

국내산 농산물로부터 고부가 천연 조미소재 Kokumi 개발  
(Development of natural seasoning kokumi using domestic  
agricultural products)

샘표식품(주)

농림수산식품부

# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “국내산 농산물로부터 고부가 천연 조미소재 kokumi 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2010년 5월 29일

주관연구기관명 : 샘표식품(주)  
주관연구책임자 : 허 병 석  
세부연구책임자 : 허 병 석  
연 구 원 : 이 대 희  
협동연구기관명 : 이화여자대학교  
협동연구책임자 : 김 영 석  
협동연구기관명 : 한양대학교  
협동연구책임자 : 이 현 규

# 요 약 문

## I. 제 목: 국내산 농산물로부터 고부가 천연 조미소재 Kokumi 개발

### II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구는 우리농산물을 이용하여 깊고 농후하며 지속성을 부여하는 새로운 기능성 조미소재 kokumi 개발과 제품화를 최종 목표로 함. 현재 수입에 의존하고 있는 kokumi 소재를 우리농산물로부터 개발하고 제품화하기 위하여 1) 우리밀 가수분해 펩타이드와 고 glutathione/핵산/펩타이드 함유 효모추출물을 이용한 천연 kokumi 소재를 개발하고, 2) 국내산 양파/마늘로부터 추출한 allin과 glutathione 등 강한 조미 증강 효과를 갖는 황함유 성분들이 함유된 kokumi 제조공정을 확립하며, 3) kokumi 특성 최적화를 위한 양조발효/효소분해 방법을 확립함으로써 고부가의 천연 조미소재 개발 및 관련산업에 기초 연구자료를 제공하고자 함.

### III. 연구개발 내용 및 범위

◆ 1차년도(2007년) 목표는 정미성 단백질 가수분해물 제조를 위한 분해효소를 선별하고, kokumi 제조를 위한 고 glutathione/핵산 함유 효모 탐색 및 개량균주 개발과 kokumi 주요성분 분석법 확립 및 target 제품 특성을 파악하고자 함.

제1과제(주관): 우리밀 단백질 분해 효소를 생산하는 미생물의 분리 및 개량균주 개발, 고 glutathione/핵산 함유 효모 탐색 및 개량균주 개발

제2과제(협동): Kokumi 주요성분의 분석법 확립 및 target 제품 특성 파악

제3과제(협동): Kokumi 제조를 위한 펩타이드 분석법 탐색 및 가수조건 확립

◆ 2차년도(2008년) 목표는 kokumi 소재 추출법, 관능검사법, formulation 및 process 최적화 조건을 확립하고, 제조조건에 따른 펩타이드 패턴/kokumi/생리활성 분석을 통한 상관관계를 분석하고자 함.

제1과제(주관): Kokumi 소재 추출법 및 관능검사법 확립

제2과제(협동): Formulation 및 process 조건을 최적화하여 pyrazine/sulfur 함유 성분 생성 조건 확립

제3과제(협동): 제조조건에 따른 펩타이드 패턴/kokumi/생리활성 분석

◆ 3차년도(2009년) 목표는 kokumi 제조공정 scale-up 및 소재 제제화 공정 확립과 가공조건에 따른 펩타이드 변화를 조사하고, 식품적용에 따른 관능검사 시행과 kokumi 시제품을 분석함으로써 국내산 kokumi 조미소재 개발 및 제품화를 이루고자 함.

제1과제(주관): 제조공정 scale-up과 kokumi 소재 제제화 공정 확립 및 식품적용에 따른 관능검사

제2과제(협동): 개발된 kokumi 시제품 향미특성 분석 및 배합비/가공조건 보완

제3과제(협동): 개발된 kokumi 시제품 펩타이드 특성분석 및 가공조건 보완

### IV. 연구개발 결과

우리밀 단백질 분해 효소를 고농도로 분비하는 미생물을 분리 및 개량하여 제국을 제조하

고, 최적의 상업용 효소를 선택 후, 제국분해와 효소분해를 이용하여 우리밀단백질 분해 반응 공정을 최적화하였다. 우리밀단백질의 분해물의 fraction으로부터 umami(지미)가 강한 지미 소재를 개발하고, 양파와 마늘로부터 추출, 정제한 glutathione과 같은 황함유 화합물을 이용하여 맛의 농후감과 지속성을 부여하는 kokumi 소재를 개발하였다. 개량 효모로부터 고 glutathione, 핵산 및 펩타이드를 추출하여 농후감과 지속성을 부여하는 kokumi 소재를 개발하고, 이들 소재들을 배합하여 초기 강한 임팩트, 농후감과 지속성을 부여하는 kokumi 소재를 개발하였다. 개발한 kokumi 소재는 spray dry 등을 이용하여 제재화하며, 생리활성 펩타이드를 분리, 정제하여 생리기능성을 탐색함과 동시에 식품에 적용하여 관능검사 및 소비자 기호도 검사를 추진하여 본 과제의 통합적인 기술을 활용하여 조미소재 뿐만 아니라 응용제품인 완제품 “연두”를 개발하였다.

세부 기술개발 내용은

- 고 protease 생산 균주 및 고 glutathione, 핵산 생산균주 개발하여 peptide 제조에 활용함
- 감칠맛이 향상된 밀단백추출물 개발 및 양파, 마늘 추출법 확립
- 효모 유래 glutathione 추출, 분석법 확립
- 세포주 융합에 의한 균주 개량 및 glutathione 생산 3배 증가, RNA 생산 3배 증가
- 제조조건에 따른 glutathione 함량/펩타이드 패턴-kokumi-생리활성 상관관계 분석함
- 가공조건에 따른 glutathione과 펩타이드 변화 및 시제품 분석함
- 기본 맛과 향 및 원재료를 이용한 맛과 향의 관능훈련 완료
- 고쿠미 관능을 위한 맛 강도, 맛의 지속성, 부드러운맛, 이미, 이취, 양파, 마늘 풍미, 효모액 기스의 풍미의 맛보는 절차 확립
- 고쿠미 소재용 추출물의 맛 특성에 관련된 맛과 향의 특성 분석
- 관능평가용 맛과 향의 표준시료 확립
- 전구체(당, 아미노산, 밀단백질 가수 분해물, 양파 및 마늘 추출액 등) 결정 및 각각의 함유량 결정
- Pyrazine류 및 sulfur 함유성분 추출법 확립
- 휘발성 향미성분 분석 및 향기활성성분 분석법 확립
- Kokumi 관능검사 수행을 위한 패널훈련, 치킨스프베이스 제조조건 및 분석항목/척도 결정
- 펩타이드 시료(GSH 추출물 및 밀가수분해물)의 DPPH 라디칼 소거능 및 ACE 저해활성 측정법 확립
- 효모변이에 따른 GSH 추출물 제조, 관능검사를 통한 kokumi 탐색 및 DPPH 라디칼 소거능 조사로부터 항산화 활성 비교
- 상업용 효소 3종의 가수분해 시간에 따른 가수분해도가 다른 가수물 제조, 관능검사를 통한 kokumi 부여능 우수 시료 선정 및 HPLC를 이용한 시료의 펩타이드 패턴 분석
- 효소종류/가수분해도가 다른 밀단백질 펩타이드의 항고혈압 및 항산화 활성 비교
- Kokumi 관능검사/미각센서 결과와 생리활성 간 상관성 분석
- 효소종류/가수분해도가 다른 밀단백질 펩타이드의 특성/kokumi/생리활성 간 상관성 확립
- 조미소재 생산공정 최적화
- 상기의 개발 기술을 활용하여 3종의 천연 조미소재를 개발하였다. 그 관능특성은 깊은 맛(strong), 조화로운 맛(balance), 풍부한 맛(richness)이 특징이다. 또한, 이 소재를 응용한 완제품 “연두” 출시함.

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 소재 적용한 완제품(연두) 사업화 성공



자연발효로 만든 4세대 조미료, 건강하게 요리의 맛을 살리는 신개념 맛내기 재료

- ‘연두’는 용도나 취향에 따라 깊은 맛, 담백한 맛 두 종류가 출시될 예정이다.
- 형태는 액상이라서 분말 조미료(덱스트린, 점도증강 첨가물함유)처럼 입구가 뜨거운 김에 닿아 굳거나 눅눅해지지 않고, 깔끔하게 사용할 수 있다.
- 연두의 원료는 국산 양파, 대파, 마늘, 생강, 무, 브로콜리, 표고버섯 등 국산재료를 사용하였고, L-글루타민산나트륨, 합성보존료, 설탕, 쇠고기향미유(우지), 덱스트린 등 첨가하지 않았다.

□ 천연 고쿠미 조미소재를 이용하여 개발한 제품(연두)은 공장출하가격 기준 판매액은 4,950원 (320g)으로 10년 4월 중순부터 이마트, 롯데마트, 홈플러스 매장에서 판매되고 있다.

# SUMMARY

## I. The subjective of project

Development of natural seasoning kokumi using domestic agricultural products

## II. The objectives and importance of project

The ultimate object of this project is to develop kokumi, a new functional seasoning ingredient that provides deep, rich, and long-lasting taste, and a commercialized product employing this, via utilizing farm products of Korea.

The following procedures are to be undertaken in order to develop kokumi and a commercialized product using farm products of Korea:—

- 1) Development of kokumi using Korean wheat hydrolysate(peptide mixture) and yeast extract with high glutathione and nucleic acid content.
- 2) Establishment of manufacturing processes for production of kokumi ingredient that contains sulphur-containing components, such as allin and glutathione, which is extracted from Korean onion and garlic and has strong seasoning effect.
- 3) Establishment of fermentation and enzyme hydrolysis procedures for optimization of kokumi characteristics, through which basic research data is to be provided for high-valued natural seasoning ingredient development and related industries.

## III. Scopes of the project

◆ **The aims of the first year(2007)** are to select appropriate hydrolyzing enzymes for manufacture of seasoning protein hydrolysate, search for high-glutathione/nucleic-acid-content yeast strain, develop mutated strains for manufacture of kokumi, establish the analysis methods for kokumi, and understand the characteristics of target products.

**Assignment 1 (Main):** Separation of microorganism that product enzymes that hydrolyze wheat proteins and development of its mutated strains, search for high glutathione/nucleic acid content yeast strain and development of its mutated strain.

**Assignment 2 (Collaborative):** Establishment of analysis methods for main components of kokumi and comprehension on characteristics of target products.

**Assignment 3 (Collaborative):** Search for peptide analysis methods and establishment of hydrolysis conditions

◆ **The aims of 2nd year (2008)** are to establish extraction methods, sensory test methods, formulation and process optimization conditions for kokumi materials and to analyse for correlation of peptide pattern/kokumi/biological activity to manufacturing conditions.

**Assignment 1 (Main):** Establishment of extraction methods and sensory test methods for kokumi materials.

**Assignment 2 (Collaboarative):** Establishment of conditions for pyrazine/sulfur containing component formation through optimization of formulation and process conditions.

Assignment 3 (Collaborative): Analysis of peptide pattern/kokumi/biological activity as a function of preparation conditions.

◆ **The aims of 3rd year (2009)** are to scale up the kokumi production processes, establish materialization processes for the ingredients, investigate for change in peptide pattern depending on production condition, carry out sensory tests for food applications of the ingredients, and analyse kokumi prototype to develop domestic kokumi seasoning ingredient and commercialize the product.

**Assignment 1 (Main):** Scale-up of production processes, establishment of kokumi ingredient materialization manufacturing processes, and sensory tests for its food applications.

**Assignment 2 (Collaborative):** Analysis on odor characteristics of kokumi prototype and complementation on composition ratio/manufacturing condition.

**Assignment 3 (Collaborative):** Analysis on peptide characteristics of kokumi prototype and complementation of manufacturing condition.

#### IV. The results and recommendation

Microorganism that secrete, at high concentration, the enzymes that hydrolyze wheat protein was selected and developed, and commercial enzymes that are optimal for the proposed processes were selected. Then, the wheat hydrolysis process was optimized using both the enzymes secreted by the developed strain and commercially available ones. Umami ingredient was developed from a fraction of wheat hydrolysate and kokumi ingredient that provides richness and continuation in taste was developed from sulphur containing compounds extracted from onion and garlic, such as glutathione. From the mutated strains of yeast, glutathione, nucleic acid, and peptide were extracted to develop kokumi ingredient that provides richness and continuation in taste, and these ingredients were formulated to develop seasoning composite that produces strong impact in initial taste and richness and lasting effect in lasting taste. The kokumi ingredient developed was materialized by spray drying, after which biologically active peptides were separated and purified, and its biological activity was investigated. Further, it was applied to food products and sensory evaluation and customer testing was carried out for the product. Through utilizing the

technologies developed in this study, not only a seasoning ingredient was developed, but a commercialized product "Yeon-Doo" was developed.

The details of technology developed through this study were as follows:

- High protease production strain and high glutathione/nucleic-acid production strain were developed and these were utilized in peptide production.
- Development of wheat protein extract enriched in taste and establishment of methods for preparing onion and garlic extracts.
- Establishment of extraction and analysis methods for yeast-derived glutathione
- Strain development through cell-line fusion - 3 fold increase in glutathione production and RNA production, respectively.
- Correlation between glutathione content/peptide pattern-kokumi-bioactivity and manufacturing condition was analyzed.
- Peptide pattern change with respect to manufacturing condition was analyzed as well as the prototype product.
- Training for sensory(taste, odor) tests using base taste and odor was complete/
- Procedures for kokumi tasting, onion/garlic tasting, and yeast extract tasting were established.
- The characteristics in taste and odor of kokumi ingredients were analyzed.
- Standard samples for sensory(taste, odor) test were established.
- Precursor materials (sugar, amino acid, wheat protein hydrolysate, onion and garlic extracts) were selected and each composition ratio was decided.
- Extraction methods for pyrazines and sulfur containing component were established.
- Volatile taste compositions were analysed and analysis method for odor-active component was established.
- Panel training for kokumi sensory test was complete, and manufacturing condition and analysis list/references for chicken soup base was decided.
- Methods for measuring DPPH radical scavenging effect and ACE inhibition activity of the peptide sample (GSH extracts and wheat hydrolysate) were established.
- GSH extract was prepared from mutated yeast strain. Kokumi was searched for by sensory tests. Anti-oxidant activity was compared through investigation on DPPH radical scavenging effect.
- Hydrolysate with different level of hydrolysis was prepared through different hydrolysis times with three types of commercially available enzymes. Ingredients with better kokumi enriching capability was selected through sensory tests. Peptide pattern was analyzed using HPLC.
- Anti-hypertension and anti-oxidant activity for wheat protein peptide produced with different enzyme types and hydrolysis times were compared.
- Correlation between Kokumi sensory test/taste sensory results and biological activity was



analyzed.

- Correlation between characteristics/kokumi/bioactivity of different wheat peptide produced with different enzymes and at various hydrolysis levels were established.
- Manufacturing procedures for the seasoning ingredient was optimized.
- 3 types of natural seasoning ingredients were developed via utilizing the developed technologies listed above. Their sensory characteristics are that they produce strong, balanced and rich taste. Also, a seasoning product 'Yeon-Doo' was developed and commercialized by utilizing these ingredients.

가. A seasoning product(Yeon-Doo) that employs the seasoning ingredients developed in this study was commercialized.



The fourth generation seasoning product made through natural fermentation. A seasoning product with a new concept of enriching food taste in a healthy way.

- Two types of products had been released - deep and light taste.
  - This is prepared in a liquid form and so does not harden like conventional 'powder type' seasoning products.
  - "Yeon-Doo" are produced with ingredients(onion, leek, garlic, ginger, mooli, broccoli, mushrooms) that had been produced in Korea, and it does not contain L-monosodium glutamate, artificial preservatives, sugar, beef-flavored oil, and dextrin.
- 'Yeon-Doo' developed by utilizing natural kokumi seasoning taste is priced at 4,950 won(320g), and was released in grocery stores, such as E-mart, Lotte mart, and Homeplus for sale, since April, 2010.

# CONTENTS

## **Chapter 1. Introduction**

Aim of research

Content of research

Expected outcomes

Part 1. Needs for proposed research and development

가. The economic and industrial importance of the proposed object of research and development and related needs

## **Chapter 2. National and international trends in technology development**

## **Chapter 3. Contents and results of research and development**

### **Part 1. Development of Kokumi seasoning product using wheat, onion, garlic, yeast extract**

#### 1. Materials and methods

- (1) Wheat manufacturing/processing methods
- (2) Selection of protease producing microorganism
- (3) Yeast cream preparation
- (4) Autolysis
- (5) Breeding characteristics of microorganism strain to be selected
- (6) Protease producing strain development via NTG and UV treatment
- (7) Composition analysis
- (8) Amino acid composition analysis
- (9) Garlic, onion extraction method
- (10) Preparation of wheat hydrolysate
- (11) Cell strain and growth media
- (12) Separation of auxotrophic mutant strain
- (13) Protoplast formation and cell wall regeneration
- (14) Protoplast fusion
- (15) Nucleic acid producing yeast strain development and production
- (16) High glutathione production yeast strain development and production
- (17) Glutathione content analysis
- (18) Total dry weight
- (19) High glutathione and nucleic acid production and extraction from fused strains
- (20) Sensory evaluation method (Panel training and statistical analysis)
- (21) Sensory evaluation on wheat, onion, and yeast extract

(가) Materials

(나) Descriptive analysis of extracts

- ① Panel selection and training
- ② Sample preparation and suggestion
- ③ Evaluation and procedures

## 2. Results and Discussion

가. Establishment of separation tool for protease producing strain - 1st year

- (1) Protease producing strain separation and selection
- (2) Development of protease producing strain (UV mutation)

나. Search and development of high glutathione producing yeast and nucleic acid producing yeast

- (1) Selection of yeast strain suitable for seasoning ingredient
- (2) Selection of yeast strain with good taste.
- (3) Analysis of breeding characteristics of strains (8 types) to be selected.
- (4) High glutathione production strain development(mutation)
- (5) Lab-scale production of yeast glutathione with various medium compositions
- (6) Development(mutation) of RNA containing yeast strain
- (7) Lab-scale RNA production with various medium compositions.

다. Establishment of kokumi ingredients from wheat, onion, garlic and yeast extract - 2nd year

- (1) Production of wheat protein
  - (가) Wheat analysis
  - (나) Wheat protein preparation
  - (다) Wheat protein extraction

- (2) Onion and garlic extraction methods

라. High glutathione, nucleic acid, and peptide producing strain development.

- (1) Lab-scale glutathione production with various medium compositions.
- (2) Lab-scale RNA production with various medium compositions
- (3) Separation of auxotrophic mutant strain
- (4) Protoplast formation and cell wall regeneration
- (5) Glutathione and RNA content of protoplast fused strain
- (6) Growth medium optimization by RSM
- (7) Lab-scale RNA production from yeast

마. Results of sensory evaluation on wheat, garlic, onion extract

- (1) Results of sensory evaluation on the extracts
- (2) Sensor characteristics of soup system and customer preferences.
  - (가) Sensory characteristics
  - (나) Preference evaluation

- 바. Optimization of pilot-scale yeast production procedures (3 ton reactor) - 3rd year
  - (1) Preparation of yeast extract
- 사. Establishment of optimal materialization conditions by spray-drying
  - (1) Establishment of optimal materialization conditions - temperature and diffusion rate (rpm of atomizer)
  - (2) Establishment of optimal materialization conditions - diluent type
- ㅇ. Food application test and sensory evaluation
  - (1) Development of seasoning ingredient

## **Part 2. Investigation on Kokumi flavor characteristic and establishment o process condition**

### 1. Materials and Methods

- 가. Establishment of analysis methods for major components of kokumi and a study on characteristics of target products (1st year)
  - (1) Sample condition
  - (2) Establishment of extraction and analysis methods for Pyrazines and sulfur containing components
    - (가) SDE: Simultaneous Steam Distillation/Solvent Extraction
    - (나) SPME : Solid Phase Microextraction
    - (다) Analysis on volatile flavor compounds
      - ① GC-MS analysis
      - ② Purification of volatile flavor compounds
    - (라) Analysis on odor-active compounds
      - ① GC-Olfactometry analysis
      - ② Identification of odor-active compounds
  - (3) Establishment of an analysis method for free glutamic acid
    - (가) Identification of free glutamic acid
      - ① Extraction of amino acid and derivatization
      - ② GC-MS analysis
    - (나) Quantitative analysis of free glutamic acid
      - ① Extraction of amino acid and derivatization
      - ② GC-FID analysis
    - (다) Establishment of an analysis method for nucleic acid component
      - ① Extraction of nucleic acid component
      - ② Analysis of nucleic acid component
        - ㉠ Mobile phase optimization
        - ㉡ High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) analysis
        - ㉢ Quantitative analysis
  - (4) Establishment of an analysis method for NaCl
    - (가) Extraction

- (나) Analysis method for NaCl
  - ① Mohr method
  - ② Quantitative analysis of NaCl
- 나. Formulation and establishment of process condition (2nd year)
  - (1) Precursor types and concentration selection
    - (가) Reactant selection
    - (나) Reaction condition
      - ① Thermal Reaction
      - ② Vacuum Drying
    - (다) Formulation selection
  - (2) Investigation and analysis on flavor characteristics for various formulation
    - (가) Analysis methods for Pyrazines and sulfur containing compounds
      - ① Analysis on volatile flavor compounds
        - ㉠ Sample preparation
        - ㉡ Extraction of volatile flavor compounds
        - ㉢ GC-MS analysis
        - ㉣ Identification of volatile flavor compounds
    - (나) Analysis on odor-active compound
      - ① GC-Olfactometry analysis
      - ② Identification of odor-active compound
  - (3) Establishment of manufacturing process and standardization
- 다. Analysis on flavor characteristics of the prototype and complementation(3rd year)
  - (1) Formation of pyrazines and other heterocyclic compounds by wheat protein enzyme treatment and heating procedures
    - (가) Aim of experiment
    - (나) Materials
    - (다) Methods
      - ① Measurement of hydrolysis rate
      - ② Enzyme-hydrolysis of wheat protein
      - ③ Fraction of the hydrolysate under 3,000 Da in its molecular weight
      - ④ Measurement of glutamine and glutamic acid
        - ㉠ Sample preparation
        - ㉡ GC-MS Analysis
      - ⑤ Ammonia measurement
      - ⑥ Deamidation using glutaminase
      - ⑦ Maillard reaction
      - ⑧ Solvent extraction
      - ⑨ Gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS)
      - ⑩ Identification and quantitative analysis on flavor compounds
  - (2) Extraction and analysis of flavor compound from the prototype

- (가) Sample
- (나) SDE: Simultaneous Steam Distillation/Solvent Extraction
- (다) GC-MS analysis
- (라) Identification of volatile flavor compounds

## 2. Results and discussion

가. Establishment of analysis methods for major components of kokumi and a study on characteristics of target products (1st year)

(1) Analysis on pyrazine and sulfur containing compounds

(가) Identification and quantitative analysis on volatile flavor compounds

① GC-MS analysis of volatile kokumi flavor compounds extracted by SDE

② GC-MS analysis of volatile kokumi flavor compounds extracted by SPME

(나) Identification of volatile flavor compounds

(2) Analysis on free glutamic acid

(가) Identification of free amino acid

(나) Quantification of free amino acid

(다) Quantitative analysis of aspartic acid and glutamic acid using standard materials

(3) Analysis of nucleic acid compounds

(가) Establishment of extraction methods

(나) Mobile phase composition optimization

(다) Result analysis

(4) NaCl Analysis

나. Establishment of formulation and process condition (2nd year)

(1) Precursor type and concentration selection

(2) Investigation and Analysis on flavor characteristics for various formulation

(가) Identification and quantitative analysis of volatile flavor compounds

(나) Identification of odor-active compounds

(3) Establishment of manufacturing process and standardization

다. Analysis on flavor characteristics of the prototype and complementation (3rd year)

(1) Formation of pyrazines and other heterocyclic compounds by wheat protein enzyme treatment and heating procedures

(가) Results of hydrolysis rate measurement

(나) Quantitative analysis of glutamine, glutamic acid

(다) Ammonia measurement

(라) Identification and quantification of volatile flavor compounds

(2) Discussion and identification of volatile flavor compounds in Kokumi prototype

## Part 3. Research and development results

### 1. Materials and methods

가. Establishment of peptide pattern analysis method

(1) Assessment of peptide pattern analysis method

(가) Glutathione (GSH) analysis

- ① Alloxan reagent method
- ② HPLC method

(나) Peptide pattern analysis

- ① Reversed phase HPLC chromatography
- ② Gel electrophoresis
- ③ Gel filtration chromatography

(2) Preparation of kokumi peptides from yeast and wheat protein

(가) Establishment of high-yield GSH extraction condition from yeast

(나) Preparation of WGHs having various degree of hydrolysis

(다) Sensory evaluation

- ① Training of the sensory panel
- ② Preparation and presentation of sample
- ③ Evaluation and procedure

(라) Amino acid contents

**나. Kokumi/peptide pattern/biological activity as a function of preparation condition**

(1) Measurement of kokumi and biological activity of GSH-enriched extract from yeast

(가) Optimization of high-yield GSH extraction condition

(나) Kokumi analysis of GSH extract by yeast mutation

(다) DPPH radical scavenging of GSH extract by yeast mutation

(2) Investigation of kokumi, peptide pattern, and biological activity of WGHs

(가) Peptide pattern

- ① Reversed phase HPLC chromatography
- ② Gel filtration chromatography

(나) Kokumi analysis

- ① Sensory evaluation
- ② Taste sensing system

(다) Biological activity

- ① DPPH radical scavenging effect
- ② Hydroxyl radical scavenging effect
- ③ Angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibition

(3) Purification of kokumi peptide from the A24h

(가) Peptide pattern

(나) Ultrafiltration

(다) Reversed phase HPLC chromatography

- (라) Kokumi analysis
- (마) Amino acid contents
- (4) Anti-radical activity of the WGH by purification step
  - (가) DPPH radical scavenging effect
- (5) Processing adaptability of the WGH containing kokumi peptides
  - (가) Reversed phase HPLC chromatography
- (나) Effect of pH and heating temperature on the anti-radical activity of the A24h
  - ① Effect of pH on the DPPH radical scavenging activity of the A24h
  - ② Effect of heating on the DPPH radical scavenging activity of the A24h
- (6) Characterization of trial products
  - (가) Reversed phase HPLC chromatography
  - (나) DPPH radical scavenging effect

## 2. Results and discussion

### 가. Establishment of peptide pattern analysis method

- (1) Assessment of peptide pattern analysis method
  - (가) Glutathione (GSH) analysis
    - (나) Comparison of GSH assay
      - ① Non-separative techniques
      - ② Chromatographic methods
        - ㉠ Thin-layer chromatography methods (TLC)
        - ㉡ High-performance liquid chromatography methods (HPLC)
        - ㉢ Gas chromatography methods
        - ㉣ Capillary electrophoresis methods
      - ③ Comparison of GSH assay
        - ㉠ Alloxan reagent method
        - ㉡ HPLC method
  - (다) Molecular weight distribution
  - (라) Peptide pattern
- (2) Analysis of target product
  - (가) GSH content
  - (나) Peptide pattern

### 나. Preparation of kokumi peptides from yeast and wheat protein

- (1) Establishment of high-yield GSH extraction condition from yeast
  - (가) GSH yield and content



- (2) Degree of hydrolysis
- (3) Off-taste analysis by Degree of hydrolysis
  - (가) Sensory evaluation
  - (나) Amino acid contents

**다. Kokumi/peptide pattern/biological activity as a function of preparation condition**

- (1) Measurement of kokumi and biological activity of GSH-enriched extract from yeast
  - (가) Optimization of high-yield GSH extraction condition
  - (나) Kokumi analysis of GSH extract by yeast mutation
  - (다) DPPH radical scavenging of GSH extract by yeast mutation
- (2) Investigation of kokumi, peptide pattern, and biological activity of WGHs
  - (가) Peptide pattern
    - ① Preparation of WGHs having various degree of hydrolysis
    - ② Reversed phase HPLC chromatography
    - ③ Gel electrophoresis
    - ④ Gel filtration chromatography
  - (나) Kokumi analysis
    - ① Sensory evaluation
    - ② Taste sensing system
  - (다) Biological activity
    - ① DPPH radical scavenging effect
    - ② Hydroxyl radical scavenging effect
    - ③ Angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibition
  - (라) Comparison of kokumi development of domestic and imported WGHs
    - ① Sensory evaluation
    - ② Taste sensing system
    - ③ Amino acid contents
  - (마) Biological effects of domestic and imported WGHs
    - ① DPPH radical scavenging effect
    - ② Hydroxyl radical scavenging effect
    - ③ Angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibition

**라. Purification of kokumi peptide from the A24h and analysis of trial products**

- (1) Purification of kokumi peptide from the A24h
  - (가) Ultrafiltration
  - (나) Reversed phase HPLC chromatography
- (2) DPPH radical scavenging activity

- (가) Ultrafiltration
- (나) Reversed phase HPLC chromatography
- (3) Processing adaptability of the A24h
  - (가) Peptide pattern
  - (나) Effect of pH and heating temperature
- (4) Characterization of trial products
  - (가) Peptide pattern
  - (나) DPPH radical scavenging effect

**Chapter 4 . Level of target accomplishment and contribution to related fields**

**Chapter 5. Achievements of research and development and plans for utilizing  
research results**

**Chapter 6. Information on international scientific technology collected during  
research and development**

**Chapter 7. Reference**

# 목 차

<b>제 1 장 연구개발과제의 개요</b>	27
제 1 절 연구목표	27
제 2 절 연구내용	27
제 3 절 연구개발에 따른 기대성과	27
<b>제 2 장 기술연구개발의 필요성 및 국내외 연구현황</b>	28
제 1 절 기술 연구개발의 경제적 · 산업적 중요성	28
제 2 절 연구의 필요성	31
제 3 절 국내외기술개발 현황	33
<b>제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과</b>	34
제1 절 우리밀, 양과, 마늘, 조미용 효모 추출을 이용한 Kokumi 조미소재 개발	34
1. 재료 및 방법	34
(1) 우리밀 제조방법	
(2) Protease 생산 균주 선별	
(3) Yeast cream 제조	
(4) 자가소화(autolysis)	
(5) 선별 대상 균주에 대한 생육특성	
(6) NTG 및 UV 처리에 의한 Protease 생산균주 개량	
(7) 일반성분 분석	
(8) 아미노산 조성 분석	
(9) 마늘, 양과 추출법	
(10) 우리밀 가수분해물 제조	
(11) 균주 및 배지	
(12) 영양요구성 변이주의 분리	
(13) 원형질체 생성과 세포벽 재생	
(14) 원형질체 융합	
(15) 핵산 생산용 yeast 균주 개량 및 생산	
(16) 고 glutathione 생산용 yeast 균주 개량 및 생산	
(17) Glutathione 함량분석	
(18) 건조균체량	
(19) 융합균주로부터 고 glutathione 및 핵산 생산, 추출	
(20) 관능검사(패널 훈련 및 통계분석)	

(21) 우리밀, 양파, 마늘, 효모추출물의 관능검사	
(가) 실험재료	
(나) 추출물의 묘사 분석	
① 패널 선정 및 훈련	
② 시료 준비 및 제시	
③ 평가 내용 및 절차	
2. 실험 결과 및 고찰	42
가. 우리밀 단백질을 분해하는 Protease 생산균주의 분리 tool 확립(1차년도)	42
(1) Protease 생산 균주 분리 및 선발	
(2) Protease 생산균주의 개량 (UV mutation)	
나. 고 glutathione 생산 효모와 핵산 생산효모의 탐색 및 개량	44
(1) 조미소재로 적합한 효모균주 선택	
(2) 정미성 우수한 효모균주 선별	
(3) 선별 대상 균주(8종)에 대한 생육특성 분석	
(4) 고 glutathione 생산용 균주개량	
(5) Lab-scale에서 배지 구성에 따른 효모 Glutathione 생산	
(6) RNA 함유 효모 균주 개량	
(7) Lab-scale에서 배지 구성에 따른 효모 RNA 생산	
다. 우리밀, 양파, 마늘, 효모엑기스로부터 kokumi 소재 추출법 확립(2차년도)	51
(1) 우리밀 단백질 제조	
(가) 우리밀 분석	
(나) 우리밀 단백질 제조	
(다) 우리밀 단백질 추출	
(2) 마늘, 양파 추출법	
라. 고 glutathione, 핵산 및 펩타이드 생산균주 개발	56
(1) Lab-scale에서 배지 구성에 따른 효모 Glutathione 생산	
(2) Lab-scale에서 배지 구성에 따른 효모 RNA 생산	
(3) 영양요구성 변이주의 분리	
(4) 원형질체 생성과 세포벽 재생	
(5) 원형질체 융합균주의 glutathione 및 RNA 함량	
(6) RSM을 이용한 배지 최적화	
(7) Lab-scale에서 효모 glutathione 및 RNA 생산	
마. 우리밀, 마늘 양파 추출물을 이용한 관능 검사 결과	64
(1) 추출물들의 관능검사 결과	
(2) 추출물을 이용한 soup system의 관능적 특성 및 소비자 기호도	
(가) 관능특성	
(나) 기호도 검사	
바. Pilot scale에서의 효모 생산 공정 최적화(3 ton 반응기)(3차년도)	67

(1) 효모엑기스 제조	.....	67
사. Spray dry를 이용한 제형 조건 확립 제재화	.....	67
(1) 온도와 분산속도(rpm)에 따른 최적의 제재화 조건 확립		
(2) 부형물의 종류에 따른 최적의 제재화 조건 확립		
아. 식품 적용 test 및 관능검사	.....	69
(1) 조미 소재 개발		
제 2 절 Kokumi 향미특성 규명 및 process 조건 확립	.....	71
1. 연구개발의 내용 및 방법	.....	71
가. Kokumi 주요성분의 분석법 확립 및 Target제품 특성파악 (1차년도)	.....	71
(1) 시료 조건		
(2) Pyrazine 및 sulfur 함유 성분의 추출 및 분석법 확립		
(가) 동시용매증류추출법 (SDE: Simultaneous Steam Distillation/Solvent Extraction)		
(나) 고체상미세추출법 (SPME : Solid Phase Microextraction)		
(다) 휘발성 향미성분 분석		
① GC-MS 분석		
② 휘발성 향미성분의 동정		
(라) 향기활성성분(odor-active compound)의 분석		
① GC-Olfactometry 분석		
② 향기활성성분의 동정		
(3) Free glutamic acid의 분석법 확립		
(가) Free glutamic acid의 동정		
① 아미노산의 추출 및 derivatization		
② GC-MS 분석		
(나) Free glutamic acid의 정량		
① 아미노산의 추출 및 derivatization		
② GC-FID 분석		
(다) 핵산 성분의 분석법 확립		
① 핵산 성분의 추출		
② 핵산 성분의 분석		
㉠ Mobile phase 최적화		
㉡ High Performance Liquid Chromatograph (HPLC)를 이용한 분석		
㉢ 정량		
(4) NaCl의 분석법 확립		
(가) 추출		
(나) NaCl의 분석 방법		
① Mohr법		
② NaCl의 정량		

나. Formulation 및 process 조건 확립 (2차년도)	..... 76
(1) 전구체 종류 및 농도 결정	
(가) 반응물의 선택	
(나) 반응조건	
① Thermal Reaction	
② Vacuum Drying	
(다) 배합비 설정	
(2) Formulation에 따른 향미 특성 고찰 및 규명	
(가) Pyrazine 및 sulfur 함유 성분의 분석 방법	
① 휘발성 향미성분 분석	
㉠ Sample preparation	
㉡ Extraction of volatile compounds	
㉢ GC-MS 분석	
㉣ 휘발성 향미성분의 동정	
(나) 향기활성성분(odor-active compound)의 분석	
① GC-Olfactometry 분석	
② 향기활성성분의 동정	
(3) 가공공정 확립 및 표준화	
다. 시제품 향미특성 분석 및 보완 (3차년도)	..... 79
(1) 밀단백질을 효소처리 및 가열공정을 이용한 pyrazine 및 기타 heterocyclic compound의 생성	
(가) 실험목적	
(나) 실험재료	
(다) 실험방법	
① 가수분해율 측정	
② 밀단백질의 효소 가수분해	
③ 가수분해물의 분자량 3,000Da 이하로의 fraction	
④ Glutamine, Glutamic acid 측정	
㉠ 시료준비	
㉡ GC-MS 분석	
⑤ 암모니아 측정	
⑥ Glutaminase를 이용한 Deamidation	
⑦ Maillard reaction	
⑧ 용매추출	
⑨ Gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS)	
⑩ 향미 성분의 동정 및 정량	
(2) 시제품 향미성분 추출 및 분석	
(가) 시료	
(나) 동시용매증류추출법 (SDE: Simultaneous Steam Distillation/Solvent Extraction)	
(다) GC-MS 분석	

(라) 휘발성 향미성분의 동정	
2. 연구 결과 및 고찰	84
가. Kokumi 주요성분의 분석법 확립 및 Target제품 특성 파악 (1차년도)	84
(1) Pyrazine 및 sulfur 함유 성분의 분석	
(가) 휘발성 향미성분 동정 및 정량	
① SDE로 추출한 kokumi 휘발성 향미성분의 GC-MS 분석	
② SPME로 추출한 kokumi 휘발성 향미성분의 GC-MS 분석	
(나) 향기활성성분의 동정	
(2) Free glutamic acid의 분석	
(가) Free amino acid의 동정	
(나) free amino acid의 정량	
(다) 외부표준물질을 이용한 aspartic acid와 glutamic acid의 정량	
(3) 핵산 성분의 분석	
(가) 추출방법 정립	
(나) Mobile phase 조성 최적화	
(다) 분석 결과	
(4) NaCl의 분석	
나. Formulation 및 process 조건 확립 (2차년도)	96
(1) 전구체 종류 및 농도 결정	
(2) Formulation에 따른 향미 특성 고찰 및 규명	
(가) 휘발성 향미성분 동정 및 정량	
(나) 향기활성성분의 동정	
(3) 가공공정 확립 및 표준화	
다. 시제품 향미특성 분석 및 보완 (3차년도)	114
(1) 밀단백질을 효소처리 및 가열공정을 이용한 pyrazine 및 기타 heterocyclic compound의 생성	
(가) 가수분해율 측정 결과	
(나) Glutamine, Glutamic acid 정량	
(다) 암모니아 측정	
(라) 휘발성 향미 성분 동정 및 정량	
(2) Kokumi 시제품의 휘발성 향미 성분 고찰 및 규명	

## 제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과 143

### 제 1 절 재료 및 방법 143

#### 가. 고꾸미 제조를 위한 펩타이드 분석법 탐색 및 가수조건 확립 143

##### (1) 고꾸미 관련 펩타이드 분석법 확립

##### (가) GSH 함량분석

##### ① Alloxan reagent method

- ② HPLC method
  - (나) 펩타이드 패턴 분석
    - ① Reversed phase HPLC chromatography
    - ② Gel electrophoresis
    - ③ Gel filtration chromatography
  - (2) 고꾸미 관련 펩타이드 제조조건 확립
    - (가) 추출용매 종류 및 농도에 따른 GSH 수율조사
    - (나) 효소종류/가수시간별 밀 단백질 가수분해물 제조 및 이미 분석
      - ① 가수분해도에 따른 밀 단백질 가수분해물 제조
    - (다) 관능검사
      - ① 패널 선정 및 훈련
      - ② 시료 준비 및 제시
      - ③ 평가 내용 및 절차
    - (라) 아미노산 조성분석
- 나. 제조조건에 따른 고꾸미/펩타이드 패턴/생리활성 분석 ..... 146
- (1) Glutathione(GSH) 수율 최적화 및 GSH 함량에 따른 고꾸미 및 생리활성 탐색
    - (가) GSH 수율 최적조건 확립(lab-scale)
    - (나) 효모변이에 따른 GSH 추출물의 고꾸미 관능검사
    - (다) 효모변이에 따른 GSH 추출물의 DPPH 라디칼 소거능
  - (2) 가수분해 조건에 따른 펩타이드 패턴과 고꾸미 및 생리활성 탐색
    - (가) 가수분해 조건에 따른 펩타이드 패턴분석
      - ① Reversed phase HPLC chromatography
      - ② Gel filtration chromatography
    - (나) 가수분해 조건에 따른 고꾸미 분석
      - ① 관능검사
      - ② 미각센서 분석
    - (다) 가수분해 조건에 따른 생리활성 탐색
      - ① DPPH radical 소거능
      - ② Hydroxyl radical 소거능
      - ③ Angiotensin-I converting enzyme(ACE) 저해활성
  - (3) 단백질 가수분해물(A24h)로부터 고꾸미 펩타이드 정제
    - (가) 고꾸미 펩타이드 정제에 따른 펩타이드 패턴분석
    - (나) 한외 여과법(Ultrafiltration)
    - (다) Reversed phase HPLC chromatography
    - (라) 관능검사에 따른 고꾸미 분석



(마) 아미노산 조성	
(4) 정제별 밀 단백질 가수분해물의 항산화 활성 측정	
(가) DPPH 라디칼 소거능	
(5) 가공조건에 따른 고꾸미 펩타이드 패턴분석	
(가) Reversed phase HPLC chromatography	
(나) A24h의 pH와 열처리에 따른 항산화 활성	
① A24h의 pH에 따른 DPPH 라디칼 소거능	
② A24h의 열처리에 따른 DPPH 라디칼 소거능	
(6) 시제품 펩타이드 패턴분석 및 가공조건 보완	
(가) Reversed phase HPLC chromatography	
(나) DPPH 라디칼 소거능	
2. 결과 및 고찰	..... 151
가. 고꾸미 제조를 위한 펩타이드 분석법 탐색 및 가수조건 확립	..... 151
(1) 고꾸미 관련 펩타이드 분석법 확립	
(가) 기존 glutathione분석법의 장단점 검토	
(나) GSH 분석법 비교	
① Non-separative techniques	
② Chromatographic methods	
㉠ Thin-layer chromatography methods(TLC)	
㉡ High-performance liquid chromatography methods(HPLC)	
㉢ Gas chromatography methods	
㉣ Capillary eletrophoresis methods	
③ GSH 분석	
㉠ Alloxan reagent method	
㉡ HPLC method	
(다) SDS-PAGE를 이용한 분자량 패턴 분석	
(라) 펩타이드 패턴 분석	
(2) Target제품 분석 및 가수분해물의 펩타이드 패턴분석	
(가) GSH 함량	
(나) 펩타이드 패턴 및 함량	
나. 고꾸미 관련 펩타이드 제조조건 확립	..... 159
(1) 고 GSH추출조건 확립	
(가) 추출용매 종류 및 농도에 따른 GSH수율조사	
(2) 가수분해 조건에 따른 가수분해도(DH) 측정	
(3) 가수분해도에 따른 이미 분석	

(가) 관능검사	
(나) 아미노산 조성분석	
다. 제조조건에 따른 고꾸미/펩타이드 패턴/생리활성 분석	..... 164
(1) Glutathione(GSH) 수율 최적화 및 GSH 함량에 따른 고꾸미 및 생리활성 탐색	
(가) GSH 수율 최적조건 확립(lab-scale)	
(나) 효모변이에 따른 GSH 추출물의 고꾸미 관능검사	
(다) 효모변이에 따른 GSH 추출물의 DPPH 라디컬 소거능	
(2) 가수분해 조건에 따른 펩타이드 패턴과 고꾸미 및 생리활성 탐색	
(가) 가수분해 조건에 따른 펩타이드 패턴분석	
① 가수분해 조건에 따른 시료 제조	
② Reversed phase HPLC chromatography	
③ SDS-PAGE	
④ Gel filtration chromatography	
(나) 가수분해 조건에 따른 고꾸미 분석	
① 관능검사	
② 미각센서	
(다) 가수분해 조건에 따른 생리활성 탐색	
① DPPH 라디컬 소거능	
② Hydroxyl 라디컬 소거능	
③ ACE 저해활성	
(라) 우리밀/수입밀 가수분해물의 고꾸미 비교	
① 관능분석	
② 미각센서	
③ 아미노산 조성분석	
(마) 우리밀/수입밀 가수분해물의 생리활성 비교	
① DPPH 라디컬 소거능	
② Hydroxyl 라디컬 소거능	
③ ACE 저해활성	
라. 밀 단백질 가수분해물(A24h)로부터 고꾸미 펩타이드 정제 및 시제품 분석.....	180
(1) 분리단계별 시료의 고꾸미 분석	
(가) 한외 여과법(Ultrafiltration)	
(나) Reversed phase HPLC chromatography	
(2) 분리단계별 시료의 DPPH 라디컬 소거능	
(가) 한외 여과법(Ultrafiltration)	
(나) Reversed phase HPLC chromatography	

- (3) 분리단계별 시료의 특성분석 및 가공조건 보완
  - (가) A24h로부터 고꾸미 펩타이드 정제에 따른 특성분석
  - (나) 가공조건에 따른 A24h의 펩타이드 패턴, 고꾸미 및 항산화 활성 조사
- (4) 시제품 분석
  - (가) 펩타이드 패턴분석
  - (나) DPPH 라디칼 소거능

<b>제 4 장</b>	<b>목표달성도 및 관련분야에의 기여도</b>	.....	189
<b>제 5 장</b>	<b>연구개발 성과 및 성과활용 계획</b>	.....	191
<b>제 6 장</b>	<b>연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보</b>	....	193
<b>제 7 장</b>	<b>참고문헌</b>	.....	194

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구목포

본 연구는 우리농산물을 이용하여 깊고 농후하며 지속성을 부여하는 새로운 기능성 조미소재 kokumi 개발과 제품화를 최종 목표로 함. 현재 수입에 의존하고 있는 kokumi 소재를 우리농산물로부터 개발하고 제품화하기 위하여 1) 우리밀 가수분해 펩타이드와 고 glutathione/핵산/펩타이드 함유 효모추출물을 이용한 천연 kokumi 소재를 개발하고, 2) 국내산 양파/마늘로부터 추출한 allin 등 강한 조미 증강 효과를 갖는 황함유 성분들이 함유된 kokumi 제조공정을 확립하며, 3) kokumi 특성 최적화를 위한 양조발효/효소분해 방법을 확립함으로써 고부가의 천연 조미소재 개발 및 관련산업에 기초 연구자료를 제공하고자 함.

## 제 2 절 연구내용

- **Kokumi 생산을 위한 우량균주 개발**
  - 고 protease 생산 균주 및 고 glutathione, 핵산 생산 균주 개발
- **단백질 분해조건 및 process 조건 확립**
  - Formulation과 process 조건 확립 및 표준화
  - Glutathione 및 단백질 가수분해 펩타이드 분석법 탐색 및 조건 확립
  - 제조조건에 따른 glutathione 함량/펩타이드 패턴-kokumi-생리활성 상관관계 분석
  - 가공조건에 따른 glutathione과 펩타이드 변화 및 시제품 분석
- **Kokumi 제품 평가 및 개발**
  - 우리밀, 양파, 마늘, 효모엑기스로부터 kokumi 소재 제조 최적화
  - Kokumi 소재의 scale-up 및 제재화
  - Kokumi 소재의 관능검사 및 묘사분석
  - Kokumi의 주요성분(pyrazine류, sulfur 함유성분, 핵산 등) 분석법 확립
  - Kokumi로 개발되어 있는 target제품의 특성파악
  - 시제품 개발 및 보완

## 제 3 절 연구개발에 따른 기대성과

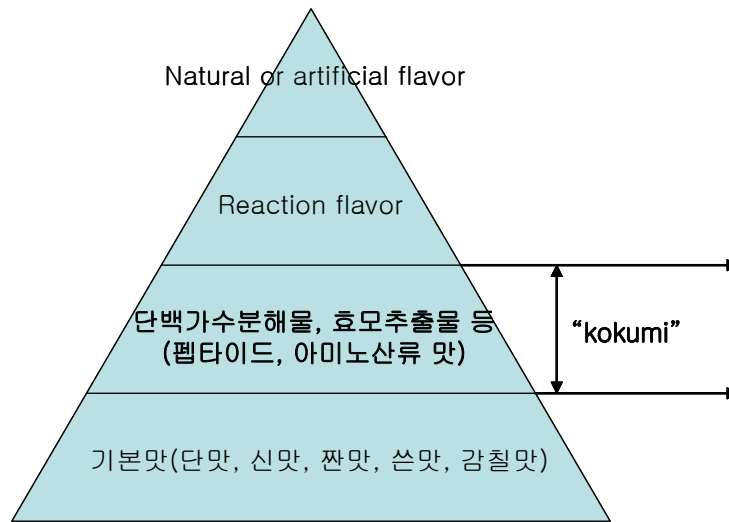
- 한국적인 맛을 가미한 천연조미소재 개발로 국내 수요 충족 및 해외 수출 품목 육성
- 국내산 우리밀, 양파, 마늘 농가의 소득증대와 관련 산업의 발전에 기여
- 우리 입맛에 맞는 kokumi를 제조함으로써 국내 식품산업의 향상에 기여
- 안전성, 기호성에 초점을 두어 소비자의 편익에 이바지함
- 천연 조미소재 개발에 대한 기초자료로 활용함
- Kokumi 에 대한 특허 출원을 통한 국가경쟁력 확보함
- 건강 지향적인 천연조미소재 개발로 국민 보건 복지에 기여함

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 기술연구개발의 경제적·산업적 중요성

#### [경제적·산업적 중요성]

● **조미료**는 음식을 만드는 주재료인 식품에 첨가하여 음식의 맛을 돋우는 물질로 사용되어 왔으나 조류독감, 광우병(BSE), 돼지콜레라, 가축사료의 항생제, MSG, GMO 문제 등으로 소비자의 선택이 천연지향적, 건강지향적으로 변화하면서 국내 조미료산업은 정체기를 맞고 있다. 그러나 소비자들은 더욱 다양하고 세련된 ‘맛’을 요구하고 있으며, 바쁜 현대인이 손쉽게 일정한 맛과 향을 내기 위해 조미료의 사용은 불가피한 것으로 여겨진다. 따라서 조미식품업체들은 소비자의 선호도에 맞게 조미식품 제조에 천연추출물을 이용하고 있으나, **맛의 깊이나 농후감, 지속성이 부족하여 일본산 kokumi 제품으로 맛을 보강하고 있다.** 이에 no meat, no MSG, no HVP, non-GMO, low sodium 등의 특성을 갖춘 프리미엄급 천연조미료의 개발이 시급한 실정이다. 이에 식물성 단백질, 야채추출물 및 효모엑기스 원료를 이용하여 효소처리 공정과 Maillard 반응 등으로 고기향이나 고소한 향 등의 savory-type의 특성을 지닌 kokumi(고꾸미 : 5가지 기본 맛 외에 깊고 풍부하며 지속적인 맛을 의미하는 일본식 용어) 소재 개발이 요구된다.



Flavor pyramid에서의 kokumi

(출처: 아지노모토 “kokumi 조미료” 소개, 한국아지노모토(주)).

● **우리밀**은 1991년부터 “우리밀 살리기” 운동에 힘입어 2004년 우리밀 재배면적은 3800ha, 생산 물량은 고작 1만2600t에 불과하다. 그런데 그것마저 남아돌아 창고에 쌓여있다. 우리 밀을 안 먹는 이유는 값이 비싸기 때문이다(농민신문 2005년 5월 13일). 수입 밀은 비료도 많이 주

지만 맹독성 농약도 많이 뿌린다는 사실이 잘 알려져 있으며 재배과정 뿐만 아니라 수확이후에도 뿌린다. 그러나, **우리밀은 식약청 실험 등을 포함 수년에 걸친 농약 잔류시험에서 84종의 농약 전체가 전혀 검출되지 않았다.** 강원대 최면 교수팀의 연구결과에 의하면 **우리밀은 수입밀보다 인체 면역 기능이 2배나 높으며 항산화작용을 통한 항노화 효능이 월등히 높은 것으로 나타났다**((사)우리밀 살리기 운동본부). 최근의 웰빙과 무농약 유기농 돌풍으로 우리밀 밀가루의 경우 가격 경쟁력을 회복하고 있으나, 소비량이 적어 남아도는 실정이다. 따라서 **우리밀의 추가적인 소비 및 용도 개발이 절실하다.**

● *Allium* 속 식물인 **마늘과 양파**는 저장에 의해 물량조절을 시도하고 있으나, **가격의 폭등과 폭락으로 생산자와 소비자에게 많은 경제적 피해를 주고 있기 때문에 분해 농축하여 장기간 보존하거나, 마늘과 양파 고유의 맛과 향을 보유한 조미액을 만들어 다양한 식품첨가물로 용도를 개발하고 있다.** 특히 중국의 WTO가입이 예상됨에 따라 최근 품질이 개선되고 가격면에서 국산보다 월등한 경쟁력을 가지고 있는 **중국산 마늘과 양파 수입이 증가할 것으로 예상된다.**

● **양파**의 2006년 재배면적은 15,315ha, 생산량은 88만6천톤으로, 금년산 양파 저장량이 적고, 저장 물량도 소진된 상태이므로 2006년 9월 상품 kg당 도매가격은 작년 동기보다 크게 높은 850원으로 전망된다. 최근 식생활 패턴의 변화에 따른 수요량 증가로 재배면적과 생산량은 지속적으로 늘어나고 있으며, 채소류 중 증가율이 큰 품목이다. 중국산 도매가격은 202원/kg으로 국내산가격(509원/kg)에 비해 2.5배가 낮다. 중국산 건조양파의 경우 당도는 낮지만 건조 상태나 색깔이 양호하므로 라면스프, 혼합조미료 등의 부 재료로 국산보다 선호하고 있다. 국내 양파는 수확 후 저장출하 등 유통비용이 높아 단경기 가격경쟁력이 떨어져 수입증가 요인으로 작용할 수 있다. 또한, 전년도 가격동향에 따라 재배면적의 증감폭이 크고 기상여건에 따라 생산량 변동이 심한 편으로 저장 비용이 증가한다(양파연구소 [www.knrda.go.kr](http://www.knrda.go.kr)).

● **마늘**은 제3의 소득 작목이지만 내년(2008년)부터 수입이 자유화돼 생마늘로 판매하는 대부분의 농가들이 상당한 어려움을 겪을 것으로 예상되고 있다. 1999년 마늘 재배면적은 42416ha, 생산량은 483,778톤 이었으며, 연간 재배면적과 생산량은 큰 변동이 없었다. 2005년 연말부터 마늘 가격 안정화 차원에서 정부가 지속적으로 방출한 중국산 수입마늘이 본격적으로 가공되어 시장에 유통되면서 깎마늘 kg당 2,000원에 거래되고 있다(국산 깎마늘은 2,600원~3,300원). 저가의 중국산 깎마늘 유통으로 소비가 전환되면서 국내산 수요는 줄어들어 중국산 마늘 점유가 늘어나고 있으며, 이로 인해 산지 국내산 피마늘 거래가 매우 미미하게 이루어지고 있다. 더욱이 정부는 중국산 수입 마늘을 지속적으로 방출할 계획에 있어 당분간 중국산 위주의 소비가 지속될 것으로 예상된다(농수산물 유통공사 자료).

● **일본 조미료 시장**(일본 식품과 개발 2006년 12월호)은 발효조미료, 종합조미료 그리고 다양한 조미식품의 소재로 활용되는 천연조미료로 구분할 수 있다. **천연조미료는 소비자의 천연, 고급, 원물 지향에 부응하여 지속적으로 성장하여 왔다.** 지난 수년간 조미료시장의 주류는 풍미를 중시한 동식물 추출물이지만, 같은 추출물이라도 최근에는 보다 풍미지속이 큰 비농

축형이 신장 추세이고, 최근의 가장 큰 흐름은 kokumi감과 후미의 풍만감을 부여하는 펩타이드계 조미료, 조리감을 부여하는 쿠킹조미료, 씨즈닝오일 등의 이용도 활발해 지고 있다. 현재, 천연계 조미료 시장은 원료형을 생산량은 11만톤을 상회하고, 매출규모로는 1000억엔, 배합형까지 포함하면 생산량 16만톤, 매출 1,500억엔 수준이다. 그 중 70%를 점하는 것이 추출물 계열의 조미료로 최근 시장의 주류가 되고 있다.

▶ **펩타이드계 조미료**는 종래의 아미노산계 조미료만으로는 제공할 수 없던 펩타이드의 복잡하고 지속적인 맛을 요구하고 있다. **펩타이드계를 대표하고 있는 효모추출물과 효소 분해 조미료 등은 비약적인 신장**을 보이고 있다. 현재 개발이 계속되고 있는 새로운 타입의 효소분해형 조미료로서는 a) 코지균의 효소로 어육과 소맥 글루텐을 분해한 양조계, b) 기존의 hydrolyzed animal protein(HAP), hydrolyzed vegetable protein(HVP)를 대체하는 enzymatically hydrolyzed animal protein(EAP), enzymatically hydrolyzed vegetable protein(EVP)계, c) 수산추출물을 효소 처리하여 정미를 개량한 추출물 등 3가지로 분류할 수 있다.

▶ **야채 추출물**은 동물 추출물과 비교하여 단독으로는 정미성이 떨어지나, 뼈추출물과 함께 사용하면, 상승 작용으로 kokumi 부여 효과가 있다. 또한 야채의 향기로 인한 풍미 개선효과가 기대될 수 있으며 건강, 천연지향 등으로 수요가 증가하고 있다. 현재 시장규모는 약 7천톤에 70억엔 정도이다.

주요 야채엑기스 생산량

종류	생산(톤/년)	종류	생산(톤/년)
양파엑기스	1,500	양배추엑기스	700
당근엑기스	900	마늘엑기스	500

▶ 한편 근래에 **효모 추출물**의 이용도 활성화 되는 추세이다. 라면소스와 레토르트식품 등에서는 고기 유래의 향과 정미 균형으로 인해 널리 사용되나 특유의 냄새인 효모취를 억제한 추출물 개발, 여과기술에 의한 청정성 향상 및 담색화, 분해기술에 의한 정미성분의 함량 증가 등으로 인해 이용범위가 점차 넓어지고 있다. 일본 내 수요량은 단품형으로 약 1만 2천톤, **120억엔의 시장**이다. 효모추출물은 액체와 페이스트가 4천2백톤, 분말형이 3천8백톤, 배합형이 1천7백톤, 수입이 2천5백톤이다.

● **국내 조미료 시장**은 대상(주)의 미원, CJ(주)의 아이미 등으로 대표되는 **발효조미료**의 내수시장은 성숙기를 거쳐 소폭 감소세를 보이는 쇠퇴기에 접어들고 있다. MSG에 대한 기피현상이 주원인으로 판단된다. 2002년 기준 전체 시장규모는 1만 9천톤 정도이며, 가정용은 약 8천톤 규모로 물량기준으로는 전년대비 7% 정도 감소한 것으로 추정된다. 주요 원인은 가정에서의 조리 감소와 종합조미료 혹은 천연조미료로 전환되는 데서 기인한 것으로 보인다(식품산업 2004년 9월호).

**종합조미료** 시장은 CJ에서 다시다 제품을 출시한 후 대상에서 맛나, 감치미를 출시하면서 2002년 기준 시장규모는 2천억원에 이르고 있으며, 가정용 시장규모는 약 1만1천톤, 700억 규모이다. 업소용 시장은 물량 기준으로 약 2만 8천톤, 약 **1,400억** 규모이다. 2003년 들어서는

전반적으로 성장둔화 내지는 정체현상을 보이고 있다. 최근 이 시장에서 주목할 점은 기존 CJ나 대상에서 주도하던 시장에 맞다시, 청다시 등 군소업체들이 생산한 제3의 비(非)브랜드제품들이 업소용 식자재상을 중심으로 연간 약 3천톤 규모를 형성했다는 것이다. 가정용에 비해 가격이 상대적으로 중요한 저가 도매시장에서 빠른 속도로 증가하고 있다. 이제 업소용 시장에서는 종합조미료도 가격경쟁 시대로 접어들고 향후 차별화 요소가 없으면 점차 부가가치가 떨어질 것으로 생각된다.

최근에는 소비자의 천연선호 및 고급화 경향에 따라 CJ는 "가쓰오다시다", '해맑은 멸치다시다', "다시다 순" 등과 같은 프리미엄급 조미료와 '떡국에 좋은 사골국물', '냉면육수' 등과 같은 액상제품을 출시하는 등 부가가치 극대화를 도모하고 있다. 대상은 종합조미료 제품으로는 "감치미", "맛나" "버섯 감치미"를 출시하여 시장영역을 개척해 나가고 있다(식품산업 2004년 9월호).

## 제 2 절 기술연구개발의 필요성

● 우리밀을 가공한 밀가루에는 조미소재로 활용 가능한 glutamine이 40% 이상 포함되어 있어 고 glutamic acid 함유한 umami(지미) 소재로서 개발할 가치가 있다. 우리밀은 신도불이 바람과 우리밀 살리기 운동 등에 힘입어 우리밀의 재배 및 이용이 촉진되고 있으나 수입산에 비해 가격이 비싼 것이 단점이다. 우리밀은 외국 무농약 밀가루 가격에 비해 월등히 싼 값 (우리밀 2.5달러, 일본산 무농약 5달러, 미국산 무농약 7달러)으로 단백질과 비타민 B1이 많고 다른 곡물에 없는 글루텐이 많아 가공에 용이하며, glutamic acid 함량이 높은 고부가가치 umami 소재로의 용도 개발이 용이하다.

● 마늘과 양파는 *Allium* 속 식물로 특유의 맛과 향기는 식품의 조리 및 가공에 중요한 향신료 조미료 소재로 이용되고 있다. 마늘과 양파는 주로 저장에 의해 물량조절을 시도하고 있으나, 중국산 수입 및 가격의 폭등과 폭락으로 생산자와 소비자에게 많은 경제적 피해를 주고 있기 때문에 장기간 보존하거나, 다양한 조미소재 또는 식품첨가물로의 용도 개발이 필요하다. 야채류와 스파이스류의 향미를 증강시키는 물질로는 양파와 마늘에 함유되어 있는 황함유물질이 고부가가치 조미성분으로 평가되고 있다. 특히 glutathione는 지미가 존재하는 식품에서 농후감과 지속성을 부여해 주는 특징이 있어 농후감과 지속성을 부여하는 훌륭한 kokumi 소재이다.

● 국내 조미료 시장은 MSG, 핵산과 같은 발효조미료와 다시다, 감치미 등으로 대표되는 종합조미료가 주류를 이루고 있는데, 모두 후반 성숙기에 진입한 제품으로 시장 자체가 정체되어 있고 가정에서의 소비가 점차 줄어드는 실정이다. 하지만 외식과 단체급식의 증가로 업소용 시장에서는 소비가 지속적인 증가세를 나타내고 있다.

● 일본 및 유럽업체들은 밀, 대두 등의 전통 양조 발효물 및 효소분해물, 야채 및 수산 추출물, 개량 효모 분해물 및 추출물을 이용하여 고부가가치의 천연 조미소재를 개발하였다. 이러한 소재들은 기존 umami 제품보다 맛의 깊이, 농후감, 지속성을 부여하는 고부가가치 kokumi



조미소재로 개발·판매되고 있다. Kokumi 소재는 제품에 초기 강한 풍미 및 편치력을 주는 “임팩트 타입”, 전체적인 맛이 풍부하고 지속성이 있는 “농후감/지속성 타입”과 부드러운 깊은 맛이 조화로운 “조화타입”이 있다. 현재 우리나라에서 사용되는 조미소재 중에 깊고 농후하며 지속성을 부여하는 kokumi 소재는 모두 일본 및 유럽 제품이다.

● 새로운 펩타이드계 조미소재 연구는 kokumi 부여 효과에 관심이 집중되면서 일본의 경우 아지노모토와 교와를 중심으로 코지균과 소맥 글루텐의 효소분해물 개발과 효모추출물의 개발 등으로 연구가 진행되어 Koji-Aji, Super YE, CP-200 등으로 제품화가 이루어지고 있다. Kokumi는 원료의 추출·정제물에서 기인하는 것과 원료 단백질이 분해되어 생성되는 펩타이드와 아미노산, pyrazine, GSH (L-glutamyl-L-cysteinylglycine; tripeptide)과 핵산 등에 의해 생성되는 것으로 알려져 있다. 따라서 펩타이드와 아미노산으로부터 부여되는 kokumi 특성이 매우 중요하다.

▶ Kokumi 생성을 위해 사용되는 원료 단백질의 glutamine, cysteine, glycine은 GSH의 전구물질이 되고, 특히 glutamine은 glutamic acid와 암모니아로 효소적 가수분해 되어 pyrazine과 핵산 생성을 위한 전구물질로 이용된다. 또한, 소비자의 요구에 부응하고 조미료 산업의 부가가치 향상과 첨단산업화를 위해 나노기술을 이용한 조미 신소재 연구, 초미 분쇄기술, 미세 캡슐화, 생물공학 기술이 활용된 발효 및 효소분해에 의한 펩타이드계 조미소재 개발 등의 새로운 소재가 개발되고 있다.

▶ 펩타이드(일반적으로 분자량 10,000이하)는 다양한 조합의 아미노산이 펩타이드 결합에 의해 중합물을 형성하고 있는 것으로, 단백질에 비해 소화흡수성이 우수하며 물성개량 효과 및 생리활성 등의 효과가 나타난다고 알려져 있다. 따라서 단백질을 가수분해도(degree of hydrolysis, DH)를 조절해서 효소분해 했을 경우 펩타이드와 아미노산의 조성이 다를 것이며, 이는 결국 반응에 의해 다양한 생리활성을 나타내는 kokumi를 생성하게 된다. 또한 다양한 가수분해도의 단백 가수분해물로부터 kokumi 펩타이드와 생리활성 펩타이드를 분리하고 이들의 상관관계를 밝혀냄으로써 우수한 kokumi 특성 및 생리활성이 부여된 펩타이드 생성을 기대할 수 있다.

● 현재, 일본에서는 소비자의 요구에 부응하여 kokumi 등의 천연조미료를 개발하였고, 식품산업계에서 그 사용이 점차 증가하고 있다. 우리나라에는 깊고 농후하며 지속성을 부여하는 고부가가치 조미소재가 개발되어 있지 않아 일본과 유럽업체가 개발한 소재를 이용하여 조미식품의 맛을 보강하고 있는 실정이다. 따라서 국내에서도 전통 식품산업과 바이오기술을 접목한 새로운 천연조미소재 개발에 동참해야만 세계화 시대의 경쟁에서 살아남을 수 있다.

● 샘표식품(주)는 60년 전통의 양조 발효 및 효소분해 기술들과, 추출 및 분리 기술들을 핵심기술로 보유하고 있다. 이러한 기술들을 접목시켜 우리밀, 양파, 마늘, 효모엑기스를 이용한 고부가가치 조미소재 개발은 우리밀 발효물 및 분해물, 양파 및 마늘 추출·분리물의 이용 및 소비를 확대할 수 있다. 또한, 값싼 미국산 밀 또는 저가 중국산 마늘과 양파의 수입에 대비하여 가격경쟁력을 확보할 수 있다. 본 과제의 기술 개발은 새로운 맛을 창출하는

고부가가치 조미소재로서 수입대체 및 수출 품목으로 개발하여 생표식품(주)의 차세대 성장 동력으로 발전시키고자 한다.

◎ 본 연구의 성공적인 수행은 외국제품에 의존하는 맛 보강 조미소재를 개발함으로써 수입 대체, 수출 증진 및 우리밀, 양파, 마늘의 소비 확산에 따라 경제적·산업적으로 큰 이익을 가져올 수 있으리라 사료된다.

### 제 3 절 국내외 기술개발 현황

\* 국내·외 관련분야에 대한 기술개발현황과 연구결과가 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치 등을 기술

(국내 현황) 유사제품 및 기술개발 사례 없음.

(국외 현황)

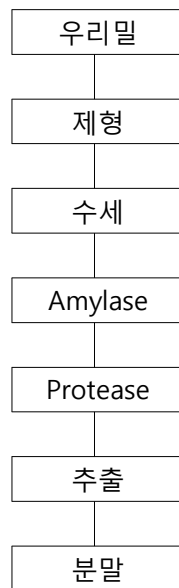
연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
아지노모토	<ul style="list-style-type: none"> <li>발효밀단백질, 효모엑기스를 원료로 한 분말타입</li> <li>소맥과 대두를 원료로한 범용성 분말타입</li> </ul>	"KOJI-AJI", "KOJI-AJI S" 제품화하여 판매하고 있음
	<ul style="list-style-type: none"> <li>양파, 마늘 유래 glutathione의 정미성 확립</li> <li>환원 glutathione, IMP, GMP, 유리 아미노산이 풍부하여 우마미에 농후감과 지속성을 부여</li> </ul>	"슈퍼효모엑기스 YE" 제품화하여 판매하고 있음
대일본 제당	<ul style="list-style-type: none"> <li>소맥글루텐 원료(EVP)를 분해시킨 펩타이드에 의한 깊은 맛 부여, 마스크 효과 등 정미성 부여</li> </ul>	"엔잡V" 제품화하여 판매하고 있음
닛켄(日研)푸드	<ul style="list-style-type: none"> <li>소재를 살린 순수한 맛을 중시한 엑기스, 조리공정 유래의 향미를 중시한 엑기스 (로스트, 소테), 야채 기름추출시즈닝 오일 등의 사용 증가</li> </ul>	"야채 부용" 제품화하여 판매하고 있음
도카이 (東海)물산	<ul style="list-style-type: none"> <li>일본산 양질의 신선한 야채를 가공하여 풍미가 풍부한 각종 야채 엑기스 공급(양파, 마늘, 양배추, 감자 등)</li> <li>야채엑기스와 축육엑기스를 mix하여 조리감이 높은 야채믹스</li> </ul>	"야채분말", "야채믹스" 제품화하여 판매하고 있음
교와발효푸드	<ul style="list-style-type: none"> <li>효모엑기스를 Maillard peptide화하여 풍부한 북잡미와 지속성을 부여</li> <li>고핵산, 고펩타이드 효모엑기스 -&gt; 소량 첨가로 핵산 유래의 우마미와 펩타이드 유래의 진한 맛을 균형 있게 부가 가능</li> </ul>	효모엑기스 교와"시리즈로 "효모엑기스교와 MP-310", "효모엑기스교와 N-20"발매 3년 후 100톤의 판매량 예상
고진(흥인)	<ul style="list-style-type: none"> <li>우마미 성분이 풍부하고 효모냄새 低, 고핵산으로 진한 맛</li> <li>효모엑기스와 식품원료를 조합하여 가열반응시켜 비프, 치킨, 포크 풍미 재현 - 각종 식품의 깊은 맛과 조리감을 부여</li> </ul>	"아로마일드", "어디필스" 제품화하여 2006년 판매량 11,150톤(내수:약 950톤, 수출:약 200톤)
DSM푸드 스페셜티	<ul style="list-style-type: none"> <li>고핵산 함유 정미 증강 타입의 효모엑기스</li> <li>저지방, 저나트륨 설계의 정미증강 제품</li> <li>Vegan, Non-GMO, Kosher, Halal 인증</li> </ul>	"Maxarome@", "Maxarome@ select" 제품화하여 판매하고 있음

## 제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

### 제 1 절 우리밀, 양파, 마늘, 조미용 효모 추출을 이용한 Kokumi 조미소재 개발

#### 1. 재료 및 방법

##### (1) 우리밀 제조방법



##### (2) Protease 생산 균주 선별

2%의 casein을 함유한 potato dextrose agar(PDA)배지 및 LB 배지에 전통 간장, 된장 발효물에서 시료를 취해  $1 \times 10^2$ 으로 희석하여 도말한 후 40℃ 배양기에서 3일간 배양하면서 clear zone을 형성하는 균주를 1차 선별한 후, 50℃, pH 6~8사이에서 왕성한 protease를 분비하는 균주를 선별한다. 선발균주들은 10% 우리밀 단백질의 분해능을 비교하여 최종 선발하였다.

