배합비율 된장에 기재 용도 용법 된장에 기재 보관방법 및 포장재질 된장에 기재 포장방법 및 포장단위 방법 : 밀봉포장, 단위 : 450g 성상 고유의 색택과 향미를 가지며, 이미,이취가 없어 아 함.	요청하는 품목제조 보고번호 2010018230059 
기타 실은보관 「식품위생법」 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다. 2017년 09월 04일 대구광역시 동구청장 귀하 보고인 정용진	
품목보고번호 20100182300-59 처리부서 경제복지국 위생과 처리자성명 김기만 처리일자 2017년 09월 29일	

그림 23. 저염 된장 디자인 및 품목제조 보고서

(라) 저염 된장차

○ 저염 된장을 동결건조 된장의 섭취방법을 다양화한 제품을 그림 24와 같이 개발함.

발급번호 : 0270-9972-0 YW-0XOK-7BJZ					
식품(식품첨가물) 품목제조보고서					
신고인	성명(법인명) 종용진	생년월일(법인번호) 1964년 03월 29일			
	주소 대구광역시 동구 을인로 12(을인동)	전화번호 휴대전화	070 42586335		
영업소	영점(상호) (주)케이엠에프				
	소재지 대구광역시 동구 을인로 12(을인동)				
제품정보	식품의 유형	고탄차	영업등록번호	20100182300	
	재품명	유니웰 된장차 α			
	유통기한	제조일로부터 24개월(실온보관)			
	품질유지기한	제조일로부터 24개월(실온보관)			
	분쇄도 또는 성분명 및 배합 비율	뒷장에 기재			
	용도 용법	뒷장에 기재			
	보관방법 및 포장재질	뒷장에 기재			
	포장방법 및 포장단위	방법 : 밀봉, 단위 : 6g, 1Kg, 2Kg, 박크			
	생산	본일제품으로 고유의 색상을 가지고 이미·미취가 없어야 함.			
	고열량 저열량 식품 해당 여부	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	<input type="checkbox"/> 해당 없음	불활인중 여부	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오
기타	일부광경 위탁가공: 동결건조, ㈜대도F&D(강원도 속초시 농공단지길115) / 주문자상표부착생산 (OEM): 유니웰(주)(충북 청주시 흥덕구 부오산로74)				
「식품위생법」 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.					
2017년 11월 29일 보고인 정용진					
대구광역시 동구청장 귀하					
품목보고번호	20100182300-62				
처리부서	경제복지국 위생과	처리자성명	김기만	처리일자	2017년 11월 29일



그림 24. 저염된장차 디자인 및 품목제조 보고서

(2) 저염 펩타이드 함유 제품의 제품 홍보자료

○ 저염펩타이드를 함유한 제품을 여러 박람회에 참가하여 홍보하였으며, 2016년 8월 서울식문화전, 2016년 11월 푸드위크, 2016년 12월 월드전람, 2017년 3월 상해 FIC, 2017년 5월 서울푸드, 2017년 8월 친환경유기농무역박람회, 2017년 10월 서울푸드위크에 참가하여 홍보하였음. 국내 홍보내용은 그림 25, 26, 27과 같으며, 중국 홍보내용은 그림 28, 29와 같음.

SAP 염미 및 지미상승 식물성 발효조성물

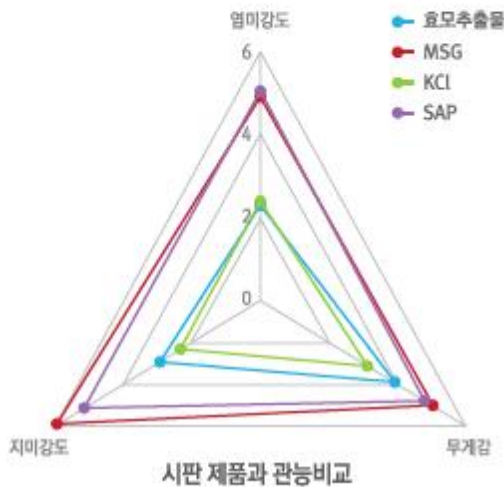
- 소금(NaCl)과 혼합사용에서 염미의 상승효과
- 식물성 원료, 100% 발효소재
- 쓴맛 없는 맛있는 저염 제품 소재
- 짠맛 이외 감칠맛(지미) boosting 효과 탁월
- 국내특허 출원 : 10-2015-0041749
- 식물성 원료를 이용한 염미성 증가 천연 조성물 및 그 제조방법
- PCT 출원 : KR2016/002930

*Profile

- 제품유형 : 복합조미식품
- 성 상 : 미황색 분말
- 주요원료 : 대두단백, 비열처리 현미생식초, 정제소금
- 포장단위 : 1kg, 10kg
- 유통기한 : 제조일로부터 36개월

Technical data

- SAP의 효과
 - 저염소재 비교시 염미강도 5.0으로 가장 높음
 - MSG와 유사한 body감 및 지미 강도



KMF염미증강기술

*염미증강 소재를 활용하여 소금함량을 감소시켜도 염미를 느끼게 하는 기술

KMF염미증강기술



식물성 발효조성물(SAP)활용 짠맛 상승 기술 공정

• S사 관능전문 패널 관능검사 결과

* 조사량 : 간장 관능 검사에 고도로 훈련된 전문 패널 9명

- 조사결과 : 501양조간장 내 염을 염미증진제로 대체 시 효과 확인
- 동일한 염농도를 가진 간장 base의 일정량의 염미증진제 첨가 시 패널들의 의견으로 감칠맛, 신맛, 쓴맛 등이 강하여 전반적인 맛 강도가 조금 더 강하게 느껴진다는 의견
- 본 조사에 참여한 패널은 고도로 훈련된 패널, 다른 맛과 연관성을 배제하고 오로지 짠맛에 대하여 객관적으로 평가 가능, 일반 소비자의 경우 짠맛이 더 강하다고 인지 할 수 있을 것 이라는 결과



KMF 본사 & 연구소 (41065) 대구광역시 용구 율령로 12
 친환경 발효생물공학 TEL +82-53-592-1282 / FAX +82-53-584-6524

그림 25. SAP의 국내 홍보용 브로슈어

염미 및 지미상승 식물성 발효 조성물 (Salt Alternative Product, SAP)

SAP 식물성 발효 조성물이란?

1. 소금(NaCl)과 혼합사용에서 염미의 상승효과
2. 식물성 원료만을 이용한 100%발효 소재
3. 쓴맛 등의 거부감이 없는 맛있는 저염제품 소재
4. 짠맛 이외 감칠맛(지미) 동시 상승으로 식감 탁월
5. 특허: 식물성 원료를 이용한 염미성 증가 천연 조성물 및 그 제조방법
(출원번호: 10-2015-0041749)
6. PCT: KR2016/002930
7. 제품: (1)SAP(B2B용), (2)SAP+KCl(B2B용), (3)Zalt(25%저염)

소금대신 찰트하져!

***Zalt**



건강발효소금 찰트
나트륨은 줄이고,
짠맛은 그대로!

식물성 발효 조성물(SAP) 활용 저나트륨 소금 함유 제품



나트륨 과다섭취의 문제점



- 혈액으로 유입
- 삼투압현상, 혈액분류증가, 혈관벽 경화
- 내피세포 직접 손상 가능
- 혈관수축, 혈액순환 부담 증가



식물성 발효 조성물(SAP)활용



그림 26. SAP의 국내 홍보용 브로슈어

ZALT 나트륨은 줄이고 짠맛은 그대로!

*짤트(Zalt)란?

Zero Salt의 합성어

소금의 함량을 최대한 낮추어 세계인의 식생활을 선도하자는 ㈜KMF의 신념을 담고 있습니다.

- 나트륨은 줄이고, 짠맛은 그대로인 건강 발효 소금
- SAP와 비열처리 현미생식초로 감칠 맛을 올린 건강 발효 소금 (※SAP란? 염미 및 지미 상승 식물성 발효 조성물)
- 저염효과 : 소금과 동량 사용시 Na 함량 25% 감소

*Profile

- 제품유형 : 가공소금
- 성 상 : 백색 분말
- 유통기한 : 제조일로부터 36개월
- 포장단위 : 150g, 500g, 1kg, 15kg
- 원재료명 : 천일염(호주산), 암화칼륨, SAP, 비열처리 현미생식초, 구연산, 아산화규소

*Technical data

- 염미강도 : Zalt 5.29, 시판 저염소금 3.71
- 무게감 및 지미 : 저염소금 대비 Zalt 약 0.86 높음

*Zalt와 국내산 천일염 및 국내산 정제염 품질 비교

	천일염	정제염	Zalt
염화나트륨(%)	90	99	73
총염소(%)	54	60	56
수분(%)	4.40	0.04	0.50
불용분(%)	0.02	0.00	0.00
황산이온(%)	2.60	0.04	0.60
사분(%)	0.10	0.00	0.00



KMF 본사 & 연구소 (41065) 대구광역시 중구 동암로 12
 정제염 전문제조기업 TEL +82-53-592-1282 / FAX +82-53-584-6524

그림 27. 짤트의 국내 홍보용 브로슈어

提升咸味和滋味的植物性发酵组合物 SAP

- 与食盐 (NaCl) 混合使用更有咸味
- 植物性原料, 100% 发酵材料
- 无苦味, 美味低盐产品材料
- 除咸味以外, 更加可口
- 韩国专利申请号: 10-2015-0041749
- 利用植物性原料增加口感天然组合物及其制作方法
- PCT 申请号: KR2016/002930

*Profile

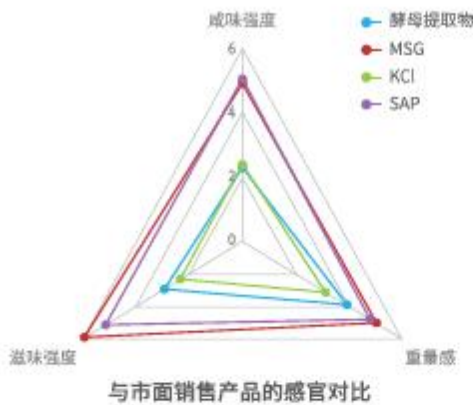
- 产品类型: 复合调味食品
- 形状: 米黄色粉末
- 主要原料: 大豆蛋白, 非热处理玄米生醋, 精盐
- 包装单位: 1kg, 10kg
- 保质期: 生产日期起 36 个月

Technical data

- **SAP 效果**
- 与低盐材料对比时咸味强度最高, 为 5.0
- 与 MSG 类似的身体感受及口感强度

KMF 口感增加技术

*利用增强咸味的材料, 在盐量减少的情况下也能品尝到有滋味的技术



KMF 咸味强化技术



认证运用植物性发酵组合物 (SAP) 提升咸味的技术

S 公司感官专业陪审进行感官测试的结果

*调查对象: 10 名对酱油感官测试接收过高度训练的专业陪审

- 调查结果: 确认 501 酿造酱油里用咸味增加剂代替食盐是有效的
- 调查中专业陪审一致认为在同一盐浓度下, 添加一定的咸味增加剂会比一般食盐在口感, 酸味, 苦味等味觉方面有更强烈的感受
- 参与本次调查的都是经过高度训练的专业陪审, 能排除与其他味道的关联性并只对咸味进行客观评价, 其结论是认为一般消费者会对咸味有更强烈的感受



KMF 环保发酵专业企业
总部&研究所 (41065) 大邱广城市东区莱物路12
TEL +82-53-592-1282 / FAX +82-53-584-6524

그림 28. SAP의 중국 홍보용 브로슈어

提高盐味及至味的, 植物性发酵组成物 (Salt Alternative Product, SAP)

SAP植物性发酵组成物是什么?

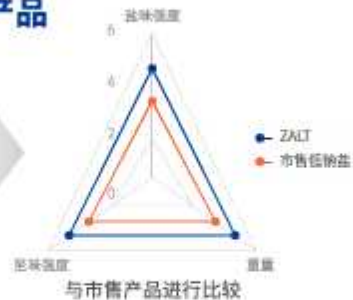
1. 与盐混合使用后, 提高盐味的功效。
2. 只使用植物性原料的100%发酵材料
3. 没有苦味等排斥感, 好吃的低盐产品材料
4. 除了咸味以外, 同时提高味道(至味)的卓越口感
5. 专利: 利用植物性原料增加盐味的天然组成物及其制作方法 (申请编号: 10-2015-0041749)
6. PCT-KR2016/002930
7. 产品: (1)SAP(B2B), (2)SAP+KCl(B2B), (3)Zalt(25%低钠盐)

用zalt代替盐

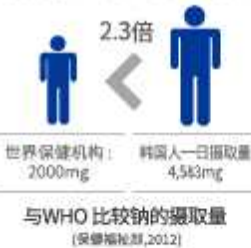
Zalt

健康发酵盐 Zalt
减少钠的含量,
咸味不变。

运用植物性发酵组成物的, 含有低钠盐的产品



摄取过多钠的问题点



- 流入血液
- 渗透压现象、血容量增加, 强化血管壁
- 可直接损伤内皮细胞
- 血管收缩、增加血液循环负担



植物性发酵组成物的活用



그림 29. SAP의 중국 홍보용 브로슈어

바. 저염화 기술을 활용한 노하우 컨설팅

(1) 저염 된장 제조법 컨설팅 실시 및 기술이전

○ 나트륨 저감화 된장의 제조방법은 크게 3가지 방안으로 컨설팅을 실시하였으며 첫번째 방안으로 현장 컨설팅을 통해 염도, 숙성, 수분관리 두 번째 방안으로 나트륨 저감화 소금인 Zalt75를 이용하여 장담금을 하는 방안, 세 번째 방안으로 기존에 생산된 된장은 염미성 무염콩발효물을 혼합하여 관능 및 품질적으로 저장성이 우수한 혼합된 장 생산할 수 있도록 하였으며, 장담금에 따라 저염소재 활용방안에 대한 기술지도 및 컨설팅을 진행하였음.

(2) 노하우 및 기술이전 실시 내용 첨가

- 그림 30. 와 같이 노하우로 자체 기술 실시함으로써 저염 된장의 출시를 하였음.
- 울진콩 6차산업클러스터사업단에 저염화 기술교육을 실시하였고, 저염 소재를 활용한 장담금 및 기존에 만들어진 된장에 염미성 무염콩발효물 혼합하여 저염화 된장 생산 노하우를 기술실시 하였음.

[별지 13의2]

기술실시보고서						
(단위 : 원)						
연구개발과제 현황	사업명	고부가가치식품기술개발사업		연구과제번호	308053-2	
	연구과제명	농축 부산물을 활용한 산업을 염미소재 개발 및 산업화				
	연구기관명	(주)케이엠에프	연구책임자	정용진	참여기업명	(주)케이엠에프
	연구협약일	2018년 07월 07일	연구기간	2018.07.07.~2017.12.31		
연구개발비	정부출연금	374,000	기업부담금		기타 ()	
			170,000		계	
					444,000	
기술실시계약 및 성과활용 현황	계약(활용)명	대우와 글루텐을 이용한 염미성 증가 천연소미료 및 그 제조				
	계약(활용)일	2017.09.27.~				
	지재권 종류	노하우	실시권 유형	직접 실시		
	· 지재권이 특허(출원/등록)인 경우	명칭	번호	일자	종소기업	
기술요산청내역	실시(활용)기관	주 소	대우시 동구 중앙로 12	대표자	정 용 진	
	사업자번호	509-81-57184	전화번호	053-584-9533		
	부세담당자	박이향	e-mail	gtrajid44naver.com		
	기술요산청내역	농림축산식품연구개발사업 운영규정 53조에 따라 연구개발주체가 중소기업에 해당되고 직접실시 하는 경우로 외에 규정에 따라 같음				
기 술 료	정액기술료	경상기술료		기타 조건		
	정수(납부)예정일	정수(납부)금액	확수기본료	정수(납부)금액		
	2017.08.09	8,838,000	정수(납부)시작일	결산일		
	계	8,838,000	정수(납부)종료일	정수율		
기타특기사항	기술료 20,000,000원 산출					
<p>국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제22조 제2항에 따라 위와 같이 기술실시계약이 체결되었음을 보고합니다.</p> <p>붙임 1. 기술실시계약서 사본 1부(타기관으로 기술이전시). 2. 지적재산권을 포함하는 기술이전인 경우 해당 증빙자료(특허 등록증, 출원증 등) 1부 (타기관으로 기술이전시). 3. 연구개발과제협약서 사본 1부(직접실시시).</p> <p style="text-align: center;">2017년 8월 10일 주관연구기관 (주)케이엠에프 의 대표 농림수산식품기술기획평가원장 귀하</p>						

그림 30. 기술실시_(주)케이엠에프

[별지 13의2]

기술실시보고서						
(단위 : 원)						
연구개발과제 현황	사업명	고부가가치식품기술개발사업		연구과제번호	306053-2	
	연구과제명	농축 부산물을 활용한 산업용 염미소재 개발 및 산업화				
	연구기관명	(주)케이엠에프	연구책임자	정용진	참여기업명	(주)케이엠에프
	연구협약일	2016년07월07일	연구기간	2016.07.07.~2017.12.31		
연구개발비	정부출연금	274,000	기업부담금		기타 ()	
			170,000		계	
					444,000	
기술실시계약 및 성과활용 현황	계약(활용)명	대우와 글루텐을 이용한 염미성 증가 천연소미료 및 그 제조				
	계약(활용)일	2017.09.27.~				
	지재권 종류	노하우	실시권 유형	양도		
	· 지재권이 특허(출원/등록)인 경우	명칭	번호	일자	종소기업	
기술요산청내역	실시(활용)기관	주 소	경북 울진군 광학면 대마로길76	대표자	김선원	
	사업자번호	407-82-69434	전화번호	054-789-5296		
	부세담당자	김선원	e-mail	uiginbean6@gmail.com		
	기술요산청내역	농림축산식품연구개발사업 운영규정 53조에 따라 연구개발주체가 중소기업에 해당되고 직접실시 하는 경우로 외에 규정에 따라 같음				
기 술 료	정액기술료	경상기술료		기타 조건		
	정수(납부)예정일	정수(납부)금액	확수기본료	정수(납부)금액		
	2017.11.25	18,000,000	정수(납부)시작일	결산일		
	계		정수(납부)종료일	정수율		
기타특기사항	기술료 20,000,000원 산출					
<p>국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제22조 제2항에 따라 위와 같이 기술실시계약이 체결되었음을 보고합니다.</p> <p>붙임 1. 기술실시계약서 사본 1부(타기관으로 기술이전시). 2. 지적재산권을 포함하는 기술이전인 경우 해당 증빙자료(특허 등록증, 출원증 등) 1부 (타기관으로 기술이전시). 3. 연구개발과제협약서 사본 1부(직접실시시).</p> <p style="text-align: center;">2017년 09월 27일 주관연구기관 (주)케이엠에프 의 대표 정 용 진 농림식품기술기획평가원장 귀하</p>						

그림 31. 기술실시_울진콩6차산업클러스터사업단

사. 특허출원

(1)특허명칭

- 대체염 및 염미성 콩 발효물을 활용한 나트륨 저감화 된장의 제조방법

(2)특허요약서 내용

- 된장으로부터의 나트륨 섭취를 줄이기 위하여 염미성 소재인 염화칼륨(KCl) 또는 염미성 콩 발효물을 이용하여 저나트륨 된장을 제조하는 방법을 제공한다.
- 즉, 종래 담금수의 소금 비율을 19%로 볼 때, 그중에서 12.5%, 25%, 32.5% 또는 45%를 염화칼륨으로 대체한 메주 담금수를 이용하여 나트륨 저감화 된장을 제조하거나 자체 개발한 염미성 콩 발효물을 이용하여 시판되어있는 된장과 브랜딩하는 경우 된장의 나트륨 함량을 낮출 수 있다는 내용의 기술을 그림 32. 와 같이 출원함.

