

연구과제 최종보고서

과 제 명	전통식품 된장의 특성 규명을 통한 품질 지표의 제시					
총연구기간	2018년 6월 ~ 2018년 12월		당해연도 연구기간	2018년 6월 ~ 2018년 12월		
수행부서/ 세부수행부서	시험연구소 성분검정과 (용역)	연구 책임자	구분	직위	성명	
			정	과장	안 중 성	
			부	팀장	이 승 화	
		참여 연구원	직위		성명	
			주무관		김혜진	
			주무관		반애련	
			주무관		홍미리	
주무관			이형석			
위탁연구책임자		이충환				
참여부서	건국대학교 산학협력단					
사업구분	단년도 (√) 다년도 ()		총 (1)개년 중 (1)차 연도			
연구결과 요약	<p>본 연구에서는 메타볼로믹스 연구를 통하여 다양한 된장의 품질 특성을 규명하고, 전통된장만의 차별점이나 우수성을 나타낼 수 있는 품질 지표를 제시하고자 하였다. 전통된장과 시판된장의 차이는 원료와 공정 및 발효기간에 의하여 관찰되었으며, 전통된장은 일반적으로 콩함량(원료)이 높아 상대적으로 아미노산, 소야사포닌의 함량이 높게 나타났다. 또한 탈지대두(공정)를 사용한 시판된장보다 높은 지방산 함량을 보였고, 발효기간이 긴 전통된장에서는 이소플라본 아글리콘이 보다 짧은 시판된장에서는 이소플라본 배당체가 높은 함량을 나타냈으며, 아글리콘의 함량이 높은 전통된장에서 항산화 활성이 높게 측정되었다. 다른 콩 발효제품과의 차이 또한 각 원료와 함량, 발효기간에 의하여 관찰되었으며, 청국장, 낫또는 콩 함량이 높고 발효기간이 짧아 소야사포닌과 이소플라본 배당체가 높은 함량을 나타내었다. 콩 함량이 높았던 청국장과 낫또가 항산화 활성이 가장 높았으며, 그 제품에 많았던 성분들이 항산화에 기여함을 확인하였다.</p>					

전통식품 된장의 특성 규명을 통한 품질 지표의 제시

1. 연구배경 및 목표

가. 연구배경

1) 국내 시장 현황

- 대사체학은 세포의 대사산물 총체를 일컫는 학문으로 오믹스의 한 분야이며, 유전자나 단백질의 기능을 밝히는 유전체학 및 단백체학과 더불어 중요한 연구의 한 분야로 인식되고 있음. 대사산물은 실제로 생명체의 표현형을 가장 잘 나타내는 저분자량의 생화학적 성분으로 완전한 대사체 프로파일은 그 자체로서 또는 유전자의 발현과 연관된 데이터와 조합하여, 생체내에서 일어나는 다양한 생리학적 또는 병리학적 현상에 관하여 유용한 정보를 제공함.
- 오믹스 분야는 시스템 생물학이 필요로 하는 생체 구성요소의 목록을 제공하고, 그들이 특정시간과 환경에 어떻게 분포하는지에 대한 중요한 정보를 제공함. 이 과정에서 적게는 몇 백개에서 많게는 몇 만개의 구성요소에 대한 대용량의 정보가 쏟아져 나오게 되고, 이를 효과적으로 처리하여 구성 요소 간의 관계를 파악 할 수 있게 해주는 방법이 필요함.
- 기초 및 산업응용분야에 중요한 역할을 하는 발효미생물 분야에서 미생물의 대사경로 규명은 매우 중요한 분야로 발효환경에서 대사체 프로파일링 연구를 통한 발효미생물과 환경의 상호작용을 오믹스(메타볼로믹스 + 지노믹스) 연구를 통해 이해할 수 있음.
- 대사체학 분야에서는 아직까지 질량분석기기에 기초한 연구들이 대다수로 진행되고 있으며, 이 중에서 미생물에 대한 연구는 아직까지 기초연구단계로서 미비한 실정임. 미생물 대사체 연구의 국가별연구동향을 살펴보면 미국과 영국 등 유럽 국가들을 중심으로 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 최근 우리나라와 일본 등 아시아 국가들도 미생물 대사체 분야에 많은 투자를 기울이고 있으나, 국내의 경우 발효에 대한 역사적, 사회적, 과학적 관심에도 불구하고 발효대사체 해석에 대한 연구는 특히 미비한 실정임.

- 발효는 미생물과 기질 및 다양한 발효 환경에 의한 복잡한 일련의 과정을 거침. 원료가 가지고 있는 다양한 대사체들이 미생물들에 의해 발효 되면서 분해 또는 이용이 되고, 여러 발효 환경에 따라 다른 대사과정을 나타냄. 따라서, 복잡한 발효 과정에 기여하는 1차 및 2차 대사체를 통합적으로 해석할 수 있는 메타볼로믹스 분석이 필요함.

나. 연구목표

- 메타볼로믹스 연구를 통하여 다양한 된장의 품질특성을 규명하고, 전통된장만의 차별점이나 우수성을 나타낼 수 있는 품질 지표를 제시하고자 함

2. 연구내용 및 방법

가. 연구내용

- (1) 전통된장의 대사체 분석을 통한 성분 연구
 - (가) 맛과 품질에 영향을 주는 차별화된 성분을 탐색하고 성분 함량 차이 비교
 - 조단백, 아미노산, 유기산, 당 등 성분분석을 통한 품질 지표 성분 추출
 - (나) 된장의 휘발성 성분 대사체 분석을 위한 GC-MS 분석조건 확립
 - 대사체 검출 감도를 고려한 시료 주입법 및 분석조건 최적화
 - (다) 된장의 비휘발성 성분 대사체 분석을 위한 LC-MS 분석조건 확립
 - 된장의 전처리 방법 개발
 - 대사체 검출 감도를 고려한 분석 조건의 최적화
 - (라) 된장 대사체 분석 결과의 통계분석방법 확립
 - 다변량 통계분석을 통한 된장의 특이적 물질 비교
- (2) 전통식품 된장과 시판품 된장, 해외 제품 등의 모니터링 실시
 - (가) 전통식품 된장의 특이성 규명을 위해 일반/기능성 성분으로 구분하여 비교 분석

- (나) 국내산 및 수입산 원료를 사용한 시판 전통된장 및 개량식 된장 각각 20종 이상의 제품에 대한 휘발성 및 비휘발성 대사체분석 수행
 - (다) 전통식품 된장과 시판품 된장의 유효성분을 모니터링하여 차별화 탐색
- (3) 된장의 품질 특성 규명 및 전통된장만의 차별점이나 우수성을 나타낼 수 있는 품질 지표의 제시
- (가) 전통식품 된장의 특이성 규명을 위해 일반/기능성 성분으로 구분하여 비교 분석
 - (나) 된장 대사체 분석 결과의 통계분석방법 확립

나. 연구방법

- (1) 시료선정

- (가) 전통 된장 시료: 22종

제품번호	제품명	제조회사
G103	된장	구수담영농조합법인
G44	광이원전통된장	광이원식품
G25	양주골장독된장	양주골장독
G31	유기전통된장	절골농원
G19	하동춘된장	전통이레식품
G60	토종콩된장	연호전통식품
G37	옛맛뚝배기재래식 된장	뚝배기 식품
G56	무수춘된장	무수춘된장마을영농조합법인
G82	청송얼음골황통 된장	청송얼음골
G41	맥된장	한국맥꾸름
G48	산해원된장	영양산마을
G65	죽장언프리미엄전통된장	(주)죽장언
G57	강진군동전통된장	강진전통된장영농조합법인
G17-2	참한솔된장	한솔영농조합법인
G78	진통된장	(주)선재식품
G45-2	옹고집호박보리 된장	옹고집영농조합법인
G69	삼보정깊은죽염된장예작	삼보식품
G68	삼보정깊은죽염된장수작	삼보식품
G87	전통무릉된장	왕기식품
G89	맑은섬제주푸른콩전통된장	영농조합법인한라산청정촌
G9	두루땃 된장	
G35	고시랑 된장	고시랑 장독대 영농조합법인

(나) 시판 된장 시료

제품번호	제품명	제조회사
F1	찬마루 된장	풀무원
F2	청정원 순창 구수한 매주 콩된장	대상(주), 청정원
F3	청정원 순창 개운하고 담백한 재래식 생된장	대상(주), 청정원
F4	청정원 순창 깊고 진한 재래식 집된장	대상(주), 청정원
F5	콩된장	삼화
F6	해찬들 구수한 집된장	CJ, 해찬들
F7	해찬들 명품 집된장	CJ, 해찬들
F8	해찬들 재래식 된장	CJ, 해찬들
F9	해찬들 국산 된장	CJ, 해찬들
F10	백일된장	샘표
F11	샘표 재래식옛된장	샘표
F12	샘표 토장	샘표
F13	샘표 토굴된장	샘표
F14	잔맛을 줄인 건강한 재래된장	신송식품
F15	순창궁 재래식된장	해표 (사조그룹)
F16	매일맛있는 재래식된장	매일식품
F17	진미 잘되는 맛집 된장	진미식품
F18	가가호호 재래식 집된장	진미식품
F19	우리콩 재래식 된장	오복식품
F20	찌개된장	오복식품
F21	몽고된장	몽고간장
F22	범일콩된장	태화식품공업(주)
F23	미화합동찌개된장	(주)미화합동

(다) 해외 발효제품 시료 등

① 미소된장 시료

제품번호	제품명	제조회사	구분
A1	아와세 미소 (적된장)	마루산(일본)	미소된장
A2	신슈이찌미소	야마나시(일본)	미소된장
A3	오카아상(아와세)	하나마루키(일본)	미소된장
A4	야와세미소	마쓰야(일본)	미소된장
A5	시로미소	마루코메(일본)	미소된장

② 두반장 시료

제품번호	제품명	제조회사	구분
B1	중화 두반장	이금기(중국)	두반장
B2	총반려 두반장	하오푸드,훈화(중국)	두반장
B3	하하 두반장	화풍(대만)	두반장
B4	피현 두반장	단단(중국)	두반장
B5	두반장소스	긴꼬방(일본)	두반장

③ 첨면장 시료

제품번호	제품명	제조회사	구분
C1	첨면장	본타물(대만)	첨면장
C2	호구미 첨면장	사해(중국)	첨면장
C3	총반려 첨면장	하오푸드,훈화(중국)	첨면장
C4	첨면장	리민(중국)	첨면장
C5	첨면장	유우키(일본)	첨면장

④ 청국장 시료

제품번호	제품명	제조회사	구분
D1	강화도 벵짬발효 청국장	정들콩(강화)	청국장
D2	산사의 참맛영평죽염전통청국장	영평식품	청국장
D3	항아골 청국장	항아골(충주)	청국장
D4	서분례 청국장	서일농원	청국장
D5	뽕당골 청국장	뽕당골식품	청국장
D6	하늘정골 청국장	하늘정골된장	청국장
D7	담양청국장	죽향콩	청국장
D8	찌개청국장	함씨네(전북전주 함정회)	청국장
D9	전영주 청국장	청호식품	청국장
D10	산음골할매 황토방 생청국장	산음골할매(경남 산청)	청국장

⑤ 낫또 시료

제품번호	제품명	제조회사	구분
E1	생생 실의힘 국산콩 생나또	풀무원	낫또
E2	한식발효 생나또	CJ[(주)니켈바이오 노업회사법인]	낫또
E3	발효과학 아침낫또	동원[(주)참좋은콩]	낫또
E4	유기농 콩으로 만든 낫또	오뚜기	낫또
E5	우리종균 생나또	종가집	낫또
K6	낫또	시카야(일본)	낫또
K7	소립나또	스즈세이(일본)	낫또
K8	유기농 극소립나또	아즈마(일본)	낫또
K9	파워 낫또	다루마식품혼포 (일본)	낫또
K10	오카메낫또	타카노푸드(일본)	낫또

(2) 시료 추출 및 기기분석

(가) 시료의 대사체 추출

Deep freezer에 보관된 시료 각 100mg을 1mL 혼합용매(80% MeOH)에 30 frequency, 10분 동안 Mixer mill(Retsch MM400, Germany)을 이용하여 2번 반복 추출한 후, 원심분리기를 이용하여 상층액을 분리시킴 (15,000 rpm, 4 ℃, 5 min). 필터한 상층액을 speed vacuum을 이용하여 건조 (overnight) 시킴

(나) GC-TOF-MS 분석방법 표준화 및 분석조건 확립

① GC 분석방법 표준화

- 건조된 시료를 80% MeOH을 이용하여 농도(10,000ppm)를 맞추는 후, 100 uL을 speed vacuum을 이용하여 건조시킴(overnight).
- 건조된 각 샘플은 oximation을 위하여 methoxyamine hydrochloride (20mg/mL in pyridine)를 50uL 넣어 30℃에서 90분간 반응시킴.
- Oximation이 끝나면 silylation을 위해 MSTFA 50uL를 넣고 37℃, 30

분 동안 반응함.