##### (3) Yeast cream 제조

총 68종의 선별 대상 균주를 30℃ 진탕배양기에서 30시간 배양하여 cell growth(OD660)를 측정하였다. cell 농도를 조절하기 위하여 멸균수로 희석하여 OD값을 동일하게 보정한 후, 배양액을 3000 rpm/10 min 동안 원심분리 후 상등액을 제거하였다. 멸균수를 이용하여 3회 반복하여 세척하였다. 상등액을 버리고 균체(이스트 크림)만 회수하여 자가소화에 이용하였다.

##### (4) 자가소화(autolysis)

Yeast cream과 멸균수를 이용하여 최종 20%(w/v) 농도로 현탁액을 제조하였다. 현탁액에 1%(w/v) 정제소금(NaCl)와 1%(w/w)을 첨가하여 50℃ shaking incubator에서 48 h 동안 진탕(150 rpm)하였다. 100℃에서 5분간 살균한 후, 3000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액

을 회수하여 관능검사에 사용하였다.

(5) 선별 대상 균주에 대한 생육특성

수집된 균주 중에 1차로 선별된 균주들의 생육특성을 검토하기 위하여 30°C 진탕배양기 (Rotary Shaking Bath, kumsung science corp)에서 30h 동안 배양하였다. 배양 종료 후, 균체농도는 50 CONC, UV-Visible spectrophotometer(Varian)를 이용하여 600 nm에서 측정하였다. PH 변화는 pH meter (HANNA instruments, Model pH210 microprocessor pH meter, Italy)를 이용하여 측정하였다.

(6) NTG 및 UV 처리에 의한 Protease 생산균주 개량

앞에서 분리한 균주를 이용하여 NTG의 농도에 따라 생존율 1%이하의 MIC 농도를 구한 후, 최종 선별된 Protease 생산균주의 포자를  $1 \times 10^3$ 으로 희석하여 N-methyl-N'-nitro-nitrosoguanidine(NTG) 농도별로 도포된 plate상에서 배양한다. 가장 왕성하게 성장하면서 clear zone을 크게 형성하는 균주를 선별한다. 또한, 60cm 거리에서 UltraViolet(40Watt)에 의한 생존율 1% 이하의 처리시간을 구한 후, 배양하면서 clear zone을 형성하는 균주를 선별한다. 변이균주는 대조구와 비교하여 50°C, pH 6~8사이에서 가장 protease 활성이 우수한 균주를 최종 선별한다.

(7) 일반성분 분석

A.O.A.C 방법(AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC Intl. 15th ed.; Kenneth, H., Ed.; Chapter 11. pp. 1-31. Association of Official Analysis Chemists, Washington, DC, USA, (1990)) 에 준하여 수분함량은 105°C 상압 가열건조법, 조단백질은 Kjeldahl 질소 정량법, 조지방은 Soxhlet's 추출법, 조회분은 550°C 직접 회화법을 이용하여 분석하였다. 이때 염도는 염분 농도계(Model NS-3P, Merbabu Trading Co., Ltd., Japan)를 사용하여 측정하였다.

(8) 아미노산 조성 분석

고온 단기 반응물(STFS)의 아미노산 조성은 AccQ-Tag 법을 이용하여 분석하였다. 즉, 고온 단기 반응물(STFS) 0.5g에 증류수를 가하여 초음파처리(sonication)한 용액을 50 mL 취하여 붕산염 완충액(borate buffer) 350 mL와 AccQ-Tag 유도체시약 100 mL을 넣어 잘 혼합한 후 55°C에서 10분간 유도체화 하였다. 유도체화 되어진 시료를 각각 10 mL씩 취한 후 HPLC의 자동시료주입기에 안치하여 Table 1과 같은 조건으로 분석하였다. 표준물질은 40 mL, 시료 용액은 10 mL을 HPLC에 주입하여 아미노산을 분석하였으며, 컬럼(column)은 AccQ-Tag C<sub>18</sub>(Millipore Co. Milford, MA, USA) 아미노산 분석 컬럼(amino acid analysis column)을 사용하였으며 이동상은 0.14 M 아세트산 나트륨 (sodium acetate)과 10% 트리에틸아민 (triethylamine)을 1% 인산 (phosphoric acid) 으로 pH 5.02를 맞춘 용액(eluent A)과 물과 아세토니트릴(acetonitrile)을 4:6으로 혼합한 용액(eluent B)을 선형 구배(linear gradient)로 용출하였다.

Table 1. HPLC analysis condition for seasoning ingredients

항 목	실 험 조 건
장비(Instrument)	Waters 1525 Binary Pump, Waters 717 plus Autosampler, Waters 474 Fluorescence detector
컬럼(Column)	AccQ-Tag column C <sub>18</sub>
컬럼크기(Column size)	3.9 × 150 mm
용출용매 A(Eluent A)	0.14 M Sodium acetate, 10% triethylamine in water, pH 5.02
용출용매 B(Eluent B)	Acetonitrile : water = 6:4
구배(Gradient)	AccQ-Teg method
유속(Flow rate)	1.0 mL/min
가동시간(Run time)	45 min
파장(Wavelength)	ex. = 250 nm, em. = 395 nm

(9) 마늘, 양파 추출법

마늘과 양파 각각 1kg에 물 4L을 첨가하여 121℃, 15분간 열처리하고 homogenizer로 파쇄하였다. 다시 121℃, 15분간 열처리 후, 3500rpm, 30분간 원심분리하였다. 상징액을 회수하여 감압농축기로 500ml가 되도록 농축하였다. 농축액은 이취를 제거하고 Spray Dryer로 분무건조하였다.

(10) 우리밀 가수분해물 제조

우리밀 단백질을 증자(120℃, 1atm, 10분)하고 증자된 단백질에 곰팡이 접종하고 30℃에서 2일간 배양하였다. 소금을 20% 첨가하고 45℃에서 3일간 반응시킨다. 반응물을 1차 여과 후 90℃에서 2시간동안 살균 후, 2차 여과한 후, spray dry하여 우리밀 단백질분해물을 얻었다.

(11) 균주 및 배지

개량한 효모 *Candida utilis* 및 이들 균주를 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(NTG)으로 처리하여 얻은 영양요구성 변이주로서 table 2과 같다. 영양요구성변이주 분리와 원형질체 생성을 위해서 생성배지(production medium)에서 20시간 진탕배양한 세포를 사용하였고, 세포벽 재생을 위해서는 재생배지(regeneration medium)에서 5~7일간 배양하였으며, 이들의 배지 조성은 Table 2와 같다.

Table 2. Chemical composition of production(PM), complete(CM) and minimal medium(MM).

Ingredients	PM(%)	CM(%)	MM(%)
Glucose	4	2	2
Yeast extract	0.2	0.2	
Bacto tryptone		0.2	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.3		0.2
Polypeptone		0.1	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1	0.1	0.1
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.05	0.05	0.05
KCl	0.05	0.05	0.05
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.001	0.001	0.001

(12) 영양요구성 변이주의 분리

영양요구성변이주는 Alderberg(1965), Lederberg(1952), Holliday(1956) 등의 방법에 준하여 분리하였다. *Candida utilis* SEM4-2와 SEM4-3의 야생주를 PM배지에서 배양하여 이 균체를 식염수로 씻은 다음 0.5mg/ml의 NTG가 들어있는 최소배지(MM)에 현탁하여 30℃에서 30분간 반응시켰다. NTG처리된 균체를 식염수로 2번 원심분리하여 씻은 다음 완전배지(CM)에 도말한 후 완전배지에서 생육된 콜로니를 다시 완전배지와 최소배지에 이식하여 최소배지에 자라지 않음을 3회 반복 확인한 후 영양요구성변이주로 선별하였다. 이렇게 분리된 영양요구 변이주를 여러 가지 아미노산과 비타민, 염기 등이 일정량 혼합된 최소배지에 이식하여 영양요구 물질을 확인하였다.

(13) 원형질체 생성과 세포벽 재생

원형질체생성은 Fournier(1977) 등의 방법을 사용하였는데, 원심분리하여 회수한 균체를 0.7M KCl, 20mM CaCl<sub>2</sub>와 99mM Tris-HCl이 함유된 완충액(pH 8.0) 10ml에 현탁하여 30℃에서 10분간 처리하였다. 다시 원심분리하여 회수한 균체에 1.2M KCl(pH 8.0) 2ml, 50mM β-mercaptoethanol 1ml 및 세포벽용해 효소액(Westase 10 units/ml) 1ml를 가하여 현탁한 후, 30℃에서 60분간 반응하였다. 이때 세포벽 용해효소는 Westase (takara Co.)을 사용하였다. 원형질체생성 정도는 Yamamura(1975) 등의 방법을 사용하여 용균률(lysis ratio)로 나타내었으며 공식은 다음과 같다.

$$\text{Lysis ratio(\%)} = \frac{\text{O.D.}(t_0) - \text{O.D.}(t)}{\text{O.D.}(t_0)} \times 100$$

이때 O.D.(t<sub>0</sub>)는 최초의 세포현탁액을 증류수로 희석하여 570nm에서 측정된 흡광도이고, O.D.(t)는 t시간 동안 반응시킨 후, 세포현탁액의 흡광도이다. 생성된 원형질체는 0.7M KCl, 20mM CaCl<sub>2</sub>와 99mM Tris-HCl이 든 완충액(pH 8.0)으로 세척한 후, RM배지에서 중층도말하여 재생시켰으며, 재생률(regeneration ratio)은 0.6M KCl이 함유된 배지와 함유되지 않은 배지에서 자란 콜로니의 차이를 최초의 원형질체 수에 대한 백분율로 나타내었으며, 공식은 다음과 같다.

$$\text{Regeneration ratio(\%)} = \frac{\text{Colony number on KCl CM} - \text{Colony number on CM}}{\text{Initial protoplast number}} \times 100$$

(14) 원형질체 융합

원형질체 융합은 Fournier(1977) 등의 방법을 사용하였다. 형성한 *C. utilis*의 원형질체를 각각 1.5 X 10<sup>7</sup>/ml가 되게하여, 원형질체를 동비율(1:1)로 혼합한 후, 원심분리하여 회수한 균체에 40% PEG 4000, 50mM glycine, 20mM CaCl<sub>2</sub>와 Tris-HCl이 든 완충액(pH 8.0)을 3ml 첨가하여 현탁시키 후, 30℃에서 75rpm으로 교반하며 30분간 반응하였다. 여기서 0.7M KCl을 넣어

희석, 세척한 후, RM배지로 증충도말 하였다. 융합세포를 PEG를 뺀 융합배지로 2회 세척한 다음 최소배지에 도말하고 증충한 후 30℃에서 5일간 배양하여 재생시켰다. 이때 PEG를 처리하지 않은 각각의 원형질체를 RM배지에 증충도말하여 야생균주로의 복귀돌연변이 여부를 항상 조사하였다. 세포융합빈도(fusion frequency)는 최소배지(KCl MM)에 나타난 융합세포의 콜로니 수를 완전배지(KCl CM)에 나타난 콜로니 수로 나눈 값이다.

Colony number on KCl MM

Fusion frequency= \_\_\_\_\_

Colony number on KCl CM

(15) 핵산 생산용 yeast 균주 개량 및 생산

YPD 배지에서 24시간 배양한 배양액을 5000rpm에서 5분간 원심분리한 후 균체를 회수, 세척하였다. 회수균체를 EMS(ethylmethane sulfonate)처리하여 30℃에서 교반, 반응시켰다. 200개의 colony가 형성되도록 희석 후 YPD 평판배지에 도말하여 생존율이 20%가 될 때의 변이주를 선별하였다. YPD에 tooth picking하여 잘 자라는 변이주를 선별하였다. 선별한 변이주를 YPD 배지에서 배양하여 높은 함량 핵산(RNA) 변이주와 모균주의 배양결과를 비교하였다.

(16) 고 glutathione 생산용 yeast 균주 개량 및 생산

YM(1% glucose, 0.5% peptone, 0.3% yeast extract, 0.3% malt extract) 액체배지를 사용하여 30℃에서 36시간 진탕배양 시킨 종균배양액을 YM 액체배지에서 1%(v/v) 접종하고 24시간 진탕배양 한다. 배양액 6ml을 원심분리하여 균체를 생리식염수 6ml에 현탁시킨 후 petri-dish에 넣어 UV lamp(40 Watt)로부터 30cm의 거리에서 6분 동안 UV를 조사하였다. 조사한 균액을 sodium azide가 30ug/ml 첨가된 YM 액체배지에 2%(v/v) 접종하였다. 25℃에서 4일간 진탕배양한 후 YM 고체배지에 도말하여 균주의 생육유무를 확인하였다. 개량균주에 의한 glutathione 생산조건 검토는 원균주의 최적배지를 사용하여 시간, 온도 및 pH 조건을 중심으로 glutathione 생산에 필요한 영양원의 종류와 농도를 최적화하였다.

(17) Glutathione 함량분석

17-1) Alloxan reagent method: 0.25 M phosphate buffer(pH 7.6) 3.5 mL, 0.1 M glycine 용액 0.5 mL, 0.1% Alloxan 시약 1.0 mL과 시료 1.0 mL을 혼합하여 20분간 반응시킨 후 305 nm에서 흡광도를 측정하였다.

17-2) HPLC method: HPLC system Beckman SYSTEM의 SHISEIDO CAPCELL PAK C<sub>18</sub> (4.6 x 250 mm) column을 사용하여 Phosphoric acid와 CH<sub>3</sub>CN (64:36)을 이동상으로 하여 분석하였다.

(18) 건조균체량

배양액 10ml를 취하여 무게를 알고 있는 원심분리용 튜브에 넣고 원심분리기를 사용하여 3000rpm으로 15분간 원심 분리한다. 균체를 1차 세척을 위하여 원심 분리된 튜브 내에 들어 있는 상등액을 제거하고 증류수 10ml를 가하고 다시 3000rpm에서 15분간 원심 분리하였다. 1

차 세척과 같은 방법으로 2회 더 세척한 다음 상등액 제거한 후, 균체가 들어 있는 튜브를 온도가  $100\pm 1^{\circ}\text{C}$ 로 유지되고 있는 건조기에 넣어서 12시간 동안 건조시킨 다음에 식혀서 튜브의 무게를 측정하여 건조 균체량을 구한다.

(19) 융합균주로부터 고 glutathione 및 핵산 생산, 추출

Yeast, *Candida utilis*의 종배양(seed culture)은 YPD(20g glucose, 20g peptone, 10g yeast extract) 배지에서 초기 pH 6.0,  $30^{\circ}\text{C}$ , 200rpm에서 20시간 진탕 배양하였다. 본 배양 배지는 1리터당 30g glucose, 8g ammonium sulfate, 3g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.25g  $\text{MgSO}_4$ 을 첨가하여 제조하였다. 본 배양은 5L fermentor을 이용하여 working volume 3L에 종배양액 10%을 접종하여 배양하였다. pH는 5.5로 3M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 와 3M NaOH를 가지고 일정하게 조절하였으며, 교반속도는 300rpm이었다. 반응이 끝난 배양액은 원심분리(400 X g, 10분,  $4^{\circ}\text{C}$ )하여 침전 처리하여 생성된 glutathione을 회수하였다.

(20) 관능검사(패널 훈련 및 통계분석)

우리밀, 양파, 마늘, 효모추출물에 대한 묘사분석 패널은 묘사분석에 경험이 있고, 관능검사에 관심과 참여 의지가 있는 샘플식품(주)의 훈련된 관능검사원은 1주일에 3일씩 12주간 훈련시키고, 매회 훈련에 소요된 시간은 평균 1시간이었다. Kokumi 조미소재의 관능적 특성들에 있어서 유의적인 차이가 있는지 알아보기 위하여 분산분석을 실시하였고, 그 결과에 따라 평균 간에 Duncan's multiple range test를 수행하였다( $\alpha = 0.05$ ). 또한 분산분석 결과를 이용하여 spider web을 그렸다. 모든 통계분석은 SPSS for Windows 12.0(SPSS Inc., Chicago, USA)을 사용한다.

(21) 우리밀, 양파, 마늘, 효모추출물의 관능검사

(가) 실험재료

시료는 추출물의 종류에 따라 WH1, WH2, WH3, 마늘추출물, 양파추출물, 효모추출물을 이용하였다(Table 3).

(나) 추출물의 묘사 분석

① 패널 선정 및 훈련

추출물들에 대한 묘사분석 패널은 묘사분석에 경험이 있고, 샘플식품(주) 관능검사원으로 활동하고 있는 연구원 및 검사원 15명으로 구성하였다. 선발된 관능검사원은 1주일에 1일씩 12주간 훈련받았으며, 매회 훈련에 소요된 시간은 평균 1시간이었다.

관능검사원의 훈련기간 중에는 추출물에 대한 평가 방법을 정립하였으며, 평가할 시료의 관능적 특성에 대해 용어를 개발하고 정의(Table 4) 내렸다. 또한 각 특성을 대표하는 표준물질(Table 5)을 확립하였다. 훈련은 검사원이 시료와 평가 방법에 익숙해지고, 특성 강도평가에 대해 안정된 결과를 보일 때까지 진행하였다.



Table 3. A type of bio advanced materials used in experiment

시 료	원 료	비 고
WH1	WH1 1 kDa 이하 분말	효소 분해
WH2	WH2 1~5 kDa 분말	효소 분해
WH3	WH3 5 kDa 이상 분말	효소 분해
GE	Garlic extract 100%	열수 추출
OE	Onion extract 100%	열수 추출
YE	Yeast extract 100%	열수 추출

Table 4. Definitions of the descriptive attributes for bio advanced materials

특 성	정 의
<b>의 관</b>	
색의 진한 정도 (Intensity of Brownness)	갈색의 진한 정도
<b>향미</b>	
전체적인 향미 강도 (Overall intensity of flavor)	향, 기본적인 맛 및 입촉감의 조합으로 나타나는 강도
단맛 (Sweet taste)	혀에서 느껴지는 설탕 등 단 물질과 관련된 맛
짠맛 (Salty taste)	혀에서 느껴지는 나트륨 이온과 관련된 맛
신맛 (Sour taste)	혀에서 느껴지는 산의 맛
쓴맛 (Bitter taste)	혀 뒤쪽에서 후미로써 느껴지는 카페인, 퀴닌 등의 쓴 맛
MSG 맛 (MSG taste)	혀 뒤쪽에서 느껴지는 MSG 특유의 맛
맛의 강도	MSG의 맛을 높여주는 맛
맛의 지속성	맛이 지속되는 시간
조화로운 맛	전체적인 맛은 강하나 특정한 맛이 튀지 않는 맛
비린 향미 (Agar)	한천 배지에서 느껴지는 비린 향미
발효 향미 (Fermented)	활성화된 밀과 관련된 향미
옥수수차 향미 (Roasted corn tea)	옥수수에서 나는 구수한 향미
조선간장 향미 (Korean soy sauce)	간장에서 나는 간장 특유의 향미
치킨엑기스향미 (Chicken extract)	치킨엑기스에서 나는 치킨 특유의 향미
마늘엑기스향미 (Garlic extract)	마늘엑기스에서 나는 특유의 향미
양파엑기스향미 (Onion extract)	양파엑기스에서 나는 특유의 향미
카라멜 향미(Caramel)	당을 가열시 나는 카라멜과 관련된 향미
화학적 향미(Chemical)	인공적인 화학약품 향미
종이 탄 향미(Burnt paper)	종이 등이 탄 향미
<b>텍스처</b>	
점도 (Viscosity)	액상 시료가 입 안에서 흐를 때 시료의 내부 저항 정도
뽀은 감각 (Astringency)	탄닌에 의해 느껴지는 혀가 오므라 들거나 마른 느낌
금속성 (Metallic)	철이나 구리 등과 같은 금속에서 나는 감각

Table 5. Reference samples for the descriptive attributes of bio advanced materials.

특성	표준물질
<b>외관</b>	
색의 진한 정도	갈색의 진한 정도
<b>향미</b>	
전체적인 향미 강도 (Overall intensity of flavor)	
단맛 (Sweet taste)	5% sucrose solution
짠맛 (Salty taste)	1% sodium chloride solution
신맛 (Sour taste)	0.08% lactic acid solution
쓴맛 (Bitter taste)	0.05% caffeine solution
MSG 맛 (MSG taste)	0.3% MSG solution
비린 향미 (Agar)	1.5% 한천배지
발효 향미(Fermented)	fermented sugar solution for 24 hours by 1.5g wheat
옥수수차 향미(Roasted corn tea)	옥수수차 10g + 증류수 300ml
조선간장향미(Korean soy sauce)	10% 조선간장 수용액
치킨엑기스향미 (Chicken extract)	0.3% 치킨엑기스분말 수용액
마늘엑기스향미 (Garlic extract)	0.3% 마늘엑기스 수용액
양파엑기스향미 (Onion extract)	0.3% 양파엑기스 수용액
카라멜 향미(Caramel)	caramel flavor
화학적 향미(Chemical)	0.01% Creotose
종이 탄 향미(Burnt paper)	탄 종이
<b>텍스처</b>	
점도 (Viscosity)	0.1% 아라비아 검 수용액
뽀은 감각 (Astringency)	0.1% tannic acid solution
금속성 (Metallic)	stainless steel spoon

② 시료 준비 및 제시

20g의 시료를 상온(27±2℃)의 물 1L에 넣고 시료가 녹을 때까지 충분히 저어 주었다. 준비된 시료를 검사원 개인별 비커(50ml)에 50ml씩 담아 상온에서 제시하였다. 각 시료의 용기에는 검사물에 대한 편견을 없애기 위하여 난수표에서 추출한 세 자리 숫자를 표기하였으며, 시료 제시는 랜덤하게 하였다. 또한 평가 사이에 입을 헹글 수 있도록 정수기(Ceramic filter System, Supercap, Dalton, Fariey Industrial Ceramics Ltd., London, U.K.)를 통과시킨 상온(27±2℃)의 물을 함께 제시하였다. 향미 특성 평가를 위한 시료는 색의 차이에서 오는 편견을 배제시키기 위하여 개인 검사대의 어두운 적색등 밑에 제시하였고, 외관 특성 평가를 위한 시료는 별도로 준비하고 새로운 번호를 붙여 light box(Superlight-III, Boteck, 경기도 시흥)의 day light(D65)하에서 평가하도록 하였다.

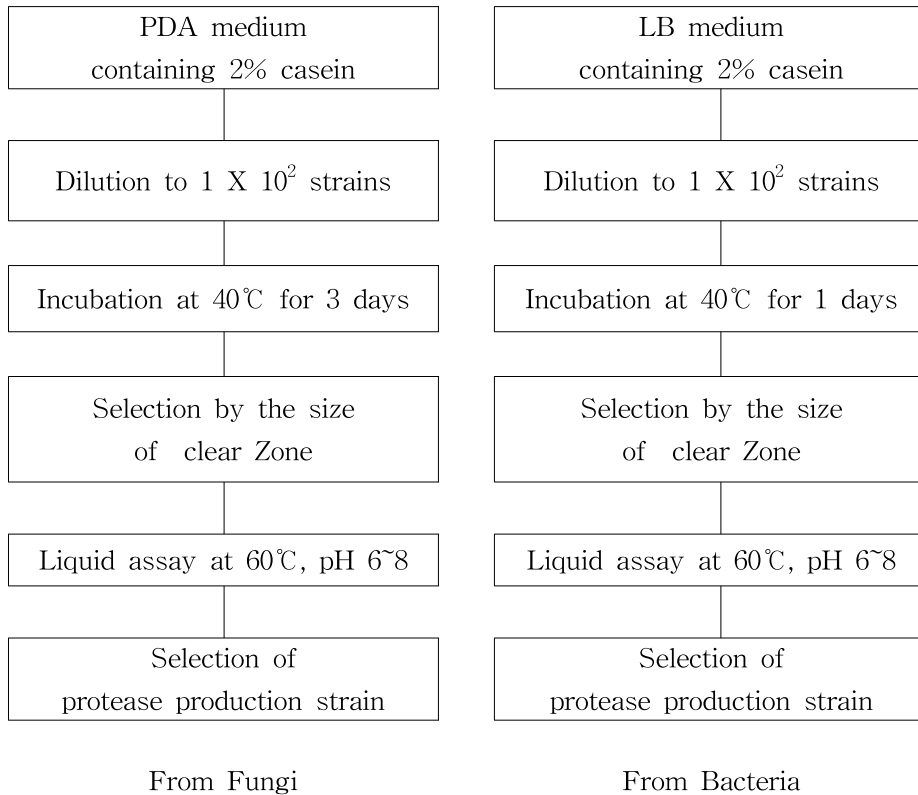
### ③ 평가 내용 및 절차

추출물의 관능적 특성 강도는 7점 항목 척도를 사용하여, 패널 요원에게는 각 특성에 대한 강도를 항목 척도 상에 표시하도록 하였다. 검사원이 신소재의 특성 평가는 반복 수행되었고, 각 평가에 소요된 시간은 약 30분이었다. 검사는 오전 11시와 오후 5시에 실시되었으며 2일에 걸쳐 수행되었다. 실험에 참여하는 관능검사원들에게는 검사 1시간 전부터 물 이외의 음료나 음식물 섭취와 구강세척제 사용을 피하도록 하였고, 향이 진한 화장품의 사용을 금하도록 하였다.

## 2. 실험 결과 및 고찰

### 가. 우리밀 단백질을 분해하는 Protease 생산균주의 분리 tool 확립 - 1차년도

우리밀 단백질과 효모 단백질을 분해하여 peptide성 조미소재와 기능성 소재를 검토하기 위해서는 특이적인 protease가 요구되었다. 따라서, 하기와 같이 screening tool을 이용하여 protease 생산균주를 선별하였다.



### (1) Protease 생산 균주 분리 및 선발

재래식 된장 및 간장 등에서 분리한 180여종의 bacteria와 fungi 중에서 2% casein이 함유된 plate상에서 casein을 분해하여 clear zone을 형성하는 크기에 따라 1차 선별하였다. 분리된 균주들 중에서 역가가 좋은 fungi 8종과 bacteria 7종을 선별하여 액체 배양을 실시하여 protease activity를 측정하여 protease 역가가 좋은 균주를 선별하였다(Table 6). 최종 Fungus SEM-133 (*Aspergillus* sp.) 1종과 Bacterium SEM-162 (*Bacillus* sp.) 1종의 균주를 선발하였다.

Table 6. Protease assay in Liquid broth containing 3% domestic wheat powder.

No	Name	Protease activity(U/ml)	
1	SEM-11	64	Fungi
2	SEM-27	68	
3	SEM-54	65	
4	SEM-61	69	
5	SEM-87	59	
6	SEM-93	77	
7	SEM-130	73	
8	SEM-133	89	
9	SEM-139(Y균)	70	
10	SEM-140	41	Bacteria
11	SEM-156	41	
12	SEM-158	43	
13	SEM-162	57	
14	SEM-166	50	
15	SEM-176	43	
16	SEM-177	46	

최종 선별된 균주의 protease activity를 비교하기 위하여 bacterium은 2% casein을 함유한 LBplate를 이용하였으며, Fungus는 3% casein이 함유된 PD plate를 이용하여 clear zone 형성 능으로 protease 역가를 비교하였다(Figure 1). Fungi 중에서는 SEM-133 이 가장 우수하였으며, Bacteria 중에서는 SEM-162 이 가장 우수하여 이들 2종을 최종 선발하였다(Figure 2).

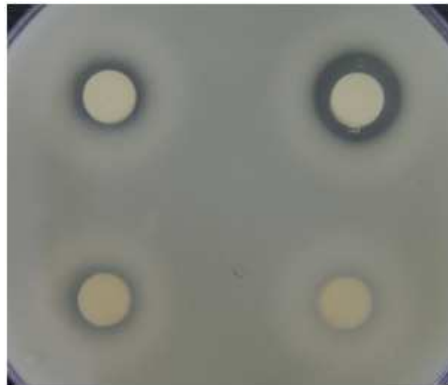


Fig. 1. Formation of clear zone of the isolated fungi(*Aspergillus* sp.) on PDA plate containing 3% casein.



*Bacillus licheniformis*(SEM-166)

*Bacillus subtilis*(SEN-162)

Fig. 2. Formation of clear zone of isolated bacteria on LB plate containing 2% casein.

## (2) Protease 생산균주의 개량 (UV mutation)

재래식 된장 및 간장 등에서 분리한 최종 2종의 균주 [Fungus SEM-133 1종과 Bacterium SEM-162 1종]를 이용하여 균주개량을 하기로 하였다. 이 2 균주를 대상으로 하여 random mutation을 실시하여, Plate assay (nutrient broth containing 2% casein)로 1차 선별을 진행하였으며 최종 선별 방법으로 liquid assay를 진행한 결과, *Bacillus* sp. 1종과 *Aspergillus* sp. 1종의 균주를 최종 선별하여 각각 *Bacillus* sp. SP1과 *Aspergillus* sp. SP1으로 명명하였다. 각각의 protease 활성은 다음과 같다 (Table 7).

Table 7. Protease assay in Liquid broth containing 3% domestic wheat protein.

Selected strain	<i>Aspergillus</i> sp. SP1	<i>Bacillus</i> sp. SP1
Enzyme activity		
Protease (U/ml)	154(U/ml)	118(U/ml)

## 나. 고 glutathione 생산 효모와 핵산 생산효모의 탐색 및 개량

### (1) 조미소재로 적합한 효모균주 선택

조미용 효모균주를 선별하기 위하여 상업용 시판균주를 구입하거나, 미생물은행으로부터 효모 균주를 분양받았다. 또한 딸기, 사과, 바나나 자연발효물로부터 효모를 분리하였다. 총 68종의 효모를 동일 농도로 조절한 후, 자가소화시켜 관능검사를 실시하였다.

### (2) 정미성 우수한 효모균주 선별

분리한 효모를 이용한 조미소재를 개발하기 위해서는 무엇보다도 효모 자체의 정미성이 우수하고, 이미, 이취가 적은 효모 균주가 바람직하다. 원 균주 자체의 정미성이 부족하거나 이미, 이취가 강하면 제조공정에서 이들의 보충 및 제거공정이 추가되어야 하므로 원가 부담이 발생할 수 있다. 따라서, 우선적으로 효모 균주를 자가소화시켜 관능적으로 우수한 균주를 선별한 후, 그 균주를 대상으로 고 glutathione, 핵산을 생산하는 균주개량을 하고자 하였다.

분리한 효모 균주를 대상으로 관능적으로 우수한 균주를 1차로 선별하기 위하여 균체를 배양하여 자가소화시킨 후에 관능검사에 이용하였다. 그 결과 정미성이 우수한 8종(시판균주 3종, 분양보유균주 3종, 자사 분리균주 1종)의 균주를 1차로 선별하였다(Table 8).

Table 8. Yeast strains selected by sensory evaluation

No.	선발 효모 균주	비 고
1	SEM-Y4	터키산, 빵효모( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )
2	SEM-Y5	중국산, 고향성 효모( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )
3	SEM-Y6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> - Special for making alcohol
4	SEM-Y8	<i>Candida utilis</i> 1
5	SEM-Y9	<i>Candida utilis</i> 2
6	SEM-Y10	<i>Candida utilis</i> 3
7	SEM-Y11	<i>Candida utilis</i> 4
8	SEM-Y12	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>

1차 선발균주를 대상으로 2 그룹으로 나누어 2차 관능검사를 실시하였다. 제 1 그룹의 관능 검사 결과는 Fig. 3에서 나타내었다. 연구원 14명을 대상으로 실시한 관능검사 결과는 SEM-Y4, SEM-Y8, SEM-Y5 순으로 각각 65%, 21%, 14%의 선호도를 나타내었다. 또한, 제 2 그룹의 관능검사도 연구원 18명을 대상으로 실시한 결과는 SEM-Y6, SEM-Y9, SEM-Y10, SEM-Y11 순으로 각각 39%, 22%, 22%, 17%의 선호도를 나타내었다(Figure 4). 이들 중에 전체적인 기호도는 SEM-Y4, SEM-Y6이 비교적 좋으나, 느끼한 맛, 역겨운 향, 이취, 비린 맛 등이 단점으로 지적되었다. 또한 Gelinass와 Barrette의 보고에 의하면, *Candida utilis*와 *Saccharomyces cerevisiae*의 100g yeast 당 g protein 비율은 58.2%와 43.3%로 *C. utilis*가 약 15% 정도 높았다. Protein yield(g/100g glucose)로 비교하면 *C. utilis*의 경우는 평균 14이고, *S. cerevisiae*의 경우는 평균 7.9로 약 2배 차이를 보였다. 조미용 효모 개발에 있어서 *C. utilis*가 생산하는 평균 단백질 함량이 58% 이상이라는 것은 중요하다. 효모엑기스의 관능적인 차이에도 불구하고 공정개선을 고려할 때 *C. utilis*가 더 높은 상업적 가치가 있다고 사료된다. 따라서, 균주 개량요 효모균주로 *C. utilis* 1를 선발하였다.

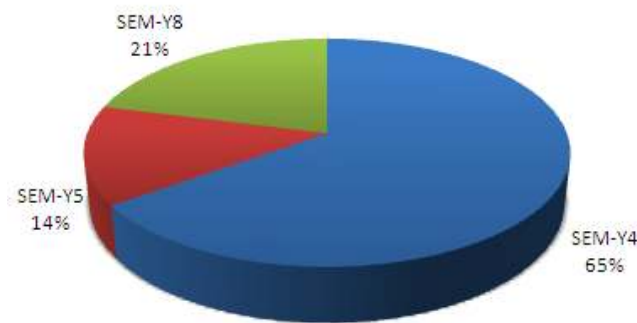


Fig. 3. 제 1 그룹 관능검사 결과(선호도, n=14).

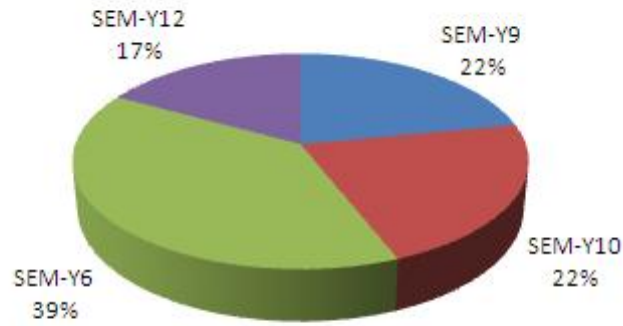


Fig. 4. 제 2 그룹 관능검사 결과(선호도, n=18).

### (3) 선별 대상 균주(8종)에 대한 생육특성 분석

Fig. 5을 보면, 균체 증식(SEM-Y4, SEM-Y5, SEM-Y8, SEM-Y12)은 배양 12시간에 대수 증식기로 성장하였으며, 배양 12시간 이후는 정지기에 다다랐다. pH 변화도 배양 12시간에서 가장 낮은 값을 나타내었다. 이는 pH 감소와 균체성장과 관계가 있음을 보여주고 있다. 4종의 yeast 중에서 SEM-Y8 (*C. utilis* KCCM 50342)이 가장 좋은 균체 성장을 보였다. SEM-Y12 인 *Z. rouxii*(Z-효모)는 8시간까지 lag phase, 30시간까지 대수증식기를 보이며, YPD 배지에서 는 생육이 가장 느렸다.

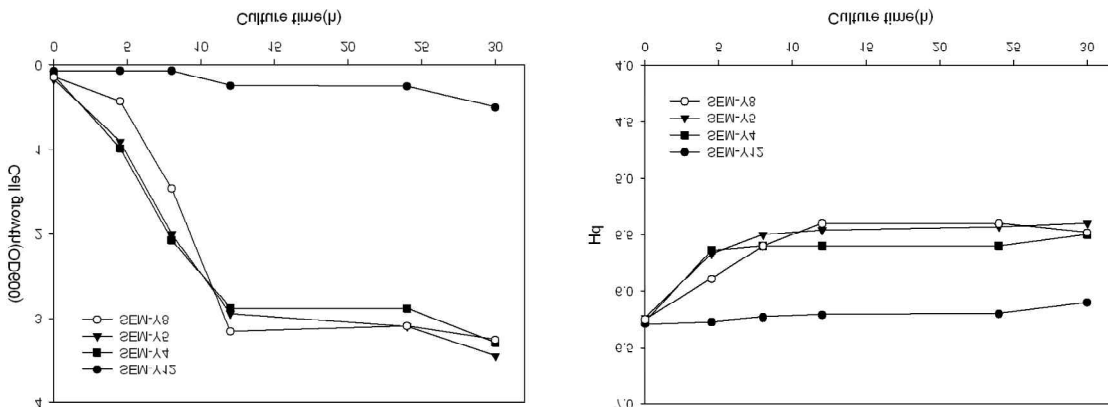


Fig. 5. Flask culture of SEM-Y12, SEM-Y4, SEM-Y5, and SEM-Y8 in YPD medium

Fig. 6를 보면, 균체 증식(SEM-Y9, SEM-Y10, SEM-Y11, SEM-Y6)은 배양 12시간까지 대수

증식기를 보였고, 12시간 이후에는 균체증식이 일어나지 않는 정지기로 진입하였다. 균체증식은 SEM-Y9, SEM-Y10, SEM-Y11 순으로 증가하였으며, SEM-Y11인 *C. utilis* 5는 YPD배지에서 생육이 좋지 않아 균체증식이 가장 낮았다.

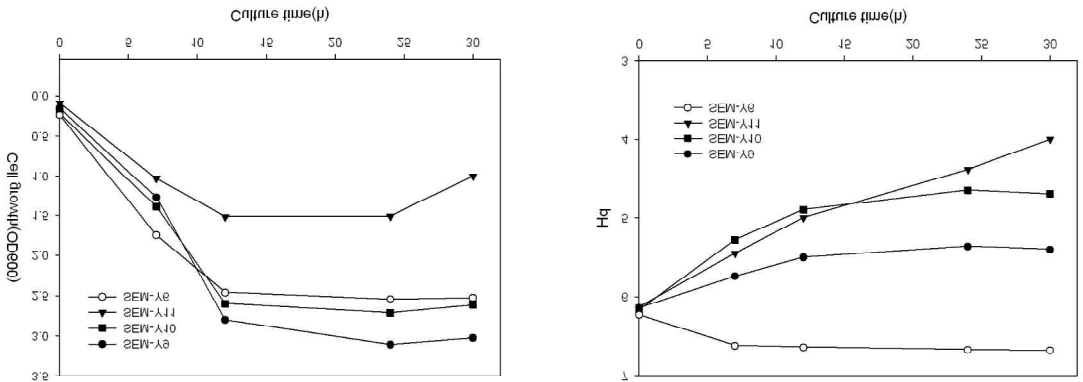


Fig. 6. Flask culture of SEM-Y9, SEM-Y10, SEM-Y11, and SEM-Y6 in YPD medium

선발된 효모 8종의 균체성장을 비교시 SEM-Y8이 가장 높았다. 효모 SEM-Y8 (*C. utilis* 1)이 관능적인 면과 균체증식적인 면을 볼때 균주 개량에 가장 적합한 균주로 선발되어 이후의 고 glutathione, 핵산 생산용 균주 개량에 이용하였다.

#### (4) 고 glutathione 생산용 균주개량

먼저, 선발된 SEM-Y8 균주를 이용하여 돌연변이원(UV) 처리시 발생하는 사멸율을 계산하였다. 사멸율의 표준곡선은 Fig. 7에서 나타내었다. 초기 균체량은  $4.6 \times 10^8$ 에서 6분간 UV 처리시  $1.05 \times 10^3$ 까지 사멸하였다.

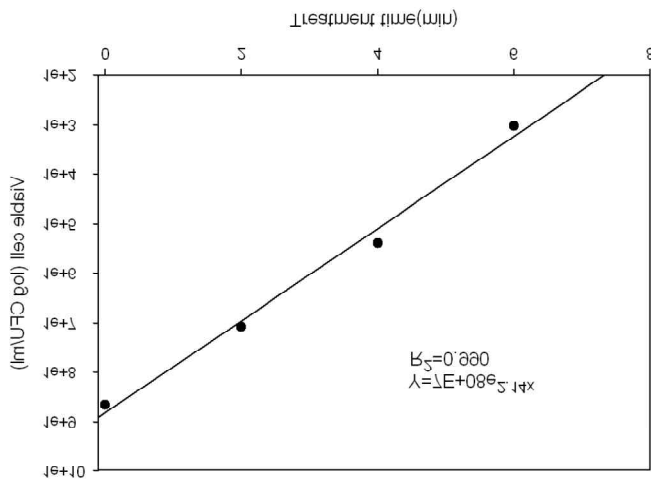


Fig. 7. Standard curve of viable rate by UV treatment

Glutathione (GSH)의 생산농도를 측정하기 위하여 표준품인 환원형 glutathione을 Sigma사에서 구입하여 농도별(0~100 ug/mL) 표준곡선을 작성하였다 (Figure 8).



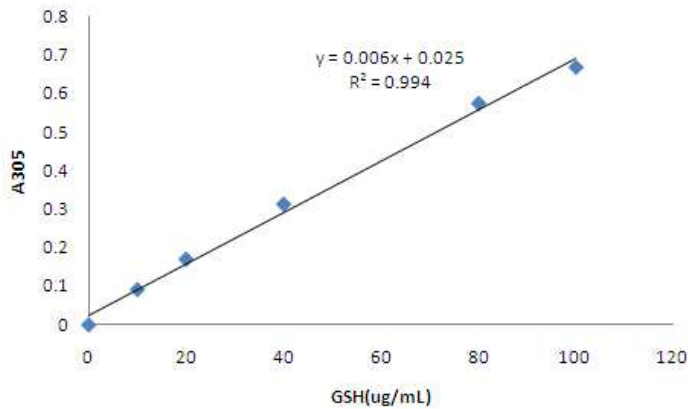


Fig. 8. Standard curve of glutathione concentration

균주개량을 위하여 효모 SEM-Y8, *C. utilis* 1 균주를  $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ 이 되도록 배양한 후, 약 7 분간 UV 처리하여 plate상에서 생존한 효모 균주만을 선발하였다. 생존 균주들과 wild type (야생균주)을 함께 액체 배양한 후, glutathione(GSH) 농도를 측정하여 glutathione의 생산능의 변화를 비교하였다. 변이 균주 (69.7 ug/mL) 중에서 Mutant 2는 야생균주 (54.8 ug/mL)에 비해 glutathione 농도가 130% 향상됨을 확인하였다 (Figure 9). Mutant 2 효모를 이용한 2차 UV 처리로부터 약 163% glutathione 생산 농도가 증가한 mutant 2-1 효모 균주(113.8 ug/mL)를 얻었다.

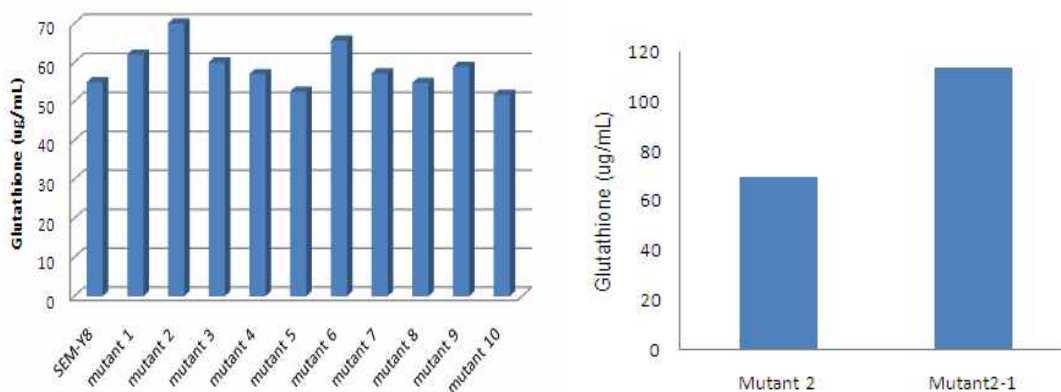


Fig. 9. Selection of mutant strains by UV treatment

#### (5) Lab-scale에서 배지 조성에 따른 효모 Glutathione 생산

효모 배양용 기본 배지인 YM broth (1.0% glucose, 0.5% peptone, 0.3% yeast extract, 0.3% malt extract)와 선택 배지(4.0% yeast extract, 1.5% glucose, 0.04%  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , 0.04%

L-cystein)를 이용하여 야생균주와 mutant 2-1 효모에서의 glutathione 생산농도를 비교하였다.

Table 9에서 나타낸 것과 같이 균체농도에 대한 glutathione 농도는 YM broth에서는 56.7mg/g, selected medium에서는 86.4mg/g으로 selected medium가 우수하였으며, specific glutathione production rate도 YM broth (1.8)보다 selected medium(2.7)가 우수한 것으로 나타나, 4.0% yeast extract, 1.5% glucose, 0.04% NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.04% L-cystein 배지 조성이 최적인 것으로 사료된다. 야생균주와 변이균주 mutant 2-1의 glutathione 생산은 배양 32시간에 야생균주 (54.8 ug/mL)에서 최종 mutant 2-1 균주(170.7 ug/mL)로 약 3.1배 증가하였다.

Table 9. Effect of medium composition on the growth and glutathione production of yeasts in flask cultures

Parameters	YM broth	Selected medium
Glutathione/DCW (mg/g)	56.7	86.4
Specific glutathione production rate (mg/g/h)	1.8	2.7

#### (6) RNA 함유 효모 균주 개량

또한, 변이균주와 야생균주 사이의 RNA 농도 변화를 비교하기 위하여 표준품인 Torula RNA 을 Sigma사에서 구입하여 농도별 (0~1.0 mg/mL) 표준곡선을 작성하였다 (Figure 10).

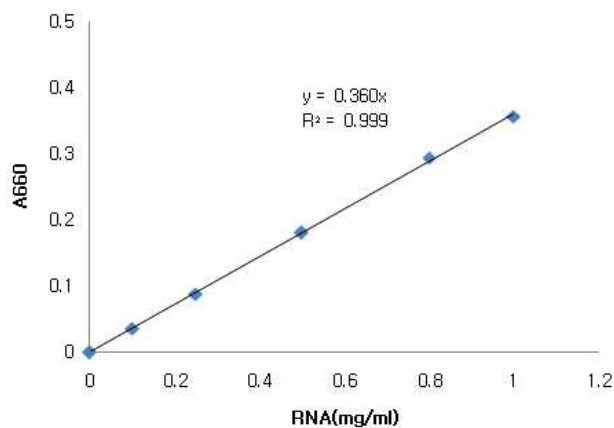


Fig. 10. Standard curve of RNA concentration

RNA 함유 효모 균주를 개량하기 위하여 고 glutathione 개량균주로 사용한 SEM-Y8인 *C. utilis* 1를 사용하였다. 변이원인 Ethylmethane sulfonate(EMS)를 처리하여 생존한 균주를 YPD(yeast extract 0.3%, malt extract 0.3%, glucose 1.0%, peptone 0.5%)액체배지에서 30℃, 48시간 125rpm에서 진탕 배양하였다. 원심분리하여 얻어진 균체를 열처리하여 추출된 RNA를

Orcinol법으로 작성한 표준곡선과 비교하여 정량하였다. EMS 처리를 통하여 얻은 콜로니 20여 개를 YM 고체배지와 1.5 M KCl이 첨가된 YM 고체배지에 접종하여 KCl 감수성 균주를 선별하여 Fig. 11에 나타내었다. 야생균주에 비해 변이균주는 1.5M KCl을 함유하는 배지에서 자랄 수 없다. 따라서, YM 배지에서는 자라고, 1.5M KCl을 함유하는 YM배지에서 자라지 못하는 균주를 선별하였다.



Fig. 11. Growth of *Candida utilis* KCCM 50342(B) and its mutants(A) on a YM agar plate containing 1.5 M KCl. Plate A; YM agar medium with 1.5 M KCl, plate B; YM agar medium.

Fig. 12에서 나타낸 것과 같이, 얻어진 변이균주들 중에서는 mutant 26은 야생균주(Wild type)에 비하여 약 2배 이상의 RNA 생산 농도를 나타내었다. 그러나, Mutant 28과 같이 역으로 RNA 생산 농도가 감소하는 경우도 있다.

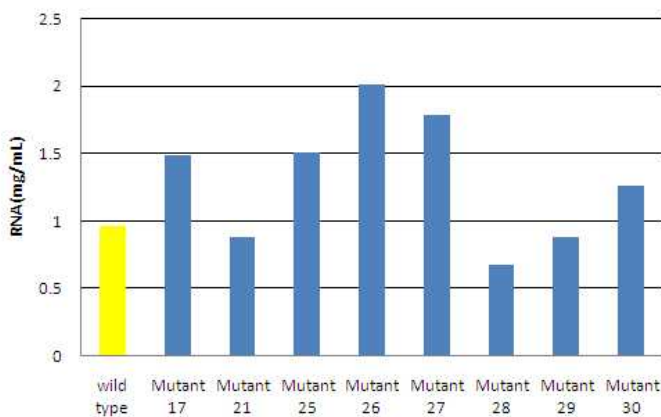


Fig. 12. Selection of mutant strains by EMS treatment

#### (7) Lab-scale에서 배지 조성에 따른 효모 RNA 생산

Glutathione 배양용 최적화 배지를 이용하여 야생균주와 mutant 26 효모에서의 RNA 생산농

도를 비교하였다. Fig. 13에서 나타낸 것과 같이, wild strain인 *C. utilis* 1와 Mutant 26의 Cell growth는 비슷한 양상을 보였으나, RNA 생산에서는 배양 4시간부터 차이를 보이기 시작하여 배양 11시간에서 약 2배(0.79:1.61) 이상의 차이를 보였다. 배양 31시간째의 RNA 생산은 약 2.3 배(0.774:1.693)로 배양기간 중 가장 높았다. 균체당 RNA 생산은 mutant 26의 경우 배양 4시간째에 최고이고, 야생균주는 배양 8시간째에 가장 높았다. 배양시간당 RNA 생산은 mutant 26의 경우 배양 12시간째에 가장 높았고, 야생균주는 배양 8시간째에 가장 높았다. Mutant 균주의 배양에서 볼때 균체당 생산성은 배양 4시간이 가장 적합하였으나, 산업적 생산성으로 볼때는 배양 11시간이 가장 적합하였다.

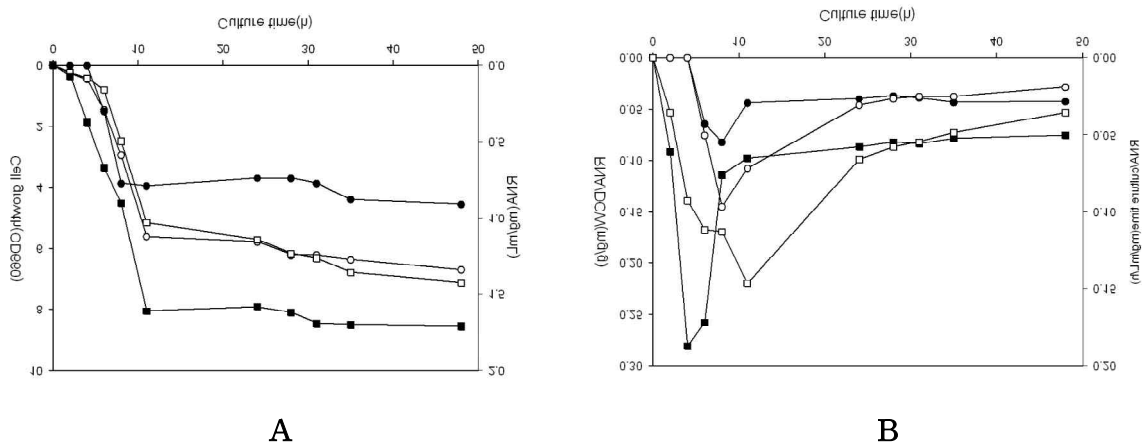


Fig. 13. Culture time of yeast SEM-Y8 on RNA production. ●, cell growth of SEM-Y8; ■, cell growth of mutant 26; ○, RNA of SEM-Y8; □, RNA of mutant 26(A). ●, RNA/DCW of SEM-Y8; ■, RNA/DCW of mutant 26; ○, RNA/h of SEM-Y8; □, RNA/h of mutant 26(B).

이상의 결과에서 보면, glutathione 생산은 균체농도와 비례하는 경향을 보였으나, RNA 생산은 대수기 중기에서 말기 사이에서 집중적으로 생산하는 것을 알 수 있었다. 변이원 처리를 통한 균주 개량을 통하여 glutathione 생산은 약 3.1배 증가, RNA 생산은 약 2.3배의 증가를 볼 수 있었다.

## 다. 우리밀, 양파, 마늘, 효모엑기스로부터 kokumi 소재 추출법 확립 - 2차년도

### (1) 우리밀 단백질 제조

#### (가) 우리밀 분석

우리밀로부터 단백질을 추출하기 위하여 먼저 우리밀의 구성성분과 아미노산 분포를 조사하였다. 그 결과 우리밀에는 전분이 63%이고 조단백이 17%, 기타가 20%이었다(Table 10). 우리밀 단백질의 총 아미노산은 52.43%이고, 아미노산 조성은 glutamic acid가 15.14%, proline 7.81% 순이었다(Table 11).

Table 10. Composition of domestic wheat powder.

구성성분	Starch	Crude protein (N x 6.25)	Crude fat	Ash	Others
함량	63	17	2	2	16

Table 11. Composition of amino acid in domestic wheat powder.

Amino acid	Content(%)
Asp	2.45
Ser	2.95
Glu	15.14
Gly	2.98
His	0.59
Arg	1.88
Tyr	2.10
Ala	2.45
Pro	7.81
Cys	0.00
Tyr	2.26
Val	2.52
Met	1.15
Lys	1.44
Ile	1.97
Leu	2.14
Phe	2.59
Total (%)	52.43

#### (나) 우리밀 단백질 제조

우리밀의 제조공정은 Fig. 1에서 나타내었다. 우리밀은 (유)온누리친환경농업회사법인에서 구입하여 우리밀을 분쇄한 후, 수세, amylase, protease 처리 및 추출하여 분말화하였다(Figure 14). Protease를 단계적으로 처리하여 최종 protein 함량 70% 이상의 우리밀 단백질을 얻었다(Table 12와 13). 그 아미노산 조성은 Table 과 같다. 총 Glutamic acid + glutamine은 약 23.2%로 증가하였다.

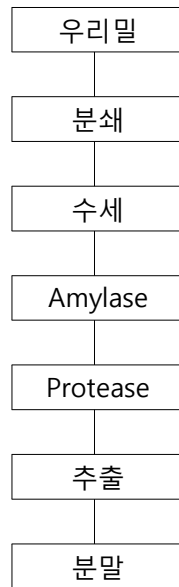


Fig. 14. Manufacturing process of domestic wheat powder.

Table 12. Protein content extracted from domestic wheat powder.

TN	Protein(N x 6.25)%
11.3	70.6

Table 13. Composition of domestic wheat powder.

구성성분	Starch	Crude protein (N x 6.25)	Crude fat	Ash	Others
합량	15.1	70.6	1.3	2	11

또한, 분리한 fungus 균주를 이용하여 PD broth에서 액체배양을 실시하였다. 그 배양액의 균체를 paper disc를 이용하여 제거한 후, 상징액만 회수하였다. 이 회수 protease를 우리밀로부터 제조한 wheat gluten의 분해 실험에 이용하였다.

#### (다) 우리밀 단백질 추출

우리밀로부터 추출한 우리밀 단백질의 아미노산 조성을 분석하였다. 총 아미노산은 58.8%이고, glutamic acid + glutamine은 23.2% 이었다.

우리밀 단백질을 분리한 균주로부터 얻은 protease를 이용하여 조미용 소재에 적합한 size로 분해시키기 위하여 시간별 분해를 실시하였다. 그 결과를 15% SDS-PAGE를 통하여 분해 패턴을 나타내었다. 먼저, 10분부터 3시간까지는 protease에 의해 분해되면서 점차 약 41 kDa와 27 kDa size로 집중적으로 분해됨을 알 수 있었다(Fig. 15-1). 5시간부터 20시간까지는 10 kDa

에서 4 kDa 사이로 단계적으로 분해되는 것을 볼 수 있었다(Fig. 15-2).

Fig. 15-1. 15% SDS-PAGE

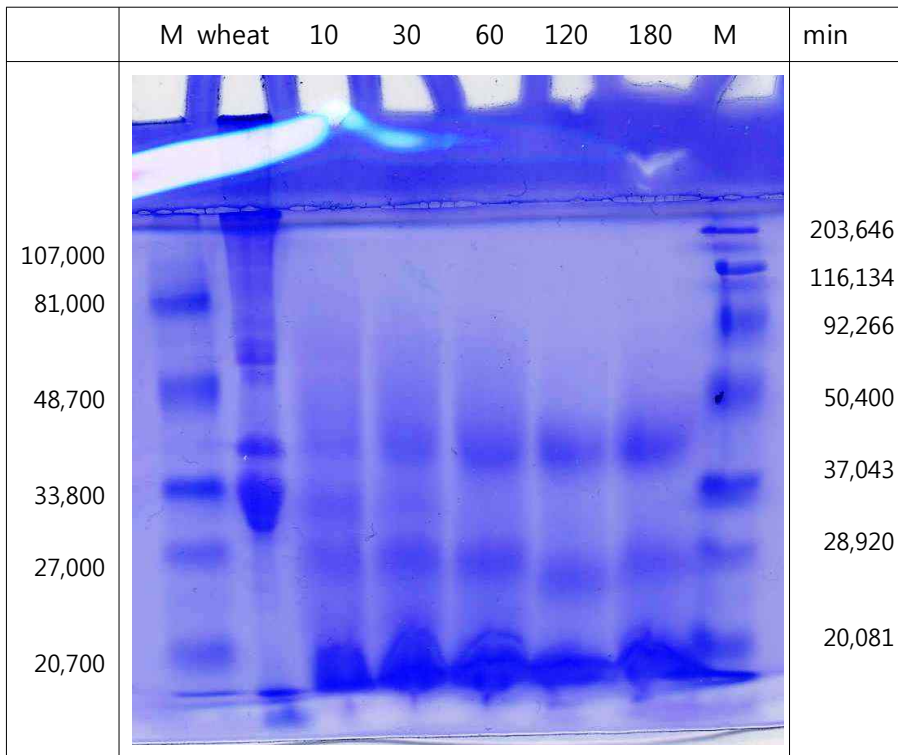
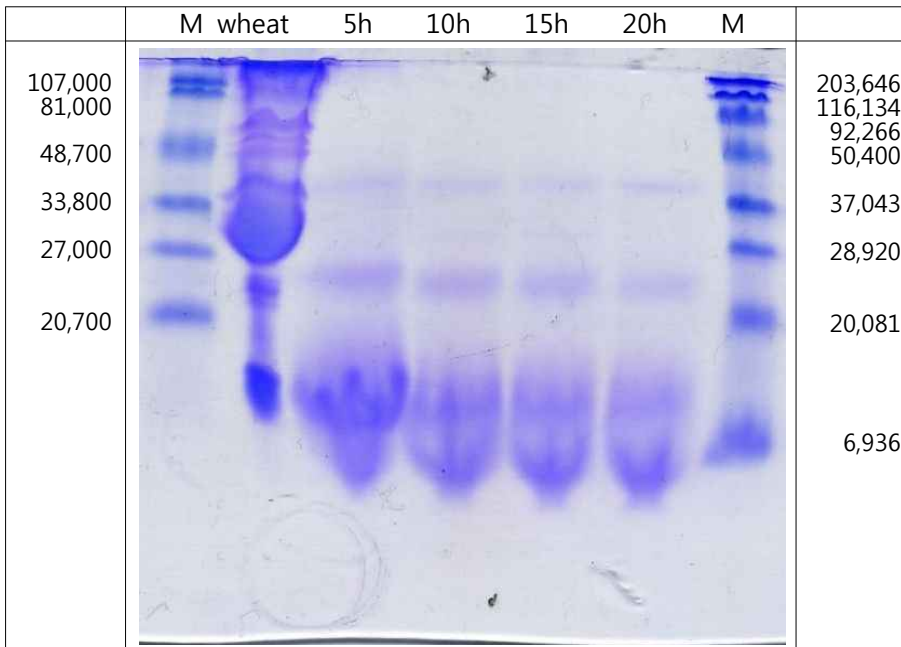


Fig. 15-2. 15% SDS-PAGE



또한 분해 5시간부터 20시간 까지의 분자량 분포를 검토하기 위하여 GPC를 이용하여 분자량을 확인하였다. 분해시간에 따라 고분자들이 저분자화되는 것을 볼 수 있었다(Fig. 16).

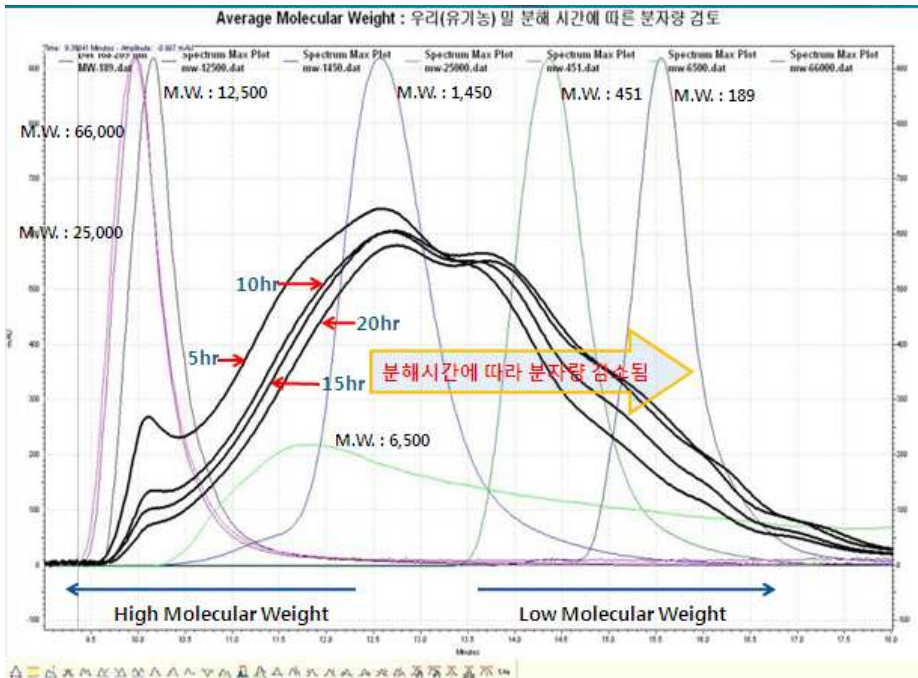


Fig. 16. Distribution of molecular weight

우리밀의 분해시간별 단백질 함량과 아미노산 함량을 확인하기 위하여 total nitrogen(TN), amino nitrogen(AN), 유리 아미노산, 총 아미노산을 분석하였다(Table 14과 15). 우리밀의 단백질 함량은 70~84%까지 높게 추출되었으며, AN 값이나 유리 아미노산은 미미하였다. 그러나, 총 아미노산 분석에서 glutamic acid + glutamine 함량이 23~36%까지 높은 수치를 보였다. 이는 수입밀과 비교하여 결코 낮은 수치가 아니므로 조미소재로 개발할 수 있는 가능성을 시사한다.

Table 14. Content of protein and amino acid by protease treatment time

	우리밀 단백질	5h	10h	15h	20h
TN	11.54	11.287	13.462	13.378	13.318
단백질%(x6.25)	72	70.5	84.1	83.6	83.2
AN	0.06	0.03	0.49	0.56	0.63
아미노산	0.36	0.14	3.03	3.51	3.91

\* 아미노산 % = AN/TN 값(총단백질 중 아미노산의 비율)을 단백질 함량에 곱하여 계산



Table 15. Amino acid composition hydrolyzed from isolated proteases

Amino acid	우리밀 단백질	5h	10h	15h	20h
	Total amino acid(%)				
Asp	2.05	1.71	1.50	1.75	1.85
Thr	1.49	1.60	1.37	1.66	1.61
Ser	3.01	4.08	3.46	4.12	4.11
Glu	23.19	35.96	29.31	34.30	34.25
Gly	2.16	2.95	2.45	2.88	2.84
Lys	0.92	0.71	0.61	0.80	0.81
Arg	2.14	1.77	1.56	1.92	1.86
<b>Total (%)</b>	<b>58.81</b>	<b>77.58</b>	<b>64.97</b>	<b>77.06</b>	<b>76.09</b>

## (2) 마늘, 양파 추출법

마늘과 양파를 탈피하고 분쇄한 후, 각각 1kg에 물 3L를 첨가하여 95℃, 30분간 열처리하여 추출한다. 추출액을 여과, 농축하여 동결건조시켜 분말화한다(Fig. 17.).

마늘의 일반 성분은 분석(수분, TN, AN)

양파의 일반성분

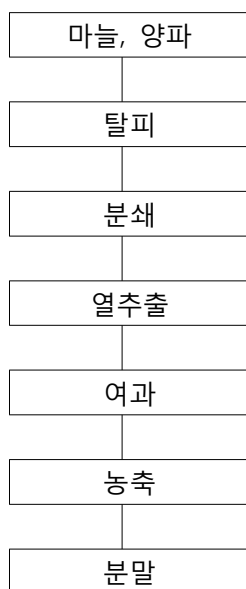


Fig. 17. Extraction process of kokumi materials from garlic and onion

## 라. 고 glutathione, 핵산 및 펩타이드 생산균주 개발

### (1) Lab-scale에서 배지 조성에 따른 효모 Glutathione 생산

효모 배양용 기본 배지인 YM broth (1.0% glucose, 0.5% peptone, 0.3% yeast extract, 0.3% malt extract)와 선택 배지를 이용하여 야생균주와 mutant 2-1 효모에서의 glutathione

생산농도를 비교하였다.

Table 16에서 나타낸 것과 같이 균체농도에 대한 glutathione 농도는 YM broth에서는 56.7ug/g, selected medium에서는 86.4ug/g으로 selected medium가 우수하였으며, specific glutathione production rate도 YM broth (1.8)보다 selected medium(2.7)가 우수한 것으로 나타나, 4.0% yeast extract, 1.5% glucose, 0.04% NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.04% L-cystein 배지 조성이 최적인 것으로 사료된다. 야생균주와 변이균주 mutant 2-1의 glutathione 생산은 배양 32시간에 야생균주 (54.8 ug/mL)에서 최종 mutant 2-1 균주(170.7 ug/mL)로 약 3.1배 증가하였다.

Table 16. Effect of medium composition on the growth and glutathione production of yeasts in flask cultures

Parameters	YM broth	Selected medium
Glutathione/DCW (ug/g)	56.7	86.4
Specific glutathione production rate (ug/g/h)	1.8	2.7

## (2) Lab-scale에서 배지 조성에 따른 효모 RNA 생산

Glutathione 배양용 최적화 배지를 이용하여 야생균주와 mutant 26 효모에서의 RNA 생산농도를 비교하였다. Fig. 18에서 나타낸 것과 같이, wild strain인 *C. utilis* 1와 Mutant 26의 Cell growth는 비슷한 양상을 보였으나, RNA 생산에서는 배양 4시간부터 차이를 보이기 시작하여 배양 11시간에서 약 2배(0.79:1.61) 이상의 차이를 보였다. 배양 31시간째의 RNA 생산은 약 2.3 배(0.774:1.693)로 배양기간 중 가장 높았다. 균체당 RNA 생산은 mutant 26의 경우 배양 4시간째에 최고이고, 야생균주는 배양 8시간째에 가장 높았다. 배양시간당 RNA 생산은 mutant 26의 경우 배양 12시간째에 가장 높았고, 야생균주는 배양 8시간째에 가장 높았다. Mutant 균주의 배양에서 볼때 균체당 생산성은 배양 4시간이 가장 적합하였으나, 산업적 생산성으로 볼때는 배양 11시간이 가장 적합하였다.

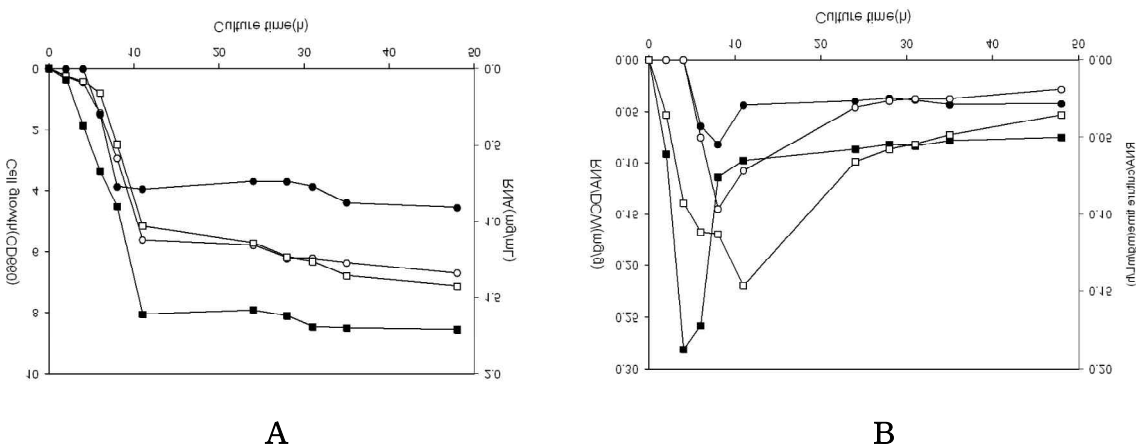


Fig. 18. Culture time of yeast SEM-Y8 on RNA production. ●, cell growth of SEM-Y8; ■, cell growth of mutant 26; ○, RNA of SEM-Y8; □, RNA of mutant 26(A). ●, RNA/DCW of SEM-Y8; ■, RNA/DCW of mutant 26; ○, RNA/h of SEM-Y8; □, RNA/h of mutant 26(B).

이상의 결과에서 보면, glutathione 생산은 균체농도와 비례하는 경향을 보였으나, RNA 생산은 대수기 증기에서 말기 사이에서 집중적으로 생산하는 것을 알 수 있었다. 변이원 처리를 통한 균주 개량을 통하여 glutathione 생산은 약 3.1배 증가, RNA 생산은 약 2.3배의 증가를 볼 수 있었다.

### (3) 영양요구성 변이주의 분리

세포융합에 필요한 표지유전인자를 얻기 위하여 영양요구성 변이주를 분리하였다(Table 17). 단일 표지유전자가 얻어지는 빈도는 거의 비슷하였다(약  $10^{-6}$ 정도). 이 영양요구성 변이주를 SEM4-3으로 명명하였다.

Table 17. List of strains used.

Strain	Phenotype	Remark
<i>Candida utilis</i>	Wild type	
<i>C.utilis</i> SEM4-1	Glutathione production	NTG mutant of <i>C.utilis</i>
<i>C.utilis</i> SEM4-2	RNA production	EMS mutant of <i>C.utilis</i>
<i>C.utilis</i> SEM4-15	Glutathione, Lys <sup>-</sup>	NTG mutant of <i>C.utilis</i>

### (4) 원형질체 생성과 세포벽 재생

원형질체 생성과 세포벽 재생에 있어서 세포벽 용해효소의 최적 처리시간을 조사하였다(Fig. 19). 처리시간이 길어질수록 원형질체의 생성은 좋았으나, 세포벽재생은 나빠졌다. Westase(4 units/ml)를 60분간 처리하였을 때 원형질체의 생성률(75%)과 재생률(9%)이 비교적 양호하였다.