출원번호통지서

출원일자 2017.12.20
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(1063289)
출원번호 10-2017-0176383 (접수번호 1-1-2017-1272939-16)
출원인명칭 주식회사 케이엘에프(1-2002-042415-9)
대리인성명 특허법인이플리온(9-2016-100061-5)
발명자성명 경용진 김미연 장세영 황지훈
발명의명칭 대체염 및 염미성 콩 발효물을 활용한 나트륨 저감화 된장의 제조 방법

그림 32. 특허출원증

제3절. 제 1협동 : 염미성 펩타이드 합성 및 분석 기술 개발(계명대)

1. 실험방법

가, 염미성 펩타이드 합성 전략 기술 개발

(1) 염미성 펩타이드 분석법 개발

(가) TLC, LC-MS/MS를 이용한 지표성분 분석

○ Competitive ELISA 방법으로 96 well plate에 arginine (2 mg/ml)로 coating한 후 PBS (with 0.05% Tween 20)로 세 번 씻어 말림. Arginine, arginine-glycine, arginine-serine, 혹은 염미성 펩타이드 샘플과 arginine을 잡을 수 있는 항체를 4도에서 12시간 이상 반응시킨 후 coating된 plate에 넣어 30 분간 반응시킴. PBST로 3번 씻어주고 이차항체를 90 분간 반응시킴. 불지 않은 여분의 이차항체를 PBST로 세 번 씻어주고 enzyme substrate인 O-phenylenediamine을 넣어 room temperature에서 30분간 반응시켜 490 nm에서 분석

(나) HPLC를 통한 지표성분 분석 및 벨리테이션

○ SAP 10 mg을 200 μ l acetonitrile/ H₂O (5:5,v/v)로 녹인 후, 필터를 사용하여 정제한 용액을 liquid chromatography (LC) 표준시료로 사용함. 또한, 아미노산 정량을 위해 아민(-NH₂)기를 중성 조건과 염기성 조건에서 benzyl chloride로 capping 한 시료를 함께 분석하였고, Capping된 시료는 SAP 10 mg을 200 μ l acetonitrile/ H₂O(5:5,v/v)로 녹여 benzyl bromide 10 mg을 추가하여 12시간 교반 하였고, 반응 종료 후 남은 benzyl bromide 제거를 위해 16시간 동결건조 하였음. 준비된 시료는 HPLC는 Shimadzu (Japan)사의 LC-6AD 시스템 하에서 고정상으로는 Shimadzu (Japan)사의 VP-ODS (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m)을 사용하였으며, 40 $^{\circ}$ C 오븐에서 유속은 1.0 mL/min, injection volume은 10 μ l으로 설정하였음. 이동상으로는 0.1% trifluoroacetic acid (TFA)가 포함된 H₂O(A)와 acetonitrile (B)을 사용하였으며. 최초 100% (A)로 시작하여 40분 후 100% (B)가 되도록 gradient를 준 후 10분간 유지하는 조건을 설정하여 실험을 진행하였음.

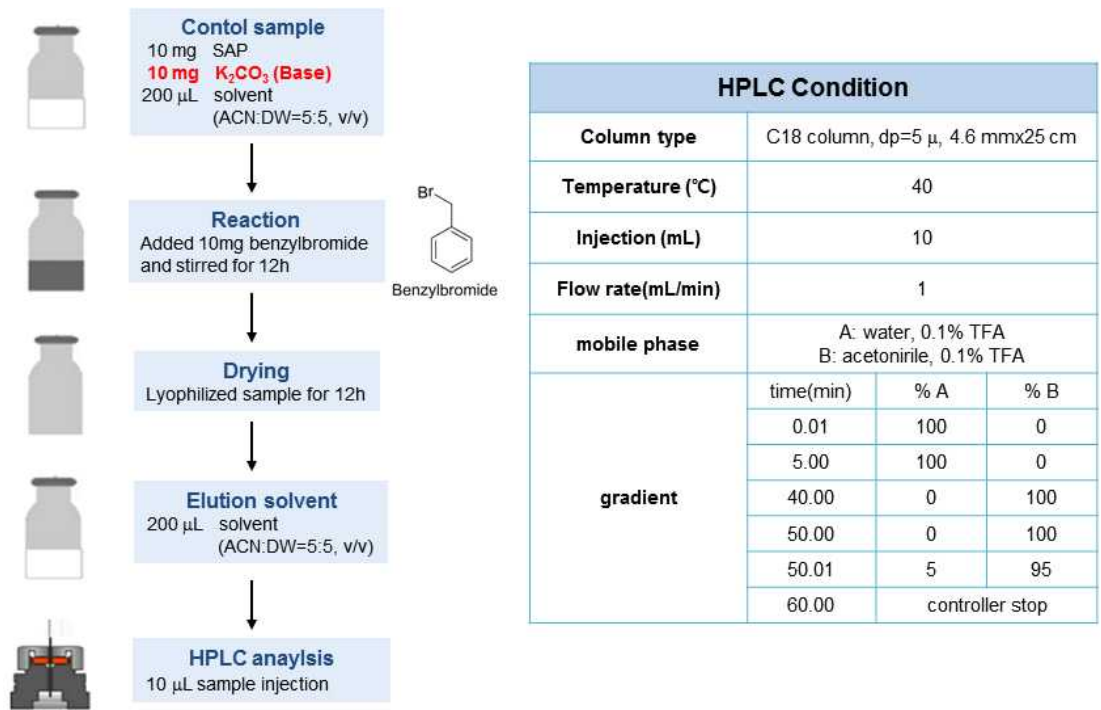


그림 1. 염미성 펩타이드의 염기성 조건에서 HPLC 분석 방법

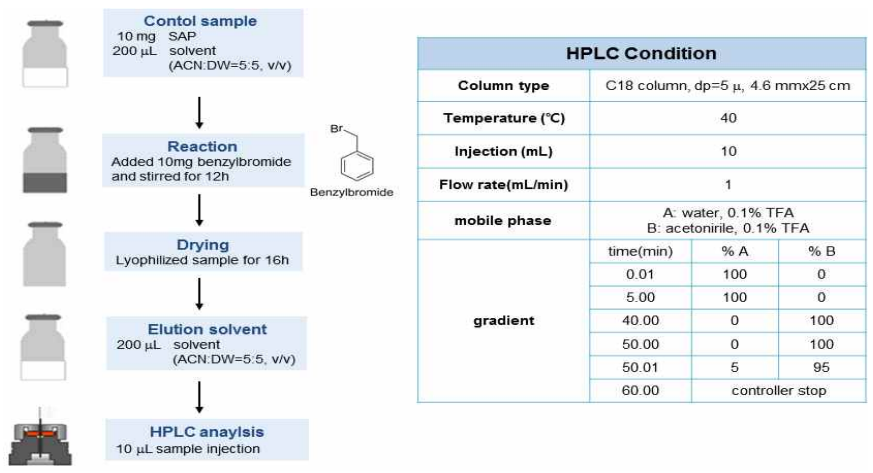


그림 2. 염미성 펩타이드의 중성 조건에서 HPLC 분석 결과

2. 연구개발 수행결과

가. 염미성 펩타이드 합성 전략 기술 개발

(1) 염미성 펩타이드 분석법 개발

(가) 염미성 펩타이드안의 Arginine, Arginine-seine, 및 Arginine-alanine의 농도를 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 를 통하여 측정

○ SAP안에 Arginine, Arginine-seine, 및 Arginine-alanine의 농도를 측정하기 위하여

Arginine antibody를 이용하여 ELISA로 확인함. Arginine에 대한 항체를 사용하였기 때문에, Arginine-serine과 arginine-Alanine이 Arginine 항체에 의해 detection 되는지를 확인함.

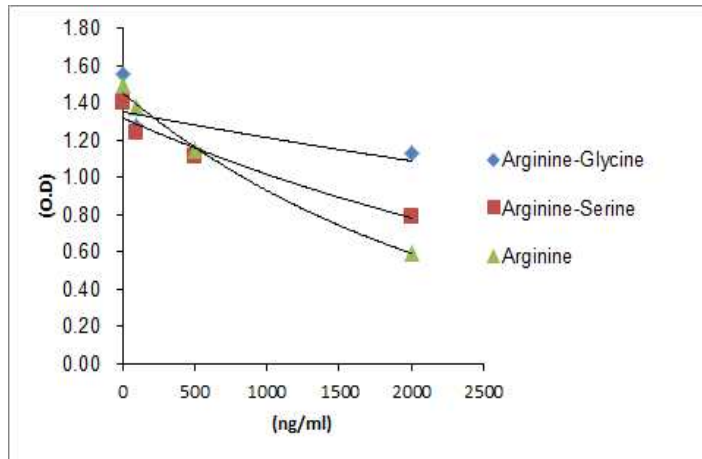
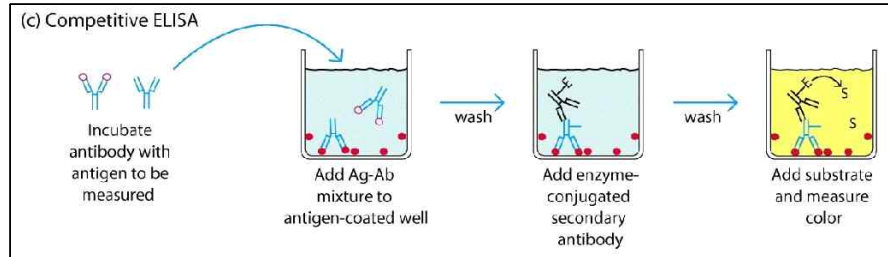


그림 3. Arginine 항체를 이용한 ELISA test

- 그 결과 Arginine 항체가 3가지 peptide를 모두 인식하여 detection 할 수 있음을 확인함. 하지만 항체에 대한 민감도는 Arginine>Arginine-Serine>Arginine-Glycine 순으로 확인되어 peptide구성에 따른 민감도 차이가 확인됨 (그림 3).
- 본 결과를 토대로 염미성 펩타이드 SAP에 존재하는 Arginine, Arginine-Serine, 그리고 Arginine-Glycine을 detection 하여 염미성 펩타이드 안의 함량을 예측해 봄 .

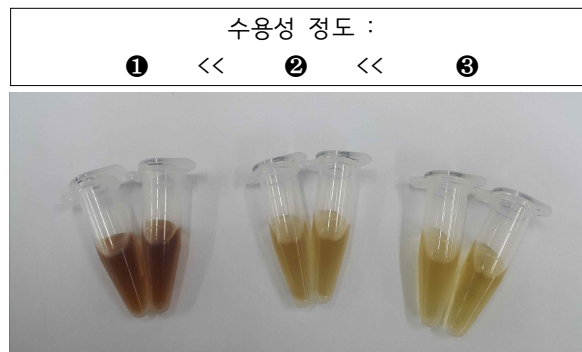


그림 4. 물에 대한 수용성이 다른 염미성 펩타이드

- ELISA 연구를 수행하기 위하여 물에 대한 수용성을 증가시켜 수용성에 대한 차이를 보이는 세 가지 염미성 펩타이드 안의 Arginine 함량을 예측하고자 ELISA를 통하여 확인함.

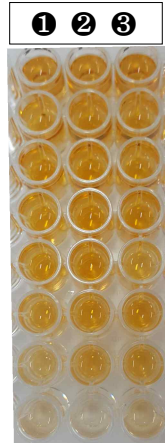


그림 5. 염미성 펩타이드의 Arginine 함량을 ELISA를 통하여 확인함

- 각각의 염미성 펩타이드 50 $\mu\text{g/ml}$ 기준으로 수용도가 다른 1, 2, 3번의 시료에서 약 1580 ng/ml, 97.68 ng/ml, 그리고 102.29 ng/ml 정도의 arginine을 함유한 것으로 결과가 나옴 (그림 5).
- 이러한 결과를 토대로 기존의 염미성 펩타이드에서 짠맛을 나타내는 중요한 성분으로 알려진 arginine-glycine을 특이적으로 검출할 수 있는 항체를 개발하여 염미성 펩타이드내에서의 함유도를 확인 할 예정이다.

(나) HPLC를 통한 지표성분 분석 및 벨리테이션

① benzyl기를 capping를 통한 분석법

- HPLC는 다양한 물질의 분석 및 정제를 위해 사용하는 분석 기기로서 식품, 제약, 화장품, 환경 등 여러 분야에서 필수적인 분석 기술로 알려져 있음. 따라서 본 실험에서는 SAP 내 펩타이드 및 아미노산 함량을 정량하기 위한 방법 중 하나로 HPLC를 이용함.
- 분석하고자 하는 아미노산은 $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$ 그룹이 포함되어 있는 친수성이 큰 물질이므로, C18-칼럼을 사용한 HPLC 분석 시 머무르는 시간이 짧아 분리 및 분석이 힘들다는 단점이 있음.
- 이러한 점을 극복하기 위해 아미노산의 $-\text{NH}_2$ 그룹을 benzyl기로 보호하여 C18-칼럼 내에 머무르는 시간을 최적화함.
- 시료 내 benzyl기를 capping하기 위하여 SAP 샘플 10 mg을 200 μl acetonitrile/ H_2O (5:5,v/v)로 녹인 후, 필터를 사용하여 정제한 용액을 LC 표준 시료로 사용하였고, 동일한 시료 10 mg을 200 μl acetonitrile/ H_2O (5:5, v/v)로 녹인 혼합물에 benzyl chloride 10 mg을 추가하여 12시간 교반함.

② 염미성 펩타이드의 중성 조건에서의 HPLC 분석

- benzyl기를 capping반응 종료 후 16시간 동결건조 하여 남은 benzyl chloride를 제거

한 후 준비된 시료의 분석을 위해 최적 HPLC 조건을 검토하였고, Shimadzu (Japan)사의 VP-ODS (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)을 고정상으로 하여 40℃ 오븐에서 유속은 1.0 ml/min으로 분석함.

- 또한 이동상으로는 0.1% TFA가 포함된 H₂O (A)와 acetonitrile (B)을 사용하였으며, 최초 100% (A)로 시작하여 40분 후 100 % (B)가 되도록 gradient를 준 후 10분간 유지하는 조건을 설정함.
- 적정 파장은 190 nm와 254 nm로 설정하였으며, 이 방법으로 SAP 시료를 분석할 경우 30분 이내에 모든 성분을 확인 할 수 있었음 (그림 1).

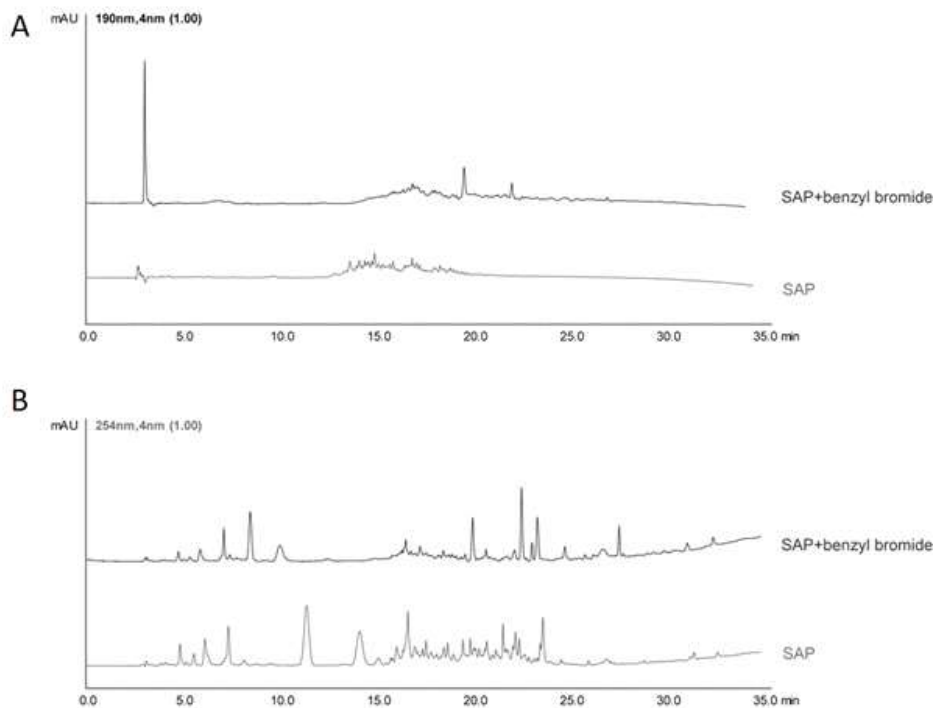


그림 6. 효미성 펩타이드의 중성 조건에서 HPLC 분석 결과.

③ 효미성 펩타이드의 염기성 조건에서의 HPLC 분석

- Benzyl기를 capping반응 종료 후 16시간 동결건조 하여 남은 benzyl chloride를 제거한 후 준비된 시료의 분석을 위해 최적 HPLC 조건을 검토하였고, Shimadzu (Japan)사의 VP-ODS (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)을 고정상으로 하여 40℃ 오븐에서 유속은 1.0 ml/min으로 분석하였음.
- 또한 이동상으로는 0.1% TFA가 포함된 H₂O (A)와 acetonitrile (B)을 사용하였으며, 최초 100% (A)로 시작하여 40분 후 100 % (B)가 되도록 gradient를 준 후 10분간 유지하는 조건을 설정함.
- 적정 파장은 190 nm와 254 nm로 설정하였으며, 이 방법으로 SAP 시료를 분석할 경우 30분 이내에 모든 성분을 확인 할 수 있었음 (그림 7).

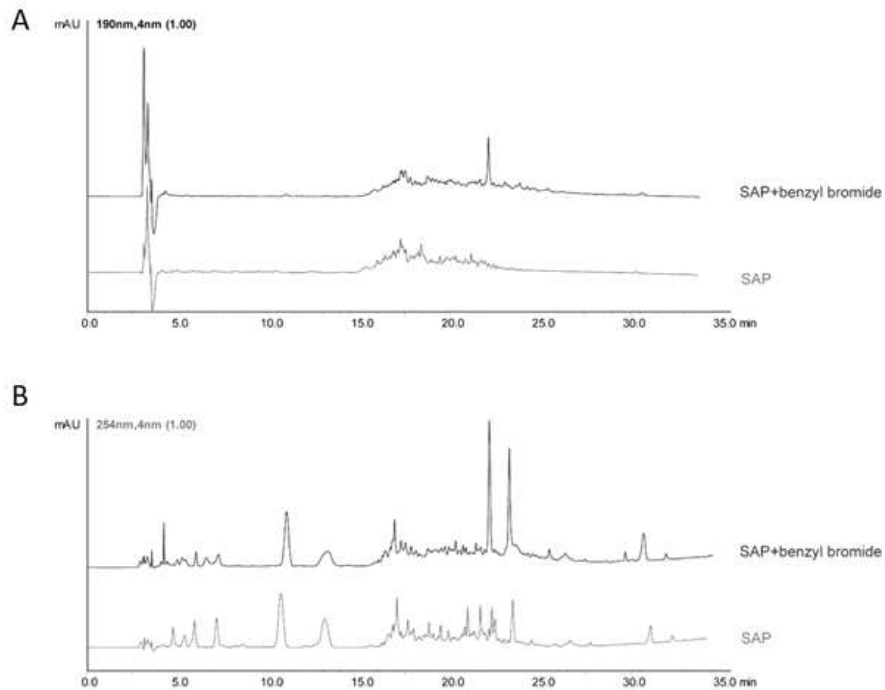


그림 7. 염미성 펩타이드의 염기성 조건에서 HPLC 분석 결과

- 하지만 위에서 얻어진 결과를 통해 표준시료와 benzyl기로 capping 된 시료 사이의 큰 변화를 관측하는데 어려움이 있었고, 이유는 중성조건에서 benzyl기 capping 반응이 제대로 이루어지지 않았기 때문이라고 예측함.
- 따라서 pH를 염기성 조건으로 조정 한 후, 시료 내 benzyl기를 capping하여 시료 20 mg을 400 μ l acetonitrile/ H₂O (5:5, v/v)로 녹인 후 절반은 표준 시료로 사용하였고, 나머지 절반은 benzyl bromide 10 mg 와 K₂CO₃ 10 mg을 추가하여 12시간 교반 함 (그림 2).
- 반응 종료 후 남은 benzyl bromide 제거를 위해 16시간 동결 건조 하였으며, 위와 동일한 방법을 통해 분석한 결과 23~25분 사이의 머무름 시간에서 유의미한 피크 변화가 일어남을 확인할 수 있었음 (그림 7).

