

간장의 디펩티드와 맛의 상관관계 분석

한국과학기술정보연구원
전문연구위원 민태익
(mheen @reseat.re.kr)

1. 서론

- 간장은 전 세계에서 널리 사용되고 있으며 간장의 맛은 사용된 원료와 제조방법에 의존한다. 전형적인 일본간장(koikuchi, 농구간장)은 동량의 삶은 콩과 볶은 밀에 소금(NaCl 최종농도 17%)을 첨가하여 제조한다. 곰팡이, 유산균, 효모를 발효시킨 후 잘 숙성된 간장덧(mash)을 압착하여 저온 살균한다(Sugiyama 1984). 그러나 전통 중국간장은 농구간장보다 밀을 소량 사용하며 사용된 균주와 발효기간도 농구간장과는 완전히 다르다(Chou와 Ling 1998).
- 간장의 맛과 품질은 다양한 성분 때문이므로(Fukushima 1981), 간장 성분과 맛의 관계를 평가함으로써 간장의 품질을 향상시킬 수 있지만 간장 성분의 차이를 밝힌 연구는 소수에 불과하다. 아미노산, 당류, 유기산, 미네랄은 간장의 주요 맛 성분이며, 총 질소와 염 농도는 품질을 평가하는 유용한 지표이다. 그러나 이들 성분은 서로 상호작용하기 때문에 소수의 기본 맛 성분만으로 간장 맛을 설명하는 것은 곤란하다(Keast와 Breslin 2003).
- 간장의 감칠맛은 단백질의 효소분해로 생성된 L-글루탐산 농도에 의존하지만 Phe와 Tyr도 감칠맛 성분이다(Lioe 등 2004, 2007). Imamura 등(2009)은 농구간장의 맛을 감지하는 MSG와 glucose의 최저농도는 1.9%와 1.8%이며 수용액의 최저 감지농도는 0.026%와 0.57%라고 하였다. 이 사실은 맛 기여 성분이 간장 맛에 반드시 영향을 미치는 것이 아니고 다른 맛 성분도 맛에 상당한 영향을 미친다는 것이며, 총 질소와 소금 농도와 같은 기존의 간장품질에 대한 지표가 완벽하지 않다는 것을 의미한다.
- 따라서 간장의 맛을 연구하기 위해 다양한 성분이 분석되어야 한다. 일

본 전통간장의 주원료인 대두와 밀의 총 단백질 중 70~90%는 수용성 유리아미노산과 펩티드로 분해된다(Chou와 Ling 1998). 일반적으로 2~3개의 아미노산으로 구성된 저분자 펩티드는 농구간장의 총 질소화합물의 10~20%이며 유리아미노산 다음으로 가장 많은 성분이다(Takeuchi 등 1962). 최근 저분자 펩티드는 간장의 맛 활성성분으로 제안되었다. 저분자 펩티드(<500Da)의 간장분획은 모든 분획 중에서 감칠맛이 가장 강했다(Apriyantonio 등 2002, 2004).

- 또한 pyroglutamyl peptide는 맛을 강화하는 것으로 알려져 있으며 이 펩티드는 밀 gluten의 효소분해 산물인 N-말단 Glu와 Gln의 축합반응으로 생성된다(Schlichtherle-Cerny와 Amado 2002). Katsura 등(2005)은 pyroglutamyl peptide 분획이 일본 우동국물의 감칠맛을 강화한다고 보고하였고 Lioe 등(2006)은 농구와 타마리 간장의 감칠맛에 대한 저분자 펩티드의 기여도를 맛 희석분석(taste dilution analysis, TDA)으로 평가하였다.
- 간장의 저분자 디펩티드는 맛 활성성분이지만 소수의 디펩티드가 맛과 관련되는 것으로 보고되었다. 간장 맛과 관련된 디펩티드는 TDA로 평가되었으나 디펩티드와 다양한 간장 맛의 관계는 결코 연구되지 않았다. 본 연구에서는 대사체학 기반 성분 프로파일링 기법을 사용하여 간장의 디펩티드와 맛과의 상관관계를 조사하였다. 먼저 디펩티드를 분석하기 위한 실험방법을 개발하였다.
- 디펩티드 데이터 매트릭스는 LC/MS/MS를 사용하였고, 저분자량 성분의 데이터 매트릭스는 GC/MS를 사용하여 얻었다. 다음 잠재구조에 대한 정사영(orthogonal projection to latent structure, OPLS)으로 성분과 감각분석 데이터 매트릭스의 상관관계를 분석하였다. 성분 데이터 매트릭스는 설명변수, 감각분석 데이터 매트릭스는 반응변수로 역할을 한다. 모델의 예측능력을 평가한 후 디펩티드와 맛의 상호관계는 변수 중요도 척도(variable importance in projection, VIP) 점수로 조사하였다(Eriksson 등 2001).