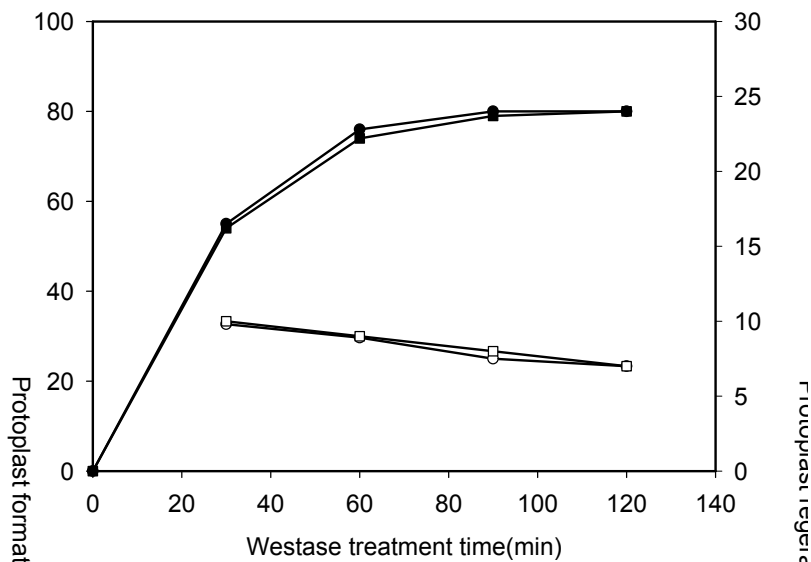


Fig. 19. Effect of Westase treatment time on the formation and regeneration of protoplast. Formation: ●, *C.utilis* SEM4-2; ■, *C.utilis* SEM4-15, regeneration: ○, *C.utilis* SEM4-2; □, *C.utilis* SEM4-15.

(5) 원형질체 융합균주의 glutathione 및 RNA 함량

*C. utilis*의 원형질체 세포융합은 PEG 방법을 사용하였다. 세포융합에 있어서 40% PEG 4000을 이용하여, pH 8.0, 10분 처리한 후, KCl CM배지와 KCl MM배지상 자란 콜로니 수를 비교하여 나타내었다(Table 18).

Table 18. Protoplast fusion frequency between *C. utilis* SEM4-2 and SEM4-3.

	<i>C. utilis</i> SEM4-2
<i>C. utilis</i> SEM4-15 (Glutathione, Lys-)	3.2 (X 10 <sup>-4</sup> )

Table 19 에서는 세포융합 후, lysine- 배지에서 자란 융합균주의 glutathione 량과 RNA 함량을 비교하였다. 야생균주의 경우 glutathione 농도가 54.8 ug/ml이었고, 변이균주 SEM-15은 2.1배 증가한 113.8 ug/ml이었다. 야생균주의 RNA 함량은 0.95mg/ml이었고, 변이균주 SEM4-2는 2.1배 증가한 2.01mg/ml이었다. 세포융합균주들은 야생주와 비교하면 glutathione의 경우 113.6~114.5 ug/ml로서 2.1배 증가하였다. RNA 함량의 경우는 1.84~2.09 mg/ml로써 약 2.2배 증가하였다. 세포융합균주와 변이균주의 glutathione과 RNA 함량을 비교하면, 세포융합균주와 변이균주의 glutathione은 각각 2.1배 증가로 차이가 없었으며, RNA 함량은 변이균주는 2.1배 증가, 세포융합균주는 2.2배 증가로 glutathione과 마찬가지로 차이를 보이지 않았다.

Table 19. Comparisons of high glutathione and RNA contents of protoplast strains

Protoplast strain	Glutathione(ug/ml)	RNA(mg/ml)
Wild type	54.8	0.95
<i>C. utilis</i> SEM4-2	-	2.01
<i>C. utilis</i> SEM4-15	113.8	-
<i>C. utilis</i> SEM4-401	114.5	1.84
<b><i>C. utilis</i> SEM4-409</b>	<b>113.6</b>	<b>2.09</b>
<i>C. utilis</i> SEM4-421	113.4	1.89
<i>C. utilis</i> SEM4-438	114.2	1.94
<i>C. utilis</i> SEM4-444	114.3	2.01
<i>C. utilis</i> SEM4-476	111.6	1.96
<b><i>C. utilis</i> SEM4-3</b>	<b>113.8</b>	<b>2.95</b>

따라서, NTG 처리로 glutathione이 2.1배 증가한 *C. utilis* SEM4-1과 EMS처리하여 RNA 함량이 3.1배(2.95 mg/ml) 증가한 *C. utilis* SEM4-15의 세포융합균주 *C. utilis* SEM4-409를 최종 선별하였다.

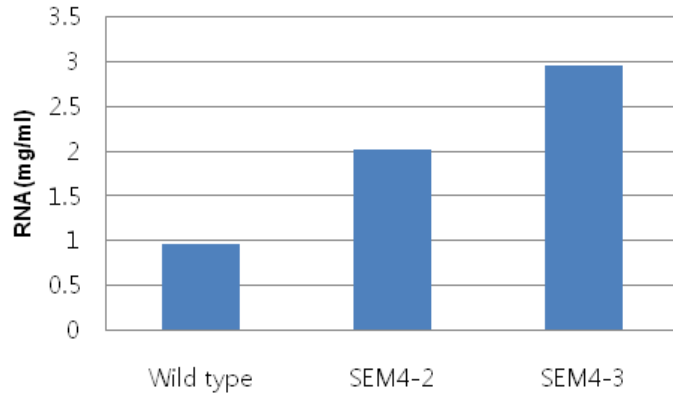


Fig. 20. Selection of high RNA production strain by EMS treatment.

또한, 우리는 추가적인 실험을 통하여 *C. utilis* SEM4-1을 EMS처리하여 얻은 변이주로부터 113.8 ug/ml의 glutathione과 RNA 함량이 3.1배 증가(2.95 mg/ml)한 *C. utilis* SEM-3를 얻었다(Fig. 20). 그러므로, 이후의 실험은 glutathione과 RNA를 동시에 생산할 수 있는 *C. utilis* SEM4-3 균주를 선발하였다.

#### (6) RSM을 이용한 배지 최적화

Table 9에서 나타난 것과 같이 균체농도에 대한 glutathione 농도는 YMD 배지에서 30°C, 200 rpm, 18hr, 2%접종(250ml flask 배양)하여 핵산 생산용 배지 최적화를 실행하였다. 실험 디자인 및 분석; Design Expert 7.0 프로그램을 사용하여 ANOVA 및 RSM분석을 실시하였다.

#### ● 1차 RSM(반응표면분석법) design

Table 20. Central composite design for the response surface method

Xn	Independent variables	Level				
		-α	-1	0	+1	+α
X1	glucose	33.18	40.00	50.00	60.00	66.82
X2	yeast extract	29.09	32.50	37.50	42.50	45.91
X3	ammonium phosphate	4.95	7.00	10.00	13.00	15.05

α=1.681791(중심점의 수: 3ea / 독립변수의 수: 3ea)

#### ● 1차 RSM실험 결과 고찰

본실험은 3개의 실험구(탄소원, 질소원, 무기원)에 대하여 최적농도를 결정하기 위하여 중심합성계획법을 이용하여 반응표면분석을 실시하였다. 모든 실험의 계획 및 분석은 design expert 7.0 분석 프로그램을 사용하였다. 독립변수는 중심합성계획에 따라 17실험구로 구분하

였으며,  $\alpha$ 값은 1.68로써 반응표면분석을 실시한 결과 quadratic model로 분석하였을 경우 lack of fit은 나타나지 않았으며, RNA함량에 대한  $R^2$ 은 0.87, p-value(유의확률)는 0.0168로 0.05보다 작으며, 1.68%  $\alpha$ -level에서 유의한 quadratic model이 도출되었다(Tabel 20). 탄소원, 질소원, 무기원의 교호작용이 높은 것을 볼 수 있으며, 특히 탄소원과 무기원의 농도에 따른 RNA 함량의 변화가 큰 것으로 나타났다. 그림 21에서 보는 바와 같이, 탄소원, 질소원 및 무기원이 RNA합성에 미치는 영향을 나타내는 반응표면분석 cube plot에서 RNA 최고 함량을 나타내는 최적점은 탄소원(glucose) 60.0 g/L, 질소원(yeast extract) 42.5 g/L, 무기원(ammonium phosphate) 7.0 g/L로 나타났다. 그러므로 다음 실험에서는 위의 최적점을 중심점으로 활용하여 2차 RSM을 수행하였다.

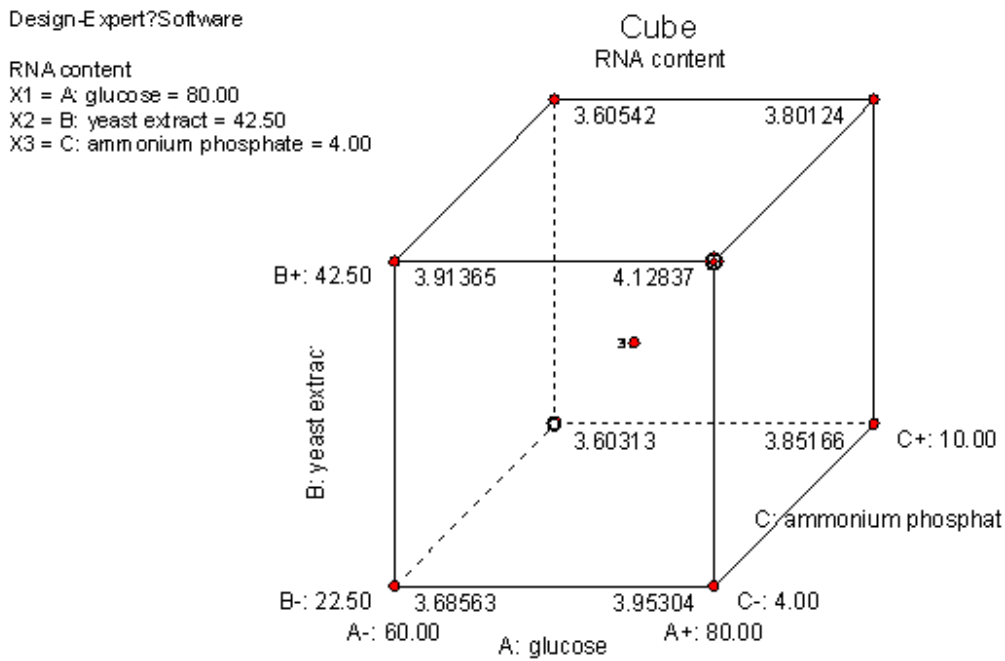


Fig. 21. 탄소원, 질소원 및 무기원이 RNA합성에 미치는 영향을 나타내는 반응표면분석

● 2차 RSM design

Table 21. Central composite design for the response surface method

Xn	Independent variables	Level				
		- $\alpha$	-1	0	+1	+ $\alpha$
X1	glucose	53.18	60.00	70.00	80.00	86.82
X2	yeast extract	15.68	22.50	32.50	42.50	49.32
X3	ammonium phosphate	1.95	4.00	7.00	10.00	12.05

$\alpha=1.681791$ (중심점의 수:  $3e_a$  / 독립변수의 수:  $3e_a$ )

● 2차 RSM 실험 고찰

모든 실험조건은 1차 RSM 실험과 동일하게 진행하였으며, 탄소원, 질소원 및 무기원의 농도를 변경하여 반응표면분석을 실시한 결과 quadratic model로 분석하였을 경우 lack of fit은 나타나지 않았으며, RNA 함량에 대한  $R^2$ 은 0.85, p-value(유의확률)는 0.0317로 0.05보다 작으며, 3.17%  $\alpha$ -level에서 유의한 quadratic model이 도출되었다(Table 21). 그림 22와 같이 탄소원, 질소원 및 무기원이 RNA 합성에 미치는 영향을 나타내는 반응표면분석 cube plot에서 RNA 최고 함량을 나타내는 최적점은 탄소원(glucose) 80.0 g/L, 질소원(yeast extract) 42.5 g/L, 무기원(ammonium phosphate) 4.0 g/L로 나타났으나, 질소원(yeast extract)이 RNA 합성에 영향을 미치는 주효과를 분석한 결과 질소원의 최적농도는 + $\alpha$ 값 보다는 이하가 최적일 것으로 판단되며, 최적점에서의 RNA 함량에 대한 점추정을 실시하여 Table 23에 나타내었다. 최종적으로 RNA 함량이 가장 높은 탄소원, 질소원 및 무기원의 최적배지농도는 80 g/L, 37.5 g/L 및 4.0 g/L 이었으며, 예측되는 최대 RNA 함량은 4.15 mg/ml 이었다.

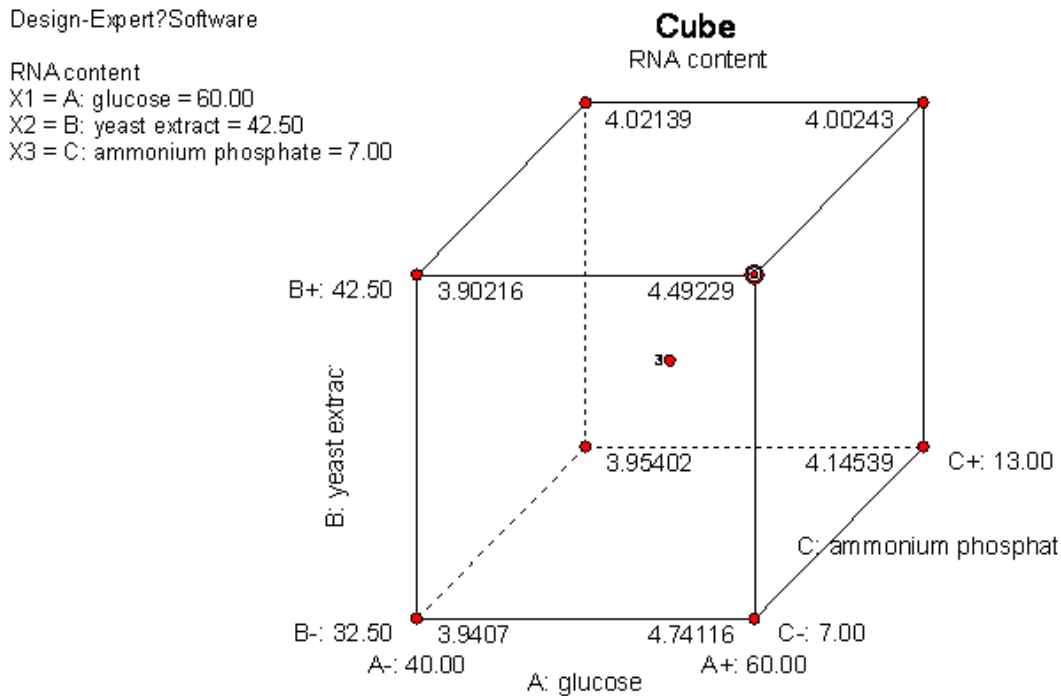


Fig. 22. 탄소원, 질소원 및 무기원이 RNA 합성에 미치는 영향을 나타내는 반응표면분석 cube plot

Table 22. Design expert를 이용한 최적화 단계의 재현성 확인(point prediction)

Factor	Name	Level	Low level	High Level
A	glucose	80	60	80
B	yeast extract	37.5	22.5	42.5
C	Ammonium phosphate	4	4	10
Response	Prediction	SE Mean	95% CI low	95% CI high
RNA content	4.152	0.073	3.979	4.325

(7) Lab-scale에서 효모 glutathione 및 RNA 생산

5L fermenter를 이용하여 cell growth, pH 변화, RNA 생산, glutathione 생산을 검토하였다 (Fig. 22). 효모배양은 시간의 경과에 따라 성장하였으며 배양 10시간째에 정지기를 보였으며, RNA의 함량은 세포성장과 함께 증가하다가 배양 10시간째에 4.45mg/ml로 가장 높았으며 이후 급격히 감소하는 양상을 보였다. pH는 배양시작과 동시에 감소하기 시작하여 배양 10시간째를 기점으로 감소가 둔화 되었으며, 이는 세포 성장과 비슷한 양상을 보였다. Glutathione은 Table 23에서 나타낸 것과 같이 배양 16시간에 최대값을 나타내었으며 배양 24시간에서는 감소하는 경향을 보였다.

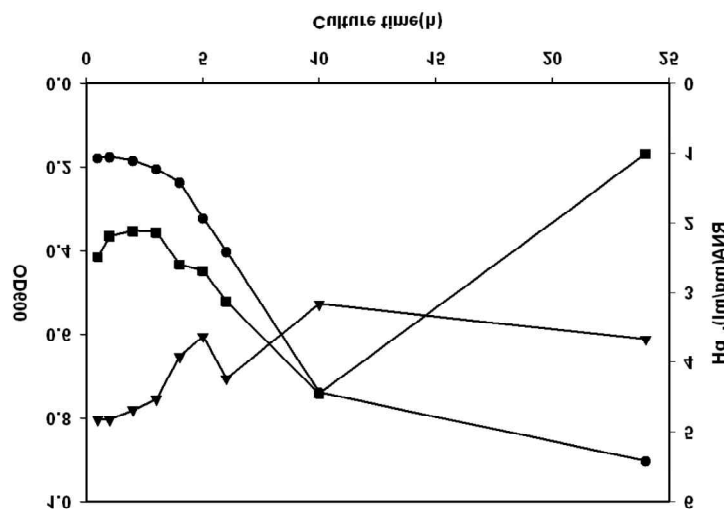


Fig 23. Specific glutathione and RNA production of *C. utilis* SEM4-3 strain  
Symbol: ■, RNA(mg/ml); ●, OD600; ▲, pH

Table 23. Glutathione production by culture time of *C. utilis* SEM4-3 strain

Culture time(h)	0	4	10	16	24
Glutathione (ug/ml)	8	12	36	68	52



마. 우리밀, 마늘 양과 추출물을 이용한 관능 검사 결과

(1) 추출물들의 관능검사 결과

원료 추출물들의 관능적 특성 강도를 Duncan's multiple range test를 수행한 결과 (Table 16) 모든 특성에서 각 시료에 따른 유의적 차이(P<0.05)가 있었다. 사용된 8가지 시료는 다음과 같다 : control(C)로서 0.3% MSG solution와 0.8% NaCl이 함유된 수용액으로서 테스트하고자 하는 시료 0.3g을 첨가한다. 추출물 시료는 WH1, WH2, WH3, 밀단백, GE, OE, YE을 이용하여 감칠맛 정도, 맛의 지속성, 치킨풍미, 마늘, 양파 풍미, 부드러운 맛, 이미 및 이취를 조사하였다.

방사형 그래프(Fig. 24)와 Duncan's multiple range test를 수행한 결과에서 보면 감칠맛은 밀단백, YE, WH3, GE 순이였고 그중 밀단백이 유의적으로 가장 높게 나타났다. 맛의 지속성은 GE, OE, YE, 밀단백 순 이였으며, GE에서 유의적으로 가장 높은 지속성을 나타내었다. 치킨 풍미는 전체 시료에서 미미하였으며, GE에서 약간의 치킨 풍미를 느낄 수 있었다. 마늘, 양파 풍미는 GE와 OE에서 월등히 높고, 그 외의 시료에서는 인지하기에 미미한 정도였다. 부드러운 맛 특성은 밀단백, OE, YE에서 비교적 높게 나타났으며, 밀단백에서 유의적으로 높게 나타났다. 이미, 이취는 WH1, WH2, WH3에서 비교적 높게 나타났으며, 이는 추출공정에서 아미노산, 펩타이드, 저분자 단백질이 함께 어우러진 발효향미, 간장향미, 비린향미 등에서 오는 복합적인 이미, 이취로 보인다. 이러한 이미, 이취가 다른 조미성분들과 어우러지게 되면 풍미를 강화시켜 주는 역할을 할 수도 있을 것이라 사료된다.

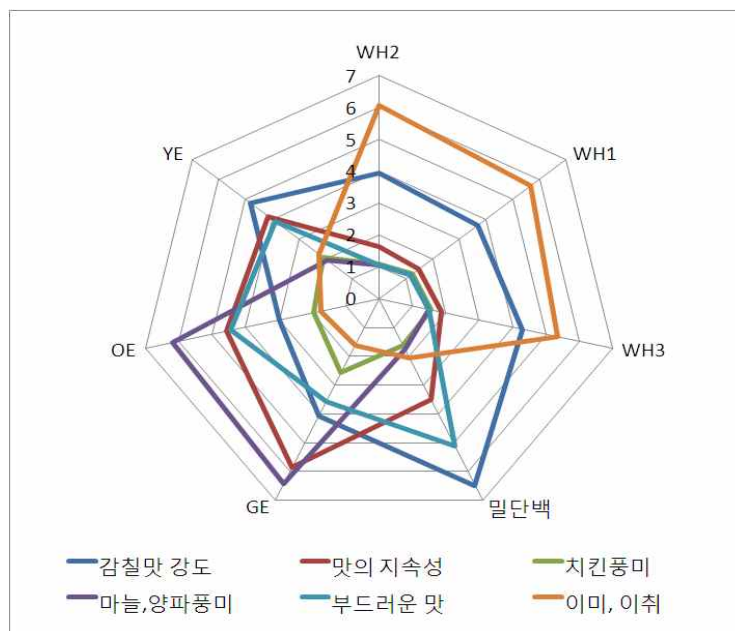


Fig. 24. Spider web about kokumi materials attributes

추출물 원료와 추출방법에 따른 추출물 묘사분석을 수행한 결과, 원료가 같은 WH1, WH2,

WH3는 대부분의 특성에서 유의적 차이가 없음을 알 수 있었다. 원료가 같고 추출방법이 다른 WH1, WH2, WH3와 밀단백의 경우, 밀단백이 감칠맛, 부드러운 맛에서 유익적 차이가 있음을 알 수 있었다. 반면에 원료가 다른 GE, OE, YE에서는 모든 특성에서 유의적 차이가 있음을 알 수 있었다. 따라서 추출물들은 추출방법과 원료에 따른 차이가 크다는 것을 알 수 있었다.

## (2) 추출물을 이용한 soup system의 관능적 특성 및 소비자 기호도

### (가) 관능특성

추출물을 적용한 chicken soup의 관능특성을 알아보기 위하여 chicken soup에 kokumi 소재를 0.3%씩 첨가하였다(table 24).

Table 24. Amount of kokumi materials used in chicken soup system

시료	C	WH1	WH2	WH3	밀단백	GE	OE	YE
마늘엑기스분말	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5
양파엑기스분말	22.8	22.8	22.8	22.8	22.8	22.8	22.8	22.8
치킨엑기스분말	44.8	44.8	44.8	44.8	44.8	44.8	44.8	44.8
정제소금	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5
후추	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
텍스트린	20.0	19.7	19.7	19.7	19.7	19.7	19.7	19.7
WH 1 kDa 이하	-	0.3	-	-	-	-	-	-
WH 1~5 kDa	-	-	0.3	-	-	-	-	-
WH 5 kDa 이상	-	-	-	0.3	-	-	-	-
밀단백 분말	-	-	-	-	0.3	-	-	-
GE 분말	-	-	-	-	-	0.3	-	-
OE 분말	-	-	-	-	-	-	0.3	-
YE 분말	-	-	-	-	-	-	-	0.3
합 계	100	100	100	100	100	100	100	100
회석레시피는 위의 8종 시료 각각의 혼합물 5.3g을 뜨거운 물 100ml에 회석하여 관능평가에 이용하였다.								

이렇게 제조한 chicken soup를 각각 5.3g을 뜨거운 물 100ml에 회석하여 관능평가에 사용하였다. Fig. 25과 Table 25에서 나타낸 것과 같이 방사형 관능결과에서 보면 감칠맛과 부드러운 맛은 밀단백이 가장 좋았으며, 그 다음으로는 YE가 좋았다. 맛의 지속성은 GE, 밀단백, WH3, OE가 높게 나타났으며, 그중에서 GE가 가장 높게 나타내었다. 이미, 이취는 WH2, WH1, WH3 순으로 높게 나타났으며, 이는 풍미의 지속성을 향상시키는 효과도 가지고 있으나 이미, 이취가 강해 제대로 평가받지 못한 면도 있다. WH3의 경우 이미, 이취만 조금 더 보완한다면 좋은 kokumi 소재가 될 수 있다. 감칠맛의 강도와 맛의 지속성은 밀단백이 가장 우수하였으며, 맛의 지속성은 GE가 가장 우수하였다.

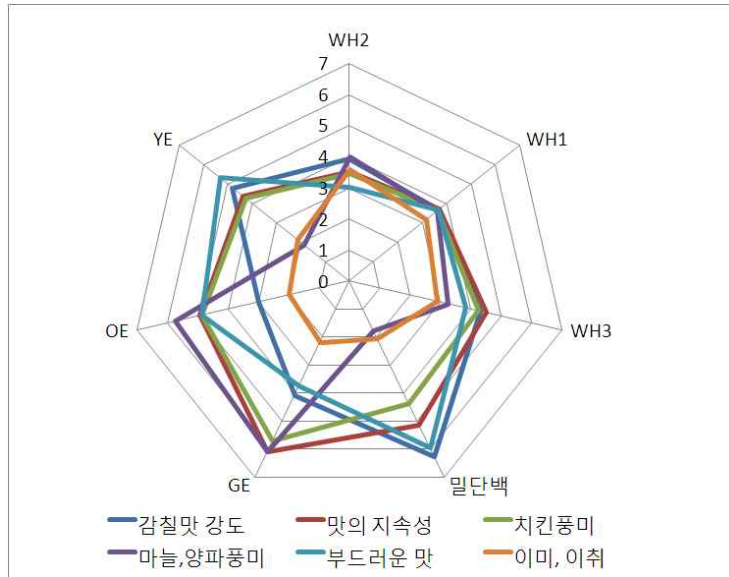


Fig. 25. Spider web about attributes of chicken soups containing Kokumi materials

Table 25. Sensory scores for chicken soup containing kokumi materials

	WH2	WH1	WH3	밀단백	GE	OE	YE
감칠맛 강도	3.94	3.69	4.31	6.25	4.06	3.00	4.81
맛의 지속성	3.50	3.69	4.50	5.14	6.06	4.94	4.38
치킨풍미	3.44	3.63	4.25	4.38	5.69	4.88	4.25
마늘,양파 풍미	4.00	3.63	3.25	1.75	6.06	5.75	1.88
부드러운 맛	3.00	3.63	3.81	5.94	3.75	4.88	5.31
이미, 이취	3.56	3.13	2.88	2.06	2.19	2.00	2.13

#### (나) 기호도 검사

추출물을 적용한 chicken soup의 기호도 검사 결과 (Table 26), 밀단백 양을 0.3g넣은 시료가 가장 높은 기호도를 나타냈고, 두 번째 기호도가 높은 시료는 GE이었다. 이 두 시료의 기호도는 유의적 차이가 있었다. 또한 YE가 세 번째로 높은 기호도를 나타냈으며, 이 시료는 유의적 차이가 없었고, 그 밖에 OE, WH3의 순으로 기호도는 낮아졌다.

관능적 특성 평가 결과를 살펴보면, WH1과 WH2는 간장 향미, 발효향미, 비린향미가 높은 경향을 보였다. 이 중, 특히 chicken soup의 중요한 특성인 비린 chicken 향미가 증가한 것으로 사료된다.

Table 26. Overall acceptability score for soup containing kokumi materials

	WH2	WH1	WH3	밀단백	GE	OE	YE
전체기호도	4.06	3.69	4.81	6.13	5.69	5.19	5.31
	±0.38	±0.33	±0.34	±0.15	±0.18	±0.19	±0.18

바. Pilot scale에서의 효모 생산 공정 최적화(3 ton 반응기) - 3차년도

Figure 23의 Lab-scale 배양 실험 결과를 기초로 3 ton 반응기를 이용하여 핵산 생산을 실시하였다. 그 결과 Fig 26에서 보는 바와 같이 RNA 함량이 최대 4.48(mg/ml)로 lab-scale과 유사한 결과를 얻었다. 최대 RNA 생산은 3 ton 반응기를 이용하여 13.5kg RNA 함량을 얻었다.

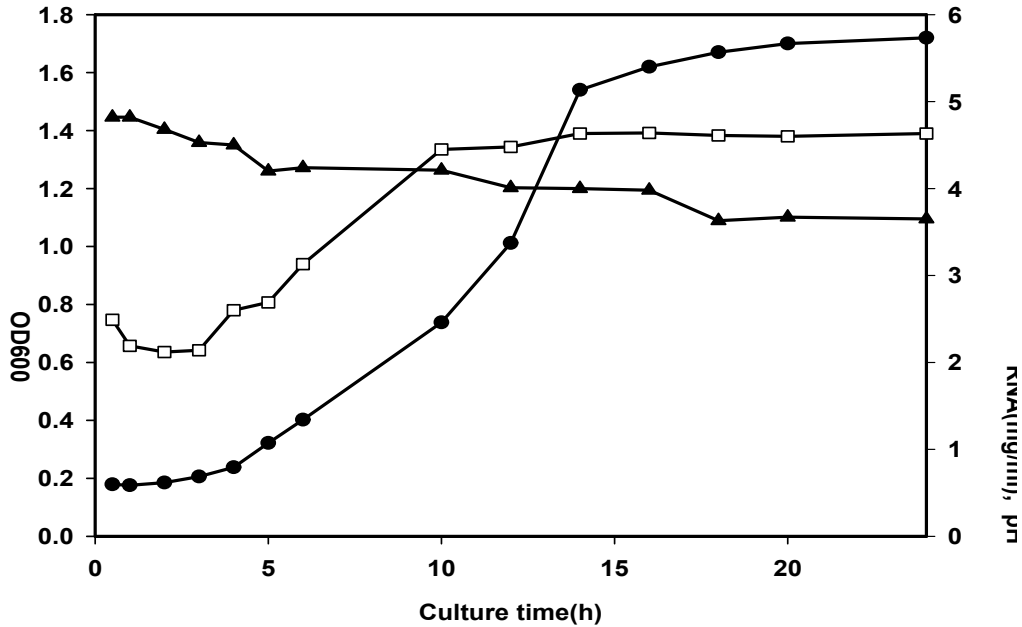


Fig. 26. Cell growth and RNA production of *C. utilis* strain  
Symbol: □, RNA(mg/ml); ●, OD600; ▲, pH

(1) 효모엑기스 제조

효모엑기스를 제조하기 위하여 배양한 효모를 원심분리한 후, 수세하였다. 고형분이 10% 되게 용해한 후에 1% 단백질 분해효소와 0.5% 핵산효소를 첨가하여 분해하였다. 분해액은 여과를 통하여 고액을 분리하고 남은 여액만을 회수하여 조미소재로 사용하였다. 그 최종 수율은 5%(w/v)이었다.

사. Spray dry를 이용한 제형 조건 확립 제재화

(1) 온도와 분산속도(rpm)에 따른 최적의 제재화 조건 확립

고온단기 분해 반응물의 분말 제재화는 제품의 품질 안정화(오염, 흡습 등)에 중요한 인자일 뿐만 아니라 보관이 간편하고, 운송비용을 줄일 수 있는 장점이 있다. Inlet 온도와 outlet 온도가 낮거나 atomizer rpm이 적합하지 않으면 수분 흡습이 많아 caking이 생기거나 고르지 못한 분말의 입자 상태를 얻는다. Inlet 온도와 outlet 온도가 너무 높으면 분말이 타서 색상이 짙어지는 문제가 발생한다. 반응물의 분말화는 spray dryer(SD)의 Inlet 온도, Outlet 온도, rpm 등의 조건에 따라 많은 영향을 받는다. 따라서 이 조건을 확립하는 것이 분말화의 중요한

인자이다. Table 10는 Inlet 온도, Outlet 온도, rpm에 따른 spray dryer의 분말화 조건을 검토하였다. SD의 Atomizer rpm은 일반적으로 사용하는 18,000으로 고정하고, Inlet 온도는 170 ~ 180℃, outlet 온도는 70 ~ 90℃ 범위에서 분말화 조건을 검토하였다(Table 27).

그 결과 분말의 수분함량이 적고, 색상이 밝고, 손실량이 적은 최적 조건은 Inlet 온도가 180℃, Outlet 온도가 80℃, 18,000 rpm에서 가장 좋은 분말 제품을 얻을 수 있었다.

Table 27. Condition establishment of powder using spray dry

	Inlet temp(℃).	outlet temp(℃)	rpm	분말입자 상태
1	170	70	18,000	수분함량이 높고, 챔버 내부에 붙는 현상이 큼
	170	80	18,000	
	170	90	18,000	
2	175	70	18,000	액의 이동 속도가 빨라 분말의 색이 짙음
	175	80	18,000	
	175	90	18,000	
3	180	70	18,000	분말은 좋으나, 수분 함량이 다소 높음
	<b>180</b>	<b>80</b>	<b>18,000</b>	<b>분말이 가장 좋고, 색상도 적당함</b>
	180	90	18,000	분말은 좋으나, 색이 다소 진함

## (2) 부형물의 종류에 따른 최적의 제재화 조건 확립

분말 제재화 과정에서 발생하는 또 다른 문제 중에 하나는 잔존하는 수분이나 흡습된 수분에 의해 발생하는 caking을 방지하는 것이다. 분말 제품마다 적합한 caking 방지제가 다르기 때문에 여러 제품을 검토하였다. Caking 방지제로서 lactose, dextrin, malto-dextrin, 아라비아검을 검토하였다. Table 28은 caking 방지제에 따른 분말입도, 색도, 흐름성, 흡습정도를 나타내었다. 검토한 4종류의 caking 방지제 중에서 가장 좋은 효과는 malto-dextrin이었고, 그 다음은 dextrin, lactose, 아라비아검 순 이었다. 본 고온단기 분해반응물의 경우 malto-dextrin이 분말입도, 색도, 흐름성, 흡습정도에 있어서 가장 좋은 caking 방지효과를 보였다.

따라서 분해반응물의 분말화는 2% maltodextrin을 caking 방지제로 사용하고, Inlet 온도가 190℃, Outlet 온도가 80℃, 18,000 rpm에서 가장 좋은 상태의 분말 제품을 얻을 수 있었다.

Table 28. Effect of caking inhibitors on moisture absorption of spray-drying powder

부형제	분말입도	색도	흐름성	흡습(수분)정도
Lactose	++	+++	+++	+++
Dextrin	++++	++	++	+++
Malto-dextrin	++++	+++	++++	++++
아라비아 검	++	++	++	++

분말입도: ++, 분말입자가 거칠; +++, 분말입자가 고음; +++++, 분말 입도가 아주 고음

색도: +, 진함; ++, 보통; +++, 밝음

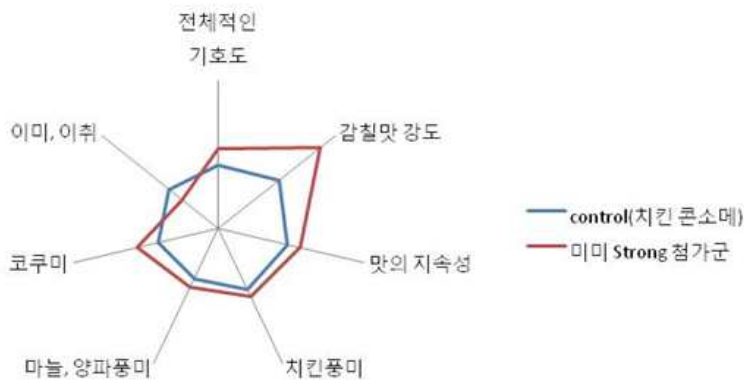
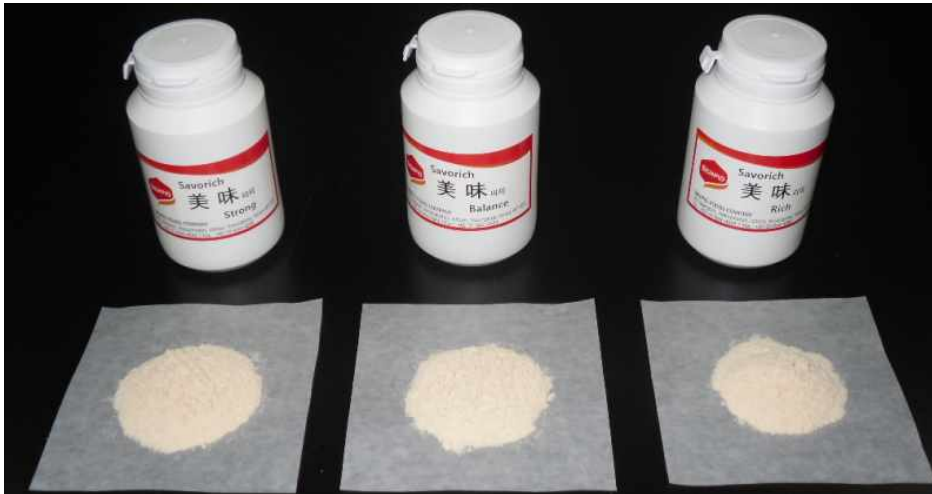
흐름성: ++, 나쁨; +++, 좋음; +++++, 아주 좋음

흡습정도: ++, 높음; +++, 보통; +++++, 낮음

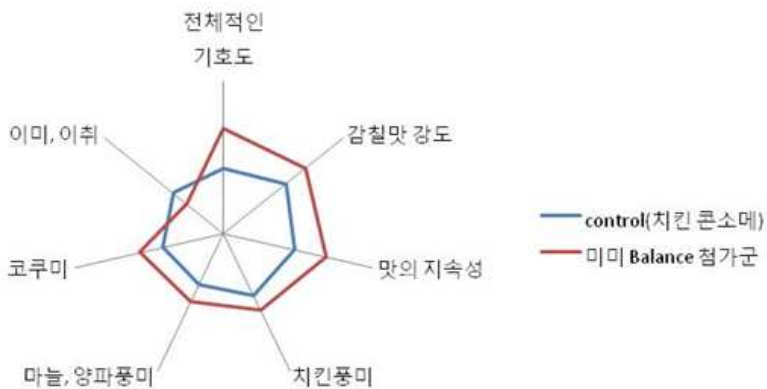
## 아. 식품 적용 test 및 관능검사

### (1) 조미 소재 개발

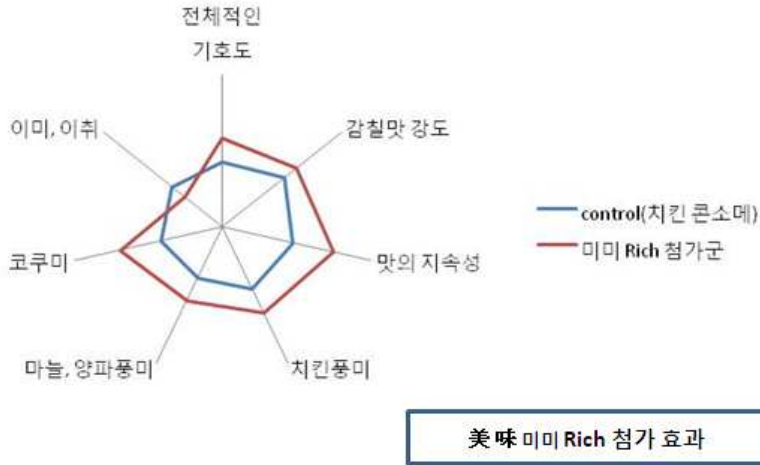
상기의 방법을 활용하여 아래 그림에서 제시하는 바와 같이 3종의 조미소재를 개발하였다. 그 관능특성은 깊은 맛(strong), 조화로운 맛(balance), 풍부한 맛(richness)이 특징이다.



美味 미미 Strong 첨가 효과



美味 미미 Balance 첨가 효과



(2) 소재 적용한 완제품(연두) 개발



자연발효로 만든 4세대 조미료, 건강하게 요리의 맛을 살리는 신개념 맛내기 재료

- ‘연두’는 용도나 취향에 따라 깊은 맛, 담백한 맛 두 종류가 출시될 예정이다.
- 형태는 액상이라서 분말 조미료(텍스트린, 점도증강 첨가물함유)처럼 입구가 뜨거운 김에 닿아 굳거나 눅눅해지지 않고, 깔끔하게 사용할 수 있다.
- 연두의 원료는 국산 양파, 대파, 마늘, 생강, 무, 브로콜리, 표고버섯 등 국산재료를 사용하였고, L-글루타민산나트륨, 합성보존료, 설탕, 쇠고기향미유(우지), 텍스트린 등 첨가하지 않았다.

□ 천연 고쿠미 조미소재를 이용하여 개발한 제품(연두)은 공장출하가격 기준 판매액은 4,950원(320g)으로 10년 4월 중순부터 이마트, 롯데마트, 홈플러스 매장에서 판매되고 있다.

## 제 2 절 Kokumi 향미특성 규명 및 process 조건 확립

### 1. 연구개발의 내용 및 방법

#### (1) 시료 조건

Target제품인 AJINOMOTO사의 KOJI-AJI와 KYOWA HAKKO사의 BS-100 (분말 형태의 조미료)을 시료로 채택하여 사용하였다.

#### (2) Pyrazine 및 sulfur 함유 성분의 추출 및 분석법 확립

(가) 동시용매증류추출법 (SDE: Simultaneous Steam Distillation/Solvent Extraction)

물보다 비중이 무거운 methylene chloride 50 mL을 한 쪽 둥근 플라스크에 넣고 시료 5 g 과 deionized water 100 mL을 다른 쪽 플라스크에 넣어 Liken-Nickerson apparatus로 2시간 동안 추출하였다. 추출 후 organic fraction을 취하여 무수 sodium sulfate로 수분을 제거한 후 질소가스를 이용하여 final volume 0.1 mL까지 농축시켰다.

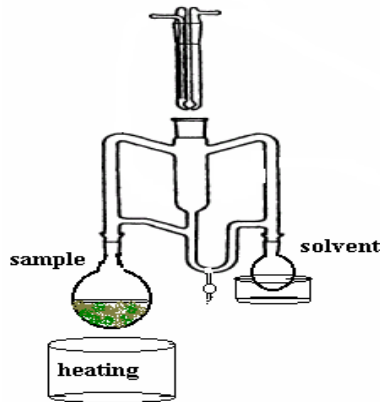


Fig. 27. Simultaneous Steam Distillation/Solvent Extraction (Parliament, 2002)

(나) 고체상미세추출법 (SPME : Solid Phase Microextraction)

Carboxen/Polydimethylsiloxane (CAR/PDMS) fiber를 사용하여 실험을 수행하였다. 60 mL vial에 시료 5 g과 deionized water 30 mL를 넣은 뒤 PTFE/rubber septum으로 입구를 봉하고, 60°C에서 1시간 동안 평형상태를 만들었다. 유리병에 SPME fiber needle을 넣고 30분간 휘발성 성분을 흡착시키고 200°C의 GC injection port에서 5분간 탈착시켰다.



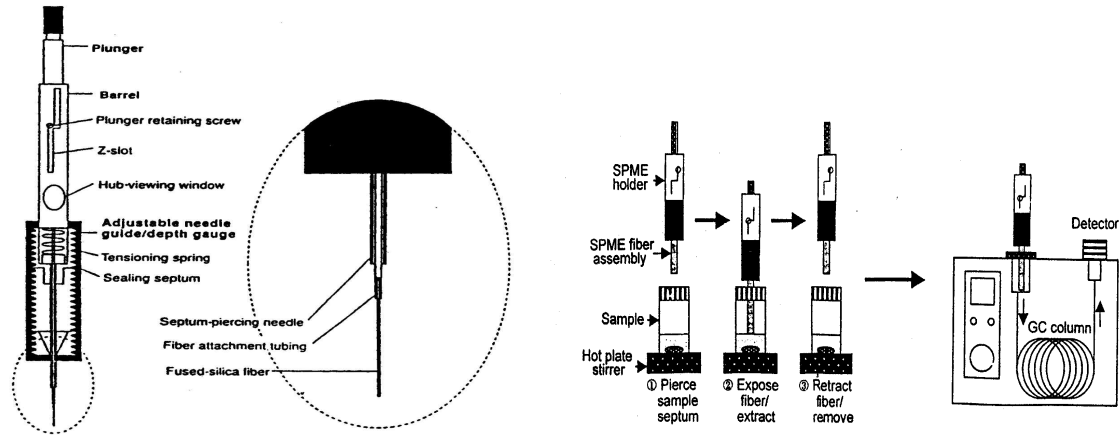


Fig. 28. Extraction process by SPME and desorption System for GC analysis (Kataoka *et al.*, 2002)

(다) 휘발성 향미성분 분석

① GC-MS 분석

휘발성분의 동정을 위해 HP-6890 series gas chromatograph에 연결된 5975A mass selective detector (Hewlett-Packard Co., Palo Alto, CA, USA)가 사용되었다. SDE에 의해 추출된 농축액의 1  $\mu\text{L}$ 를 취해 GC에 주입하였으며 이에 따른 gas chromatograph-mass spectrometer 조건은 다음과 같다.

<GC-MS 분석조건 : SDE>

- Column: DB-5MS (30 m length $\times$ 0.25 mm I.d  $\times$  0.25  $\mu\text{m}$  film thickness)
- Oven: 40 $^{\circ}\text{C}$  (3 min)  $\rightarrow$  4 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$   $\rightarrow$  200 $^{\circ}\text{C}$  (10 min)
- Injector temperature: 200 $^{\circ}\text{C}$
- Split ratio: splitless
- Carrier gas: He
- Flow rate: 0.8 mL/min
- EM voltage: 70 eV

Solid phase microextraction (SPME)에 의해 추출된 향기성분은 GC injector에 넣고 5분간 탈착시켰다. 이에 따른 gas chromatograph-mass spectrometer 조건은 다음과 같다.

<GC-MS 분석조건 : SPME>

- Column: DB-5MS (30 m length $\times$ 0.25 mm I.d  $\times$  0.25  $\mu\text{m}$  film thickness)
- Oven: 40 $^{\circ}\text{C}$  (6 min)  $\rightarrow$  4 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$   $\rightarrow$  210 $^{\circ}\text{C}$  (10 min)
- Injector temperature: 200 $^{\circ}\text{C}$
- Split ratio: splitless
- Carrier gas: He
- Flow rate: 0.8 mL/min

-EM voltage: 70 eV

## ② 휘발성 향미성분의 동정

각 시료의 휘발성 향미성분은 on-computer library (Wiley 275L)와 기타 참고자료에 의해 비교 분석되었고 *n-paraffins*  $C_7 - C_{22}$ 을 사용한 retention index (RI) value를 타 자료와 비교하여 동정하였다.

SDE, SPME에 의해 추출된 각각의 휘발성 향기 성분들의 정량은 전체 peak areas에 대한 각 성분들의 peak area를 percentage로 계산하였다.

## (라) 향기활성성분(odor-active compound)의 분석

### ① GC-Olfactometry 분석

향기활성성분의 동정을 위해 sniffing port가 설치된 HP-6890 series gas chromatograph/flame ionization detector를 사용하였다. SDE 방법에 의해 추출된 농축액 1  $\mu$ L를 GC에 주입한 후 GC에서 분리되어 나오는 각 peak들을 sniffing하여 aroma description을 얻었다. Column의 끝은 flame ionization detector (FID)와 sniffing port 사이에서 1:1로 분지하였고, 이에 따른 gas chromatography-olfactometry 조건은 SDE 추출 방법의 GC-MS 분석조건과 동일하게 하였다.

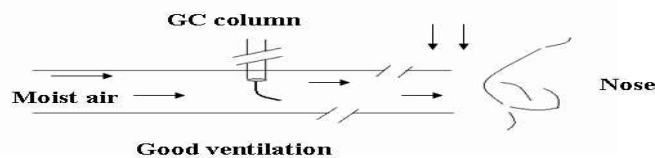


Fig. 29. Scheme of GC-Olfactometry

### ② 향기활성성분의 동정

각 시료의 향기활성성분은 on-computer library (Wiley 275L)나 기타 참고자료에 의해 비교 분석되었고 *n-paraffins*  $C_7 - C_{22}$ 을 사용한 retention index (RI) value 및 odor description은 다른 자료들과 비교하여 동정에 사용하였다.

## (3) Free glutamic acid의 분석법 확립

### (가) Free glutamic acid의 동정

#### ① 아미노산의 추출 및 derivatization

아미노산의 효율적인 추출을 위해 60 mL vial에 2 g의 시료와 10 mL의 methanol을 넣고 70  $^{\circ}$ C에서 25분간 추출하였다. 30분간 상온에서 cooling 후, 10 mL water와 5 mL chloroform을 넣고 1분간 vortexing 하였다. 그 후 3000 rpm에서 10 분간 2회에 걸쳐 원심분리 하였다. 원심분리 한 부분 중 aqueous fraction 100  $\mu$ L을 취하여 GC-MS용 Amino acid kit인 EZ:faast<sup>TM</sup> Amino acid analysis kits (Phenomenex, Inc Germany)를 이용하여 아미노산만을 target으로 유도체화 (derivatization) 시킨 후 GC-MS 및 GC에 주입하였다.

#### ② GC-MS 분석

아미노산은 HP 6890 series gas chromatograph에 연결된 5975A mass selective detector

(Hewlett-Packard Co., Palo Alto, CA, USA)에 의해 분석되었고, standard sample, on-computer library (agilent.L)와 기타 참고자료를 이용하여 동정하였다. 시료의 2  $\mu$ L를 취해 GC에 주입하였으며, 이에 따른 gas chromatograph-mass spectrometer 조건은 다음과 같다.

#### <GC-MS 분석조건>

##### GC settings

- Column: Zebron column (ZB-AAA, 10 m length  $\times$  0.25 mm i.d.)
- Oven: 110 $^{\circ}$ C $\rightarrow$ 30 $^{\circ}$ C/min $\rightarrow$  320 $^{\circ}$ C
- Injector temperature: 250 $^{\circ}$ C
- Detector temperature: 320 $^{\circ}$ C
- Split ratio: 1:15
- Carrier gas : He
- Flow rate: 1.1 mL/min

##### MS settings

- MS source: 240 $^{\circ}$ C
- MS Quad: 180 $^{\circ}$ C
- Auxiliary: 310 $^{\circ}$ C
- Scan rage: 45-450 m/z
- Sampling rate: 2<sup>2</sup> (3.5 scans/sec)

(나) Free glutamic acid의 정량

##### ① 아미노산의 추출 및 derivatization

GC-MS와 같은 방법으로 추출한 후 aqueous fraction에서 100  $\mu$ L를 취해 GC-FID용 Amino acid kit인 EZ:faast<sup>TM</sup> Amino acid analysis kits (Phenomenex, Inc Germany)를 이용하여 아미노산만을 target으로 유도체화 (derivatization) 시켰다.

##### ② GC-FID 분석

Free glutamic acid의 정량은 FID가 장착된 HP 5890 series gas chromatograph (Hewlett-Packard Co., Palo Alto, CA, USA)가 사용되었다. Glutamic acid와 asparagine, phenylalanine은 같은 조성의 용매로 100배 희석한 후 유도체화 하여 정량하였으며 외부표준검량 물질도 같은 조성의 용매에 용해시킨 후 유도체화 시켜 정량을 하였다. 추출 후 유도체화 된 시료의 1  $\mu$ L를 취해 GC에 주입하였다. Aspartic acid나 glutamic acid를 제외한 다른 free amino acids는 내부표준물질의 peak area값에 대한 동정 화합물의 peak area로 계산하였고, aspartic acid와 glutamic acid는 외부표준물질로 검량곡선을 작성하여 함량을 구하였다. 이에 따른 GC-FID 조건은 다음과 같다.

#### <GC-FID 분석조건>

- Column: Zebron column (ZB-AAA, 10 m length  $\times$  0.25 mm i.d.)
- Oven: 110 $^{\circ}$ C (6 min) $\rightarrow$  28 $^{\circ}$ C/min $\rightarrow$  320 $^{\circ}$ C (1 min)

- Injector temperature: 250°C
- Detector temperature: 320°C
- Split ratio: Splitless
- Carrier gas : He
- Flow rate: 1.5 mL/min

(다) 핵산 성분의 분석법 확립

① 핵산 성분의 추출

시료 1 g을 HPLC grade water에 넣어 최종 부피를 100 mL로 맞춘 용액을 실온에서 30분간 stirring하여 추출을 시행하였다.

② 핵산 성분의 분석

㉠ Mobile phase 최적화

Mobile phase의 조성 변화에 따른 분리능을 확인하였으며, 5'-CMP, 5'-UMP, 5'-GMP, 5'-IMP 표준물질을 200 mg/L 농도로 주입하였다.

<High Performance Liquid Chromatography>

- Model: Waters 600 controller, 600 pump, 717 Autosampler
- Detector: 2487 dual  $\lambda$  absorbance detector (UV detector 254 nm)
- Column:  $C_{18}$  column (Sunfire 4.6 × 250 mm, 5  $\mu$ m)
- Flow rate: 1.0 mL/min

<Mobile phase 조성>

- ① A line : 0.5 M potassium dihydrogen phosphate (pH 4.0, phosphoric acid)  
isocratic
- ② A line : 60 % methanol  
B line : 0.02 M potassium dihydrogen phosphate (pH 5.5, potassium hydroxide)  
gradient 0-15min (3:97 → 20:80)  
15-22min (20:80 → 3:97)
- ③ A line : 1% triethylamine  
isocratic
- ④ A line : 0.3M potassium dihydrogen phosphate(pH 4.3, phosphoric acid)  
isocratic

㉡ High Performance Liquid Chromatograph (HPLC)를 이용한 분석

위에서 최적화된 방법을 이용하여 추출한 용액을 syringe filter로 filtration 시킨 후 HPLC에 20  $\mu$ L 주입하여 분석하였다. HPLC 분석 조건은 다음과 같다.

<HPLC 분석조건>

- Model: Waters 600 controller, 600 pump, 2487 dual  $\lambda$  absorbance detector, 717

## Autosampler

- Detector: 2487 dual  $\lambda$  absorbance detector (UV detector 254nm)
- Column:  $C_{18}$  column (Sunfire 4.6  $\times$  250 mm, 5 $\mu$ m)
- Mobile phase: 0.3 M potassium diphosphate (pH 4.3, phosphoric acid)
- Flow rate: 1.0 mL/min

### ㉔ 정량

HPLC를 이용하여 분석한 5'-CMP, 5'-UMP, 5'-GMP, 5'-IMP는 외부표준물질의 검량곡선을 이용하여 정량하였다.

## (4) NaCl의 분석법 확립

### (가) 추출

시료 1 g을 deionized water (D.W)에 넣어 100 mL로 부피를 조정된 용액을 실온에서 30분간 stirring하여 추출하였다.

### (나) NaCl의 분석 방법

#### ① Mohr법

추출한 용액 중 10 mL를 취하여 10%  $K_2CrO_4$  지시용액 1mL를 가한 후 적갈색 침전이 생기는 순간을 반응종점으로 하여 0.1 N  $AgNO_3$  용액으로 적정하였다.

#### ② NaCl의 정량

표준용액으로 NaCl 0, 0.5, 1, 2, 4 g을 volumetric flask에 넣고 샘플과 동일하게 실험을 반복하여 검량곡선을 얻었으며, 이를 통해 시료 중의 NaCl 함량을 구하였다.

## 나. Formulation 및 process 조건 확립 (2차년도)

### (1) 전구체 종류 및 농도 결정

#### (가) 반응물의 선택

샘플에서 제공받은 밀분해 추출물 (WAB-G30), 밀단백 추출물 (eHVP), 밀글루텐 효소분해물, Aromild, 하이치온 엑기스-15 등을 주원료로 하여 실험을 진행하였다. Control을 기본으로 하여 전구체 및 반응조건 등을 달리하여 시료를 제작하였다.

#### (나) 반응조건

##### ① Thermal Reaction

60°C로 가열한 물 100 mL에 Table 10의 배합비에 따라 당류 (D-glucose, D-xylose)와 thiamin을 넣어 stirring한 후, 아미노산(isoleucine, asparagine, glycine, proline, methionine, cystine)과 밀분해 추출물 (WAB-G30) 또는 밀단백 추출물 (eHVP), 밀글루텐 효소분해물을 넣고, Aromild 또는 하이치온 엑기스-15를 첨가하였다. 그리고 garlic extract와 onion extract를 첨가한 뒤 완전히 용해될 때까지 stirring하였다. 온도를 40°C 이하로 낮춘 후, 50% NaOH

를 첨가하여 pH 8-9사이로 맞추었으며, stainless steel reaction bottle에 넣고 밀봉하여 Dry oven 95℃에서 90분간 반응시켰다.

## ② Vacuum Drying

Dry oven에서 반응한 시료를 30분간 흐르는 수돗물로 냉각 시킨 후, 시료에 maltodextrin, NaCl, IMP, GMP를 넣어 mixing 시킨 후 vacuum oven에 시료를 넣고 70℃에서 1시간 30분간 감압 건조하였다. 건조한 시료는 막자사발을 사용하여 분쇄하였다.

### (다) 배합비 설정

우리밀 단백질을 이용하여 개발된 밀분해 추출물 (WAB-G30), 밀단백 추출물 (eHVP), 밀글루텐 효소분해물을 샘플 측으로부터 제공받아 반응에 사용하였다. Table 10은 Kokumi 향미에 영향을 끼치는 주요성분들의 배합비들을 보여주고 있다.

### (3. 연구 결과 및 고찰, 나. Formulation 및 process 조건 확립에 서술)

본 실험에서는 밀분해 추출물, 밀단백 추출물, 밀글루텐 효소분해물 3가지를 사용하였으며, 이것을 기본으로 당류, 아미노산 및 핵산 등을 첨가하고 또한 여러 가지 식물성 부재료인 garlic extract, onion extract를 첨가하여 pH 8-9 범위에서 95℃, 90분간 반응시켰다. Maltodextrin은 carrier로서 시료의 안정성을 유지시키고, 향 방출기작을 조절시키므로 첨가하였다. 첨가량은 전체 시료량의 20%를 넘을 경우, 녹지 않으므로 최대 20%로 설정하였다. 또한 시료의 전체적인 savory 향 강도를 증진시키기 위해 NaCl을 첨가하였다. 잘 교반시킨 후 70℃로 설정된 vacuum dry oven에서 3시간 동안 감압 건조시켰으며 앞, 뒤 골고루 건조시키기 위해 1시간 30분 켜에 뒤집어주었다. 그리고 건조된 시료를 막자사발로 잘 분쇄하여 최종 제품으로 하였다.

## (2) Formulation에 따른 향미 특성 고찰 및 규명

### (가) Pyrazine 및 sulfur 함유 성분의 분석 방법

#### ① 휘발성 향미성분 분석

##### ㉠ Sample preparation

상기의 배합비 및 가공조건에 따라 제조한 분말 형태의 시료를 추출에 사용하였다.

##### ㉡ Extraction of volatile compounds

: Simultaneous Steam Distillation/Solvent Extraction (SDE) 추출

시료 5 g에 deionized water 100 mL를 첨가하였고, 추출을 위한 용매는 물보다 비중이 무거운 dichloromethane 50 mL를 사용하였다. 각 시료는 끓기 시작한 후 2시간 동안 추출이 진행되었으며 30분 동안 냉각시킨 후 dichloromethane 추출액을 모아서 여과지에서 무수 sodium sulfate로 수분을 제거한 후 질소가스로 final volume 0.1 mL까지 농축하였다.

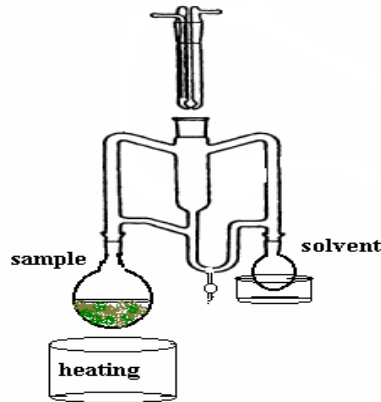


Fig. 30. Simultaneous Steam Distillation/Solvent Extraction (Parliament, 2002)

㉔ GC-MS 분석

추출이 끝난 sample은 휘발성 성분의 동정을 위해 HP-6890 series gas chromatograph에 연결된 5975 mass selective detector (Hewlett-Packard Co., Palo Alto, CA, USA)가 사용되었다. Simultaneous Steam Distillation/Solvent Extraction (SDE) 방법으로 추출하여 농축한다. sample을 1  $\mu$ L를 취해 GC에 주입하였으며, 이에 따른 gas chromatograph-mass spectrometer 조건은 다음과 같다.

<Gas chromatography-mass spectrometry : SDE>

- Column: DB-5MS (30 m length x 0.25 mm i.d x 0.25  $\mu$ m film thickness)
- Oven: 40 $^{\circ}$ C(3 min)  $\rightarrow$  4 $^{\circ}$ C/min  $\rightarrow$  200 $^{\circ}$ C (10 min)
- Injector temperature: 200 $^{\circ}$ C
- Split ratio: splitless
- Carrier gas: He
- Flow rate: 0.8 mL/min

㉕ 휘발성 향미성분의 동정

각 시료의 휘발성 향미성분은 on-computer library (Wiley7n.1)와 기타 참고자료에 의해 비교 분석되었고 *n-paraffins* C<sub>7</sub>-C<sub>22</sub>을 사용한 retention index (RI) value를 타 자료와 비교하여 동정하였다. SDE에 의해 추출된 각각의 휘발성 향기 성분들의 정량은 GC/MS total ion chromatogram의 peak area에 대한 각 성분들의 peak area를 percentage로 계산하였다.

(나) 향기활성성분(odor-active compound)의 분석

① GC-Olfactometry 분석

향기활성성분의 동정을 위해 sniffing port가 설치된 HP-7890 series gas chromatograph/flame ionization detector (FID)를 사용하였다. SDE 방법에 의해 추출된 농축액 1  $\mu$ L를 취해 GC에 주입한 후 GC에서 분리되어 나오는 각 peak들을 sniffing하여 aroma description을 얻었다. Column의 끝은 flame ionization detector (FID)와 sniffing port 사이에

서 1:1로 분지하였고, 이에 따른 gas chromatography-Olfactometry 조건은 다음과 같다.

<Gas chromatography-Olfactometry : SDE>

- GC: Agilent HP-7890
- Column: HP-5 (30 m length x 320  $\mu\text{m}$  i.d x 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness)
- Oven: 40°C(3 min)  $\rightarrow$  4°C/min  $\rightarrow$  200°C (10 min)
- Injector temperature: 200°C
- Detector temperature: 250°C
- Split ratio: splitless
- Carrier gas: He
- Flow rate: 1.58 mL/min

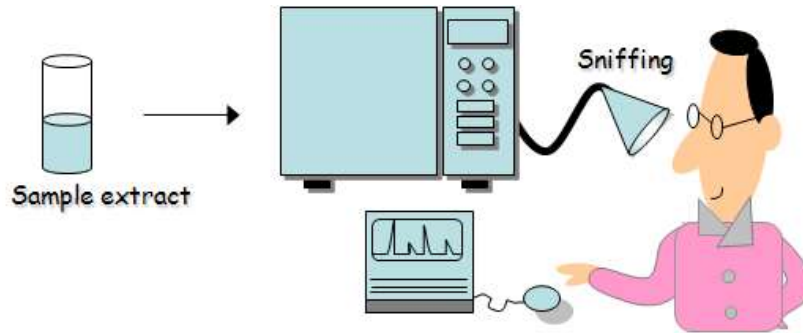


Fig. 31. Scheme of GC-Olfactometry

② 향기활성성분의 동정

각 시료의 향기활성성분은 on-computer library (Wiley7n.1)나 기타 참고자료에 의해 비교 분석되었고 *n-paraffins* C<sub>7</sub>-C<sub>22</sub>을 사용한 retention index (RI) value 및 odor description은 다른 자료들과 비교하여 동정에 사용하였다.

(3) 가공공정 확립 및 표준화

(3. 연구 결과 및 고찰, 나. Formulation 및 process 조건 확립에 서술)

다. 시제품 향미특성 분석 및 보완 (3차년도)

(1) 밀단백질을 효소처리 및 가열공정을 이용한 pyrazine 및 기타 heterocyclic compound의 생성

(가) 실험목적

시제품에 사용된 주소재인 밀단백질을 이용하여 이의 향미특성을 개선시키고자, 효소처리 및 가열공정을 통하여 pyrazine 등의 heterocyclic compounds 및 glutamic acid의 함량을 높이고자 하였다. Glutaminase를 이용하여 glutamine을 glutamic acid로 전환시켜 감칠맛을 높이고, 이 때 방출된 free ammonia를 Maillard reaction의 precursor로 이용하여 pyrazine을 비롯한 기타 heterocyclic compound의 생성을 고찰하였다.



- The enzyme to catalyze deamination of L-glutamine

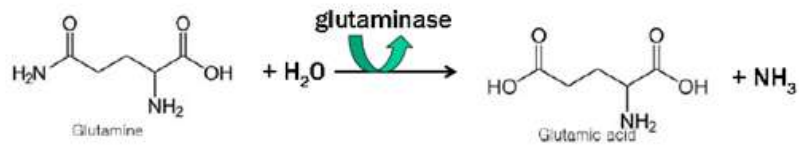
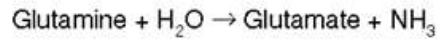


Fig. 32. Deamidation of glutamine to glutamic acid

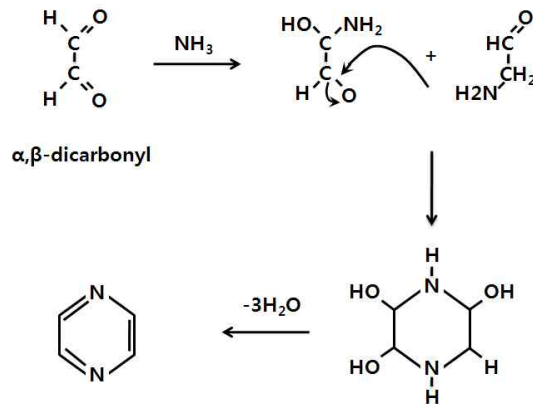


Fig. 33. Pyrazines formation

(나) 실험재료

샘표에서 제공받은 우리밀을 시료로 이용하였다. 효소는 protease/peptidase인 Flavourzyme 500MG (Novozymes, Bagsvaerd, Demnark)와 Glutamine을 Glutamic acid로 deamidation 시키는 Glutaminase SD-C100S (Daiwa Kasei K.K., Shiga, Japan)를 이용하였다. 그리고 기타 시약은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

(다) 실험방법

① 가수분해율 측정

단백질의 가수분해 정도를 측정하기 위하여 아미노산태 질소 정량 방법을 변형하여 사용하였다 (채, 2002). 각각의 시간대별로 가수분해물 50 mL를 0.1 N NaOH를 이용하여 pH 7로 맞추었다. 0.1 N NaOH로 중화시킨 formaldehyde 25 mL (pH 7)을 넣고 10분간 교반시켰다. 그리고 0.1 N NaOH를 이용하여 pH 8.9로 맞추었다. 밀단백질을 6 N HCl로 110°C에서 24시간 가열시킨 것을 100% 가수분해 된 것으로 간주하였다.

$$\text{Amino nitrogen (\%)} = (V_1/V_0) \times 100$$

$V_1$  : 시료의 0.1 N NaOH 적정소비량 (mL)

$V_0$  : 산 가수분해물의 0.1 N NaOH 적정소비량 (mL)

② 밀단백질의 효소 가수분해

10 g의 밀글루텐에 증류수 100 mL를 첨가하고, protease/peptidase인 Flavourzyme 1 g을 넣었다. 온도는 55°C이고, 속도는 180 rpm으로 유지시킨 shaking incubator (BS-31, JEIOTECH Co. Ltd., Daejeon, Korea)에서 4시간 동안 효소 가수분해 시켰다.

③ 가수분해물의 분자량 3,000Da 이하로의 fraction

가수분해물을 30분간 cooling 시킨 후, 3,000이하의 분자량으로 여과하는 membrane이 장착된 분획장치(Millipore, Billerica, MA, USA)를 이용하여 fraction 시켰다. Membrane의 반쪽이는 면이 위로 향하게 device에 설치 한 후, 약 100mL의 시료를 loading시키고 뚜껑을 닫은 후, 보호대 안에 장착하고 질소가스를 연결하여 30 psi의 압력으로 천천히 stirring 시켰다. 시료의 오염 및 변질을 막기 위해 실험은 4°C로 세팅된 cold room에서 진행하였다.

④ Glutamine, Glutamic acid 측정

㉠ 시료준비

fraction된 시료를 100  $\mu$ L 취한 후, GC-MS용 Amino acid kit인 EZ:faast™ Amino acid analysis kits (Phenomenex, Inc Germany)를 이용하여 아미노산만을 target으로 유도체화(derivatization) 시킨 후 GC-MS에 주입하였다.

Glutamine, Glutamic acid의 측정은 효소 Glutaminase를 처리하기 전과 후, 각각 시행하였다.

㉡ GC-MS 분석

아미노산은 HP 6890 series gas chromatograph에 연결된 5975A mass selective detector (Hewlett-Packard Co., Palo Alto, CA, USA)에 의해 분석되었고, authentic compounds 및 on-computer library (Agilent.L)와 기타 참고자료를 이용하여 동정하였다. Glutamine과 glutamic acid는 SIM (selected ion monitoring) 모드에서 분석되었으며,  $m/z$  84 (glutamine)와  $m/z$  230 (glutamic acid)에서 각각 정량을 수행하였다. 시료 1  $\mu$ L를 취해 GC에 주입하였으며, 이에 따른 gas chromatograph-mass spectrometer 조건은 다음과 같다.

<GC-MS 분석조건>

**GC settings**

- Column: Zebron column (ZB-AAA, 10 m length  $\times$  0.25 mm i.d.)
- Oven: 110°C  $\rightarrow$  30°C/min  $\rightarrow$  320°C
- Injector temperature: 250°C
- Transfer line temperature: 320°C
- Split ratio: 1:15
- Carrier gas : He
- Flow rate: 1.1 mL/min

**MS settings**

- MS source: 240°C
- MS Quad: 180°C
- Auxiliary: 310°C

**SIM mode**

- 1 group : 158 *m/z*
- 2 group : 230 *m/z*
- 3 group : 84 *m/z*

⑤ 암모니아 측정

free ammonia의 양을 측정하기 위하여 spectrophotometric ammonium assay kit인 K-AMIAAR (Megazyme, Wicklow, Ireland)를 이용하였다. glutamate dehydrogenase, 2-oxoglutarate를 이용하여 NADPH를 NADP로 효소적으로 전환시키는 원리를 이용한 것이다. 암모니아의 측정은 효소 Glutaminase를 처리하기 전과 후, 각각 시행하였다.



**Fig. 34. The principle of ammonia determination**

⑥ Glutaminase를 이용한 Deamidation

fraction된 가수분해물에 1 g의 Glutaminase를 넣고 온도는 65°C, 속도는 180 rpm으로 유지시킨 shaking incubator (BS-31, JEIOTECH Co. Ltd., Daejeon, Korea)에서 2시간 동안 deamidation 시켰다.

⑦ Maillard reaction

가수분해물에 0.05 M 농도의 당(glucose, fructose, xylose)을 각각 넣고, 1 N NaOH로 pH 7로 맞춘 후, 200 mL stainless steel bottle에 넣었다. 180°C, 150°C로 유지시킨 열풍 건조기 (LDO-250N, DAIHAN LABTECH Co. Ltd., Namyangju, Korea)에서 90분 간 반응 시켰다.

⑧ 용매추출

가열 반응 후 생성된 반응 산물들로부터 휘발성성분의 추출을 위해 용매 추출법을 사용하였다. 각각의 반응물 30 mL에 1000 ppm (v/v in hexane)으로 제조된 2-vinylpyridine 0.1 mL를 내부표준물질로 첨가한 후, hexane 30 mL를 사용하여 400 rpm에서 30분간 stirring시키면서 용매추출을 시행하였다. 이것을 separatory funnel에서 용매층과 수분층으로 분획하였다. 여기에서 얻어진 용매추출물에 남아있는 당 및 기타 수용성 성분들을 제거하기 위하여 각 50 mL 씩 3차 증류수를 사용하여 씻어내었다. 추출 후 남아있는 여분의 수분을 sodium sulfate로 제거한 후, N<sub>2</sub> gas로 0.1 mL 까지 농축하였다. 실험은 각 시료에 대해 3회 반복실험으로 진행하였다.