(다) NMR 분석을 통한 염미성 peptide 분석

- NMR은 주로 단일 화합물의 구조를 분석하는 도구로 사용되지만, 점차 정량을 위한 도구로도 많이 이용되는 추세로 NMR의 시그널 적분 강도는 해당 시그널에 나타나는 핵의 수에 정 비례할 뿐만 아니라, 스펙트럼의 모든 양성자의 감도가 동일하므로 다른 분석법에서는 필수적인 검·교정이 필요 없다는 큰 장점이 있음.
- 또한 별다른 시료의 전처리가 필요하지 않아 혼합물에서 분석 물질을 분리해내거나 시료를 분해하는 등의 과정에서 발생하는 오차를 줄일 수 있는 장점을 가지고 있음.
- 따라서, 농·축부산물 유래 발효 조성물에서 L-Arg을 포함한 peptide 정량을 위한 또 다른 방법으로서 NMR 분석법을 이용하였음.

Compound		L-Arginine	Arg-Ala	Arg-Ser
Sample parameters	Molecular weight (g/mol)	89.09	245.28	261.18
	Sample weights (mg)	20.2	5.0	20.0
	Volume of solvent (ml)	0.7	0.7	0.7
	Molarity (mol/l)	0.323	0.029	0.109
	Solvent	D ₂ O	D ₂ O	D ₂ O
¹ H NMR parameters	Scans	36	36	36
	Relaxation Delay	5	5	5
	X_angle (deg)	45	45	45
	Chemical Shift (ppm)	3.17 (t)	3.18 (t)	3.18 (t)
¹³ C NMR parameters	Scans	12288.0	12288.0	12288.0
	Relaxation Delay	2	2	2
	X_angle (deg)	30	30	30
	Chemical Shift (ppm)	156.80	156.84	156.84

표 1. Arginine를 포함한 peptide의 sample, 1H-NMR and 13C-NMR parameters

- 본 실험에서는 표준물질로서 L-Arg과 arginine을 포함한 두 종의 염기성 펩타이드 (Arg-Ala, Arg-Ser)를 이용하여 NMR 분석을 수행한 결과, 총 3종의 표준물질을 일정량 (Arg: 20.2 mg, Arg-Ala: 5.0 mg, Arg-Ser: 20.0 mg) 취한 후, 0.7 ml의 D₂O에 녹여 시료를 준비하였으며 준비된 시료는 Joel resonance (Japan)사의 JNM-ECZ500R를 이용하여 측정하였음.
- 각 시료의 ¹H-NMR spectrum을 얻기 위해 500 MHz 주파수에서 relaxation time은 5초, 온도는 25°C로 설정 한 후, 32회 scan 하여 최종 결과를 얻었음.
- 또한, ¹³C-NMR spectrum결과를 위해 125 MHz 주파수에서 relaxation time은 2초, 온도는 25 °C, scan number는 12288.0회 조건에서 분석을 수행하였음 (표 1).

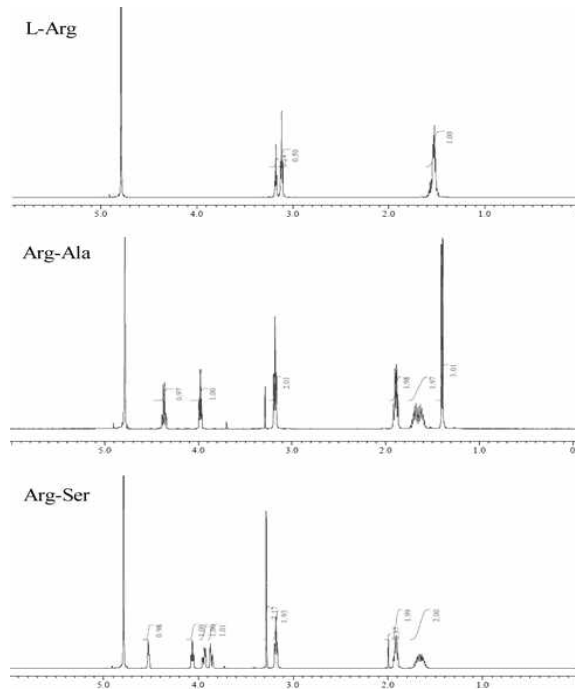


그림 8. Guanidine 그룹을 가진 샘플에서의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum

- 우선 L-Arg 시료의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum을 살펴보면 (그림 8), 3.13 ppm과 3.10 ppm 사이에 triplet 피크를 확인할 수 있었으며, 문헌치를 통해 이 피크가 구아니딘기에 가장 근접한 탄소의 수소일 것으로 추정하였음.
- 이러한 시그널은 Arg-Ser 과 Arg-Ala 시료에서도 각각 3.19~3.17 ppm과 3.18~3.17 ppm에서 동일한 위치의 수소 시그널이 나타남을 확인 할 수 있었음.
- 비록 각 시료의 구아니딘에 근접한 수소의 화학적 이동값은 매우 유사한 값을 나타내지만, 아미노산의 α -탄소의 수소피크와 sulfides에서의 수소피크 등과 겹쳐질 우려가 있어 내부표준시그널로 선정하는데 어려움이 있었음.

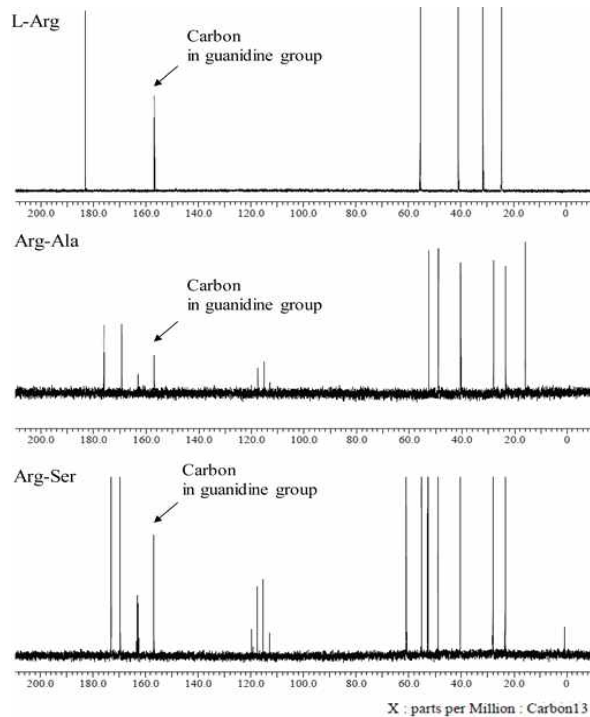


그림 9. Guanidine 그룹을 가진 샘플에서의 ^{13}C -NMR spectrum

- 다음으로 각 표준물질의 ^{13}C NMR spectrum을 살펴 본 결과, 모든 시료에서 156.0~156.9 ppm 사이에 하나의 탄소 피크가 나타남을 확인하였음 (그림 9).
- 위 실험에서 얻어낸 결과와 각 시료들의 문헌치를 비교하여 보았을 때, 156.0~156.9 ppm 위치의 탄소 피크는 구아니딘 위치에 있는 탄소의 시그널일 것으로 추정할 수 있음.
- 각 시료의 구아니딘 위치에 있는 탄소의 화학적 이동값은 매우 유사한 값 (L-arginine: 156.8 ppm, Arg-Ala: 156.4 ppm, Arg-Ser: 156.4 ppm)을 나타내었고 무시할 수 있을 만큼의 오차를 가짐.
- 또한, 구아니딘 위치의 탄소 시그널은 다른 위치의 탄소 시그널들과 겹치지 않아 정확한 적분비와 화학적 이동값을 얻는 것이 가능하였음.
- 구아니딘 위치의 탄소 시그널을 L-arginine을 포함한 peptide 정량을 위한 내부표준 시그널로 선정하였음.
- 비록 충분한 양의 SAP를 확보하지 못하여 유의미한 ^{13}C -NMR 스펙트럼 결과를 얻는 것은 실패하였지만, 위 결과를 통해 arginine 함유 펩타이드 정량분석을 위해 NMR의 사용이 매우 간편하고 효율적인 수단임을 증명하였음 (그림 9).

제4절. 제 2협동 : 염미성 펩타이드 기능평가 (한식연)

1. 실험방법

가. Ca²⁺signaling assay를 이용한 TRPV1 활성화 정량 반응 측정

- TRPV1 발현 세포주는 human TRPV1 expression plasmid를 lipofectamine 2000 (Invitrogen)을 이용해서 HEK293T 세포에 co-transfection시킨 뒤 24-h 후 실험에 사용하였다.
- TRPV1 agonist 및 antagonist에 반응하여 TRPV1 발현 세포에서 방출되는 Ca²⁺의 양을 정량적으로 신속하게 분석 가능하도록 FLEX system을 구축하였다. 세포내 Ca²⁺ 측정은 FlexStationIII™ (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)을 이용하여 실시하였다. 세포는 측정 24시간 전에 96-well black-wall CellBIND surface plates (Corning, NY, USA)에 분주 하고, 세포내 칼슘양의 변화를 측정하기 위한 표식자로 5 μM Fluo-4-AM(Molecular Probes, Eugene, OR, USA)를 처리하여 27 °C에서 30분간 반응하였다. 그 후, 세포는 assay buffer (130 mM NaCl, 10 mM glucose, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, and 100 mM HEPES, pH 7.4)로 세정한 뒤 100 uL의 assay buffer 를 첨가하여 실온에서 15분간 방치한 후, 각각의 펩타이드를 처리하여, 486 nm와 516 nm 에서 (F486, F516)형광흡광도를 120초 동안 측정하였다.
- 시료는 기저 측정 17초 후에 처리되었고, 형광강도의 변화는 2.1초 간격으로 120초 동안 측정되었다(485 nm 흡광, 525 nm 흡광). 가장 큰 형광 강도 값에서 baseline 형광 강도 값을 뺀 값을 데이터로 사용하였다.

나. Ca²⁺signaling assay를 이용한 CaSR 활성화 정량 반응 측정

- CaSR 발현 세포주는 human CaSR (hCaSR) expression plasmid와 Ga16gust44를 lipofectamine 2000 (Invitrogen)을 이용해서 HEK293T 세포에 co-transfection시킨 뒤 24-h 후 실험에 사용하였다.
- 세포내 Ca²⁺ 측정은 FlexStationIII™ (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)을 이용하여 실시하였다. 세포는 측정 24시간 전에 96-well black-wall CellBIND surface plates (Corning, NY, USA)에 분주 하고, 세포내 칼슘양의 변화를 측정하기 위한 표식자 로 5 μM Calcium 4 dye (Molecular Devices, USA)를 처리하여 27 °C에서 30분간 반응하였다. 그 후, 세포는 assay buffer (130 mM NaCl, 10 mM glucose, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, and 100 mM HEPES, pH 7.4)로 세정한 뒤 100 uL의 assay buffer 를 첨가하여 실온에서 15분간 방치한 후, 각각의 펩타이드를 처리하여, 486 nm와 516 nm 에서 (F486, F516)형광흡광도를 120초 동안 측정하였다.
- 세포내 칼슘양의 변화는 ΔRFU로 표시하고, Softmax software (Molecular devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 분석하였다

2. 연구개발 수행결과

가. 맛 수용체 발현 세포모델에서의 활성 펩타이드의 작용 평가

- 주관연구기관에서 개발한 짠맛증강 활성 펩타이드 혼합물, SAP1, 2, 3, 4 및 wSAP2의 맛 수용체 발현 세포모델에서의 작용 평가를 위해, TRPV1 및 CaSR 발현 세포를 이용하여 수용체에 대한 작용제(agonist) 또는 agonist 작용 증강제로서의 특성을 측정하였다.

(1) 펩타이드의 TRPV1 맛 수용체 활성화 작용 평가

(가) TRPV1 수용체에 대한 활성 펩타이드의 작용 평가

- **SAP1**을 TRPV1 발현 세포에 50, 100, 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리하였다.
- SAP1 처리로 세포내 Ca^{2+} 농도가 증가 되었으나 증가량이 비교적 적고, 농도 의존적 효능 또한 뚜렷이 관찰되지 않았다.
- 한편, SAP1 처리로 증가된 세포내 Ca^{2+} 량은 TRPV1의 specific antagonist인 capsazepine에 의해 유의적으로 저해되었다.
- 이 결과는 SAP1이 그 작용이 미약하기는 하지만 TRPV1 수용체에 대해 agonist와 유사한 활성을 나타내는 것으로, SAP1의 amiloride 비감수성 짠맛 인지 경로를 통한 짠맛증강 작용 관여 가능성을 시사한다.

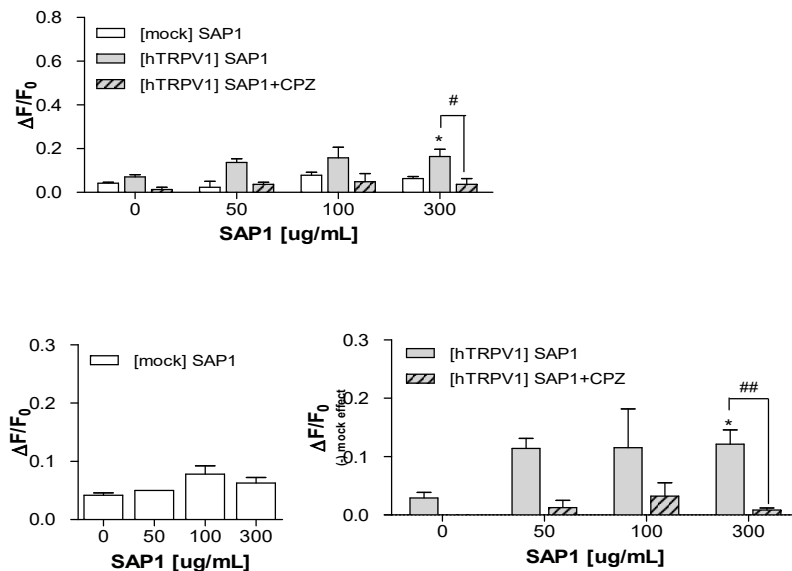


그림 1. TRPV1이 발현된 세포에서의 SAP1의 agonist 효과

- **SAP2** (50, 100, 300 $\mu\text{g/mL}$)를 TRPV1 발현 세포에 처리하였을 때 세포내 Ca^{2+} 농도의 유의적인 증가가 관찰되었으며, 이 현상은 SAP2 농도 의존적으로 확인되었다.
- 한편, SAP2 처리로 증가된 세포내 Ca^{2+} 량은 capsazepine에 의해 유의적으로 저해되었다.
- 이 결과는 SAP2가 TRPV1 수용체에 대해 agonist 유사 활성을 나타내는 것으로, SAP2의 amiloride 비감수성 짠맛인지경로를 통한 짠맛증강 작용 관여 가능성을 시사한다.

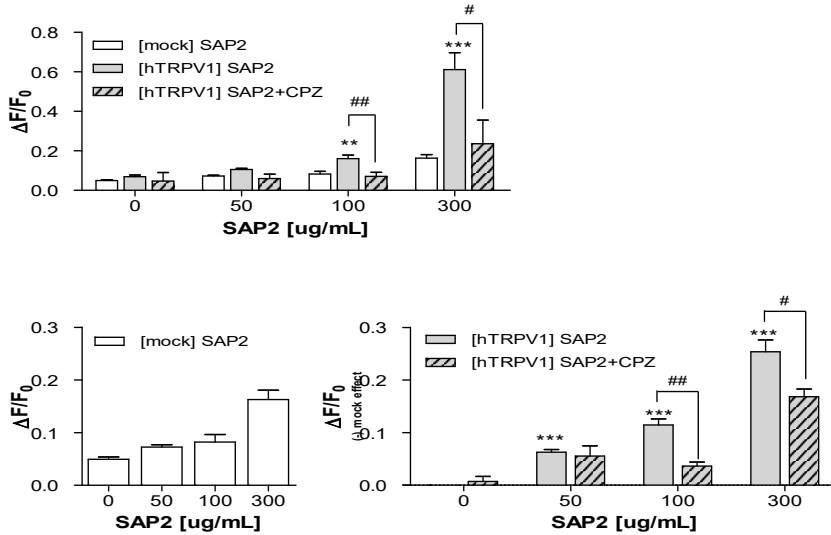


그림 2. TRPV1이 발현된 세포에서의 SAP2의 agonist 효과

- **SAP3** (50, 100, 300 $\mu\text{g/mL}$)은 수용체가 발현되지 않은 mock 세포에서 TRPV1 비특이적 반응이 크게 나타나 TRPV1 발현세포에서의 수용체 특이적 반응 측정이 불가능하였다. 시료에 함유된 첨가물 등의 영향으로 판단되며 SAP3은 본 실험에 부적합한 시료로 판단되었다.

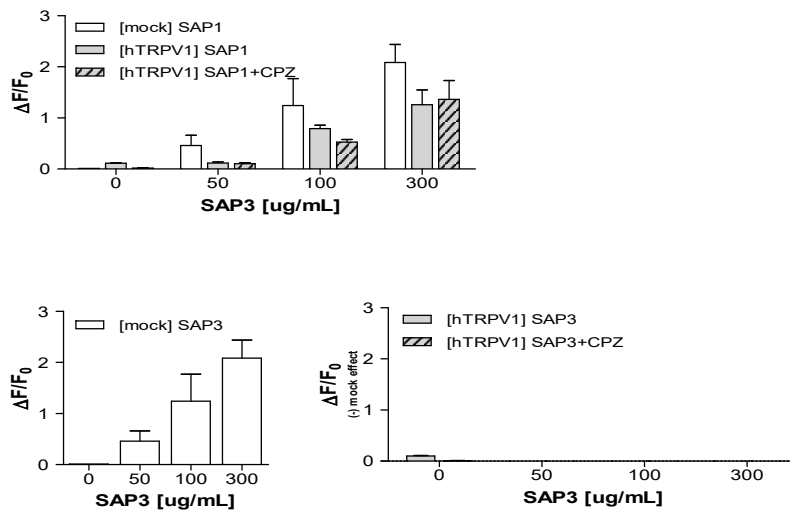


그림 3. TRPV1이 발현된 세포에서의 SAP3의 agonist 효과

- **SAP4** (50, 100, 300 $\mu\text{g/mL}$) 또한 수용체가 발현되지 않은 mock 세포에 처리하였을 때 SAP3과 유사하게 TRPV1 수용체 비특이적 반응이 크게 나타나 TRPV1 발현세포에서의 수용체 특이적 반응 측정이 불가하였다.
- 이 결과는 SAP4에 함유된 첨가물 등의 영향 때문으로 SAP4 또한 본 실험에 부적합한 것으로 판단되었다.