- 반응물은 filter 후, autosampler vial에 옮겨 담아 GC-TOF-MS를 이용하여 분석.

② GC-TOF-MS 기기 분석조건

- GC-TOF-MS 장비

GC: Agilent 7890A GC system, Agilent 7693 autosampler (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)

MS: Pegasus HT TOF-MS (Leco Corporation, St. Joseph, MD)

- GC-TOF-MS 분석 조건

Column: Rtx-5MS column (30m length × 0.25mm i.d. × 0.25 μm film thickness; Restek Corp., Bellefonte, PA).

Column temp.

Time(min)	Temp
0	75 ℃
2	75 ℃
17	300 ℃
20	300 ℃

Carrier gas : Helium, flow rate 1.5 mL/min

(다) UHPLC-LTQ-IT-MS/MS 분석방법 표준화 및 분석조건 확립

① UHPLC 분석방법 표준화

- 건조된 시료를 10,000 ppm의 농도에 맞추어 80% MeOH에 녹인 후, 0.2 um filter를 이용하여 filter함.
- 2 mL vial (insert포함)에 200 ul씩 옮겨 담은 후 UHPLC-LTQ-IT-MS/MS (negative, positive mode)에 10 ul씩 주입함.

② UHPLC-LTQ-IT-MS/MS 기기 분석조건

- UHPLC-LTQ-XL-MS/MS 장비

UHPLC: DIONEX UltiMate 3000 RS Pump, RS Autosampler, RS Column Compartment, and RS Diode Array Detector (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA)

MS/MS: Thermo Fischer Scientific LTQ XL linear ion trap mass spectrometry (ESI) (Thermo Fischer Scientific, San José, CA, USA)

③ UHPLC-LTQ-XL-MS/MS 분석 조건

Column: Thermo Scientific Synchronis C18 UHPLC column (2.1 mm x 100 mm x 1.7 μ m)

Column temp. 35 ° C

Mobile phase

A: 0.1% formic acid in Water

B: 0.1% formic acid in ACN

Flow rate: 0.3 mL/min

Gradient

Time(min)	%A	%B
initial	90	10
18	0	100
22	90	10

Diode Array Detector(nm): 200–600

Negative/Positive/Full scan mode

Mass rage(m/z): 150–1000

Source voltage : ± 5 (kV)

Capillary voltage : 39(V)

Capillary temp. : 275(°C)

TandemMS: scan-type turbo data-dependent scanning(DDS)

(3) 대사체 데이터처리 및 통계분석

(가) 데이터 처리

GC-TOF-MS data는 ChromaTOF 소프트웨어를 이용하여 .cdf file로 변환하고, UHPLC-LTQ-XL-MS/MS data는 Xcalibur 소프트웨어를 이용하여 변환한 후, Metalign을 이용하여 peak selection, alignment, baseline correction과 같은 data processing을 함.

(나) 통계분석 (다변량분석, ANOVA, t-test)

SIMCA-P(ver.12.0) 소프트웨어를 이용하여 다변량 통계분석을 진행함.

- 주요인분석(PCA; principal component analysis)

- 부분최소제곱법 판별분석(PLS-DA; partial least squares-discriminant analysis)

(4) 대사체 동정 및 지표물질 선정

다변량 통계 분석 후 주요한 대사체 동정은 mass spectra와 retention time 등에 의해서 동정함. Standards가 있을 시 standard를 통해 동정 하였으며, 없을 시에 NIST MS Library 나 references, combined chemical dictionary version 7.2 (Chapman & Hall/CRC) 및 in-house library에 의해 tentative한 동정을 하였음. 또한, UHPLC-LTQ-XL-MS/MS 분석에서, Xcalibur를 이용한 accurate mass와 elemental compositions을 이용하여 대사체의 formula를 찾고, MSn fragmentation patterns및 UV spectrum을 통해 대사체를 동정함.

(5) 대상 시료의 화학적 특성 및 생리활성 측정

(가) 대상 시료의 화학적 특성 측정을 위한 추출

시료 각 1g을 20m Water에 넣고 shaker에서 교반한 후, 원심분리기를 이용하여 상층액을 분리시킴

(나) 대상 시료의 화학적 특성 측정

① pH 측정: 추출용액을 pH meter (Orion 3 Star pH benchtop, Thermo Fisher Scientific, Inc.)로 측정함.

② 염도 측정: 추출용액을 portable refractometer (HI 96821, HANNA Instruments, Woonsocket, RI, USA) 이용하여 측정함.

(다) 대상 시료의 생리활성 측정

① 항산화능 측정 (ABTS): ABTS 활성 측정을 위하여 7mM ABTS 용액을 750 nm에서 흡광도 0.7까지 dilution 시킴. 그 후 80% 메탄올로 추출한 시료 10 uL과 dilution 한 ABTS용액 190 uL를 혼합한 뒤, 6분 동안 암소에서 반응함. 흡광도 750 nm에서 microplate reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 측정하였으며, ABTS 활성능은 Trolox standard curve(0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 mM)를 이용한 trolox equivalent concentration(mg)으로 나타냄. 실험은 3반복 수행하였으며, 그 결과 값을 평균값과 오차막대로 표시하였음.

② 총 페놀 함량 측정: 80% 메탄올로 추출한 시료 20 uL와 0.2 N Folin-Ciocalteu 용액 100 uL을 6분동안 반응시킨 후, 7.5% Na₂CO₃ 80 uL을 혼합하여 60분 간 암소에서 추가 반응시킴. 흡광도 750 nm에서 microplate reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 측정하였으며, 페놀 함량은 Gallic acid standard curve(15.63, 31.25, 62.5, 125, 250, 500 ppm)를 이용한 Gallic acid equivalent concentration(ppm)으로 나타내었음. 실험은 3반복 수행하였으며, 그 결과 값을 평균값과 오차막대로 표시함.

(6) 대상 시료의 화학적 특성 및 생리활성 측정

대사체와 생리활성과의 상관관계를 보기 위하여, 선정 기준에 따라 동정된 variable과 생리활성 결과를 SPSS(version 12.0; SPSS, INC., Chicago, IL, USA)를 프로그램을 이용하여 Pearson's correlation coefficient 값($-1 < r < 1$)을 분석하였음. 데이터의 시각화를 위하여 상관관계를 색으로 나타내어 Heat map을 표시하였음.

3. 결과 및 고찰

가. 결과

(1) 전통된장과 시판된장의 비교 프로파일링

(가) 전통된장과 시판된장의 1차 대사체 프로파일링

전통된장 22개와 시판된장 24개의 GC-TOF-MS 기기 분석을 통해 다음과 같은 크로마토그램을 얻어냄 (Figure 1). 얻어낸 크로마토그램의 다변량 통계분석(PCA 및 PLS-DA 결과, PCA에서는 PC1 (18.30%), PC2 (7.76%) 및 PLS1 (18.18%), PLS2 (6.38%)에 따라 전통된장과 시판된장이 구분되는 양상을 확인하였음(Figure2)

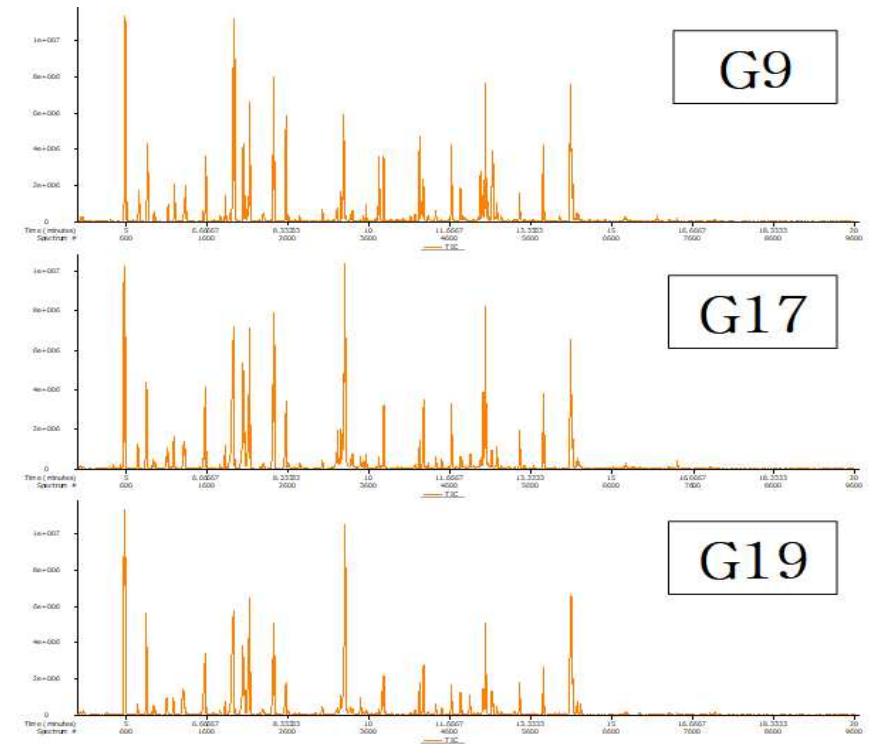


Figure 1. 전통 된장과 시판 된장의 GC-TOF-MS 크로마토그램(예)

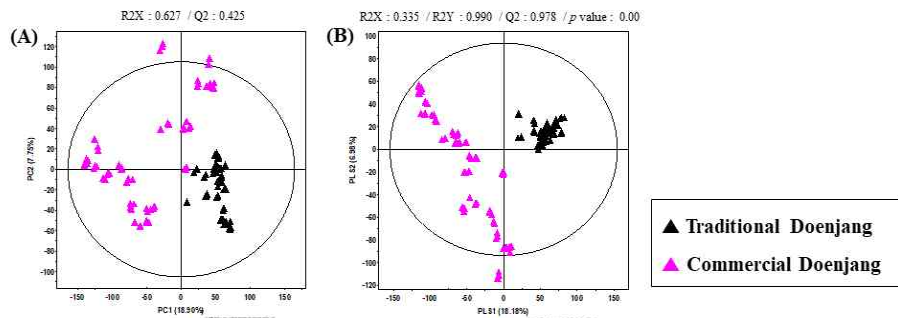


Figure 2. GC-TOF-MS를 이용한 전통 된장과 시판 된장의 principal component analysis (PCA) score plot (A) 및 partial least-square discriminant analysis (PLS-DA) score plot (B).