⑨ Gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS)

HP 6890 gas chromatograph에 연결된 mass selective detector (Hewlett-Packard Co., Palo Alto, CA, USA)에 DB-5MS (30 m length x 0.25 mm i.d. x 0.25 mm film thickness, J&W Scientific, Folsom, CA, USA) fused silica GC capillary column을 장착하여 휘발성 향미 성분들의 분석에 사용하였다. Carrier gas는 0.8 mL/min의 constant flow rate으로 헬륨(He)이 사용되었고, mass spectra는 70 eV에서 electron ionization (EI) 방식에 의해 얻어졌다. 추출된 시료는 1 µL를 1:20 split mode에서 syringe를 사용하여 주입하였다. GC oven 온도는 40°C에서 2분간 유지시킨 뒤 160°C까지 4°C/min로 온도를 증가시켰으며, 280°C까지 15°C/min씩 증가시켰다. 그리고 280°C에서 5분간 유지시켜 총 48분의 시간이 소요되었다. 주입부와 검출기의 온도는 각각 280°C, 250°C였다.

#### ⑩ 향미 성분의 동정 및 정량

각 시료의 휘발성 성분 동정을 위해서는 mass spectral data와 retention index (RI)를 이용하였다. Mass spectral data는 on-computer library (Wiley 7n)와 manual interpretation을 이용하여 분석하였다. RI는 *n*-paraffins C<sub>7</sub>-C<sub>22</sub>를 각 성분들의 외부표준물질로 사용하여 각 성분들의 GC/MS 머무름 시간을 비교하여 구하였다 (Girard, 1996). 동정된 각 휘발성 성분들의 정량은 2-vinylpyridine의 GC/MS peak area에 대한 상대적인 peak area에 의해 구하였다.

## (2) 시제품 향미성분 추출 및 분석

### (가) 시료

Kokumi 시제품인 연두 담백한 맛(plain)과 깊은 맛(deep) (액상 형태)을 시료로 사용하였다.

### (나) 동시용매증류추출법 (SDE: Simultaneous Steam Distillation/Solvent Extraction)

물보다 비중이 무거운 methylene chloride 50 mL을 한 쪽 둥근 플라스크에 넣고 시료 100 mL를 다른 쪽 플라스크에 넣어 Liken-Nickerson apparatus로 2시간 동안 추출하였다. 추출 후 organic fraction을 취하여 무수 sodium sulfate로 수분을 제거한 후 질소가스를 이용하여 final volume 0.1 mL까지 농축시켰다.

### (다) GC-MS 분석

추출이 끝난 sample은 휘발성 성분의 동정을 위해 HP-6890 series gas chromatograph에 연결된 5975 mass selective detector (Hewlett-Packard Co., Palo Alto, CA, USA)가 사용되었다. Simultaneous Steam Distillation/Solvent Extraction (SDE) 방법으로 추출하여 질소가스로 최종부피 0.1mL로 농축한 sample을 1 µL를 취해 GC에 주입하였으며, 이에 따른 gas chromatograph-mass spectrometer 조건은 다음과 같다.

#### <Gas chromatography-mass spectrometry : SDE>

-Column: DB-5MS (30 m length x 0.25 mm i.d x 0.25 µm film thickness)

-Oven: 40°C (3 min) → 4°C/min → 200°C (10 min)

-Injector temperature: 200°C

-Detector transfer line temperature: 250°C

- Split ratio: split (20:1)
- Carrier gas: He
- Flow rate: 0.8 mL/min
- EM voltage: 70eV
- Scan range: 50-550 a.m.u.

(라) 휘발성 향미성분의 동정

각 시료의 휘발성 향미성분은 on-computer library (Wiley7n.1)와 기타 참고자료에 의해 비교 분석되었고 *n-paraffins* C<sub>7</sub>-C<sub>22</sub>을 사용한 retention index (RI) value를 타 자료와 비교하여 동정하였다. SDE에 의해 추출된 각각의 휘발성 향기 성분들의 정량은 GC/MS total ion chromatogram의 peak area에 대한 각 성분들의 peak area를 percentage로 계산하였다.

## 2. 연구 결과 및 고찰

### 가. Kokumi 주요성분의 분석법 확립 및 Target제품 특성파악 (1차년도)

#### (1) Pyrazine 및 sulfur 함유 성분의 분석

##### (가) 휘발성 향미성분 동정 및 정량

##### ① SDE로 추출한 kokumi 휘발성 향미성분의 GC-MS 분석

KOJI-AJI와 BS-100을 SDE 추출법에 의해 추출 한 후 GC-MS로 분석한 결과를 Table 1과 2에 나타내었다. 분석 결과 KOJI-AJI에서 총 30개의 성분들이 검출되었으며, 그 중 aldehyde and ketone compounds가 6개, cyclic compounds 3개, furan 1개, S-containing compounds 4개, N-containing compounds 5개, aliphatic and terpene hydrocarbons가 9개 동정되었다. BS-100에서도 총 30개의 화합물이 검출되었으며 aldehyde and ketone compounds가 4개, cyclic compounds 7개, furan 2개, S-containing compounds 1개, N-containing compounds 3개, aliphatic and terpene hydrocarbons가 10개 동정되었다. Basic compounds의 일종인 pyrazine은 Maillard reaction 및 Strecker degradation에 의해 생성되는 화합물로서 가열과정 중 당류와 단백질의 분해에 의해 생성된 carbonyls, dicarbonyls, ammonias 등 pyrazine 주요 전구 물질들의 축합 및 고리화 반응 등에 의해 만들어지는 것으로 알려져 있다. pyrazine류는 대개 고소한 nutty향과 roasted향 특성을 지니며 KOJI-AJI에서 더 많이 검출되었다. Furan 계통의 2-furanmethanol과 dihydro-5-methyl-2[3H]-furanone은 갈변 반응인 caramelization 반응의 산물일 것으로 여겨진다. Benzaldehyde는 지방 산화물로부터 열처리에 의해 생성되는 화합물로 알려져 있고 휘발성 성분 중 carbonyl류 성분은 식품에서 주로 불포화 지방산의 산화와 지방의 열에 의한 산화적인 분해에 의한 결과로 형성된다고 알려져 있다 (Moon *et al.* 2006.). 그리고 황 함유 성분들 (thiazole류, sulfide류)은 주로 비타민 B<sub>1</sub>인 thiamine 및 아미노산인 cysteine의 열에 의한 분해로부터 생성되는 것으로 알려져 있다 (Moon *et al.* 2006.). Kokumi의 휘발성 향미성분은 주로 Maillard reaction에 의해 일어난다고 볼 수 있다.

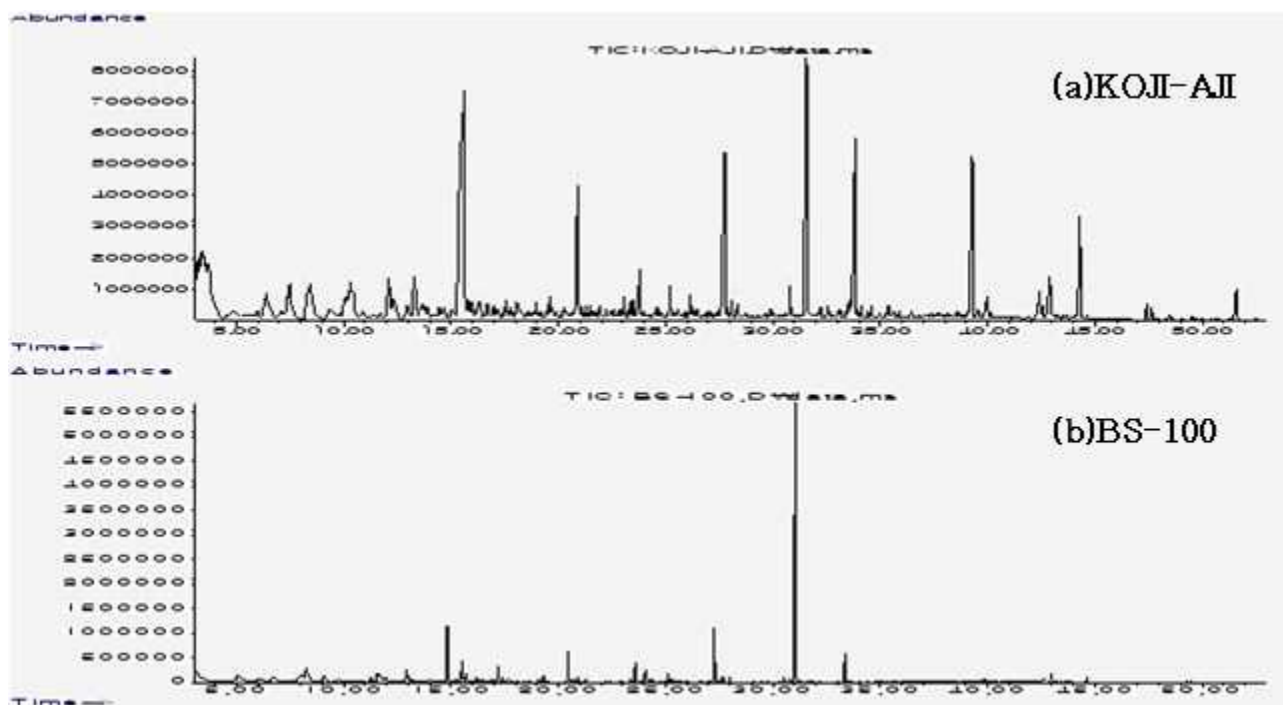


Fig. 35. GC-MS total ion chromatograms of KOJI-AJI(a) and BS-100(b) extracted by SDE

Table 29. Volatile compounds in KOJI-AJI extracted by SDE

RI <sup>A)</sup>	Compounds	P.A (%)	ID <sup>B)</sup>
<b>Aldehydes and Ketones</b>			
829	Furfural	0.66	MS/RI
953	Benzaldehyde	3.52	MS/RI
1035	Benzeneacetaldehyde	23.02	MS/RI
1462	2,6-Di(t-butyl)-4-hydroxy-4-methyl-2,5-cyclohexadien-1-one	1.68	MS
1481	5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal	17.60	MS/RI
1499	2,3,6,7-Tetrahydrocyclopent[b]azepine-8[1H]-one	1.18	MS
<b>Cyclic compounds</b>			
1625	[1-Butylheptyl]-benzene	0.36	MS
1868	Cyclohexadecane	2.44	MS
<b>Furans</b>			
855	2-Furanmethanol	3.76	MS/RI
<b>S-Containing compounds</b>			
903	Methional	0.67	MS/RI
963	Dimethyl trisulfide	1.05	MS/RI
1195	1,4-Dimethyl tetrasulfide	0.60	MS/RI
1401	3-Phenylthiophene	1.08	MS
<b>N-Containing compounds</b>			
990	2-Ethyl-6-methylpyrazine	0.82	MS/RI
1235	2-Isoamyl-6-methylpyrazine	0.59	MS
1282	Indole	6.88	MS/RI
1449	3-Phenylpyridine	1.25	MS
1902	Hexahydro-3-[2-methylpropyl]-pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione	14.30	MS
<b>Aliphatic and Terpene Hydrocarbons</b>			

958	2,6,6-Trimethyl-bicyclo[3,1,1]hept-2-ene	1.52	MS/RI
986	$\beta$ -Myrcene	2.30	MS/RI
999	$\ell$ -Limonene	7.78	MS/RI
1289	Tridecane	0.61	MS/RI
1490	Pentadecane	0.47	MS/RI
1589	Hexadecane	1.32	MS/RI
1689	Heptadecane	0.73	MS/RI
1782	1-Octadecene	1.23	MS/RI
1987	Eicosane	0.89	MS/RI
1889	Nonadecane	0.70	MS/RI
<b>Miscellaneous compounds</b>			
1302	2-Methoxy-4-vinylphenol	0.46	MS/RI
1510	Tributyl phosphate	0.51	MS

<sup>A)</sup> Retention indices were determined *n*-paraffins  $C_7 - C_{22}$  using as external references

<sup>B)</sup> Identification : Tentative identification was performed as follows: MS/RI, mass spectrum was identical with that of Wiley mass spectral database (1995) (Hewlett Packard Co., Palo Alto, CA, USA), and retention index was consistent with that of the literatures [A, Kondjoyan and Berdague(1996); B, Adams(2002); C, Acree and Arn(1997); E, Ansorena *et al.* (2001); F, Kerler and Grosch(1996)]; MS, mass spectrum was consistent with that of Wiley mass spectrum database.

Table 30. Volatile compounds in BS-100 extracted by SDE

RI <sup>A)</sup>	Compounds	P.A (%)	ID <sup>B)</sup>
<b>Aldehydes and Ketones</b>			
954	Benzaldehyde	5.97	MS/RI
1036	Benzeneacetaldehyde	19.84	MS/RI
1146	3-Phenylpropenal	1.70	MS/RI
1464	2,6-Di-[t-butyl]-4-hydroxy-4-methyl-2,5-cyclohexadien-1-one	1.36	MS
<b>Cyclic compounds</b>			
865	1,3-Dimethylbenzene	4.54	MS/RI
926	2-Cyclohexen-1-one	1.32	MS/RI
973	1-Ethyl-2-methylbenzene	0.21	MS/RI
1057	Acetophenone	2.33	MS/RI
1723	[1-Butyloctyl]benzene	0.41	MS/RI
1718	[1-pentylheptyl]benzene	0.33	MS
1795	[1-Methylundecyl]-benzene	0.40	MS
<b>Furans</b>			
855	2-Furanmethanol	8.59	MS/RI
947	Dihydro-5-methyl-2[3H]-furanone	2.91	MS/RI
<b>S-Containing compounds</b>			
903	Methional	0.49	MS/RI
<b>N-Containing compounds</b>			
752	1H-Pyrrole	1.51	MS/RI
990	2-Ethyl-5-methylpyrazine	0.56	MS/RI
1306	3-Butyl-2,5-dimethylpyrazine	0.37	MS/RI
1676	2,4-Di-t-butyl-6-nitro-phenol	0.85	MS
<b>Aliphatic and Terpene Hydrocarbons</b>			
1022	ℓ-Limonene	25.37	MS/RI
1094	Undecane	1.05	MS/RI
1190	Dodecane	0.94	MS/RI
1292	Tridecane	0.81	MS/RI
1391	Tetradecane	0.63	MS/RI
1689	Heptadecane	0.40	MS/RI
1782	1-Octadecene	0.62	MS/RI
1789	Octadecane	0.66	MS
1889	Nonadecane	0.50	MS/RI
1987	9-Methyl-nonadecane	0.34	MS
<b>Miscellaneous</b>			
986	7-Methyl-3-methylene-1,7-octadiene	11.47	MS/RI
1856	Bis[2-methylpropyl]ester-1,2-benzenedicarboxylic acid	0.39	MS
1952	Hexadecanoic acid	3.15	MS/RI

<sup>A)</sup> Retention indices were determined *n*-paraffins  $C_7 - C_{22}$  using as external references

<sup>B)</sup> Identification : Tentative identification was performed as follows: MS/RI, mass spectrum was identical with that of Wiley mass spectral database (1995) (Hewlett Packard Co., Palo Alto, CA, USA), and retention index was consistent with that of the literatures[A, Kondjoyan and Berdague(1996); B, Adams(2002); C, Acree and Arn(1997); E, Ansorena *et al.* (2001); F, Kerler and Grosch(1996)]; MS, mass spectrum was consistent with that of Wiley mass spectrum database.

## ② SPME로 추출한 kokumi 휘발성 향미성분의 GC-MS 분석

BS-100을 SPME 추출법을 이용하여 추출하였으며, GC-MS로 분석한 결과를 Table 3에 나타내었다. 분석 결과 15개 화합물 중 aldehyde류가 주를 이루었으며, 알코올류 화합물은 동정



되지 않았다. SDE로 분석한 BS-100의 결과와는 달리 S-containing compounds가 검출되지 않았으며 N-containing compounds도 적게 검출되었다. benzaldehyde의 peak area(%) 값이 33.34%로 가장 많이 검출되었으며 SDE 분석 결과와 일치하는 화합물은 Benzaldehyde와 Benzeneacetaldehyde, Tetradecane, Hexadecanoic acid 등이었고 그 외에 오렌지, 장미 향기를 내는 Nonanal이나 sweet, waxy, floral 향기를 내는 Decanal이 동정되었다. 하지만 이 방법은 추출효율이 낮아 kokumi의 전체적 향미특성을 규명하는 목적에는 적합하지 않아 SDE 방법을 최종 선택하였다.

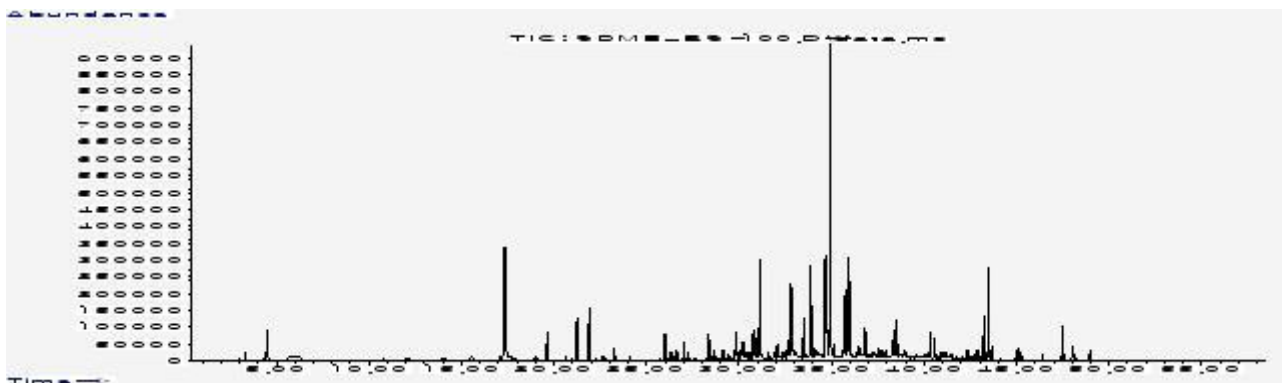


Fig. 36. GC-MS total ion chromatogram of BS-100 extracted by SPME

Table 31. Volatile compounds in BS-100 extracted by SPME

RI <sup>A)</sup>	Compounds	P.A(%)	ID <sup>B)</sup>
<b>Aldehydes and Ketones</b>			
1026	Benzaldehyde	33.34	MS/RI
1082	Nonanal	5.13	MS/RI
1085	Benzeneacetaldehyde	8.04	MS/RI
1038	1-Phenylethanone	9.07	MS
1173	Decanal	1.85	MS/RI
1278	3,4-Dimethyl-benzaldehyde	2.57	MS
1391	3,5-Dimethyl-2-octanone	1.22	MS
1554	5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal	8.56	MS
1590	2-Methylundecanal	4.02	MS
1829	3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxybenzaldehyde	5.37	MS
<b>N-Containing compounds</b>			
951	2,5-Dimethylpyrazine	0.48	MS/RI
<b>Aliphatic and Terpene Hydrocarbons</b>			
1249	Tetradecane	5.10	
<b>Miscellaneous compounds</b>			
<700	Acetic acid	0.53	MS
1372	Methylundecanoate	2.16	MS/RI
1839	Hexadecanoic acid	10.74	MS/RI
2026	9-Octadecanoic acid	1.83	MS

<sup>A)</sup> Retention indices were determined *n*-paraffins  $C_7 - C_{22}$  using as external references

<sup>B)</sup> Identification : Tentative identification was performed as follows: MS/RI, mass spectrum was identical with that of Wiley mass spectral database (1995) (Hewlett Packard Co., Palo Alto, CA, USA), and retention index was consistent with that of the literatures[A, Kondjoyan and Berdague(1996); B, Adams(2002); C, Acree and Arn(1997); E, Ansorena *et al.* (2001); F, Kerler and Grosch(1996)]; MS, mass spectrum was consistent with that of Wiley mass spectrum database.

(나) 향기활성성분의 동정

KOJI-AJI의 향기활성성분을 분석한 결과는 Table 32에 나타내었다. 모두 27개의 향기활성성분을 얻을 수 있었고, 이 중 15개의 성분들은 GC/MS, RI값, 향 특성을 통해 동정되었으며 향 특성은 가지고 있지만 미동정된 것들도 일부 있었다. 구수한 향미 성분을 나타내는 roasted, nutty한 향기활성성분은 Maillard reaction에 의한 pyrazine에 기인한 것으로 추정된다. KOJI-AJI에서는 roasted, nutty한 향 외에도 sweet, sulfury, oily, spicy한 특성을 지닌 향기활성성분들이 동정되었으며 Methional(감자 향)과 Limonene(레몬 향)의 향 특성도 특징적으로 나타났다.

BS-100의 향기활성성분을 분석한 결과는 Table 33에 나타내었고, smoky, baked, pungent, garlic 같은 자극적인 향이 동정되었으며, MS data에서 *l*-Limonene의 peak area(%)값이 크게 나타난 것에 비해 향기활성을 나타내지 않았다.

Table 32. Aroma-active compounds of KOJI-AJI

RI <sup>A)</sup>	Possible Compounds	Aroma description	ID <sup>B)</sup>
<700	unknown	soy sauce	SN
829	Furfural	nutty, sweet	MS/RI/SN
847	Isopropylbutanoate	pungent	RI/SN
867	2-Hexenal	fatty, rancid	RI/SN
855	2-Furfural	almond, smoky, caramel-like	MS/RI/SN
903	Methional	cooked potato	MS/RI/SN
921	Acetyl pyrroline	nutty, roasted	RI/SN
953	Benzaldehyde	bitter almond, roasted	MS/RI/SN
962	Dimethyl trisulfide	pungent, sulfury	MS/RI/SN
986	$\beta$ -Myrcene	pungent, vinegar	MS/RI/SN
999	<i>l</i> -Limonene	floral(lilac), grass	MS/RI/SN
1035	Benzeneacetaldehyde	sweet	MS/RI/SN
1086	Dimethylethylpyrazine	roasted	RI/SN
1124	Methylcyclopentapyrazine	roasted	RI/SN
1230	Myrtenal	spicy	RI/SN
1302	2-Methoxy-4-vinylphenol	spicy, nutty	MS/RI/SN
1380	unknown	spicy	RI/SN
1452	$\alpha$ -Humulene	woody	RI/SN
1465	Dodecyl alcohol	oily	MS/RI/SN
1481	5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal	roasted, cocoa	MS/RI/SN
1490	Pentadecane	alkane	MS/RI/SN
1589	Hexadecane	alkane	MS/RI/SN
1645	$\beta$ -caryophyllene alcohol	earth	RI/SN
1689	Heptadecane	alkane	MS/RI/SN
1714	unknown	nutty	SN
1738	unknown	nutty	SN
1782	1-Octadecene	alkane	MS/RI/SN

<sup>A)</sup> Retention indices were determined *n*-paraffins  $C_7 - C_{22}$  using as external references

B) Identification : Tentative identification was performed as follows: MS, mass spectrum was consistent with that of Wiley mass spectrum database; RI, retention index was consistent with that of the literatures(A, Kondjoyan and Berdague, 1996; B, Adams, 2002; C, Acree; D, Arn, 1997; E, Ansorena *et al.*, 2001; F, Kerler and Grosch,1996) SN, odor property perceived at sniffing part

Table 33. Aroma-active compounds of BS-100

RI <sup>A)</sup>	Possible compound	Aroma description	ID <sup>B)</sup>
671	Thiophene	garlic, pungent	RI/SN
696	Methyl thiocyanate	sulfury	RI/SN
872	2-Furanmethanol	oily, burnt	MS/RI/SN
904	2,6-Dimethylpyrazine	chocolate, roasted, nutty	MS/RI/SN
914	Dimethyl sulfone	smoky	RI/SN
924	2-Cyclohexenone	oily, pesticide	MS/RI/SN
963	Benzaldehyde	bitter almond, smoky, nutty	MS/RI/SN
1084	Dimethylethylpyrazine	nutty	RI/SN
1102	unknown	scorched rice, candy, nutty	SN
1159	Diethylmethylpyrazine	smoky, baked	RI/SN
1181	(E,Z)-2,3-Nonadienal	pungent, rubber	RI/SN
1245	Tridecane	alkane	MS/RI/SN
1408	Methyl sulfide	spicy, sulfury, garlic	RI/SN
1757	unknown	pungent, pine	SN

A) Retention indices were determined *n-paraffins* C<sub>7</sub> – C<sub>22</sub> using as external references

B) Identification : Tentative identification was performed as follows: MS, mass spectrum was consistent with that of Wiley mass spectrum database; RI, retention index was consistent with that of the literatures(A, Kondjoyan and Berdague, 1996; B, Adams, 2002; C, Acree; D, Arn, 1997; E, Ansorena *et al.*, 2001; F, Kerler and Grosch,1996); SN, odor property perceived at sniffing part

## (2) Free glutamic acid의 분석

### (가) Free amino acid의 동정

GC-MS분석 결과 KOJI-AJI와 BS-100에서는 각각 22개의 아미노산이 동정되었는데 KOJI-AJI에는 Alanine, Glycine, α-Aminobutylic acid, Valine, Leucine, Isoleucine, Threonine, Serine, Proline, Aspartic acid, Methionine, Glutamic acid, Phenylalanine, Ornithine, Lysine, Histidine, Hydroxylysine, Tyrosine, Proline-hydroxyproline, Tryptophan, Cystine 이 동정되었고 BS-100에서는 Alanine, Glycine, 4-Hydroxyproline, Valine, Leucine, Isoleucine, Threonine, Serine, Proline, Aspartic acid, Methionine, Glutamic acid, Phenylalanine, Ornithine, Lysine, Histidine, Hydroxylysine, Tyrosine, Proline-hydroxyproline, Tryptophan, Cystine이 동정되었다.

α-Aminobutylic acid는 KOJI-AJI에서는 동정되었으나 BS-100에서는 동정되지 않았다, Free amino acid를 동정한 GC-MS의 크로마토그램을 Fig.32와33에 나타내었으며 3.092분에 동정되는 glutamic acid의 양에서 큰 차이를 보인다.

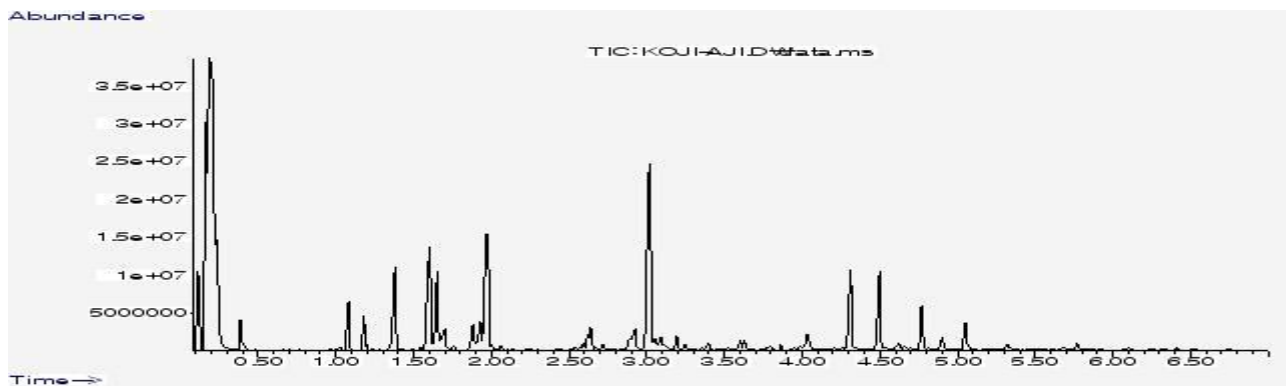


Fig. 37. GC-MS total ion chromatogram of free amino acids in KOJI-AJI

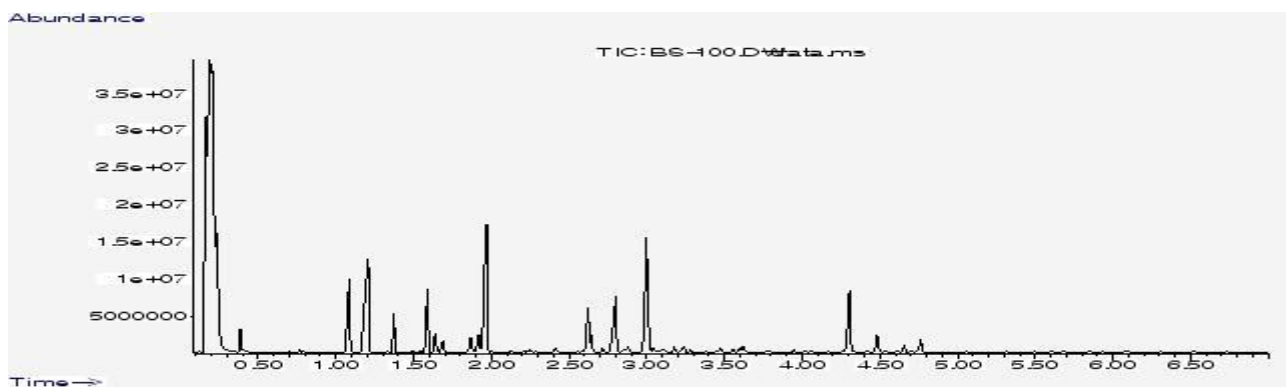


Fig. 38. GC-MS total ion chromatogram of free amino acids in BS-100

(나) free amino acid의 정량

Table 34. Relative content of free amino acids identified in KOJI-AJI and BS-100

	KOJI-AJI	BS-100
Alanine	32.22	41.78
Glycine	74.84	128.31
$\alpha$ -Aminobutylic acid	1.012	0
Valine	20.36	10.83
Leucine	53.96	26.28
Isoleucine	23.4	6.42
Threonine	31.76	8.86
Serine	52.96	12.31
Proline	198.3	61.67
Aspartic acid	27.87	20.21
Methionine	14.49	6.62
Glutamic acid	179.8	54.96
Phenylalanine	75.85	15.68
Ornithine	15.48	2.55
Lysine	8.086	31.95
Histidine	38.59	3.94
Tyrosine	28.3	1.01
Tryptophan	9.693	19.37
Cystine	3.144	3.46

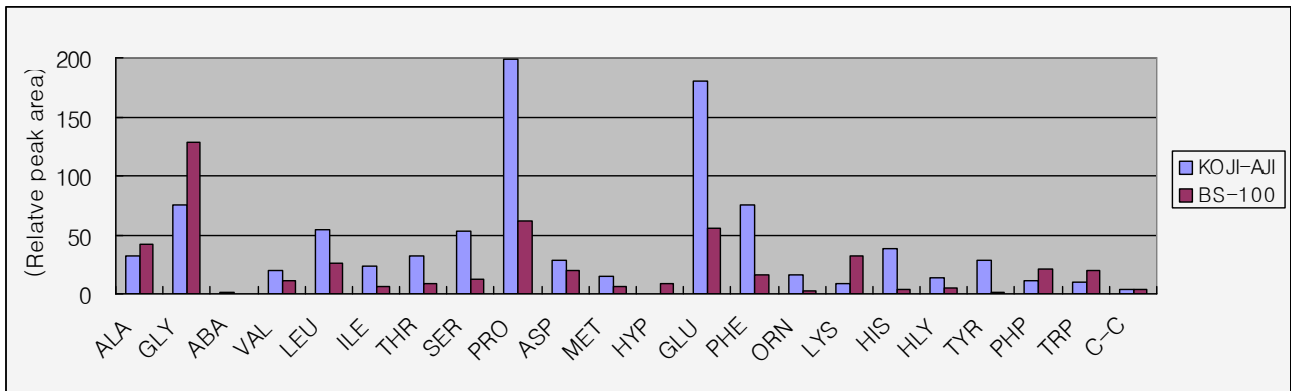


Fig. 39. relative peak area of free amino acid in KOJI-AJI and BS-100

(다) 외부표준물질을 이용한 aspartic acid와 glutamic acid의 정량

각 농도별로 (10, 20, 40, 60, 80, 160mg/L) 분석하여 얻은 표준검량곡선을 나타내었다. glutamic acid와 aspartic acid의 함량은 내부표준물질에 의한 결과에서와 같이 KOJI-AJI가 더 높았다. Table 35의 결과에서도 볼 수 있듯이 KOJI-AJI 2g을 20mL에 추출한 후 100배 희석한 용액 1L 내에는 aspartic acid와 glutamic acid의 함량이 각각 21mg과 142mg이었으며, BS-100에서는 각각 20.34mg과 55.03mg이 포함되어 있었다.

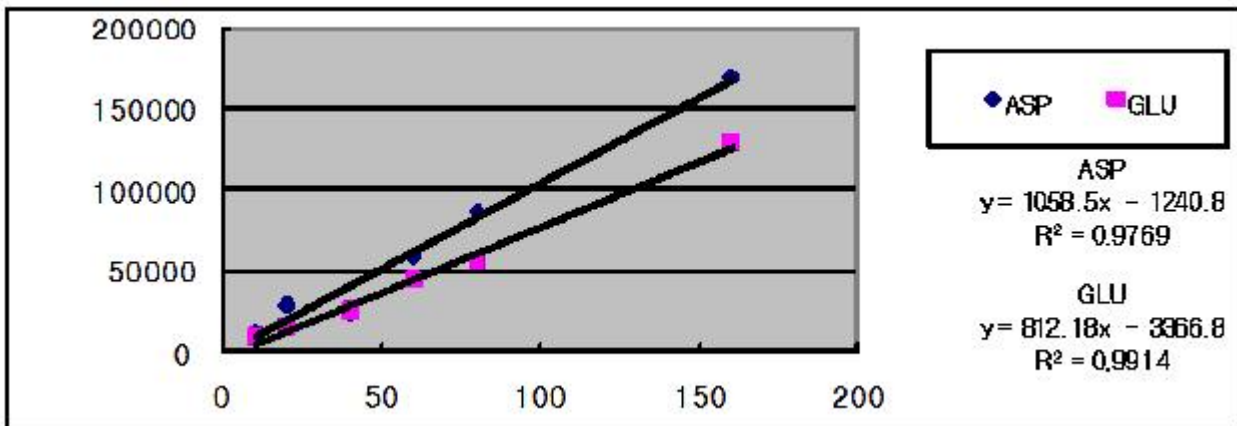


Fig. 40. Calibration curve for aspartic acid and glutamic acid

Table 35. The contents of free glutamic acid and aspartic acid in KOJI-AJI and BS-100 (단위: mg/L)

	KOJI-AJI	BS-100
aspartic acid	21.48	20.34
glutamic acid	142.22	55.03

### (3) 핵산 성분의 분석

(가) 추출방법 정립

일반적으로 핵산 성분 추출에는  $KClO_4$ 나 deionized water (D.W)를 사용하는데 kokumi는 물

에 대부분 녹아 수용액상태가 되기 때문에 온도조절이나 처리과정 중의 오차요인이 많은  $KClO_4$ 보다 D.W로 추출하는 것이 용이하였다. 25 mL의 물에 0.5 g의 시료를 녹여 boiling한 후 centrifuge하여 침전된 단백질을 제거하고 최종 volume을 10 mL로 evaporator에서 농축하는 Taylor *et al.*(1981)의 방법을 사용하였으며, 농축 과정 중에 오차가 발생하고 침전되는 단백질의 함량이 미비하여 가열과정을 생략하였다. 최종적으로는 시료 1 g을 D.W에 녹여 총 100 mL 용액을 만든 후 30분간 추출하는 방법을 채택하였다.

(나) Mobile phase 조성 최적화

0.5 M buffer (방법①)를 mobile phase로 사용시에는 buffer의 농도가 높아서 라인이 막히고 chromatogram의 밀림 현상이 자주 일어났으며 압력이 불안정하였다. 또 60% Methanol과 0.02 M buffer (방법②)에 gradient를 주어 사용하였더니 5'-AMP의 분석 시간 단축에는 효과가 있었으나 5'-AMP가 동정되지 않았으며, 5'-GMP와 5'-IMP의 peak가 겹쳐 정량에 어려움이 있었다. 조미료와 성분이 유사한 라면스프의 선행 연구에서 1% Triethylamine을 사용한 바 있지만 (방법③) 본 실험 결과 5'-GMP와 5'-IMP의 peak가 상당부분 겹쳐 정량이 어려웠다. 0.3 M의 buffer (방법 ④)를 사용한 결과 peak의 resolution이 가장 좋아 이 분석방법을 선택하였다.

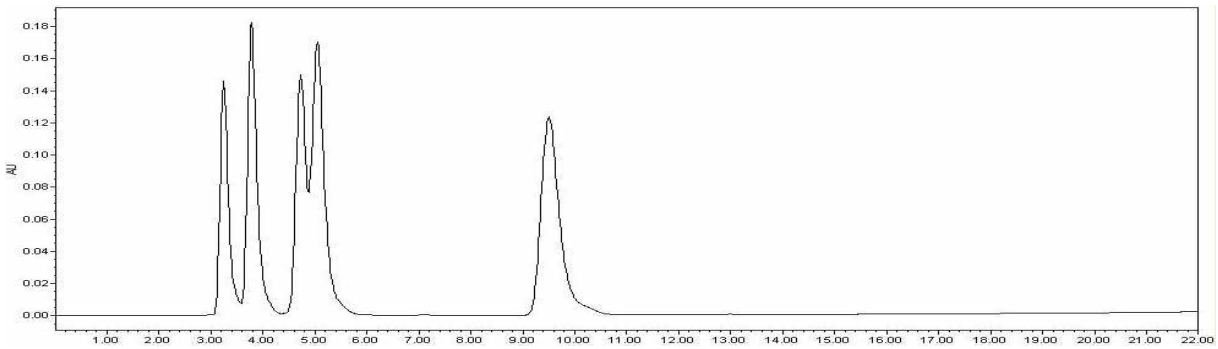


Fig. 41. HPLC chromatogram of standards (5'-CMP, 5'-UMP, 5'-GMP, 5'-IMP, 5'-AMP) analyzed by method ②

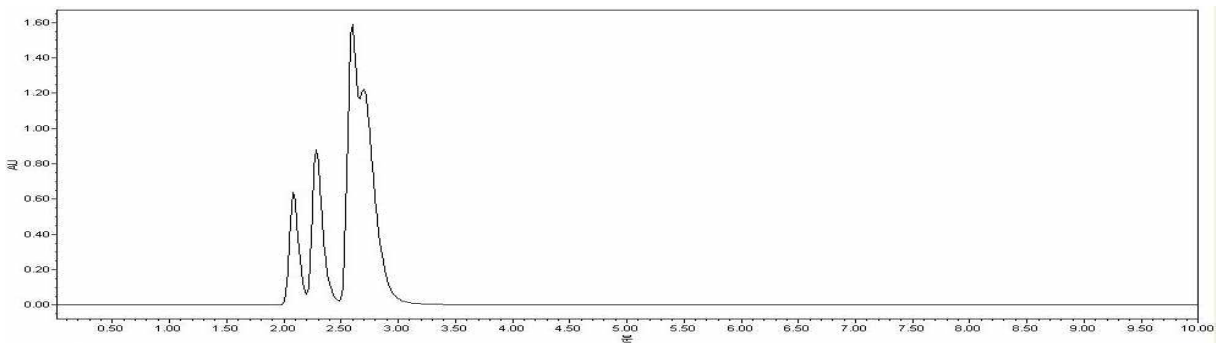
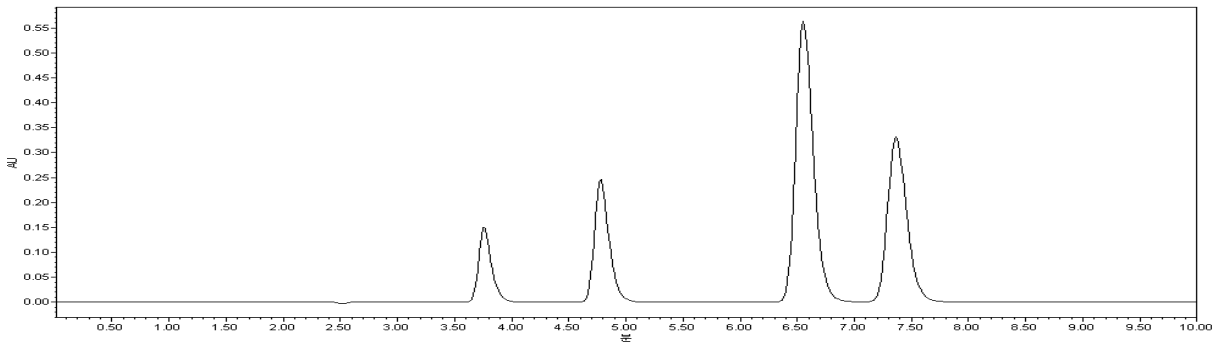


Fig.42. HPLC chromatogram of standards (5'-CMP, 5'-UMP, 5'-GMP, 5'-IMP) analyzed by method ③

Fig. 43. HPLC chromatogram of standards (5'-CMP, 5'-UMP, 5'-GMP, 5'-IMP) analyzed by method ④



(다) 분석 결과

Nucleotides는 aspartic acid, glutamic acid와 함께 umami taste를 증진시키는 효과가 있으며, kokumi의 맛을 내는데 중요한 역할을 한다. Fig. 37. 은 두 target 시료에서 분석된 nucleotides의 HPLC chromatograms를 나타낸 것이다.

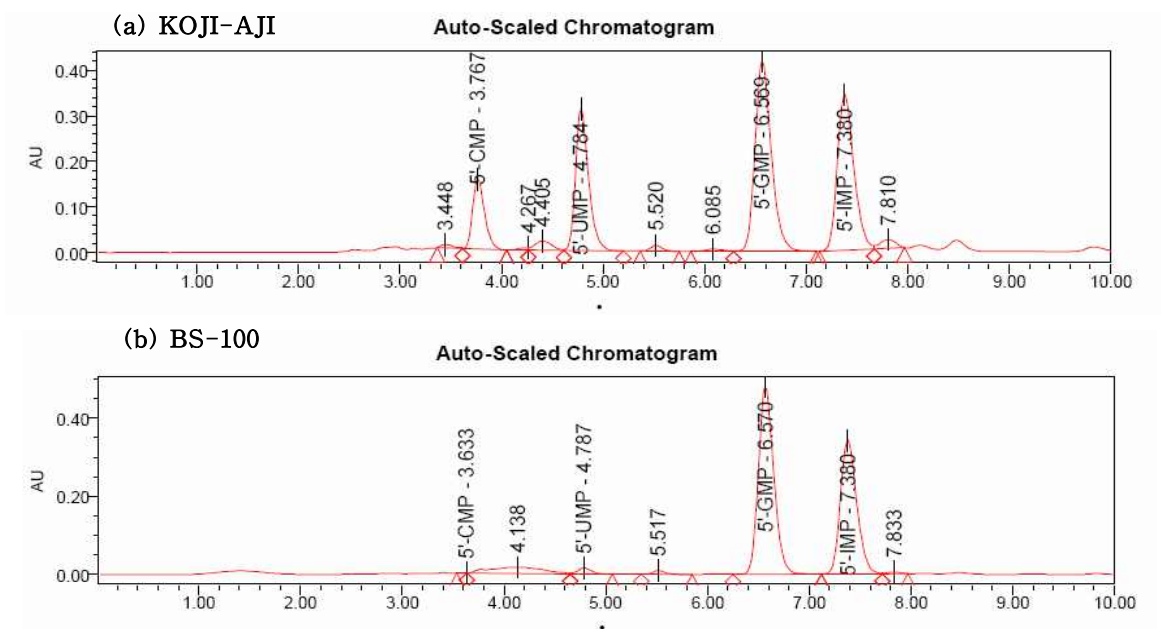


Fig. 44. Chromatograms of nucleotides (a)KOJI-AJI, (b)BS-100

CMP (Cystidine-5'-monophosphate disodium), UMP (Uridine-5'-monophosphate disodium), GMP (Guanosine-5'-monophosphate disodium), IMP (Inosine-5'-monophosphate disodium) 등 총 4개의 nucleotide가 확인되었으며, 향미증진효과가 가장 높고 표고버섯과 송이버섯의 감칠맛 성분으로 알려져 있는 5'-GMP 양은 1g당 15.259mg과 16.492mg으로 시료 간에 비슷한 양상을 보였고, 쇠고기, 돼지고기, 생선의 중요한 감칠맛 성분으로 알려져 있는 5'-IMP 역시 1g당 20.167mg과 19.883mg으로 비슷한 양상을 보였다. 5'-IMP에서 5'-AMP으로 전환되면 정미성이 떨어지는 것으로 알려져 있으나 두 시료 모두 5'-AMP는 검출되지 않았다. 아래 Fig. 39는 kokumi에서 확인된 nucleotide의 외부검량곡선이며 Table 36은 이를 이용하여 얻은 정량 데이터이다.

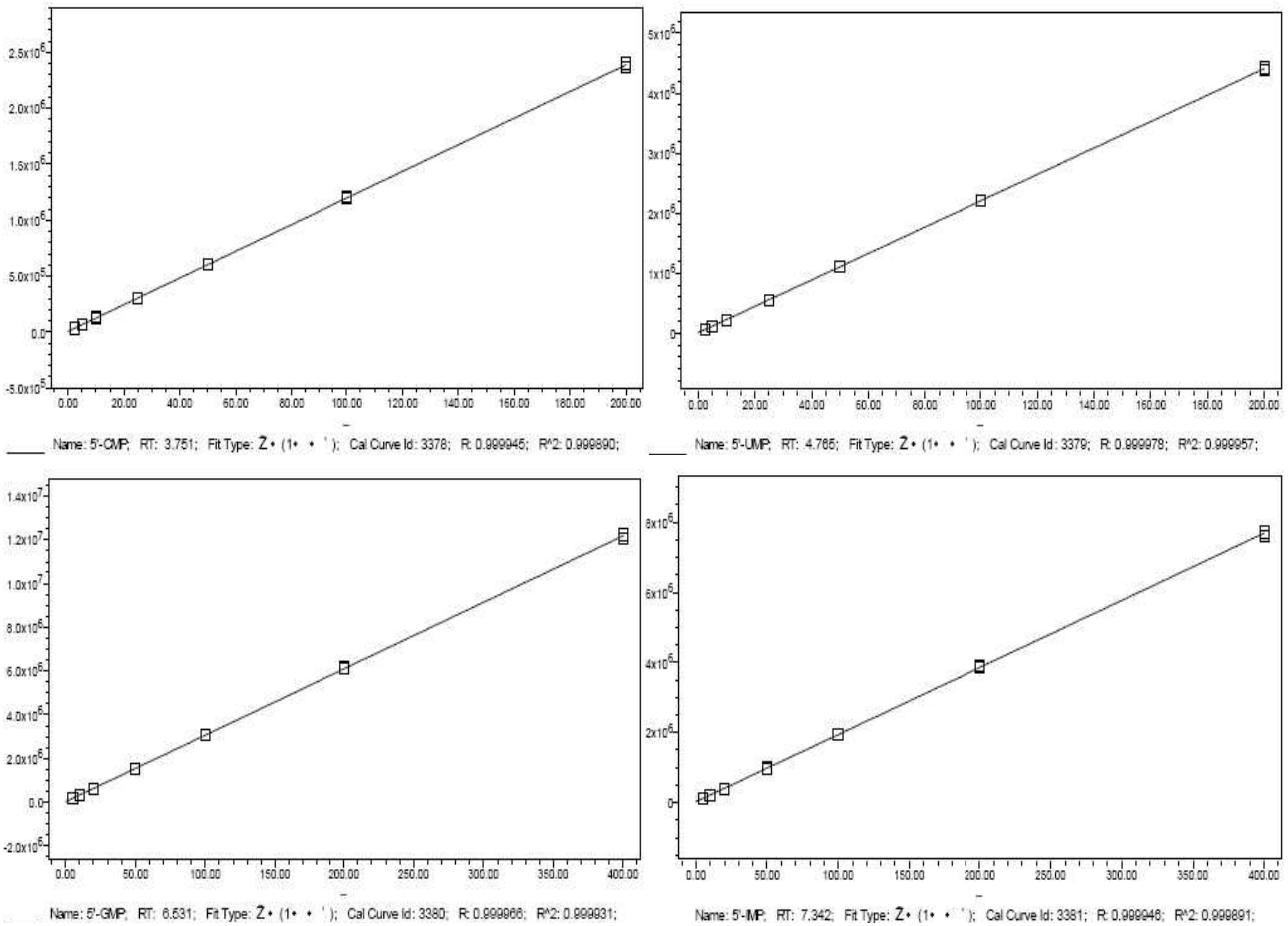


Fig. 45. Calibration curves for the nucleotides

Table 36. Nucleotides in KOJI-AJI and BS-100 (mg /L)

	5'-CMP	5'-UMP	5'-GMP	5'-IMP
KOJI-AJI	110.56	127.26	152.59	201.67
BS-100	0	6.21	164.92	198.83

#### (4) NaCl의 분석

표준용액 검량곡선은 Figure 15 에 나타내었고 염도 분석 결과는 Table 37에 나타내었다. 1 g의 KOJI-AJI내 NaCl양은 KOJI-AJI에서 0.088 g, BS-100에서 0.2149 g 검출되었으며, percent로 환산시 KOJI-AJI의 염도는 8.80 %, BS-100의 염도는 21.49 %로 BS-100의 염도가 KOJI-AJI보다 3배가량 높았다.



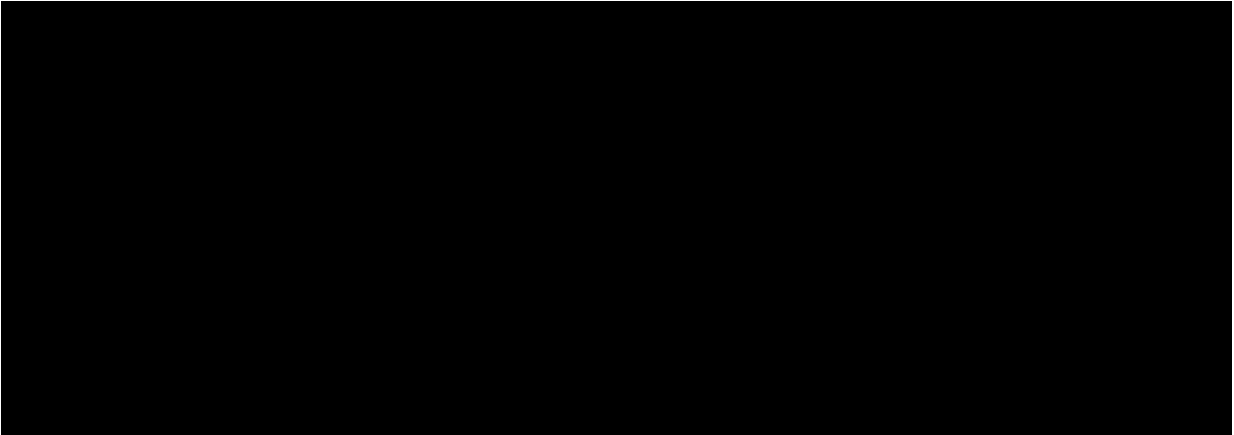


Fig. 46. Calibration curves for the salt contents

Table 37. Salt content in KOJI-AJI and BS-100

	적정치	염도
KOJI-AJI	1.53	8.80%
BS-100	3.77	21.49%

#### 나. Formulation 및 process 조건 확립 (2차년도)

##### (1) 전구체 종류 및 농도 결정

우리밀 단백질을 이용하여 개발된 밀분해 추출물, 밀단백 추출물, 밀글루텐 효소분해물을 샘플 측으로부터 제공받아 반응에 사용하였다. Table 38은 Kokumi 향미에 영향을 끼치는 주요 성분들의 배합비들을 보여주고 있다.

본 실험에서는 밀분해 추출물, 밀단백 추출물, 밀글루텐 효소분해물 3가지를 사용하였으며, 이것을 기본으로 당류, 아미노산 및 핵산 등을 첨가하고 또한 여러 가지 식물성 부재료인 garlic extract, onion extract를 첨가하여 pH 8-9 범위에서 95℃, 90분간 반응시켰다. Maltodextrin은 carrier로서 시료의 안정성을 유지시키고, 향 방출기작을 조절시키므로 첨가하였다. 첨가량은 전체 시료량의 20%를 넘을 경우, 녹지 않으므로 최대 20%로 설정하였다. 또한 시료의 전체적인 savory 향 강도를 증진시키기 위해 NaCl을 첨가하였다. 잘 교반시킨 후 70℃로 설정된 vacuum dry oven에서 3시간 동안 감압 건조시켰으며 앞, 뒤 골고루 건조시키기 위해 1시간 30분 켜에 뒤집어주었다. 그리고 건조된 시료를 막자사발로 잘 분쇄하여 최종 제품으로 하였다.

**Table 38. Formulations of Kokumi flavor**

성분	함 량 (g)						
	Control	A	B	C	D	E	F
밀분해 추출물	50	50	50	-	-	-	-
밀단백 추출물	-	-	-	50	50	-	-
밀글루텐 효소분해물	-	-	-	-	-	50	50
Yeast Extract	10	-	-	-	-	-	-
Aromild	-	10	-	10	-	10	-
HC 엑기스-15	-	-	10	-	10	-	10
증류수	100	100	100	100	100	100	100
부재료							
Garlic extract	3	3	3	3	3	3	3
Onion extract	2	2	2	2	2	2	2
pH(50% NaOH)				pH 8~9			
반응온도 / 반응시간				95℃, 90min			

Kokumi 제품의 base를 결정하기 위해 당류나 아미노산 등의 조건은 일정하게 유지하고 밀분해 추출물, 밀단백 추출물, 밀글루텐 효소분해물과 Yeast Extract (천연첨가물)인 Aromild, HC 엑기스-15의 조건을 각각 달리하여 Control을 포함한 7가지의 formulation을 토대로 실험을 수행하였다.

샘플 내에 자체 관능검사원 15명을 대상으로 실시한 1차 관능검사 결과, 7가지 sample 들 중에 밀분해 추출물 + Yeast Extract, 밀단백 추출물 + Aromild의 두 sample이 가장 좋은 기호도를 나타내었다. 자세한 관능평가 결과는 다음과 같다.

**Table 39. The values of sensory attributes in different Kokumi samples**

	대조군	RK <sup>1)</sup>	밀분해 추출물 + Yeast Ext.	밀단백 추출물 + Aromild
전체적인 기호도	3	3.7778	3.8889	4.4444
감칠맛 강도	3.4444	4.2222	4.2222	5.2222
맛의 지속성	3.4444	3.7778	4.5556	4.4444
치킨풍미	3	3.4444	3.5556	4.1111
마늘양파의 풍미	4.1111	3.6667	3.3333	3.6667
부드러운 맛강도	3.1111	4	4.8889	4
이미,이취	3.6667	2.8889	2.6667	3

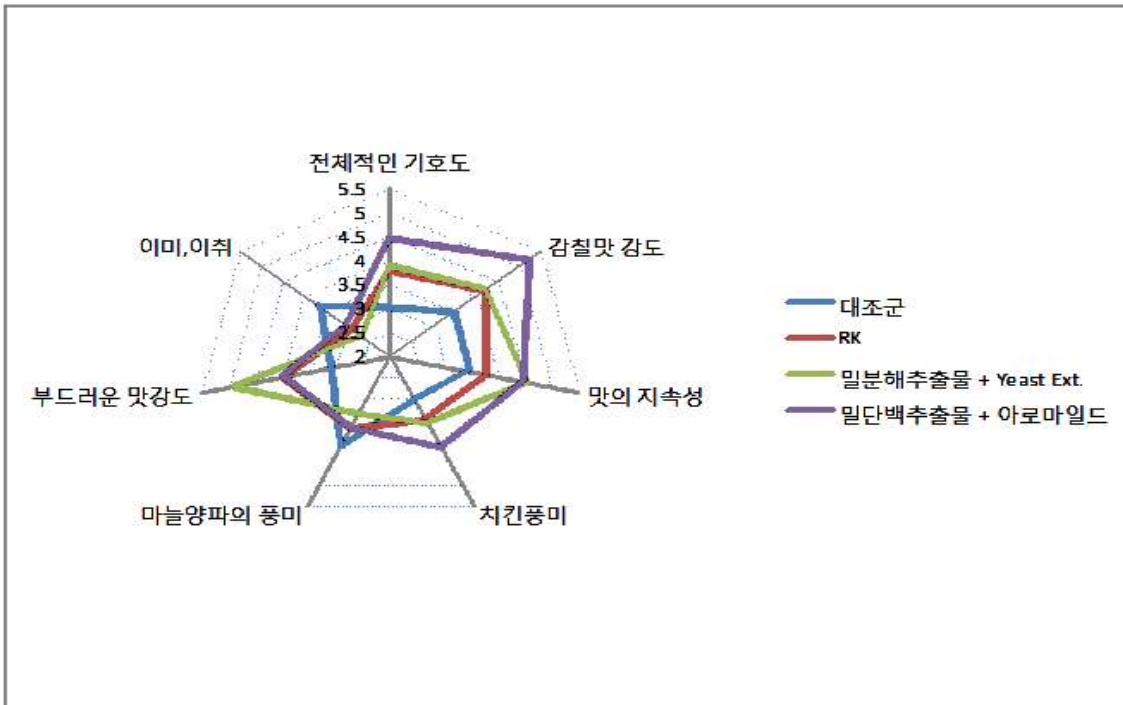


Fig. 47. The values of sensory attributes in different Kokumi samples

<sup>1)</sup>RK : 일본 AJINOMOTO사의 kokumi 제품

밀분해 추출물 + Yeast Ext. sample은 부드러운 맛의 강도가 다른 것에 비해 점수가 높았고, 맛의 지속성 또한 높았다. 밀단백 추출물 + Aromild sample은 전체적인 기호도가 가장 높았고 감칠맛 강도나 치킨풍미, 맛의 지속성 또한 높게 나타났다. 마늘, 양파의 풍미는 대조군보다 오히려 낮게 나타나 그 강도를 높여달라는 요청이 있었다.

1차 관능평가 결과를 토대로 kokumi의 base가 되는 주성분을 밀분해 추출물과 밀단백 추출물로 결정하였다. 그리고 각각의 반응물에 대한 영향을 알아보기 위하여 배합비를 조금씩 달리하여 시료를 제조하였다. 각각 11개씩 총 22개의 시험구를 실험하였다.

Table 40. Formulations of Kokumi flavor(밀분해 추출물+Yeast Extract)

성분	함 량 (g)				
	1-1	1-2	1-3	1-4	1-5
밀분해 추출물	50	50	50	50	50
Yeast Extract	10	10	10	10	10
증류수	86	86	86	80.5	76.25
비타민 Thiamine	10	10	10	10	10
부재료 Garlic extract	9	9	9	12	15
Onion extract	5	5	5	7.5	8.75
pH(50% NaOH)	pH 8~9				
반응온도 / 반응시간	95°C, 90min				

Table 41. Continued

성분	합 량 (g)					
	1-6	1-7	1-8	1-9	1-10	1-11
밀분해 추출물	50	50	50	50	50	50
Yeast Extract	10	10	10	10	10	10
증류수	86	86	86	86	86	86
비타민 Thiamine	<b>12</b>	<b>15</b>	10	10	10	10
부재료 Garlic extract	9	9	9	9	9	9
Onion extract	5	5	5	5	5	5
pH(50% NaOH)	pH 8~9					
반응온도 / 반응시간	95°C, 90min					

Table 42. Formulations of Kokumi flavor(밀단백 추출물+Aromild)

성분	합 량 (g)				
	2-1	2-2	2-3	2-4	2-5
밀단백 추출물	50	50	50	50	50
Aromild	10	10	10	10	10
증류수	86	86	86	80.5	76.25
비타민 Thiamine	10	10	10	10	10
부재료 Garlic extract	9	9	9	<b>12</b>	<b>15</b>
Onion extract	5	5	5	<b>7.5</b>	<b>8.75</b>
pH(50% NaOH)	pH 8~9				
반응온도 / 반응시간	95°C, 90min				

Table 43. Continued

성분	합 량 (g)					
	2-6	2-7	2-8	2-9	2-10	2-11
밀단백 추출물	50	50	50	50	50	50
Aromild	10	10	10	10	10	10
증류수	86	86	86	86	86	86
비타민 Thiamine	<b>12</b>	<b>15</b>	10	10	10	10
부재료 Garlic extract	9	9	9	9	9	9
Onion extract	5	5	5	5	5	5
pH(50% NaOH)	pH 8~9					
반응온도 / 반응시간	95°C, 90min					

Table 41은 base를 밀분해 추출물로 한 배합비이고, Table 42는 밀단백 추출물로 한 배합비이다. Sulfur향 및 savory향을 더 강화시키기 위해서 IMP와 GMP 함량을 늘린 결과, 시료 1-1과 2-1은 감칠맛이 강화되었으나 1-3과 2-3은 오히려 쓴 맛이 많이 났다. 마늘과 양파의 풍미를 높이기 위해 garlic extract와 onion extract의 양을 늘린 1-4, 1-5, 2-4, 2-5의 경우 다른 시료에 비해 그 풍미가 강화되었다. 1-6, 1-7, 2-6, 2-7은

Chicken type의 savory한 향을 더 강하게 주기 위하여 thiamine의 양을 기존보다 2 g, 5 g씩 늘린 각각 12 g, 15 g으로 배합비를 달리하였다. 또한 1-8, 1-9, 2-8, 2-9는 meaty, beefy, sulfury한 향 특성을 가진 cystine의 양을 조금씩 늘려 배합비를 달리하였다.

샘표 내에 자체 연구원 16명을 대상으로 실시한 2차 관능검사를 통해 22가지 sample들의 선호도와 각 시료의 향미특성을 살펴보았다. 자세한 관능평가 결과는 다음과 같다.

Table 44. The values of sensory attributes in different Kokumi samples

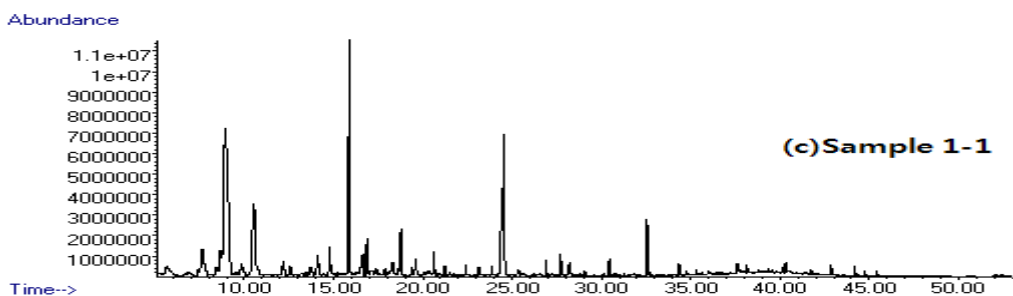
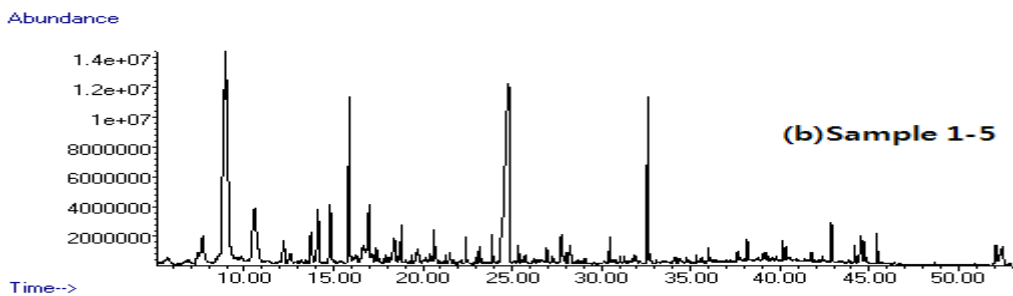
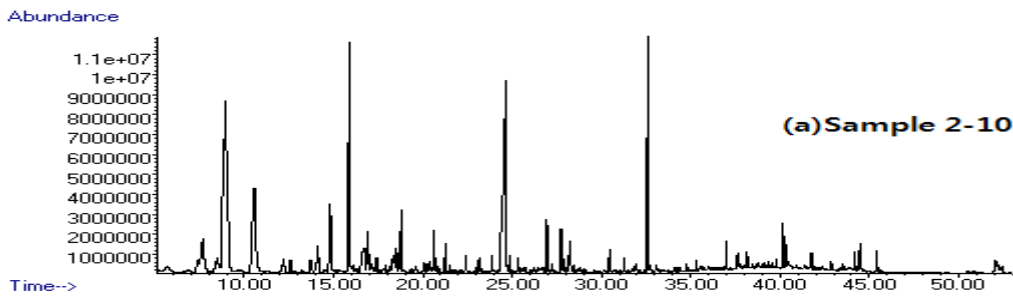
샘플 번호	감칠맛 강도			맛의 지속성			치킨풍미			마늘, 양파의 풍미			부드러운 맛 강도			이미, 이취			전체적인 기호도		
	472 (1-1)	192 (1-5)	750 (2-10)	472 (1-1)	192 (1-5)	750 (2-10)	472 (1-1)	192 (1-5)	750 (2-10)	472 (1-1)	192 (1-5)	750 (2-10)	472 (1-1)	192 (1-5)	750 (2-10)	472 (1-1)	192 (1-5)	750 (2-10)	472 (1-1)	192 (1-5)	750 (2-10)
	6	5	4	6	5	4	6	5	5	4	4	4	4	4	4	3	3	3	6	4	5
	2	6	4	4	2	6	6	2	4	1	2	3	2	4	6	6	2	1	4	2	6
	4	5	3	3	5	6	3	4	6	4	5	5	4	3	5	1	2	1	5	6	4
	1	5	6	4	5	5				6	5	5	1	7	6	4	2	2	1	6	7
	3	4	3	3	4	4	2	2	2	3	2	2	3	3	4	3	2	2	2	4	3
	4	5	3	4	5	2	4	2	3	3	2	5	3	4	2	2	2	4	5	3	3
	3	4	5	7	5	4	7	6	3	2	3	4	6	5	4	6	5	4	1	3	5
	2	2	5	3	2	5	2	3	5	5	2	2	3	5	4	1	1	1	3	2	5
	4	6	2	4	3	6	3	6	3	5	3	3	4	5	3	2	3	2	5	3	4
	2	5	3	2	5	4	5	2	2	4	5	3	5	4	3	4	5	2	5	3	2
	6	3	5	5	3	6	5	4	6	2	4	3	3	4	5	3	4	5	6	3	5
	5	4	4	4	3	5	6	4	5	4	6	6	6	6	4	3	2	4	4	6	5
	5	3	5	5	4	5	5	4	3	5	4	5	2	5	4	4	2	4	2	6	5
	5	5	5	5	5	5	4	4	4	2	2	2	3	3	3	5	5	5	7	6	7
	4	3	2	4	3	3	3	2	3	3	2	3	3	2	2	1	2	1	3	2	3
	4	5	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5	4	3	3	4	4	4	4	5	5
합계	60	70	64	67	64	75	66	55	59	58	56	60	56	67	62	52	46	45	63	64	74
평균	3.75	4.375	4	4.187	4	4.687	4.4	3.666	3.933	3.625	3.5	3.75	3.5	4.187	3.875	3.25	2.875	2.812	3.937	4	4.625
순위	3	1	2	2	3	1	1	3	2	2	3	1	3	1	2	3	2	1	3	2	1

## (2) Formulation에 따른 향미 특성 고찰 및 규명

### (가) 휘발성 향미성분 동정 및 정량

2차 관능평가 결과가 가장 우수했던 상위 시료 5가지를 선정하여 SDE 추출법에 의해 추출한 후 GC-MS로 분석한 결과를 Table 45-49에 나타내었다. 분석 결과 다양한 종류의 향미성분들을 확인할 수 있었으며, 이들은 Maillard reaction이나 비타민 B<sub>1</sub>인 thiamine 및 아미노산인 cystine의 열에 의한 분해산물과 Maillard reaction 산물간의 상호작용임을 알 수 있었다. 또한 기타 지방이나 당 분해 산물들 등도 분석되었다.

특히 meaty, roasted한 향미 특성을 지닌 pyrazine류, sugar degradation에 의해 생성되며 sweet, fruity, nutty, caramel-like와 같은 향미 특성을 나타내는 furan류, 황 함유 화합물이고 beefy, savory한 향미 특성을 가진 2-acetylthiazole, baked potato의 향미 특성을 나타내는 methional 등이 공통적으로 동정되었다. 또한 Maillard 반응 중 thiamine에서 오는 성분인 bis(2-methyl-3-furyl)disulfide, 2-methyl-3-furanthiol 등도 확인하였다. 그 밖에 chromatogram 뒷부분에 나타나는 peak들의 경우 대부분이 lipid의 분해 결과 생성되는 성분들이었다.



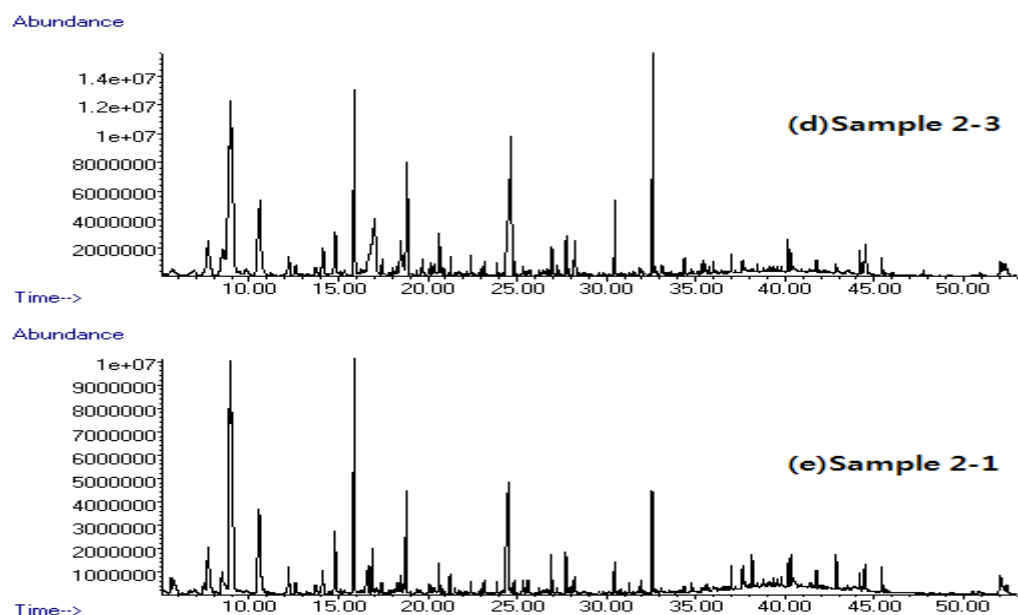


Fig. 48. GC-MS total ion chromatograms of ranking top 5 sample(a)~(e) extracted by SDE

Table 45. Volatile compounds in Sample 2-10 extracted by SDE

RI <sup>A)</sup>	Possible compounds	P.A(%)	ID <sup>B)</sup>
<b>Alcohols</b>			
802	4-Methyl-3-hexanol	0.059	MS
1067	Thenylalcohol	1.554	MS
1107	Benzeneethanol	0.818	MS
1178	2-(2-Butoxyethoxy)-ethanol	0.858	MS
1495	2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-phenol	0.059	MS
2077	1-Octadecanol	0.058	MS
<b>S-containing compounds</b>			
863	2-Methyl-3-furanthiol	7.354	MS/RI
909	Methional	8.841	MS/RI
974	3-(Methylthio)-1-propanol	0.240	MS
986	Dihydro-2-methyl-3(2h)-thiophenone	0.788	MS
1013	2-Acetylthiazole	3.235	MS/RI
1111	5-Methyl-2-thiophenecarboxaldehyde	0.142	MS
1114	2-Formyl-5-methylthiophene	2.174	MS
1162	2-Methyl-3-(methyldithio)furan	1.147	MS
1273	4-Methyl-5-thiazoleethanol	17.199	MS
1405	2-Phenylthiophene	0.106	MS
1519	Bis(2-methyl-3-furyl)disulfide	8.245	MS
<b>N-containing compounds</b>			
1007	1H-Pyrrole-2-carboxaldehyde	0.214	MS
1059	1-(1H-Pyrrol-2-yl)-ethanone	0.979	MS
1091	N-(1,1-Dimethylethyl)-2-propenamide	0.252	MS



1097	Butanal, dimethylhydrazone	0.248	MS
1127	N-(3-Methylbutyl)acetamide	0.087	MS
1201	Quinazoline	0.091	MS
1379	(Hydroxyimino)cyclohexane	1.340	MS
<b>Pyrazines</b>			
823	Methylpyrazine	0.439	MS/RI
996	Trimethylpyrazine	1.923	MS/RI
1071	3-Ethyl-2,5-dimethylpyrazine	0.207	MS
1079	Tetramethylpyrazine	0.681	MS/RI
1304	2,5-Dimethyl-3-n-butylpyrazine	0.176	MS
1377	1,4-Dimethylpyrrolo(1,2-a)pyrazine	0.115	MS
1570	2,5-Dimethyl-3-n-butylpyrazine	0.145	MS
<b>Furans</b>			
851	2-Furanmethanol	0.460	MS/RI
949	2-Furancarboxylic acid	0.932	MS
<b>Acids</b>			
1468	4-Hydroxy-3,5-dimethoxy-benzoic acid	0.074	MS
1955	n-Hexadecanoic acid	1.478	MS/RI
>2100	9,12-Octadecadienoic acid	0.212	MS/RI
>2100	(z)-9-Octadecenoic acid	0.104	MS/RI
<b>Aldehyde and Ketone</b>			
958	Benzaldehyde	0.716	MS/RI
1146	4-Heptanone	0.079	MS
1185	4-Fluoro-3-hydroxybenzaldehyde	0.228	MS
1260	$\alpha$ -Ethylidenbenzeneacetaldehyde	0.092	MS
1386	3-Methoxy-4-hydroxybenzaldehyde	0.227	MS
<b>Aliphatic hydrocarbons</b>			
831	1,2-Nonadiene	3.362	MS
1024	Dotriacontane	0.065	MS
1192	Dodecane	0.072	MS/RI
1393	Tetradecane	0.108	MS/RI
1592	Hexadecane	0.180	MS/RI
1655	2-Methylhexadecane	0.070	MS
1691	Heptadecane	0.436	MS/RI
1758	2-Methylheptadecane	0.187	MS
1796	Octadecane	0.542	MS/RI
1898	Nonadecane	0.233	MS/RI
<b>Ester</b>			
1197	$\beta$ -Nonalactone	0.070	MS
1341	2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate	1.548	MS
1365	Butyl butyrate	1.287	MS
1987	Ethyl hexadecanoate	0.753	MS/RI
>2100	Ethyl linoleate	0.880	MS

<sup>A)</sup> Retention indices were determined *n-paraffins*  $C_7 - C_{22}$  using as external references

<sup>B)</sup> Identification : Tentative identification was performed as follows: MS/RI, mass spectrum was identical with that of Wiley mass spectral database (1995) (Hewlett Packard Co., Palo Alto, CA, USA), and retention index was consistent with that of the literatures[A, Kondjoyan and Berdague(1996); B, Adams(2002); C, Acree and Arn(1997); E, Ansorena *et al.* (2001); F, Kerler and Grosch(1996)]; MS, mass spectrum was consistent with that of Wiley mass spectrum database.