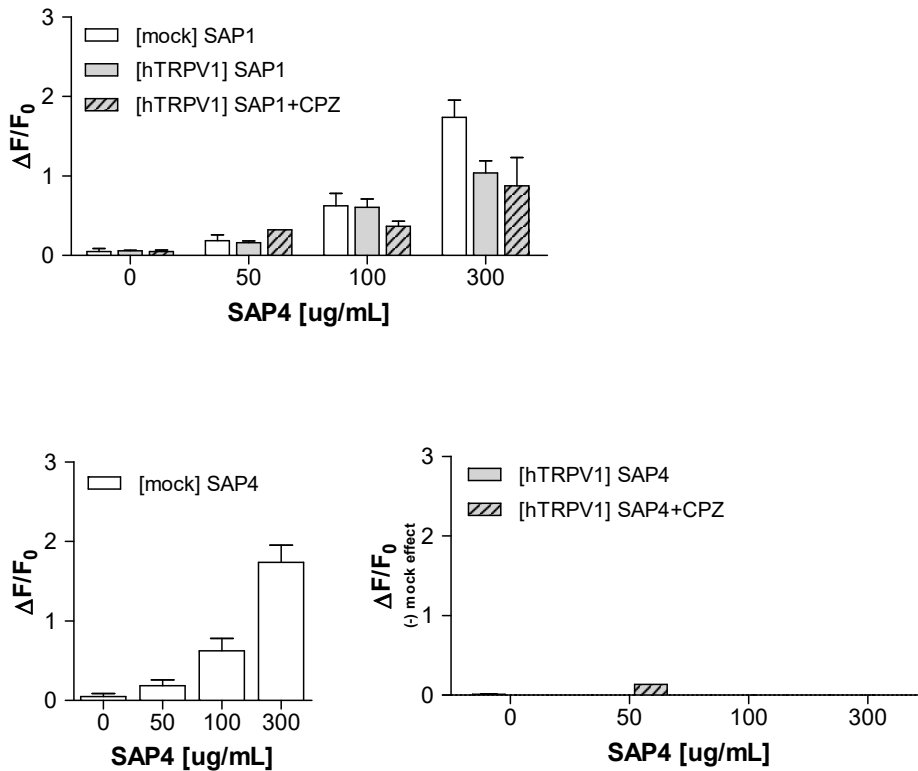


그림 4. TRPV1이 발현된 세포에서의 SAP4의 효과

- 짠맛증강 활성 펩타이드 혼합물 SAP1, 2, 3 및 4의 TRPV1 발현 세포에 미치는 영향을 측정한 결과 특히 SAP2가 TRPV1 수용체에 대해 agonist와 유사한 활성을 나타내는 것으로 확인되었으며 따라서 SAP2는 amiloride 비감수성 짠맛인지 경로를 통한 짠맛 증강작용에 관여할 가능성이 시사되었다.
- 따라서 활성 펩타이드 혼합물 SAP2로부터 수용성 물질만을 추출하여 wSAP2를 제조하고 wSAP2의 TRPV1 발현 세포에 대한 agonist로서의 효능을 측정하였다.
 - **wSAP2** (50, 100, 300 $\mu\text{g/mL}$)을 TRPV1 발현 세포에 농도로 처리하였을 때, 그 변화가 미약하기는 하였으나 wSAP2 농도 증가에 따라 세포내 Ca^{2+} 농도가 증가하였으나 이 현상은 wSAP2 300 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 감소하는 경향을 나타내었다.
 - 한편, wSAP2 처리로 증가된 세포내 Ca^{2+} 량은 TRPV1의 specific antagonist capsazepine에 의해 저해되었으나 유의적인 변화를 나타내지는 않았다.

- 이 결과는 wSAP2의 TRPV1 수용체에 대한 agonist 유사활성이 SAP2 보다 낮으며, 따라서 wSAP2는 amiloride 비감수성 짠맛인지경로를 통한 짠맛증강 작용 관여 가능성이 낮음을 시사한다.

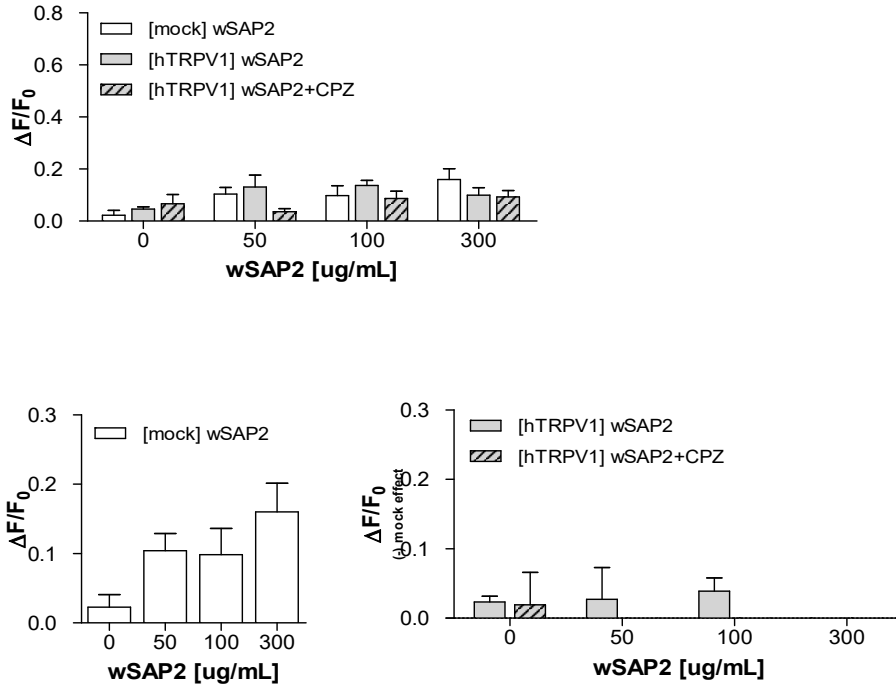


그림 5. TRPV1이 발현된 세포에서의 wSAP2의 agonist 효과

○ 짠맛증강 활성 펩타이드 혼합물 SAP1, 2, 3, 4 및 wSAP2의 TRPV1 발현 세포에 미치는 영향을 측정한 결과 SAP2에서 만 유의미한 TRPV1 agonist 유사활성이 확인되었으며 amiloride 비감수성 짠맛인지 관여 가능성이 시사되었다.

(나) 활성 펩타이드의 TRPV1 수용체 작용제와의 상호작용 평가

○ SAP1, 2, 3, 4 및 wSAP2 5종의 펩타이드 혼합물 중 비 특이적 반응으로 인해 미각 수용체 발현 세포 실험에 적용 불가능한 SAP3과 SAP4를 제외한 3종의 SAP1, 2 및 wSAP2에 대해 TRPV1 agonist의 작용을 증가시키는 증강제로서의 효능을 확인하였다.

○ **SAP1** 300 $\mu\text{g/mL}$ 을 capsaicin (0.01 μM)과 함께 반응시켰을 때 capsaicin 만 반응시켰을 때에 비해 세포 내 Ca^{2+} 유입량에 변화가 나타나지 않았다.

○ 이 결과는 SAP1은 TRPV1 agonist 작용 증강제로서 작용하지 않는 것을 시사한다.

○ 따라서 펩타이드 혼합물 SAP1은 미약하지만 TRPV1 agonist 유사활성을 통해 amiloride 비감수성 짠맛인지 작용할 가능성은 있으나, TRPV1 agonist 작용 증강제로서 짠맛에 관여할 가능성은 높지 않음을 시사한다.

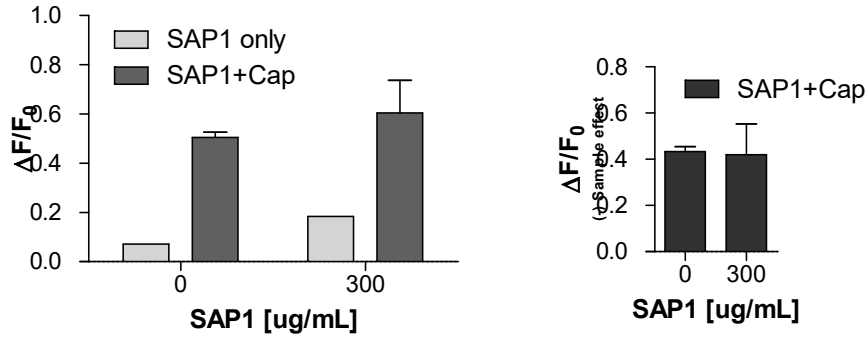


그림 6. TRPV1이 발현된 세포에서의 SAP1과 capsaicin과의 상호작용

- **SAP2** 300 $\mu\text{g/mL}$ 을 capsaicin (0.01 μM)과 함께 반응시킨 결과, capsaicin만을 반응시켰을 때와 세포 내 Ca^{2+} 유입량에 변화가 없었다.
- 이 결과는 SAP2는 TRPV1 agonist 작용 증강제로서의 작용 가능성이 낮음을 시사한다.
- 따라서 펩타이드 혼합물 SAP2은 TRPV1 agonist 유사활성을 통해 amiloride 비감수성 짠맛인지에 관여할 가능성은 높지만 TRPV1 agonist 작용 증강제로서는 짠맛에 관여할 가능성은 높지 않음을 시사한다.

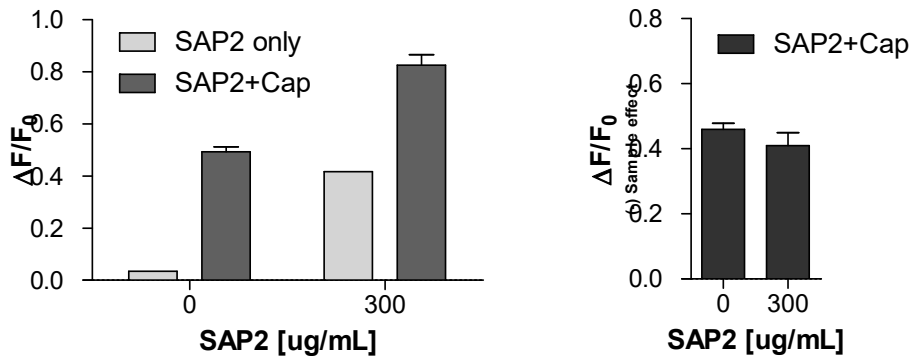


그림 7. TRPV1이 발현된 세포에서의 SAP2와 capsaicin과의 상호작용

- **wSAP2** 300 $\mu\text{g/mL}$ 을 capsaicin (0.01 μM)과 함께 반응시킨 결과, capsaicin만 반응시켰을 때에 비해 세포 내 Ca^{2+} 유입량에 변화가 없었다.
- 이 결과는 wSAP2는 TRPV1 agonist 작용 증강제로서의 작용 가능성이 낮음을 시사한다.
- 따라서 펩타이드 혼합물 wSAP2는 TRPV1 agonist 유사활성 뿐 아니라 TRPV1 agonist 작용 증강제로서도 짠맛에 관여할 가능성은 높지 않음을 시사한다.

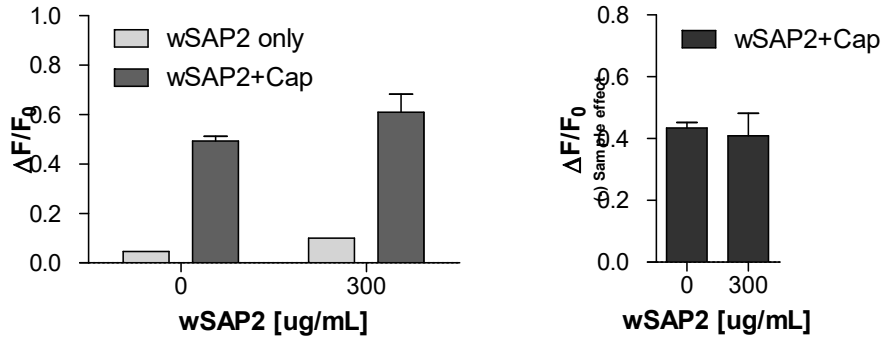


그림 8. TRPV1이 발현된 세포에서의 wSAP2와 capsaicin과의 상호작용

- 짠맛 증강 활성 펩타이드 혼합물 SAP1, 2 및 wSAP2의 TRPV1 발현 세포에 대한 agonist 유사활성 및 agonist 작용을 증가시키는 활성증가제로서의 영향을 측정한 결과, SAP1과 SAP 2는 TRPV1 agonist 유사활성을 나타내지만 agonist 작용 증강제로서는 작용 가능성은 낮은 것으로 나타났다.
- 한편 wSAP2는 TRPV1 agonist 유사활성 및 agonist 작용 증강제로 작용할 가능성은 낮은 것으로 확인되었다.
- 이 결과는 펩타이드 혼합물의 제조 방법을 달리함으로써 목표하는 식품에서의 짠맛을 조절할 수 있는 가능성을 나타낸다.
- 뿐만 아니라 본 주관연구기관에서 제조한 염미성 펩타이드 혼합물은 관능검사 뿐 아니라 amiloride 비감수성 짠맛 관련 수용체 TRPV1를 통해서도 짠맛 인지에 유효한 소재임을 입증하는 결과이다.

(2) 펩타이드의 CaSR 및 수용체 활성화 작용 평가

(가) CaSR 수용체에 대한 활성 펩타이드의 작용 평가

- **SAP1** (50, 100, 300 $\mu\text{g/mL}$)을 CaSR 발현 세포에 처리하였을 때, 변화량이 적기는 하지만 세포내 Ca^{2+} 유입량이 증가하였으며 세포내 Ca^{2+} 유입량 증가는 SAP1 농도 증가에 따라 증가하는 경향을 나타내었다.
- 한편, SAP1 처리로 증가된 세포내 Ca^{2+} 유입량은 CaSR의 specific antagonist인 NPS 2143 (10 μM)에 의하여 저해되었다.
- 이 결과는 SAP1은 그 작용이 약하기는 하지만 CaSR 수용체에 agonist와 유사한 작용을 나타냄으로써 CaSR 수용체를 통한 짠맛증강작용에 관여할 가능성을 시사한다.

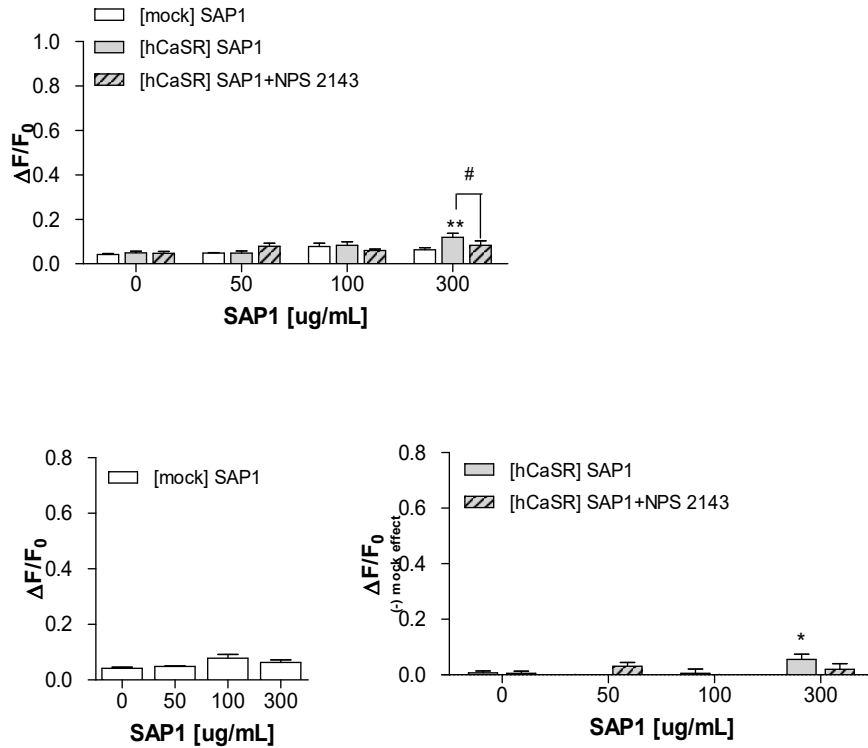


그림 9. CaSR이 발현된 세포에서의 SAP1의 agonist 효과

- **SAP2** (50, 100, 300 $\mu\text{g/mL}$)을 CaSR 발현 세포에 처리하였을 때, 세포내 Ca^{2+} 유입량이 증가하였으며 Ca^{2+} 유입량은 SAP2 농도 증가에 따라 유의적으로 증가하였다.
- 특히 SAP2에 의한 세포내 Ca^{2+} 유입량 증가는 SAP1에 비해 유의적으로 크게 나타났다.
- 한편, SAP2 처리로 증가된 세포내 Ca^{2+} 유입량은 CaSR의 specific antagonist인 NPS 2143 (10 μM)에 의하여 유의적으로 감소하였다.
- 이 결과는 SAP2는 CaSR 수용체에 agonist와 유사한 작용을 나타냄으로써 CaSR 수용체를 통한 짠맛증강작용에 관여할 가능성을 시사한다.

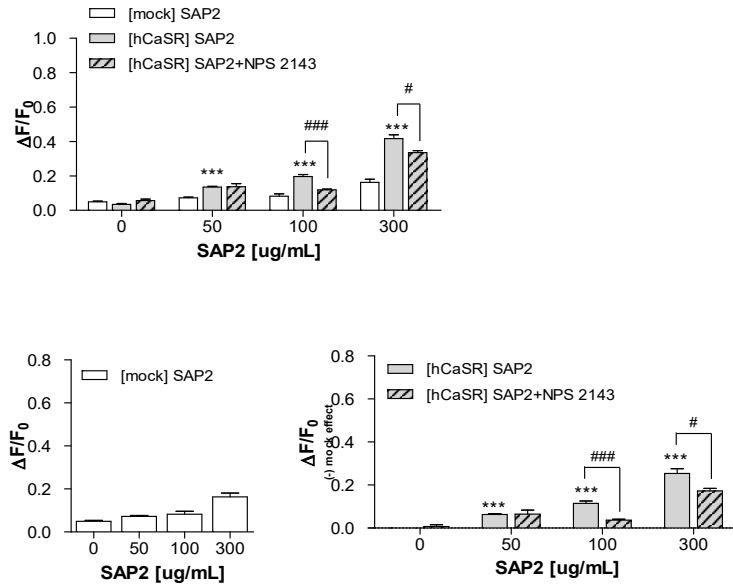


그림 10. CaSR이 발현된 세포에서의 SAP2의 agonist 효과

- **SAP3** (50, 100, 300 $\mu\text{g/mL}$)은 수용체가 발현되지 않은 mock 세포에서 수용체 비특이적 반응이 크게 나타나 CaSR 발현세포에서의 수용체 특이적 반응 측정이 불가능하였다.
- SAP3에 함유된 첨가물 등의 영향 때문으로, SAP3은 본 실험에 부적합한 것으로 판단되었다.

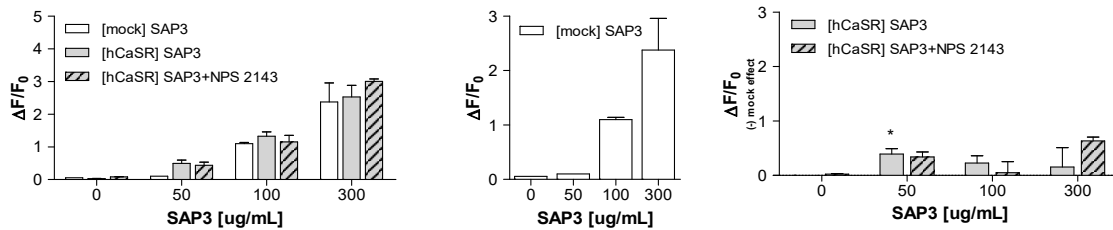


그림 11. CaSR이 발현된 세포에서의 SAP3의 agonist 효과

- **SAP4** (50, 100, 300 $\mu\text{g/mL}$) 또한 수용체가 발현되지 않은 mock 세포에서 CaSR 비특이적 반응이 매우 크게 나타나 CaSR 발현세포에서의 수용체 특이적 반응 측정이 불가능하였다.
- SAP3과 마찬가지로 SAP4은 본 실험에 부적합한 것으로 판단되었다.