(나) 전통된장과 시판된장의 차이 나는 1차 대사체 비교분석

- ① GC-TOF-MS 분석 및 다변량 통계분석을 통해 전통된장과 시판된장을 구분 짓는 1차 대사산물을 31개 선정하였음. 이는 VIP values ($VIP > 0.7$)로 선정되었음. 31개의 대사체로는 아미노산계열 14개 (alanine, valine, leucine, isoleucine, glycine, serine, threonine, aspartic acid, gaba, phenylalanine, ornithine, lysine, tyrosine, tryptophan), 당 9개 (xylitol, pinitol, fructose, glucose, mannose, galactose, glucitol, myo-inositol, maltose), 지방산 4개 (linoleic acid, oleic acid, linolenic acid, stearic acid), 유기산 4개 (malic acid, threonic acid, citric acid, oleamide)가 동정되었음 (Table 1).
- ② Box and whisker plot으로 동정된 대사체의 경향을 확인한 결과, 14개의 아미노산 중 11개의 아미노산이 시판된장보다 전통된장에서 높은 함량을 나타냄. 전통된장의 상대적 콩 함량이 높아 콩단백질의 발효기간 동안 가수분해로 인하여 시판된장에서 상대적으로 높게 나타나는 것으로 예상됨.
- ③ 동정된 9개의 당은 전통된장보다 시판된장에서 높은 함량을 나타냄. 시판된장의 원료(쌀, 밀등의 첨가)에 따른 탄수화물 대사에 인한 결

과로 예상됨.

- ④ 지방산 4개는 시판된장보다 전통 된장에서 높은 함량을 나타냄. 시판된장은 대부분 탈지대두(defatted soybean)을 사용하여 전통된장보다 지방산함량이 낮은 것으로 예상됨.
- ⑤ 유기산은 특이적인 경향을 보이지 않았음 (Figure 3).

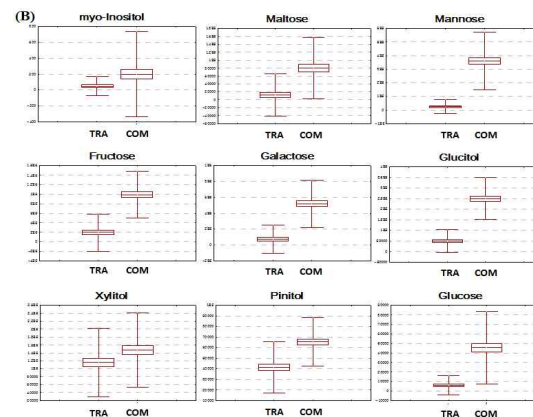
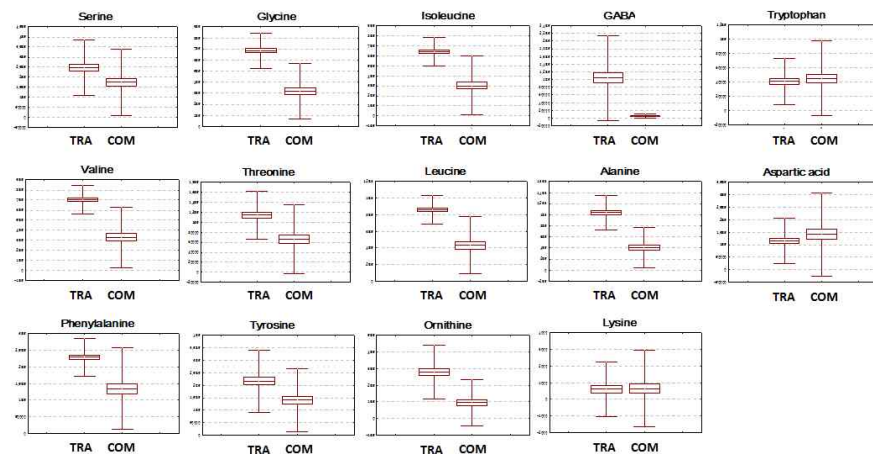
Table 1. 전통된장과 시판된장을 구분 짓는 GC-TOF-MS 기반 1차 대사체

No.	Tentative metabolites ^a	RT ^b	Unique mass	Fragment ion	TMS ^c	ID ^d
Amino acids						
1	Alanine	5.41	116	73 116 147 190 218	2	LIB
2	Valine	6.63	144	73 100 144 218 246	2	LIB
3	Leucine	7.19	158	73 130 158 232 260	2	LIB
4	Isoleucine	7.40	158	73 100 133 158 218	2	LIB
5	Glycine	7.54	174	73 147 174 248 276	3	LIB
6	Serine	8.03	204	73 147 174 204 278 306	3	LIB
7	Threonine	8.29	219	73 117 147 219 291 320	3	LIB
8	Aspartic acid	9.42	232	73 100 147 176 232	3	LIB
9	GABA	9.50	304	73 147 174 216 246 304	3	LIB
10	Phenylalanine	10.30	192	73 100 147 192 218	2	LIB
11	Ornithine	11.70	142	73 142 174 200 258	4	LIB
12	Lysine	12.40	174	73 128 156 230 317	4	LIB
13	Tyrosine	12.53	218	73 100 147 218 280	3	LIB
14	Tryptophan	14.32	202	73 158 202 291	3	LIB
Sugar and sugar alcohols						
15	Xylitol	11.04	217	73 103 129 147 217	5	LIB
16	Pinitol	11.88	260	73 147 191 217 260 318	5	LIB
17	Fructose	12.22	103	73 103 147 217 307	5	NIST
18	Glucose	12.30	83	73 103 147 205 319	5	NIST
19	Mannose	12.35	320	73 103 160 205 320	5	NIST
20	Galactose	12.47	160	73 103 147 205 319	5	NIST

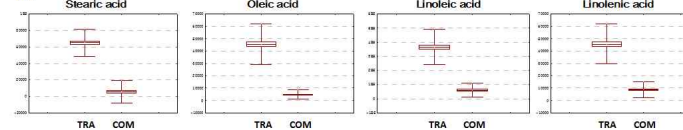
21	Glucitol	12.55	319	73 147 205 319	6	NIST
22	myo-Inositol	13.59	217	73 147 191 217 305	6	LIB
23	Maltose	17.20	361	73 147 204 243 271 361	8	LIB
Fatty acids						
24	Linoleic acid	14.14	67	55 75 95 129 150	1	LIB
25	Oleic acid	14.15	339	75 84 117 129 145 339	1	LIB
26	Linolenic acid	14.18	108	75 93 108 129 149 335	1	LIB
27	Stearic acid	14.29	117	73 117 129 145 341	1	LIB
Organic acids and Etc.						
28	Malic acid	9.15	233	73 147 233 307 335	3	LIB
29	Threonic acid	9.78	292	73 147 220 245 292	4	LIB
30	Citric acid	11.73	273	73 147 273 305 347	4	LIB
31	Oleamide	15.28	131	75 116 131 198 338	1	LIB

^a Tentative metabolites based on variable importance of projection (VIP) analysis with cutoff values of 0.7 from PLS-DA model. ^b Retention time. ^c Trimethylsilyl. ^d Identification: LIB, in house Library and NIST (National Institute of Standards and Technology mass search version 2.0, 2011, USA)

(A)



(C)



(D)

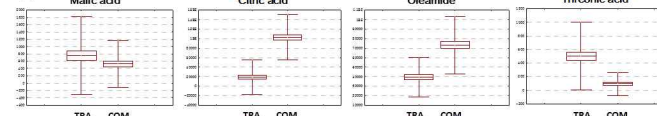


Figure 3. GC-TOF-MS 기반 전통된장과 시판된장을 구분 짓는 1차 대사체의 Box and whisker plots. 아미노산(A), 당(B), 지방산(C), 유기산(D). TRA, traditional doenjang; COM, commercial doenjang; *Line*, mean; *box*, standard error; *whisker*, standard deviation.

(다) 전통된장과 시판된장의 2차 대사체 프로파일링

- ① 전통된장 22개와 시판된장 24개의 GC-TOF-MS 기기 분석을 통해 다음과 같은 크로마토그램을 얻어냄 (Figure 4).
- ② 전통된장과 시판된장의 UHPLC-LTQ-IT-MS분석 후 다변량 통계분석 (PCA 및 PLS-DA 결과, PCA에서는 PC1 (8.57%), PC2 (4.0%) 및 PLS1 (8.31%), PLS2 (3.57%)에 따라 전통된장과 시판된장이 구분되는 양상을 확인하였음 (Figure 5).

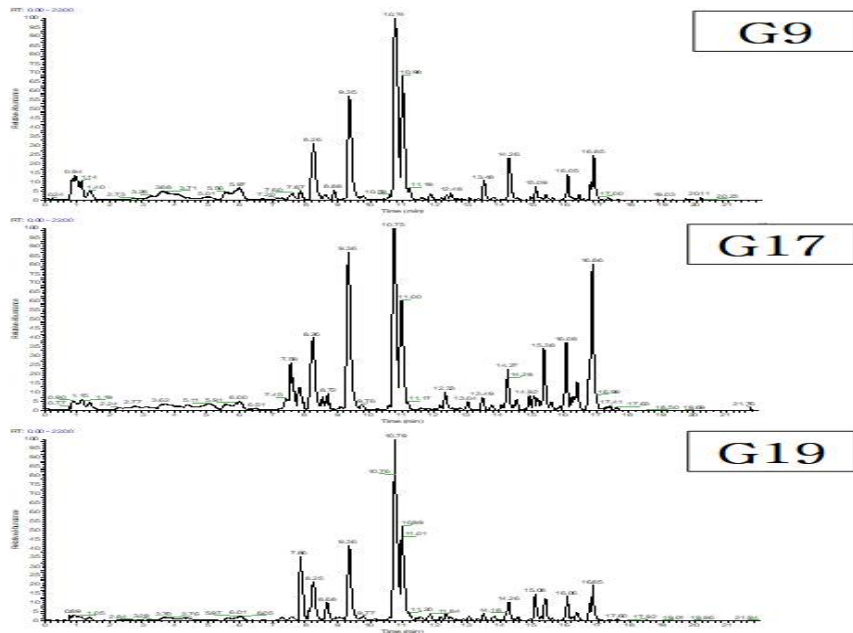


Figure 4. 전통 된장과 시판 된장의 UHPLC-LTQ-IT-MS 크로마토그램

(라) 전통된장과 시판된장의 차이 나는 2차 대사체 비교분석

- ① UHPLC-LTQ-IT-MS 분석 및 다변량 통계분석을 통해 전통된장과 시판된장을 구분 짓는 2차 대사산물을 19개 선정하였음. 이는 VIP values ($VIP > 0.7$)로 선정되었음. 그 중 14개의 대사체가 isoflavone 계열 6개 (genistin, malonylgenistin, daidzein, glycitein, dihydrogenistein, genistein), soyasaponin 계열 5개(soyasaponin V, soyasaponin I, soyasaponin II, soyasaponin III, soyasaponin IV), lysophospholipid 계열 3개(lysoPE 18:2, lysoPC 18:2, lysoPC 16:0)로 동정되었음 (Table 2).
- ② Box and whisker plot으로 동정된 대사체의 경향을 확인한 결과, isoflavone 중 배당체 isoflavone은 시판된장에서 높은 함량을, 아글리콘 형태는 전통된장에서 높은 함량을 나타내었음. 이는 전통된장이 시판된장보다 오랜 기간 발효가 진행됨에 따라 생물전환이 일어나는 것으로 사료됨. 5개의 soyasaponin이 모두 콩의 함량이 높은 전통된장에서 높은 함량을 나타내었음. Lysophospholipid 계열 3개는 밀이나 쌀 등의 첨가물이 많은 시판된장에서 높은 함량을 나타냄 (Figure 6).

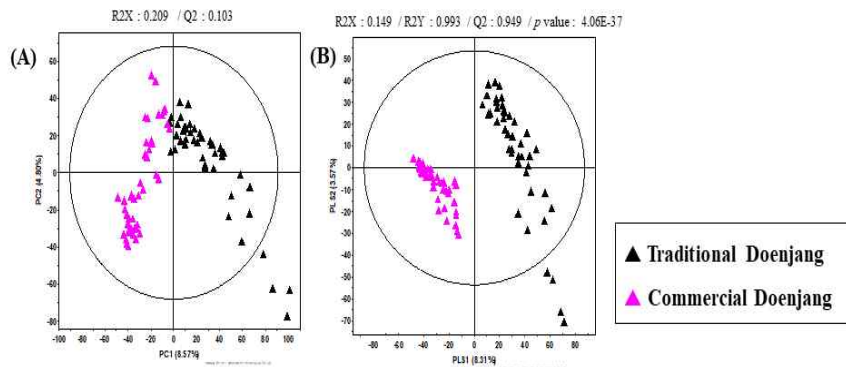


Figure 5. UHPLC-LTQ-IT-MS를 이용한 전통 된장과 시판 된장의 principal component analysis (PCA) score plot (A) 및 partial least-square discriminant analysis (PLS-DA) score plot (B).