2. 간장의 GC/MS 데이터 매트릭스

- 총 19종(일본 농구간장 9종, 백간장 1종, 중국 6종, 미국 3종)의 간장을 GC/MS 분석하여 138개의 피크를 확인하였다. 73개의 피크는 아미노산 25, 당 또는 당알코올 24, 유기산 12, 아민 4, 기타 기지 성분 8개로 동정되었고 나머지 65피크는 미지의 성분이었다. 이 간장 성분의 확실한 차이를 확인하기 위해 종속변수로 GC/MS 기반 성분 프로파일을 사용하여 일원분산분석(one-way ANOVA) 결과, 총 138개의 성분은 현저한 차이($p < 0.05$)를 보였고 이들 성분 프로파일은 후속 데이터분석에 사용되었다.

3. LC/MS/MS를 사용한 dipeptide 분석방법 구축 및 간장 dipeptide 분석

- 디펩티드의 표준 혼합물은 LC/MS/MS의 MRM 모드를 사용하여 분석하였다. 표준혼합물 A(Gln-X, Leu-X, Pro-X, Thr-X, Arg-X, His-X, Gly-X), B(Glu-X, Met-X, Ile-X, Phe-X, Ser-X, Asn-X), C(Asp-X, Lys-X, Val-X, Ala-X, Trp-X, Tyr-X), D(pGlu-X)를 제조하여 총 이온 전류 크로마토그램(total ion current chromatogram, TICC)을 분석하였다. 결과 디펩티드 중에서 Asp-Asn은 짧은 체류시간(1.45분)을, Arg-Trp은 긴 체류시간(25.01분)을 나타냈다.
- LC/MS/MS를 사용하여 총 19개의 일본, 중국, 미국 간장의 대표적인 TICC를 분석한 결과, 3개의 TICC는 유사한 패턴을 보였다. 또한 어느 간장 연구에서도 검출되지 않았던 가장 많은 수인 237개 유형의 디펩티드가 19간장샘플에서 검출되었다. 디펩티드의 대부분은 Ala, Asp, Gly, Glu, Ile, Leu, Pro, Ser로 구성된 반면 검출된 펩티드의 일부는 Asn, Gln, Met, Trp로 구성되었다. 한편 Glu 함유 31개의 디펩티드가 검출되었지만 Pro-Trp는 검출된 유일한 prolyl dipeptide이었다.

4. Data 구조를 평가하는 주성분 분석

- 주성분분석(PCA)은 대사체분석이 대량의 데이터를 만들기 때문에 데이터구조를 이해하는 데 널리 사용된다(Ochi 등 2012, Ali 등 2011, Yamamoto 등 2012, Tsugawa 등 2013). 이 연구에서 GC/MS와 LC/MS/MS에서 얻은 데이터 매트릭스를 PCA용으로 각각 사용하였다.
- 일본과 중국에서 제조한 샘플은 그룹 내에서 서로 가깝게 플롯(plot)되었고 제조 장소에 따라 구별되었다. 일본샘플은 PC1과 PC2 값이 높은 경향을 보였고 점수플롯의 상단 우편에 플롯된 반면, 중국샘플은 PC1과 PC2 값이 모두 낮았고 미국샘플은 PC2 값이 낮았다. 로딩플롯에서 대부분의 성분은 높은 PC1 값을 보였다. 점수플롯과 로딩플롯을 비교했을 때 성분의 대부분은 다른 샘플보다 일본샘플에 가깝게 플롯되었다. 이 결과는 일본샘플의 성분이 다른 샘플의 성분보다 더 다양하다는 것을 의미한다.

5. OPLS를 사용한 간장의 dipeptide와 맛의 상관관계 분석

- 검출된 간장의 디펩티드와 맛의 상관관계를 분석하기 위해 설명변수로 성분의 데이터 매트릭스와, 응답변수로 정량적 감각 데이터 매트릭스를 사용하여 OPLS 회귀분석을 수행하였다. 설명변수의 3유형은 GC/MS와 LC/MS/MS에서 얻은 성분 데이터 매트릭스 및 GC/MS와 LC/MS/MS에서 얻은 복합데이터 매트릭스를 사용하였다.
- GC/MS와 LC/MS/MS에서 얻은 복합데이터 매트릭스를 이용하여 단맛, 짠맛, 감칠맛, 신맛, 쓴맛에 대한 예측모델을 작성하였다. 예측 값은 수평 축에, 관측 값은 수직 축에 각 샘플을 표시한 결과 직선상에 모였다. 이는 예측 값이 관측 값과 동일하다는 것이며 직선상에 점이 모인 것은 정확도가 높다는 것을 나타낸다.
- 한편 디펩티드 데이터 매트릭스가 모델의 예측능력을 개선하였기 때문에 VIP 점수를 사용하여 간장 중의 디펩티드와 맛의 상관관계를 조사하였다. 그 결과 GC/MS와 LC/MS/MS에서 얻은 복합데이터 매트릭스