**Table 46. Volatile compounds in Sample 1-5 extracted by SDE**

RI <sup>A)</sup>	Possible compounds	P.A(%)	ID <sup>B)</sup>
<b>Alcohols</b>			
1178	2-(2-Butoxyethoxy)-ethanol	0.258	MS
<b>S-containing compounds</b>			
864	2-Methyl-3-furanthiol	10.157	MS/RI
910	Methional	6.897	MS/RI
949	2,3-Dimethylthiophene	1.666	MS
986	Dihydro-2-methyl-3(2h)-thiophenone	1.918	MS
1013	2-Acetylthiazole	2.689	MS/RI
1068	2-Thiophenemethanol	2.467	MS
1091	5-Acetylthiazole	0.220	MS
1098	3-Thienylmethanol	0.141	MS
1114	2-Formyl-5-methylthiophene	1.344	MS
1162	2-Methyl-3-(methyldithio)furan	1.066	MS
1164	1,2-Dithian-4-one	0.460	MS
1224	2-Isopropyl-4,5-dimethylthiazole	0.278	MS
1230	2,5-Thiophenedicarboxaldehyde	0.572	MS
1234	2-Methyl-3-(methylthio)furan	0.142	MS
1278	4-Methyl-5-thiazoleethanol	25.051	MS
1405	3-Phenyl-thiophene	0.151	MS
1518	Bis(2-methyl-3-furyl)disulfide	5.953	MS
1610	1-Isothiocyanato-heptane	0.241	MS
1712	2-Methyl-3-furanthiol	0.713	MS
<b>N-containing compounds</b>			
1535	3-Methyl-quinoline	0.112	MS
1567	2-Ethyl-quinoline	0.078	MS
<b>Pyrazines</b>			
822	Methylpyrazine	0.389	MS/RI
996	Trimethylpyrazine	3.630	MS/RI
1078	3-Ethyl-2,5-dimethylpyrazine	0.640	MS
1189	2-(2-Methylpropyl)-3,6-dimethylpyrazine	0.087	MS
1294	2,5-Dimethyl-3-(3-methylbutyl)pyrazine	0.852	MS
1318	2-Butyl-3,5-dimethylpyrazine	0.088	MS
1570	2,5-Dimethyl-3-n-butylpyrazine	0.205	MS
<b>Furans</b>			
851	2-Furanmethanol	0.157	MS/RI
<b>Acids</b>			

1957	Hexadecanoic acid	1.428	MS/RI
>2100	9-Octadecenoic acid	0.119	MS
<b>Aldehyde and Ketone</b>			
958	Benzaldehyde	0.789	MS/RI
1041	Benzeneacetaldehyde	8.469	MS
1099	Nonanal	0.163	MS/RI
1748	3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxybenzaldehyde	0.159	MS
<b>Ester</b>			
1365	3-Hydroxy-2,4,4-trimethylpentyl 2-methylpropanoate	0.948	MS
1988	Ethyl hexadecanoate	1.048	MS/RI
2016	Isopropyl palmitate	0.106	MS
>2100	Ethyl linoleate	1.329	MS
<b>Aliphatic hydrocarbons</b>			
973	1-Ethyl-2-methyl-benzene	0.218	MS
1094	Undecane	0.138	MS/RI
1592	Hexadecane	0.144	MS/RI
1691	Heptadecane	0.237	MS/RI
1766	3-Methyl-heptadecane	0.111	MS
1796	Octadecane	0.352	MS/RI
1878	Cyclohexadecane	0.136	MS/RI
1899	Nonadecane	1.116	MS/RI
2077	1-Octadecene	0.116	MS
<b>Miscellaneous compounds</b>			
1104	Maltol	1.441	MS
1138	2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4h-pyran-4-one	1.219	MS
1185	Methylphloroglucinol	0.547	MS
1341	2-Methyl-propanoic acid	0.435	MS

<sup>A)</sup> Retention indices were determined *n*-paraffins  $C_7 - C_{22}$  using as external references

<sup>B)</sup> Identification : Tentative identification was performed as follows: MS/RI, mass spectrum was identical with that of Wiley mass spectral database (1995) (Hewlett Packard Co., Palo Alto, CA, USA), and retention index was consistent with that of the literatures[A, Kondjoyan and Berdague(1996); B, Adams(2002); C, Acree and Arn(1997); E, Ansorena *et al.* (2001); F, Kerler and Grosch(1996)]; MS, mass spectrum was consistent with that of Wiley mass spectrum database.

**Table 47. Volatile compounds in Sample 1-1 extracted by SDE**

RI <sup>A)</sup>	Possible compounds	P.A(%)	ID <sup>B)</sup>
<b>Alcohols</b>			
1024	2-Ethyl-1-hexanol	0.208	MS
1177	2-(2-Butoxyethoxy)-ethanol	0.378	MS
<b>S-containing compounds</b>			
865	2-Methyl-3-furanthiol	25.577	MS/RI
908	Methional	8.708	MS/RI
986	Dihydro-2-methyl-3(2H)-thiophenone	0.746	MS
1012	2-Acetylthiazole	1.661	MS/RI
1065	2-Thienylmethanol	1.887	MS

1097	3-Thienylmethanol	0.1	MS
1110	2-Formyl-5-methylthiophene	0.237	MS
1113	2-Formyl-3-methylthiophene	1.974	MS
1161	2-Methyl-3-(methylthio)furan	0.96	MS
1169	2-Butyl-thiophene	0.117	MS
1230	Dimethylformylthiophene	0.418	MS
1271	4-Methyl-5-thiazoleethanol	14.289	MS
1405	3-Phenyl-thiophene	0.189	MS
1517	Bis(2-methyl-3-furyl)disulfide	2.141	MS
<b>N-containing compounds</b>			
992	N,N-Dimethyl-4-pyridinamine	0.093	MS
<b>Pyrazines</b>			
824	Methylpyrazine	0.523	MS/RI
995	Trimethylpyrazine	1.64	MS
1072	2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazine	0.227	MS
1185	1-Methyl-3,4-dihydro-pyrrolo(1,2-a)pyrazine	0.15	MS
1293	2-Butyl-3,5-dimethyl-pyrazine	0.213	MS
<b>Furans</b>			
852	2-Furanmethanol	0.77	MS/RI
948	2-Furancarboxylic acid	1.171	MS
<b>Acids</b>			
1951	Hexadecanoic acid	0.082	MS/RI
<b>Aldehyde</b>			
958	Benzaldehyde	0.738	MS/RI
<b>Ester</b>			
1341	2,2,4-Trimethylpentanediol-1,3-diisobutyrate	0.557	MS
1987	Ethyl hexadecanoate	0.236	MS/RI
>2000	Ethyl linoleate	0.179	MS
>2000	Ethyl oleate	0.142	MS
<b>Aliphatic hydrocarbons</b>			
830	1,2-Nonadiene	3.537	MS
858	Ethylbenzene	2.343	MS/RI
1095	Undecane	0.134	MS/RI
1592	Hexadecane	0.121	MS/RI
1691	Heptadecane	0.343	MS/RI
1765	3-Methyl-heptadecane	0.117	MS
1796	Octadecane	0.326	MS/RI
1898	Nonadecane	0.35	MS/RI
<b>Miscellaneous compounds</b>			
803	2,2-Dimethyl-3-pentanol	0.136	MS
890	1,4-Dimethylbenzene	1.316	MS/RI
973	2-Acetylcyclopentanone	0.254	MS
1135	2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one	0.945	MS

<sup>A)</sup> Retention indices were determined *n-paraffins*  $C_7 - C_{22}$  using as external references

<sup>B)</sup> Identification : Tentative identification was performed as follows: MS/RI, mass spectrum was identical with that of Wiley mass spectral database (1995) (Hewlett Packard Co., Palo Alto, CA, USA), and retention index was consistent with that of the literatures[A, Kondjoyan and Berdague(1996); B, Adams(2002); C, Acree and Arn(1997); E, Ansorena *et al.* (2001); F, Kerler and Grosch(1996)]; MS, mass spectrum was consistent with that of Wiley mass spectrum database.

**Table 48. Volatile compounds in Sample 2-3 extracted by SDE**

RI <sup>A)</sup>	Possible compounds	P.A(%)	ID <sup>B)</sup>
<b>Alcohols</b>			
1178	2-(2-Butoxyethoxy)-ethanol	0.669	MS
1213	2-Naphthol	0.056	MS
1757	2-(Octadecyloxy)-ethanol	0.206	MS
<b>S-containing compounds</b>			
864	2-Methyl-3-furanthiol	6.745	MS/RI
910	Methional	8.84	MS/RI
986	Dihydro-2-methyl-3(2H)-thiophenone	0.698	MS
1013	2-Acetylthiazole	2.202	MS/RI
1116	2-Formyl-3-methylthiophene	5.897	MS
1162	2-Methyl-3-(methyldithio)furan	1.511	MS
1165	1,2-Dithian-4-one	0.203	MS
1190	3-Ethyl-2-formylthiophene	0.161	MS
1230	2,5-Diformylthiophene	0.609	MS
1270	4-Methyl-5-thiazoleethanol	4.527	MS
1405	3-Phenyl-thiophene	0.056	MS
1519	Bis(2-methyl-3-furyl)disulfide	9.639	MS
<b>N-containing compounds</b>			
1026	1-(2-Pyridinyl)-ethanone	0.341	MS
1068	1-(1H-Pyrrol-2-yl)-ethanone	6.318	MS
1080	1,7-Dihydro-6H-purin-6-one	0.844	MS
1089	Butanal, ethylhydrazone	0.063	MS
1201	Quinazoline	0.125	MS
1293	2-Methyl-quinoxaline	0.475	MS
1411	1-(3-Methylphenyl)-1H-imidazole	0.032	MS
1450	N-(4-Chlorophenyl)-acetamide	2.688	MS
1874	N-Ethylpiperazine	0.038	MS
<b>Pyrazines</b>			
823	Methylpyrazine	0.179	MS/RI
996	Trimethylpyrazine	2.394	MS/RI
1305	2,5-Dimethyl-3-(3-methylbutyl)-pyrazine	0.206	MS
1570	2-Butyl-3,5-dimethylpyrazine	0.117	MS
<b>Furans</b>			
852	2-Furanmethanol	1.106	MS/RI
949	2-Furancarboxylic acid	1.337	MS

<b>Acids</b>			
1357	Octadecanoic acid	0.036	MS
1552	Dodecanoic acid	0.093	MS/RI
1957	Hexadecanoic acid	1.92	MS/RI
>2100	9,12-Octadecadienoic acid	0.191	MS/RI
>2100	9-Octadecenoic acid	0.245	MS/RI
<b>Aldehyde and Ketone</b>			
959	Benzaldehyde	0.589	MS/RI
1041	Benzeneacetaldehyde	10.76	MS
1100	Nonanal	0.209	MS/RI
1197	Decanal	0.077	MS/RI
1387	4-Hydroxy-3-methoxy-benzaldehyde	0.129	MS
1401	Dodecanal	0.053	MS/RI
1476	5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal	0.132	MS/RI
2007	2,2-Dimethyl-3-octanone	0.145	MS
<b>Ester</b>			
1341	2,2,4-Trimethylpentanediol-1,3-diisobutyrate	0.998	MS
1365	Hexyl isobutanoate	1.349	MS
1988	Ethyl palmitate	0.673	MS/RI
>2100	Ethyl linoleate	1.121	MS
<b>Aliphatic hydrocarbons</b>			
1095	Undecane	0.23	MS/RI
1192	Dodecane	0.101	MS/RI
1393	Tetradecane	0.131	MS/RI
1467	(E)-2-Tetradecene	0.082	MS/RI
1592	Hexadecane	0.168	MS/RI
1655	2-Methyl-hexadecane	0.056	MS
1691	Heptadecane	0.411	MS/RI
1723	2,3-Dimethyl-bicyclo(2.2.1)hept-2-ene	0.278	MS
1796	Octadecane	0.517	MS/RI
1898	Nonadecane	0.236	MS/RI
2077	1-Nonadecene	0.045	MS
<b>Miscellaneous compounds</b>			
890	1,4-Dimethylbenzene	0.094	MS/RI
1106	Maltol	2.086	MS
1138	2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one	1.14	MS
1302	2-Methoxy-4-vinylphenol	0.208	MS/RI
1398	2,3,6-Trimethyl-phenol	0.082	MS

<sup>A)</sup> Retention indices were determined *n-paraffins*  $C_7 - C_{22}$  using as external references

<sup>B)</sup> Identification : Tentative identification was performed as follows: MS/RI, mass spectrum was identical with that of Wiley mass spectral database (1995) (Hewlett Packard Co., Palo Alto, CA, USA), and retention index was consistent with that of the literatures[A, Kondjoyan and Berdague(1996); B, Adams(2002); C, Acree and Arn(1997); E, Ansorena *et al.* (2001); F, Kerler and Grosch(1996)]; MS, mass spectrum was consistent with that of Wiley mass spectrum database.

Table 49. Volatile compounds in Sample 2-1 extracted by SDE

RI <sup>A)</sup>	Possible compounds	P.A(%)	ID <sup>B)</sup>
<b>Alcohols</b>			
1024	1-Dodecanol	0.137	MS
1106	Benzeneethanol	0.791	MS
1120	3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	0.099	MS
1177	2-(2-Butoxyethoxy)-ethanol	0.708	MS
<b>S-containing compounds</b>			
864	2-Methyl-3-furanthiol	7.051	MS/RI
909	Methional	8.238	MS/RI
965	Dimethyl trisulfide	0.059	MS
974	3-(Methylthio)-1-propanol	0.227	MS
986	Dihydro-2-methyl-3(2H)-thiophenone	0.48	MS
1013	2-Acetylthiazole	2.995	MS/RI
1065	2-Thiophenemethanol	1.992	MS
1083	2-Ethyl-5-methylthiophene	0.041	MS
1097	3-Thiophenemethanol	0.173	MS
1111	2-Formyl-5-methylthiophene	0.363	MS
1114	2-Formyl-3-methylthiophene	4.316	MS
1162	2-Methyl-3-(methylthio)furan	1.11	MS
1189	3-Ethyl-2-formylthiophene	0.095	MS
1269	4-Methyl-5-thiazoleethanol	8.726	MS
1405	1-Naphthalenethiol	0.064	MS
1517	Bis(2-methyl-3-furyl)disulfide	3.777	MS
<b>N-containing compounds</b>			
843	3-Methyl-1H-pyrrole	0.07	MS
1060	1-(1H-Pyrrol-2-yl)-ethanone	2.867	MS
<b>Pyrazines</b>			
825	Methylpyrazine	0.682	MS/RI
993	2-Ethyl-6-methyl-pyrazine	0.261	MS
996	Trimethylpyrazine	1.571	MS/RI
1071	2-Ethyl-3,5-dimethyl-Pyrazine	0.228	MS
1304	2,5-Dimethyl-3-(3-methylbutyl)-pyrazine	0.08	MS
1376	1,4-Dimethylpyrrolo(1,2-a)pyrazine	0.092	MS
<b>Furans</b>			
810	Dihydro-2-methyl-3(2H)-furanone	0.12	MS
852	2-Furanmethanol	0.508	MS/RI
949	2-Furancarboxylic acid	1.64	MS
1151	2-Methyl-3-(methylthio)furan	0.06	MS
1213	3-Phenylfuran	0.08	MS/RI
<b>Acids</b>			
1549	Dodecanoic acid	0.077	MS/RI

1954	Hexadecanoic acid	1.618	MS/RI
>2100	9,12-Octadecadienoic acid	0.111	MS/RI
<b>Aldehyde and Ketone</b>			
929	2-Cyclohexen-1-one	0.14	MS/RI
958	Benzaldehyde	0.685	MS/RI
1006	1H-Pyrrole-2-carboxaldehyde	0.207	MS
1035	2-Fluoro-benzaldehyde	0.063	MS
1040	Benzeneacetaldehyde	11.558	MS
1185	4-Fluoro-3-hydroxy-benzaldehyde	0.245	MS
1230	2,5-Thiophenedicarboxaldehyde	0.628	MS
<b>Ester</b>			
803	Methyl 3-butenolate	0.089	MS
1341	2,2,4-Trimethylpentanediol-1,3-diisobutyrate	1.354	MS
1365	Butyl butanoate	1.442	MS
1987	Ethyl palmitate	1.063	MS/RI
>2100	Ethyl linoleate	1.484	MS
<b>Aliphatic hydrocarbons</b>			
1095	Undecane	0.136	MS/RI
1192	Dodecane	0.085	MS/RI
1393	Tetradecane	0.072	MS/RI
1556	2-Methylpentadecane	0.066	MS
1592	Hexadecane	0.261	MS/RI
1655	2-Methylhexadecane	0.142	MS/RI
1691	Heptadecane	0.76	MS/RI
1757	2-Methylheptadecane	0.318	MS/RI
1766	3-Methylheptadecane	0.288	MS/RI
1796	Octadecane	1.011	MS/RI
1898	Nonadecane	1.17	MS/RI
2077	1-Nonadecene	0.069	MS
<b>Miscellaneous compounds</b>			
944	Chlorobenzene	0.099	MS
1134	2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one	0.086	MS
1145	(z)-Sabinene hydrate	0.061	MS
1299	2,6-Dimethylfluorobenzene	0.037	MS
1301	2-Methoxy-4-vinylphenol	0.478	MS/RI
1331	2-Chloroethoxybenzene	0.079	MS
1453	2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-2,5-cyclohexadiene-1,4-dione	0.064	MS
1494	2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol	0.281	MS
1497	2,4-Bis(1,1-dimethylethyl)-phenol	0.521	MS
1502	Tributylphosphate	0.097	MS

<sup>A)</sup> Retention indices were determined *n*-paraffins  $C_7 - C_{22}$  using as external references

<sup>B)</sup> Identification : Tentative identification was performed as follows: MS/RI, mass spectrum was identical with that of Wiley mass spectral database (1995) (Hewlett Packard Co., Palo Alto, CA, USA), and retention index was consistent with that of the literatures [A, Kondjoyan and Berdague(1996); B, Adams(2002); C, Acree and Arn(1997); E, Ansorena *et al.* (2001); F, Kerler and Grosch(1996)]; MS, mass spectrum was consistent with that of Wiley mass spectrum database.



(나) 향기활성성분의 동정

GC-MS로 분석한 시료 중 sample 2-10을 Gas chromatography-Olfactometry를 사용하여 sniffing test를 수행하였고, 향기활성성분을 분석한 결과를 Table 50에 나타내었다. 모두 17개의 향기활성성분을 얻을 수 있었고, 이 중 11개의 성분들은 GC/MS, RI값, 향 특성을 통해 동정되었으며, 향 특성은 가지고 있지만 미동정 된 것들도 일부 있었다. nutty, roasted한 향기활성성분은 Maillard reaction에 의한 pyrazine류에 의한 것으로 추정된다. 이 외에도 smoky, sulfury, spicy한 특성을 지닌 향기활성성분들이 동정되었으며 rose-like와 같은 향 특성도 특징적으로 나타났다.

Table 50. Aroma active compounds of Sample 2-10

RI <sup>A)</sup>	Possible Compounds	Aroma description	ID <sup>B)</sup>
846	Methylpyrazine	nutty	MS/RI/SN
872	unknown	sulfury	SN
917	Methional	cooked potato	MS/RI/SN
936	Benzaldehyde	bitter almond, roasted	MS/RI/SN
1088	Tetramethylpyrazine	peanuts	MS/RI/SN
1104	Benzeneethanol	rose-like+sweet	MS/RI/SN
1138	5-Methyl-2-thiophenecarboxaldehyde	roasted peanuts	MS/RI/SN
1220	3-Pyridinecarboxylic acid, methyl ester	nutty	MS/RI/SN
1267	$\alpha$ -Ethylidenebenzeneacetaldehyde	potato chips	MS/RI/SN
1295	unknown	smoky+nutty	SN
1305	unknown	roasted nuts	SN
1362	unknown	vinegar	SN
1381	4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyde	sweet	MS/RI/SN
1693	Heptadecane	alkane	MS/RI/SN
1820	Octadecane	alkane	MS/RI/SN
1979	unknown	nutty	SN
1999	unknown	nutty	SN

<sup>A)</sup> Retention indices were determined *n*-paraffins  $C_7 - C_{22}$  using as external references

<sup>B)</sup> Identification : Tentative identification was performed as follows: MS, mass spectrum was consistent with that of Wiley mass spectrum database; RI, retention index was consistent with that of the literatures(A, Kondjoyan and Berdague, 1996; B, Adams, 2002; C, Acree; D, Arn, 1997; E, Ansorena *et al.*, 2001; F, Kerler and Grosch,1996); SN, odor property perceived at sniffing part

(3) 가공공정 확립 및 표준화

온도, 시간, 반응 시 pH, 수분함량 등은 제품 특성에 영향을 미친다. 반응온도는 제품의 향미 balance와 관계가 깊은 것으로 알려져 있다. 즉, 온도에 따라 각 향미 성분들의 상대적인 생성 속도가 달라진다. 이는 각 성분의 형성에 필요한 activation energy와 관계되는 것으로 반응속도에 영향을 미친다.

온도와 관계된 일반적인 사항은 다음과 같다.

Low activation energy(5-12kcal/mole): off-flavor 성분들 상온 저장 시에 형성가능  
 Medium activation energy(12-25kcal/mole): cooked, steamed, stewed note boiling 시  
 High activation energy(>25kcal/mole): nutty, roasted, toasted note frying, roasting, toasting 시

즉, 저온에서 장시간 온도로 반응을 시켜도 고온에서 반응시킨 것과 같은 향 특성을 절대로 가질 수 없으며, 일반적으로 90~140°C 범위에서 1/2~1시간 정도 반응시킨다.

본 실험에서는 80~140°C 범위에서 실험을 진행하였으며, 90°C 이하에서는 특유의 roasted, beefy, savory 특성의 향미 특성이 너무 약하였으며, 120°C 이상에서는 burnt한 특성이 너무 강해지는 것을 볼 수 있었다 (data not shown). 따라서 본 실험에서는 90~120°C 범위에서 가열반응을 진행하였으며, 95°C를 기본조건으로 확립하였다. 반응시간은 60분, 90분, 120분으로 진행하였으며, 95°C에서 반응 시 90분에서 가장 좋은 제품을 얻을 수 있었다. 60분 반응 시에는 전체적인 향미 특성이 낮았고, 120분 반응 시에는 전체적으로 over cooked된 특성이 나타났습니다.

염기성 pH 범위에서 일반적으로 Maillard 반응은 진한 색상과 강한 nutty, roasted한 특성을 나타내며, 일반적으로 pH가 낮아질수록 sulfur한 특성이 강해질 수 있다. 본 실험에서는 약산성, 중성, 약알칼리 조건에서 예비실험을 수행하였으며, 약알칼리 (pH 8-9) 조건에서 가장 좋은 향미특성을 얻을 수 있어 이 조건에서 실험을 수행하였다.

본 실험에서는 가열반응 시 시료 중 수분의 함량을 달리하여 그 영향을 살펴보았다. 수분의 함량이 제품의 특성에 영향을 미치며, 고형물의 적절한 농도 유지가 매우 중요하다. 예비 실험에서는 가열반응 시 시료 중 수분의 함량을 달리하여 그 영향을 살펴보았으며, 수분 함량이 30-36% 범위에서 가장 적합한 것으로 확인하였다 (data not shown). 30% 이하에서는 반응물의 강도가 낮았으며, 36%을 넘어서는 수분 함량이 부족하여 burnt된 특성이 나타났으며, 반응물도 색이 검어지고, 쓴맛 성분들이 급격히 증가하였다. 따라서, 본 실험에서는 table 21과 같이 수분함량을 32-36% 범위로 조정하여 가열반응을 시켰다.

**Table 51. Water contents of Kokumi**

	1-1	1-2	1-3	1-4	1-5	1-6	1-7	1-8	1-9	1-10	1-11
수분함량	86mL	86mL	86mL	80.5mL	76.25mL	86mL	86mL	86mL	86mL	86mL	86mL
고형분 함량	152g	152g	152g	157.5g	161.75g	154g	157g	154g	157g	152g	152g
	2-1	2-2	2-3	2-4	2-5	2-6	2-7	2-8	2-9	2-10	2-11
수분함량	86mL	86mL	86mL	80.5mL	76.25mL	86mL	86mL	86mL	86mL	86mL	86mL
고형분 함량	152g	152g	152g	157.5g	161.75g	154g	157g	154g	157g	152g	152g

또한, 가열반응 후 건조조건을 달리하여 제품 공정을 최적화하였다. Spray drying시에는 보다 boiled, brothy한 특성을 얻게 되며, Pan drying시에는 짧은 시간 안에 반응이 종결되는 것으로 이해된다. Pan drying시에는 반응이 공정 중 계속 진행되어 일종의 후숙 현상이 일어나며, 이 과정 중 반응 중간단계에 남아있던 중간대사산물들이 최종산물로 전환이 이루어지고 있는 것으로 보인다.

Table 52는 초기에 kokumi를 만들 때, 온도, 시간 등을 달리하여 실험을 수행한 formulation이다. A1은 1차 Dry oven에서 95°C, 120분 반응시킨 결과, 반응물의 색이 검고 burnt한 향이 나서 이후의 실험을 수행할 때에는 90분간 반응하는 것으로 조건을 조절하였다. 2차 Vacuum Drying과정에서 반응물을 vacuum oven에 넣고 70°C에서 3시간동안 감압 건조하였다. A1에서 Vacuum oven의 온도 설정을 90°C로 설정했을 때 내용물이 넘치고 burnt향미에 영향을 주었다. 그래서 이후의 실험을 수행할 때에는 온도를 70°C로 조정하였다.

**Table 52. Formulations of primary Kokumi flavor**

성분		함량(g)			
		A1	A2	A3	A4
Vitamin	Thiamine	5	10	10	10
	Glutathione	0	0	10	3
용매	Water	100mL	100mL	100mL	100mL
	밀분해 추출물	50	50	50	50
기타 맛 성분	Yeast Extract	15	15	15	15
	Garlic extract	2	2	2	2
	Onion extract	1	1	1	1
pH(50%NaOH)		pH 8.02	pH 8.02	pH 8.02	pH8.02
반응온도 / 시간		95°C, 120min	95°C, 90min	95°C, 90min	95°C, 90min

각각의 시료에 대한 전체적인 description은 다음과 같다.

\*A1: Burnt향, Burnt색

\*A2: 5'-GMP:12.982mg/g 5'-IMP: 38.373mg/g 염도: 19.5%, 동물성 단백질향

\*A3: 5'-GMP:19.231mg/g 5'-IMP: 76.397mg/g 염도: 19.8%, 고소한 맛

\*A4: sulfur 냄새가 강함, 풀색, 쓴맛

#### 다. 시제품 향미특성 분석 및 보완 (3차년도)

##### (1) 밀단백질을 효소처리 및 가열공정을 이용한 pyrazine 및 기타 heterocyclic compound의 생성

###### (가) 가수분해를 측정 결과

밀단백질을 가수분해 한 후 α-amino nitrogen 함량을 측정하는 방법으로 가수 분해율을 결정하였다. 2시간, 4시간, 6시간, 8시간, 24시간 효소 처리 후 43.94%, 55.18%, 55.73%, 57.76%, 66.87%의 가수 분해율을 보였다(Table 53). 효소를 이용하여 가수분해 시 가수 분해율이 급

격히 증가하다 점차적으로 완만히 증가하는 경향을 보였다(Fig. 48). 이 결과를 바탕으로 이후에 진행된 실험에서는 효소 가수분해 시간을 4시간으로 결정하였다.

Table 53. Degree of protein hydrolysis according to time

Time (hour)	Protein hydrolysis (%)
2hr	43.94
4hr	55.18
6hr	55.73
8hr	57.76
24hr	66.87

An average of duplicated studies.

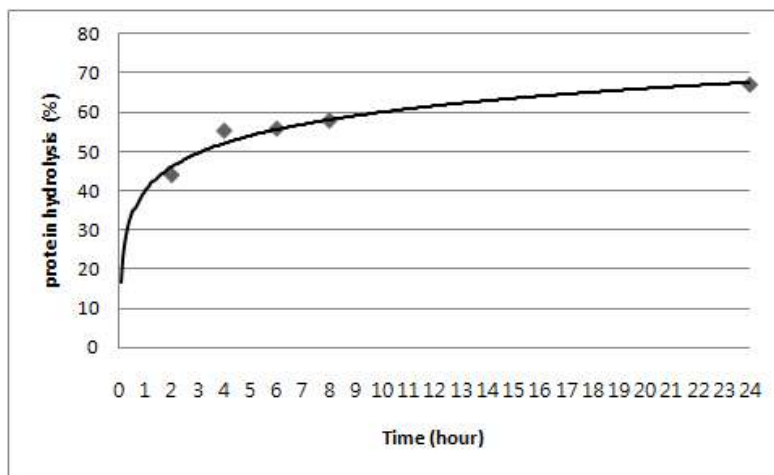
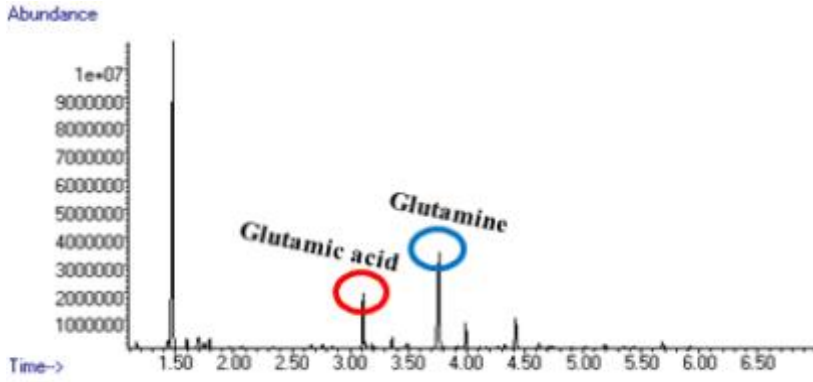


Fig. 49. Degree of protein hydrolysis according to time

(나) Glutamine, Glutamic acid 정량

Amino acid kit인 EZ:faast™ Amino acid analysis kits (Phenomenex, Inc Germany)를 이용하여 selected ion monitoring (SIM) mode에서 free amino acid를 동정한 GC-MS의 크로마토그램을 Fig. 50. 에 나타내었다. Glutamine이 glutamic acid로 전환 후에 약 13배 정도 증가한 것을 볼 수 있다. Internal standard인 norvaline은 1.622분, glutamic acid는 3.132분, glutamine은 3.79분에 동정되었다.



ns

Fig. 50. GC-MS SIM mode chromatogram of glutamine, glutamic acid in wheat gluten hydrolysates

Table 54. Relative content of glutamine, glutamic acid identified in wheat gluten hydrolysates

	전환 전	전환 후
Glutamic acid	0.172	2.301
Glutamine	0.623	0.074

(다) 암모니아 측정

Glutaminase 처리 전과 후의 free ammonia의 양을 측정한 결과를 Fig. 51에 나타내었다. 실험은 각 시료에 대해 3회 반복실험으로 진행하였으며 평균값을 나타내었다. 전환 후 free ammonia의 양이 약 1.3배 정도 증가한 것을 볼 수 있다. Deamidation이란 glutamine (Gln) 또는 asparagine (Asn)의 side chain에 있는 amide 작용기의 가수분해로 glutamic acid 그리고 aspartic acid가 형성되는 것을 말한다. 그리고 이 반응의 결과 free ammonia가 단백질로부터 방출된다 (Hwang *et al.* 1993.). 그리고 이렇게 방출된 ammonia는 Maillard 반응의 전구체로 이용된다 (Izzo and Ho. 1992.).

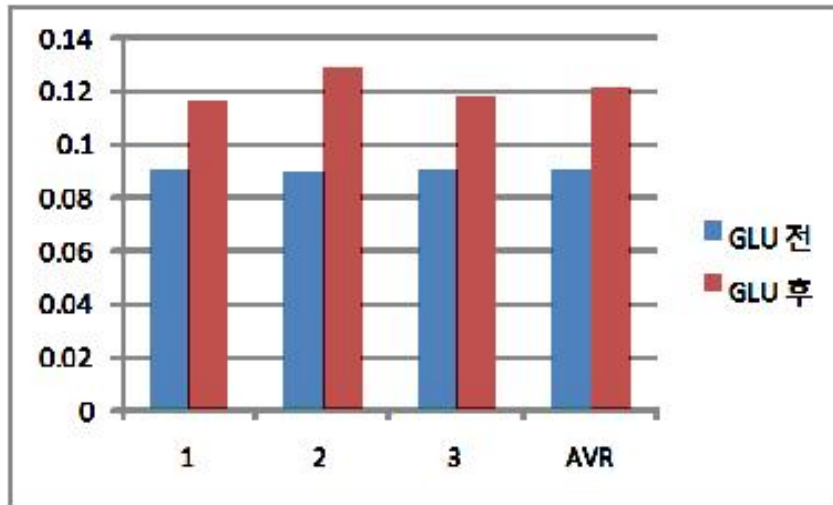


Fig. 51. Amounts of ammonia( $\mu\text{mole/mL}$ ) released in two conditions

(라) 휘발성 향미 성분 동정 및 정량

Deamidation 시킨 가수분해물에 0.05 M 농도의 당을 각각 넣고, 180°C, 150°C에서 90분 간 Maillard 반응 시킨 후, GC-MS로 분석한 결과를 표 25-30에 나타내었다.

밀단백추출물을 서로 다른 환원당과 함께 가열 반응 시 전체적인 향특성은 caramel과 같은 향이 강하게 나타났고, 이 외에 burnt한 향과 함께 고소한 향 특성을 나타내었다. 이러한 향 특성은 2-methylpyrazine과 같은 nitrogen-containing compound가 생성된 것과 연관성이 있다.

밀단백 추출물과 환원당과의 가열 반응에서 생성되는 주요한 성분으로는 nitrogen-containing compounds (pyrazine류, pyridine류 등), sulfur-containing compounds (dimethyl trisulfide, thiazole류, thiophene류 등), furans 및 furanones가 있었다. Cysteine과 starch mixtures에 glucose와 xylose를 각각 첨가하여 동일한 조건에서 반응시켰을 때, glucose에서 aliphatic sulfur 화합물, thiophene류, pyrazine류와 thiazole류가 많이 동정되었다. Amadori 생성물의 deamination이나 dehydration에 의해 생성되는 furfural은 Maillard 반응의 주요한 생성물이다. Sulfonic acid groups (SAGs)을 가진 촉매제(catalyst)의 경우 xylose의 dehydration을 촉진하여 furfural 생성에 영향을 준다고 보고되었다 (Ana et al., 2004). 또한 sulfur를 함유하지 않은 furan류는 일반적으로 nutty, fruity, caramel-like한 향 특성을 생성한다고 보고된 바 있다 (Tressl et al., 1989). Furan류는 당의 cyclization, fragmentation과 dehydration에 의해 생성되는데 이것은 식품의 sensory 특성에 영향을 줄 수 있다 (Tai and Ho, 1998).

일반적으로 pyrazine류는 roasted, nutty한 향미특성을 가진다 (Zhang and Ho, 1998; Hwang et al., 1995). Pyrazine류는 cooked, roasted, toasted한 식품에서 주로 형성되는 heterocyclic 성분으로 일련의 복잡한 반응 경로를 거쳐 생성된다 (Mega, 1992). 이러한 pyrazine의 최종형성 경로는 Strecker degradation에 의해 생성된  $\alpha$ -carbonyl과 amines의 축합반응이다. Deamidation 여부에 따라 glucose를 180°C에서 반응시켰을 때, 총 29개의 pyrazine이 동정되었으며 deamidation 시키지 않은 가수분해물에서는 19개의 pyrazine이 동정되었고, 각각의 함량은 Table 55와 같다. 대부분의 pyrazine의 양은 deamidation 시킨 시료에서 더 높게 나타났다. 당의 종류에 따라서는 가수분해물과 glucose의 반응에서는 29개, fructose와의 반응에서는 40

개, xylose와의 반응에서는 30개의 pyrazine이 동정되었다.

Maillard 반응은 여러 가지 요인들에 의해 영향을 받는데 이 중 반응온도는 반응의 정도와 색에 큰 영향을 준다. 밀단백 추출물과 glucose, fructose 반응물을 각각 150°C, 180°C로 90분 동안 가열 반응 시 전체적으로 반응 온도가 높아짐에 따라 반응색의 갈색도가 증가했고 그 향미특성도 강하게 나타났다. 생성된 향미성분을 살펴보면 온도가 높아짐에 따라 향미성분의 수와 양이 급격히 증가하는 경향을 보였다. 150°C, 180°C에서 모두 xylose 반응물에서 furan류인 furfural이 동정된 반면 glucose와 fructose에서는 발견되지 않았다. 이는 xylose가 6탄당인 glucose와 fructose보다 반응이 더 잘 일어났기 때문으로 사료된다. Pyrazine 역시 150°C에서는 glucose 반응물에서는 3개, fructose 반응물에서는 6개, xylose 반응물에서는 15개로 180°C에 비해 적은 종류와 양이 동정됨을 확인할 수 있었다.

Serine/threonine/glutamate-ribose/glucose/fructose model system에서 동정된 pyrazine류를 보면 그 종류에 있어 차이를 보이지만 전체적인 양에 있어서 fructose에서 glucose보다 더 많이 동정된 것을 볼 수 있는데 (Chen and Ho, 1999), 이는 앞의 실험결과와 같은 경향을 보였다. 또한 pyrazine류는 높은 온도에서 더 잘 생성되며, 일반적으로 반응시간이 증가함에 따라서도 pyrazine의 양도 증가하였다 (Takayuki and Richard, 1976). Glycine, glucose, starch를 120, 150, 180°C에서 각각 반응시켰을 때, 온도가 감소할수록 nitrogen-containing compounds와 oxygen-containing compounds가 전체적으로 급격하게 감소하는 경향을 보였다 (Ames et al., 2001). Xylose와 glucose를 cysteine, starch와 함께 120, 150, 180°C에서 각각 반응시켰을 때, 전체 동정된 향미성분의 수에 있어서는 glucose가 xylose보다 많았다. 특히, oxygen-containing compounds인 furan계열의 경우 xylose가 glucose에서보다 많은 양이 정량되었고 온도감소에 EKfms 영향을 적게 받는다는 연구결과 본 실험과 유사한 결과로 볼 수 있다 (Ames et al., 2001).

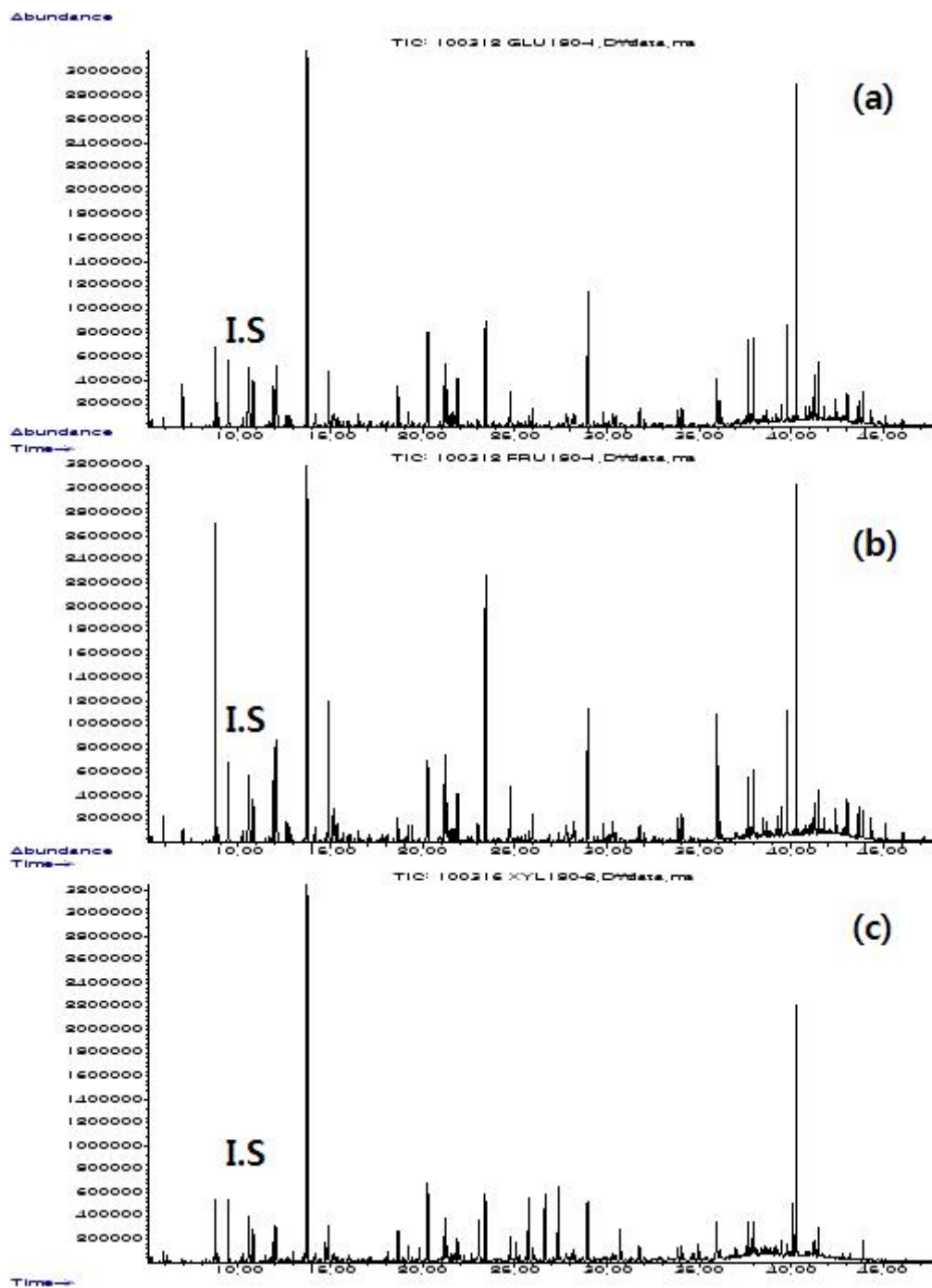


Fig. 52. GC-MS total ion chromatograms of volatile compounds formed from the thermal reactions of wheat gluten hydrolysates and reducing sugars at 180°C for 90min.;(a) gluten hydrolysates-glucose; (b) gluten hydrolysates-fructose; (c) gluten hydrolysates-xylose



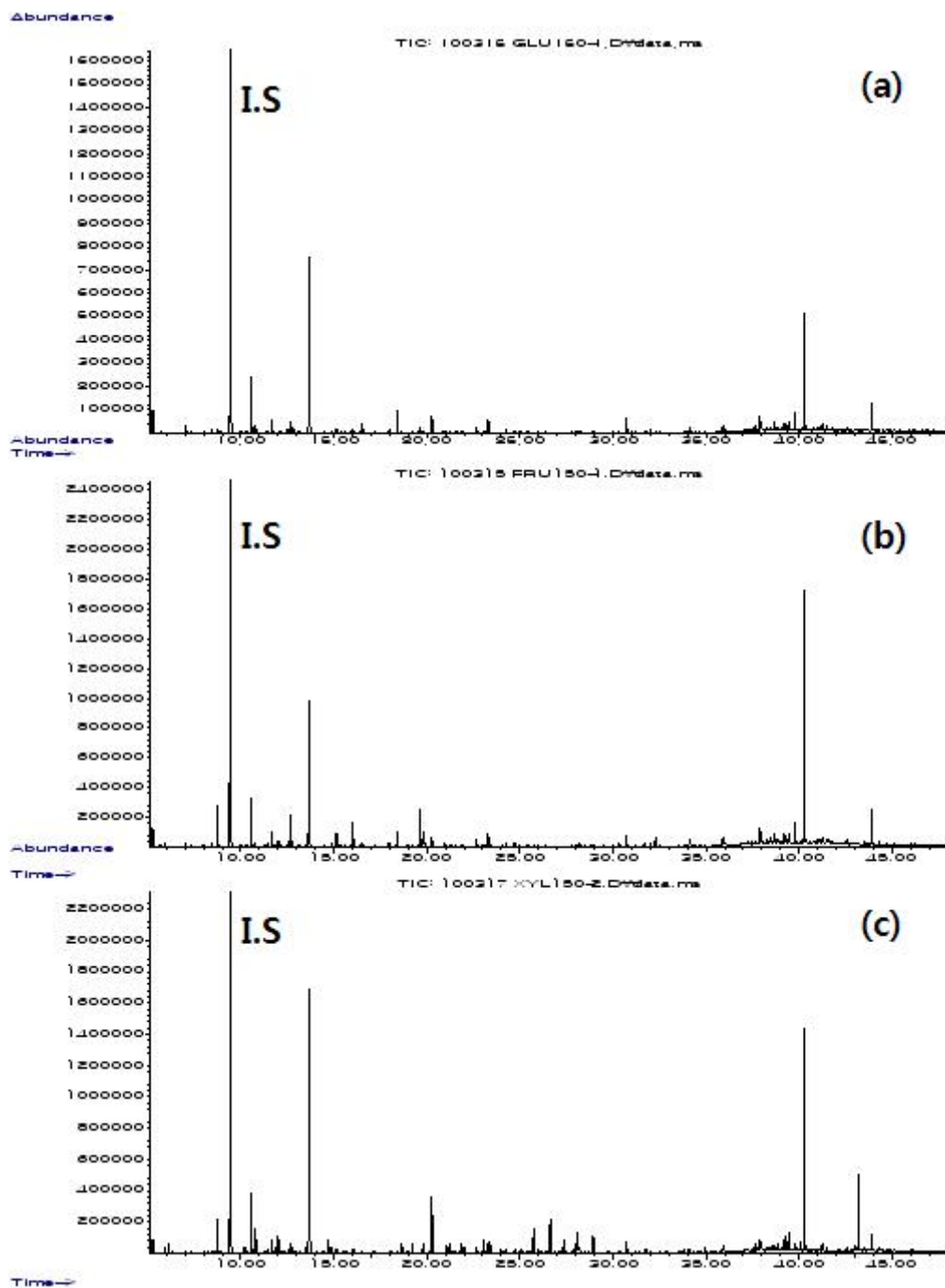


Fig. 53. GC-MS total ion chromatograms of volatile compounds formed from the thermal reactions of wheat gluten hydrolysates and reducing sugars at 150°C for 90min.:(a) gluten hydrolysates-glucose; (b) gluten hydrolysates-fructose; (c) gluten hydrolysates-xylose

Table 55. Volatile compounds formed from the thermal reactions of wheat gluten hydrolysates and glucose at 180°C

No	RI <sup>A)</sup>	Volatile Compounds	Relative peak area (mean ± SD)						ID <sup>B)</sup>
			WGH <sup>C)</sup>			DWGH <sup>D)</sup>			
<b>Pyrazines</b>									
1	821	2-Methylpyrazine	0.079	±	0.004	0.137	±	0.015	MS/RI
2	909	2,5-Dimethylpyrazine	0.394	±	0.012	0.828	±	0.079	MS/RI
3	913	2-Ethylpyrazine	0.216	±	0.005	0.345	±	0.016	MS/RI
4	994	2-Ethyl-6-methylpyrazine	0.369	±	0.011	0.461	±	0.042	MS/RI
5	998	2-Ethyl-3-methylpyrazine	0.263	±	0.009	0.461	±	0.037	MS/RI
6	999	2-Ethyl-5-methylpyrazine	0.370	±	0.015	0.613	±	0.111	MS/RI
7	1014	2-Ethenyl-6-methylpyrazine	0.144	±	0.013	0.179	±	0.010	MS
8	1019	2-Ethenyl-5-methylpyrazine	0.093	±	0.001	0.142	±	0.009	MS
9	1052	2-Methyl-5-(1-methylethyl)pyrazine				0.032	±	0.004	MS
10	1059	(2-Methylpropyl)pyrazine				0.041	±	0.004	MS
11	1073	3-Ethyl-2,5-dimethylpyrazine	0.351	±	0.003	0.641	±	0.062	MS/RI
12	1088	2,5-Diethylpyrazine				0.063	±	0.003	MS
13	1094	Dimethyl-2-vinylpyrazine				0.107	±	0.007	MS
14	1110	2-Acetyl-5-methylpyrazine				0.057	±	0.009	MS
15	1132	2-Butyl-3-methylpyrazine	0.044	±	0.002	0.110	±	0.009	MS
16	1135	5-Methyl-6,7-dihydro-(5H)-cyclopentapyrazine	0.070	±	0.002	0.088	±	0.010	MS
17	1148	2,3-Diethyl-5-methylpyrazine				0.040	±	0.003	MS/RI
18	1151	3,5-Diethyl-2-methylpyrazine				0.081	±	0.018	MS/RI
19	1174	2-Isoamylpyrazine	0.530	±	0.008	0.474	±	0.025	MS
20	1178	2,6-Dimethyl-6,7-dihydro-5H-cyclopentapyrazine				0.032	±	0.005	MS
21	1195	2,5-Dimethyl-3-(2-methylpropyl)pyrazine	0.046	±	0.003	0.067	±	0.008	MS
22	1244	2-Methyl-3-propylpyrazine	0.448	±	0.003	0.468	±	0.052	MS
23	1247	2-Isoamyl-6-methylpyrazine	0.688	±	0.005	0.752	±	0.066	MS
24	1260	2-Isoamyl-6-methylpyrazine	0.087	±	0.003	0.129	±	0.025	MS
25	1309	2,5-Dimethyl-3-(3-methylbutyl)pyrazine	0.727	±	0.004	1.179	±	0.247	MS
26	1321	2,3-Dimethyl-5-isopentylpyrazine	0.047	±	0.021	0.065	±	0.013	MS
27	1375	2,3,5-Trimethyl-6-butylpyrazine				0.081	±	0.015	MS

28	1430	Furfuryl-3-dimethyl-2,5-pyrazine				0.036	±	0.004	MS
29	1574	(2-Phenylethyl)pyrazine	0.212	±	0.006	0.249	±	0.042	MS

### Other N-containing Compounds

30	894	Acetone (1-methylethylidene)hydrazone				0.033	±	0.004	MS
31	1197	2-Methyl-1H-benzimidazole	0.031	±	0.002	0.068	±	0.004	MS
32	1281	2-Ethyl-1H-benzimidazole				0.055	±	0.002	MS
33	1288	1H-Indole				0.102	±	0.015	MS
34	1387	5-Acetyl-2,3-dihydro-1H-pyrrolizine	0.225	±	0.007	0.231	±	0.030	MS
35	1444	5-Hydroxy-1,4-naphthalenedione				0.181	±	0.008	MS
36	1457	3-Phenylpyridine	0.195	±	0.003	0.209	±	0.041	MS/RI
37	1493	5-Acetyl-7-methyl-2,3-dihydro-1H-pyrrolizine				0.058	±	0.007	MS
38	1524	5-Acetyl-7-methyl-2,3-dihydro-1H-pyrrolizine	0.092	±	0.026	0.176	±	0.014	MS
39	1530	7-Methyl-2,3,6,7-tetrahydrocyclopent(b)azepine-8(1H)-one	0.066	±	0.000	0.125	±	0.004	MS
40	1539	1-Naphthalenamine	0.166	±	0.008	0.561	±	0.316	MS
41	2091	2-Phenyl-1H-indole				0.075	±	0.010	MS

### Furans and Furanones

42	906	2-Acetylfuran	0.041	±	0.006	0.080	±	0.012	MS
43	957	5-Methyl-2-furfural				0.209	±	0.024	MS
44	1183	2,3-Dihydro-6-methylthieno[2,3c]furan				0.041	±	0.006	MS
45	1219	3-Phenylfuran	1.389	±	0.031	1.238	±	0.046	MS/RI

### S-containing Compounds

46	965	Dimethyltrisulfide	0.621	±	0.008	0.508	±	0.150	MS
47	988	Dihydro-2-methyl-3(2H)-thiophenone				0.083	±	0.013	MS
48	991	2-Thiophenecarboxaldehyde				0.066	±	0.003	MS/RI
49	1015	2-Acetylthiazole				0.073	±	0.006	MS/RI
50	1080	3-Methyl-2-thiophenecarboxaldehyde	0.038	±	0.000	0.270	±	0.008	MS
51	1086	3-Acetylthiophene	0.056	±	0.003	0.124	±	0.005	MS
52	1117	5-Methyl-2-thiophenecarboxaldehyde	0.062	±	0.009	0.209	±	0.019	MS

### Carbonyls

53	800	Hexanal	0.160	±	0.015	0.105	±	0.006	MS/RI
54	853	5-Methyl-2-hexanone				0.027	±	0.001	MS
55	868	(E)-2-Ethylpent-2-enal	0.061	±	0.001	0.036	±	0.002	MS
56	950	2-Methyl-3-octanone	0.119	±	0.010	0.114	±	0.009	MS
57	959	Benzaldehyde	0.847	±	0.010	0.815	±	0.035	MS/RI
58	1038	2-Fluorobenzaldehyde				0.036	±	0.004	MS
59	1043	Benzeneacetaldehyde	7.341	±	0.139	7.636	±	0.994	MS
60	1063	Acetophenone				0.044	±	0.003	MS
61	1101	2-Isopropyl-5-methyl-2-hexenal	0.083	±	0.001	0.107	±	0.019	MS
62	1123	Phenyl-2-propanone				0.073	±	0.011	MS
63	1250	3-(1-Methylpropyl)-2-hydroxy-2-cyclopenten-1-one	0.053	±	0.006	0.194	±	0.024	MS
64	1265	2-phenyl-2-butenal	0.492	±	0.005	0.501	±	0.162	MS/RI
65	1363	4-Methyl-2-phenyl-2-pentalal				0.068	±	0.017	MS
66	1481	5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal	1.443	±	0.012	1.384	±	0.649	MS/RI

### Alcohols

67	<800	3-Hexanol				0.031	±	0.013	MS
68	1054	1-Nonen-4-ol				0.088	±	0.012	MS
69	1160	2,3-Dihydro-1H-Inden-5-ol				0.107	±	0.016	MS

### Hydrocarbons

70	1068	1,2-Heptadiene				0.069	±	0.008	MS
71	1599	Hexadecane				0.040	±	0.004	MS/RI
72	1698	Heptadecane	0.097	±	0.002				MS/RI
73	1798	Octadecane	0.190	±	0.004	0.104	±	0.041	MS/RI
74	1897	Nonadecane	0.098	±	0.003	0.053	±	0.018	MS/RI
75	1996	Eicosane	0.111	±	0.006				MS/RI
76	2095	Heneicosane	0.161	±	0.043				MS/RI
77	2194	Docosane	0.140	±	0.022				MS/RI
78	>2200	Tricosane	0.174	±	0.032				MS/RI
79	>2200	Eicosane	0.181	±	0.059				MS
80	>2200	Eicosane	0.161	±	0.027				MS

### Miscellaneous

81	1614	4-Methyl-2-phenylphenol				0.041	±	0.011	MS
82	1638	3,4,6-Trimethylazulene-1-carbaldehyde	0.158	±	0.005	0.245	±	0.057	MS
83	1644	3,4,6-Trimethylazulene-1-carbaldehyde	0.237	±	0.013	0.345	±	0.081	MS

<sup>A)</sup> Retention indices were determined *n-paraffins*  $C_7 - C_{22}$  using as external references

<sup>B)</sup> Identification : Tentative identification was performed as follows: MS/RI, mass spectrum was identical with that of Wiley mass spectral database (1995)

(Hewlett Packard Co., Palo Alto, CA, USA), and retention index was consistent with that of the literatures[A, Kondjoyan and Berdague(1996); B, Adams(2002);

C, Acree and Arn(1997); E, Ansorena *et al.* (2001); F, Kerler and Grosch(1996)]; MS, mass spectrum was consistent with that of Wiley mass spectrum database.

<sup>C)</sup> WGH : Wheat gluten hydrolysate

<sup>D)</sup> DWGH : Deamidated wheat gluten hydrolysate

**Table 56. Volatile compounds formed from the thermal reactions of wheat gluten hydrolysates and fructose at 180°C**

No	RI <sup>A)</sup>	Volatile Compounds	Realative peak area			ID <sup>B)</sup>
			(mean ± SD)			
			DWGH <sup>C)</sup>			
<b>Pyrazines</b>						
1	820	2-Methylpyrazine	0.231	±	0.074	MS/RI
2	910	2,5-Dimethylpyrazine	3.306	±	0.600	MS/RI
3	913	2-Ethylpyrazine	0.232	±	0.042	MS/RI
4	994	2-Ethyl-6-methylpyrazine	0.705	±	0.072	MS/RI
5	999	2-Ethyl-3-methylpyrazine	1.154	±	0.158	MS/RI
6	1014	2-Ethenyl-6-methylpyrazine	0.284	±	0.022	MS
7	1018	2-Ethenyl-5-methylpyrazine	0.187	±	0.016	MS
8	1052	2-Methyl-5-(1-methylethyl)pyrazine	0.051	±	0.007	MS
9	1059	(2-Methylpropyl)pyrazine	0.026	±	0.005	MS
10	1073	3-Ethyl-2,5-dimethylpyrazine	1.685	±	0.138	MS/RI
11	1088	2,5-Diethylpyrazine	0.040	±	0.004	MS
12	1094	Dimethyl-2-vinylpyrazine	0.180	±	0.024	MS
13	1110	2-Acetyl-5-methylpyrazine	0.073	±	0.013	MS
14	1117	2-Acetyl-6-methylpyrazine	0.151	±	0.011	MS
15	1131	2-Methyl-5-propylpyrazine	0.153	±	0.015	MS

16	1135	5H-5-methyl-6,7-dihydrocyclopentapyrazine	0.068	±	0.006	MS
17	1148	2,3-Diethyl-5-methylpyrazine	0.076	±	0.008	MS/RI
18	1150	3,5-Diethyl-2-methylpyrazine	0.092	±	0.011	MS/RI
19	1152	2,3,5-Trimethyl-6-ethylpyrazine	0.042	±	0.004	MS
20	1154	2,5-Dimethyl-3-propylpyrazine	0.035	±	0.004	MS
21	1159	2-Methyl-5-(1-propenyl)pyrazine	0.145	±	0.012	MS
22	1174	2-Isoamylpyrazine	0.306	±	0.035	MS
23	1178	2,6-Dimethyl-6,7-dihydro-5H-cyclopentapyrazine	0.040	±	0.004	MS
24	1194	2,5-Dimethyl-3-(2-methylpropyl)pyrazine	0.191	±	0.016	MS
25	1197	4-Methylpyrrolo[1,2-a]pyrazine	0.041	±	0.015	MS
26	1205	Benzopyrazine	0.075	±	0.034	MS
27	1214	2-Acetyl-3,5-dimethylpyrazine	0.029	±	0.004	MS
28	1216	3,5-dimethyl-6,7-dihydro-5H-cyclopentapyrazine	0.083	±	0.006	MS
29	1237	2-Isoamyl-6-methylpyrazine	0.102	±	0.032	MS
30	1244	2-Methyl-3-propylpyrazine	0.728	±	0.075	MS
31	1247	2-Isoamyl-6-methylpyrazine	1.117	±	0.113	MS
32	1260	2-Isoamyl-6-methylpyrazine	0.173	±	0.021	MS
33	1297	2,5-Dimethyl-3-(2-methylpropyl)pyrazine	0.394	±	0.044	MS
34	1309	2,5-Dimethyl-3-(3-methylbutyl)pyrazine	3.270	±	0.320	MS
35	1322	2,3-Dimethyl-5-isopentylpyrazine	0.050	±	0.003	MS
36	1324	2-Butyl-3,5-dimethylpyrazine	0.055	±	0.008	MS
37	1380	2,3,5-Trimethyl-6-(3-methylbutyl)-pyrazine	0.217	±	0.017	MS
39	1430	Furfuryl-3-dimethyl-2,5-pyrazine	0.121	±	0.013	MS
40	1574	(2-Phenylethyl)pyrazine	0.250	±	0.023	MS

#### Other N-containing Compounds

41	894	Acetone (1-methylethylidene)hydrazone	0.040	±	0.003	MS
42	1002	4-Ethyl-2-methyl-1H-pyrrole	0.027	±	0.012	MS
43	1105	2-Acetyl-4-methylthiazole	0.141	±	0.017	MS
44	1256	6-Quinazolinol	0.191	±	0.014	MS
45	1280	2-Ethyl-1H-benzimidazole	0.094	±	0.013	MS
46	1285	3,5-Dimethyl-1H-indazole	0.067	±	0.005	MS
47	1288	1H-Indole	0.122	±	0.061	MS

48	1386	5-Acetyl-2,3-dihydro-1H-pyrrolizine	0.375	±	0.045	MS
49	1457	3-Phenylpyridine	0.271	±	0.006	MS/RI
50	1492	Benzenamine, N,N-diethyl-4-methyl-	0.078	±	0.009	MS
51	1498	5,6-Dimethoxy-1H-indazole	0.089	±	0.008	MS
52	1524	5-Acetyl-6-methyl-2,3-dihydro-1H-pyrrolizine	0.349	±	0.035	MS
53	1530	7-Methyl-2,3,6,7-tetrahydrocyclopent(b)azepine-8(1H)-one	0.168	±	0.013	MS
54	1539	1-Naphthalenamine	0.415	±	0.323	MS
55	1700	2-Amino-3,9-dimethyl-3H-imidazo[4,5-f]quinoline	1.659	±	0.183	MS
56	1710	7-Amino-1,4-dimethylpyrimido[4,5-c]pyridazine-3,5-(1H,2H)-dione	0.213	±	0.032	MS
57	1752	2-Methoxy-7-methylquinoxaline	0.045	±	0.002	MS
58	1803	Benzoic acid, 4-amino-, ethyl ester	0.523	±	0.108	MS
59	2090	2-Phenyl-1H-indole	0.056	±	0.011	MS

### Furans and Furanones

60	906	2-Acetylfuran	0.090	±	0.015	MS
61	988	2-Pentylfuran	0.064	±	0.006	MS/RI
62	1183	2,3-Dihydro-6-methylthieno[2,3c]furan	0.119	±	0.044	MS
63	1219	3-Phenylfuran	1.134	±	0.090	MS/RI

### S-containing Compounds

64	965	Dimethyltrisulfide	0.488	±	0.081	MS
65	990	2-Thiophenecarboxaldehyde	0.061	±	0.004	MS/RI
66	1015	2-Acetylthiazole	0.166	±	0.013	MS/RI
67	1080	3-Methyl-2-thiophenecarboxaldehyde	0.743	±	0.063	MS
68	1086	3-Acetylthiophene	0.240	±	0.017	MS
69	1091	5-Methyl-2-thiophenecarboxaldehyde	0.059	±	0.004	MS
70	1167	1,2-Dithian-4-one	0.066	±	0.006	MS
71	1358	Methyldihydrothienothiophene	0.078	±	0.002	MS

### Carbonyls

72	801	Hexanal	0.098	±	0.010	MS/RI
73	868	(E)-2-Ethylpent-2-enal	0.034	±	0.007	MS

74	949	2-Methyl-3-octanone	0.153	±	0.013	MS
75	959	Benzaldehyde	0.930	±	0.132	MS/RI
76	1038	2-Fluorobenzaldehyde	0.072	±	0.006	MS
77	1042	Benzeneacetaldehyde	7.415	±	1.406	MS
78	1063	Acetophenone	0.039	±	0.002	MS
79	1101	2-Isopropyl-5-methyl-2-hexenal	0.099	±	0.011	MS
80	1123	Phenyl-2-propanone	0.065	±	0.018	MS
81	1250	3-(1-Methylpropyl)-2-hydroxy-2-cyclopenten-1-one	0.260	±	0.025	MS
82	1265	2-phenyl-2-butenal	0.525	±	0.094	MS/RI
83	1274	(E)-3-Phenyl-2-butenal	0.041	±	0.001	MS
84	1362	4-Methyl-2-phenyl-2-pental	0.071	±	0.009	MS
85	1366	3-Pentyl-2-hydroxycyclopent-2-en-1-one	0.051	±	0.002	MS
86	1481	5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal	1.444	±	0.403	MS/RI
87	1600	1-oxa-3-phenyl-5-methyl-cyclopenta-3-en-2-one	0.079	±	0.003	MS

### Alcohols

88	1054	2,6-Dimethyl-3-heptanol	0.197	±	0.077	MS
----	------	-------------------------	-------	---	-------	----

### Hydrocarbons

89	1798	Octadecane	0.060	±	0.036	MS/RI
----	------	------------	-------	---	-------	-------

### Miscellaneous

90	1306	2-Methoxy-4-vinylphenol	0.026	±	0.004	MS
91	1375	2,4,5-Trimethylphenol	0.128	±	0.011	MS
92	1614	4-Methyl-2-phenylphenol	0.051	±	0.005	MS
93	1638	3,4,6-Trimethylazulene-1-carbaldehyde	0.396	±	0.043	MS
94	1644	3,4,6-Trimethylazulene-1-carbaldehyde	0.539	±	0.055	MS
95	1658	3,4,6-Trimethylazulene-1-carbaldehyde	0.076	±	0.004	MS
96	1981	2,4,6-Trimethylbenzophenone	0.043	±	0.007	MS

<sup>A)</sup> Retention indices were determined *n-paraffins*  $C_7 - C_{22}$  using as external references

<sup>B)</sup> Identification : Tentative identification was performed as follows: MS/RI, mass spectrum was identical with that of Wiley mass spectral database (1995)



(Hewlett Packard Co., Palo Alto, CA, USA), and retention index was consistent with that of the literatures[A, Kondjoyan and Berdague(1996); B, Adams(2002); C, Acree and Arn(1997); E, Ansorena *et al.* (2001); F, Kerler and Grosch(1996)]; MS, mass spectrum was consistent with that of Wiley mass spectrum database.