Table 2. 전통된장과 시판된장된장을 구분 짓는 UHPLC-LTQ-IT-MS 기반 2차 대사체

No.	Tentative metabolites ^a	RT ^b	M-H	M+H	M.W.	Fragment pattern ^c	ID ^d
1	Genistin	6.78	477 [+FA-H]	433	432	271 > 215, 153	LIB
2	Malonylgenistin	7.74	-	519	518	271 > 215, 153	Ref
3	Daidzein	8.25	253	255	254	199, 137 > 181, 131	LIB
4	Glycitein	8.5	283	285	284	270 > 242, 152	LIB
5	Dihydrogenistein	9.35	271.5	273.5	272	244, 216, 153	Ref
6	Genistein	9.35	269	271	270	243, 215, 153 > 96	LIB
7	Soyasaponin V	10.6	1003 [+FA-H]	959.5	958.5	797, 599, 441 > 581, 423	Ref
8	Soyasaponin I	10.75	987.5 [+FA-H]	943.5	942.5	797, 599, 441	LIB

9	Soyasaponin II	10.99	957 [+FA-H]	913	912	781, 599, 441	LIB
10	Soyasaponin III	11.06	795	797	796	599, 441 > 581, 423	LIB
11	Soyasaponin IV	11.18	765.5	767	766	617, 599, 441, 423	LIB
12	LysoPE 18:2	12.45	476.5	478	477	324, 306 > 208	Ref
13	LysoPC 18:2	13.08	564.5 [+FA-H]	520.5	519.5	502, 443, 184	Ref
14	LysoPC 16:0	13.56	540.5 [+FA-H]	496.5	495.5	478, 184 > 125, 86	Ref
15	NI 1	1.22	293.5	295.5	294.5	277, 166 > 120 > 93	-
16	NI 2	1.43	423.5	425.5	424.5	407, 389 > 341	-
17	NI 3	5.97	236	238	237	220, 192, (166) > 120 > 93	-
18	NI 4	9.05	1003 [+FA-H]	959.5	958.5	813, 615 > 597 457	-
19	NI 5	9.9	-	728	-	331, 271	-

^a Tentative metabolites based on variable important projection (VIP) analysis with cutoff values of 0.7 from PLS-DA model. ^b Retention time. ^c MSⁿ fragment patterns detected in positive ion mode. ^d Identification: LIB, in house Library; Ref., reference

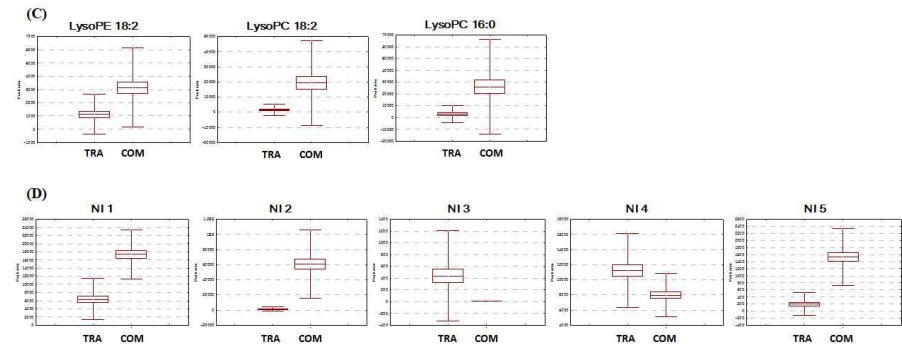
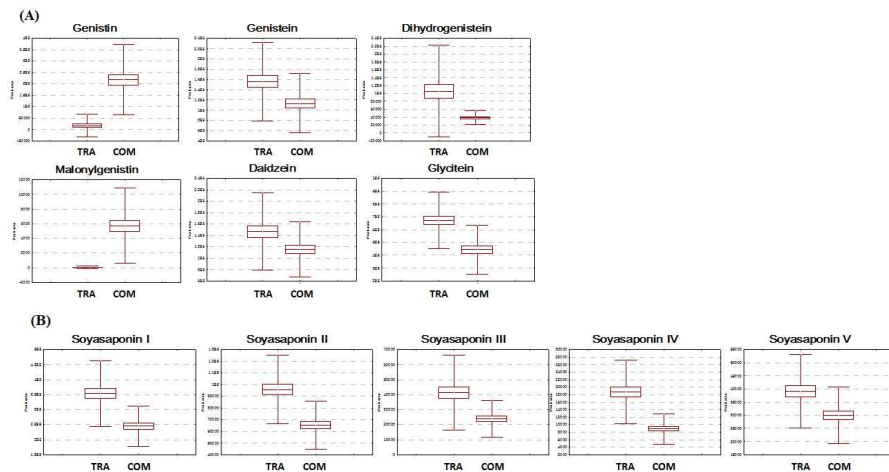


Figure 6. UHPLC-LTQ-IT-MS 기반 전통된장과 시판된장을 구분 짓는 2차 대사체의 box and whisker plots. 계열별로 이소플라본(A), 소야사포닌(B), 리소인지질(C), 미동정 성분(D)이다. TRA, traditional doenjang; COM, commercial doenjang; Line, mean; box standard error; whisker, standard deviation.

(마) 전통된장과 시판된장의 화학적 특성 분석

전통된장과 시판 된장의 화학적 특성 차이를 확인하고자 배양시간별 pH와 염도 측정 결과, 염도는 시판된장에서 전체적으로 높게 나타남. pH는 전통 된장에서 높은 양상을 나타냈으나, 유의적으로 차이가 없었음 (Figure 7).

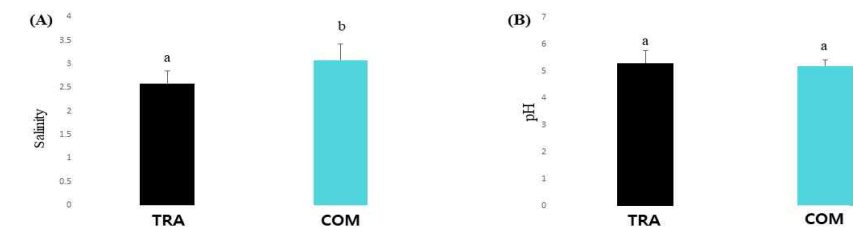


Figure 7. 전통된장과 시판된장의 염도 및 pH

(바) 전통된장과 시판된장의 생리활성 분석

전통된장과 시판 된장의 화학적 특성 차이를 확인하고자 ABTS 항산화 활성과 총 페놀함량 측정 결과, 전통된장에서 항산화활성이 높게 나타남. 총 페놀 함량의 경우시판된장에서 높은 양상을 나타냈으나, 유의적으로 차이가 없었음 (Figure 8)

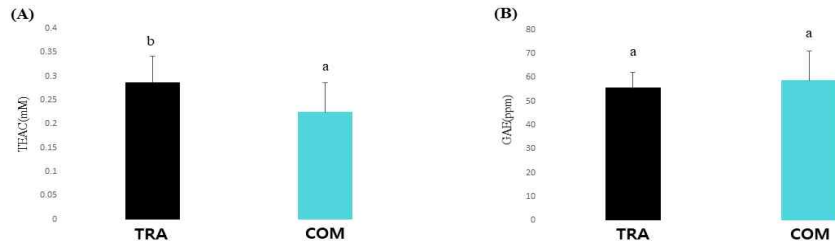


Figure 8. 전통된장과 시판된장의 ABTS 및 총페놀함량

(사) 생리활성 지표 대사체 탐색 및 동정

된장 내 항산화 활성 물질을 탐색하기 위하여, 전통된장과 시판된장을 구분 짓는 대사체들과 항산화 활성과의 상관관계를 분석하였음 (Figure 9-10). 일차대사체 중에서는 대부분의 아미노산과 항산화 활성의 상관관계가 나타났으며, 이차대사체 중에서는 isoflavone 아글리콘인 daidzein, glycitein, genistein, dihydrogenistein이 활성과 positive한 상관관계를 나타냈음.

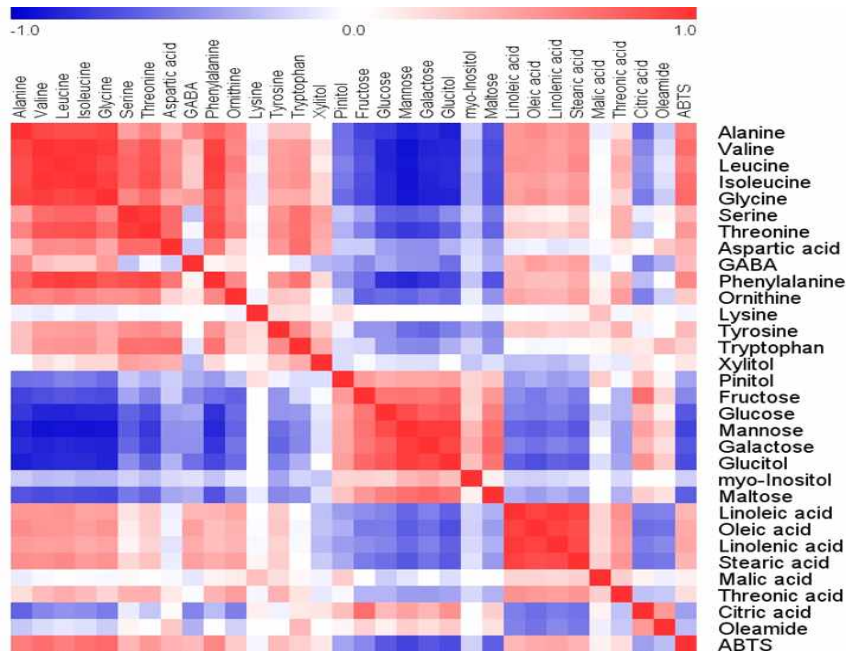


Figure 9. 1차 대사체와 항산화 활성(ABTS)과의 상관관계를 나타내는 correlation map. 각 칸은 Pearson's coefficient values r 값을 의미함. 빨강색은 positive ($0 < r < 1$) correlation, 파랑색은 negative ($-1 < r < 0$) correlation을 나타냄.

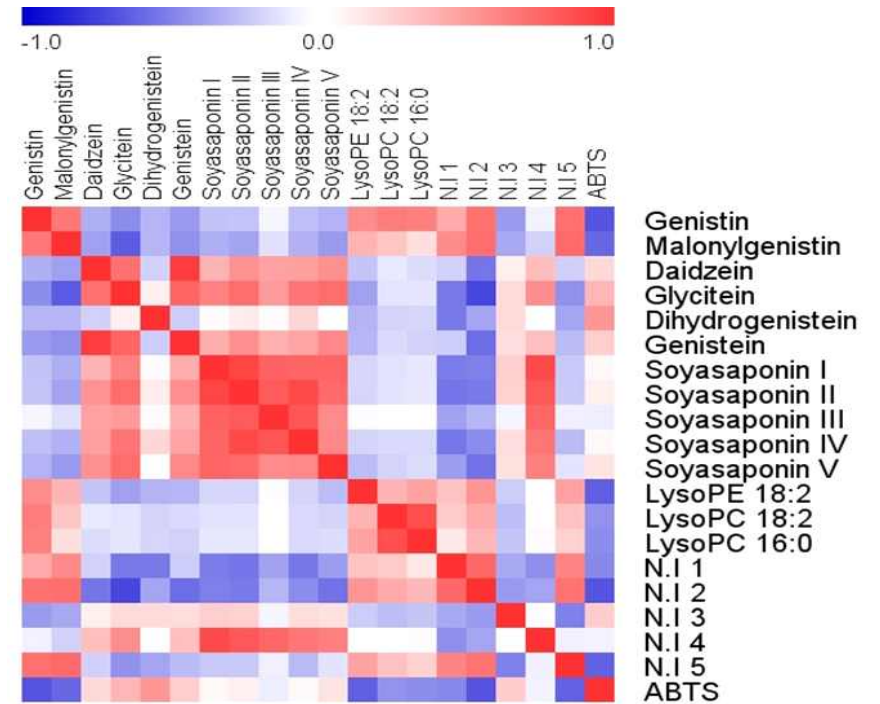


Figure 10. 2차 대사체와 항산화 활성(ABTS)과의 상관관계를 나타내는 correlation map. 각 칸은 Pearson's coefficient values r 값을 의미함. 빨강색은 positive ($0 < r < 1$) correlation, 파랑색은 negative ($-1 < r < 0$) correlation을 나타냄.