를 사용하여 구축한 5개 맛(단맛, 짠맛, 감칠맛, 신맛, 쓴맛)의 예측모델에서 가장 높은 VIP(VIP>1) 점수를 갖는 디펩티드는 긍정과 부정적인 상관관계를 보였다. 전반적으로 수용액에서 쓴맛을 갖는 Phe, Tyr, Arg, Leu, Ile, Val, His로 구성된 디펩티드는 VIP 점수가 높았다.

- 간장의 맛에 영향을 미치는 주요 성분인 설탕과 글루탐산의 VIP 점수와 디펩티드의 VIP 점수를 비교한 결과 단맛의 경우 포도당(VIP 점수=1.43), 설탕(1.31), 과당(1.55)의 VIP 점수가 1보다 높으므로 당류는 달콤한 차이에 대한 예측모델을 구성하는 중요한 성분이 되었다. 이 결과는 Yamamoto 등(2012)의 연구와 일치하였다. 10개의 디펩티드는 VIP 점수가 설탕보다 더 높았다. 특히 Ile-Gln, Pro-Lys, Ile-Glu, Thr-Phe, Leu-Gln은 달콤한 차이가 긍정적인 상관관계를 보였다. 감칠맛은 Arg-Pro, Asp-Asp, Arg-Asp의 VIP 점수가 글루탐산(1.65)보다 더 높았다. 그러나 Asp-Glu의 VIP 점수(0.754)는 1보다 낮았지만 단맛과 양의 상관관계를 보였다고 한다(Park 등 2002).
- 짠맛의 경우 특정 디펩티드는 VIP 점수가 1보다 낮았지만 우리 연구의 짠맛과 양의 상관관계를 보였다. Shimon 등(WO2009-119503, 2009)은 짠맛의 지수로서 Glu-Ala(0.34)와 Glu-Ser(0.234)를 제시하였다. 또한 Arg-Ala(0.223), Arg-Ser(0.410), Arg-Val(0.184)은 짠맛의 맛 활성성분이라고 보고하였다(Schindler 등 2011).
- 감칠맛의 경우 Lioe 등(2006)의 pGlu-Gln(0.0287), pGlu-Gly(0.831), Park 등(2002)의 Val-Pro(0.683), Asp-Glu(0.131), Gly-Phe(0.948), Ala-Pro(1.01), Noguchi 등(1975)의 Glu-Glu(0.810), Thr-Glu(0.101)(32)와 같이 대부분의 보고된 감칠맛 관련 디펩티드의 VIP 점수는 낮은데도 불구하고 이들 모든 디펩티드는 감칠맛과 양의 상관관계를 보였다.
- 신맛의 경우 Park 등(2002)의 Asp-Pro(0.0104), Kiri-mura(1969)의 Asp-Ala(0.955), Asp-Asp(0.407), Glu-Ala(0.593), Glu-Phe(0.902), Glu-Tyr(0.434), Gly-Asp(0.0409), Gly-Glu(0.301) 및 Toko(1969)의 Gly-Gly(0.223)는 VIP 점수가 1 이하지만 신맛과 양의 상관관계를 나타냈다.
- 쓴맛의 경우 Okai와 Miyake(1982)의 Gly-Phe(0.478), Gly-Pro(0.630),

Pro-Gly(0.305)(35), Kirimura 등(1969)의 Ala-Phe(0.570), Arg-Pro(0.620), Gly-Ile(0.081), Gly-Met(0.230), Toko(1969)의 Gly-Leu(0.486)는 VIP 점수가 1보다 낮은데도 불구하고 쓴맛과 양의 상관관계가 있었다. 이전에 보고된 맛 활성 디펩티드가 긍정적으로 해당 맛 차이와 상관되었으므로 OPLS 회귀분석으로 얻은 결과는 이전 연구결과와 일치하였다.