<sup>C)</sup> WGH : Wheat gluten hydrolysate

<sup>D)</sup> DWGH : Deamidated wheat gluten hydrolysate

**Table 57. Volatile compounds formed from the thermal reactions of wheat gluten hydrolysates and xylose at 180 °C**

No	RI <sup>A)</sup>	Volatile Compounds	Realative peak area			ID <sup>B)</sup>
			(mean ± SD) DWGH <sup>C)</sup>			
<b>Pyrazines</b>						
1	821	2-Methylpyrazine	0.170	±	0.006	MS/RI
2	910	2,5-Dimethylpyrazine	0.955	±	0.035	MS/RI
3	913	2-Ethylpyrazine	0.204	±	0.007	MS/RI
4	995	2-Ethyl-6-methylpyrazine	0.356	±	0.012	MS/RI
5	998	2-Ethyl-3-methylpyrazine	0.596	±	0.011	MS/RI
6	1006	2-Propylpyrazine	0.059	±	0.006	MS
7	1014	2-Ethenyl-6-methylpyrazine	0.053	±	0.005	MS
8	1019	2-Ethenyl-5-methylpyrazine	0.057	±	0.004	MS
9	1059	(2-Methylpropyl)pyrazine	0.049	±	0.004	MS
10	1073	3-Ethyl-2,5-dimethylpyrazine	0.602	±	0.018	MS/RI
11	1088	2,5-Diethylpyrazine	0.028	±	0.003	MS
12	1092	2-Methyl-5-propylpyrazine	0.048	±	0.002	MS
13	1094	Dimethyl-2-vinylpyrazine	0.058	±	0.010	MS
14	1111	2-Acetyl-5-methylpyrazine	0.045	±	0.002	MS
15	1132	2-Butyl-3-methylpyrazine	0.156	±	0.002	MS
16	1136	5-methyl-6,7-dihydro-(5H)-cyclopentapyrazine	0.078	±	0.017	MS
17	1156	(E)-5-methyl-2-(1-propenyl)pyrazine	0.066	±	0.009	MS
18	1159	(E)-2-methyl-6-(1-propenyl)pyrazine	0.194	±	0.009	MS
19	1174	2-Isoamylpyrazine	0.721	±	0.211	MS
20	1189	2-Methyl-6,7-dihydro-5H-cyclopentapyrazine	0.330	±	0.008	MS
21	1194	2,5-Dimethyl-3-(2-methylpropyl)pyrazine	0.078	±	0.001	MS
22	1237	2-Isoamyl-6-methylpyrazine	0.075	±	0.003	MS

23	1244	2-Methyl-3-propylpyrazine	0.402	±	0.009	MS
24	1247	2-Isoamyl-6-methylpyrazine	0.722	±	0.010	MS
25	1260	2-Isoamyl-6-methylpyrazine	0.136	±	0.004	MS
26	1309	2,5-Dimethyl-3-(3-methylbutyl)pyrazine	1.119	±	0.028	MS
27	1322	5-Butyl-2,3-dimethylpyrazine	0.049	±	0.011	MS
28	1430	Furfuryl-3-dimethyl-2,5-pyrazine	1.225	±	0.049	MS
29	1513	Furfuryl-2-trimethyl-3,5,6-pyrazine	0.067	±	0.006	MS
30	1574	(2-Phenylethyl)pyrazine	0.256	±	0.026	MS

#### Other N-containing Compounds

31	895	Acetone (1-methylethylidene)hydrazone	0.046	±	0.005	MS
32	1256	6-Quinazolinol	0.158	±	0.011	MS
33	1288	1H-Indole	0.134	±	0.024	MS
34	1387	5-Acetyl-2,3-dihydro-1H-pyrrolizine	0.261	±	0.017	MS
35	1407	1-(2-Furanylmethyl)-2-formyl- 1H-pyrrole	1.340	±	0.108	MS
36	1457	3-Phenylpyridine	0.256	±	0.039	MS/RI
37	1473	9H-Purine, 9-ethyl-6-(1-propenyl)-,(E)-	0.112	±	0.013	MS
38	1524	3-(Diethylamino)-1-methylbenzene	0.123	±	0.057	MS
39	1530	7-Methyl-2,3,6,7-tetrahydrocyclopent(b)azepine-8(1H)-one	0.111	±	0.005	MS
40	1539	1-Naphthalenamine	0.461	±	0.257	MS
41	1700	2-Amino-3,9-dimethyl-3H-imidazo[4,5-f]quinoline	0.740	±	0.066	MS
42	1710	7-Amino-1,4-dimethylpyrimido[4,5-c]pyridazine-3,5-(1H,2H)-dione	0.171	±	0.034	MS

#### Furans and Furanones

43	828	2-Furancarboxaldehyde	0.132	±	0.010	MS
44	906	2-Acetylfuran	0.109	±	0.015	MS
45	1004	1-(2-Furanyl)-propanone	0.029	±	0.005	MS
46	1023	Tetrahydro-2,2-dimethyl-5,1-(methylpropyl)furan	0.193	±	0.038	MS
47	1038	4,5-Dimethyl-2-formylfuran	0.172	±	0.005	MS/RI
48	1181	4-(2-Furanyl)-3-buten-2-one	0.071	±	0.001	MS
49	1206	2-[(methylthio)methyl]furan	0.289	±	0.066	MS
50	1219	3-Phenylfuran	1.356	±	0.066	MS/RI

51	1262	2-Acetylfuran	0.048	±	0.013	MS
----	------	---------------	-------	---	-------	----

### S-containing Compounds

52	965	Dimethyltrisulfide	0.563	±	0.056	MS
53	983	2-Amino-thiazol-4-one	0.113	±	0.000	MS
54	990	2-Thiophenecarboxaldehyde	0.057	±	0.002	MS/RI
55	1015	2-Acetylthiazole	0.077	±	0.006	MS/RI
56	1069	1-(2-Furyl)-butan-3-one	0.370	±	0.009	MS
57	1080	3-Methyl-2-thiophenecarboxaldehyde	0.261	±	0.004	MS
58	1086	3-Acetylthiophene	0.100	±	0.001	MS
59	1117	5-Methyl-2-thiophenecarboxaldehyde	0.068	±	0.005	MS
60	1242	2-Hydroxybenzothiazole	0.050	±	0.008	MS
61	1327	3-Methyl-5H-Thiazolo[3,2-a]pyridin-5-one	0.055	±	0.005	MS

### Carbonyls

62	801	Hexanal	0.110	±	0.013	MS/RI
63	853	5-Methyl-2-hexanone	0.045	±	0.002	MS
64	868	(E)-2-Ethylpent-2-enal	0.033	±	0.001	MS
65	949	cis-2-acetylcyclobutanecarboxylic acid	0.150	±	0.001	MS
66	959	Benzaldehyde	0.882	±	0.025	MS/RI
67	1042	Benzeneacetaldehyde	6.781	±	1.287	MS
68	1063	Acetophenone	0.047	±	0.003	MS
69	1123	Phenyl-2-propanone	0.089	±	0.012	MS
70	1250	3-(1-Methylpropyl)-2-hydroxy-2-cyclopenten-1-one	0.255	±	0.044	MS
71	1265	2-phenyl-2-butenal	0.457	±	0.089	MS/RI
72	1267	1-Methoxy-4-(1'-methylethyl)cyclohexa-1,4-diene	0.160	±	0.101	MS
73	1299	3,4-Dihydro-3-methylene-2H-1-benzopyran-2-one	0.671	±	0.006	MS
74	1359	trans-1-(4-Methylphenyl)-3-methyl-1-pentene	0.339	±	0.005	MS
75	1363	4-Methyl-2-phenyl-2-pentenal	0.073	±	0.006	MS
76	1366	3-Pentyl-2-hydroxycyclopent-2-en-1-one	0.118	±	0.014	MS
77	1481	5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal	1.251	±	0.291	MS/RI
78	1671	3-(2-Furanyl)-2-phenyl-2-propenal	0.434	±	0.020	MS

Alcohols						
79	<800	3-Hexanol	0.046	±	0.008	MS
80	1054	6-Undecanol	0.141	±	0.050	MS
Hydrocarbons						
81	1799	Octadecane	0.125	±	0.053	MS/RI
82	1899	Nonadecane	0.082	±	0.026	MS
Miscellaneous						
83	1380	2,4-hexadienyl phenyl ether	1.145	±	0.036	MS
84	1609	1,2,3,6,7,8-Hexahydro-as-indacene	0.099	±	0.011	MS
85	1638	3,4,6-Trimethylazulene-1-carbaldehyde	0.267	±	0.011	MS
86	1644	3,4,6-Trimethylazulene-1-carbaldehyde	0.323	±	0.011	MS

<sup>A)</sup> Retention indices were determined *n-paraffins*  $C_7 - C_{22}$  using as external references

<sup>B)</sup> Identification : Tentative identification was performed as follows: MS/RI, mass spectrum was identical with that of Wiley mass spectral database (1995) (Hewlett Packard Co., Palo Alto, CA, USA), and retention index was consistent with that of the literatures[A, Kondjoyan and Berdague(1996); B, Adams(2002); C, Acree and Arn(1997); E, Ansorena *et al.* (2001); F, Kerler and Grosch(1996)]; MS, mass spectrum was consistent with that of Wiley mass spectrum database.

<sup>C)</sup> WGH : Wheat gluten hydrolysate

<sup>D)</sup> DWGH : Deamidated wheat gluten hydrolysate

**Table 58. Volatile compounds formed from the thermal reactions of wheat gluten hydrolysates and glucose at 150°C**

No	RI <sup>A)</sup>	Volatile Compounds	Relative peak area			ID <sup>B)</sup>
			(mean ± SD)			
			DWGH <sup>C)</sup>			
Pyrazines						
1	910	2,5-Dimethylpyrazine	0.012	±	0.004	MS/RI
2	913	2-Ethylpyrazine	0.005	±	0.001	MS/RI
3	1174	2-Isoamylpyrazine	0.008	±	0.001	MS

#### Other N-containing Compounds

4	1156	5,8-Dimethylquinoline	0.011	±	0.002	MS
5	1287	1H-Indole	0.018	±	0.002	MS
6	1457	3-Phenylpyridine	0.008	±	0.001	MS/RI
7	1539	1-Naphthalenamine	0.048	±	0.008	MS
8	1894	10H-Phenoxazine	0.007	±	0.001	MS

#### Furans and Furanones

9	988	2-Pentylfuran	0.032	±	0.003	MS
10	1218	3-Phenylfuran	0.063	±	0.007	MS/RI

#### S-containing Compounds

11	965	Dimethyltrisulfide	0.020	±	0.001	MS
12	991	2-Thiophenecarboxaldehyde	0.006	±	0.001	MS/RI
13	1015	2-Acetylthiazole	0.035	±	0.003	MS/RI
14	1080	5-Methyl-2-thiophenecarboxaldehyde	0.008	±	0.002	MS
15	1116	5-Methyl-2-thiophenecarboxaldehyde	0.030	±	0.003	MS
16	1167	1,2-Dithian-4-one	0.060	±	0.008	MS

#### Carbonyls

17	801	Hexanal	0.050	±	0.010	MS/RI
18	887	2-Heptanone	0.006	±	0.002	MS
19	901	Heptanal	0.008	±	0.000	MS
20	958	Benzaldehyde	0.149	±	0.018	MS/RI
21	1041	Benzeneacetaldehyde	0.441	±	0.051	MS
22	1062	Acetophenone	0.007	±	0.001	MS
23	1480	5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal	0.012	±	0.004	MS/RI

#### Alcohols

24	<800	3-Hexanol	0.010	±	0.004	MS
25	979	1-Octen-3-ol	0.004	±	0.001	MS

#### Hydrocarbons

26	1598	Hexadecane	0.006	±	0.001	MS
----	------	------------	-------	---	-------	----

27	1698	Heptadecane	0.030	±	0.004	MS
28	1798	Octadecane	0.022	±	0.003	MS/RI

### Miscellaneous

29	1306	2-Methoxy-4-vinylphenol	0.032	±	0.006	MS
----	------	-------------------------	-------	---	-------	----

<sup>A)</sup> Retention indices were determined *n-paraffins*  $C_7 - C_{22}$  using as external references

<sup>B)</sup> Identification : Tentative identification was performed as follows: MS/RI, mass spectrum was identical with that of Wiley mass spectral database (1995) (Hewlett Packard Co., Palo Alto, CA, USA), and retention index was consistent with that of the literatures[A, Kondjoyan and Berdague(1996); B, Adams(2002); C, Acree and Arn(1997); E, Ansorena *et al.* (2001); F, Kerler and Grosch(1996)]; MS, mass spectrum was consistent with that of Wiley mass spectrum database.

<sup>C)</sup> WGH : Wheat gluten hydrolysate

<sup>D)</sup> DWGH : Deamidated wheat gluten hydrolysate

**Table 60. Volatile compounds formed from the thermal reactions of wheat gluten hydrolysates and fructose at 150°C**

No	RI <sup>A)</sup>	Volatile Compounds	Relative peak area			ID <sup>B)</sup>
			(mean ± SD)			
			DWGH <sup>C)</sup>			
<b>Pyrazines</b>						
1	821	Methyl pyrazine	0.017	±	0.002	MS/RI
2	910	2,5-Dimethylpyrazine	0.126	±	0.018	MS/RI
3	994	2-Ethyl-6-methylpyrazine	0.009	±	0.002	MS/RI
4	998	Trimethylpyrazine	0.022	±	0.006	MS/RI
5	1072	3-Ethyl-2,5-dimethylpyrazine	0.013	±	0.005	MS/RI
6	1309	2,5-Dimethyl-3-(3-methylbutyl)pyrazine	0.015	±	0.004	MS
<b>Other N-containing Compounds</b>						
7	1105	2-Acetyl-4-methylthiazole	0.022	±	0.005	MS
8	1287	1H-Indole	0.019	±	0.003	MS
9	1457	3-Phenylpyridine	0.013	±	0.003	MS/RI
10	1539	1-Naphthalenamine	0.039	±	0.010	MS
<b>Furans and Furanones</b>						
11	988	2-Pentylfuran	0.034	±	0.003	MS/RI

12	1183	2,3-Dihydro-6-methylthieno[2,3c]furan	0.010	±	0.003	MS
13	1218	3-Phenylfuran	0.037	±	0.008	MS/RI

### S-containing Compounds

14	964	Dimethyl trisulfide	0.017	±	0.005	MS
15	1015	2-Acetylthiazole	0.104	±	0.006	MS/RI
16	1080	3-Methyl-2-thiophenecarboxaldehyde	0.046	±	0.009	MS
17	1086	3-Acetylthiophene	0.007	±	0.000	MS
18	1116	3-Methyl-2-thiophenecarboxaldehyde	0.013	±	0.003	MS
19	1167	1,2-Dithian-4-one	0.041	±	0.007	MS

### Carbonyls

20	801	Hexanal	0.050	±	0.009	MS/RI
21	887	2-Heptanone	0.006	±	0.001	MS
22	901	Heptanal	0.008	±	0.000	MS
23	958	Benzaldehyde	0.143	±	0.009	MS/RI
24	1041	Benzeneacetaldehyde	0.414	±	0.033	MS
25	1062	Acetophenone	0.007	±	0.001	MS
26	1265	2-phenyl-2-butenal	0.010	±	0.002	MS/RI
27	1480	5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal	0.008	±	0.003	MS/RI

### Alcohols

28	<800	3-Hexanol	0.008	±	0.002	MS
----	------	-----------	-------	---	-------	----

### Hydrocarbons

29	1598	Hexadecane	0.010	±	0.004	MS
30	1699	Heptadecane	0.046	±	0.009	MS
31	1798	Octadecane	0.029	±	0.014	MS/RI
32	1898	Nonadecane	0.014	±	0.003	MS
33	1996	Eicosane	0.007	±	0.002	MS

### Miscellaneous

34	1306	2-Methoxy-4-vinylphenol	0.032	±	0.008	MS
----	------	-------------------------	-------	---	-------	----

35 1369 3-Hydroxy-2,4,4-trimethylpentyl-ester-2-methyl-propanoic acid 0.011 ± 0.004 MS

<sup>A)</sup> Retention indices were determined *n-paraffins*  $C_7 - C_{22}$  using as external references

<sup>B)</sup> Identification : Tentative identification was performed as follows: MS/RI, mass spectrum was identical with that of Wiley mass spectral database (1995)

(Hewlett Packard Co., Palo Alto, CA, USA), and retention index was consistent with that of the literatures[A, Kondjoyan and Berdague(1996); B, Adams(2002);

C, Acree and Arn(1997); E, Ansorena *et al.* (2001); F, Kerler and Grosch(1996)]; MS, mass spectrum was consistent with that of Wiley mass spectrum database.

<sup>C)</sup> WGH : Wheat gluten hydrolysate

<sup>D)</sup> DWGH : Deamidated wheat gluten hydrolysate

**Table 60. Volatile compounds formed from the thermal reactions of wheat gluten hydrolysates and xylose at 150°C**

No	RI <sup>A)</sup>	Volatile Compounds	Realative peak area			ID <sup>B)</sup>
			(mean ± SD)			
			DWGH <sup>C)</sup>			
<b>Pyrazines</b>						
1	821	Methyl pyrazine	0.015	±	0.001	MS/RI
2	910	2,5-Dimethylpyrazine	0.081	±	0.007	MS/RI
3	913	Ethyl pyrazine	0.006	±	0.001	MS/RI
4	995	2-Ethyl-6-methylpyrazine	0.356	±	0.012	MS/RI
5	1006	2-Propylpyrazine	0.005	±	0.001	MS
6	1014	2-Ethenyl-6-methylpyrazine	0.007	±	0.001	MS
7	1073	3-Ethyl-2,5-dimethylpyrazine	0.016	±	0.001	MS/RI
8	1094	Dimethyl-2-vinylpyrazine	0.006	±	0.001	MS
9	1174	2-Isoamylpyrazine	0.037	±	0.005	MS
10	1189	2-Methyl-6,7-dihydro-5H-cyclopentapyrazine	0.031	±	0.003	MS
11	1244	2-Methyl-3-propylpyrazine	0.015	±	0.002	MS
12	1247	2-Isoamyl-6-methylpyrazine	0.026	±	0.002	MS
13	1309	2,5-Dimethyl-3-(3-methylbutyl)pyrazine	0.029	±	0.002	MS
14	1430	Furfuryl-3-dimethyl-2,5-pyrazine	0.035	±	0.005	MS
15	1574	2-phenylethyl pyrazine	0.009	±	0.000	MS
<b>Other N-containing Compounds</b>						
16	857	2-Methylpyridine	0.005	±	0.002	MS



17	1105	2-Acetyl-4-methylthiazole	0.008	±	0.001	MS
18	1287	1H-Indole	0.018	±	0.002	MS
19	1386	Diethylphenylamine	0.010	±	0.001	MS
20	1407	1-(2-Furanylmethyl)-2-formyl- 1H-pyrrole	0.111	±	0.008	MS
21	1457	3-Phenylpyridine	0.019	±	0.001	MS/RI
22	1539	1-Naphthalenamine	0.045	±	0.006	MS
23	1893	10H-Phenoxazine	0.009	±	0.001	MS

### Furans and Furanones

24	827	2-Furancarboxaldehyde	0.041	±	0.006	MS
25	988	2-Pentylfuran	0.032	±	0.002	MS
26	1069	1-(2-Furanyl)-3-butanone	0.045	±	0.004	MS
27	1181	4-(2-Furanyl)-3-buten-2-one	0.008	±	0.001	MS
28	1206	2-[(methylthio)methyl]furan	0.026	±	0.002	MS
29	1218	3-Phenylfuran	0.168	±	0.012	MS/RI
30	1335	(5H)-5-Pentyl-2-furanone	0.010	±	0.001	MS
31	1422	5-Methyl-4-phenyl-2,3-dihydro-furan	0.009	±	0.001	MS

### S-containing Compounds

32	906	3-(methylthio)-propanal	0.010	±	0.002	MS
33	965	Dimethyl trisulfide	0.071	±	0.014	MS
34	990	2-Thiophenecarboxaldehyde	0.004	±	0.000	MS/RI
35	1015	2-Acetylthiazole	0.030	±	0.002	MS/RI
36	1080	3-Methyl-2-thiophenecarboxaldehyde	0.017	±	0.000	MS

### Carbonyls

37	800	Hexanal	0.039	±	0.004	MS/RI
38	888	2-Heptanone	0.005	±	0.001	MS
39	901	Heptanal	0.007	±	0.001	MS
40	958	Benzaldehyde	0.174	±	0.004	MS/RI
41	1042	Benzeneacetaldehyde	0.956	±	0.146	MS
42	1062	Acetophenone	0.007	±	0.001	MS
43	1265	2-phenyl-2-butenal	0.026	±	0.004	MS/RI

44	1268	3,4-Dihydroxyacetophenone	0.018	±	0.002	MS
45	1299	3,4-Dihydro-3-methylene-2H-1-benzopyran-2-one	0.036	±	0.005	MS
46	1480	5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal	0.045	±	0.008	MS/RI
47	1670	3-(2-Furanyl)-2-phenyl-2-propenal	0.026	±	0.003	MS

### Alcohols

48	<800	3-Hexanol	0.008	±	0.002	MS
----	------	-----------	-------	---	-------	----

### Hydrocarbons

49	1598	Hexadecane	0.010	±	0.001	MS
50	1699	Pentadecane	0.025	±	0.003	MS
51	1798	Octadecane	0.025	±	0.008	MS/RI
52	1898	Nonadecane	0.037	±	0.006	MS

### Miscellaneous

53	1637	3,4,6-Trimethylazulene-1-carbaldehyde	0.008	±	0.001	MS
54	>2200	3-(4-Methoxyphenyl)-2-propenoic acid 2-ethylhexyl ester	0.008	±	0.002	MS

<sup>A)</sup> Retention indices were determined *n-paraffins*  $C_7 - C_{22}$  using as external references

<sup>B)</sup> Identification : Tentative identification was performed as follows: MS/RI, mass spectrum was identical with that of Wiley mass spectral database (1995)

(Hewlett Packard Co., Palo Alto, CA, USA), and retention index was consistent with that of the literatures[A, Kondjoyan and Berdague(1996); B, Adams(2002);

C, Acree and Arn(1997); E, Ansorena *et al.* (2001); F, Kerler and Grosch(1996)]; MS, mass spectrum was consistent with that of Wiley mass spectrum database.

<sup>C)</sup> WGH : Wheat gluten hydrolysate

<sup>D)</sup> DWGH : Deamidated wheat gluten hydrolysate

## (2) Kokumi 시제품의 휘발성 향미 성분 고찰 및 규명

Kokumi 시제품인 연두 담백한 맛 (plain)과 깊은 맛 (deep) (액상 형태)을 SDE 추출법에 의해 추출한 후, GC-MS로 분석한 결과를 Table 61-62에 나타내었다. 분석 결과 다양한 종류의 향미성분들을 확인할 수 있었으며, 이들은 주로 Maillard reaction이나 그 반응산물간의 상호작용임을 알 수 있었다. 또한 기타 지방이나 당 분해 산물들 등도 분석되었다.

분석 결과 담백한 맛(plain)에서 총 69개의 성분들이 검출되었으며, 그 중 aldehydes와 ketones가 5개, pyrazines 18개, furans 8개, S-containing compounds 5개, N-containing compounds 23개, aliphatic hydrocarbons가 1개, 기타 화합물이 7개 동정되었다. 깊은 맛(deep)에서는 총 47개의 화합물이 검출되었으며 aldehydes와 ketones가 8개, pyrazines 14개, furan 7개, S-containing compounds 4개, N-containing compounds 10개, 기타 화합물이 4개 동정되었다. Methylpyrazine, 2,3-dimethyl pyrazine과 같은 pyrazine류와 furfuryl alcohol, furfural, 2-methyl-5-formylfuran과 같은 furan류가 중요한 향기 성분으로 동정되었다. 특히 sugar burnt한 향기특징을 가지는 furfurylalcohol은 두 시료 모두에서 다량으로 확인되었다. Benzeneacetaldehyde는 Maillard 반응의 Strecker degradation에 의해 생성되는 것으로 알려져 있다. 두 시료에서 모두 동정된 3-Hydroxy-2-methyl-4H-pyran-4-one (Maltol)은 caramel-like, sweet한 향기 특성을 가지며 flavor enhancer로 소량으로도 식품의 단맛을 향상시키고 증대시키는 역할을 한다.

Basic compounds의 일종인 pyrazine은 Maillard reaction 및 Strecker degradation에 의해 생성되는 화합물로서 가열과정 중 당류와 단백질의 분해에 의해 생성된 carbonyls, dicarbonyls, ammonias 등 주요 전구 물질들의 축합 및 고리화 반응 등에 의해 만들어지는 것으로 알려져 있다. pyrazine류는 대개 고소한 nutty향과 roasted향 특성을 지니며 담백한 맛 (plain)에서 더 많이 검출되었다. Furan 계통의 2-furanmethanol과 5-methylene-2[5H]-furanone은 갈변 반응인 caramelization 반응의 산물일 것으로 여겨진다. 기타 휘발성 성분 중 carbonyl류 성분은 식품에서 주로 불포화 지방산의 산화와 지방의 열에 의한 산화적인 분해에 의한 결과로 형성된다고 알려져 있다 (Moon *et al.* 2006).

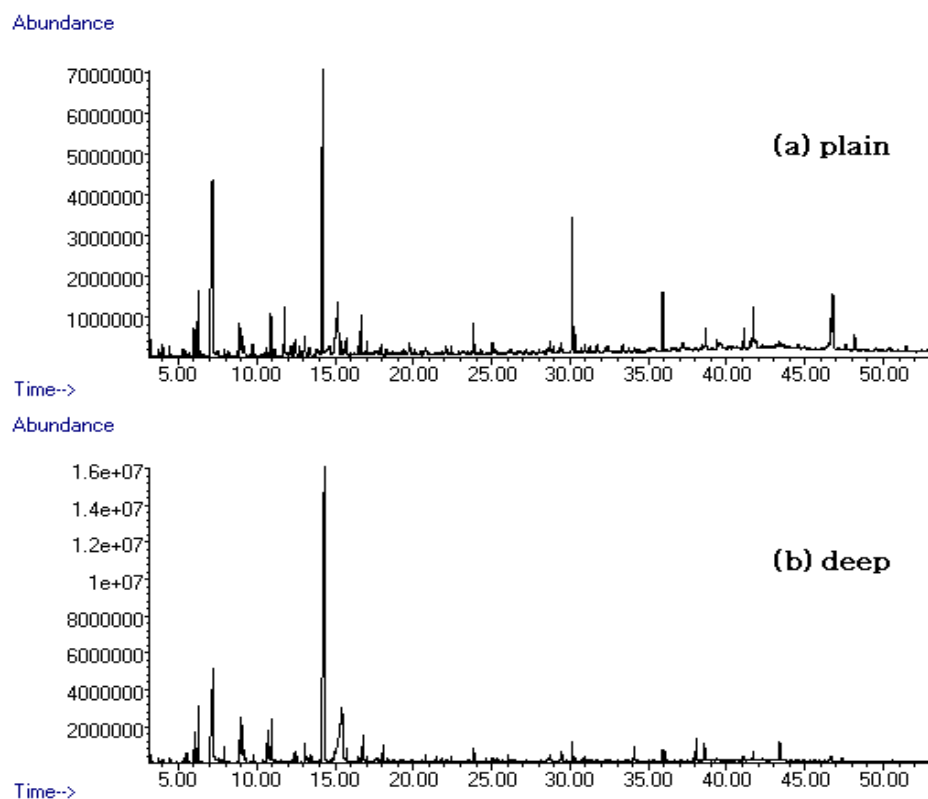


Fig. 54. GC-MS total ion chromatograms of sample plain(a) and deep(b) extracted by SDE

Table 61. Volatile compounds in plain taste (kokumi sample) extracted by SDE

RI <sup>A)</sup>	Possible compounds	P.A(%)	ID <sup>B)</sup>
<b>Alcohols</b>			
1103	Benzenemethanol	0.415	MS
1117	1-Octen-3-ol	2.172	MS/RI
<b>Pyrazines</b>			
<800	Pyrazine	0.283	MS/RI
846	Methylpyrazine	0.972	MS/RI
932	2,5-Dimethylpyrazine	0.568	MS/RI
939	2-Ethylpyrazine	0.363	MS/RI
943	2,3-Dimethylpyrazine	0.270	MS/RI
978	2-Vinylpyrazine	0.451	MS
1059	2-Acetylpyrazine	0.148	MS
1135	2-Acetyl-5-methylpyrazine	0.104	MS
1156	2-Ethyl-6-methylpyrazine	0.479	MS/RI
1165	Trimethylpyrazine	0.690	MS
1221	2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazine	0.517	MS
1240	3-Ethyl-2,5-dimethylpyrazine	0.127	MS
1329	3-Isoamyl-2,5-dimethylpyrazine	0.402	MS
1334	2-butyl-3-methylpyrazine	0.096	MS
1343	2-Isoamyl-6-methylpyrazine	0.227	MS
1361	4-Methylpyrrolo[1,2-a]pyrazine	0.348	MS
1377	2-Methyl-6,7-dihydro-5H-cyclopentapyrazine	0.598	MS
1533	1,3-Dimethylpyrrolo[1,2-a]pyrazine	0.257	MS

### S-containing compounds

921	3-(Methylthio)propanal	1.874	MS
1074	Dimethyl trisulfide	0.301	MS/RI
1153	2-Formyl-3-methylthiophene	0.537	MS
1427	3-Phenylthiophene	0.130	MS
1452	Hexahydro-1-methyl-2H-azepine-2-thione	0.052	MS

### 기타 N-containing compounds

<800	Pyridine	0.363	MS/RI
<800	1H-Pyrrole	0.268	MS/RI
873	2-Methylpyrrole	0.175	MS
888	2-Methylpyrrole	0.070	MS
980	N-Ethylcyclohexanamine	0.277	MS
1022	1,2,6-Trimethylpiperidine	0.089	MS
1142	1-Butylpyrrolidine	0.316	MS
1169	2,3,4,5-tetramethyl-1H-pyrrole	0.116	MS
1184	2-Formyl-1-methylpyrrole	0.144	MS
1208	2-Acetylpyrrole	7.258	MS
1259	4-Ethyl-2,5,6-Trimethylpyrimidine	0.257	MS
1344	2-(Methoxycarbonyl)pyridine	0.166	MS
1365	1,2,3,4-Tetrahydroquinoline	0.380	MS
1399	1H-Indazole	0.205	MS
1508	Dodecyldimethylamine	5.187	MS
1521	2,3,6,7-Tetrahydrocyclopent(b)azepine-8(1H)-one	1.178	MS
1559	4-(1-Pyrrolidiny)pyridine	0.105	MS
1582	2,3,4,5,6,7-Hexahydrocyclopent(b)azepine-8(1H)-one	0.286	MS
1583	7-Methyl-2,3,6,7-tetrahydrocyclopent(b)azepine-8(1H)-one	0.356	MS
1610	1-Naphthalenamine	0.303	MS
1631	N-Acetylhystrine	0.326	MS
1696	2-Ethylquinoline	0.243	MS
2115	N-Methyl-N-benzyltetradecanamine	1.361	MS

### Furans & Furanones

863	2-Furancarboxaldehyde	3.335	MS/RI
918	2-Furanmethanol	16.380	MS/RI
962	5-Methylene-2(5H)-furanone	0.260	MS
974	4(3)-Methyl-2-furanmethanol	0.103	MS
1031	5-Methyldihydro-2(3H)-furanone	0.116	MS
1058	2-Methyl-5-formylfuran	1.920	MS
1257	3-Phenylfuran	0.149	MS
1371	N-(3-Methylbutylidene)-2-furanmethanamine	0.105	MS

### Aldehydes & Ketones

908	2-Methyl-2-cyclopentenone	0.230	MS
1067	2-Hydroxy-1-methylcyclopenten-3-one	0.436	MS
1131	Benzeneacetaldehyde	15.937	MS
1395	2-Phenyl-2-butenal	0.300	MS
1628	5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal	0.292	MS

### Aliphatic hydrocarbons

1615	Cyclododecane	0.479	MS
------	---------------	-------	----

### Miscellaneous compounds

817	1-Fluorocyclohexene	0.269	MS
1125	3-Hydroxy-2-methyl-4H-pyran-4-one	2.408	MS
1246	2-Methoxyphenol	0.736	MS
1321	2-Methoxy-4-vinylphenol	1.332	MS/RI
1330	(E,E)-2,4-Heptadienal	0.117	MS/RI
1426	2,6-Dimethoxyphenol	0.617	MS/RI

<sup>A)</sup> Retention indices were determined *n*-paraffins  $C_7 - C_{22}$  using as external references

<sup>B)</sup> Identification : Tentative identification was performed as follows: MS/RI, mass spectrum was identical with that of Wiley mass spectral database (1995) (Hewlett Packard Co., Palo Alto, CA, USA), and retention index was consistent with that of the literatures[A, Kondjoyan and Berdague(1996); B, Adams(2002); C, Acree and Arn(1997); E, Ansorena *et al.* (2001); F, Kerler and Grosch(1996)]; MS, mass spectrum was consistent with that of Wiley mass spectrum database.

**Table 62. Volatile compounds in deep taste (kokumi sample) extracted by SDE**

RI <sup>A)</sup>	Possible compounds	P.A(%)	ID <sup>B)</sup>
<b>Pyrazines</b>			
<800	Pyrazine	0.270	MS/RI
848	Methylpyrazine	1.595	MS/RI
936	2,5-Dimethylpyrazine	2.897	MS/RI
943	2-Ethylpyrazine	0.411	MS/RI
948	2,3-Dimethylpyrazine	0.241	MS/RI
980	2-Vinylpyrazine	0.429	MS
1000	Trimethylpyrazine	0.576	MS
1044	2-Methyl-6-vinylpyrazine	1.183	MS
1156	2-Acetyl-6-methylpyrazine	0.346	MS
1157	2-Ethyl-6-methylpyrazine	0.502	MS/RI
1330	3-Isoamyl-2,5-dimethylpyrazine	0.496	MS
1336	2-Butyl-3-methylpyrazine	0.130	MS
1345	2-Isoamyl-6-methylpyrazine	0.215	MS
1380	(E)-5-methyl-2-(1-propenyl) pyrazine	0.171	MS
<b>S-containing compounds</b>			
925	3-(Methylthio)propanal	4.514	MS
1075	Dimethyl trisulfide	0.158	MS/RI
1104	2-Acetylthiophene	0.198	MS/RI
1233	Dimethyl tetrasulfide	0.141	MS

### 기타 N-containing compounds

<800	Pyridine	0.128	MS/RI
<800	1H-Pyrrole	0.158	MS/RI
1024	2-Pyridinecarboxamide	0.154	MS
1060	2,6-Dimethyl-3-pyridinamine	0.166	MS
1348	2-(Methoxycarbonyl)pyridine	0.141	MS
1509	Dodecyldimethylamine	1.058	MS
1521	2,3,6,7-Tetrahydrocyclopent(b)azepine-8(1H)-one	0.281	MS
1554	Diethylphenylamine	0.132	MS
1568	5-Acetyl-7-methyl-2,3-dihydro-1H-pyrrolizine	0.231	MS
1583	7-Methyl-2,3,6,7-tetrahydrocyclopent(b)azepine-8(1H)-one	0.359	MS

### Furans & Furanones

818	Dihydro-2-methyl-3(2H)-furanone	0.602	MS
865	2-Furancarboxaldehyde	3.811	MS/RI
921	2-Furanmethanol	14.030	MS/RI
965	5-Methylene-2(5H)-furanone	0.896	MS
1044	2-Furancarboxylic acid	2.767	MS
1061	2-Methyl-5-formylfuran	2.632	MS
1258	3-Phenylfuran	0.497	MS

### Aldehydes & Ketones

1075	2-Hydroxy-1-methylcyclopenten-3-one	0.732	MS
1112	2-Methylmercaptomethylbut-2-enal	0.439	MS
1139	Benzeneacetaldehyde	35.283	MS
1203	5-Methyl-1H-pyrrole-2-carbaldehyde	0.503	MS
1262	2-Phenylpropenal	0.299	MS
1396	2-Phenyl-2-butenal	0.352	MS
1484	4-Methyl-2-phenyl-2-pental	0.118	MS
1629	5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal	0.550	MS

### Miscellaneous compounds

1136	3-Hydroxy-2-methyl-4H-pyran-4-one	2.930	MS
1240	2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one	1.727	MS
1321	2-Methoxy-4-vinylphenol	0.819	MS/RI
1427	2,6-Dimethoxyphenol	0.213	MS/RI

<sup>A)</sup> Retention indices were determined *n-paraffins*  $C_7 - C_{22}$  using as external references

<sup>B)</sup> Identification : Tentative identification was performed as follows: MS/RI, mass spectrum was identical with that of Wiley mass spectral database (1995) (Hewlett Packard Co., Palo Alto, CA, USA), and retention index was consistent with that of the literatures[A, Kondjoyan and Berdague(1996); B, Adams(2002); C, Acree and Arn(1997); E, Ansorena *et al.* (2001); F, Kerler and Grosch(1996)]; MS, mass spectrum was consistent with that of Wiley mass spectrum database.

### 제 3 절 최적의 kokumi를 위한 펩타이드 제조 조건 확립

#### 1. 재료 및 방법

##### 가. 고꾸미 제조를 위한 펩타이드 분석법 탐색 및 가수조건 확립

###### (1) 고꾸미 관련 펩타이드 분석법 확립

###### (가) GSH 함량분석

###### ① Alloxan reagent method

일정농도의 시료 1 mL을 0.25 M phosphate buffer(pH 7.6) 3.5 mL에 녹인 후 0.1 M glycine solution 0.5 mL을 가하였다. 시료혼합액에 0.1% Alloxan reagent(0.1 M HCl에 용해) 1.0 mL을 가한 후 aluminum foil을 이용하여 빛을 차단하고 실온에서 20분 동안 반응시켰다. 반응액의 흡광도는 305 nm(UV/visible spectrophotometer, Ultrospec 2100, Cambridge, England)에서 측정하였고, 0-200 uM의 glutathione을 이용하여 검량선을 구하였다.

###### ② HPLC method

GSH분석은 HPLC system Beckman SYSTEM의 SHISEIDO CAPCELL PAK C<sub>18</sub> (4.6 × 250 mm) column을 사용하여 Phosphoric acid와 CH<sub>3</sub>CN (64:36)을 이동상으로 하여 분석하였다.

###### (나) 펩타이드 패턴 분석

###### ① Reversed phase HPLC chromatography

밀 단백질 가수분해물의 hydrophobicity 패턴분석은 μBondapak<sup>TM</sup> C<sub>18</sub> column(5 μm, 4.6 × 150 mm, Waters, Milford, MA, Ireland)이 장착된 HPLC system(Waters, Milford, MA, Ireland)을 이용하여 분석하였다. 이동상으로는 eluent A(0.1% TFA in water)와 eluent B(0.1% TFA in water/acetonitrile(40/60, v/v))를 이용하여 35분 동안 eluent A를 100-0%로 조절하였다. 유속은 1.0 mL/min이었고, 214 nm에서 검출하였다.

###### ② Gel electrophoresis

Laemmli 등의 방법에 따라 miniVE Vertical eletrophoresis system(8 × 7 cm, Amersham pharmacia biotech., USA)을 이용하여 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE, 5% stacking gel, 15% separating gel)를 행하였다. 시료의 전처리하는 밀 단백질 500 mg에 lysis buffer(1% NP-40, 120 mM NaCl, 40 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM PMSF) 1 mL을 가하여 2분간 혼합, 2분간 sonification을 한 후 7,000 × g 에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액을 동량의 sample buffer(125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 20% glycerol, 2% mecaptoethanol, 0.04% bromophenol blue, 4% SDS)와 혼합하여 5분간 끓인 다음 전기영동(100 V, 50 mA)을 행하였다. 전개가 완료된 gel은 Coomassie brilliant blue로 염색 한 후 45% methanol(10% acetic acid 함유)로 탈색하였다. 분자량 표준품으로는 High and low range molecular weight marker(Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)를 사용하였다.

###### ③ Gel filtration chromatography



밀 단백질 가수분해물의 분자량 분포는 Superdex Peptide 10/300 GL column(10 × 300 mm, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)이 장착된 prep-FPLC system(fast protein liquid chromatography; AKTA, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)을 이용하여 분석하였다. 30% acetonitrile를 이동상으로 isocratic 조건에서 유속 0.2 mL/min, 214 nm에서 검출하였다. 분자량 표준품으로 HPLC peptide standard mixture(Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)를 사용하였다.

## (2) 고꾸미 관련 펩타이드 제조조건 확립

### (가) 추출용매 종류 및 농도에 따른 GSH 수율조사

균주(*Candida utilis*)를 YM agar에서 활성화시켜 18시간 전배양한 배양액을 준비하고, 본배양 배지에 1%(v/v)의 농도로 전배양액을 첨가한 후 30°C, 150 rpm에서 36시간 동안 배양하였다. 반응이 끝난 배양액은 1,650 × g에서 10분간 원심분리 후 침전물을 0.85% 생리식염수로 2회 수세하여 얻은 침전물에 대해 알코올과 산(perchloric acid, meta-phosphoric acid)을 처리하여 생성된 glutathione을 회수하였다. 알코올 추출은 침전물에 10 mL의 40% ethanol을 넣어 30°C에서 2시간 교반 후 glutathione을 추출하였다. 가열과정 유무에 따른 산처리는 배양액 20 mL에서 얻은 침전물에 10 mL의 증류수를 가해 100°C에서 10분간 가열한 다음, 10 mL의 5% meta-phosphoric acid 또는 3.3% perchloric acid를 가해 vortex로 강하게 2분간 glutathione을 추출하였다.

### (나) 효소종류/가수시간별 밀 단백질 가수분해물 제조 및 이미 분석

#### ① 가수분해도에 따른 밀 단백질 가수분해물 제조

밀 단백질은 5%(w/v) 농도가 되도록 증류수와 혼합하여 4 M NaOH로 pH를 7.0으로 조절 한 후, 50°C에서 30분 동안 가온 후 가수분해 기질로 사용하였다. 가수분해는 기질 건중량을 기준으로 1%(w/w)의 단백질 분해효소(alcalase, flavourzyme, protamex; Novozymes, Bagsvaerd, Denmark)를 사용하여 50°C에서 1-24시간 동안 실시하였다. 효소반응이 종료된 반응액을 100°C에서 10분간 처리하여 효소를 불활성화한 후 3,000 × g에서 10분간 원심분리하여 얻은 상등액에 대해 가수분해도를 측정하고, 이 후 분석용 시료로 사용하였다. 효소종류/가수분해도별 가수분해물의 가수분해도를 결정하기 위해 trinitrobenzenesulfonic acid(TNBS) 방법을 사용하였다. 1% sodium dodecyl sulfate(SDS)에 녹인 표준물질 및 밀 단백질 가수분해반응액 0.25 mL을 phosphate beffer(pH 8.2) 2 mL에 녹인 후 0.1% TNBS 용액 2 mL을 가하였다. Aluminum foil을 이용하여 빛을 차단하고 50°C에서 1시간 동안 반응 후 0.1 N HCl 4 mL을 가하여 반응을 중지시켰다. 상온에서 30분간 정치 후 UV/visible spectrophotometer(Shimadzu UV-1201, Kyoto, Japan)를 이용하여 340 nm 영역에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 leucine(0-3 mM)의 흡광도를 측정하여 검량선을 구하고, 밀 단백질 가수분해물의 가수분해도(degree of hydrolysis, DH)는 Adler-Nissen의 방법에 따라 다음의 식에 의해 결정하였다.

$$\text{DH (\%)} = \frac{(\text{가수분해에 의해 생성된 } \alpha\text{-amino group의 밀리당량수 (milliequivalents/g)})}{\text{단위무게당 펩타이드 결합 총수(밀의 경우 8.3 milliequivalents/g)}} \times 100$$

h: 가수분해에 의해 생성된  $\alpha$ -amino group의 밀리당량수(milliequivalents/g),  $h_{\text{tot}}$ : 단위무게당 펩타이드 결합 총수(밀의 경우 8.3 milliequivalents/g).

#### (다) 관능검사

##### ① 패널 선정 및 훈련

효소종류별 밀 단백질 가수분해물의 관능평가를 위한 패널은 선택식품(주) 연구원 3명으로 구성하였다. 이들은 단맛(sweet, 5% sucrose solution), 신맛(sour, 0.08% lactic acid solution), 짠맛(salty, 1% sodium chloride solution), 우마미(glutamate-like; umami, 0.3% MSG solution), 쓴맛(bitter, 0.05% caffeine solution)을 기준물질로 6개월간 훈련하였다.

##### ② 시료 준비 및 제시

2 g의 시료를 상온(27±2°C)의 물 100 mL에 용해한 후 30 mL씩을 패널에게 제시하였다. 각 시료의 용기에는 검사물에 대한 편견을 없애기 위하여 난수표에서 추출한 세 자리 숫자를 표기하였으며, 시료 제시는 랜덤하게 하였다. 또한 평가 사이에 입을 헹글 수 있도록 정수기를 통과시킨 상온(27±2°C)의 물을 함께 제시하였다. 향미 특성 평가를 위한 시료는 색의 차이에서 오는 편견을 배제시키기 위하여 개인 검사대의 어두운 적색등 밑에 제시하였고, 외관 특성 평가를 위한 시료는 별도로 준비하고 새로운 번호를 붙여 light box 내 day light(D65)하에서 평가하도록 하였다.

##### ③ 평가 내용 및 절차

18종의 밀 단백질 가수분해물에 대한 종합적인 기호도와 우마미의 강도에 따라 순위를 정한 후, 상위 3가지 샘플에 대하여 관능적 특성 강도를 5점 항목 척도를 사용하여 조사하였다. 검사는 오전 11시와 오후 5시에 실시되었으며 2일에 걸쳐 수행되었다. 실험에 참여하는 관능검사원들에게는 검사 1시간 전부터 물 이외의 음료나 음식물 섭취와 구강세척제 사용을 피하도록 하였고, 향이 진한 화장품의 사용을 금하도록 하였다.

#### (라) 아미노산 조성분석

아미노산 조성은 AccQ-Tag 법을 이용하여 분석하였다. 즉, 시료 0.5g에 증류수를 가하여 초음파처리(sonication)한 용액을 50 mL 취하여 붕산염 완충액(borate buffer) 350 mL와 AccQ-Tag 유도체시약 100 mL을 넣어 잘 혼합한 후 55°C에서 10분간 유도체화 하였다. 유도체화 되어진 시료를 각각 10 mL씩 취한 후 HPLC의 자동시료주입기에 안치하여 분석하였다. 표준물질은 40 mL, 시료용액은 10 mL을 HPLC에 주입하여 아미노산을 분석하였으며, 컬럼

(column)은 AccQ-Tag C<sub>18</sub>(Millipore Co. Milford, MA, USA) 아미노산 분석 컬럼(amino acid analysis column)을 사용하였으며, 이동상은 0.14 M 아세트산 나트륨(sodium acetate)과 10% 트리에틸아민(triethylamine)을 1% 인산 (phosphoric acid) 으로 pH 5.02를 맞춘 용액(eluent A)과 물과 아세토니트릴(acetonitrile)을 4:6으로 혼합한 용액(eluent B)을 선형 구배(linear gradient)로 용출하였다.

**나. 제조조건에 따른 고꾸미/펩타이드 패턴/생리활성 분석**

(1) Glutathione(GSH) 수율 최적화 및 GSH 함량에 따른 고꾸미 및 생리활성 탐색

(가) GSH 수율 최적조건 확립(lab-scale)

균주(*Candida utilis*)를 YM agar에서 활성화시켜 18시간 전배양한 배양액을 준비하고, 본배양 배지에 1%(v/v)의 농도로 전배양액을 첨가한 후 30°C, 150 rpm에서 36시간 동안 배양하였다. 반응이 끝난 배양액은 1,650 × g에서 10분간 원심분리 후 침전물을 0.85% 생리식염수로 2회 수세하여 얻은 침전물에 대해 알코올과 산(perchloric acid, meta-phosphoric acid)을 처리하여 생성된 glutathione을 회수하였다. 알코올 추출은 침전물에 10 mL의 40% ethanol을 넣어 30°C에서 2시간 교반 후 glutathione을 추출하였다. 가열과정 유무에 따른 산처리는 배양액 20 mL에서 얻은 침전물에 10 mL의 증류수를 가해 100°C에서 10분간 가열한 다음, 10 mL의 5% meta-phosphoric acid 또는 3.3% perchloric acid를 가해 vortex로 강하게 2분간 glutathione을 추출하였다.

(나) 효모변이에 따른 GSH 추출물의 고꾸미 관능검사

효모추출물에 대한 묘사분석 패널은 묘사분석에 경험이 있고, 관능검사에 관심과 참여 의지가 있는 샘플식품(주)의 훈련된 관능검사원은 1주일에 3일씩 12주간 훈련시키고, 매회 훈련에 소요된 시간은 평균 1시간이었다. 고꾸미 조미소재의 관능적 특성들에 있어서 유의적인 차이가 있는지 알아보기 위하여 분산분석을 실시하였고, 그 결과에 따라 평균 간에 Duncan’s multiple range test를 수행하였다(α=0.05). 또한 분산분석 결과를 이용하여 spider web을 그렸다. 모든 통계분석은 SPSS for Windows 12.0(SPSS Inc., Chicago, USA)을 사용하였다.

(다) 효모변이에 따른 GSH 추출물의 DPPH 라디컬 소거능

GSH 추출물의 DPPH 라디컬 소거능은 시료용액 2 mL에 0.1 mM DPPH (95% ethanol에 제조) 2 mL을 첨가하여 암실에서 30분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하여 아래 계산식에 따라 DPPH 라디컬 소거능을 측정하였다.

$$\text{Scavenging activity (\%)} = \frac{(\text{Control의 흡광도} - \text{Sample의 흡광도})}{\text{Control의 흡광도}} \times 100$$

## (2) 가수분해 시간에 따른 펩타이드 패턴과 고꾸미 및 생리활성 탐색

### (가) 가수분해 시간에 따른 펩타이드 패턴분석

#### ① Reversed phase HPLC chromatography

밀 단백질 가수분해물의 hydrophobicity 패턴분석은 SunFire™(5 µm, 4.6 × 150 mm, Waters, Milford, MA, USA)이 장착된 HPLC system(Waters, Milford, MA, Ireland)을 이용하여 분석하였다. 이동상으로는 eluent A(0.1% TFA in water)와 eluent B(0.1% TFA in water/acetonitrile(40/60, v/v))를 이용하여 35분 동안 eluent A를 100-0%로 조절하였다. 유속은 1.0 mL/min이었고, 214 nm에서 검출하였다.

#### ② Gel filtration chromatography

밀 단백질 가수분해물의 분자량 분포는 Superdex Peptide 10/300 GL column(10 × 300 mm, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)이 장착된 prep-FPLC system(fast protein liquid chromatography; AKTA, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)을 이용하여 분석하였다. 30% acetonitrile를 이동상으로 isocratic 조건에서 유속 0.2 mL/min, 214 nm에서 검출하였다. 분자량 표준품으로 HPLC peptide standard mixture(Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)를 사용하였다.

### (나) 가수분해 시간에 따른 고꾸미 분석

#### ① 관능검사

치킨콘소메 스프를 기본베이스로 마늘엑기스 분말 5.5 g, 양파엑기스 분말 22.8 g, 치킨엑기스 분 44.8 g, 정제소금 6.5 g, 후추분말 0.4 g, 효소종류/가수분해도별 소재 0.03 g, dextrin 19.97 g 으로 총 100 g으로 배합한 치킨 콘소메 혼합물을 최종 농도 5.3%가 되도록 물에 용해하여 패널에게 제시하여 관능평가 하였다. 효소종류/가수분해도별 시료에 대하여 감칠맛 강도, 신맛, 쓴맛 등의 이미, 이취, 전체적인 기호도 다음 항목을 9점 평가법(약함 1, 강함 9)으로 비교평가 후 가장 좋은 점수를 받은 샘플 선정하였다.

#### ② 미각센서 분석

상업용 치킨콘소메 큐브(Herbox, Hormel food, Austin, MN)를 1% 농도로 제조한 후 효소종류/가수분해도별 시료를 최종 농도 1%가 되도록 첨가하여 미각센서 분석을 수행하였다. 효소종류/가수분해도별 시료의 kokumi는 commercial taste sensing system SA 402(Anritsu Co., Atsugi, Japan)을 이용하여 분석하였다. 시료분석 전에 기기의 probe(lipid membrane 전극이 담겨져 있는 튜브)를 포화된 AgCl/3.3 M KCl 용액으로 채우고, detecting과 reference 전극을 35 mL의 시료용액에 담가 두 종류의 전극 사이에서 나타나는 맛의 차이를 분석하였다.

(다) 가수분해 시간에 따른 생리활성 탐색

① DPPH radical 소거능

밀 단백질 가수분해물의 DPPH 라디칼 소거능은 위와 동일한 방법으로 수행하였다.

② Hydroxyl radical 소거능

Hydroxyl 라디칼 소거능을 측정하기 위해 2-Deoxyribose oxidation method (You, Zhao, Cui, Zhao, & Yang, 2009)를 사용하였다. 10 mM FeSO<sub>4</sub>-EDTA(0.2 mL), 10 mM α- deoxyribose(0.5 mL), 시료용액(0.2 mL), 0.2 M sodium phosphate buffer(pH 7.4, 0.2 mL), 10 mM hydrogen peroxide(0.2 mL)를 혼합 후 37°C에서 1시간 동안 반응하였다. 그 다음에 2.8% trichloroacetic acid(TCA) 1.0 mL과 1.0% thiobarbituric acid(TBA) 1.0 mL를 첨가하여 반응을 멈춘 후에 15분 동안 반응하였다. Ice에 cooling 후 UV/visible spectrophotometer(Shimadzu UV-1201, Kyoto, Japan)를 이용하여 532 nm 영역에서 흡광도를 측정하였다. Hydroxyl radical 소거능은 hydroxyl radicals에 의한 α-deoxyribose oxidation 억제율로써 아래 계산식에 따라 계산되었다(Chung, Osawa, & Kawakishi, 1997).

$$\text{Scavenging activity (\%)} = (1 - \text{control absorbance} / \text{sample absorbance}) \times 100$$

③ Angiotensin-I converting enzyme(ACE) 저해활성

항고혈압 활성의 지표인 ACE의 저해활성은 Cushman과 Cheung(1971)의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉, 시료 50 μL에 기질인 hippuryl-L-histidyl-L-leucine (HHL 25 mg/2.5 mL 0.1 M sodium borate buffer, pH 8.3) 용액 50 μL, 0.4 M NaCl이 함유된 0.1 M sodium borate buffer(pH 8.3) 100 μL를 가한 후 37°C에서 10분간 pre-incubation하였다. 여기에 ACE 조효소액(ACE rabbit lung acetone powder에 10배 가량의 0.1 M sodium borate buffer를 가하여 24시간 교반 후 15,000×g에서 1시간 원심분리한 상층액) 50 μL를 가하고 37°C에서 30분간 반응 후, 1 N HCl 250 μL를 넣어 반응을 정지시켰다. 대조군은 시료용액 대신 증류수를 사용하였으며, 공시료는 1 N HCl을 먼저 가한 후 ACE 조효소액을 가하였다. 여기에 ethyl acetate 1.5 mL를 가하여 15초간 교반한 후 원심분리(3,290×g, 10min)하여 상층액 1 mL를 취하였다. 상층액은 100°C에서 40분 동안 완전히 건조시킨 후, 증류수 1 mL를 가하여 용해시켜 228 nm에서 흡광도를 측정하여 아래 계산식에 따라 ACE 저해율(%)을 나타내었다.

$$\text{ACE inhibitory activity (\%)} = 1 - \left[ \frac{S - SB}{C - B} \right] \times 100$$

S : Sample의 흡광도

SB : Sample blank(HCl에 의한 반응정지 후 효소를 넣은 군)의 흡광도

C : Control(Sample 대신 증류수를 넣은 군)의 흡광도

B : Blank의 흡광도

### (3) 단백질 가수분해물(A24h)로부터 고꾸미 펩타이드 정제

A1h, A24h, F1h, F24h, P1h, P24h에 대해서 고꾸미 발현에 대한 관능분석을 실행하였다. 밀 단백질 가수분해물 중 A24h에서 고꾸미와 전체적인 기호도면에서 가장 높은 점수를 받았다. 우수한 관능특성을 보인 A24h에 대하여 고꾸미 펩타이드 정제에 따른 특성분석을 진행하였다.

#### (가) 고꾸미 펩타이드 정제에 따른 펩타이드 패턴분석

정제별 밀 단백질 가수분해물의 hydrophobicity 패턴분석은 SunFire<sup>TM</sup>(5 µm, 4.6 × 150 mm, Waters, Milford, MA, USA)이 장착된 HPLC system(Waters, Milford, MA, Ireland)을 이용하여 분석하였다. 이동상으로는 eluent A(0.1% TFA in water)와 eluent B(0.1% TFA in water/acetonitrile (40/60, v/v))를 이용하여 35분 동안 eluent A를 100-0%로 조절하였다. 유속은 1.0 mL/min이었고, 214 nm에서 검출하였다.

#### (나) 한외 여과법(Ultrafiltration)

우수한 관능특성을 보인 A24h는 ultrafiltration cell(Amicon Co., Beverly, MA, USA)을 이용하여 한외여과하였다. Ultrafiltration membrane은 YM-1(MWCO; 1,000; Amicon Co., Beverly, MA, USA)을 사용하여 2개의 fraction(1 kDa 이상, 1 kDa 이하)을 얻어 동결건조한 후 각각의 kokumi 관능검사 및 항산화(DPPH 라디칼 소거능)활성을 측정하였다. 고꾸미가 가장 높은 fraction은 -70°C에 보관하면서 다음 정제에 사용하였다.

#### (다) Reversed phase HPLC chromatography

한외여과에서 얻은 시료 중 고꾸미가 가장 높은 fraction을 Grace Vaydac Protein & Peptide C<sub>18</sub>column(10µm, 22.0×250 mm; W.R. Grace & Co. Conn., MA, USA)이 장착된 HPLC system(Waters Co., Milford, MA, Ireland)을 이용하여 분리 정제하였다. 이동상은 Acetonitrile(0-36%)과 Water(100-64%)를 linear gradient로 10 mL/min의 속도로 용출하였다. Fraction은 0.2 µm membrane filter로 여과하여 3 mL씩 30분간 분석하여 얻은 peak fraction에 대해 동결건조한 후 고꾸미 관능검사 및 DPPH 라디칼 소거능을 측정하였다.

#### (라) 관능검사에 따른 고꾸미 분석

정제별 밀 단백질 가수분해물의 관능평가를 위한 패널은 단맛(sweet, 5% sucrose solution), 신맛(sour, 0.08% lactic acid solution), 짠맛(salty, 1% sodium chloride solution), 우마미(glutamate-like; umami, 0.3% MSG solution), 쓴맛(bitter, 0.05% caffeine solution)을 기준물질로 6개월간 훈련하였다. 또한 고꾸미 훈련을 위해 기준물질로 chicken broth와 pH 6.5조절된 chicken broth에 Koji-Aji가 0.3%되도록 하여 훈련하였다. 정제별 밀 단백질 가수분해물들에 대하여 우마미, 고꾸미, 쓴맛, 전체적인 기호도 항목을 9점 평가법(약함 1, 강함 9)으로 비교평가 후 가장 좋은 점수를 받은 샘플 선정하였다.

(마) 아미노산 조성

정제별 밀 단백질 가수분해물의 아미노산 조성 분석은 위와 동일한 방법으로 수행하였다.

(4) 정제별 밀 단백질 가수분해물의 항산화 활성 측정

(가) DPPH 라디칼 소거능

정제별 밀 단백질 가수분해물의 DPPH 라디칼 소거능은 위와 동일한 방법으로 수행하였다.

(5) 가공조건에 따른 고꾸미 펩타이드 패턴분석

(가) Reversed phase HPLC chromatography

밀 단백질가수분해물 A24h의 pH와 열처리에 따른 펩타이드 패턴 분석은 위와 동일한 방법(나(2)(가))으로 수행하였다.

(나) A24h의 pH와 열처리에 따른 항산화 활성

① A24h의 pH에 따른 DPPH 라디칼 소거능

pH와 열처리에 따른 단백질의 변성이 DPPH 라디칼 소거능에 미치는 영향을 조사하기 위하여 밀 단백질가수분해물 A24h의 시료를 pH 4.0, 7.0, 9.0 용액에 2%(w/v)의 농도로 제조한 시료와 변성처리 하지 않은 A24h(pH 5.0)을 실온에서 한 시간 동안 반응시켜 변성도가 다른 시료를 준비하였다. 변성이 유도된 시료용액을 원심분리(8,000 X g, 20분)하여 얻은 상등액은 centrifugal vacuum concentrator를 이용하여 감압 농축한 후 DPPH 라디칼 소거능을 측정하였다.

② A24h의 열처리에 따른 DPPH 라디칼 소거능

가열에 따른 활성변화는 2%(w/v, pH 5.0)의 농도로 제조한 시료용액을 60, 80, 100℃에서 10분간 가열한 후 pH 변성과 동일한 방법으로 DPPH 라디칼 소거능을 측정하였다.

(6) 시제품 펩타이드 패턴분석 및 가공조건 보완

(가) Reversed phase HPLC chromatography

시제품의 펩타이드 패턴 분석은 위와 동일한 방법(나(2)(가))으로 수행하였다.

(나) DPPH 라디칼 소거능

시제품의 DPPH 라디칼 소거능은 위와 동일한 방법으로 수행하였다.

## 2. 결과 및 고찰

### 가. 고꾸미 제조를 위한 펩타이드 분석법 탐색 및 가수조건 확립

#### (1) 고꾸미 관련 펩타이드 분석법 확립

##### (가) 기존 glutathione 분석법의 장단점 검토

Reduced glutathione(GSH,  $\gamma$ -L-glutamyl-L-cysteinylglycine)과 효소적/비효소적 산화과정에서 생성된 GSHdisulfide(GSSG) 및 관련 화합물은 non-separative methods와 separative methods에 의해 분석할 수 있다. Non-separative methods는 GSH 분석을 위한 가장 손쉽고 용이한 방법이지만 GSH과 그 유도체를 분리하여 분석할 수 없고, 시료회수나 전처리 등에서 표준화된 방법이 부족하다는 것이 단점이다. 반면 separative methods는 HPLC, GC 및 CE 등의 기기분석법으로 이중에서 HPLC와 CE를 이용하는 방법이 가장 정확하고 재현성이 높다. 그러나 시료회수 과정이나 저장 및 분석과정 중의 GSH 변화 등으로 인해 분석값에 대한 오차가 발생할 수 있다.

GSH 분석에서 가장 큰 단점은 쉽게 자동산화가 되고,  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase( $\gamma$ -GT)에 의해 쉽게 분해된다는 점이다. 특히 혈장에서의 GSH는 pH 7.0 이상에서 비효소적으로 빠르게 산화되어 GSSG의 형태로 전환되기 때문에 pH 7.0 이하를 유지하는 것이 중요하다. 또한 시료 준비 과정에서 쉽게 산화가 이루어지는 thiol compound는 HCl, diethylenetriaminepentaacetic acid, ascorbic acid 10 mM로 구성된 redox quenching buffer를 사용함으로써 thiol group의 산화를 방지할 수 있다. 따라서 시료의 산화에 따른 GSH 분석오차를 최소화하기 위해 다음과 같은 사항을 유의해야 한다.

① 혈액이나 혈장 내 시료는 시료채취 과정에서 적혈구 용혈현상 방지

② 총 GSH과 관련 저분자 aminothiols(ATs) 함량은 생체 내 용액이나 세포에 현존하는 disulfide 관련인자를 제거(enzymatic reaction, electrolysis, chemical reaction 등)한 후 분석

③ 생물학적 시료에 다량 존재하는 단백질은 HPLC나 CE 분석에서 컬럼 벽면에 부착되어 이동 시간, 피크모양, 재현성, 분석 목적물질의 감지 정도 등에 영향을 주기에 시료준비 과정에서 반드시 제거(acidification, addition of organic solvent, ultrafiltration 등)할 것 등이 있다. 특히 유기용매를 이용한 침전법은 GSH 자동산화를 유발할 수 있고, 산을 이용하는 방법은 매우 효과적이지만 분석 전 pH를 9.0 이상으로 유지시켜야만 한다는 단점이 있다. 따라서 pore dimension에 기초한 filter를 사용하는 방법이 가장 타당하다고 할 수 있다.

④ GSH와 GSSG의 구조가 흡광이나 형광성을 많이 띠지 않아 유도체화를 시키는 것이 좀 더 정확한 분석결과를 도출할 수 있다. 유도체화에 사용하는 labeling reagent는 검출에 민감하며, 특이성이 있어야 하고, 주요 구조에 영향을 미치지 않는 물질이어야 한다. GSH 및 GSSG는 각각 carboxylic, amino, thiol functional group 및 amino, carboxylic group 이 유도체화의 대상이 되며, 주로 사용되는 시약의 종류와 특징은 Table 63과 같다



Table 63. Characteristics of the labeling reagents used in GSH derivatization

시약	장단점
N-ethylmaleimide (NEM), monoiodoacetic acid (MIAA)	Thiol group 보호와 정확한 UV 검출을 위한 가장 일반적인 시약으로, NEM은 thiol group이 maleimide의 이중결합과 교차되는 반응, MIAA는 nucleophilic substitution에 따른 S-carboxymethyl (CM) 유도체 생성반응으로 GSH의 자동산화 방지의 우수성 보유
5',5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB)	Pre-column 반응에서 GSH이나 다른 thiol compound와 반응하여 UV-검출을 용이하게 하는 adduct를 형성함으로써 이용성이 넓음
O-Phtalaldehyde (OPA)	GSH이나 관련 aminothiols compound와 반응하여 형광성 adduct를 형성하므로 형광검출기 사용 시 일반적으로 사용함
Monobromobimane (BrB)	Thiol functional group에 대한 특이성으로, 높은 형광감도를 갖는 BrB-thiol adduct를 형성하여 낮은 농도( $2 \times 10^{-8}$ M) 분석도 가능
Fluorobenzofurazane derivatives (SBD-/ABD-/DBD-F)	Thiol group에 대한 강한 특이성으로, 형광생성물이 안정하고 분석 peak에 영향을 주지 않음. 특히 ABD-F는 mild condition에서 빠른 정량분석이 가능
ThioGloTM3	Maleimide 반응성을 보이는 새로운 물질로 thiol group에 대해 강한 특이성을 보이며, GSH 및 congeners와 형광물질을 형성
N-Hydroxysuccinimidyl-acetate derivatives (HSAA, HSM-PA)	Primary amino group에 대한 특이성을 보여 아미노산이나 oligopeptide의 선택적 분석에 사용

(나) GSH(GSH) 분석법 비교

① Non-separative techniques

Non-separative 방법은 spectrophotometry, spectrofluorimetry, amperometry 등을 사용하는 것으로 방법이 간단하고, 비용이 저렴하며, 높은 민감도를 보이지만 특이성과 선택성이 낮은 것이 단점이다(Table 64). Non-separative 방법 중 DTNB를 이용하여 GSSG에 대한 GSH의 산화에 기초한 kinetic reaction을 이용하여 총 GSH 함량을 구하는 방법은 가장 광범위하게 사용할 수 있다.

Table 64. Non-separative methods for the analysis of GSH

종류	원리	장단점	참고 문헌
Spectrophotometric assay	Alloxan reagent, DTNB 등을 이용하여 GSSG로 환원된 GSH의 양을 305 nm에서 발색시켜 정량	-장점: 경제적, 방법 단순, 높은 정확성	1
Spectrofluorimetric assay	5-maleimidyl-2-(m-methylphenyl)-benzoxazole을 이용하여 thiol group을 유도체화	-단점: 낮은 특이성과 선택성	2

## ② Chromatographic methods

### ㉠ Thin-layer chromatography methods(TLC)

GSH와 5-(penta-fluorobenzoylamino)-fluorescein(PFB-F)의 선택적 형광반응에 기초하여 TLC에서 전개된 spot을 일정 파장에서의 scanner detection을 이용하여 HPLC보다 빠르고 여러 종류의 시료를 동시에 분석할 수 있다.

### ㉡ High-performance liquid chromatography methods(HPLC)

GSH 및 관련 화합물은 다양한 detector(UV-Vis, diode array, electrochemical, and mass spectrometry)를 이용하여 분석할 수 있으며, 이 때 고정상으로는 octa-decylsilica gel(ODS)을 가장 많이 사용한다. 일반적으로 GSH의 형광물질을 이용한 유도체화로 소수성기를 강화시켜 역상시스템에서 분석을 한다. 그러나 용매에 산을 첨가함으로써 유도체화 과정 없이 역상을 이용하여 분석하는 방법들도 다양하게 보고되고 있다. 이는 용매에 산을 첨가함으로써 GSH, GSSG 및 관련 화합물들의 영김 현상을 방지하고, thiol group의 자동산화도 최소화할 수 있다. 현재까지 보고된 시료별 HPLC 분석조건과 관련문헌은 Table 65에 정리되었다.

Table 65. HPLC methods for the analysis of GSH, GSSG, and related compounds

시료	컬럼	검출기	참고문헌
Blood	LiChrospher 100 NH <sub>2</sub>	UV-Vis	3-18
	Nucleosil C <sub>18</sub>	FD 370nm/470nm	
	3-Aminopropyl	FD 335nm/515nm	
	Ultrasphere ODS	FD 300nm/470nm	
	Hypersil ODS	ECD	
	Nucleosil-100 OH	ESI-MS	
Flour	Spherisorb amino bonded silica	UV-Vis	19
Organ	Econosphere C <sub>18</sub>	ECD	20-27
	Hypersil ODS	ECD	
	Ultrasphere ODS	FD 303/470nm	
	Spherisorb C	FD 385/435nm	
	Alima C <sub>18</sub>	ESI-MS/MS	
Pharmaceuti c	Hypersil 5 ODS	UV-Vis	28
Saliva	HILIC silica	LC-MS	29
Tissue, cell	Spherisorb 5 ODS 2	UV-Vis 412nm	30-41
	Rainin Dynamax C <sub>18</sub>	UV-Vis 365nm	
	Ultrasphere ODS	FD 310/390nm	
	Hamilton PRP-X 110S	ESI-MS/MS	
	Nucleosil-100 OH	ESI-MS	
Urine	Cosmosil 5 C <sub>18</sub> AR	FD 386/516nm	42-43
	Zorbax C <sub>8</sub>	ECD	
Yeast	Amine	LC-Radiolabeling	44-45

㉔ Gas chromatography methods

GC system으로 분석하기 위해서는 적절하게 끓는 점을 낮추는 것이 요구되기 때문에 유도화 과정이 필요하며 일반적으로 GSH 및 관련 화합물 분석에서의 응용은 제한적이다.

㉕ Capillary eletrophoresis methods

Capillary electrophoresis(CE)는 유기 및 무기화합물, peptide, protein, nucleotide, sugar, drug, herbicide 등 여러 종류의 시료분석에 다양하게 이용할 수 있다. CE 분석은 경제적이고 기기 오염에 따른 분석치 오차발생 위험도가 낮지만, 아주 소량의 시료를 이용해야 하는 점에서 상당한 수준의 기술과 민감도를 요구한다. CE 기기의 종류로는 free zone capillary electrophoresis(CZE), micellar electrokinetic chromatography(MEKC), isotachopheresis(ITP), capillary gel electrophoresis(CGE), capillary electrochromatography(CEC) 등이 있다. 소량의 시료분석에 따른 CE 분석오차를 감소시키기 위해서는 1) extended path length를 갖는 capillary

장착(bubble- or zeta-shaped cell), 2) 민감도가 높은 검출기 사용 (multi-wavelength and DAD, conductivity, laser-induced fluorescence, MS), 3) two-dimensional CE 사용(ITP coupled to CZE, ITP-CZE), 4) 시료의 유도체화 등을 통해 분석오류를 최소화할 수 있다.

이상과 같이 많은 연구자들이 다양한 시료로부터 GSH 및 관련 화합물의 정량, 정성 및 대사물 등의 분석법을 개발하고 여러 가지 분석기기 및 검출기의 조합을 통해 분석법을 발전시켜 왔다. 따라서 본 연구에서 목적으로 하는 효모 및 고구미 제품 내 GSH 및 관련 화합물 분석 시 권장되는 분석법은 총 GSH 함량을 분석하고자 하는 경우에는 non-separative methods 중 alloxan reagent를 이용한 spectrophotometric assay, GSH와 GSSG 등 유사물질을 동시에 분석하고자 할 때는 photometric detector가 장착된 HPLC를 이용하는 것이 적합하다고 평가된다.

③ GSH분석

㉞ Alloxan reagent method

GSH분석을 위해 사용되는 방법 중 가장 간편하고 다용되는 방법인 alloxan reagent를 이용한 분석법을 진행하였다. 0-200 uM 농도의 GSH표준품을 이용하여 작성한 표준곡선은 Fig. 55와 같이 0.99의 결정계수를 보였다. 또한 다양한 농도의 GSH용액을 제조하여 표준곡선에 대입한 결과 오차범위 내에서 동일 농도를 보였다.

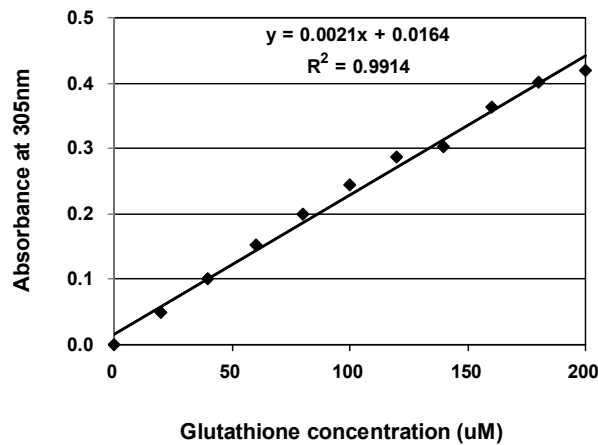


Fig. 1. Standard curve of GSH obtained by alloxan reagent method.

㉟ HPLC method

GSH분석법 확립을 위해 위에서 언급한 alloxan reagent법과 HPLC를 이용한 분석법을 비교하였다. 0-5 mM 농도의 GSH표준품을 이용하여 작성한 표준곡선은 Fig. 56과 같이 1.00의 결정계수를 보였다.

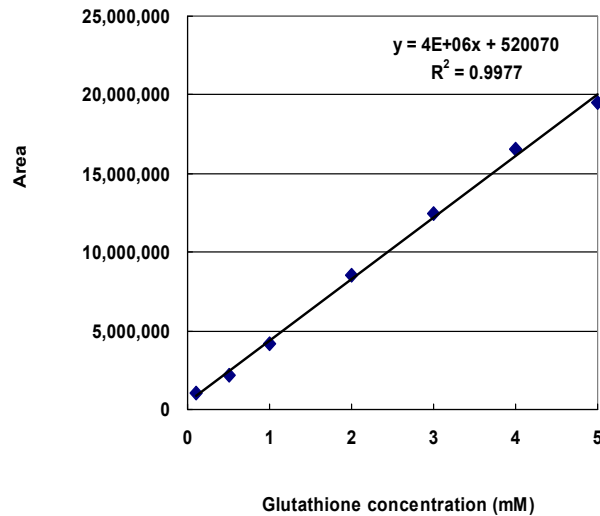


Fig. 56. Standard curve of GSH obtained by HPLC method.