(아) 요약 및 고찰

전통된장과 시판된장의 차이는 원료와 공정 및 발효기간에 의하여 관찰되었음 (Figure 11). 전통된장은 일반적으로 콩함량(원료)이 높아 상대적으로 아미노산, 소야사포닌의 함량이 높게 나타남. 또한 탈지대두(공정)를 사용한 시판된장보다 높은 지방산 함량을 보임. 발효기간이 긴 전통

된장에서는 이소플라본 아글리콘이 보다 짧은 시판된장에서는 이소플라본 배당체가 높은 함량을 나타냈으며, 아글리콘의 함량인 높은 전통된장에서 항산화 활성이 높게 측정되었음.

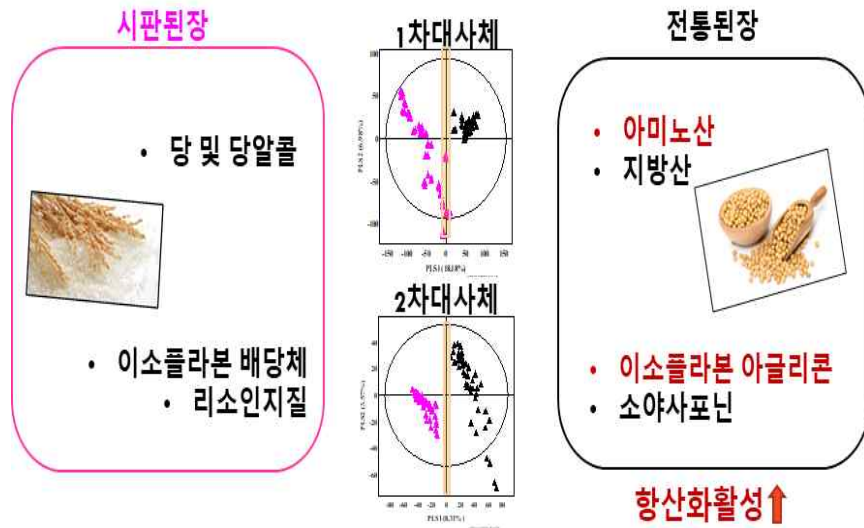


Figure 11. 전통된장과 시판된장의 대사체 프로파일링 요약

(2) 전통된장과 해외발효제품과의 비교 모니터링

(가) 전통된장과 해외발효제품의 1차 대사체 프로파일링

전통된장, 청국장, 낫또, 두반장, 찜면장, 미소 각 5개씩을 선정하여 다음과 같은 크로마토그램을 얻어냄 (Figure 12). 전통된장과 해외발효제품의 GC-TOF-MS분석 후 다변량 통계분석(PCA 및 PLS-DA 결과, PCA에서는 PC1 (14.9%), PC2 (10.3%) 및 PLS1 (14.6%), PLS2 (10.1%)에 따라 각각의 발효제품(낫또, 청국장, 된장, 미소, 두반장, 찜면장)이 구분되는 양상을 확인하였음. 그 중 전통된장과 청국장 낫또가 각각 클러스터링 된 것에 비하여 미소, 두반장, 찜면장이 보다 혼합되는 경향을 나타냄 (Figure 13).

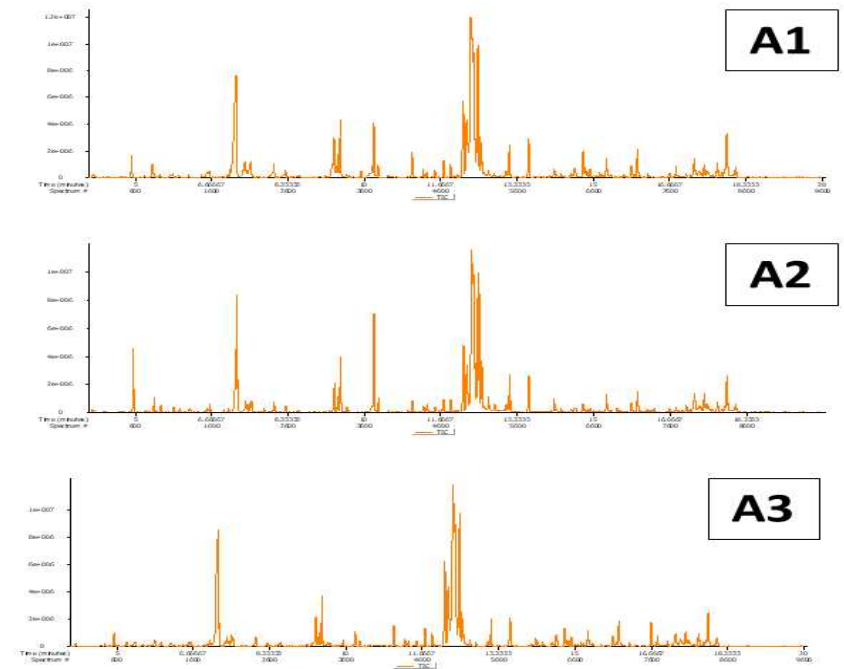


Figure 12. 전통된장과 해외발효제품의 GC-TOF-MS 크로마토그램

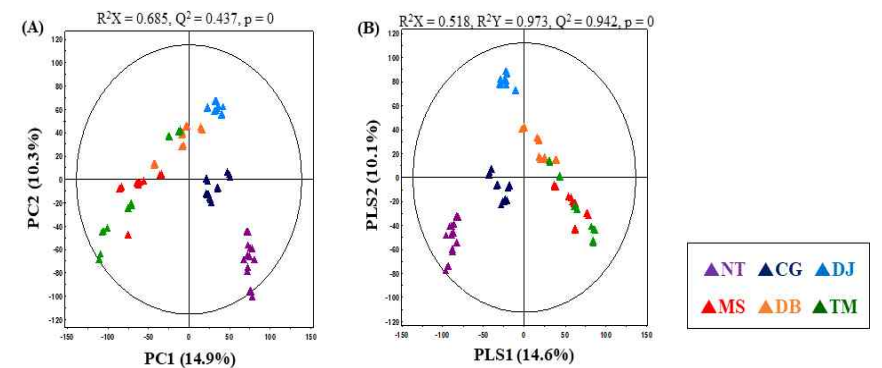


Figure 13. GC-TOF-MS를 이용한 전통된장과 해외발효제품의 principal component analysis (PCA) score plot (A) 및 partial least-square discriminant analysis (PLS-DA) score plot (B).

(나) 전통된장과 해외발효제품의 차이 나는 1차 대사체 비교분석

- ① GC-TOF-MS 분석 및 다변량 통계분석을 통해 전통된장과 시판된장을 구분 짓는 1차 대사산물을 39개 선정하였음. 이는 VIP values ($VIP > 0.7$)로 선정되었음. 39개의 대사체로는 아미노산계열 13개 (alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, glycine, serine, threonine, aspartic acid, gaba, phenylalanine, tyrosine), 당 11개 (glycerol, xylitol, pinitol, galactose, N-acetyl-D-glucosamine, ribose, ribitol, sucrose, maltose, lactose), 유기산 8개(lactic acid, acetic acid, benzoic acid, succinic acid, fumaric acid, glutaric acid, ribonic acid, gluconic acid), 지방산 6개(linoleic acid, linolenic acid, stearic acid, 9-octadecenamide, oleamide, glyceryl palmitate), 기타 1개 (hydroxylamine)가 동정되었음 (Table 3).
- ② Box and whisker plot으로 동정된 대사체의 경향을 확인한 결과, 아미노산은 대부분 청국장, 낫또, 된장에서 높은 함량을 나타냄. 낫또에서 methionine, valine, leucine, isoleucine, phenylalanine, proline의 상대적 함량이 높았음. 두반장에서는 GABA의 상대적 함량이 높음. 된장에서는 glycine, tyrosine, alanine, serine, threonine, aspartic acid의 상대적 함량이 높았음.
- ③ 유기산의 경우, 낫또에서는 fumaric acid, gluconic acid, benzoic acid, ribonic acid의 함량이 상대적으로 높게 나타났으며, 청국장에서 acetic acid, succinic acid, glutaric acid의 함량이 상대적으로 높게 나타났음.
- ④ 당의 경우, 각 6종의 제품에서 각기 함량이 다르게 나타남.
- ⑤ 지방상의 경우, 첨면장에서 linoleic acid와 9-octadecenamide의 상대적 함량이 높았음. 청국장에서는 glyceryl palmitate, hydroxyamine이, 된장에서는 stearic acid, linolenic acid의 함량이, 낫또에서는 oleamide의 상대적 함량이 높게 나타남 (Figure 14).

Table 3. 전통된장과 해외발효제품을 구분 짓는 GC-TOF-MS 기반 1차 대사체

No.	Tentative Metabolites ^a	RT ^b (min)	MS Fragmentpattern(m/z)	Identified ion ^c (m/z)	TMS ^d	ID ^e
<i>Amino acids</i>						
1	Valine	5.22	72, 75, 73, 55, 74, 146	72	1	STD
2	Alanine	5.40	147, 73, 116, 204, 148, 59	116	2	STD
3	Leucine	5.97	86, 75, 73, 74, 87, 146	170	1	STD
4	Isoleucine	6.20	86, 73, 75, 69, 87, 74	86	1	STD
5	Proline	7.45	142, 73, 107, 256, 140, 77	256	2	STD
6	Glycine	7.52	174, 73, 147, 86, 175, 59	174	3	NIST
7	Serine	8.03	73, 204, 218, 100, 147, 75	204	3	NIST
8	Threonine	8.28	73, 117, 219, 218, 57, 147	219	3	NIST
9	Aspartic acid	9.42	73, 232, 100, 147, 133, 61	232	3	NIST
10	Methionine	9.42	73, 128, 147, 176, 74, 157	128	2	NIST
11	GABA	9.50	73, 174, 147, 86, 175, 75	304	3	NIST
12	Phenylalanine	10.30	73, 218, 192, 100, 147, 75	218	2	STD
13	Tyrosine	12.53	73, 218, 100, 219, 74, 179	100	3	NIST
<i>Sugar & sugar derivatives</i>						
14	Glycerol	7.21	73, 147, 117, 103, 205, 133	205	3	STD
15	Xylitol	11.04	73, 217, 147, 103, 129, 117	217	5	STD
16	Pinitol	11.88	73, 147, 217, 133, 260, 191	260	5	NIST
17	Galactose	12.33	73, 147, 103, 117, 205, 129	118	5	STD
18	N-Acetyl-D-glucosamine	13.53	73, 147, 129, 202, 87, 205	202	4	NIST
19	Myo-Inositol	13.59	73, 147, 217, 191, 305, 129	305	6	STD
20	Ribose	14.77	73, 147, 98, 103, 217, 160	160	4	STD
21	Ribitol	15.96	73, 103, 147, 156, 217, 446	446	5	STD
22	Sucrose	16.55	73, 236, 230, 147, 245, 192	236	4	NIST
23	Maltose	17.20	73, 147, 204, 361, 217, 103	361	8	STD
24	Lactose	17.29	73, 191, 147, 129, 103, 133	271	8	STD
<i>Organic acids</i>						
25	Lactic acid	4.95	73, 117, 147, 66, 59, 133	88	2	STD
26	Acetic acid	5.10	147, 73, 66, 177, 148, 75	177	2	NIST

27	Benzoic acid	6.89	179, 105, 135, 77, 51, 180	51	1	NIST
28	Succinic acid	7.50	147, 73, 75, 129, 55, 148	129	2	STD
29	Fumaric acid	7.84	147, 245, 133, 246, 174, 149	245	2	STD
30	Glutaric acid	9.84	129, 73, 147, 247, 75, 157	129	3	NIST
31	Ribonic acid	11.50	73, 147, 292, 103, 217, 75	292	5	NIST
32	Gluconic acid	13.04	73, 147, 103, 333, 74, 217	333	5	NIST

Fatty acids

33	Linoleic acid	14.14	73, 75, 67, 81, 55, 95	337	1	NIST
34	Linolenic acid	14.19	75, 73, 79, 55, 129, 67	116	1	NIST
35	Stearic acid	14.29	117, 75, 73, 129, 132, 145	117	1	NIST
36	9-Octadecenamide	15.04	59, 72, 55, 69, 60, 126	59	1	NIST
37	Oleamide	15.28	75, 144, 73, 131, 116, 128	144	1	NIST
38	Glyceryl Palmitate	16.18	73, 147, 57, 55, 371, 203	371	2	NIST

Etc.