6. 결론

- 본 연구에서 GC/MS, LC/MS/MS, 감각분석을 사용하여 얻은 성분프로파일에 기초하여 간장의 디펩티드와 맛 차이 사이의 상관관계를 분석하였다. 첫째 가능한 한 많은 디펩티드를 검출하도록 LC/MS/MS에 기초한 분석방법을 구축하였다. 이 방법을 사용하여 지금까지 간장에 관한 연구에서 가장 많은 수인 237개의 디펩티드를 성공적으로 확인하였다.
- LC/MS/MS와 GC/MS로부터 각각 얻은 디펩티드와 다른 저분자량의 친수성 성분을 포함하는 총 366개의 데이터 매트릭스를 설명변수로 사용하였다. 한편 정량적 감각 데이터 매트릭스는 맛 강도에 대한 예측모델을 구축하기 위하여 OPLS 회귀분석의 응답변수로서 사용하였다. OPLS 회귀분석 결과에 기초하여 모든 맛에 대한 정밀도가 높은 예측모델을 구축하였다. 특히 단맛과 짭맛용으로 구축된 예측모델은 GC/MS 데이터만을 사용하여 구축한 모델보다 더 정확하였다.
- 또한 VIP 점수로 간장의 디펩티드와 맛 차이를 조사한 결과 많은 디펩티드는 맛과 더 높은 상관관계를 보였다. 특히 Ile-Gln, Pro-Lys, Ile-Glu, Thr-Phe, Leu-Gln의 VIP 점수는 설탕의 단맛보다 더 높았다. 이 연구는 간장의 디펩티드와 다양한 맛의 상관관계를 조사한 최초의 보고이다. 이 연구에서 발표한 새로운 정보는 앞으로 디펩티드와 맛의 상관관계를 연구하는 데 중요한 자료가 될 것이다.

출처 : Shinya Yamamoto, Kazuki Shiga, Yukako Kodama, Miho Imamura, Riichiro Uchida, Akio Obata, Takeshi Bamba and Eiichiro Fukusaki, "Analysis of the correlation between dipeptides and taste differences among soy sauces by using metabolomics-based component profiling", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 118(1), 2014, pp.56~63

◁ 전문가 제언 ▷

- 간장은 한국, 일본, 중국을 비롯해서 동남아는 물론 전 세계적으로 사용되고 있는 조미료의 하나로 지역에 따라 다양한 방법으로 제조되고 있다. 특히 한국간장은 식품 공정상 재래식 간장, 양조간장, 산 또는 효소분해 간장, 혼합간장으로 분류된다. 간장은 짭맛, 단맛, 신맛, 쓴맛, 감칠맛과 다양한 향기가 조화되어 독특한 풍미를 갖는다. 간장의 맛과 향기성분은 주로 일본, 한국, 중국에서 연구되고 있다.
- 간장 중의 성분과 맛의 관계를 특성화하는 것은 간장의 품질을 평가하고 향상시키는 데 도움이 된다. 이 논문에서는 간장의 맛과 관련되는 디펩티드와 맛의 상관관계를 조사하였다. 우선 LC/MS/MS 방법으로 237개의 디펩티드를 검출하였고 VIP(변수 중요도 척도) 점수를 사용하여 디펩티드와 맛의 상관관계를 조사하였다. 그 결과 Ile-Gln, Pro-Lys, Ile-Glu, Thr-Phe, Leu-Gln은 달콤한 맛에 VIP 점수가 높았다.
- 국내에서는 1980년 한국 재래식 간장의 맛 성분에 관한 연구(김종규, 김창식)를 비롯해서 메주와 담금 용기에 따른 전통간장(박옥진 등 1996, 손경희 등 1998), 보리등겨로 제조한 간장(손동화 등 2002, 이은정 등 2002, 이석일 2002)의 맛 성분과 비지 Koji 첨가에 따른 양조간장(송영철, 이삼빈 2013)의 이화학적 특성이 보고되었다. 국내 간장의 맛 성분은 총질소와 암모니아성 질소, 핵산관련물질, 유리아미노산, 유리당류, 유기산 등이다. 그러나 간장의 디펩티드의 맛 성분에 관한 연구는 아직 보고된 바 없다.
- 간장은 사용원료와 제조방법에 따라 맛과 색, 향기, 풍미가 다양하다. 간장 제조에서 가장 중요한 것은 콩 품종과 메주의 형태, 콩 이외의 곡물의 첨가 및 첨가량, 메주코지용 종균의 종류 및 발효조건, 소금의 종류 및 농도 등 생산 공정의 표준화이다. 간장 성분의 정량분석과 관능검사를 위한 표준방법의 확립은 물론 다양한 성분의 조합에 따른 품질특성을 평가하는 모델개발이 필요하다. 특히 한국 전통간장은 발효와 관련된 균주의 출처와 종류에 따른 간장 맛 관련 연구가 추진되었으면 한다.

이 분석물은 미래창조과학부 과학기술진흥기금, 복권기금의 지원을 받아 작성하였습니다.