다양한 농도(1-5 mM)의 GSH 용액을 제조하여 얻은 chromatogram은 Fig. 57과 같이 동일한 분석시간대에 용출됨을 확인하였다. 또한 chromatogram의 area값을 표준곡선에 대입한 결과 오차범위 내에서 동일 농도를 보였다.

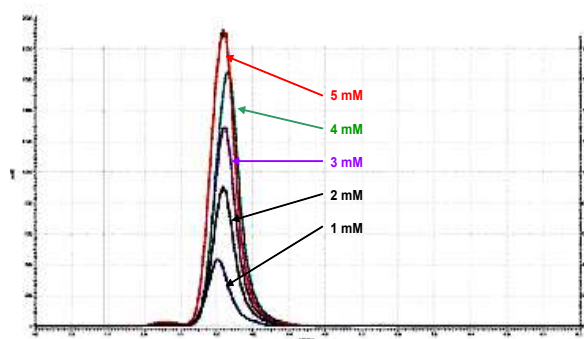


Fig. 57. GSH analysis using HPLC method.

(다) SDS-PAGE를 이용한 분자량 패턴 분석

가교제 농도 및 cross linking 비율에 따른 다양한 분자량별 전개 특성분석은 3.5-116 kDa의 분자량 표준품 11종을 이용하여 다양한 가교제 농도 및 cross linking 비율에 따른 전기영동을 수행하여 조사하였다. 가교제 농도 12%와 15%의 경우에는 6.5 kDa, 16.5%와 20%의 경우에는 3.5 kDa의 이동거리를 기준으로 Fig. 58과 같은 calibration curve를 얻었다. Calibration curve는 가교제 농도와 cross linking 비율이 증가함에 따라 shift down 되었으며, 모든 gel 조건에서 14.4 kDa의 분자량을 기준으로 직선의 기울기가 급격하게 증가하는 것을 알 수 있었다. 또한 가교제 농도 12%와 15%의 경우에는 14.4-36 kDa, 16.5%와 20%의 경우에는 14.4-26.6 kDa의 범위를 갖는 분자량 분석에 가장 적합하였다. 따라서 본 연구결과를 토대로 3.5-116 kDa의 분자량 범위에서 목적으로 하는 분자량에 따라 적합한 gel 조건을 선택할 수 있을 것이다.

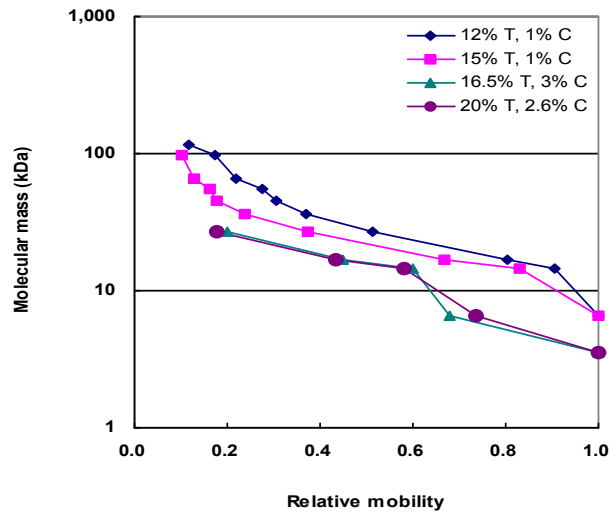


Fig. 58. Calibration curves for different types of separating gels.

Fig. 59는 Fig. 58의 calibration curve에 의해 설명된 gel type에 대한 분자량별 표준품의 전개도를 나타낸다. 3.5-116 kDa의 분자량 표준품을 이용하여 4가지 종류의 가교제 농도 (12-20% T) 및 cross linking 비율별(1-3% C) 조성에 따른 분석결과, 가교제 농도와 cross linking 비율이 증가할수록 저분자 물질까지 분석이 가능함을 알 수 있었다. 또한 가교제 농도가 15% 이상, cross linking 비율이 3%로 증가하면 30 kDa 이상의 분자량은 분석이 불가능하였다. 이는 가교제 농도와 cross linking 비율이 증가하면서 미세통로의 크기가 작아져 고분자 물질 통과가 어려워지면서 저분자 물질의 분리도가 증가하는 것이다.

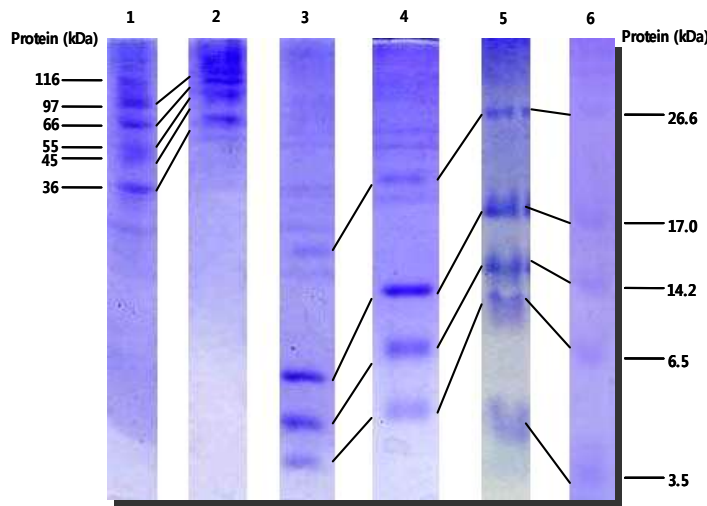


Fig. 59. Separation of standard proteins on the four gel types, characterized by the calibration curves in Fig. 4. Lane 1, 12% T, 1% C; Lane 2, 15% T, 1% C for high molecular weight; Lane 3, 12% T, 1% C; Lane 4, 15% T, 1% C; Lane 5, 16.5% T, 3% C; Lane 6, 20% T, 2.6% for low molecular weight.

일반적으로 전기영동 분석에서 전개가 가능한 분자량 범위와 gel 조성이 알려져 있으나, 실험상에서 가능한 분자량 범위는 차이가 있다고 보고되어 있다. Table 66는 gel type에 따라 분석이 가능한 분자량의 이론과 실험상에서의 범위를 나타낸다. 가교제 농도와 cross linking 비율이 증가함에 따라 1-116 kDa까지 분석이 가능하지만 실험상에서 전개 가능한 최소 분자량은 3.5 kDa으로 나타났다. 또한 16.5% 이상에서는 26.6 kDa 이상의 분자량 범위는 전개된 밴드가 너무 겹쳐짐으로써 정확한 분석이 어려운 것을 알 수 있었다. 따라서 이상의 결과로부터 목적하는 분자량 범위에 적합한 가교제 농도와 비율을 선정할 수 있다.

Table 66. Separating gel types and target molecular mass

Gel type	Target molecular mass (kDa)	
	Theory	Experiment
12% T, 1% C	17-116	17-116
15% T, 1% C	10-60	17-55
16.5% T, 3% C	1-70	3.5-26.6
20% T, 2.6% C	1-55	3.5-26.6

(2) Target제품 분석 및 가수분해물의 펩타이드 패턴분석

(가) GSH 함량

① GSH 함량

Alloxan reagent법을 이용하여 본 연구의 target 제품인 아지노모토사의 Koji-Aji와 교와의 BS-300에 함유되어 있는 GSH 함량을 분석한 결과, Koji-Aji는 0.27%, BS-100은 0.20%로 Koji-Aji 내 GSH 함량이 다소 높은 것으로 조사되었다. 따라서 효모 추출물을 20% 정도 함유하고 있는 것으로 알려진 Koji-Aji는 다량의 효모 추출물로부터 GSH이 유래되었을 것으로 평가된다.

② 펩타이드 패턴 및 함량

본 연구의 개발소재인 고꾸미는 본 연구의 target 제품인 아지노모토사의 Koji-Aji와 교와의 BS-100을 구성하는 펩타이드의 특성을 조사하고자 chromatography와 SDS-PAGE법을 이용하여 펩타이드 패턴을 분석하였다. Koji-Aji와 BS-100의 hydrophobicity에 따른 HPLC profile 결과는 Fig. 60과 같이 chromatogram이 15분 안에 분석됨으로써 more hydrophilic하거나 amphipathic한 특성의 펩타이드가 주를 이룸을 알 수 있었다.

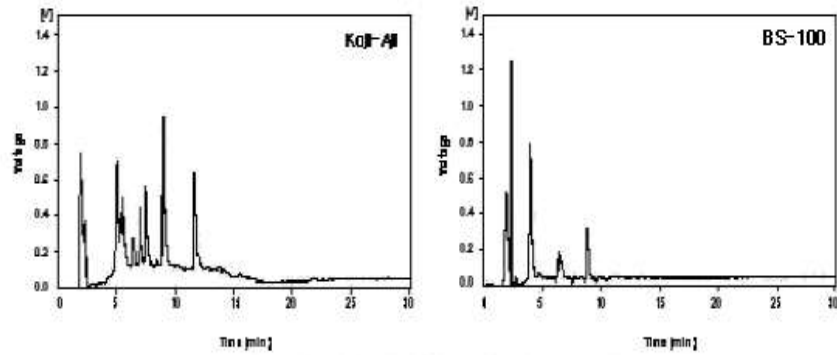


Fig. 60. Reversed-phase HPLC chromatograms of target products (Koji-Aji and BS-100) and wheat protein hydrolysate after 24 h of incubation with flavourzyme.

Koji-Aji와 BS-100의 분자량 패턴은 gel filtration column과 SDS-PAGE를 이용하여 분석하였다. 본 연구에서 사용한 Superdex Peptide 10/300 GL column의 분석가능한 분자량 범위는 200-7,000 Da으로, Koji-Aji와 BS-100 모두 저분자의 펩타이드로 구성되어 있음을 알 수 있다 (Fig. 61). 특히 Koji-Aji는 50-60분대에 peak가 용출되어 200 Da 이하의 아미노산도 함유되어 있을 것으로 예상된다. 한편 Koji-Aji와 BS-100의 SDS-PAGE profile 분석결과, 3.5 kDa보다 적은 분자량을 갖는 펩타이드로 구성되어 있음을 알 수 있었다(전개 가능한 최소 분자량 범위 이하로 밴드형성이 불가함). 이상과 같이, 본 연구의 target 제품인 Koji-Aji와 BS-100은 주로 저분자의 친수성 펩타이드로 구성됨을 알 수 있었다.

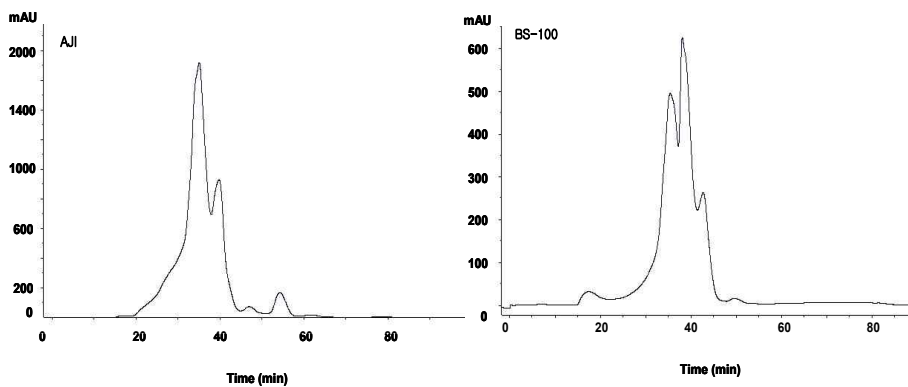


Fig. 61. Size exclusion chromatograms of target products and wheat protein hydrolysate after 24 h of incubation with flavourzyme.

#### 나. 고꾸미 관련 펩타이드 제조조건 확립

(1) 고 glutathione(GSH)추출조건 확립

(가) 추출용매 종류 및 농도에 따른 GSH 수율조사



Glutathione(GSH)은 효모 발효과정에서 생성되어 세포 내에 축적되는데 산화적 스트레스, 해독과정 및 관련 질환 등과 연관되는 주요 항산화 물질이다. 따라서 세포 내 축적된 GSH을 효과적으로 추출하는 방법을 확립하는 것이 필요하다. 본 연구에서는 40% 에탄올 및 산을 이용하여 *Candida utilis* 세포 내에 축적된 GSH 추출에 적합한 방법을 조사하였다.

효모로부터 GSH을 추출하는 방법을 에탄올과 산을 이용하여 수행한 결과, 산 처리의 수율과 함량이 매우 낮아 전처리 방법으로 가열을 병행하였다. Table 67과 같이 추출방법에 따라 GSH 수율과 함량에 차이가 있으며, 수율은 가열 후 meta-phosphoric acid 추출이 10.58 g/L, 함량은 40% 에탄올 추출에서 1.23%로 가장 높게 나왔다. 효모 배양액 1L로부터 얻을 수 있는 GSH 함량을 계산한 결과, 40% 에탄올 추출은 72 mg, 가열 후 meta-phosphoric acid 추출은 56 mg, 가열 후 perchloric acid 추출은 60 mg으로 나타났다. 일반적으로 세포 내 GSH 추출은 산화반응을 최소화하면서 세포 균질화에 따른 단백질 침전을 기본으로 이루어진다. 따라서 40% 에탄올을 사용하는 방법이 산을 이용하는 방법보다 단백질 침전에 효과적임을 확인했다.

Table 67. GSH yield and content in *Candida utilis* extract as a function of various extraction methods

Extraction method	GSH yield (g/L)	GSH content (%)	mg GSH/4
40% Ethanol	5.87	1.23	72.00
5% Meta-phosphoric acid + boiling	10.58	0.53	55.85
3.3% Perchloric acid + boiling	8.78	0.68	59.64

(2) 효소종류에 따른 가수분해도(DH) 측정

본 연구에서는 food grade 상업용 효소인 alcalase(EC 3.4.21.62), flavourzyme(EC 3.4.11.1), protamex(EC 3.4.24.28)를 선정하여 밀 단백질 가수분해물 제조에 사용하였다. 가수분해에 사용한 효소농도는 기질 건중량 대비로 각각 1-3% (w/w)로 첨가하여 24시간 동안 50°C 에서 가수분해를 진행하면서 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24시간에 시료를 취해 분석하였다.

밀 단백질은 3가지 종류의 효소와 3가지 농도범위에서 모두 시간이 증가함에 따라 가수분해도가 증가하면서 반응 1시간 이내에 급격하게 가수분해 되는 전형적인 hydrolysis curve를 보였다(Fig. 62). 또한 alcalase는 8시간, flavourzyme과 protamex는 12시간 이내에 가수분해가 완료되는 것을 알 수 있었다. 이와 같이 효소적 가수분해 속도가 반응시간이 증가함에 따라 감소하는 것은 효소가 반응할 수 있는 특이적 결합들이 분해되면서 생성된 반응물이 저해제로 작용함에 따라 효소가 불활성화된 것을 알 수 있다. 또한 반응 초기에는 효소가 불용성 단백질 표면에 흡착되어 느슨하게 결합된 polypeptide 결합을 분해하다가, 이 후에는 강하게 결합된 peptide 결합에 작용하게 되므로 반응속도가 감소하게 된다.

밀 단백질은 24시간 가수분해 후 alcalase, flavourzyme, protamex의 경우 각각 25.6-26.5%, 53.8-56.5%, 36.2-41.1%의 가수분해도를 나타내었다. 모든 효소에서 기질에 대한 효소농도가

증가할수록 가수분해도도 증가함을 나타내었으나, 농도 간 유의적인 차이를 나타내지는 않았다.

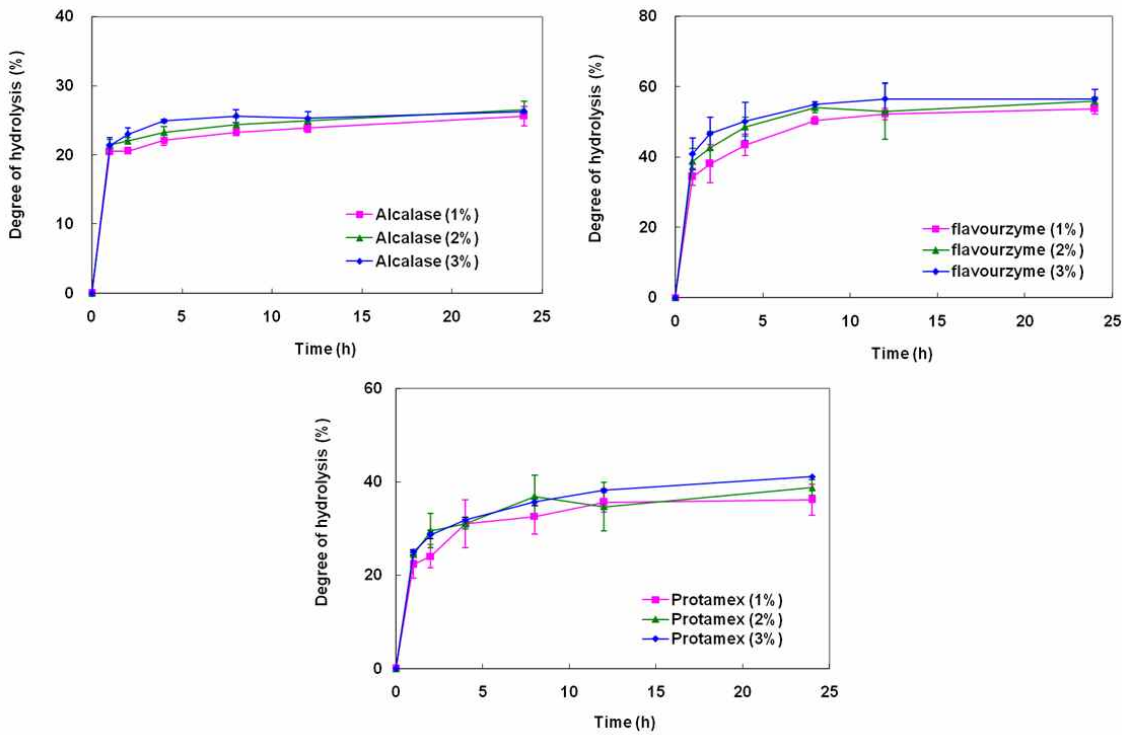


Fig. 62. Enzymatic hydrolysis of wheat protein isolate with alcalase, flavourzyme, and protamex at different enzyme concentrations.

따라서, 동일 효소농도 1%에서 효소종류에 따른 밀 단백질의 가수분해 패턴을 비교한 결과, Fig. 63에서와 같이 효소종류에 있어서는 flavourzyme이 가장 높은 가수분해도를 보였다. 이러한 결과는 flavourzyme이 다른 효소보다 밀 단백질의 peptide bond를 분해하는데 효과적임을 나타낸다. flavourzyme은 endo와 exopeptidase의 특성을 보유한 효소로 polypeptide를 oligopeptide로 분해함과 동시에 이로 인해 노출된 아미노산 잔기로부터 아미노산을 유리시키는 작용기작을 보임으로써 endoprotease인 alcalase나 protamex보다 높은 가수분해도를 나타내는 것으로 보인다. 이후, 효소적 가수분해 시간을 조절함으로써 가수분해도가 다양한 밀 단백질 가수분해물을 제조하여 관능검사 실험에 사용하였다.

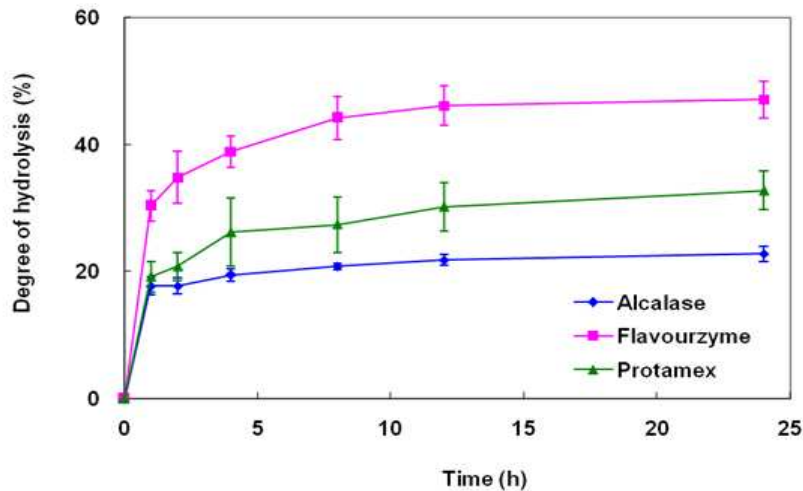


Fig. 63. Hydrolysis curve of wheat protein isolate treated with different proteases at 1:100 (w/w) enzyme/substrate.

### (3) 가수분해도에 따른 이미 분석

#### (가) 관능검사

상업용 효소 3종(alcalase, flavourzyme, protamex)을 이용하여 제조한 밀 단백질 가수분해물 18종에 대해서 이미 분석을 행하였으며, 이 후 가수분해물은 효소명과 가수시간을 기준으로 표시하였다(예: alcalase를 이용하여 1시간 동안 가수분해된 시료는 A1h). 밀 단백질 가수분해물의 이미는 A24h < F24h < P24h < F12h < F8h < P12h < A12h < P8h < A8h < F4h < F2h < A4h < A2h < P4h < F1h < P2h < A1h < P1h 순으로써 alcalase를 이용하여 24시간 가수분해한 경우 관능검사에서 이미가 가장 낮게 감지되었다. alcalase, flavourzyme, protamex를 이용하여 24시간 동안 가수분해된 밀 단백질의 가수분해도와 소수성 아미노산 함량과의 상관성을 분석한 결과 (Fig. 64), flavourzyme과 protamex에 의해 가수분해된 밀 단백질들은  $R^2 = 0.76, 0.53$ 의 높은 상관관계를 나타내었다. 이들은 가수분해도가 증가함에 따라 쓴맛을 부여하는 소수성 아미노산 함량이 증가함을 나타내었다. 그러나 alcalase에 의해 가수분해된 밀 단백질 가수분해물들은 가수분해도와 소수성 아미노산 함량과 아무런 상관성을 보이지 않았다. 가수분해물의 이미 특성은 효소종류와 소수성 아미노산에 의한 영향을 받으며, 동일 효소 내에서는 가수시간이 증가함에 따라 향상됨을 알 수 있었다. 따라서 alcalase를 이용하여 24시간동안 가수를 진행하였을 경우 가장 이미 이취를 감소시킬 수 있음을 알 수 있었다.

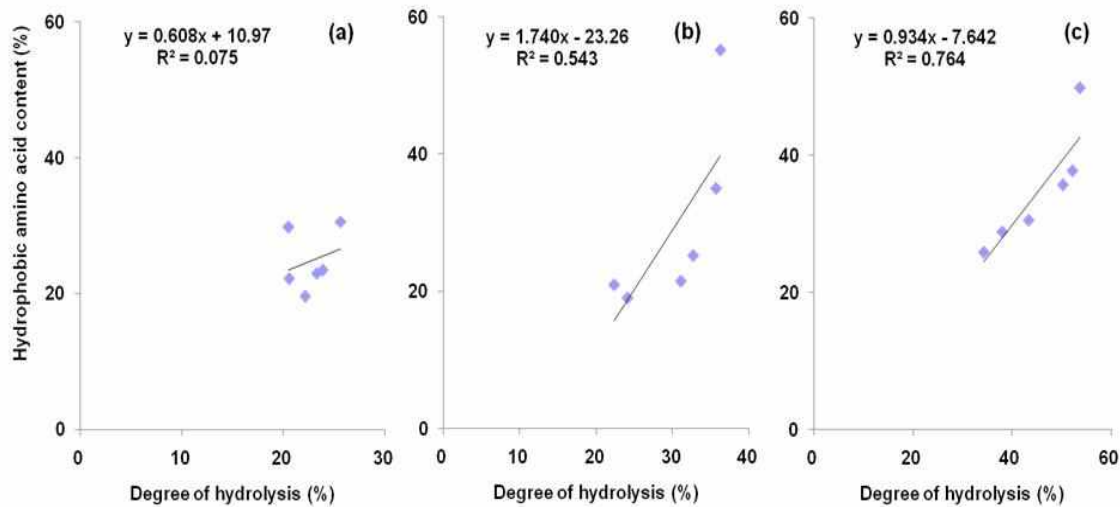


Fig. 64. Relationships between degree of hydrolysis and hydrophobic amino acid content of wheat protein hydrolysates with the use of alcalase (a), flavourzyme (b), or protamex (c)

(나) 아미노산 조성분석

밀 단백질 가수분해물의 아미노산 조성은 Table 68과 같다. 우리밀 단백질의 주요 아미노산은 glutamic acid, valine, leucine, histidine으로, 가수분해가 진행됨에 따라 glutamic acid와 leucine은 증가하고, valine 함량은 감소하는 경향을 보였다. 특히 3가지 종류의 효소를 이용하여 24시간까지 가수분해를 진행한 결과, free glutamic acid 함량이 alcalase는 2배, flavourzyme은 2.7배까지 증가하였다. Free glutamic acid는 우마미와 고꾸미를 부여함에 있어 중요한 성분으로 알려져 있다. 특히, alcalase를 이용하여 24시간 가수분해한 경우 관능검사에서 이미가 가장 낮게 감지되었는데, 펩타이드의 쓴맛을 부여하는 소수성 아미노산(Val, Met, Ile, Leu, Phe, His, Arg)의 비율이 flavourzyme과 protamex에 비하여 낮음을 알 수 있었다.

Table 68. Free amino acid composition of wheat protein hydrolysates

Sample <sup>1)</sup>	WP	A1	A2	A4	A8	A12	A24	F1	F2	F4	F8	F12	F24	P1	P2	P4	P8	P12	P24
Asp	0.02	0.02	0.03	0.03	0.03	0.04	0.00	0.06	0.08	0.10	0.09	0.04	0.00	0.00	0.03	0.00	0.03	0.00	0.00
Thr	0.09	0.22	0.27	0.35	0.52	0.58	0.63	11.53	2.07	2.77	3.50	3.69	3.20	0.12	0.26	0.37	0.55	0.68	0.48
Ser	0.02	0.08	0.10	0.14	0.19	0.22	0.08	0.33	0.49	0.64	0.89	0.86	0.38	0.01	0.10	0.16	0.23	0.24	0.10
Glu	0.21	0.19	0.20	0.20	0.24	0.25	0.41	0.22	0.26	0.29	0.30	0.32	0.56	0.00	0.20	0.21	0.17	0.15	0.24
Pro	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.53	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Gly	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.02	0.00	0.10	0.09	0.13	0.23	0.25	0.39	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.08
Ala	0.00	0.00	0.00	0.07	0.11	0.13	0.17	0.12	0.17	0.25	0.34	0.39	1.16	0.00	0.00	0.02	0.02	0.18	0.66
Cys	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.04	0.09	0.00	0.00	0.20	0.34	0.00	0.00
Val	0.25	0.31	0.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.48	0.61	0.88	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Met	0.04	0.07	0.09	0.10	0.13	0.15	0.18	0.16	0.20	0.26	0.34	0.35	0.31	0.08	0.10	0.12	0.16	0.17	0.22
Ile	0.01	0.03	0.00	0.04	0.07	0.08	0.10	0.20	0.35	0.49	0.64	0.69	0.85	0.04	0.06	0.10	0.17	0.22	0.39
Leu	0.12	0.18	0.20	0.23	0.32	0.35	0.59	0.70	0.99	1.25	1.49	1.53	1.82	0.19	0.23	0.31	0.46	0.59	1.14
Tyr	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.45	0.49	0.71	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.08
Phe	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.42	0.51	0.95	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.45
His	0.61	0.52	0.67	0.62	0.57	0.71	0.63	0.59	0.62	0.59	0.60	0.64	0.57	0.69	0.70	0.67	0.65	0.65	0.63
Lys	0.01	0.03	0.04	0.05	0.08	0.09	0.08	0.18	0.22	0.26	0.29	0.30	0.25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.11	0.10
NH <sub>3</sub>	0.25	0.25	0.34	0.28	0.31	0.34	0.53	0.31	0.31	0.34	0.34	0.39	1.05	0.23	0.25	0.25	0.27	0.33	0.67
Arg	0.00	0.08	0.00	0.14	0.17	0.15	0.00	0.41	0.48	0.53	0.60	0.53	0.13	0.12	0.12	0.15	0.16	0.00	0.09
Total (%)	1.63	1.98	2.12	2.25	2.74	3.11	3.40	4.90	6.37	7.95	11.03	11.73	13.83	1.48	2.05	2.56	3.21	3.40	5.33

<sup>1)</sup> WP, wheat protein; A, the hydrolysates treated with alcalase; F, the hydrolysates treated with flavourzyme; P, the hydrolysates treated with protamex; 1-24, hydrolysis time (h)

**다. 제조조건에 따른 고꾸미/펩타이드 패턴/생리활성 분석**

(1) Glutathione(GSH) 수율 최적화 및 GSH 함량에 따른 고꾸미 및 생리활성 탐색

(가) GSH 수율 최적조건 확립(lab-scale)

세포 내 산화적 스트레스, 해독과정 및 관련 질환 등과 연관되는 주요 항산화 물질인 GSH의 추출법을 다양한 조건에서 수행한 결과, GSH 추출을 위한 용매로는 에탄올과 산을 이용하였고, 수율 향상을 위한 전처리 방법으로 가열법을 병행하였다. 그 결과, Table 69와 같이 추출방법에 따라 GSH 수율과 함량에 차이가 있었으며, 효모 배양액 1L로부터 얻을 수 있는 GSH 함량도 다르게 나타났다. 따라서, 본 연구에서는 산화반응을 최소화하면서 세포 균질화에 따른 단백질 침전을 기본으로 효모로부터 GSH를 최적으로 추출하고자 40% 에탄올을 사용하는 방법을 선정하여 이 후 변이종에 대해 적용하였다.

Table 69. GSH yield and content in *Candida utilis* extract as a function of various extraction methods

Extraction method	GSH yield (g/L)	GSH content (%)	mg GSH/L
40% Ethanol	5.87	0.0614	3.6042
5% Meta-phosphoric acid + boiling	10.58	0.0340	3.5972
3.3% Perchloric acid + boiling	8.78	0.0264	2.3179

본 연구에서 고꾸미 소재개발에 사용할 효모추출물 제조를 위해 관능적인 특성과 공정개선을 고려하여 *Candida utilis* 균주를 선정하였고, 이의 GSH 수율을 증가시키고자 균주개량을 수행하였다. Wild type의 *Candida utilis* 균주와 이로부터 개량된 변이종 2종(Mutant-Y-12과 Mutant-Y-13)으로부터 GSH를 추출하였다(Table 70). 효모의 변이에 의해 GSH 수율은 27% 저하되었으나, 함량은 270%까지 증가하였다. 효모 배양액 1L로부터 얻을 수 있는 GSH 함량을 계산한 결과, wild type 3.6 mg, mutant-Y-12 8.6 mg, mutant-Y-13 9.8 mg으로 나타났다. 따라서 효모변이에 의해 GSH 함량이 성공적으로 증가함을 확인할 수 있었다.

Table 70. Comparison of GSH yield and content in extracts obtained from wild and mutant type of *Candida utilis*

<i>Candida utilis</i> type	GSH yield (g/L)	GSH content (%)	mg GSH/L
Wild type	5.87	0.0614	3.6042
Mutant-Y-12	4.26	0.2027	8.6350
Mutant-Y-13	4.27	0.2295	9.8000

(나) 효모변이에 따른 GSH 추출물의 고꾸미 관능검사

주관 기관의 8종 추출물 시료의 관능검사 결과 참고 바람.

(다) 효모변이에 따른 GSH 추출물의 DPPH 라디칼 소거능

세포 내 주요 항산화 물질로 알려져 있는 GSH의 라디칼 소거능을 효모변이 정도에 따라 조사한 결과, Fig. 65와 같이 모든 시료에서 농도의존적인 효과를 보였으며, 변이에 의해 그 활성이 증가함을 알 수 있었다. DPPH 라디칼 소거능에 대한 IC<sub>50</sub>값은 wild type 34.19 nM GSH, Mutant-Y-12 15.79 nM, Mutant-Y-13 13.89 nM을 보임으로써 최대 1.5배 활성이 증가하였다.

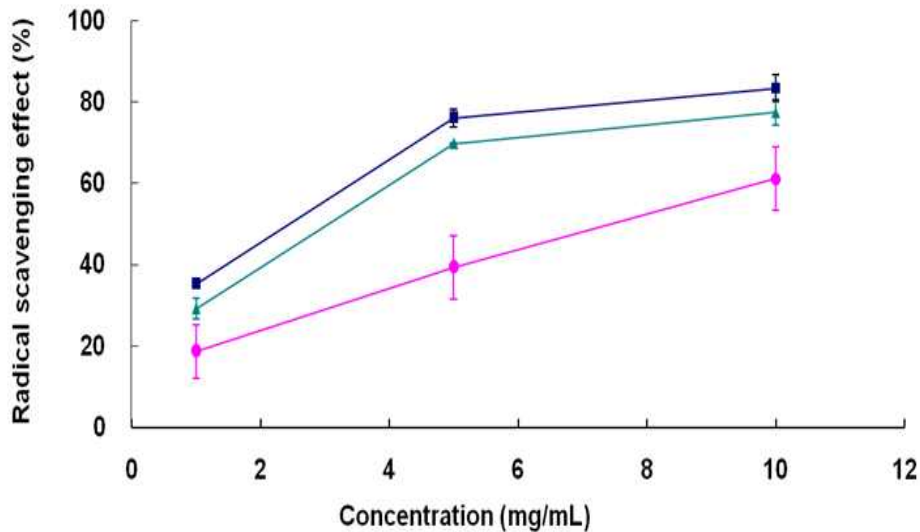


Fig. 65. DPPH radical scavenging effect of GSH extracts obtained from wild and mutant type of *Candida utilis*. Circle, wild type; triangle, mutant-Y-12; square, mutant-Y-13.

(2) 가수분해 시간에 따른 펩타이드 패턴과 고구미 및 생리활성 탐색

(가) 효소종류/가수분해도에 따른 펩타이드 패턴분석

① 효소종류/가수분해도에 따른 시료 제조

밀 단백질에 대해 3가지 효소(alcalase, flavourzyme, protamex)를 이용하여 가수분해 시간(1, 12, 24시간)을 조절하여 가수물을 제조한 결과, Table 10에서와 같이 효소종류/가수분해 시간별로 시료를 얻을 수 있었다. 따라서 이 후 결과물에 대해 효소종류인 alcalase, flavourzyme, protamex를 이용하여 반응시간별로 제조한 시료의 가수분해 시간에 따라 각각 A1h, A12h, A24h, F1h, F12h, F24h, P1h, P12h, P24h 등으로 명명하여 언급하고자 한다.

② Reversed phase HPLC chromatography

밀 단백질에 대해 효소종류/가수분해도별 시료의 hydrophobicity 특성을 분석한 결과는 Fig. 66-68과 같다. 효소종류별 가수분해물의 펩타이드 패턴에서는 flavourzyme을 이용한 경우가 다른 두 효소보다 분해패턴이 다르게 분석되었다. 또한, 모든 효소에서 가수분해도가 증가할수록 hydrophobic한 특성의 펩타이드의 비율은 감소하고, 좀 더 hydrophilic한 특성이 증가함을 알 수 있었다.

이와 같이, 밀 단백질은 효소적 가수분해에 의해 다양한 펩타이드로 분해되었고, 좀 더 hydrophilic한 부분(분석시간 15분 이내)에 대한 peak가 sharp해짐을 알 수 있었다. 특히, flavourzyme의 경우에는 alcalase나 protamex와는 달리 7, 9, 12분대에 매우 큰 peak가 생성되었다. 이는 endo와 exopeptidase의 특성을 모두 보유한 flavourzyme의 가수분해 작용기작에서 기인한 것으로 효소종류에 따라 분해하는 펩타이드 결합에 차이가 있음을 확인할 수 있었다.

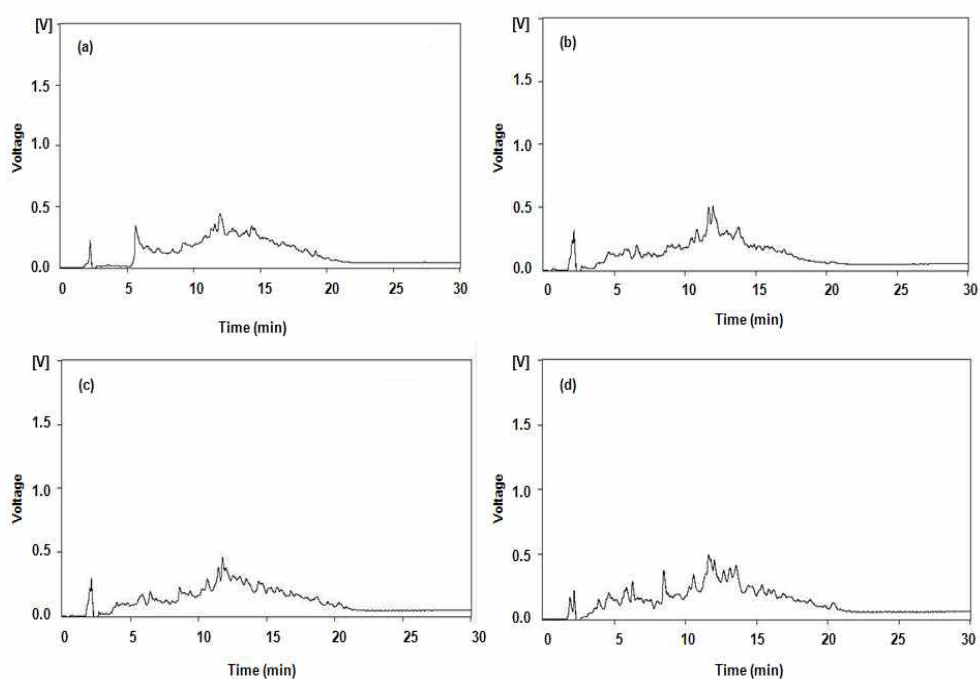


Fig. 66. Reversed-phase HPLC chromatograms of wheat protein and its hydrolysates of various degree of hydrolysis obtained by alcalase treatment. (a) Wheat protein, (b) A1h, (c) A12h, (d) A24h.

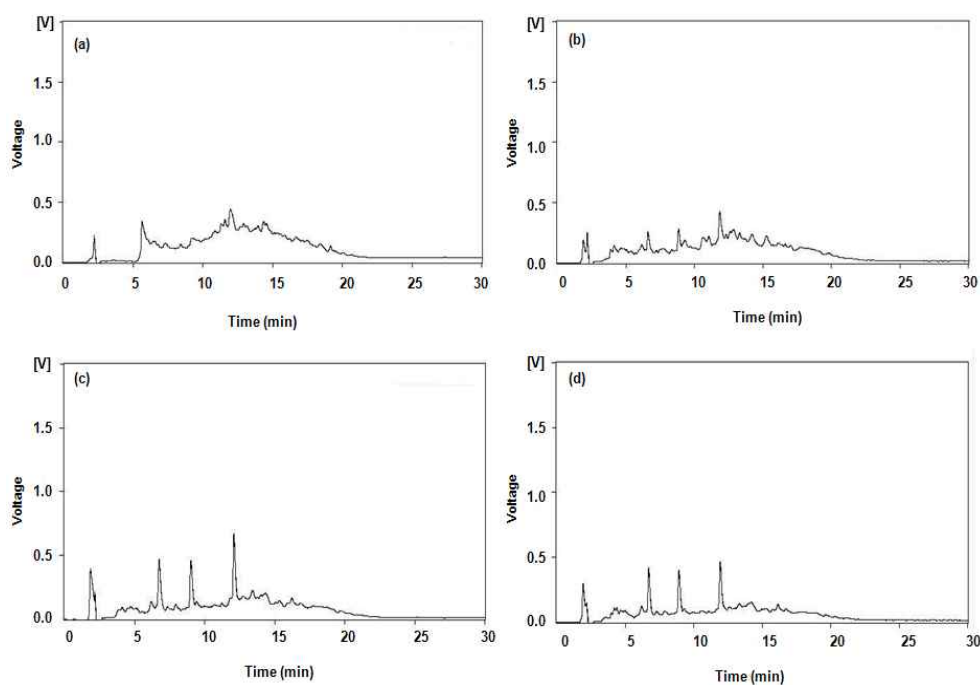


Fig. 67. Reversed-phase HPLC chromatograms of wheat protein and its hydrolysates of various degree of hydrolysis obtained by flavourzyme treatment. (a) Wheat protein, (b) F1h,



(c) F12h, (d) F24h.

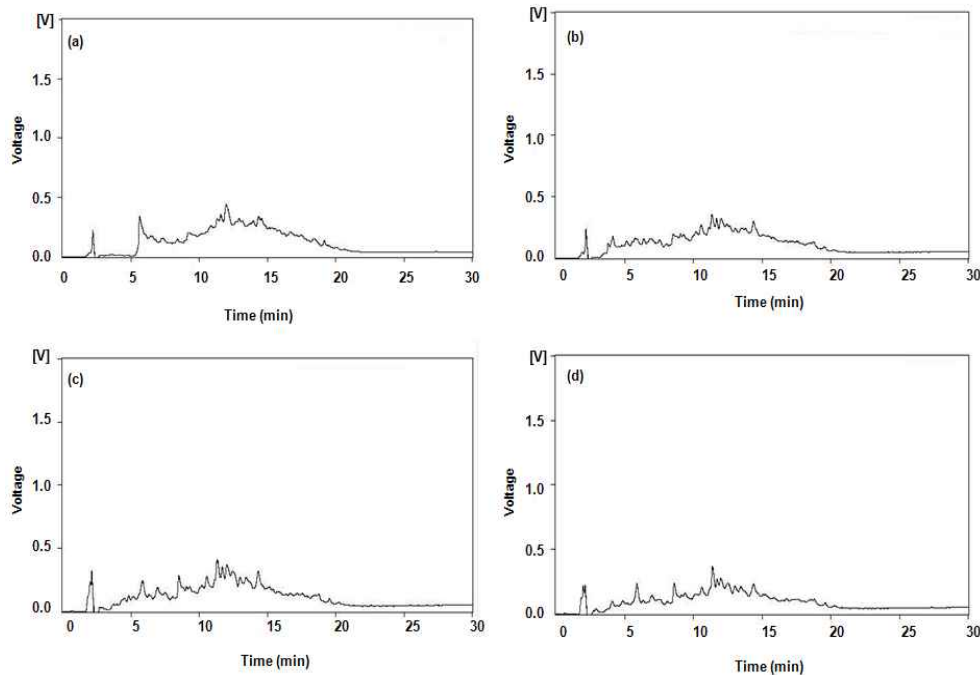


Fig. 68. Reversed-phase HPLC chromatograms of wheat protein and its hydrolysates of various degree of hydrolysis obtained by protamex treatment. (a) Wheat protein, (b) P1h, (c) P12h, (d) P24h.

이러한 결과를 확인하기 위해 본 연구에서 진행한 분석조건에서 용출된 peak의 영역을 more hydrophilic(0-5분), amphipathic(5-15분), more hydrophobic(15-30분)으로 구분하여 분석된 chromatogram의 area(%)를 비교하였다(Table 71). 가수분해가 진행됨에 따라 hydrophilic한 부분의 비율이 증가하였으며, 밀 단백질에 비해 F24h에서 4배 이상의 증가를 보였다. 반면 hydrophilic에서 hydrophobic으로 진행되는 특성을 보이는 펩타이드들은 가수분해에 의해 감소하였다.

Table 71. Relative percent of wheat protein and its hydrolysates in HPLC in total area

Total % area	Retention time (min)		
	0-5	5-15	15-30
Wheat protein	3.73	60.00	36.27
A1h	7.36	51.14	41.51
A12h	7.77	47.97	44.26
A24h	7.68	49.83	42.50
F1h	9.06	47.04	43.90
F12h	10.55	46.89	42.56
F24h	12.74	44.49	42.78
P1h	3.17	51.50	45.33
P12h	8.24	49.31	42.44
P24h	9.17	47.30	43.53

③ SDS-PAGE

위의 SDS-PAGE 분석조건을 바탕으로 밀 단백질 가수분해물의 분자량 패턴을 분석한 결과는 Fig. 69와 같다. 밀 단백질은 가수분해가 진행되면서 36 kDa, 17-26.6 kDa 및 6.5 kDa 이하의 분자량대가 점차 흐려지면서 24시간 가수 후에는 밴드가 사라지는 현상을 보였다. 그러나 protease와 peptidase의 특성을 동시에 보이는 flavourzyme은 24시간 반응 후에도 36 kDa의 분자량이 희미하게 감지됨으로써 endo-protease와 다른 가수분해 경향을 보임을 알 수 있었다.

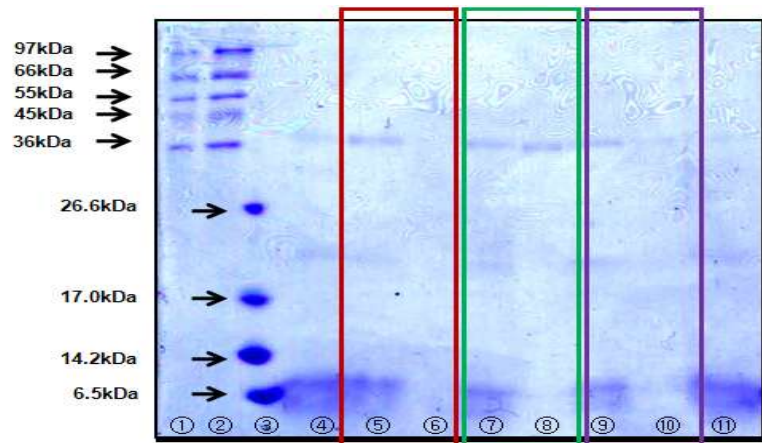


Fig. 69. SDS-PAGE profiles of wheat protein (lane ④⑪) and its wheat protein hydrolysates after 1h and 24 h of incubation with alcalase (lane ⑤⑥), flavourzyme (lane ⑦⑧), and protamex (lane ⑨⑩).

#### ④ Gel filtration chromatography

가수분해에 따른 분자량 변화는 gel filtration column을 이용하여 분석하였다. Fig. 69에서와 같이, 밀 단백질 시료에 비해 24시간 가수분해가 진행된 시료에서는 전체적인 chromatogram이 오른쪽으로 이동하는 결과를 보였다. 또한 밀 단백질과는 달리 가수분해물에서는 분석 후 반부에서 peak가 생성되었으며, flavourzyme의 경우 가장 늦은 용출시간을 보였다. 이러한 결과는 밀 단백질(polypeptide)이 가수분해에 의해 moderate 또는 small peptide로 분해되고, 효소종류에 따라 작용하는 펩타이드 결합이 다를 수 있다. 그러나 가수분해 시간이 증가함에 따른 뚜렷한 분자량 패턴변화는 나타나지 않았다.

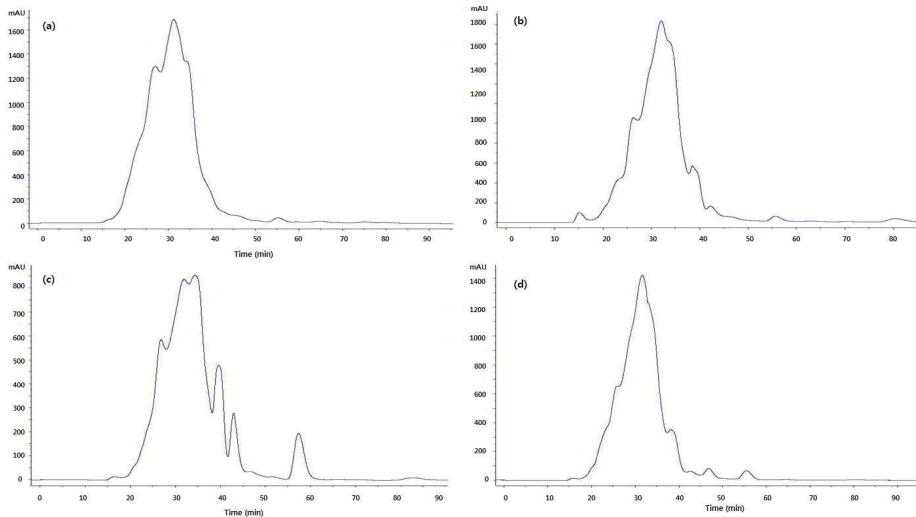


Fig. 70. Size exclusion chromatograms of wheat protein and its hydrolysates of various degree of hydrolysis obtained by different kinds of enzyme. (a) Wheat protein, (b) A24h, (c) F24h, (d) P24h.

#### (나) 효소종류/가수분해 시간별 시료의 고꾸미 분석

##### ① 관능검사

상업용 효소 3종을 이용하여 24시간 가수분해하여 제조한 밀단백가수분해물(A1h, 24h, F1h, F24h, P1h, P24h)에 대해서 고꾸미 발현에 대한 관능분석을 행하였다. 밀 단백질 가수분해물들의 관능특성을 분석한 결과(Table 72), A24h에서 우마미, 고꾸미, 전체적인 기호도에서 가장 높은 점수를 받았다. alcalase에 의한 단백질가수분해물들은 시간이 증가함에 따라 단맛과 쓴맛이 감소한 반면, 짠맛, 고꾸미, 우마미, 전체적 기호도는 증가하였다. 한편, flavourzyme과 protamex는 가수시간이 증가함에 따라 쓴맛은 증가하고 단맛은 감소되었으며 고꾸미, 우마미, 전체적 기호도에는 영향을 미치지 않았다. A24h는 맛과 관련된 아미노산으로써 감칠맛과 신맛을 내는 아미노산 Glu, Asp의 함량은 약 12%, 단맛을 내는 아미노산 Gly, Pro, Ala, Ser의 함량은 약 7% 였다. 또한 다른 가수분해물에 비해 감칠맛에 영향을 주는 Glu가 약 3배 높게 분석되었으며 쓴맛에 영

향을 주는 소수성 아미노산이 약 1.8배 낮게 분석되었다(Table 73). 따라서 고꾸미 소재를 개발하고자 한다면 alcalase를 이용하여 24시간 동안 가수분해하는 조건이 적합하다고 사료된다. 즉, 시료의 고꾸미 특성에 대한 효과는 효소종류, 가수분해시간 및 최종 산물의 분자량, 아미노산 조성 등에 따라 다양하게 나타남을 예상할 수 있었다.

Table 72. Taste profiles of wheat protein hydrolysates

	A1h	A24h	F1h	F24h	P1h	P24h
Bitter	3.1±1.2	2.5±0.5	2.4±0.5	3.0±0.9	2.6±0.7	3.1±1.0
Umami	4.3±0.7	5.0±0.8	3.9±0.8	4.0±1.2	3.9±0.8	4.0±0.8
Kokumi	4.5±0.9	4.5±1.2	4.0±0.5	3.5±1.3	4.0±0.8	4.0±0.5
Sweet	4.0±1.1	3.6±1.1	3.9±1.2	3.1±0.6	4.0±1.3	3.1±0.8
Salty	3.6±0.7	4.1±1.0	3.8±0.7	3.8±0.7	3.4±0.5	4.0±1.1
Overall acceptability	4.2±0.8	5.2±0.8	4.3±1.0	4.3±1.2	4.4±0.9	4.3±0.5

Table 73. Comparative free amino acid profiles (g/100 g hydrolysate) of enzymatic wheat protein hydrolysates

FAA <sup>1)</sup>	A1h	A24h	F1h	F24h	P1h	P24h
Asp	1.01	0.00	1.22	0.00	0.00	0
Thr	11.11	18.53	31.22	23.14	8.11	9.01
Ser	4.04	2.35	6.73	2.75	0.68	1.88
Glu	9.60	12.06	4.49	4.05	0.00	4.50
Pro	0.00	0.00	0.00	3.83	0.00	0.00
Gly	0.00	0.00	1.84	2.82	0.00	1.50
Ala	0.00	5.00	2.45	8.39	0.00	12.38
Cys	0.00	0.00	0.00	0.65	0.00	0.00
Val	15.66	0.00	0.00	6.36	0.00	0.00
Met	3.54	5.29	3.27	2.24	5.41	4.13
Ile	1.52	2.94	4.08	6.15	2.70	7.32
Leu	9.09	17.35	14.29	13.16	12.84	21.39
Tyr	0.00	0.00	0.00	5.13	0.00	1.50
Phe	0.00	0.00	0.00	6.87	0.00	8.44
His	26.26	18.53	12.04	4.12	46.62	11.82
Lys	1.52	2.35	3.67	1.81	0.00	1.88
NH3	12.63	15.59	6.33	7.59	15.54	12.57
Arg	4.04	0.00	8.37	0.94	8.11	1.69
THAA <sup>2)</sup>	29.81	30.58	25.93	45.99	20.95	55.16

<sup>1)</sup> Free amino acid

<sup>2)</sup> Total hydrophobic amino acids, Pro, Gly, Ala, Val, Met, Ile, Leu, and Phe

## ② 미각센서

훈련된 패널을 대상으로 진행한 관능검사와 함께 인간의 미뢰와 유사한 기능을 갖는 미각센서를 이용하여 기기적 분석을 수행하였다(Fig. 70). 미각센서는 각각의 맛에 특성화된 lipid membrane을 장착한 probe를 이용하여 시료 내 맛의 강도를 분석하는 기기로, 1이상의 차이를 인지할 경우 시료 간 유의적인 차이가 있다고 분석할 수 있다. 본 연구에서 제조한 밀 단백질 가수분해물과 target 제품인 Koji-Aji를 이용하여 우마미(umami)와 고크미(kokumi)를 분석하였다. 그 결과, 우마미와 고크미 모두 A24h > Koji-Aji(target 제품) > P24h > F24h의 순으로 분석되었으며, A24h의 맛 특성이 F24h보다 유의적으로 우수함을 알 수 있었다. A24h가 가장 좋은 고크미를 보임으로써 관능분석 결과와 유사한 경향을 나타내었다. 따라서 관능검사와 함께 미각센서를 이용하여 각 시료 간의 맛 특성(우마미, 고크미 등)을 조사함으로써 좀 더 정확한 결과를 얻을 수 있

음을 확인하였다. 또한, 가수분해만으로 현재 target 제품으로 사용한 Koji-Aji보다 우수한 고꾸미를 얻었으므로 추후 고꾸미 펩타이드 분리 및 가공공정에 의해 더욱 향상된 고꾸미 소재를 제조할 수 있을 것으로 생각된다.

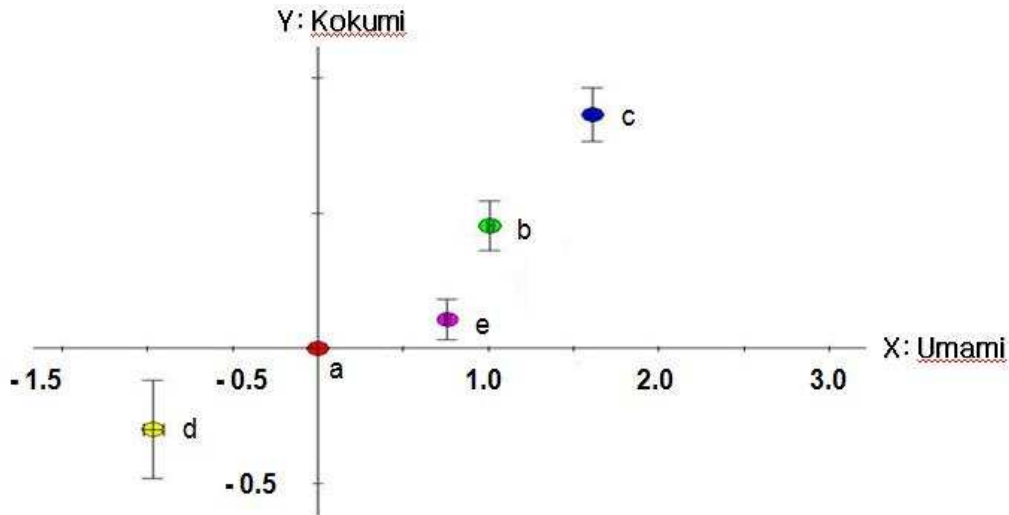


Fig.71. Taste profiles of wheat protein hydrolysates by taste sensing system. a, Reference (chicken broth); b, Koji Aji (target product); c, A24h; d, F24h; e, P24h.

(다) 효소종류/가수분해 시간별 시료의 생리활성 탐색

① DPPH 라디칼 소거능

DPPH 자유 라디칼은 항산화제와 같은 proton-donating 기질과 반응하여 소거됨으로써 흡광도가 감소하는 특성을 보인다. 즉, 안정한 라디칼인 DPPH는 산화방지물질로부터 전자 혹은 수소를 제공 받으면서 비라디칼로 전환되면서 흡광도가 변화하는 원리이다. 각각의 가수분해물의 DPPH 라디칼 소거능은 0.5-4.0 mg/mL 범위에서 농도의존적인 활성증가를 보였으나, 효소종류/가수분해시간에 따른 활성차이는 보이지 않았다(Fig. 72). 가장 우수한 고꾸미를 보인 A24h의 DPPH 라디칼 소거능에 대한 IC<sub>50</sub>은 1.1 mg/mL로써 alcalase에 의해 가수분해된 wheat germ 가수분해물(IC<sub>50</sub> 1.30 mg/mL)과 유사한 결과를 나타내었다. 그러나 protamex에 의해 가수분해된 hemp 단백질 가수분해물(IC<sub>50</sub> 2.3 mg/mL)과 alcalase에 의해 가수분해된 hemoglobin 가수분해물(IC<sub>50</sub> 약 2.0 mg/mL)보다는 높은 활성을 나타내었다. 따라서 DPPH 라디칼 소거능은 단백질 급원 및 가수에 사용되는 효소종류에 따라 다른 활성을 보임을 알 수 있었다.

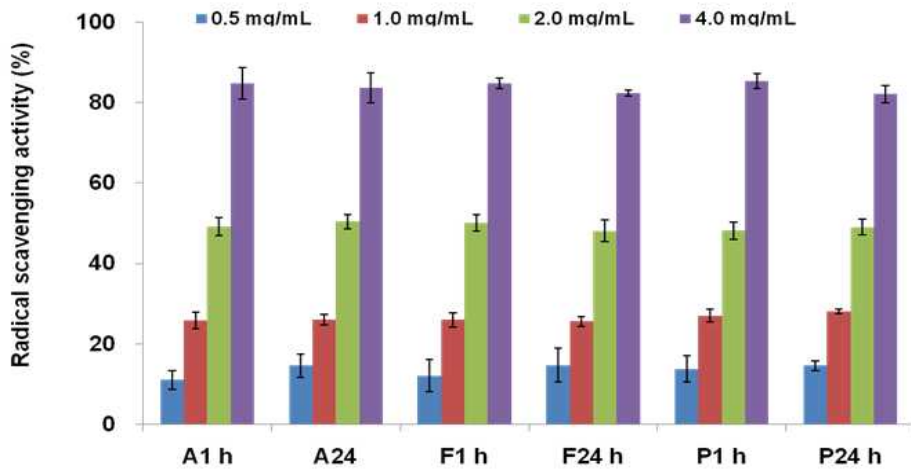


Fig. 72. DPPH scavenging effects of wheat protein hydrolysates with various time of hydrolysis obtained by different kinds of enzyme.

### ② Hydroxyl 라디칼 소거능

다양한 산소유래 라디칼 중 hydroxyl 라디칼은 단백질, DNA, PUFA, nucleic acid와 같은 생체분자를 공격하는 유해성을 보이므로 hydroxyl 라디칼을 제거함으로써 관련 질병에 대항하여 인체를 보호할 수 있다. 각각의 가수분해물의 hydroxyl 라디칼 소거능은 0.5-4.0 mg/mL 범위에서 농도의존적인 활성증가를 보였으나, 효소종류/가수분해시간에 따른 활성차이는 보이지 않았다(Fig. 73). 특히, 우수한 고꾸미를 보인 A24h의 hydroxyl radical 소거능의 IC50은 0.39 mg/mL로 alcalase에 의해 가수분해된 wheat germ 가수분해물(IC50 0.12 mg/mL)보다 약 2배정도 낮은 결과를 나타낸 반면, chickpea 단백질가수분해물(IC50 약 1.5 mg/mL)에 비해서는 약 4배 높은 결과를 나타내었다.

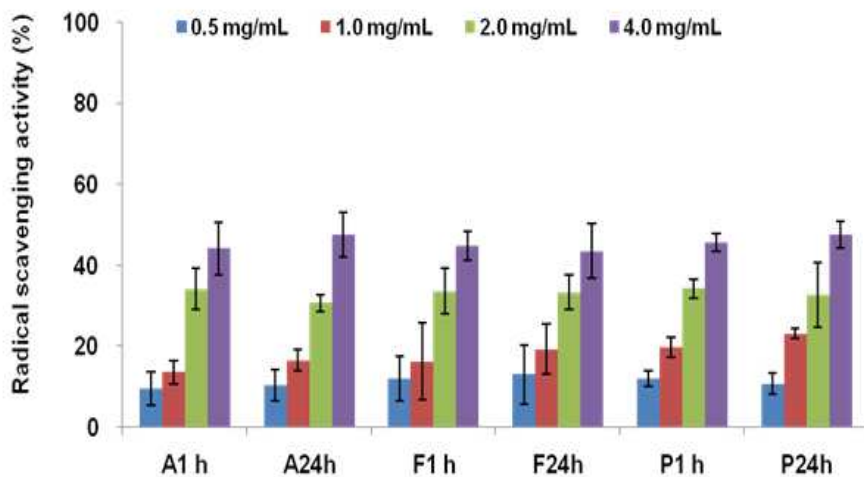


Fig. 73. Hydroxyl radical scavenging effects of wheat protein hydrolysates with various time of hydrolysis obtained by different kinds of enzyme.

### ③ ACE 저해활성

Angiotensin converting enzyme(ACE)은 신장의 renin-angiotensin계에서 전구물질인 angiotensin I을 angiotensin II로 전환시켜 혈압을 상승시키는 역할을 한다. 따라서 고혈압의 직접적인 억제제를 위하여 ACE의 활성을 억제하는 물질을 탐색함으로써 항고혈압 활성물질을 분석할 수 있다. 특히, ACE 효소저해활성을 이용하여 항고혈압 소재를 조사하는 것은 매우 과학적이고 재현성 있는 연구방법으로 많이 이용되고 있다. 따라서 본 연구에서도 효소종류/가수분해 시간별 시료들의 항고혈압 활성을 탐색하고자 ACE 저해능을 분석하였다(Fig. 74). 각각의 가수분해물의 ACE 저해능은 0.5-4.0 mg/mL 범위에서 농도의존적인 활성증가를 보였으나, 효소종류/가수분해시간에 따른 활성차이는 보이지 않았다(Fig. 20). 관능적으로 우수한 고꾸미 특성을 보인 A24h의 ACE 저해활성은 1.40 mg/mL에서 50%가 저해되는 결과를 보였다. 이러한 결과는 기존 연구결과로써 *Aspergillus oryzae*에 의해 가수분해된 soybean extract(IC<sub>50</sub> 1.46 mg/mL)와 유사한 활성을 보였다. 그러나 Alkaline protease에 의해 가수분해된 wheat germ 가수분해물(IC<sub>50</sub> 0.67 mg/mL), alcalase와 flavourzyme에 의해 가수분해된 chickpea protein isolate(IC<sub>50</sub> 0.19 mg/mL), flavourzyme에 의해 가수분해된 corn gluten 가수물(IC<sub>50</sub> 0.16 mg/mL)에 비하면 약 2-8배 낮은 결과를 나타내었다.

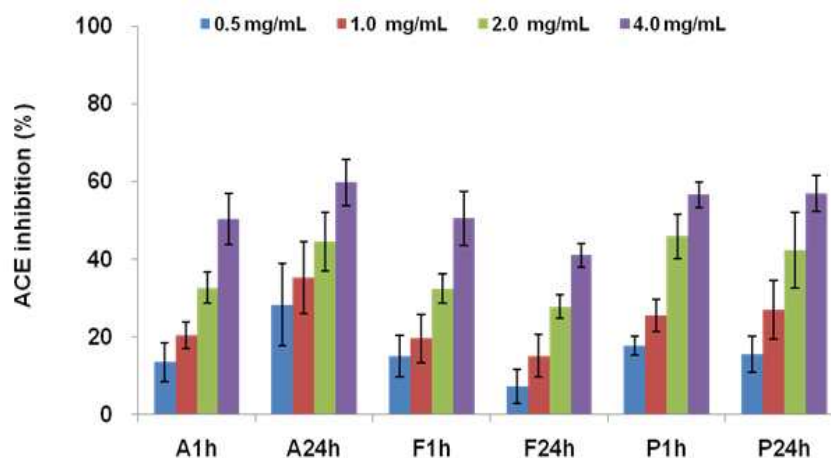


Fig. 74. ACE inhibitory effects of wheat protein hydrolysates with various time of hydrolysis obtained by different kinds of enzyme.

이상과 같이, 밀단백질에 대해 효소종류 및 가수시간을 조정함으로써 다양한 가수분해물을 제조하여 관능적 특성과 생리활성을 비교한 결과, 가수조건(특히, 효소종류)이 관능적 특성에는 영향을 주지만 생리활성의 차이는 보이지 않음을 알 수 있었다. 따라서, 원료밀의 종류에 따른 관능특성 및 생리활성의 차이를 비교하고자 우리밀과 수입밀에 대해 효소종류별로 24시간 가수분해하여 얻은 시료(우리밀 alcalase, DA24h; 우리밀 flavourzyme, DF24h; 우리밀 protamex, DP24h; 수입밀 alcalase, IA24h; 수입밀 flavourzyme, IF24h; 수입밀 protamex, IP24h) 간의 고꾸미 및 생리활성 차이를 분석하였다.



(라) 우리밀/수입밀 효소종류별 시료의 고꾸미 분석

① 관능분석

효소종류별로 24시간 가수분해한 우리밀과 수입밀 가수분해물에 대한 고꾸미 발현 정도를 분석하였다(Table 74). 전반적으로 고꾸미와 전체적인 기호도에 있어서 우리밀 가수분해물들이 수입밀보다 우수하였으며, DA24h에서 가장 우수한 고꾸미를 보였다. 또한 DA24h는 다른 가수분해물에 비해 감칠맛에 영향을 주는 Glu 함량은 높게 분석된 반면, 쓴맛을 내는 소수성 아미노산 비율은 낮았다.

Table 74. Taste profiles of wheat protein hydrolysates

	DA24h	DF24h	DP24h	IA24h	IF24h	IP24h
Kokumi	5.3±1.8	4.5±1.4	4.8±1.8	4.4±1.5	3.6±1.1	4.4±0.9
Overall acceptability	5.1±2.2	4.8±1.7	4.9±2.1	3.7±1.9	3.4±1.6	4.3±1.6
Taste off	3.5±1.4	3.5±1.5	3.5±1.4	3.5±1.1	3.5±1.5	3.5±1.4

② 미각센서

훈련된 패널을 대상으로 진행한 관능검사와 함께 인간의 미뢰와 유사한 기능을 갖는 미각센서를 이용하여 기기적 분석을 수행하였다(Fig. 75). 효소종류별로 24시간 가수분해한 우리밀과 수입밀에 대해서 target 제품인 Koji-Aji를 이용하여 우마미(umami)와 고꾸미(kokumi)를 분석하였다. 그 결과, 우마미와 고꾸미 모두 DA24h > IF24h > IA24h > IP24h > Koji-Aji (target 제품) > DP24h > DF24h의 순으로 분석됨으로써, DA24h가 가장 좋은 고꾸미를 보여 관능분석 결과와 유사한 경향을 나타내었다.

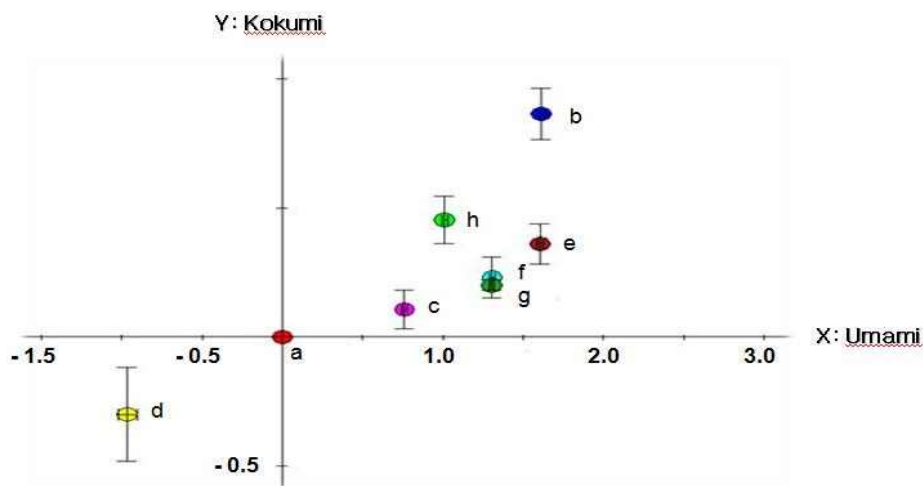


Fig. 75. Taste profiles of wheat protein hydrolysates by taste sensing system. a, Reference (chicken broth); b, DA24 h; c, DP24h; d, DF24 h; e, IF24 h; f, IA24h; g, IP 24 h; h, Koji Aji (target product)

③ 아미노산 조성분석

원료밀의 종류에 따른 가수분해물들의 우마미와 고꾸미에 영향을 주는 Glu와 쓴맛에 영향을 주는 소수성 아미노산(Pro, Gly, Ala, Val, Met, Ile, Leu, Phe)을 중심으로 아미노산 분석을 수행한 결과는 Table 75와 같다. DA24h는 다른 가수분해물들에 비하여 3배 이상의 Glu를 함유한 반면, 소수성 아미노산에서는 약 2배 정도 낮은 함량을 보였다(IA24h 제외). 특히, DP24h는 소수성 아미노산인 Ala와 Leu이 다른 가수분해물들에 비해 높게 나타났다. Lioe 등 (2006)은 Japanese soy로부터 우마미와 아미노산이 풍부한 fraction들을 분리한 결과, 20%의 Glu와 16%의 Asp를 함유되었음을 보고하였다. 또한, Indoh 등(2006)은 fish sauce의 강한 우마미는 free glutamic acid와 peptide-type의 높은 함량에 의존한다고 보고하였다. 따라서, 본 연구에서도 수입밀에 비해 높은 Glu 함량과 낮은 소수성 아미노산 비율이 우마미와 고꾸미 등의 정미성에 영향을 줄 수 있음을 확인할 수 있었다.