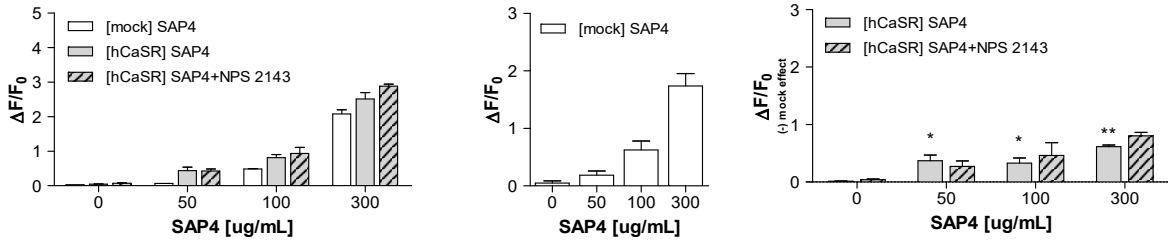


그림 12. CaSR이 발현된 세포에서의 SAP4의 agonist 효과

- **wSAP2** (50, 100, 300 $\mu\text{g/mL}$)를 CaSR이 발현된 세포에 처리하였을 때, 세포내 Ca^{2+} 유입량이 증가하였으며, 이 작용은 wSAP2 농도 증가에 따라 유의적으로 증가하였을 뿐 아니라 SAP2에 비해 유의적인 증가량을 나타내었다.
- 한편, wSAP2 처리로 증가된 세포내 Ca^{2+} 유입량은 CaSR의 specific antagonist인 NPS 2143 (10 μM)에 의하여 유의적으로 감소하였다.
- 이 결과는 wSAP2는 CaSR 수용체에 agonist와 유사한 작용을 나타냄으로써 CaSR 수용체를 통한 짠맛증강작용에 관여할 가능성을 시사한다.
- SAP2 보다 wSAP2 활성이 증가한 것은 주요 활성물질이 수용성 펩타이드임을 시사한다.
- 이 결과는 CaSR 수용체를 경유한 짠맛 증강 작용에 있어 wSAP2는 SAP2 보다도 더 유용한 활성 소재인 것으로 평가된다.

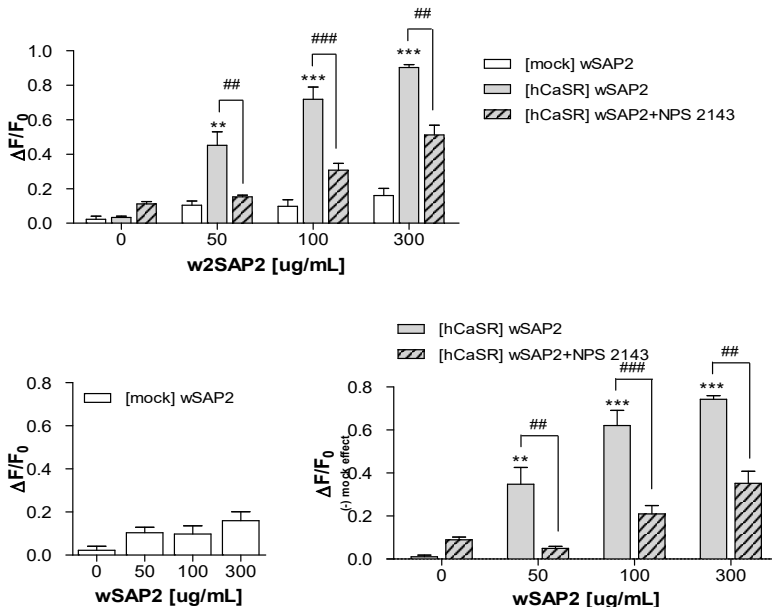


그림 13. CaSR이 발현된 세포에서의 wSAP2의 agonist 효과

(나) 활성 펩타이드의 CaSR 수용체 작용제와의 상호 작용 평가

- SAP1, 2, 3, 4 및 wSAP2 5종의 펩타이드 혼합물 중 비 특이적 반응으로 인해 미각수용체 발현 세포 실험에 적용 불가능한 SAP3과 SAP4를 제외한 3종의 SAP1, 2 및 wSAP2에 대해 TRPV1 agonist의 작용을 증가시키는 증강제로서의 효능을 확인하였다.
- **SAP1** (50, 100, 300 $\mu\text{g/mL}$)을 NPS R-568 (0.1 μM)과 함께 반응시킨 결과, NPS R-568만을 반응시켰을 때와 비교해 세포 내 Ca^{2+} 유입량에 변화가 나타나지 않았다.
- 이 결과는 SAP1은 CaSR 활성제 작용 증강제로서 작용하지 않는 것을 시사한다.
- 따라서 펩타이드 혼합물 SAP1은 미약하지만 CaSR agonist 유사활성을 통해 amiloride 비감수성 짠맛인지 작용할 가능성은 있으나, CaSR agonist 작용 증강제로서 짠맛에 관여할 가능성은 높지 않음을 시사한다.

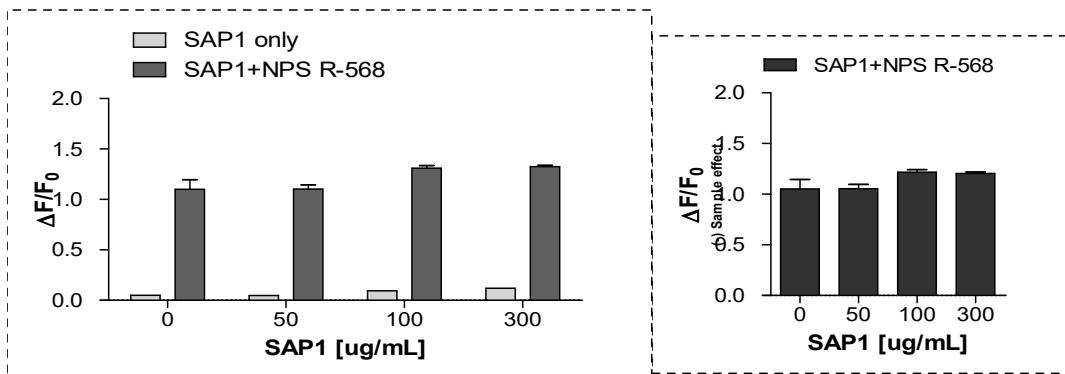


그림 14. CaSR이 발현된 세포에서의 SAP1과 CaSR agonist와의 상호작용

- **SAP2** (50, 100, 300 $\mu\text{g/mL}$)를 NPS R-568 (0.1 μM)과 함께 처리하였을 때 고농도의 SAP2 (300 $\mu\text{g/mL}$)에서 NPS R-568만을 반응시켰을 때보다 세포 내 Ca^{2+} 를 유의적으로 증가시켰다.
- 이 결과는 펩타이드 혼합물 SAP2는 CaSR에 대해 agonist와 유사한 작용 뿐 아니라 agonist 작용을 증가시키는 증강제로서도 작용할 수 있음을 나타내는 것으로, CaSR을 통한 짠맛증가 작용에 관여할 가능성이 높음을 시사한다.

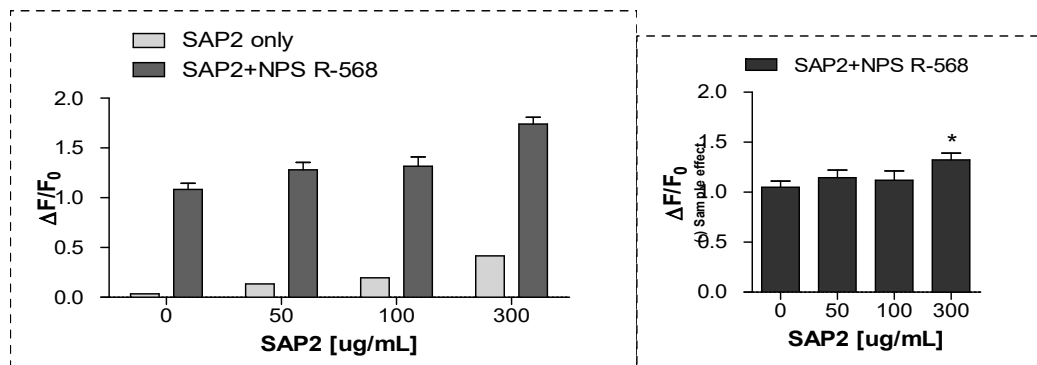


그림 15. CaSR이 발현된 세포에서의 SAP2와 CaSR agonist와의 상호작용

- **wSAP2** (50, 100, 300 $\mu\text{g/mL}$)을 NPS R-568 (0.1 μM)과 함께 반응시킨 결과, NPS R-568만 반응시켰을 때에 비해 세포 내 Ca^{2+} 유입량이 오히려 감소하였으며 감소 정도는 wSAP2의 농도가 증가할수록 커지는 것으로 나타났다.
- 이 결과는 wSAP2는 CaSR agonist 작용 증강제로서의 작용 가능성이 낮음을 시사한다.
- 따라서 펩타이드 혼합물 wSAP2는 CaSR agonist 유사활성은 모든 펩타이드 혼합물 중 가장 높지만, CaSR agonist 작용 증강제로서 짠맛에 관여할 가능성은 높지 않음을 시사한다.

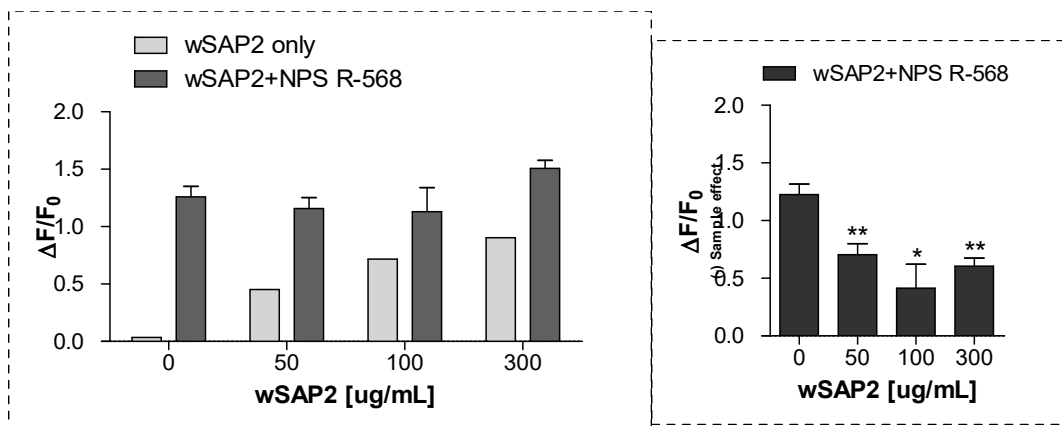


그림 16. CaSR이 발현된 세포에서의 wSAP2와 CaSR agonist와의 상호작용

- 짠맛 증강 활성 펩타이드 혼합물 SAP1, 2 및 wSAP2의 CaSR 발현 세포에 대한 agonist 유사활성 및 agonist 작용을 증가시키는 활성증가제로서의 영향을 측정한 결과, SAP1, SAP2, wSAP2는 모두 CaSR agonist 유사활성을 나타내었고 이 중 wSAP2의 활성이 가장 강한 것으로 나타났다.
- 한편 펩타이드 혼합물 SAP1, 2 및 wSAP2 중 CaSR agonist 작용 증강제로서의 작용 가능성은 SAP2에서만 확인되었다.
- 이 결과는 펩타이드 혼합물의 제조 방법을 달리함으로써 목표하는 식품에서의 짠맛을 조절할 수 있는 가능성을 나타낸다.
- 뿐만 아니라 본 주관연구기관에서 제조한 염미성 펩타이드 혼합물은 관능검사 뿐 아니라 CaSR 수용체를 통해서도 짠맛 인지에 유효한 소재임을 입증하는 결과이다.

나. 염미성 펩타이드의 맛 상승 메카니즘 도출

- 식품 단백질 소재에서 유래된 천연 염미성 펩타이드는 Na^+ 을 함유하지 않으면서 짠맛 인지에 관여한다. 따라서 본 연구에서는 Na^+ 채널 이외의 짠맛 관련 미각수용기에 대한 천연 염미성 펩타이드의 작용을 구명하고자 하였다.

○ 짠맛 관련 미각수용기로는 amiloride 비감수성 짠맛 인지 작용과 관련 가능성이 제안된 TRPV1 수용체 및 짠맛을 증강시키는 미각물질의 수용에 관여하는 것으로 보고된 칼슘감지 수용체 CaSR을 활용하였으며 기 구축된 calcium signaling assay법을 이용하였다.

(1) 활성 펩타이드의 미각수용체 작용 모델 제시

○ 천연 식품 단백질 유래 짠맛증강 펩타이드 혼합물 중 SAP2 만이 TRPV1 수용체에 agonist와 유사한 작용을 하는 것으로 확인되었으며, TRPV1 수용체에 대한 작용 메카니즘은 아래와 같이 추정되었다.

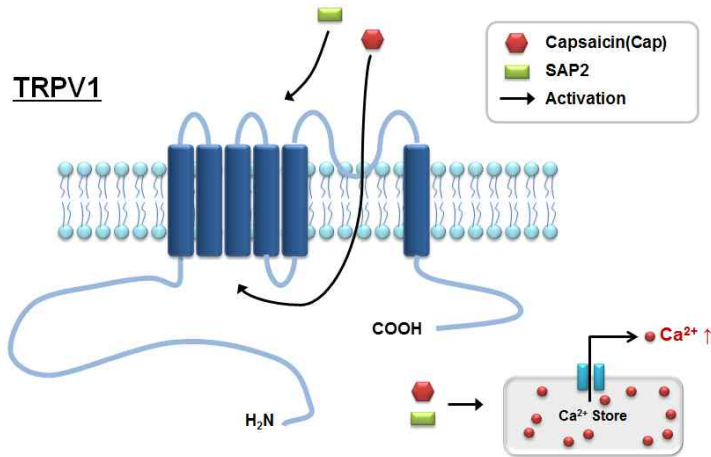


그림 17. TRPV1 수용체에 대한 작용 예상 메카니즘

○ 천연 식품 단백질 유래 짠맛증강 펩타이드 혼합물 중 SAP1, SAP2 및 wSAP는 CaSR 수용체에 agonist와 유사한 작용을 하는 것으로 확인되었으며, 이들 활성 펩타이드 혼합물의 수용체에 대한 작용 메카니즘은 아래와 같이 추정되었다.

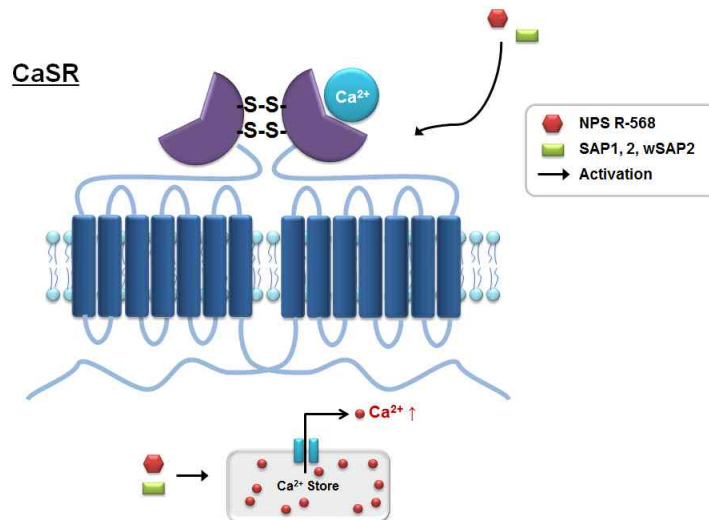


그림 18. 염미성 펩타이드 혼합물의 수용체에 대한 작용 예상 메카니즘

- 한편 천연 식품 단백질 유래 짠맛증강 펩타이드 혼합물 중 SAP2는 CaSR 수용체에서 agonist의 작용을 증가시키는 증강제로서의 효능을 나타내었으며, CaSR 수용체에 대한 SAP2의 작용 메카니즘은 아래와 같이 추정되었다.

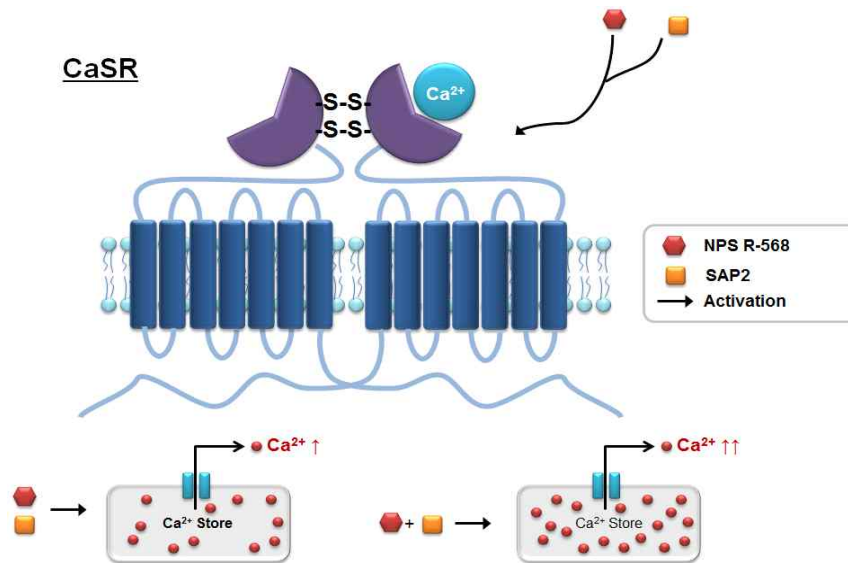


그림 19. CaSR 수용체에 대한 염미성 펩타이드의 작용 예상 메카니즘

- 즉, SAP1은 그 작용이 미약하기는 하지만 amiloride 비감수성 짠맛인지경로의 하나인 TRPV1를 통해 짠맛을 증가시키며, SAP2는 amiloride 비감수성 짠맛인지경로 뿐 아니라 CaSR을 통해 짠맛을 증가시키는 것으로 추정된다.
- 한편 SAP2의 수용성 물질만을 포집한 wSAP2의 활성은 TRPV1에 대해서는 SAP2보다 활성이 줄어들었고, CaSR에 대해서는 SAP2보다 활성이 증가됨에 따라 SAP2에 함유된 수용성 펩타이드는 주로 CaSR을 통해 짠맛을 증가시키는 것으로 추정되었으며, 이외 물질이 TRPV1 수용체를 통한 짠맛 인지에 관여하는 것으로 추정되었다.

(2) 작용 메카니즘에 근거한 소재의 활용방안

- CaSR 수용체 agonist는 짠맛을 증가시키는 작용이 있는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 천연 식품 단백질 유래 염미성 펩타이드 혼합물에 함유된 수용성 펩타이드가 CaSR 수용체에 agonist와 유사하게 작용함에 따라 이 펩타이드 소재는 그 자체로 짠맛을 띠지 않으면서 소금(NaCl)가 같은 짠맛물질과 함께 사용할 경우 소금의 짠맛을 증가시키는 작용할 가능성이 있는 것으로 추정된다.
- 따라서 SAP2와 같은 펩타이드 혼합물은 단독으로 사용하는 것이 아니라 Na⁺ 섭취를 제한하는 식이에 소금 등과 함께 사용함으로써, 식품의 짠맛은 유지하면서 Na⁺ 사용을 줄이는데 활용하는 것이 최적 활용 방안일 것으로 추정된다.
- 사용량 등은 관능검사와 세포실험간 상관성 분석을 통해 가능할 것으로 사료되며, 이 부분은 향후 소재의 실용화 과정에서 확인되어야 할 부분으로 사료된다.