39	Hydroxylamine	5.56	73, 133, 146, 119, 147, 86	146	3	NIST
----	---------------	------	----------------------------	-----	---	------

^a Tentatively identified metabolites were selected as differential variables based on p -value < 0.05 and VIP 1, 2 > 0.7; VIP 1 and VIP 2, value of variable importance in projection from PLS1 and PLS2 of PLS-DA model. ^b RT Retention time. ^c m/z , the selected ion for identification. ^d TMS, trimethylsilyl. ^e ID, identification. STD, standard compounds; NIST, the mass spectra of NIST (National Institute of Standards and Technology mass search version 2.0, 2011, USA) and in-house libraries.

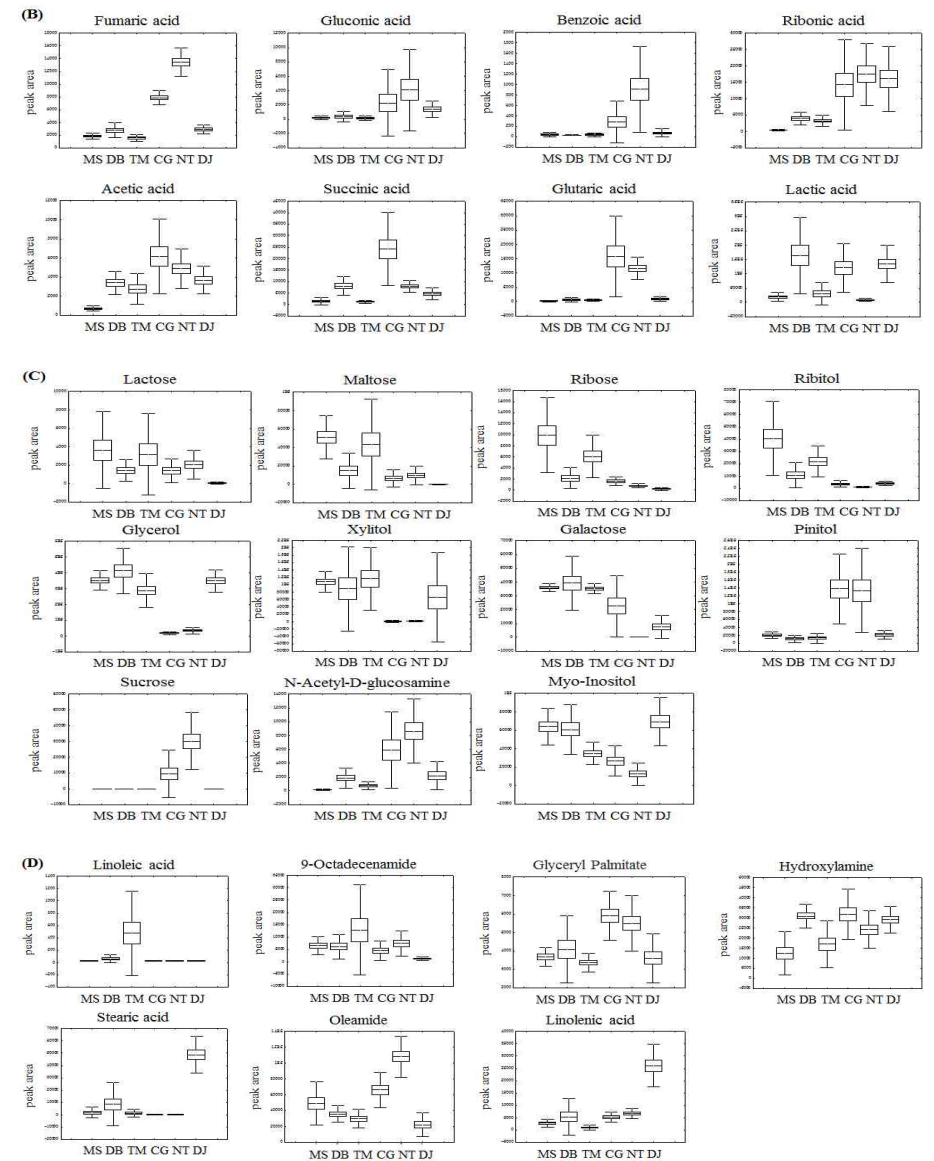
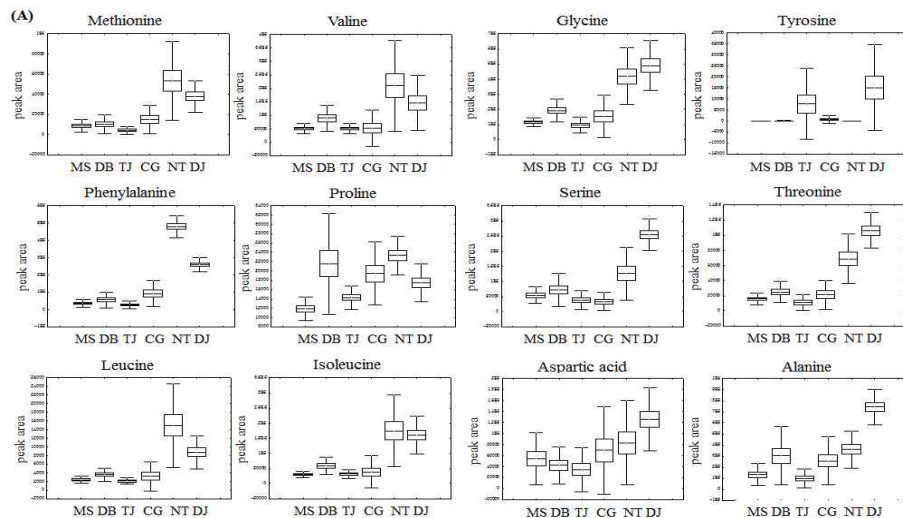


Figure 14. GC-TOF-MS 기반 전통된장과 해외발표제품을 구분 짓는 1차 대사체의 Box and whisker plots. 아미노산(A), 유기산(B), 당(C), 지방산(D). MS, miso; DB, doubanjang; TJ, tianmianjiang; CG, cheonggukjang; NT, natto; DJ, doenjang; Line, mean; box, standard error; whisker, standard deviation.

(다) 전통된장과 해외발효제품의 2차 대사체 프로파일링

전통된장, 청국장, 낫또, 두반장, 첨면장, 미소 각 5개씩을 선정하여 다음과 같은 크로마토그램을 얻어냄 (Figure 15). 전통된장과 해외발효제품의 UHPLC-LTQ-IT-MS분석 후 다변량 통계분석(PCA 및 PLS-DA 결과, PCA에서는 PC1 (10.6%), PC2 (6.7%) 및 PLS1 (10.6%), PLS2 (6.6%)에 따라 전통된장과 해외발효제품이 구분되는 양상을 확인하였음 (Figure 16). 된장과 두반장이 각기 클러스터링 되었으며, 청국장과 낫또가 그룹을 이루고 미소와 첨면장이 그룹을 이루는 경향을 나타내었음.

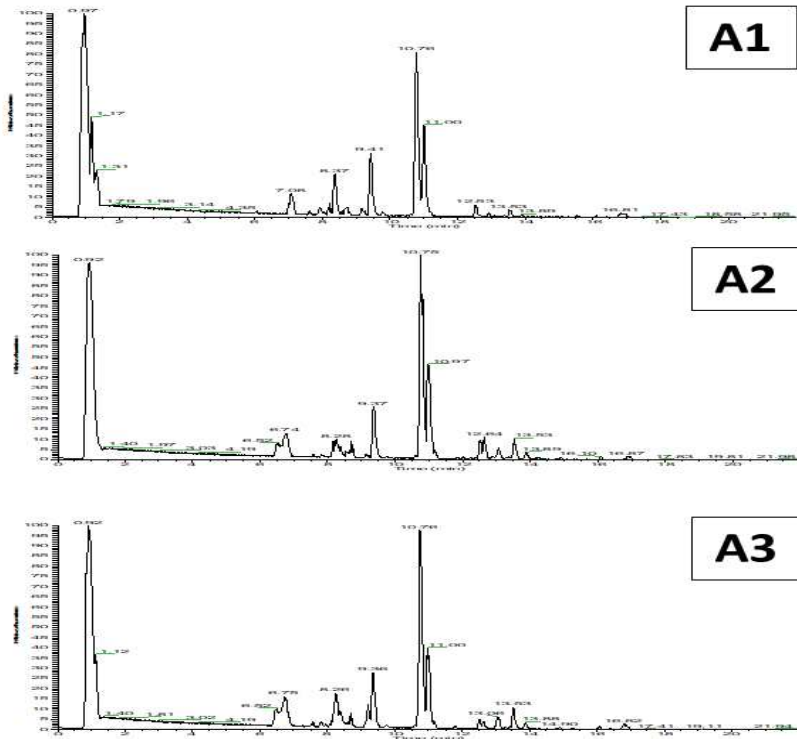


Figure 15. 전통된장과 해외발효제품의 UHPLC-LTQ-IT-MS 크로마토그램

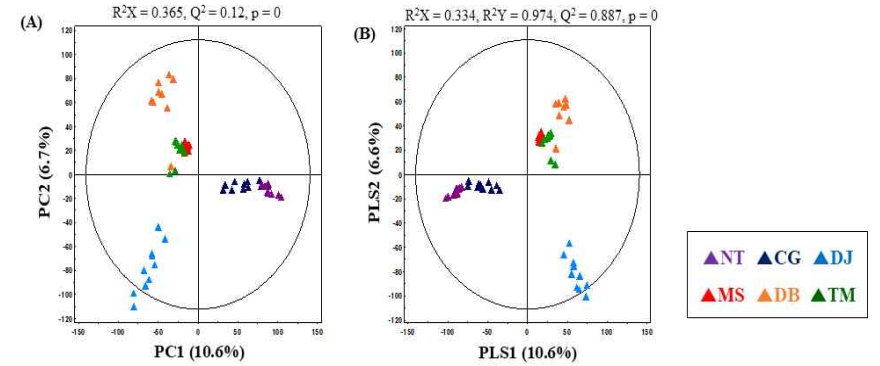


Figure 16. UHPLC-LTQ-IT-MS를 이용한 전통된장과 해외발효제품의 principal component analysis (PCA) score plot (A) 및 partial least-square discriminant analysis (PLS-DA) score plot (B).