Table 75. Comparative free amino acid profiles (g/100 g hydrolysate) of domestic and import wheat

FAA <sup>1)</sup>	DA24h	DF24h	DP24h	IA24h	IF24h	IP24h
Asp	ND	ND	ND	1.29	0.72	0.16
Thr	18.53	23.14	9.01	2.76	31.67	7.81
Ser	2.35	2.75	1.88	7.72	7.18	3.44
Glu	12.06	4.05	4.5	10.11	2.27	2.50
Pro	ND	3.83	ND	0.74	1.59	2.19
Gly	ND	2.82	1.5	1.65	1.66	0.94
Ala	5.00	8.39	12.38	6.07	3.61	5.63
Cys	ND	0.65	ND	5.33	2.20	3.13
Val	ND	6.36	ND	5.88	8.08	10.16
Met	5.29	2.24	4.13	5.33	3.57	5.16
Ile	2.94	6.15	7.32	2.21	6.39	6.25
Leu	17.35	13.16	21.39	17.46	13.20	22.97
Tyr	ND	5.13	1.5	2.76	4.80	3.91
Phe	ND	6.87	8.44	4.23	5.45	9.38
His	18.53	4.12	11.82	15.81	3.79	12.50
Lys	2.35	1.81	1.88	2.39	1.77	2.97
NH <sub>3</sub>	15.59	7.59	12.57	0.00	0.00	0.00
Arg	ND	0.94	1.69	8.27	2.06	0.94
THAA <sup>1)</sup>	30.59	49.82	55.16	43.57	43.54	62.66

<sup>1)</sup> Free amino acid

<sup>2)</sup> Total hydrophobic amino acids, Pro, Gly, Ala, Val, Met, Ile, Leu, and Phe

(마) 우리밀/수입밀 효소종류별 시료의 생리활성 탐색

① DPPH 라디칼 소거능

우리밀/수입밀 효소종류별 시료들의 DPPH 라디칼 소거능은 0.5-2.0 mg/mL 범위에서 농도의존적인 효과를 보였으며, 우리밀보다 수입밀의 활성이 높았다(Fig 76). 특히, IA24h는 0.5 mg/mL의 IC<sub>50</sub>값을 보여 기존 연구결과(alcalase를 사용한 wheat germ 가수분해물, 1.30 mg/mL; protamex를 사용한 hemp 단백질가수분해물, 2.3 mg/mL; alcalase를 사용한 hemoglobin 가수분해물, 2.0 mg/mL)보다 우수한 결과를 나타내었다. 따라서, 관능적 특성과는 달리 DPPH 라디칼 소거능에서는 수입밀이 우수함을 확인하였고, 원료밀의 종류나 효소종류에 따라 효능차이가 발생함을 알 수 있었다.

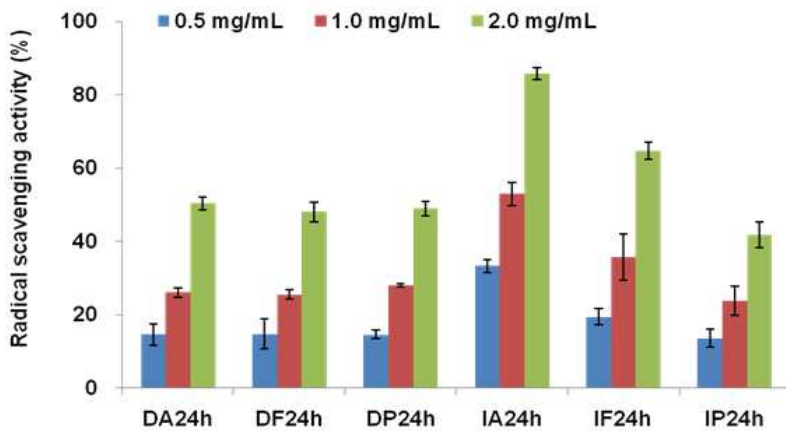


Fig. 76. DPPH scavenging effects of domestic and import wheat obtained by different kinds of enzyme.

② Hydroxyl 라디칼 소거능

우리밀/수입밀 효소종류별 시료들의 hydroxyl 라디칼 소거능은 0.5-2.0 mg/mL 범위에서 농도의존적인 효과를 보였으며, 우리밀이 수입밀보다 우수한 활성을 보였으나, 효소종류에 따른 활성차이는 없었다(Fig 77). 따라서, 관능적 특성과 함께 hydroxyl 라디칼 소거능에서도 우리밀이 우수함을 확인하였고, 원료밀의 종류가 hydroxyl 라디칼 소거능에 큰 영향을 줄 수 있었다.

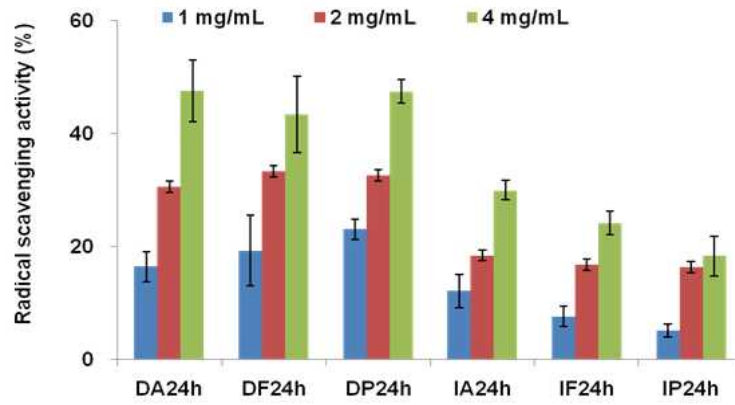


Fig. 77. Hydroxyl radical scavenging effects of domestic and import wheat obtained by different kinds of enzyme.

### ③ ACE 저해활성

우리밀/수입밀 효소종류별 시료들의 항고혈압 활성을 탐색하고자 ACE 저해능을 분석하였다 (Fig. 78). ACE 저해활성은 모든 시료에서 농도의존적인 효과를 보였으며, 원료밀의 종류보다는 효소종류에 따른 활성차이가 나타났다(alcalase > protamex > flavozyme). 특히, 관능적 특성이 우수했던 우리밀 alcalase 24시간 가수물의 ACE 저해효과도 가장 높게 나타났다.

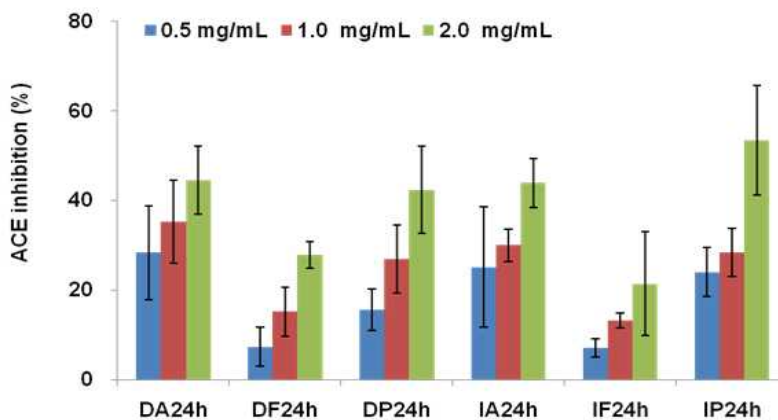


Fig. 78. ACE inhibitory effects of domestic and import wheat obtained by different kinds of enzyme.

**라. 밀 단백질 가수분해물(A24h)로부터 고꾸미 펩타이드 정제 및 시제품 분석**

이상과 같이, 밀단백질 원료, 효소종류 및 가수시간을 조정함으로써 얻어지는 다양한 가수분해물의 관능적 특성과 생리활성에서 차이가 있음을 알 수 있었다. 그러나, 관능적으로나 생리활성 면에서 가장 우수한 우리밀의 경우 현재까지 원료수급면에서 제한성이 있어 향후 정미소재로의 개발가능성을 고려하여 수입밀 alcalase 24시간 가수물을 이용하여 정미성분 정제에 따른 기능성 변화를 분석하였다.

(1) 분리단계별 시료의 고꾸미 분석

(가) 한외 여과법(Ultrafiltration)

우수한 관능특성을 보인 A24h에 대하여 고꾸미 펩타이드 정제에 따른 특성분석을 진행하였다. Ultrafiltration membrane system(분자량 cut-off 범위 1kDa)을 이용하여 한외 여과한 2개의 fraction의 관능 특성은 훈련된 패널에 의해 기준물질인 chicken broth와, 우마미, 고꾸미, 단맛, 짠맛, 신맛, 쓴맛, 전체적인 기호도에 대해 조사되었다(Table 76). 1kDa 이하의 저분자 펩타이드로 구성된 분획에서는 주로 강한 우마미와 고꾸미의 특성과 약한 신맛과 쓴맛을 나타내었다. 반면, 1kDa 이상의 분획에서는 우마미, 고꾸미, 전체적 기호도에서 1kDa 이하보다 낮은 점수를 나타냄으로써 단맛과 쓴맛은 약하고 짠맛, 우마미, 고꾸미가 강할수록 전체적 기호도가 우수해짐을 알 수 있었다. 따라서, 가장 우수한 고꾸미 특성을 보인 1kDa 이하의 획분을 회수하여 C18 column을 통한 분획화를 진행하였다.

Table 76. Taste profiles of fractions obtained from alcalase-treated for A24h through ultrafiltration (UF) membrane system in model chicken broth

Taste attribute	<1kDa	>1kDa
Bitter	2.7±1.2	2.9±1.3
Umami	4.4±1.3	4.4±1.4
Kokumi	4.9±1.4	4.6±1.5
Sweet	3.9±1.4	3.6±1.1
Salty	3.9±1.3	3.9±1.1
Overall acceptability	4.4±1.3	4.5±1.5

(나) Reversed phase HPLC chromatography

한외여과 획분 중 고꾸미가 가장 우수한 1 kDa이하의 획분을 취하여 농축한 후 적정 농도로 제조한 시료용액을 0.2 µm syringe filter를 이용하여 불순물을 제거한 다음 Grace Vydac Protein & Peptide C18 column을 이용하여 분리한 결과, 3개의 획분(HP1-HP3)을 얻을 수 있었다(Fig 79). 각 획분을 취하여 용매를 제거한 후 훈련된 패널을 통한 관능특성을 실시한 결과(Table 77),

HP1와 HP2는 주로 우마미와 짠맛의 특성을 보였고, 약한 신맛과 쓴맛을 나타내었다. 특히, HP3는 강한 우마미와 고꾸미를 보임으로써 다른 획분에 비해 전체적인 기호도가 높게 나타났다. 따라서, 단맛과 쓴맛은 약하고 짠맛, 우마미, 고꾸미가 높은 관능적 품질이 전체적 기호도에 영향을 줄 수 있었다.

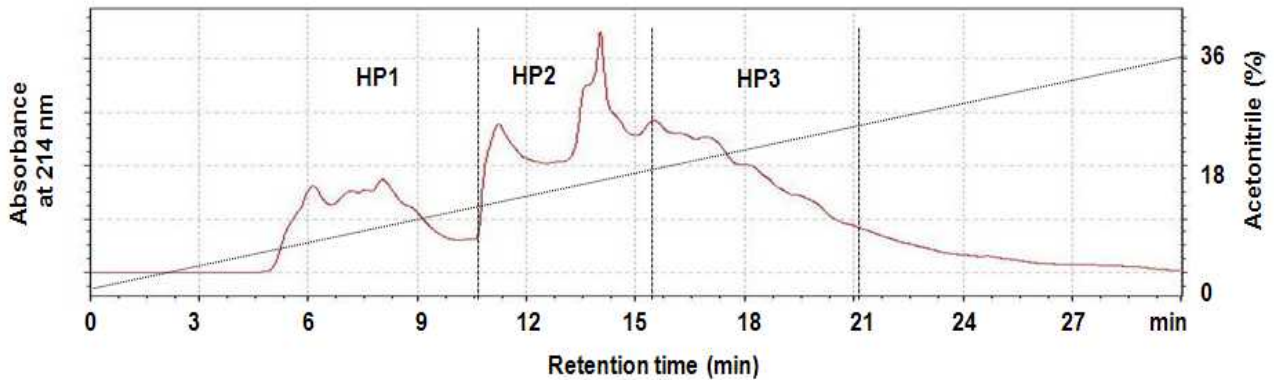


Fig. 79. Taste profiles of fractions obtained from <1kDa through ultrafiltration (UF) membrane system in model chicken broth.

Table 77. Taste profiles of fractions obtained from <1kDa through ultrafiltration (UF) membrane system in model chicken broth

Taste attribute	HP1	HP2	HP3
Bitter	2.4±1.5	2.4±1.3	2.4±0.7
Umami	3.8±1.4	4.5±1.4	4.3±1.0
Kokumi	3.0±1.2	3.9±1.4	4.0±1.2
Sweet	3.6±1.7	3.5±1.8	3.6±1.5
Salty	4.6±1.8	4.4±2.1	3.9±1.5
Overall acceptability	3.5±1.1	4.1±1.6	4.6±1.4

최종적으로 각 분리 단계별로 우수한 고꾸미를 보였던 시료들(A24h, <1kDa, HP3)에 대하여 관능특성을 재분석한 결과 Table 78 같은 결과를 나타내었다. 관능 특성은 훈련된 패널에 의해 기준물질인 chicken broth와, 쓴맛, 우마미, 고꾸미, 전체적인 기호도에 대해 조사되었다. 고꾸미에 대해서는 A24h에서 가장 높은 점수를 받았으나 정제별 시료 중 HP3은 다른 시료들에 비해 쓴맛이 가장 약하고, 우마미와 전체적인 기호도에서 유의적인 차이는 없지만 가장 높은 점수를 받았다.

Table 78. Taste profiles of A24h, <1kDa, HP3 in model chicken broth

Taste attribute	A24h	<1kDa	HP3
Bitter	3.4±1.3	3.8±1.1	3.3±1.0
Umami	4.4±1.4	4.5±1.2	4.7±1.1
Kokumi	4.6±1.2	3.8±1.1	4.2±1.2
Overall acceptability	4.2±1.4	4.0±1.2	4.3±1.7

(2) 분리단계별 시료의 DPPH 라디칼 소거능

(가) 한외 여과법(Ultrafiltration)

한외여과법에 의해 분자량 범위로 분리된 두 개의획분에 대한 DPPH 라디칼 소거능을 조사한 결과(Fig. 26), 1kDa 이하와 이상의 획분에서 각각 9-62%와 6-50%의 농도의존적인 효과를 보였다. 특히, 1kDa 이하의 저분자 획분의 IC<sub>50</sub>값이 0.78 mg/mL로 0.97 mg/mL의 1kDa 이상의 획분보다 높은 활성을 보였다. Wheat gluten을 Pepsin과 Pancreatin으로 가수분해 후 분획한 3kDa 이하 획분(1 mg/mL에서 82% 소거능)과 wheat gluten을 Papain으로 가수분해하여 얻은 5kDa 이하 획분(0.24 mg/mL에서 80% 소거능)보다는 다소 낮은 결과를 나타내었다. 따라서, 본 연구에서 한외여과를 이용하여 얻은 분획물 중 저분자로 구성된 획분이 관능특성과 함께 DPPH 라디칼 소거능도 우수함을 알 수 있었다.

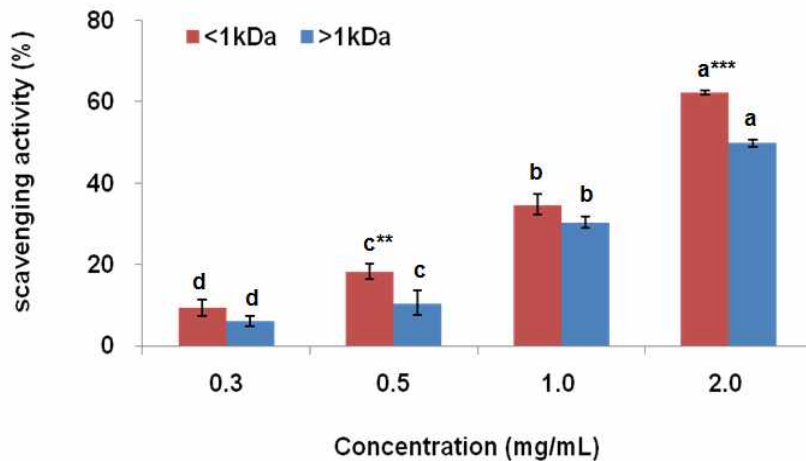


Fig. 80. DPPH radical scavenging activity of fractions obtained from A24h through ultrafiltration (UF) membrane system. Different lower-case letters on the bars indicate a significant difference among the different concentration of fractions, respectively ( $p < 0.05$ ).

\*Values with identical letters indicate a significant difference among fractions with the same concentration, respectively ( $p < 0.05$ ).

(나) Reversed phase HPLC chromatography

Grace Vydac Protein & Peptide C<sub>18</sub> column을 이용하여 얻은 3가지 획분에 대한 DPPH 라디칼 소거능을 조사하였다(Fig. 81). HP1, HP2, HP3는 0.3-2.0 mg/mL 농도에서 각각 5-31%, 16-76%, 15-73%의 농도의존적인 효과를 보였다. 특히, HP2의 IC<sub>50</sub>값은 0.59 mg/mL, HP3는 0.64 mg/mL으로 1kDa 이하의 한외여과 획분에 비해 다소 증가한 활성을 보였으나 크게 정제되지는 않았다.

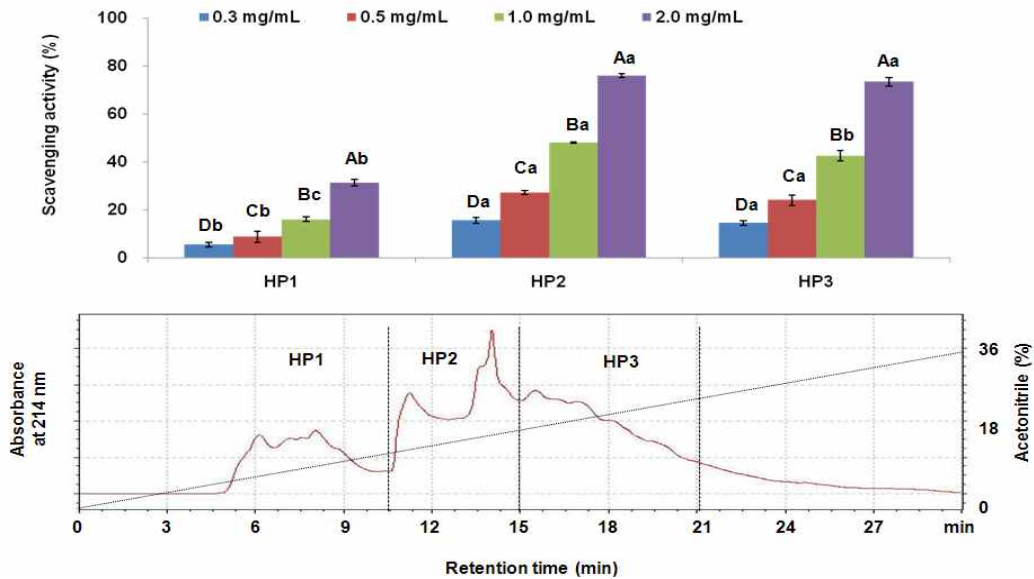


Fig. 81. DPPH radical scavenging activity of fractions obtained from <1kDa through ultrafiltration (UF) membrane system. Different upper- and lower-case letters on the bars indicate a significant difference among the different concentration of fractions and among the different fractions with the same concentration, respectively ( $p < 0.05$ ).

(3) 분리단계별 시료의 특성분석 및 가공조건 보완

(가) A24h로부터 고꾸미 펩타이드 정제에 따른 패턴분석

우수한 관능특성을 보인 A24h와 이의 한외여과를 통하여 얻어진 1 kDa 이하 획분 및 C<sub>18</sub> 획분(HP1, HP2, HP3)의 hydrophobicity 특성을 분석하였다(Fig. 82). HPLC profile 결과는 용출된 펩타이드들의 hydrophobicity를 3개의 카테고리로 그룹화(0-5분, 5-10분, 10-35분: Low, Midium, High-hydrophobicity peptides)하여 분석된 chromatogram의 area(%)를 비교하였다. A24h는 72%의 High-hydrophobicity peptides로 1kDa이하 획분에 비해 1.3배 높게 나타나 저분자화에 따른 소수성 펩타이드 그룹의 감소를 예상할 수 있었다. 한편, C<sub>18</sub> column을 통과한 3가지 획분의 경우에는 용출 순서에 따라 High hydrophobicity peptide 구간의 비율이 HP1(59%), HP2(64%), HP3(83%)로 증가함을 보였다.



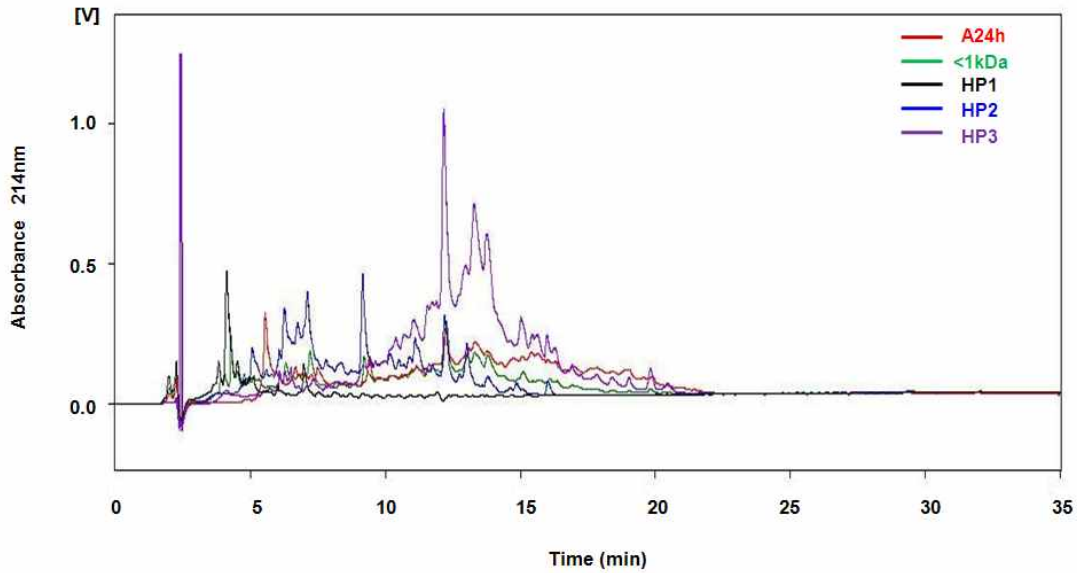


Fig. 82. Reversed-phase HPLC elution profiles of A24h, <1kDa, HP1, HP2, and HP3.

(나) 가공조건에 따른 A24h의 펩타이드 패턴, 고꾸미 및 항산화 활성 분석

가공처리에 따른 단백질 변성 가능성을 고려하여 제품의 안정성 연구의 일환으로 pH와 가열 처리에 따른 hydrophobicity 특성을 조사하기 위하여 우수한 관능특성을 보인 A24h시료를 pH 4, 7, 9와 60, 80, 100°C에서의 열처리에 따른 특성변화를 조사하였다. Fig. 83-84는 위와 같이 용출된 펩타이드들의 hydrophobicity를 3개의 카테고리로 그룹화(0-5분, 5-10분, 10-35분: Low, Midium, High-hydrophobicity peptides)하여 분석된 chromatogram의 area(%)를 비교한 결과, pH와 가열에 따른 High-hydrophobicity peptides 함량은 69-75%로써 큰 변화를 보이지 않았고 고꾸미 관능 특성에서도 유의적인 차이를 나타내지 않았다(Data not shown). 반면에 Costa et al. (2007)의 연구결과에 따르면 alcalase를 사용한 Whey proein 가수분해물과 65, 95°C에서 열처리된 Whey proein 가수분해물들의 High hydrophobicity peptide 함량 51.3, 43.3, 22.9%로써 온도가 높아짐에 있어서 High hydrophobicity peptide 함량은 감소함을 나타내었다. 따라서 A24h의 안정된 가공적성을 나타내었다고 생각된다.

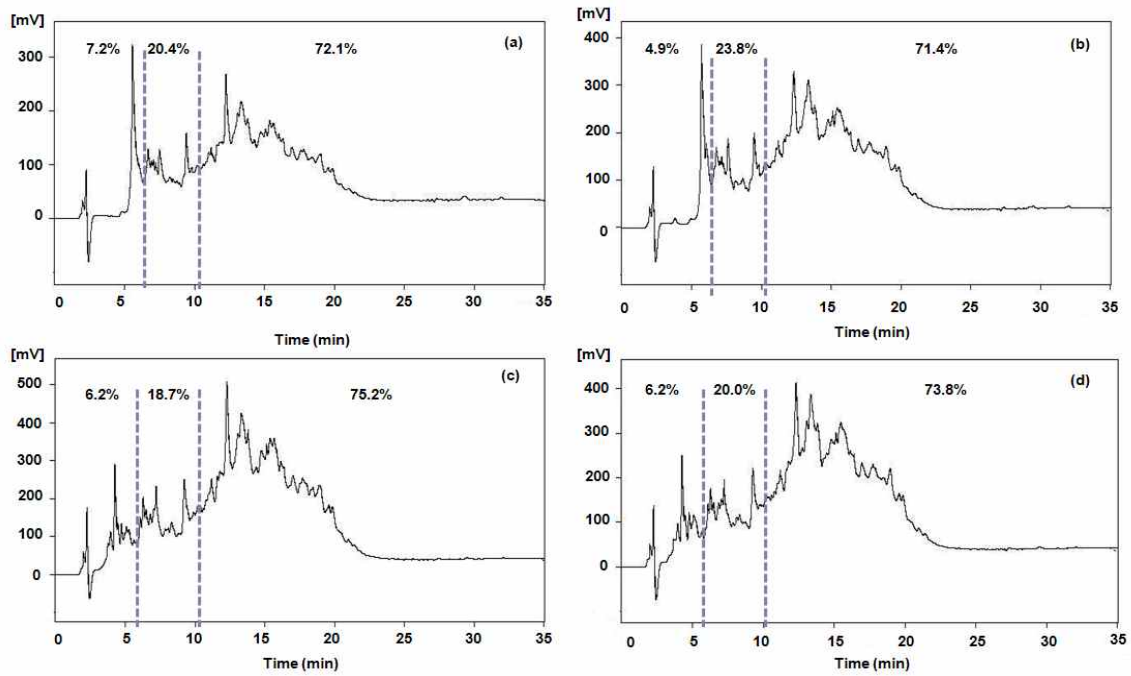


Fig. 83. Reversed-phase HPLC elution profiles of pH on A24h; (a) No treatment, (b) pH 4, (c) pH 7, (d) pH 9.

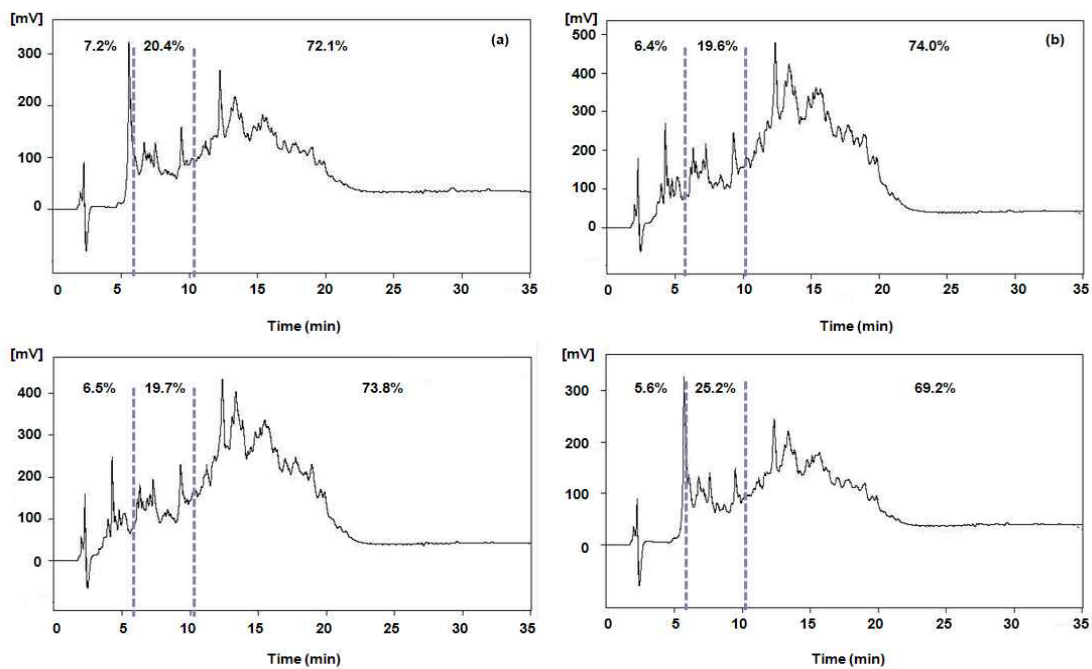


Fig. 84. Reversed-phase HPLC elution profiles of heating temperature on A24h; (a) No treatment, (b) 60°C, (c) 80°C, (d) 100°C.

기능성 펩타이드의 식품소재화에 있어서의 문제점은 가공처리에 따른 단백질 변성에 의한 활성저하 등이다. 따라서 본 연구에서는 pH와 열처리 후 DPPH 라디칼 소거능의 변화를 조사하기 위하여 우수한 관능특성을 보인 A24h를 pH(4, 5, 7, 9) 및 가열(25, 60, 80, 100℃에서 10분) 처리 후 DPPH 라디칼 소거능을 측정하였다. pH 처리에 따른 DPPH 라디칼 소거능은 pH가 산성에서 중성의 범위에서는 유의적인 차이를 보이지 않았으나( $p < 0.05$ ), 알칼리성이 강해짐에 따라 활성이 감소하는 경향을 보였다(Fig. 85). 한편, 가열처리에 의해서는 Fig. 86에서와 같이, 모든 온도구간에서 유의적인 활성 차이를 보이지 않음으로써 A24h의 열에 대한 강한 안정성을 확인할 수 있었다( $p < 0.05$ ). 따라서 본 연구에서 제조한 A24h는 관능적인 우수성과 함께 가공조건에서도 기능성을 유지할 수 있는 안정성을 나타내었다.

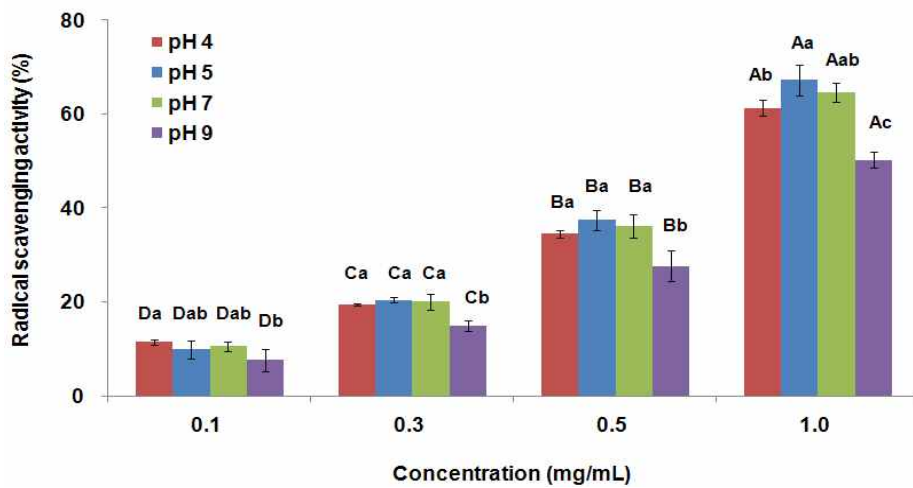


Fig. 85. Effect of pH on the DPPH radical scavenging activity of A24h. Different upper- and lower-case letters on the bars indicate a significant difference among the different concentration of A24h and among the different pH of A24h with the same concentration, respectively ( $p < 0.05$ ).

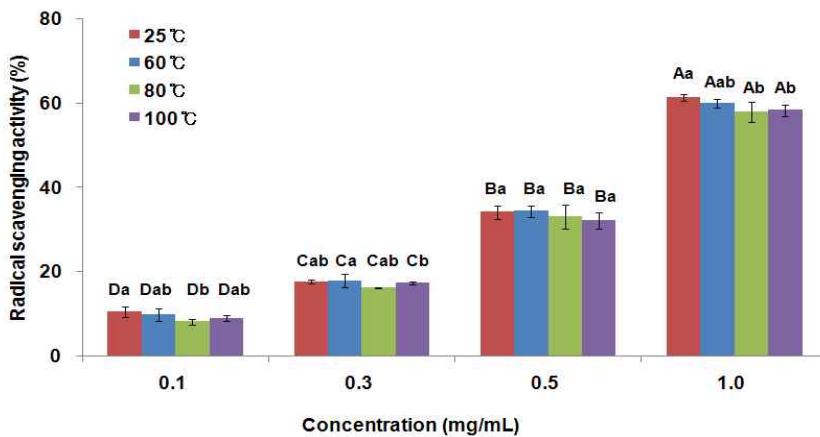


Fig. 86. Effect of heating temperature on the DPPH radical scavenging activity of A24h. Different upper- and lower-case letters on the bars indicate a significant difference among the different concentration of A24h and among the different temperature of A24h with the same concentration, respectively ( $p < 0.05$ ).

#### (4) 시제품 분석

##### (가) 펩타이드 패턴분석

본 연구에서 개발한 시제품(Umami-taste, Kokumi-taste)과 target 제품인 아지노모토사의 Koji-Aji의 펩타이드 특성을 비교하였다. Fig. 87에서와 같이 세 가지 제품 모두 chromatogram이 15분 안에 분석됨으로써 low와 medium hydrophobicity한 특성의 펩타이드가 주를 이룸을 알 수 있었다.

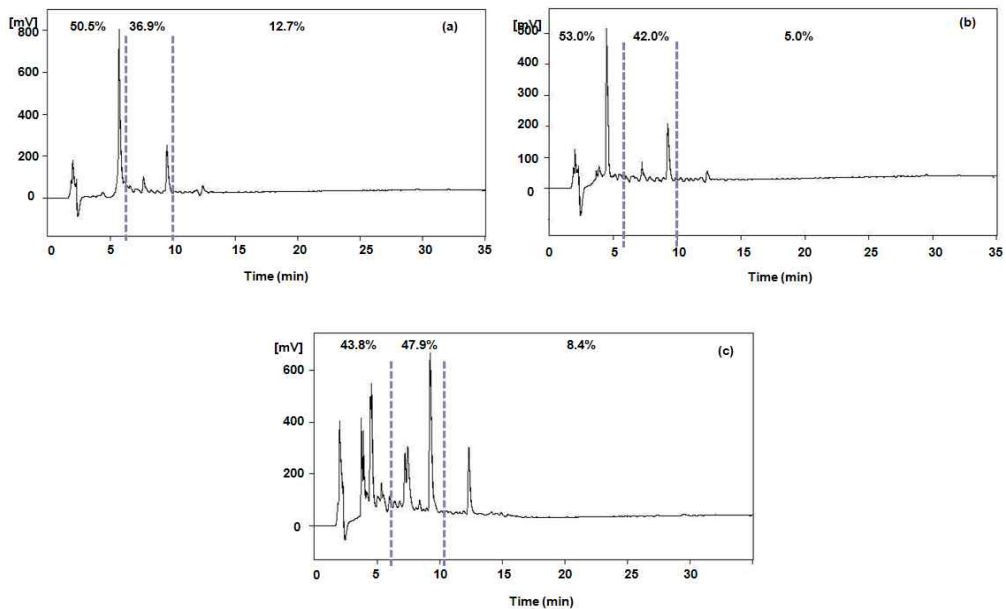


Fig. 87. Reversed-phase HPLC elution profiles of trial products (a, Umami-taste; b, Kokumi-taste) and target product (c, Koji-Aji).

##### (나) DPPH 라디칼 소거능

본 연구에서 개발한 시제품(Umami-taste, Kokumi-taste)과 target 제품인 아지노모토사의 Koji-Aji의 항산화 활성을 비교하고자 DPPH 라디칼 소거능을 조사하였다. Fig. 88과 같이, 시제품인 Umami-taste, Kokumi-taste와 target 제품인 Koji-Aji의 DPPH라디칼 소거능은 0.3-2.0 mg/mL 농도에서 각각 3-24%, 2-29%, 5-45%의 농도의존적인 효과를 나타내었다. 그러나 Target 제품인 아지노모토사의 Koji-Aji가 본 연구의 시제품보다 약 2배정도 높은 소거능을 나타내었다.

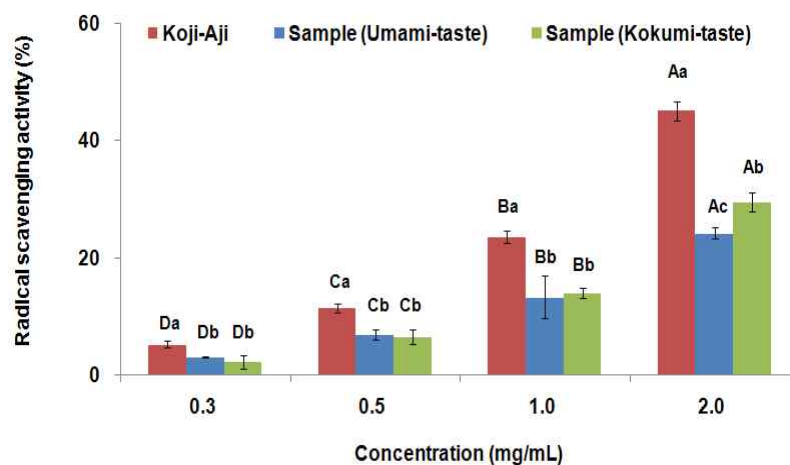


Fig. 88. Effect of heating temperature on the DPPH radical scavenging activity of target product and trial products. Different upper- and lower-case letters on the bars indicate a significant difference among the different concentration of sample and among the different of sample with the same concentration, respectively ( $p < 0.05$ ).

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

\* 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도 및 관련분야의 기술발전에의 기여도 등을 기술

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	관련분야에의 기여도
1차 연도 (2007)	우리밀, 양파, 마늘, 조미용효모추출물을 이용한 kokumi 조미소재 개발(샘표식품)	우리밀 단백질 분해효소를 생산하는 미생물의 분리 및 개량	100	우리밀의 이용성을 높일 수 있는 단백질 분해 방법
		고 Glutathione 생산 효모와 핵산 생산 효모의 탐색 및 개량	100	다양한 미생물 균주 개량에 적용 가능
	Kokumi 향미 특성 규명 및 process 조건 확립(이화여대)	Kokumi 주요 성분 분석법 확립	100	다양한 식품의 kokumi 성분 분석 가능
		Target제품 특성파악	100	Target제품 내의 pyrazine류, sulfur 함유 성분, free glutamic acid, 핵산, NaCl의 분석 및 제품 특성 파악
	최적의 kokumi를 위한 펩타이드 제조 조건 확립 (한양대)	Kokumi 관련 펩타이드 분석법 확립	100	kokumi 관련 펩타이드의 분석법 확립
		Kokumi 관련 펩타이드 제조조건 확립	100	효소종류 및 가수분해도에 따른 밀단백질 가수분해물의 이미 분석
	Target 제품 분석	100	Target 제품의 펩타이드 패턴 분석	

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	관련분야에의 기여도
2차 연도 (2008)	우리밀, 양파, 마늘, 조미용효모추출물을 이용한 kokumi 조미소재 개발(샘표식품)	우리밀, 양파, 마늘, 효모엑기스로부터 kokumi 소재추출법 확립	100	다른 농산물의 추출방법에 응용 가능
		고 glutathione, 핵산 및 펩타이드 생산균주 개발	100	효모로부터 kokumi 소재 추출법 개발
		가수분해 정도를 달리한 추출물의 묘사분석을 통해 kokumi가 우수한 분해공정 모색	100	묘사분석 패널의 선정 및 훈련으로 다양한 제품의 관능평가에 기여
		Kokumi의 묘사분석 방법 및 절차 개발	100	가수분해 정도를 달리한 추출물의 관능용어 개발, 정의 및 표준시료 확립
	Kokumi 향미 특성 규명 및 process 조건 확립(이화여대)	Formulation 및 process조건 확립	100	조미소재를 완제품에 응용시 formulation 비율 및 process 조건은 다양한 제품의 formulation에 기여
	최적의 kokumi를 위한 펩타이드 제조 조건 확립 (한양대)	Kokumi 관련 펩타이드 제조조건 최적화 및 생리활성 탐색	100	GSH 수율 최적화 및 GSH 생리활성 탐색 tool의 기여 GSH에 기인하는 관능검사법 기여 가수분해도에 따른 펩타이드 패턴과 kokumi 및 생리활성 탐색
펩타이드 패턴/kokumi/생리활성 상관관계 분석		100	펩타이드 패턴/kokumi/생리활성과의 상관관계 분석 및 최적조건 확립	

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	관련분야에의 기여도
3차 연도 (2009)	우리밀, 양파, 마늘, 조미용 효모추출물을 이용한 kokumi 조미소재 개발(샘표식품)	시제품 제작 및 제조공정 scale-up 및 kokumi 소재 제제화 공정 확립	100	소재의 분말화 공정 개발에 기여
		식품 적용 test 및 관능검사	100	신규 Kokumi 소재 발굴의 관능에 기여
	Kokumi 향미 특성 규명 및 process 조건 확립(이화여대)	시제품 향미특성 분석 및 보완	100	신규 소재개발의 관능 지표로서의 기여
	최적의 kokumi를 위한 펩타이드 제조 조건 확립 (한양대)	단백질 가수분해물로부터 kokumi 펩타이드 정제	100	신규 kokumi 펩타이드의 정제에 기여
		가공조건에 따른 kokumi 펩타이드 변화 분석	100	펩타이드의 변화에 따른 특성분석에 기여
		시제품 펩타이드 분석 및 가공조건 보완	100	

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 1. 실용화 ▪ 산업화 계획(기술실시 등)

#### 가. 조미 소재 개발

상기의 방법을 활용하여 아래 그림에서 제시하는 바와 같이 3종의 조미소재를 개발하였다. 그 관능특성은 깊은 맛(strong), 조화로운 맛(balance), 풍부한 맛(richness)이 특징이다.



#### 나. 소재 적용한 완제품(연두) 사업화 성공



자연발효로 만든 4세대 조미료, 건강하게 요리의 맛을 살리는 신개념 맛내기 재료

- '연두'는 용도나 취향에 따라 깊은 맛, 담백한 맛 두 종류가 출시될 예정이다.
- 형태는 액상이라서 분말 조미료(텍스트린, 점도증강 첨가물함유)처럼 입구가 뜨거운 김에 닿아 굳거나 눅눅해지지 않고, 깔끔하게 사용할 수 있다.
- 연두의 원료는 국산 양파, 대파, 마늘, 생강, 무, 브로콜리, 표고버섯 등 국산재료를 사용하였고, L-글루타민산나트륨, 합성보존료, 설탕, 쇠고기향미유(우지), 텍스트린 등 첨가하지 않았다.

(천연 고쿠미 조미소재를 이용하여 개발한 제품(연두)은 공장출하가격 기준 판매액은 4,950원



(320g)으로 10년 4월 중순부터 이마트, 롯데마트, 홈플러스 매장에서 판매되고 있다.

**다. 기술료 납부 및 기술실시**

- (1) Kokumi 과제에 대한 기술료(13,860천원) 납부 및 기술 실시 완료
- (2) 연구성과 이용유형 : 기존제품 및 신제품에 개발된 Kokumi를 부가하여 활용

**라. 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등**

- (1) 특허 3건 출원 및 등록 추진예정
  - (가) 코쿠미가 증강된 저분자 대두 펩타이드 제조방법(출원번호: 10-2009-0133092)
  - (나) 글루타치온 함량이 증대된 신규 효모 변이주, 그 제조방법 및 용도(출원번호 :10-2010-0038120)
  - (다) RNA 함량이 증대된 신규 효모 변이주, 그 제조방법 및 용도(출원번호: 10-2010-0027748)
- (2) 논문 1건 및 2건 추진 중
  - (가) Comparison of volatile Maillard reaction products from tagatose and other reducing sugars with amino acids, In Hee Cho, Sarah Lee, Hae-Roung Jun, Hoe-Jin Roh, and Young-Suk Ki, Food Sci. Biotechnol. 19(2): 431-438 (2010)
  - (나) 글루타치온 고함유 정미성 효모추출물 개발, 한국식품과학회지(in accepted,2010 투고중)
  - (다) Preparation and characterization of taste-active compounds by enzymatic hydrolysis of wheat gluten, Food Research International (투고 준비중, 2010년 5월)
- (3) 국내외 학술발표(해외2건, 국내1건)
  - (가) Umami Evaluation and Biological Activities of Wheat Protein Hydrolysates with Different Degree of Hydrolysis,14th World Congress of Food Science &Technology, (TS13-41) Oct 19-23, 2008, Sanghai, China (session time: Oct 21, Tuesday, Morning)
  - (나) Kokumi evaluation and biological activities of domestic and imported wheat protein hydrolysates produced by different proteases,2009 IFT Annual Meeting, (058-13) Jun 6-9, Anaheim, CA, USA (Session Time: Sunday Jun 7, 2009 3:00 PM - 5:00 PM) 미국식품과학회 (Institute of Food Technologists)
  - (다) Comparison of taste-enhancing property and anti-radical effects of the fractions isolated from wheat gluten hydrolysate, 2010년 한국식품과학회
- (4) 홍보실적 7건

주요 일간지			
순서	신문명	보도일자	비고
1	연합뉴스	2010. 5. 9	-
2	공감코리아	2010. 5. 10	-
3	뉴스웨이브	2010. 5. 10	-
4	아시아투데이	2010. 5. 10	-
5	중앙일보	2010. 5. 10	-
6	동아일보	2010. 5. 10	-
7	업코리아	2010. 5. 10	-

(5) 추가연구, 타연구에 활용 계획 등

(가) 조미소재를 응용한 제품 연두를 출시하여 이를 바탕으로, 앞으로는 첨가물을 최소화하여 식물성 단백질을 이용하여 발효공법을 통하여 만들어진 맛내기 소재로만 맛을 낼 수 있는 천연지향 맛내기 소재를 개발 예정.

(나) 이미 상용화 되고 있는 제품에 조미소재를 적용하여 대체방안 검토

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 해당 사항 없음

## 제 7 장 참고문헌

1. KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL Vol. 31, No.2, pp. 475~481(1999).
2. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. Vol. 29, No.4, 234~239(2001).
3. Kor. J. Microbiol. Biotechnol. Vol. 31, No.4, 435~438(2003).
4. (주)신아로, 천연조미료(아로마일드, 아지파루스 비에프) 제품 소개서.
5. (주)비전바이오켐, 막사버 와이비 페이스트 제품 규격서 및 설명서.
6. Gelinás P. and Barrette. Protein enrichment of potato processing waste through yeast fermentation. *Bioresour. Technol.* 98, 1138-1143(2007)
7. Choi HK, Lee CH. Submerged culture of *Phellinus linteus* in a stirred tank fermenter and an airlift fermenter. *Korean J. Chem. Eng.*, 38: 310-315(2000)
8. 채수규. (2002). 표준 식품분석학. 지구문화사.
9. H. I. Hwang., T. G. Hartman., R. T. Rosen., C. T. Ho.(1993) Formation of pyrazines from the Maillard reaction of glucose and glutamine-*amide*-<sup>15</sup>N. *J. Agric. Food Chem*
10. Izzo, H. V., C. T. Ho.(1992) Ammonia affects Maillard chemistry of an extruded autolyzed yeast extract: pyrazine aroma generation and brown color formation. *J.Food Sci.*
11. M. Tikik, K. Tikik, M. Ann.(2006) Development of inosine monophosphate and its degradation products during aging of pork  
of different qualities in relation to basic taste and retronasal flavor perception of the meat. *J. Agric Food. Chem.*
12. Ames JM, Guy RCE, Kipping GJ.(2001) Effect of pH, temperature, and moisture on the formation of volatile compounds in glycine/glucose model systems. *J.Agric. Food Chem*
13. Shu-yao Tsai, Tsai-Ping Wu, Shih-jeng Huang.(2007) Nonvolatile taste components of *Agricus bisporus* harvested at  
different stage of maturity. *Food Chem.*
14. M.T. Veciana-Nogues, M. Izquierdo-Pulido & M.C. Vidal-Carou(1996) Determination of ATP related compounds in fresh  
and canned tuna fish by HPLC. *Food Chem.*
15. Cho, I.H., Kim, T.H., Cho, S.K., Kim, Y.S., (2002) Analysis of volatile compounds in bulgogi. *Food Sci. Biotechnol*
16. Kim, T.H., Lee, S.M., Kim, Y.S., Kim, K.H., Oh, S., Lee, H.J. (2003) Aroma dilution method using GC injector split ratio  
for volatile compounds extracted by headspace solid phase microextraction. *Food Chem.*
17. Kim, T.H., Lee, S.M., Kim, Y.S., Kim, K.H., Oh, S., Lee, H.J. Characteristics of Aroma-active compounds in the  
pectin-elicited suspension culture of *Zanthoxylum piperitum* (prickly ash). (2002)*Food Chem.*
18. George A. burdock, pH.D. Fenaroli's handbook of Flavor ingredients fifth edition. CRC press
19. M Iabel Cambero, Caudia I Pereira-Lima, Juan A Ordonez and Gonzalo D Garcia de Fernando (2000). Beef broth flavour:  
relation of components with the flavour developed at different cooking temperatures. *J. Sci*

Food Agric

20. Pei-Dih Chiang, Chih-Tai Yen, Jeng-Leun Mau. (2007). Non-volatile taste components of various broth cubes. Food Chem.
21. Claudine Chatpentier, Jerome Aussenac, Monique Charpentier, Jean-Claude Prome, Bruno Duteurte and Michel Feuillat  
(2005)Release of nucleotides and nucleosides during yeast autolysis: kinetics and potential impact on flavor. J. Agric. Food. Chem.
22. HPLC에 의한 시판수산건제품의 ATP 분해생성물의 신속정량법 이용호, 구재근, 안창범, 차용진 (1984) Bull. Korean Fish. Soc.
23. Taylor, M.W.; Hershey, R. A.; Levine, R. A.; Coy, K.; Olivelle,S. Improved method of resolving neucleotides by reverse-phase high performance liquid chromatography. (1981). J. Chromatogr.
24. Tressl R, Helak B, Martain N, Kersten E. (1989) Formation of amino acid specific Maillard products and their contribution to thermally generated aromas. American Chemical Society, Washington DC, MD, USA
25. Tai C-Y, Ho C-T. (1998) Influence of glutathione oxidation on thermal formation of Maillard aromas. J.Agric.Food Chem
26. Hwang H-I, Hartman TG, Ho C-T. (1995) Relative reactivities of amino acids in pyrazine formation. J. Agric. Food Chem
27. Mega JA. (1992) Pyrazine update. Food Rev. Int.
28. Chen J, Ho C-T. (1999) Comparison of volatile generation in serine/threonine/glutamine-ribose/glucose/fructose model system. J. Agric. Food Chem
29. M. J. Nozal, J. L. Bernal, M. L. Torbio, J. C. Diego, A. Ruiz(2004) Rapid and sensitive method for determining free amino acids in honey by gas chromatography with flame ionization of mass spectrometric detection. J. Chromatogr.
30. F.Kugler, S. Graneis.,(2006) Determination of free amino compounds in betalanic fruits and vegetables by gas chromatography with flame ionization and mass spectrometric detection. J. Chem.
31. 김현위, 김영준, 배수경, 심건섭(2001) 라면스프류의 감미성분 분석연구. Korean J. Food Sci.
32. M. Tik, K. Tik, M. Ann.(2006) Development of inosine monophosphate and its degradation products during aging of pork of different qualities in relation to basic taste and retronasal flavor perception of the meat. J. Agric Food. Chem..
33. Arwa Mustafa Per Aman, Roger Andersson, Alfaf Kamal-Eldin(2007). Analysis of free amino acids in cereal products. Food. chem.
33. C.-K. Kim, J.I. Rhee. Kor. J. Biotechnol. Bioeng. 19 (2004) 192.
34. S.-C. Liang, H. Wang, Z.-M. Zhang, X. Zhang, H.-S. Zhang. Anal. Chim. Acta 451 (2002) 211.
35. T. Yoshida. J. Chromatogr. B 678 (1996) 157.

36. A.R. Ivanov, I.V. Nazimov, L. Baratova, A.P. Lobazov, G.B. Popkovich. *J. Chromatogr. B* 913 (2001) 315.
37. C.-S. Yang, S.-T. Chou, L. Liu, P.J. Tsai, J.-S. Kuo. *J. Chromatogr. B* 674 (1995) 23.
38. D.P. Jones, J.L. Carlson, P.S. Samiec, P.J. Sternberg, V.C.J. Mody, R.L. Reed, L.A.S. Brown. *Clin. Chim. Acta* 275 (1998) 175.
39. A.R. Ivanov, I.V. Nazimov, L.A. Baratova. *J. Chromatogr. A* 870 (2000) 433.
40. A.R. Ivanov, I.V. Nazimov, L. Baratova. *J. Chromatogr. A* 895 (2000) 157.
41. D. Tsikas, J. Sandmann, D. Holzberg, P. Pantazis, M. Raida, J.C. Frolich. *Anal. Biochem.* 273 (1999) 32.
42. N. Smith, M. Dunnett, P.C. Mills. *J. Chromatogr. B* 673 (1995) 35.
43. S. Melnyk, M. Pogribna, I. Pogribny, R.J. Hine, S.J. James. *J. Nutr. Biochem.* 10 (1999) 490.
44. E. Camera, M. Rinaldi, S. Briganti, M. Picardo, S. Fanali. *J. Chromatogr. B* 757 (2001) 69.
45. J. Lyons, A. Rauh-Pfeiffer, Y.M. Yu, X.-M. Lu, D. Castillo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000) 5071.
46. W. Jin, W. Li, Q. Xu. *Electrophoresis* 21 (2000) 774.
47. G. Piccoli, M. Fiorani, B. Biagiarelli, F. Palma, L. Potenza, A. Amicucci, V. Stocchi. *J. Chromatogr. A* 676 (1994) 239.
48. T. Yoshida. *J. Chromatogr. B* 678 (1996) 157.
49. W. Li, S.S. Bollecker, J.D. Schofield. *J. Cereal Sci.* 39 (2004) 205.
50. C.-S. Yang, P.-J. Tsai, W.-T. Chen, L. Liu, J.-S. Kuo. *J. Chromatogr. B* 667 (1995) 41
51. G. Shi, J. Lu, F. Xu, W. Sun, L. Jin, K. Yamamoto, S. Tao, J. Jin. *Anal. Chim. Acta* 391 (1999) 307.
52. C.C. Yan, R.J. Huxtable. *J. Chromatogr. B* 672 (1995) 217.
53. J. You, X. Fan, Q. Zhu, Y. Su. *Anal. Chim. Acta* 367 (1998) 69
54. A.P. Senft, T.P. Dalton, H.G. Shertzer. *Anal. Biochem.* 280 (2000) 80.
55. X. Ping Chen, R.F. Cross, A.G. Clark, W.L. Baker. *J. Chromatogr. B* 709 (1998) 19.
56. J. Lakritz, C.G. Plopper, A.R. Buckpitt. *Anal. Biochem.* 247 (1997) 63.
57. R.L. Norris, G.K. Eaglesham, G.R. Shaw, M.J. Smith, R.K. Chiswell, A.A. Seawright, M.R. Moore. *J. Chromato. B* 762 (2001) 17.
58. M.A. Raggi, R. Mandrioli, F. Bugamelli, C. Sabbioni. *Chromatographia* 46 (1997) 17.
59. Y. Iwasaki, M. Hoshi, R. Ito, K. Saito, H. Nakazawa. *J. Chromatogr. B* 389 (2006) 74.
60. M.J. Nozal, J.L. Bernal, L. Toribio, P. Marinero, O. Moral, L. Manzanos, E. Rodriguez. *J. Chromatogr. A* 778 (1997) 347.
61. P. Dominick, P.B. Cassidy, J.C. Roberts. *J. Chromatogr. B* 761 (2001) 1.
62. H. Ohmori, T. Kawase, M. Higashiura, Y. Chisaka, K. Nakata, Y. Yamasaki. *J. Chromatogr. B* 762 (2001) 25.
63. J.-L. Luo, F. Hammarqvist, I.A. Cotgreave, C. Lind, K. Andersson. *J. Wernerman, J. Chromatogr. B* 670 (1995) 29.
64. A.I. Haj-Yehia, L.Z. Benet. *J. Chromatogr. B* 666 (1995) 445.
65. A.F. Loughlin, G.L. Skiles, D.W. Alberts, W.H. Schaefer. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 26 (2001) 131.

66. C. Parmentier, P. Leroy, M. Wellman, A. Nicolas. J. Chromatogr. B 719 (1998) 37.
67. K.J. Lenton, H. Therriault, J.R. Wagner. Anal. Biochem. 274 (1999) 125.
68. R.C. Rose, A.M. Bode. Biochem. J. 306 (1995) 101.
69. S. Arttmangkul, M.K. Bhalgat, R.P. Haugland, Z. Diwu, J. Liu, D.H. Klaubert. Anal. Biochem. 269 (1999) 410.
70. C. Muscari, M. Pappagallo, D. Ferrari, E. Giordano, C. Capanni, C.M. Caldarera, C. Guarnieri. J. Chromatogr. B 707 (1998) 301.
71. T. Toyooka, J. Tanabe, Y. Kashihara. Anal. Chim. Acta 433 (2001) 1.
72. T. Oe, T. Ohyagi, A. Naganuma. J. Chromatogr. B 708 (1998) 285.
73. S. Zhang, W.-L. Sun, W. Zhang, W.-y. Qi, L.-t. Jin, K. Yamamoto, S. Tao, J. Jin. Anal. Chim. Acta 386 (1999) 21.
74. S. Wen, T. Zhang, T. Tan. J. Proc. Biochem. 40 (2005) 3473
75. S. Brian, R.A. Cummings, B. Roy, L.H. Lash. J. Biochem. Biophysic. Res. Comm. 276 (2000) 940
76. A. Dunkel, J. Koster, T. Hofmann. J. Agric. Food Chem. 55 (2007) 6712
77. M. Toshiro, C.H. Li, Y. Osajima. J. Peptide Sci. 5 (1999) 289
78. S.J. Rho, J.S. Lee, Y.I. Chung, Y.W. Kim, H.G. Lee. Proc Biochem. 44 (2009) 490
79. J.M. Kim, J.H. Whang, K.M. Kim, J.H. Koh, H.J. Suh. Proc Biochem. 39 (2004) 989
80. A. Bougatef, N. Nedjar-Arroume, L. Manni, R. Ravallec, A. Barkia. Food Chem 118 (2010) 559
81. C.H. Tang, X.S. Wang, X.Q. Yang. Food Chem. 114 (2009) 1484
82. Y. Li, T. Zang, W. Mu, J. Liu. Food Chem. 106 (2008) 444
83. K. Zhu, H. Zhou, H. Qian. Proc Biochem. 41 (2006) 1296
84. X. Kong, H. Zhou, Y. Hua. J. Sci Food Agric. 88 (2008) 920
85. J.S. Wang, M.M. Zhao, Q.Z. Zhao, Y.M. Jiang. Food Chem. 101 (2007) 1658
86. C.Y. Chang, K.C. Wu, S.H. Chiang. Food Chem. 100 (2007) 1537
87. C.H. Tang, J. Peng, D.W. Zhen, Z. Chen. Food Chem. 115 (2009) 672
88. X. Peng, Y.L. Xiong, B. Kong. Food Chem. 113 (2009) 196
89. S.K. Chung, T. Osawa, S. Kawakishi. Biosci Biotech. Biochem. 61 (1997) 118
90. E.L. Costa, J.A.R. Gontijo, F.M. Netto. Int Dairy J. 17 (2007) 632

## 참고 문헌(협동1기관 : 이화여대)

1. 채수규. (2002). 표준 식품분석학. 지구문화사.
2. H. I. Hwang., T. G. Hartman., R. T. Rosen., C. T. Ho.(1993) Formation of pyrazines from the Maillard reaction of glucose and glutamine-*amide*-<sup>15</sup>N. J. Agric. Food Chem
3. Izzo, H. V., C. T. Ho.(1992) Ammonia affects Maillard chemistry of an extruded autolyzed yeast extract: pyrazine aroma generation and brown color formation. J.Food Sci.
4. M. Tikik, K. Tikik, M. Ann.(2006) Development of inosine monophosphate and its degradation products during aging of pork  
of different qualities in relation to basic taste and retronasal flavor perception of the meat. J.

Agric Food. Chem..

5. Ames JM, Guy RCE, Kipping GJ.(2001) Effect of pH, temperature, and moisture on the formation of volatile compounds in glycine/glucose model systems. J.Agric. Food Chem
6. Shu-yao Tsai, Tsai-Ping Wu, Shih-jeng Huang.(2007) Nonvolatile taste components of *Agricus bisporus* harvested at different stage of maturity. Food Chem.
7. M.T. Veciana-Nogues, M. Izquierdo-Pulido & M.C. Vidal-Carou(1996) Determination of ATP related compounds in fresh and canned tuna fish by HPLC. Food Chem.
8. Cho, I.H., Kim, T.H., Cho, S.K., Kim, Y.S., (2002) Analysis of volatile compounds in bulgogi. Food Sci. Biotechnol
9. Kim, T.H., Lee, S.M., Kim, Y.S., Kim, K.H., Oh, S., Lee, H.J. (2003) Aroma dilution method using GC injector split ratio for volatile compounds extracted by headspace solid phase microextraction. Food Chem.
10. Kim, T.H., Lee, S.M., Kim, Y.S., Kim, K.H., Oh, S., Lee, H.J. Characteristics of Aroma-active compounds in the pectin-elicited suspension culture of *Zanthoxylum piperitum* (prickly ash). (2002)Food Chem.
11. George A. burdock, pH.D. Fenaroli's handbook of Flavor ingredients fifth edition. CRC press
12. M Iabel Cambero, Caudia I Pereira-Lima, Juan A Ordonez and Gonzalo D Garcia de Fernando (2000). Beef broth flavour: relation of components with the flavour developed at different cooking temperatures. J. Sci Food Agric
13. Pei-Dih Chiang, Chih-Tai Yen, Jeng-Leun Mau. (2007). Non-volatile taste components of various broth cubes. Food Chem.
14. Claudine Chatpentier, Jerome Aussenac, Monique Charpentier, Jean-Claude Prome, Bruno Duteurte and Michel Feuillat (2005)Release of nucleotides and nucleosides during yeast autolysis: kinetics and potential impact on flavor. J. Agric. Food. Chem.
15. HPLC에 의한 시판수산건제품의 ATP 분해생성물의 신속정량법 이응호, 구재근, 안창범, 차용진 (1984) Bull. Korean Fish. Soc.
16. Taylor, M.W.; Hershey, R. A.; Levine, R. A.; Coy, K.; Olivelle,S. Improved method of resolving nucleotides by reverse-phase high performance liquid chromatography. (1981). J. Chromatogr.
17. Tressl R, Helak B, Martain N, Kersten E. (1989) Formation of amino acid specific Maillard products and their contribution to thermally generated aromas. American Chemical Society, Washington DC, MD, USA
18. Tai C-Y, Ho C-T. (1998) Influence of glutathione oxidation on thermal formation of Maillard aromas. J.Agric.Food Chem
19. Hwang H-I, Hartman TG, Ho C-T. (1995) Relative reactivities of amino acids in pyrazine formation. J. Agric. Food Chem

20. Mega JA. (1992) Pyrazine update. Food Rev. Int.
21. Chen J, Ho C-T. (1999) Comparison of volatile generation in serine/threonine/glutamine-ribose/glucose/fructose model system. J. Agric. Food Chem
22. M. J. Nozal, J. L. Bernal, M. L. Torbio, J. C. Diego, A. Ruiz(2004) Rapid and sensitive method for determining free amino acids in honey by gas chromatography with flame ionization of mass spectrometric detection. J. Chromatogr.
23. F.Kugler, S. Graneis.,(2006) Determination of free amino compounds in betalanic fruits and vegetables by gas chromatography with flame ionization and mass spectrometric detection. J. Chem.
24. 김현위, 김영준, 배수경, 심건섭(2001) 라면스프류의 감미성분 분석연구. Korean J. Food Sci.
25. M. Tikik, K. Tikik, M. Ann.(2006) Development of inosine monophosphate and its degradation products during aging of pork of different qualities in relation to basic taste and retronasal flavor perception of the meat. J. Agric Food. Chem..
26. Arwa Mustafa Per Aman, Roger Andersson, Alfaf Kamal-Eldin(2007). Analysis of free amino acids in cereal products. Food. chem.

## 참고 문헌(협동2기관 : 한양대)

1. C.-K. Kim, J.I. Rhee. Kor. J. Biotechnol. Bioeng. 19 (2004) 192.
2. S.-C. Liang, H. Wang, Z.-M. Zhang, X. Zhang, H.-S. Zhang. Anal. Chim. Acta 451 (2002) 211.
3. T. Yoshida. J. Chromatogr. B 678 (1996) 157.
4. A.R. Ivanov, I.V. Nazimov, L. Baratova, A.P. Lobazov, G.B. Popkovich. J. Chromatogr. B 913 (2001) 315.
5. C.-S. Yang, S.-T. Chou, L. Liu, P.J. Tsai, J.-S. Kuo. J. Chromatogr. B 674 (1995) 23.
6. D.P. Jones, J.L. Carlson, P.S. Samiec, P.J. Sternberg, V.C.J. Mody, R.L. Reed, L.A.S. Brown. Clin. Chim. Acta 275 (1998) 175.
7. A.R. Ivanov, I.V. Nazimov, L.A. Baratova. J. Chromatogr. A 870 (2000) 433.
8. A.R. Ivanov, I.V. Nazimov, L. Baratova. J. Chromatogr. A 895 (2000) 157.
9. D. Tsikas, J. Sandmann, D. Holzberg, P. Pantazis, M. Raida, J.C. Frolich. Anal. Biochem. 273 (1999) 32.
10. N. Smith, M. Dunnett, P.C. Mills. J. Chromatogr. B 673 (1995) 35.
11. S. Melnyk, M. Pogribna, I. Pogribny, R.J. Hine, S.J. James. J. Nutr. Biochem. 10 (1999) 490.
12. E. Camera, M. Rinaldi, S. Briganti, M. Picardo, S. Fanali. J. Chromatogr. B 757 (2001) 69.
13. J. Lyons, A. Rauh-Pfeiffer, Y.M. Yu, X.-M. Lu, D. Castillo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 (2000) 5071.



14. W. Jin, W. Li, Q. Xu. *Electrophoresis* 21 (2000) 774.
15. G. Piccoli, M. Fiorani, B. Biagiarelli, F. Palma, L. Potenza, A. Amicucci, V. Stocchi. *J. Chromatogr. A* 676 (1994) 239.
16. T. Yoshida. *J. Chromatogr. B* 678 (1996) 157.
17. W. Li, S.S. Bollecker, J.D. Schofield. *J. Cereal Sci.* 39 (2004) 205.
18. C.-S. Yang, P.-J. Tsai, W.-T. Chen, L. Liu, J.-S. Kuo. *J. Chromatogr. B* 667 (1995) 41
19. G. Shi, J. Lu, F. Xu, W. Sun, L. Jin, K. Yamamoto, S. Tao, J. Jin. *Anal. Chim. Acta* 391 (1999) 307.
20. C.C. Yan, R.J. Huxtable. *J. Chromatogr. B* 672 (1995) 217.
21. J. You, X. Fan, Q. Zhu, Y. Su. *Anal. Chim. Acta* 367 (1998) 69
22. A.P. Senft, T.P. Dalton, H.G. Shertzer. *Anal. Biochem.* 280 (2000) 80.
23. X. Ping Chen, R.F. Cross, A.G. Clark, W.L. Baker. *J. Chromatogr. B* 709 (1998) 19.
24. J. Lakritz, C.G. Plopper, A.R. Buckpitt. *Anal. Biochem.* 247 (1997) 63.
25. R.L. Norris, G.K. Eaglesham, G.R. Shaw, M.J. Smith, R.K. Chiswell, A.A. Seawright, M.R. Moore. *J. Chromatogr. B* 762 (2001) 17.
26. M.A. Raggi, R. Mandrioli, F. Bugamelli, C. Sabbioni. *Chromatographia* 46 (1997) 17.
27. Y. Iwasaki, M. Hoshi, R. Ito, K. Saito, H. Nakazawa. *J. Chromatogr. B* 389 (2006) 74.
28. M.J. Nozal, J.L. Bernal, L. Toribio, P. Marinero, O. Moral, L. Manzanos, E. Rodriguez. *J. Chromatogr. A* 778 (1997) 347.
29. P. Dominick, P.B. Cassidy, J.C. Roberts. *J. Chromatogr. B* 761 (2001) 1.
30. H. Ohmori, T. Kawase, M. Higashiura, Y. Chisaka, K. Nakata, Y. Yamasaki. *J. Chromatogr. B* 762 (2001) 25.
31. J.-L. Luo, F. Hammarqvist, I.A. Cotgreave, C. Lind, K. Andersson. *J. Chromatogr. B* 670 (1995) 29.
32. A.I. Haj-Yehia, L.Z. Benet. *J. Chromatogr. B* 666 (1995) 445.
33. A.F. Loughlin, G.L. Skiles, D.W. Alberts, W.H. Schaefer. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 26 (2001) 131.
34. C. Parmentier, P. Leroy, M. Wellman, A. Nicolas. *J. Chromatogr. B* 719 (1998) 37.
35. K.J. Lenton, H. Therriault, J.R. Wagner. *Anal. Biochem.* 274 (1999) 125.
36. R.C. Rose, A.M. Bode. *Biochem. J.* 306 (1995) 101.
37. S. Arttmangkul, M.K. Bhalgat, R.P. Haugland, Z. Diwu, J. Liu, D.H. Klaubert. *Anal. Biochem.* 269 (1999) 410.
38. C. Muscari, M. Pappagallo, D. Ferrari, E. Giordano, C. Capanni, C.M. Caldarera, C. Guarnieri. *J. Chromatogr. B* 707 (1998) 301.
39. T. Toyooka, J. Tanabe, Y. Kashihara. *Anal. Chim. Acta* 433 (2001) 1.
40. T. Oe, T. Ohyagi, A. Naganuma. *J. Chromatogr. B* 708 (1998) 285.
41. S. Zhang, W.-L. Sun, W. Zhang, W.-y. Qi, L.-t. Jin, K. Yamamoto, S. Tao, J. Jin. *Anal. Chim. Acta* 386 (1999) 21.
42. S. Wen, T. Zhang, T. Tan. *J. Proc. Biochem.* 40 (2005) 3473
43. S. Brian, R.A. Cummings, B. Roy, L.H. Lash. *J. Biochem. Biophys. Res. Comm.* 276

(2000) 940

44. A. Dunkel, J. Koster, T. Hofmann. *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 6712
45. M. Toshiro, C.H. Li, Y. Osajima. *J. Peptide Sci.* 5 (1999) 289
46. S.J. Rho, J.S. Lee, Y.I. Chung, Y.W. Kim, H.G. Lee. *Proc Biochem.* 44 (2009) 490
47. J.M. Kim, J.H. Whang, K.M. Kim, J.H. Koh, H.J. Suh. *Proc Biochem.* 39 (2004) 989
48. A. Bougatef, N. Nedjar-Arroume, L. Manni, R. Ravallec, A. Barkia. *Food Chem* 118 (2010) 559
49. C.H. Tang, X.S. Wang, X.Q. Yang. *Food Chem.* 114 (2009) 1484
50. Y. Li, T. Zang, W. Mu, J. Liu. *Food Chem.* 106 (2008) 444
51. K. Zhu, H. Zhou, H. Qian. *Proc Biochem.* 41 (2006) 1296
52. X. Kong, H. Zhou, Y. Hua. *J. Sci Food Agric.* 88 (2008) 920
53. J.S. Wang, M.M. Zhao, Q.Z. Zhao, Y.M. Jiang. *Food Chem.* 101 (2007) 1658
54. C.Y. Chang, K.C. Wu, S.H. Chiang. *Food Chem.* 100 (2007) 1537
55. C.H. Tang, J. Peng, D.W. Zhen, Z. Chen. *Food Chem.* 115 (2009) 672
56. X. Peng, Y.L. Xiong, B. Kong. *Food Chem.* 113 (2009) 196
57. S.K. Chung, T. Osawa, S. Kawakishi. *Biosci Biotech. Biochem.* 61 (1997) 118
58. E.L. Costa, J.A.R. Gontijo, F.M. Netto. *Int Dairy J.* 17 (2007) 632