제5장. 연구개발 성과

				코드번호	D-06		
제1절. 논문게재성과							
번호	논문명	저자명	학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	논문게재일	SCI 여부
1	Comparison of quality characteristics of <i>Doenjang</i> reduced of sodium content	김민아 김미연 정용진	한국 식품저장 유통학회	24(6)	국내	2017- 11-30	비SCI I
2	Jaceosidin induces apoptosis through Bax activation and downregulation of Mcl-1 and c-FLIP expression in human renal carcinoma Caki cells.	우성민 권택규	Chemico- Biologi- cal Interacti- ons	260	국외	2016- 08-08	SCI
3	YM155 enhances ABT-737-mediated apoptosis through Mcl-1 downregulation in Mcl-1-overexpressed cancer cells.	우선민 민경진 서보람 서영호 정용진 권택규	Molecul- ar and Cellular Biochem- istry	429	국외	2017- 01-24	SCI
4	HPLC와 NMR를 이용한 염미성 펩타이드 분석방법 검증	박선유 정용진 김미연 황지홍 권택규 서영호	Journal of life science	27(1 1)	국내	2017- 10-24	비SCI I
5	Chalcone-templated Hsp90 inhibitors and their effects on gefitinib resistance in non-small cell lung cancer (NSCLC)	정주희 오용진 권택규 서영호	Archive s of pharmac- al research	1(1)	국외	2016- 08-21	SCI
6	Identification of a key umami-active fraction in modernized Korean soy sauce and the impact thereof on bitter-masking	김이슬 김은영 손희진 이재정 최용호 류미라	Food chemistr- y	263	국외	2017- 04-21	SCI

제2절. 특허성과

번호	특허명	출원기관	출원등록번호	출원일	출원국
1	대체염 및 엽미성 콩 발효물을 활용한 나트륨 저감화 된장의 제조 방법	(주)케이엠에프	10-2017-0176383	2017.12.20	대한민국

제3절. 기술요약정보

번호	기술실시 계약명	연도	요약내용	기술완성도
1	대두와 글루텐을 이용한 엽미성증가 천연조미료 및 그 제조	2017	엽미성 펩타이드를 활용하여 자사 저염제품에 기술활용	노하우
2	대두와 글루텐을 이용한 엽미성증가 천연조미료 및 그 제조	2017	엽미성 펩타이드가 들어있는 무염된장을 활용하여 울진콩 6차 산업클러스터 사업단에 된장 블렌딩 노하우 기술실시	노하우

제4절. 사업성과 및 매출실적

항목	세부항목		성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	23,647만원
			향후 3년간 매출	-
		관련제품	개발후 현재까지	-
			향후 3년간 매출	-
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 10 % 국외 : 0 %
			향후 3년간 매출	-
		관련제품	개발후 현재까지	-
			향후 3년간 매출	-
세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		-	
	3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		-	

제5절. 학술발표

번호	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	한국식품저장유통학회 학술대회	정용진 김미연 류미라	2017.07.14	대구한의대학교	대한민국
2	Korean society for chemical senses and ingestive behavior	류미라	2017.06.17	DGIST	대한민국

제6절. 홍보성과

1. 박람회/전시회 참가

번호	유형	행사명	전시품목	장소	활용년도
1	박람회 참가	2016 서울식문화전	염미성 펩타이드 소재 및 그 활용제품	서울 코엑스	2016
2	박람회 참가	2016 푸드위크	염미성 펩타이드 소재 및 그 활용제품	서울 코엑스	2016
3	박람회 참가	2016 월드전람	염미성 펩타이드 소재 및 그 활용제품	일산 킨텍스	2017
4	박람회 참가	2017 FI-China	염미성 펩타이드 소재 및 그 활용제품	상해 국가중심	2017
5	기타	2017 한중FTA유망품목 바이어초청	염미성 펩타이드 소재 및 그 활용제품	대구 노보텔	2017
6	박람회 참가	2017 서울푸드	염미성 펩타이드 소재 및 그 활용제품	일산 킨텍스	2017
7	박람회 참가	2017 친환경유기농무역	염미성 펩타이드 소재 및 그 활용제품	서울 코엑스	2017
8	기타	대형유통업체 입점을 위한 「지역 우수상품」 품평회	염미성 펩타이드 소재 및 그 활용제품	현대백화점 대구점	2017
9	박람회 참가	2017 푸드위크	염미성 펩타이드 소재 및 그 활용제품	서울 코엑스	2017
10	박람회 참가	2017 상해식품박람회	염미성 펩타이드 소재 및 그 활용제품	상해 신 국제박람회센터	2017

11	기타	KITA 대구경북 글로벌 빅비아어 초청 수출상담회	염미성 펩타이드 소재 및 그 활용제품	대구 노보텔	2017
----	----	-----------------------------------	----------------------------	-----------	------

2. 매체활용

번호	홍보유형	매체명	제목	일시	활용년도
1	Internet/PC통신	팩트올	피플 한국식품연구원 류미라박사 인터뷰	2016.11	2017

3. 교육/지도

구분	일시	컨설팅 내용	활용년도
컨설팅	7월 11일	(주)거제향기 멸치 젓갈, 간장 현장 컨설팅	2016
컨설팅	7월 13일	(주)모아 저염 김치 개발관련 컨설팅	2016
컨설팅	9월 12일	(주)옥이김치 저염 김치 결과 컨설팅	2016
컨설팅	9월 27일	(주)알알이 저염 제품 홍보 방안 컨설팅	2016
컨설팅	10월 23일	(주)삼미 저염 튀김가루 시제품 생산 및 품질 컨설팅	2016
컨설팅	10월 31일	전통식/개량식 저염된장 매뉴얼 컨설팅	2016
컨설팅	11월 10일	남안동농협 장류가공사업소 생산공정 및 제품 컨설팅	2016
컨설팅	9월 27일	울진 매화 농협 생산공정 및 저염제품 컨설팅	2017
컨설팅	9월 27일	방주명가 나트륨 저감화 컨설팅	2017

제7절. 연구성과물

1. 논문게재 및 학술발표

--	--



Chalcone-templated Hsp90 inhibitors and their effects on gefitinib resistance in non-small cell lung cancer (NSCLC)

Ju Hui Jeong¹, Yong Jin Oh¹, Taeg Kyu Kwon², Young Ho Seo¹

Received: 11 August 2016 / Accepted: 10 October 2016

Identification of a key umami-active fraction in modernized Korean soy sauce and the impact thereof on bitter-masking

Yiseul Kim^{1,3}, Eun-Young Kim^{1,3}, Hee Jin Son⁴, Jai-jung Lee⁵, Yong-ho Choi³, Mee-Ra Rhyu^{4,*}

¹ Division of Functional Food Research, Korea Food Research Institute, Hwanggi-ro, Seongnam-si, Gyeonggi-do 13258, Republic of Korea

ARTICLE INFO

Article history: Received 10 October 2016; Received in revised form 10 April 2017; Accepted 19 April 2017; Available online 21 April 2017

Keywords: Bitter-masking; Bitter taste receptor; Low molecular weight fraction; Modernized Korean soy sauce; Umami

ABSTRACT

Food protein hydrolysates created by natural fermentation have been used for centuries as food flavoring. The aim of this study was to define the key umami-active fraction of modernized Korean soy sauce (mKSS) and the impact thereof on bitter-masking of human sensory and bitter-taste receptor-expressing cells. We found strong correlations between taste profiles of mKSS and a contained fraction (F05). The latter contained components of less than 500 Da, and elicited a distinct umami taste. Both free amino acids and Glu-enkephalin oligopeptides are suggested to be crucial in terms of the effects of F05 on taste. F05 not only reduced human-perceived bitterness, but also effectively suppressed the intracellular Ca²⁺ response induced by caffeine in the HTRC3K43 and HDCK26 human bitter-taste receptor-expressing cells. This suggests that F05, a key umami-active fraction of mKSS, contains components that at least partially modulate human bitter-taste receptor action, improving food flavor.

1. Introduction

Fermentation is one of the oldest food-processing techniques and typically exploits the activities of a diverse array of microorganisms to induce metabolic protein breakdown. Amino acids and peptides from protein hydrolysates often make crucial contributions to the taste of fermented products. Fermentation products of soybeans contain high levels of amino acids and peptides, and are commonly used as food seasonings in Asian countries. Soybeans (Ohsaka, 1998). Although such products are made in different ways, using raw materials and microorganisms that vary by country-by-country, biochemical breakdown via protein fermentation is a core feature when the unique umami taste is sought (Hajeb & Jung, 2015; Ohsaka, 1998). Fermented soy products can be categorized as saucers or pastes. Shoyu, a Japanese soy sauce, is probably the most common form of soy sauce worldwide. Compared to shoyu, which is prepared principally from soybeans mixed with wheat or rice, Josen ganjang, a traditional Korean soy sauce, is made by fermenting only soybeans in brine (Chung & Sohn, 1994; Lee & Koh, 1976; Ohsaka, 1998).

As most traditional soy sauces are prepared using natural bacteria and fungi, and are then ripened for a long time at room temperature, it is not easy to standardize the quality of the final product. Modernized soy sauces, prepared under controlled microorganisms and temperature have recently become commercially available. Although the microorganisms used dictate the taste of the final product (Chen, Feng, Cui, Zhao, & Zhao, 2014; Lee & Koh, 1976; Lee et al., 2004), the taste characteristics of modernized Korean soy sauce, prepared using soybeans fermented by *Aspergillus oryzae* in brine, have not been explored. We first identified a key umami-active peptide fraction of modernized Korean soy sauce, and then explored the impact thereof on bitter-masking in humans. We employed sensory tests to this end. Umami substances have been suggested to suppress the tastes of various bitter compounds (Noguchi, Yamashita, Arai, & Fujimaki, 1975; Kozai, & Breslin, 2003; Kemp, & Beauchamp, 1994; Miodini, 1993). Bitter-suppression by umami substances was confirmed by recording single-neuron activities in C57BL/6J mice (Tokita & Boughter, 2012). These correspond to the responses of relevant receptors of taste cells. In terms of umami-bitter interactions with taste receptors, a recent study showed that umami peptides suppressed bitter tastes by binding to bitter-taste receptor(s) (Kim, Son, Kim, Oh, & Rhyu, 2015). Thus, we defined a key umami-active fraction in modernized Korean soy sauce, and the bitter-masking effects thereof, using human sensory cells and cells expressing bitter-taste receptors.

* Corresponding author. E-mail address: mrrhyu@kfri.re.kr (M.-R. Rhyu).

These authors contributed equally to this work.

http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.123

0924-6460/2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

An Analytical Method for the Validation of a Salt-enhancing Peptide Using a Liquid Chromatography and a Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy

Sun You Park¹, Yong Jin Jeong^{2,*}, Mi-Yeon Kim³, Ji Hong Hwang³, Taeg Kyu Kwon⁴ and Young Ho Seo⁴

¹ College of Pharmacy, Keimyung University, Daegu, 704-701, Korea; ² Department of Food Science and Technology, Keimyung University, Daegu, 704-701, Korea; ³ DMF Co., Ltd., Yuseong, Daejeon, 305-380, Korea; ⁴ Department of Immunology, School of Medicine, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

Received October 10, 2017 / Revised October 24, 2017 / Accepted October 24, 2017

Salt, or sodium chloride (NaCl), is a critical ingredient in many foods. It has roles in the flavor profiles of food products, textures of foods and preservation of foods against microbes. However, it increases risks of hypertension and is closely related to the development of cardiovascular disease. In recent years, health concerns related to sodium intake caused an increased demand for salt-reduced products in worldwide; it became necessary to develop natural salt-alternative products that are globally competitive. In a recent study, researchers succeeded in obtaining a natural salt enhancer through the hydrolysis of vegetable- and animal-matter mixtures. This study used various methods to identify and quantify peptide-containing arginine as a salt-alternative peptide (SAP) in an optimum combination. Arginine, or dipeptide-containing arginine, was analyzed as a standard substance using an NMR spectroscopy. The NMR carbon signal of the guanidine group of the standard substance was verified in a similar location (the L-Arginine (Arg) was 176.8 ppm, the Arg-L-Alanine was 186.4 ppm and the Arg-Serine was 156.4 ppm). The results suggested that it is possible to analyze peptide-containing arginine quantitatively through the hydrolysis of vegetable- and animal-matter mixtures.

Key words: Liquid chromatography, nuclear magnetic resonance, salty enhancing peptide

서론

소금은 식품에 맛을 부여할 뿐 아니라, 조직감과 색도 개선 및 방부 효과를 목적으로 식품산업에서 가장 보편적으로 사용되는 소금이다. 그러나 세계 각국의 90%가량이 과도한 양의 나트륨을 섭취하고 있으며, 특히 한국인의 평균 1일 나트륨 섭취량은 4,027.5 mg으로 세계보건기구 (WHO)의 1일 나트륨 권장량인 2,000 mg의 2배 이상을 섭취하고 있으며, 저 이러한 나트륨을 과다 섭취로 인해 고혈압, 심장 장애, 뇌졸중 등 다양한 심혈관 질환뿐만 아니라, 신장 질환 등 삶의 위협을 일으킬 증가하는 추세이며, 이에 각 나라에서는 국민 건강 보호를 위해 나트륨 섭취량 감소 정책을 시행하고 있다. 이 최근 글로벌 이슈에 따라 식품의약품안전처는 '가솔린 및 나트륨 저감화 사업'을 시행하여 2020년까지 국민

의 나트륨 1일 섭취량의 20%를 줄이기 위한 사업을 진행하였 으며, 국내 식품가공 분야에서도 소금의 함량을 절감하기 위한 연구가 다각도에서 진행되고 있다.

식품에서 나트륨을 저감시키기 위한 방법 중 하나로서, 나트륨 함량을 절감, 감칠, 마그네슘 등의 금속염으로 대체하는 방법이 있다. 대표적인 예로 일화염(나트륨)이 있으며, 이는 다양한 식품에서 사용되고 있지만 강한 쓴맛과 금속취 우려가 있는 단점이 있고 있다. 다른 방법으로는 mono sodium glutamate(MSG), 로오 추출물, 아미노산 등 자연산 향미물질을 가지고 있지 않지만 소금의 역할을 할 수 있는 천연물질을 이용한 방법이 있다. 이 중 아미노산은 훌륭한 향미 증강 소금으로는 L-arginine (L-Arg), L-lysine (L-Lys)와 같은 아미노산이 보고되어 있으며, 특히 L-Arg는 포함한 펩타이드인 구아닐 나일 그룹은 Na⁺ 채널과 상호작용하여 Na⁺ 이온의 유입을 향상시켜 맛을 증진시키는 것으로 보고 되어 있다. 하지만 합성물 통한 아미노산 제형은 염기 부성 효과가 있는데도 불구하고 선택되지 않아 시장성이 떨어지며, MSG는 발효 미생물에서 생산된 천연 향미 물질로써는 이미지가 높고 소비자들에게서 인정받고 있는 추세이다. 그러나 인공의 합성 물질은 상용화시키기, 선택적으로 적용을 하기 어려운 천연 펩타이드 일화염과 달리 선택적으로 적용할 수 있는 천연 펩타이드 일화염이 필요할 것이다. 농축부산물 원료 배합을 통한 염기 성분 향미 조성

* Corresponding author. Tel.: +82-53-380-3882; Fax: +82-53-380-3795; E-mail: myo@kmi.ac.kr (Yong Ho Seo); kwon@kmi.ac.kr (Taeg Kyu Kwon). This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.



Jacoesidin induces apoptosis through Bax activation and down-regulation of Mcl-1 and c-FLIP expression in human renal carcinoma Caki cells

Seon Min Woo, Taeg Kyu Kwon^{*} Department of Immunology, School of Medicine, Keimyung University, 2689 Daegu-buk-gu, Daegu, 704-701, South Korea

ARTICLE INFO

Article history: Received 27 July 2016; Received in revised form 23 September 2016; Accepted 7 October 2016; Available online 9 October 2016

Keywords: Jacoesidin; Apoptosis; Bax; c-FLIP; Mcl-1; Renal cancer

ABSTRACT

Jacoesidin is a flavonoid isolated from *Artemisia vestita* that has been reported to possess anti-tumor and anti-proliferative activities in many cancer cells. In this study, we investigated the anti-tumor activity of jacoesidin in renal carcinoma cells. Jacoesidin induced apoptosis in multiple human renal carcinoma cells (Caki, ACHN, A875, and 786-O), lung cancer cells (A549) and glioma cells (U251MG). In contrast, jacoesidin does not induce apoptosis in normal human umbilical vein cells (EA.hy926). Apoptotic cell death was associated with the activation of caspase-3 and cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase. Treatment with jacoesidin also caused loss of mitochondrial membrane potential (MMP) and Bax activation, which led to the release of cytochrome c into the cytosol. We also found that jacoesidin down-regulated Mcl-1 and c-FLIP expression at the transcriptional level and that ectopic expression of Mcl-1 and c-FLIP blocked jacoesidin-induced apoptosis. Cumulatively, our results suggest that jacoesidin induces apoptosis in renal carcinoma cells through Bax activation and induces Mcl-1 and c-FLIP expression.

cytochrome c release and loss of mitochondrial membrane potential (MMP) [7]. The loss of mitochondrial membrane potential leads to the activation of caspase-3 and the degradation of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP). However, the study lacks mechanistic insights and the mechanism of action for jacoesidin signaling pathways as anti-cancer agents has not been fully elucidated in renal cancer cells. In this study, we investigated whether jacoesidin induces apoptosis in human renal Caki cells. We found that jacoesidin promoted apoptosis through Bax activation and downregulation of Mcl-1 and c-FLIP expression.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture and materials

Human renal carcinoma (Caki, ACHN, A498, and 786-O), human lung carcinoma cells (A549), and human glioma cells (U251MG) were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). The human umbilical vein cell line (EA.hy926) was a gift from Dr. H. Lee (Yeungnam University, Daegu, Korea). All cells were small cell in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Daegu Korea) containing 10% fetal bovine serum (FBS, GenGen, Daegu, Korea), 20 mM HEPES buffer, 100 U/ml penicillin, 100 U/ml

* Corresponding author. E-mail address: kwon@kmi.ac.kr (T.K. Kwon). http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2016.10.011 0924-2960/© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.



YM155 enhances ABT-737-mediated apoptosis through Mcl-1 downregulation in Mcl-1-overexpressed cancer cells

Seon Min Woo¹ · Kyoung-Jin Min¹ · Bo Ram Seo¹ · Young Ho Seo² · Yong-Jin Jeong^{3,4} · Taeg Kyu Kwon¹

Received: 17 October 2016 / Accepted: 23 December 2016 / Published online: 24 January 2017
© Springer Science+Business Media New York 2017

Abstract ABT-737 is a BH3 mimetic inhibitor of Bcl-xL, Bcl-2, and Bcl-w, and it has been reported for anti-cancer effects in various types of cancer cells. However, ABT-737 fails to induce apoptosis in cancer cell with high levels of Mcl-1 expression. The pharmacological survivin inhibitor YM155 has been reported to induce downregulation of Mcl-1 expression. Therefore, we investigated the effect of YM155 to sensitive resistance against ABT-737 in Mcl-1-overexpressed human renal carcinoma Caki cells. We found that ABT-737 alone and YM155 alone did not induce apoptosis, but YM155 markedly sensitized ABT-737-mediated apoptosis in Mcl-1-overexpressed Caki cells, human glioma cells (U251MG), and human lung carcinoma cells (A549). In contrast, combined treatment with ABT-737 and YM155 did not increase apoptosis in normal mouse kidney cells (TCMK-1) and human mesangial cells (MC). YM155 induced lysosome-dependent downregulation of Mcl-1 expression in Mcl-1-overexpressed Caki cells. In addition,

combined treatment with ABT-737 and YM155 induced loss of mitochondrial membrane potential and inhibited interaction of Bcl-xL and Bax. Taken together, our results suggested that YM155 effectively improves sensitivity to ABT-737 through downregulation of Mcl-1 expression.