(라) 전통된장과 해외발효제품의 차이 나는 2차 대사체 비교분석

- ① UHPLC-LTQ-IT-MS 분석 및 다변량 통계분석을 통해 전통된장과 시판된장을 구분 짓는 2차 대사산물을 19개 선정하였음. 이는 VIP values ($VIP > 0.7$)로 선정되었음. 그 중 14개의 대사체가 isoflavone 계열 6개 (genistin, malonylgenistin, daidzein, glycitein, dihydrogenistein, genistein), soyasaponin 계열 5개(soyasaponin V, soyasaponin I, soyasaponin II, soyasaponin III, soyasaponin IV), lysophospholipid 계열 3개(lysoPE 18:2, lysoPC 18:2, lysoPC 16:0)로 동정되었음 (Table 4).
- ② Box and whisker plot으로 동정된 대사체의 경향을 확인한 결과, isoflavone 중 배당체 isoflavone은 청국장과 낫또에서 높은 함량을, 아글리콘 형태는 전통된장에서 높은 함량을 나타내었음. 이는 발효기간이 청국장고 낫또는 1~3일로 가장 짧고, 된장의 경우 1~3년으로 가장 오래 발효가 진행됨에 따라 생물전환이 일어나는 것으로 사료됨.
- ③ 소야사포닌의 경우 청국장고 낫또에서 상대적으로 높은 함량을 나타냈으며, 이는 콩함량과 비슷한 경향성을 나타내었음. 소야사포게놀은

된장에서 상대적으로 높은 함량을 나타냈음. 이는 소야사포닌의 아 클리콘 형태로 발효기간이 긴 된장에서 가장 높게 나타남.

④ 리소인지질은 청국장에서 상대적으로 높은 함량을 나타냄.

⑤ 고추가 들어있는 두반장에서 캡사이신 계열이 발견되었음. (Figure 17).

Table 4. 전통된장과 해외발효제품을 구분 짓는 UHPLC-LTQ-IT-MS 기반 2차 대사체

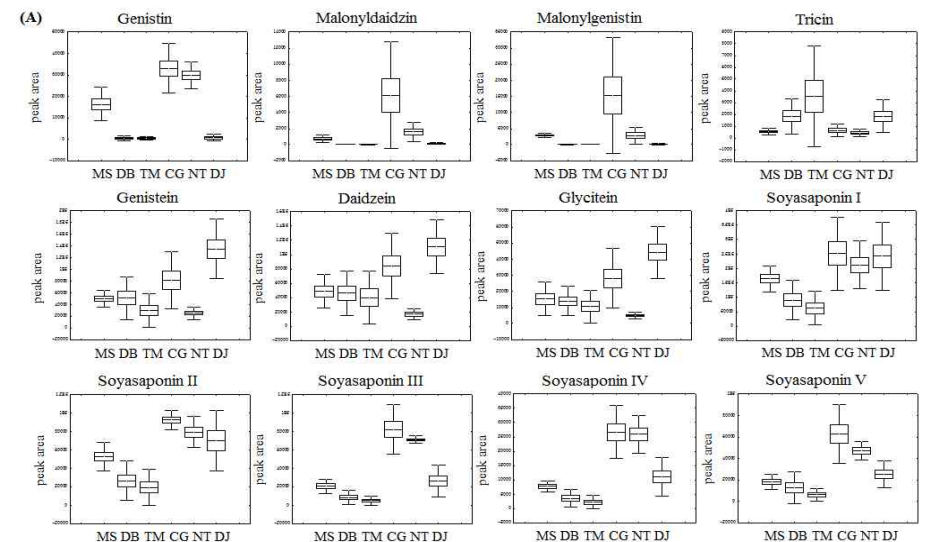
No.	Tentative metabolites ^a	UHPLC-LTQ-ESI-IT-MS/MS				
		RT ^b (min)	Measured mass(<i>m/z</i>)		MS ⁿ fragments(<i>m/z</i>) ^c	I.D. ^d
			[M-H] ⁻	[M+H] ⁺		
<i>Flavonoids</i>						
1	Genistin	6.77	477 ^e	433	433>271>243,215,153>111,67	LIB
2	Malonyldaidzin	7.02	547 ^e	503	503>255>227,199,137	Ref
3	Malonylgenistin	7.83	517	519	519>271>215,153>197,169	Ref
4	Daidzein	8.29	253	255	255>227,199,137>199,181>153	LIB
5	Glycitein	8.50	283	285	285>270>242>214,125	LIB
6	Genistein	9.43	269	271	271>253,243,215,153	LIB
7	Tricin	9.81	329	353 ^f	353>335,317,235	Ref
<i>Soyasaponins</i>						
8	Soyasaponin v	10.62	–	959	959>812,614,455>615,439	Ref
9	Soyasaponin i	10.75	987 ^e	943	943>797>599,441>581,423	LIB
10	Soyasaponin ii	11.02	957 ^e	913	913>781,617, 441	LIB
11	Soyasaponin iii	11.07	841 ^e	797	797>599,441>581,423>297	LIB
12	Soyasaponin iv	11.20	811 ^e	767	767>617,599,441	LIB
<i>Capsaicinoids & capsinoids</i>						
13	Dihydrocapsiate	8.61	307	309	309>291>281>263,222	Ref
14	Capsaicin	11.85	350 ^e	306	306>170,137	Ref
15	Dihydrocapsaicin	12.53	352 ^e	308	308>184,137>109	Ref
<i>Lipids</i>						
16	LysoPC18:3	12.46	562 ^e	518	518>500>441>305,181	Ref
17	LysoPE18:2	12.49	476	478	478>306>289,222,208	Ref
18	LysoPC18:2	13.08	565 ^e	521	521>502,184>443>307,163	Ref

19	LysoPE16:0	13.45	452	454	454>436,313>393	Ref
20	LysoPC16:0	13.54	541 ^e	497	497>478,184>419>283,163	Ref
21	LysoPC18:1	13.83	566 ^e	522	522>504>445>309,163	Ref

Non-Identifications

22	N.I.1	1.15	274	276	276>258>210>164	-
23	N.I.2	7.33	515	517	517>255>227,199,137>181,171	-
24	N.I.3	11.00	-	274	274>256>102	-
25	N.I.4	11.86	420 ^e	376	376>302,293>275>260,219	-
26	N.I.5	12.37	-	302	302>284>102	-
27	N.I.6	12.90	564 ^e	520	520>502,184>86	-
28	N.I.7	15.40	-	441	441>423>405,203	-
29	N.I.8	16.52	-	256	256>238,116,102>88	-
30	N.I.9	16.82	326 ^e	282	282>265>247>163,149	-
31	N.I.10	17.88	-	384	384>367,302,245,204,122	-

^a Tentatively identified metabolites based on both VIP > 0.7, *p*-value < 0.05 and PLS1 by PLS-DA dataset, ^b RT, Retention time, ^c MSⁿ fragment patterns detected in positive mode, ^d I.D., identification; LIB, In-house library; Ref., References., ^e Adduct ion is formate, [M+COOH]⁻, ^f Adduct ion is sodium, [M+Na]⁺



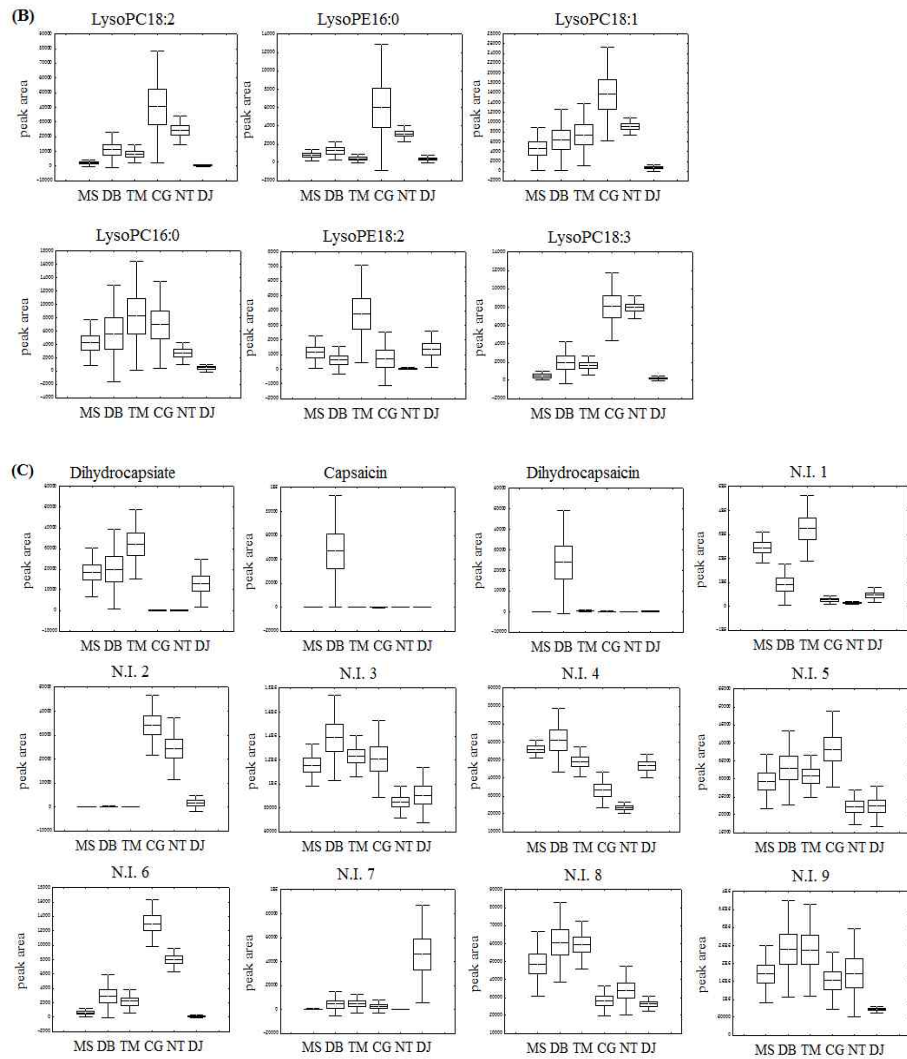


Figure 17. UHPLC-LTQ-IT-MS 기반 전통된장과 해외발효제품을 구분 짓는 2차 대사체의 box and whisker plots. 계열별로 플라보노이드와 소아사포닌(A), 리소인지질(B), 캡사노이드 및 미동정 성분(C)이다. TRA, MS, miso; DB, doubanjang; TM, tianmianjiang; CG, cheonggukjang; NT, natto; DJ, doenjang; *Line*, mean; *box*, standard error; *whisker*, standard deviation.

(마) 전통된장과 해외발효제품의 화학적 특성 분석

전통된장과 해외발효제품의 화학적 특성 차이를 확인하고자 pH와 염도 측정 결과, 염도는 첨면장에서 제일 높게 나타났으며, 미소>두반장, 된장>낫또, 청국장 순으로 나타났음. pH의 경우는 낫또>청국장>미소, 된장>첨면장, 두반장 순으로 높게 나타났음 (Figure 18).

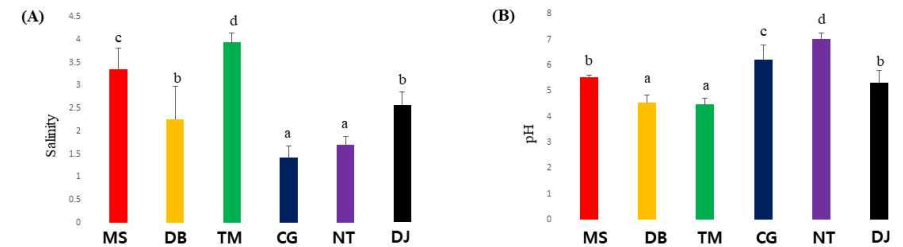


Figure 18. 전통된장과 해외발효제품의 염도 및 pH

(바) 전통된장과 해외발효제품의 생리활성 분석

전통된장과 시판 된장의 화학적 특성 차이를 확인하고자 배양시간별 ABTS 항산화 활성과 총 페놀함량 측정 결과, 낫또와 청국장에서 항산화 활성이 높게 나타났으며, 그 뒤로는 된장>두반장, 첨면장, 미소 순으로 결과가 나옴. 총 페놀 함량의 경우 유의적으로 큰 차이는 나타나지 않았으나, 낫또가 가장 높은, 두반장이 가장 낮은 함량을 나타내었음 (Figure 19).