Keywords YM155 · ABT-737 · Mcl-1 · Lysosome · Caki cells

Introduction

The Bcl-2 family comprises two groups, including anti-apoptotic and pro-apoptotic proteins. Anti-apoptotic Bcl-2 proteins contain Bcl-2 homology (BH) 1–4 domains (Bcl-2, Bcl-xL, and Mcl-1). Pro-apoptotic Bcl-2 proteins contain BH1–3 domains (Bax and Bak) and BH-only domain (Bcl, Bid, Bim, PUMA, and NOXA) [1, 2]. Many types of cancer are resistant to apoptosis through upregulation of anti-apoptotic Bcl-2 proteins [3, 4]. ABT-737 has been developed as a small-molecule BH3 mimetic that inhibits Bcl-2, Bcl-xL, and Bcl-w with high affinity, eventually inducing apoptosis in cancer cells [5], but ABT-737 binds to Mcl-1 with much lower affinity. Therefore, cancer cells with persistent expression of Mcl-1 are resistant to ABT-737-induced apoptosis [6, 7]. Previous studies have shown that combined treatment with ABT-737 and other drugs appear anti-cancer effect through decrease of Mcl-1 expression in various cancer cells including leukemia [8], melanoma cells [9], colorectal cancer cells [10] and hepatocellular carcinoma cells [11]. In our previous study, celecoxib overcomes ABT-737 resistance via downregulation of Mcl-1 expression and upregulation of Bim expression in human renal cancer cells [12].

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11010-016-2938-0) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Taeg Kyu Kwon
kwonk@dsmc.ac.kr

¹ Department of Immunology, School of Medicine, Keimyung University, 2800 Dalgubeoldaro, Daeseo-Gu, Daegu 704-701, South Korea

² College of Pharmacy, Keimyung University, 2800 Dalgubeoldaro, Daeseo-Gu, Daegu 704-701, South Korea

³ Department of Food Science and Technology, Keimyung University, 2800 Dalgubeoldaro, Daeseo-Gu, Daegu 704-701, South Korea

⁴ KMF Co., Ltd., Yuram-ro, Dong-gu, Daegu 41065, South Korea



Comparison of quality characteristics of *Doenjang* reduced of sodium content

Mi-Yeon Kim¹, Mina Kim¹, Ji Hong Hwang¹, SunHwa Kim², Yong-Jin Jeong^{1,3*}
¹KMF Co., Ltd., Daegu 41065, Korea
²Department of Food Science and Technology, Keimyung University, Daegu 42403, Korea

나트륨 저감화에 따른 된장의 품질 특성

김미연¹ · 김민아¹ · 황지홍¹ · 김선화² · 정용진^{1,3*}
(주)케이엠에프, ²계명대학교 식품기능학과

Abstract

Although *Doenjang* is a representative traditional fermented food in Korea, made mainly from soybeans, it has been classified into a food group identified as having high sodium in the National Health and Nutrition Examination. It is necessary to develop a low sodium *Doenjang* to prevent the excessive sodium intake which may cause various diseases. However, the development of *Doenjang* with low sodium, without significant changes on quality, is an ongoing challenge. Therefore, the experiment was designed to reduce the salt content of the soaking water to 12.5–45%. The pH, salinity, moisture, sodium, color, amino-type nitrogen, free amino acids and constituent amino acids composition of *Doenjang* were investigated to determine the effect of this salt reduction on the sensory quality of *Doenjang*. The reduction of sodium did not affect the pH, moisture and salinity, and this changed maintained the same range as the control. The sodium content was reduced proportionally, and the amino acid nitrogen level was 500 mg%. Therefore, this study considered that a reduction of 25% of salt in the soaking water does not affect the quality of the *Doenjang* while reducing the sodium content of the final *Doenjang*.

Key words *Doenjang*, salt, sodium content, quality characteristics

서론

세계보건기구(WHO) 일일 나트륨 권장섭취량은 2000 mg(수증으로 약 5 g)으로 권장하고 있으나(1), 국민건강영양조사에 따르면, 국내의 2010년 하루 평균 나트륨 섭취량은 4,785 mg, 2012년 4,546 mg, 2014년 3,800 mg으로(2) WHO 권장섭취량 기준의 2배 수준을 나타냈다(3). 또한, 30세 이상의 고혈압 유병률은 2007년 24.6%에서 2008년 26.9%, 2009년 30.3%로 매년 증가세로, 과다한 나트륨의 섭취는 고혈압, 허혈성 등의 다양한 만성질환의 원인이 될

수 있다는 연구는 계속 되어오며(3-5), 고혈압 질환비율은 인구 10만 명당 191명으로 OECD 4위를 나타냈다. 이에 국가적으로도 나트륨 섭취를 줄이기 위해 다양한 노력을 기울이고 있다. 나트륨 과잉섭취를 줄이기 위해 가공식품 제조, 음식조리 및 소금과 염화 등 모든 단계에서 나트륨 섭취량 저감 추진이 필요하며(6), 나트륨이 저감된 식품의 세계시장도 성장세로, SA정원의 규모를 가늠하는 것으로 추정되며 매년 그 시장이 성장하고 있는 추세이며(7), 해외에서도 저감의 정책들 적극 실시하여 일본에서는 2015년부터 “소금을 줄여도 맛있는 식품 만들기에” 식품업체의 동향을 유도하고 있다(7). 또한, 권장섭취량은 1970년대부터 30년 동안 꾸준한 나트륨 저감의 정책을 추진하여 나트륨 섭취량을 약 60% 감소시키는데 성공하였다(8). 캐나다, 미국을 비롯하여 미국, 싱가포르 등 여러 국가에서 나트륨 줄이기 사업을 국가적으로 시행하고 있으며, 우리나라 또한 한국 식품의약품안전처에서 “가공식품 분야 나트륨 저감화”를

*Corresponding author. E-mail: yjjeong@kmm.ac.kr
Phone: 82-53-584-6323, Fax: 82-53-584-6324
Received 31 August 2017; Revised 24 October 2017; Accepted 30 October 2017.
Copyright © The Korean Society of Food Preservation. All rights reserved.

Korean Society
for
Chemical Senses and Ingestive Behavior
2017 Spring Symposium
DGIST
June. 2(Fri) ~ 3(Sat) .17

Umami peptide directly binds to N96 and P44, a predicted negative allosteric site of hTAS2R16 bitter taste receptor

Yiseul Kim, Eun-Young Kim, Jae-Ho Park & Mee-Ra Ryu
Korea Food Research Institute, Gyeongsang-do 31539, Korea

The interactions among taste modalities, sweet, sour, bitter, salty, and umami, have long been suggested by psychophysical and neurophysiological studies, yet few studies have attempted to address this issue using taste receptors. We previously indicated that umami peptide effectively reduces salicin-induced intracellular Ca^{2+} influx in cells expressing hTAS2R16 using Ca^{2+} -flux signaling assay. This provides potential insights into multi binding sites for bitter-inherent ligand and another heterologous umami tastant in bitter taste receptors. Herein, we performed point mutation analysis to define whether of umami active peptide directly binds to hTAS2R16 as a negative allosteric modulator. Because acidic pH was demonstrated as one of the critical factors responsible for the bitterness-reducing in cells expressing bitter taste receptor, we controlled pH to exclude acidic pH influence from umami peptides in all assay systems. Probenecid is a negative allosteric modulator of salicin, an orthosteric ligand for hTAS2R16. Two known probenecid-insensitive mutants hTAS2R16 N96T and P44T were thus selected for experimental testing. As expected, salicin activated N96T mutant and no significant attenuation of salicin-induced Ca^{2+} response by probenecid was observed. Like probenecid, umami peptide negatively modulates hTAS2R16 wild type activation by salicin, but no significant changes in the N96T mutant and P44T mutant. This provides evidence that a potential multi binding sites at least for umami peptide and bitter ligand in hTAS2R16 bitter taste receptor. Supported by IPEP grant GA160200-02 and NRF grant GN170100-01.

전통식품의 나트륨 저감화 및 제품 개발 전략

- 일시_2017년 7월 14일(금) 13:30~17:45
- 장소_대구한의대학교 학술정보관 104호 시청각실

주최: 한국식품저장유통학회
The Korean Society of Food Preservation

후원: (사)한국전통가공식품협회 WiKim 세계김치연구소 Crac 경북발효식품수출농업기술지원단
 한국식품연구원 (성주군, 청도군, 칠곡군) IPET 농림식품기술기획평가원

심포지엄 프로그램

- 일시 : 2017년 7월 14일(금)
- 장소 : 대구한의대학교 학술정보관 104호 시청각실
- 주제 : 전통식품의 나트륨 저감화 및 제품 개발 전략
- 주최 : (사)한국식품저장유통학회
- 후원 : (사)한국전통가공식품협회, 세계김치연구소, 경북발효식품수출농업기술지원단, 어린이급식관리지원센터(성주군, 청도군, 칠곡군), 농림식품기술기획평가원

□ 세부 프로그램

제1부 전통식품의 나트륨 저감화 동향

13:30~13:45	등록	
13:45~14:00	개회사: 신승필 (한국식품저장유통학회 회장) 축사: 이영화 (대구한의대학교 부총장)	좌장 : 이연경 교수 (경북대학교)
14:00~14:30	발표주제: 전통식품의 나트륨 저감화 정책 방향 발표자: 손익재 주무관 (식품의약품안전처)	
14:30~15:00	발표주제: 전통식품 저염제품에 대한 홍보 마케팅 발표자: 박승신 사무국장 (한국전통가공식품협회)	
15:00~15:30	발표주제: 판매인지 원리와 나트륨 저감화 방안 발표자: 류미라 박사 (한국식품연구원)	
15:30~15:45	Coffee Break	

제2부 나트륨 저감화 실용화 기술 지원 방안

15:45~16:15	발표주제: 식물성 나트륨 저감화 소재 개발 현황과 활용방안 발표자: 김미연 박사 ((주)KMF)	좌장 : 권중호 교수 (경북대학교)
16:15~16:45	발표주제: 김치류의 나트륨 저감화 방안과 품질 향상 발표자: 서혜영 박사 (세계김치연구소)	
16:45~17:15	발표주제: 전통 강류 나트륨 현황과 저감화 기술지원 발표자: 정용진 교수 (계명대학교)	
17:15~17:45	토론 및 대화회(한학춘)	

2. 특허

관련생략

출원번호통지서

출원일자 2017.12.20
특기사항 실시청구(유) 공개신청(무) 출원번호(1063289)
출원번호 10-2017-0176383 (접수번호 1-1-2017-1272939-16)
출원인명칭 주식회사 케이엠에프(1-2002-042415-9)
대리인성명 특허법인이플리온(9-2016-100061-5)
발명자성명 정용진 김미연 장세영 황지홍
발명의명칭 대체재 및 염미성 용 발효물을 활용한 나트륨 저감화 된장의 제조 방법

특허청장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 등록된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호: 0131(가관코드) - 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고려번호 정보변경(경정), 경정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
※ 특허청(www.kipo.go.kr) 접속 - 민원서비스(문의) - 특허청 서명유지 및지킴이서비스
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
※ 제도 안내: <http://www.kipo.go.kr>-특허/미양-PCT/마드리드
※ 우선권 인정기간: 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내
※ 미국특허상표청의 선출원권 기호로 우리나라에 우선권주장 출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선권일부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자특고출원가서(PTO 58.39)]를 발송하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 의무에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련 법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 출원인이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효 사유가 될 수 있습니다.
8. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

3. 기술실시

[별지 13의2]		기술실시보고서				(단위 : 원)	
연구개발과제 현황	사업명	고부가가치식품기술개발사업	연구과제번호	809088-2			
	연구과제명	농축 부산물을 활용한 산업을 원료소재 개발 및 산업화					
	연구기관명	㈜케이엠에프	연구책임자	정용진	참여기업명	㈜케이엠에프	
	연구협약일	2016년 07월 07일	연구기간	2016.07.07~2017.12.31			
기술실시계약 및 성과활용 현황	연구개발비	정용출연료	기타()	계		444,000	
	계약(활동)명	대우와 군유연료 이용한 원료소재가 천연소재 및 그 제조					
	계약(활동)일	2017.09.27~		실시(활동)기간	2017.09.27~		
	계약(활동)종류	노하우		실시(활동)유형	직접 실시		
기술실시계약 및 성과활용 현황	명칭	번호		일자			
	기관명	㈜케이엠에프	기관유형	중소기업			
	주소	대구시 동구 동암로 12	대표자	정용진			
	사업자번호	809-81-87184	전화번호	053-584-8523			
기술실시계약 및 성과활용 현황	실시(활동)기관	주최(출연)동료인 경우		일자			
	사업자번호	대표자		전화번호			
	사업자명	사업자명		사업자명			
	사업자명	사업자명		사업자명			
기술실시계약 및 성과활용 현황	기술료	2017.08.09		3,898,000			
	기술료	2017.11.29		18,000,000			
	기술료	계		3,898,000			
	기술료	계		3,898,000			
기술실시계약 및 성과활용 현황	기술료	2017.08.09		3,898,000			
	기술료	2017.11.29		18,000,000			
	기술료	계		3,898,000			
	기술료	계		3,898,000			
<p>국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제22조 제2항에 따라 위와 같이 기술실시계약이 체결되었음을 보고합니다.</p> <p>붙임 1. 기술실시계약서 사본 1부(타기관으로 기술이전시) 2. 지적재산권을 포함하는 기술이전인 경우 해당 증빙자료(특허 등록증, 출원증 등) 1부 (타기관으로 기술이전시) 3. 연구개발과제협약서 사본 1부(직접실시시).</p> <p>2017년 8월 10일 주관연구기관 (주)케이엠에프 의 대표 농림수산식품기술기획평가원장 귀하</p>							

4. 박람회



5. 컨설팅 및 지도



제6장. 목표달성도 및 관련분야 기여도

코드번호 D-06

제1절. 목표달성도

구분	연구개발목표	가중치(%)	연구개발 수행내용	달성도(%)		
1 세 부	1년차 (2016)	관능평가를 통한 최적 가수분해물 배합비의 선정	40	1) 식물성 및 동물성 원료의 배합을 통한 가수분해물 조제 2) 품질특성 분석을 통한 최적 배합비의 선정	100	
		최적 가수분해물의 생산 조건 설정	40	1) Lab scale에서의 생산 호소 설정 2) 제조공정별 품질 평가 3) 염미성 펩타이드 조성물로서의 표준화 지표 설정 4) Pilot scale에서의 생산 및 품질 평가 5) 염미기능 평가 : <i>in vivo</i> 관능검사	100	
		저염 펩타이드 조성물 홍보	20	1)식품 및 첨가물 국내외 박람회 참가로 제품 홍보	100	
	2년차 (2017)	최적 가수분해물의 대량생산 조건 설정	30	1) Mass scale에서의 시생산 3회를 통한 품질 평가 기준 확보 2) Mass scale에서의 표준공정 설정 3) 염미성 펩타이드의 원료로써의 표준지표 설정	100	
		최적 조성물의 안전성 평가	20	1)설치류 대상 1회 단일 투여 허용치 LD50 값 평가로 조성물의 독성 평가(GLP기관)	100	
		염미 증강 펩타이드 활용 제품 개발	50	1) 염미 증강 펩타이드 함유 조성물 제품 사업화 2) 소금 대체 소재 적용 저염 전통 장류 제품 개발 3) 소금 대체 소재 적용 저염 전통 김치 및 절임류 제품 개발 4) 소금 대체 소재 적용 일반 가공품 개발 5) 저염펩타이드 함유 제품의 특허 출원 및 제품 홍보	100	
	1 협 동	1년차 (2016)	1. 염미성 펩타이드의 데이터 베이스 구축	50	1) Nanosep을 이용하여 SAP(1 mg/ml)을 3kDa보다 큰 사이즈와 작은 사이즈로 분리하여 전기영동 후 Coomassie brilliant blue(CBB)염색으로 확인	100
			2. 염미성 펩타이드 합성 전략 기	50	1) HPLC 분리능을 개선하기 위해서 염미성 펩타이드시료 SAP(1 mg/ml)를 Nanosep을 이용하여 분리	100

		술 개발		된 3kDa 보다 작은 시료에 benzyl bromide를 처리 2) 표준시료중 하나인 L-Lys-Gly-OH에 동일한 조건하에 benzyl bromide 처리	
2년차 (2017)		1. 염미성 펩타이드 구조분석 및 합성기술 개발	40	1) 고체상 펩타이드 합성법을 통해 염미성 펩타이드 합성 2) 합성된 염미성 펩타이드의 특성 규명(분자량, 용해도 등등)	100
		2. 염미성 펩타이드 분석법 개발	60	1) 염미성 펩타이드 분석법 - TLC, LC-MS/MS를 이용한 지표 성분 분석 및 밸리데이션 2) 펩타이드 분석법 밸리데이션 보고서 작성	100
2 협 동	1년차 (2016)	1. 염미성 펩타이드의 맛 수용체 활성화 작용 평가	40	1) 산성 펩타이드로 유발되는 pH 변화 효과 배제를 위한 assay 조건 최적화	100
				1) TRPV1 수용체 작용제로서의 효능 평가	100
				1) CaSR 수용체 작용제로서의 효능 평가	100
		2. 지미성 펩타이드에 대한 맛 수용체 활성화 작용 평가	60	1) TRPV1 수용체 작용제로서의 효능 평가	100
				1) CaSR 수용체 작용제로서의 효능 평가 · 지미성 펩타이드(ED 등)는 CaSR 활성화에 관여함	100
	2년차 (2017)	1. 맛 수용체 발현 세포모델에서의 활성 펩타이드의 작용 평가	40	1) 펩타이드의 TRPV1 맛 수용체 활성화 작용 평가	100
1) 펩타이드의 CaSR 맛 수용체 활성화 작용 평가				100	
2. 염미성 펩타이드의 맛 상승 메카니즘 도출		60	1) 활성 펩타이드의 미각수용체 작용 모델 제시 2) 작용 메카니즘에 근거한 소재의 활용방안 제시	100 100	

제2절. 관련분야 기여도

- 세계적으로 경쟁력 있는 염미증강소재의 부재에 따라 농·축부산물을 활용하여 발효공법을 적용하여 발효 전후의 유리아미노산 함량이 증가 되는 것을 확인하였으며, 염미기능과 고쿠미, 감칠맛을 증대 시켜주는 아미노산인 글루탐산, 아스파르트산, 라이신, 히스티딘, 아르기닌의 함량 및 펩타이드 증가를 확인
- KCL와 같이 쓴맛을 가지는 화학적 염미 대체제와 L-라이신, L-글루탐산 등 염미 부스팅에 효과가 있다고 알려진 합성 펩타이드와 달리 천연원료에서 발효기술을 접목하여 만든 천연

펩타이드 조성물은 짠맛을 유지하면서 감칠맛을 느끼게 해주며 화학적 염미대체제의 쓴맛을 마스킹해 줄 수 있으므로, 이를 활용한 다양한 제품들은 경제성이 매우 높을 것으로 생각됨.

- 중소기업생산 김치류와 장류는 주로 업소에 공급하고 있어, 외식, 급식에서의 나트륨 저감화에 중요한 비중을 차지함으로 개발된 염미펩타이드를 중소기업에서 생산되는 김치류, 장류, 절임류 제품에 적용함에 따라 저염 제품에 대한 시장변화가 일어날 것으로 예상됨
- 아밀로라이드 비감수성 이온채널의 하나로 추정되고 있는 TRPV1 (Transient receptor potential cation channel, subfamily V member 1) 수용체 및 감칠맛 증강 효능을 나타내는 물질의 수용체로 알려진 CaSR (Calcium sensing receptor)에 대한 염미 펩타이드의 작용메커니즘을 구명함에 따라 타사 염미증강 소재 대비 경쟁력 확보
- 과학적으로 염미증강 펩타이드의 분석기술 및 기준 규격을 설정함에 따라 과학적 근거의 뒷받침으로 글로벌 시장에서 경쟁력을 확보

제7장. 연구결과의 활용계획

코드번호

D-07

- 당뇨병자, 고혈압환자, 신장병환자 등 환자 식이 및 저염 다이어트 식이에 식물성 염미성 펩타이드 적용해 저염 식단 제공 가능
 - 나트륨은 체내 혈류량을 높이며 혈압을 높게 하며 신장병 환자는 나트륨 조절이 불가능하므로 저염식 또는 무염식이 필요함
 - 짠맛과 감칠맛을 유지할 수 있는 천연 염미성 펩타이드를 활용해 환자들에게 저염식 제공이 가능해짐
 - 최근 나트륨과 건강에 대한 관심으로 저염식 다이어트가 유행

- 염미성 펩타이드를 활용하여 천연소스 및 복합조미식품 제조
 - 시중 판매되고 있는 소스류 제품에서의 염분함량은 15~22.3% (농림축산식품부, 2016)
 - 찌개, 국, 무침, 조림 등의 요리방법과 김치, 라면, 국물요리 등의 나트륨 함량이 높은 식품이 주 식생활이므로 나트륨이 저감화 된 천연소스 및 복합조미식품의 개발 수요가 늘어남

- 저염 젓갈 제조에 염미성 펩타이드 활용
 - 건강 지향적인 식품을 선호하는 경향과 더불어 식염이 성인병을 가져오는 원인의 하나라는 것이 규명되면서 소비자들은 고식염의 젓갈제품을 기피하고 있는 추세
 - 전통 젓갈은 자기소화에 의한 아미노산 등이 생성되어 감칠맛이 생성되지만, 저염 젓갈은 낮은 염도로 인해 원료에 조미료를 가하여 감칠맛을 생성
 - 이러한 저염 젓갈에 염미성 펩타이드를 활용해 나트륨 저감과 함께 감칠맛 상승

- 염미성 펩타이드를 활용한 학교급식 저염화 식단
 - 학교급식에서 잔반율을 감안한 1인 1회 나트륨 섭취량은 여중생은 1,566mg, 남중생 1,565mg, 여고생 1,479mg, 남고생 2,302mg 으로 한국인 영양섭취기준의 충분 섭취량에 근접하거나 초과 섭취함으로 인해 나타나는 질병을 예방하기 위해 급식에 사용하는 장류, 김치 등 소금 대신에 염미성 펩타이드를 활용해 청소년의 나트륨 섭취량 저감화를 하여 성인병 예방

- 염미성 펩타이드 활용한 나트륨 저감화 가공식품 개발
 - 해외에서도 건강에 대한 관심이 높아지면서, 남아공에서는 가공식품 내 나트륨 함유량을 저

감하는 규제 법안을 발안하였음.

- 현대인의 삶에 중요해진 가공식품에는 나트륨 함량이 높아 식약처에서 저염화를 위한 법규 마련 염미성 펩타이드를 활용해 저염 된장, 간장, 김치, 절임류의 나트륨함량 저감화가 가능

○ 염미성 펩타이드 활용한 가정간편식(HMR) 저염레시피 개발

- 가정간편식 시장 규모는 최근 1인 가구가 증가함에 따라 덩달아 증가했음. 한국 농식품유통 교육원 발표 자료에 의하면 2010년 7700억원에서 2014년에는 1조 7000억원, 2017년에는 3조 원까지 확대되었음.
- 가정간편식이 조금 더 균형 잡힌 건강한 한 끼 식사로 제공될 수 있도록 염미성 펩타이드를 활용해 맛은 그대로지만 나트륨은 저감화된 저염레시피 개발

○ 식약처의 나트륨 저감화 사업 및 국내·외 기업의 저염화를 사업과 연계하여 나트륨 저감화 교육 및 컨설팅

제8장. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

코드번호

D-08

- 일본 월간 푸드케미칼 2017년 4월호에 나트륨 저감화에 대한 기사가 나옴
- 신아로 사에서는 효모를 베이스로 하여 다양한 식품 유형에 맞는 염대소재를 개발 및 판매를 하고 있음

フードケミカル
月刊 2017 4 384

特集1 おいしい減塩プロジェクトⅣ
特集2 ifia事前特集
特集3 無添加VS添加物配合食品

世界的食品・原材料・添加物トピックス
未来のキッチンでの料理とは?〈後編〉

PICK UP!
編集部イチ押し

最新技術情報
酸化防止剤ヤマモモ抽出物①

BASFジャパン(株) 植物ステロールエステル③
イングレディオン・ジャパン(株) 低糖質食品向けレジスタントスターチ

ifia JAPAN

<일본 월간 푸드케미칼 2017년 4월 호>

Same Salt Taste,
50% Less Sodium

SALT REPLACER NK S

50% Less Sodium than Salt

Same Salt Taste with no metallic aftertaste

Safe Allergen-free* GMO-free*

In 2013, World Health Organization (WHO) issued a guidance recommending adults to consume less than 2,000mg of sodium (5g of salt) per day.

Over 75% of the salt consumed is said to come from processed foods.

The development of sodium reduced foods is crucial to lower sodium intake world-wide.

For Sauces For Meat Products For Soups For Snacks

OCAWA

*According to FDA

<신아로 사의 염대소재 브로슈어>

제9장. 연구개발결과의 보안등급

코드번호	D-09
------	------

○ 일반

「국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」 제24조의4(분류기준)제1항에 해당하지 않음

제10장. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

해당사항 없음

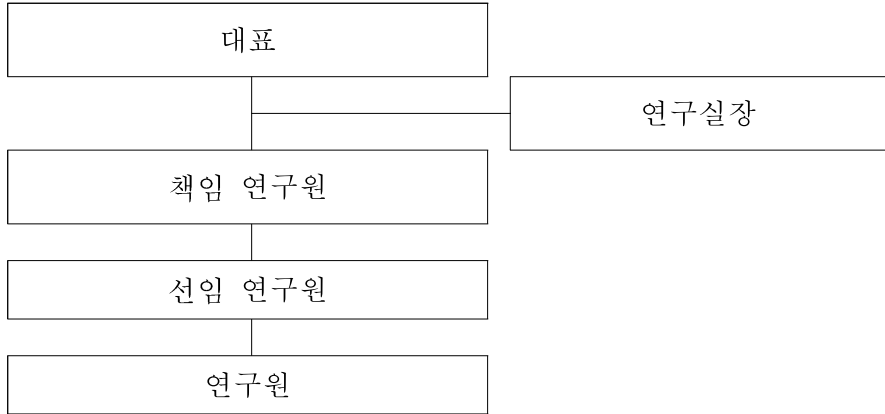
제11장. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

코드번호 D-11

○ 기술적 위험요소 분석
해당 없음

○ 안전관리대책

1. 연구실 안전관리 전담 조직 구성



2. 참여연구원의 안전 및 연구 내용 보안 관련 교육 시행 안전교육

- 교육대상 : 전체 연구원
- 교육시간

교육과정	교육대상	교육시간	비고
정기교육	전체 연구원	매달 2시간 이상	자체교육

3. 보험가입

구 분	내 용
보험	산업재해보험
보상 기준	업무상 재해로 연구활동종사자가 부상, 질병, 신체장해, 사망 등 생명 및 신체상의 손해발생시 보상

4. 연구실 안전점검

○ 안전점검의 종류

종 류	일상점검	정기점검
실시시기	매일 1회	연간 1회
대 상	전체연구실	전체연구실
점 검 자	사용자	자체점검

○ 안전점검의 내용

구분	내용	비고
1) 연구실 안전관리규정	연구실 안전관리규정 비치	
2) 화학약품 관리	연구실별 보유 화학약품 등록 및 폐기 관리	
3) MSDS 관리	연구실별 보유 화학약품의 MSDS 비치	
4) 실험폐기물 관리	실험폐기물처리 준수사항 이행 및 위탁처리 관리	
5) 연구실험실 배치도 관리	주요 연구실험실 배치도 작성 관리	
6) 연구실험실 유해물질 관리	유해물질농도 측정	
7) 연구실험실 환기 등 연구환경 개선	연구실험실 환기 등 연구환경 개선공사 시행	
8) 연구실험실 안전관리수칙 작성	연구실험실 안전수칙 보완 설치	
9) 안전보호장비 시설 보완	안전보호장비와 안전표지 설치	
10) 개인보호구 지급	개인보호구 지급	

5. 연구원 건강검진

- 건강검진 실시 계획
 - (1) 일 정 : 매년 1회 실시
 - (2) 대 상 : 연구원
 - (3) 검진내용 : 일반건강검진 및 특수건강검진

제12장. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	논문	나트륨 저감화에 따른 된장의 품질 특성	(주)케이엠 에프	교신저 자	대한민국	비	2017.10.31	단독사사	비SCI
2	논문	Identification of a key umami-active fraction in modernized Korean soy sauce and the impact thereof on bitter-masking	한국식품 연구원	교신 저자	Food Chemistry/ 미국	1.529	2017.10.15	중복사사	SCI
3	논문	YM155 enhances ABT-737-mediated apoptosis through Mcl-1 downregulation in Mcl-1-overexpress ed cancer cells.	계명대학 교	교신저 자	Molecular and Cellular Biochemist ry/ 미국	2.669	2017.01.01	중복사사	SCI
4	논문	HPLC와 NMR를 이용한 염미성 펩타이드 분석방법 검증	계명대학 교	교신저 자	Journal of Life Science/ 대한민국	-	2017.11.01	단독사사	비SCI
5	논문	Chalcone-templated Hsp90 inhibitors and their effects on gefitinib resistance in non-small cell lung cancer (NSCLC)	계명대학 교	교신저 자	Archives of Pharmacal Research/ 미국	2.324	2016.10.10	중복사사	비SCI (SCIE)

제13장. 기타사항

코드번호

D-13

해당없음

제14장. 참고문헌

코드번호	D-14
Brown IJ, Tzoulaki I, Candeias V, Elliott P (2009) Salt intakes around the world: implications for public health. <i>Int J Epidemiol</i> 38, 791-813.	
Chobanian AV, Hill M (2000) National Heart, Lung, and Blood Institute Workshop on Sodium and Blood Pressure: a critical review of current scientific evidence. <i>Hypertension</i> 35, 4, 853-863	
Choi SY, Choi MJ, Lee JJ, Kim HJ, Hong SS, Chung KS, Lee BK (1999) Growth suppression effect of traditional fermented soybean paste(<i>Doenjang</i>) on the various tumorcells. <i>J. Korea Soc. Food Sci. Nutr.</i> 28, 458-463	
Harth L, Krah U, Linke D, Dunkel A, Hofmann T, Berger RG. 2016. Salt Taste Enhancing l-Arginyl Dipeptides from Casein and Lysozyme Released by Peptidases of Basidiomycota. <i>J. Agric. Food Chem.</i>	
He J, Oqden LG, Vupputuri S, Bazzano LA, Loria C, Whelton PK (1999) Dietary sodium intake and subsequent risk of cardiovascular disease in overweight adults. <i>JAMA</i> 282, 21, 2007-2034	
Hugli TE, Moore S (1972) Determination of the tryptophan content of proteins by ion exchange chromatography of alkaline hydrolysates. <i>J Biol Chem</i> 247, 2828-2834	
Jang YJ (2013) Current status and implications of domestic and overseas sodium reduction policy, Issues and Issues, National assembly research service, 31-9735025-000625-14	
Jung BM, Roh SB (2004) Physicochemical quality comparison of commercial doenjang and traditional green tea doenjang. <i>Korean J Food Sci Nutr</i> , 33, 132-139	
Katsumata, T., Nakakuki, H., Tokunaga, C., Fujii, N., Egi, M., et al. 2008. Effect of Maillard reacted peptides on human salt taste and the amiloride-insensitive salt taste receptor (TRPV1t). <i>Chemical Senses</i> , 33: 665 - 680.	
Kesteloot, H. and Joossens, J. V. 1988. Relationship of dietary sodium, potassium, calcium, and magnesium with blood pressure. <i>Belgian Interuniversity Research on Nutrition and Health. Hypertension</i> 12, 594-599.	
Kil, G. Y. and Jin, S. Y. 2015. A survey of awareness and preference for MSG according to the pursuit of well-being in diet. <i>J. Kor. Soc. Food Cult.</i> 30, 481-490.	
Kim HJ (2014) Sodium intake status in Korea and plan for improvement of sodium intake estimation in the Korea national health and nutrition examination survey, <i>Public health weekly report</i> , KCDC, 7, 20, 425-430	
Kim JD, Choi M, Ju JS (1995) A study on correlation between blood pressure and dietary Na, K intakes pattern in the family members of normal and cerebrovascular disease patients. <i>J. Korean Soc. Food. Nutr.</i> 24: 24-29	
Kim JG (2004) Changes of Components Affecting Organoleptic Quality during the Ripening of Traditional Korean Soybean Paste Amino Nitrogen, Amino Acids, and Color. <i>J Fd Hyg Safety</i> 19, 1, 31-37	
Kim JW, Kim YS, Jeong PH, Kim HE, Shin DH (2006) Physico-chemical Characteristics of Traditional Fermented Soybean Products Manufactured in Folk Villages of Sunchang Region. <i>J. Food Hygiene Safe</i> 21, 223-230	
Kim M, Son H, Kim Y, Misaka T, Rhyu M. 2005. Umami-bitter interactions: The suppression of bitterness by umami peptides via human bitter taste receptor. <i>BBRC</i> 456: 586 - 590	

- Kim SH, Jeong YJ (2016) Domestic and International Trends in Sodium Reduction and Practices Food Science and Industry, 49, 2, 25-33
- Kremer, S., Mojet, J. and Shimojo, R. 2009. Salt reduction in foods using naturally brewed soy sauce. J. Food Sci. 74, 255-262.
- Ku KH, Park KM, Kim HJ, Kim YS, Koo MS (2014) Quality characteristics of *Doenjang* by aging period. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 43, 720-728
- Kuroda M, Kato Y, Yamazaki J, Kai Y, Mizukoshi T, Miyano H, Eto Y. 2013. Determination and quantification of the kokumi peptide gamma-glutamyl-valyl-glycine, in commercial soy sauces. Food Chem. 141(2): 823-828.
- Lee PB. (2014) Chemical properties of low-salt commercial *Doenjang* and anti-oxidation of traditional doenjang. MS Thesis. Gyeongnam National University of Science and Technology, Changwon, Korea
- Li X, Staszewski L, Xu H, Durick K, Zoller M, Adler E. 2002. Human receptors for sweet and umami taste. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:4692 - 96
- Lyll, V., Phan, T. H., Mummalaneni. S., Melone, P., Mahavadi, S., et al. 2009. Regulation of the benzamil-insensitive salt taste receptor by intracellular Ca²⁺, protein kinase C, and calcineurin. Journal of Neurophysiology, 102: 1591 - 1605.
- Lyll, V., Phan, T. H., Ren, Z., Mummalaneni, S., Melone, P., et al. 2010. Regulation of the putative TRPV1t salt taste receptor by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. Journal of Neurophysiology, 103, 1337 - 1349.
- Maruyama Y, Yasuda R, Kuroda M, Eto Y. 2012. Kokumi substances, enhancers of basic tastes, induce responses in calcium-sensing receptor expressing taste cells. PLoS One. 7(4): e34489.
- MFDS (2016) Sodium reduction manual for the food industry(*Doenjang*), Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju, Korea
- MFDS (2016) Sodium reduction report for the food industry (*Doenjang*), Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju, Korea, p16-18
- Mok C, Song K, Lee JY, Park YS, Lim S (2005) Changes in microorganisms and enzyme activity of soybean paste (*Doenjang*) during fermentation. Food Eng. 9, 112-117
- Ogawa, T., Nakamura, T., Tsuji, E., Miyanaga, Y., Nakagawa, H., Hirabayashi, H. and Uchida, T. 2004. The combination effect of L-arginine and NaCl on bitterness suppression of amino acid solutions. Chem. Pharm. Bull. 52, 172-177.
- Park BJ, Jang KS, Kim DH, Yook HS, Byun MW (2002) Changes of microbiological and physicochemical characteristics of *Doenjang* prepared with low salt content and gamma irradiation. Kor. J. Food Sci. Technol. 34, 79-84
- Park HJ, Lee MY, Yoon EK, Chung HY (2016) Sodium reduction in traditional fermented foods. Food Sci Ind, 49, 2, 34-44
- Park JY, Kim MY, Jeong YJ (2016) Changes in the quality characteristics of porcine blood under various enzyme hydrolysis conditions. Korean J Food Preserv, 23, 3, 413-421
- Park, SK, Seo KI, Choi SH, Moon JS, Lee YH (2000) Quality assessment of commercial *Doenjang* prepared by traditional method. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 29, 211-217
- Powles, J., Fahimi, S., Micha, R., Khatibzadeh, S., Shi, P., Ezzati, M., Engell, R. E., Lim, S. S., Danaei, G. and Mozaffarian, D. 2013. Global, regional and national sodium intakes in 1990 and 2010: a systematic analysis of 24 h urinary sodium excretion and dietary surveys worldwide.

- BMJ open 3, e003733.
- Ritz, E., Koleganova, N. and Piecha, G. 2009. Role of sodium intake in the progression of chronic kidney disease. *J. Ren. Nutr.* 19, 61-62.
- S. Arai, M. Yamashita, M. Fujimaki, 1972. Glutamyl oligopeptides as factors responsible for tastes of a proteinase-modified soybean protein, *Agric. Biol. Chem.* 36: 1253 - 1256.
- S. Arai, M. Yamashita, M. Noguchi, M. Fujimaki, 1973. Tastes of L-glutamyl oligopeptides in relation to their chromatographic properties, *Agric. Biol. Chem.* 37: 151 - 156.
- Servant G, Tachdjian C, Tang X, Werner S, Zhang F, et al. 2010. Positive allosteric modulators of the human sweet taste receptor enhance sweet taste. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107:4746 - 51
- Shigemura R, Podgurski C, Kitisin B, Ward J, Alatorre A. 2010. Compositions comprising sweetness enhancers and methods of making them. PCT Patent Appl. No. WO2010/014813 A2
- Shim J, Son H, Kim Y, Kim K, Kim J, Moon H, Kim M, Misaka T, Rhyu M 2015. Modulation of sweet taste by umami compounds via sweet taste receptor subunit hT1R2. *PLoS One* 10(4): e0124030.
- Shin YH (2012) Development trend of foreign sodium reduced food, *KHIDI Brief*, 45, 1-8
- Van Der Klaauw, N. J. and Smith, D. V. 1995. Taste quality profiles for fifteen organic and inorganic salts. *Physiol. Behav.* 58, 295-306.
- Vigues S, Dotson CD, Munger SD. 2009. The receptor basis of sweet taste in mammals. In *Chemosensory Systems in Mammals, Fishes, and Insects: Results and Problems in Cell Differentiation*, ed. S Korsching, W Meyerhof, pp. 1 - 16. Berlin: Springer-Verlag
- Wang M, Yao Y, Kuang D, Hampson DR. 2006. Activation of family G-protein-coupled receptors by the tripeptide glutathione. *J. Biol. Chem.* 281(13): 8864-8870.
- World Health Organization (2003) *Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases* (WHO Technical report series, No. 916). Geneva, World Health Organization Press.
- Yamaguchi, S. and Ninomiya, K. 2000. Umami and food palatability. *J. Nutr.* 130, 921S-926S.
- Yoon KH, Shin HY (2010) Medium optimization for the protease production by *Bacillus licheniformis* isolated from *Cheongkookjang*. *Kor J Microbiol Biotechnol* 38, 385-390
- Yoon, E. K. 2015. Policy Trends of sodium reduction. *Food Ind. Nutr.* 20, 6-7.