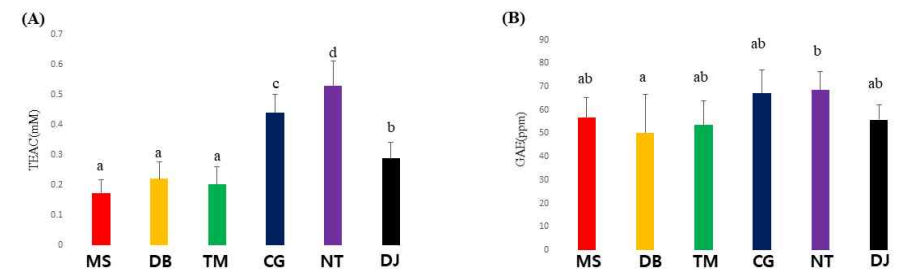


Figure 19. 전통된장과 해외발효제품의 ABTS 및 총페놀함량

(사) 생리활성 지표 대사체 탐색 및 동정

콩 발효제품 내 항산화 활성 물질을 탐색하기 위하여, 전통된장과 해외발효제품을 구분 짓는 대사체들과 항산화 활성과의 상관관계를 분석하였음 (Figure 20-21). 일차대사체 중에서는 대부분의 아미노산 및 유기산과 항산화 활성의 상관관계가 나타났으며, 이차대사체 중에서는 soyasaponin 및 isoflavone 배당체가 활성과 positive한 상관관계를 나타났음.

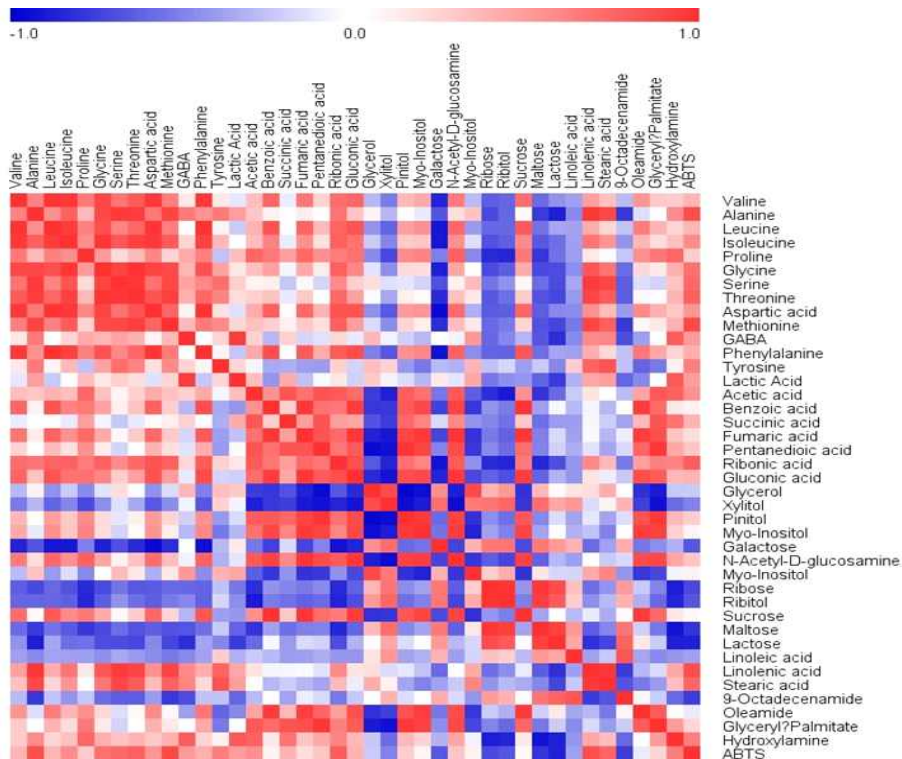


Figure 20. 1차 대사체와 항산화 활성(ABTS)과의 상관관계를 나타내는 correlation map. 각 칸은 Pearson's coefficient values r 값을 의미함. 빨강색은 positive ($0 < r < 1$) correlation, 파랑색은 negative ($-1 < r < 0$) correlation을 나타냄..

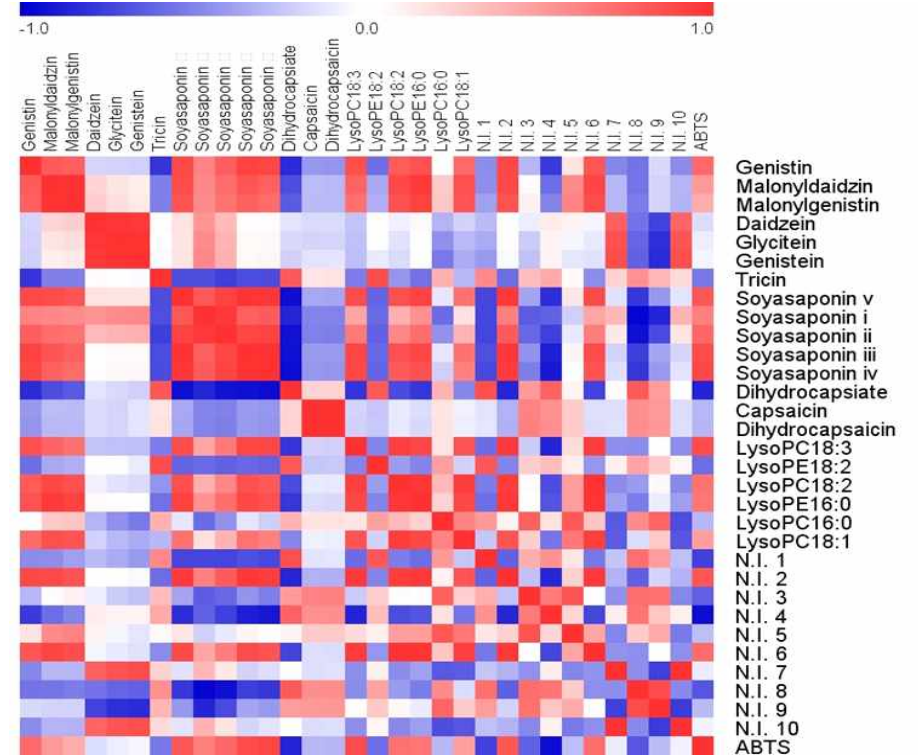


Figure 21. 2차 대사체와 항산화 활성(ABTS)과의 상관관계를 나타내는 correlation map. 각 칸은 Pearson's coefficient values r 값을 의미함. 빨강색은 positive ($0 < r < 1$) correlation, 파랑색은 negative ($-1 < r < 0$) correlation을 나타냄.

(아) 요약 및 고찰

전통된장과 해외발효제품의 차이는 각 원료와 함량, 발효기간에 의하여 관찰되었음 (Figure 22). GC-MS와 LC-MS분석 모두, 원료에 따라 클러스터링 되었으며, 원료 첨가에 따른 특이적 대사체가 발견되었음. 청국장, 낫또에서는 콩함량이 높아 상대적으로 소야사포닌의 함량이 높게 나타남. 발효기간이 상대적으로 짧은 청국장과 낫또에서 이소플라본 배당체가 높은 함량을 나타냈으며, 발효기간이 긴 된장에서는 이소플라본 아글리콘 및 소야사포닌

의 아글리콘이 높은 함량을 나타나게 되었음. 그러나 전통된장과 시판된장에서 항산화 활성 기여물질이 이소플라본 아글리콘인 반면, 이는 원료의 함량에 따른 차이가 커 콩함량이 높았던 청국장과 낫토가 항산화 활성이 가장 높았으며, 그 제품에 많았던 성분들이 항산화에 기여함을 확인하였음.

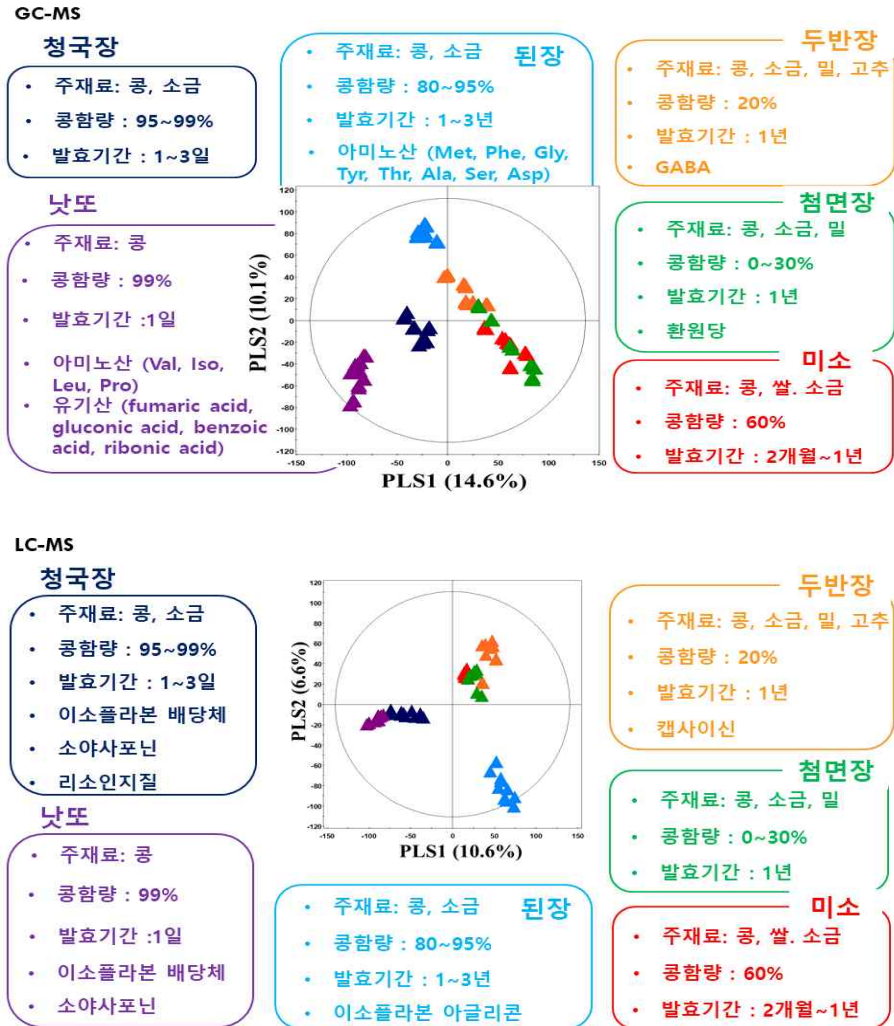


Figure 22. 전통된장과 해외발효제품의 대사체 프로파일링 비교 요약

4. 기대성과 및 활용방안

- 전통된장의 발효 대사산물 탐색을 통해 장류의 품질수준 확인 및 지속적인 품질관리에 활용
- 최신 질량분석기술을 이용한 대사산물 프로파일링 방법의 정립으로 향후 다양한 전통식품의 종합적 품질특성 확인 기법으로 활용

5. 참고문헌

1. Lee, S. Y., Lee, S., Lee, S., Oh, J. Y., Jeon, E. J., Ryu, H. S. & Lee, C. H. Primary and secondary metabolite profiling of doenjang, a fermented soybean paste during industrial processing. Food. Chem., 165, 157-166 (2014)
2. Jang, Y. K., Shin, G. R., Jung, E. S., Lee, S., Lee, S., Singh, D., Jang, E. S., Shin, D. J., Kim, H. J., Shin, H. W., Moon, B. S. & Lee, C. H. Process specific differential metabolomes for industrial gochujang types (pepper paste) manufactured using white rice, brown rice, and wheat. Food, Chem., 234, 416-424 (2017)
3. Lee, S., Lee, S., Singh, D., Oh, J. Y., Jeon, E. J., Ryu, H. S., Lee, D. W., Kim, B. S. & Lee, C. H. Comparative evaluation of microbial diversity and metabolite profiles in doenjang, a fermented soybean paste, during the two different industrial manufacturing processes. Food, Chem., 221, 1578-1586 (2017)