

탈지미강 단백질의 가수분해 및 분해물의 특성 연구

김창원 · 김현석¹ · 김병용 · 백무열*

경희대학교 생명자원과학연구원, 생명과학대학 식품공학과, ¹안동대학교 식품생명공학과

Proteolysis of Defatted Rice Bran Using Commercial Proteases and Characterization of Its Hydrolysates

Chang-Won Kim, Hyun-Seok Kim¹, Byung-Yong Kim, and Moo-Yeol Baik*

Department of Food Science and Biotechnology, Institute of Life Science Resources, Kyung Hee University

¹Department of Food Science & Biotechnology, Andong National University

Abstracts

The defatted rice bran (DRB) was enzymatically hydrolyzed using eight commercial proteases for 4hr at optimum pH and temperature. Proteolytic hydrolysates were examined in supernatant and precipitate using lowry, semimicro kjeldahl and gravimetric method using weight difference before and after enzymatic hydrolysis. In lowry and kjeldahl protein assay method, two proteases (Alcalase and Protease N) were found to be the most effective enzymes. In gravimetric method, 60.6~118.3 mg protein/g DRB was hydrolyzed after eight commercial proteases treatments. Similar to lowry and kjeldahl method, 118.3 and 107.1 mg protein/g DRB were hydrolyzed after Alcalase and Protease N treatments, respectively. When two or three effective proteases (Protamex, Alcalase and Protease N) were applied at one time to obtain synergistic effect, significant increase ($P < 0.05$) was observed when three proteases were applied at one time (63.4 mg protein/g DRB in lowry method and 204.5 mg protein/g DRB in gravimetric method). This result suggests that Alcalase and Protease N were the most effective enzymes for proteolysis of DRB and three commercial enzymes (Protamex, Alcalase and Protease N) showed the synergistic effect on the hydrolysis of DRB.

Key words: defatted rice bran, rice protein, protease, enzymatic hydrolysis

서 론

쌀은 아시아 국가에서 주식으로 사용되는 주요 곡물로서 전 세계적으로 567,000,000 톤이 생산되며, 이중 약 91%가 아시아에서 생산된다(FAO, 1998). 쌀의 도정 시 발생하는 미강의 생산량은 연간 385,000 톤에 달하며 이 중 30% 정도만이 미강유 생산에 사용되며 나머지 70%는 시료나 비료 등 저가치 물질로 사용된다. 미강은 약 30% 이상이 식이섬유이며 15% 정도의 단백질과 10-15% 정도의 지방이 함유되어 있고, 특히 현미유를 함유하고 남은 탈지미강의 경우 단백질이 약 18%에 달하고 있다(Park, 1993; Juliano, 1985). 쌀의 생산량은 매년 증가하는 추세지만 서구화된 식습관에 의해 밀의 소비량이 증가하는 반면 상대

적으로 쌀의 소비량이 낮아지고 이로 인해 잉여의 쌀로 쌀 가공식품을 개발하는 연구가 활발하게 진행되고 있다. 또한 미강에서 추출한 현미유는 불포화 지방산의 함량이 높아서 'heart oil'이라 불리며, 음식에 향을 부여하는 특징이 있어 식용으로의 이용을 위한 유지 추출이 증가하고 있으며(Taira, 1989) 현미유 착즙 후 생성되는 쌀 부산물의 양도 현미유의 제조증가와 함께 늘어나고 있다. Park et al.(1993)은 탈지미강을 초미세분쇄/공기분급을 이용하여 특성을 연구하였고, Gnanasambandam et al.(1997)은 쌀 도정 중 부산물로 생성되는 미강으로부터 가식성펩트를 제조하였으며 Jang et al.(2010)은 미강 분말을 파운드 케이크에 첨가하여 품질특성을 연구하였다. 과거에는 쌀 단백질을 미강으로부터 알칼리 추출하여 등전점 침지법으로 제조하거나 쌀을 분쇄하여 효소를 사용한 다음 전분질을 제거하는 것(Gnanasambandam & Hettiarachchy, 1995)이 주요 방법이었으나 기능성과 비용적인 문제가 있어서 다른 단백질들에 비해 식품산업에 널리 이용되지 못하고 있다. 쌀 단백질의 새로운 활용방법으로서 Shih(1996)는 쌀가루를 효소 처리하여 전분을 제거함으로써 쌀 단백질 농축물을

Corresponding author: Moo-Yeol Baik, Department of Food Science and Biotechnology, Institute of Life Science and Resources, Kyung Hee University, Yongin, Korea
Tel: +82-31-201-2625; Fax: +82-31-204-8116
E-mail: mooyeol@khu.ac.kr
Received November 16, 2010; revised February 10, 2011; accepted February 11, 2011

제조하여 pullulan과의 혼합 가식성 필름을 제조하였다.

탈지미강은 당, 지방 등을 함유하고 있지만 단백질과 식이섬유가 주성분을 이루고 있으며 단백질의 함량은 쌀이나 밀, 보리보다 높다. 현재 탈지미강의 이용분야는 풍부한 아미노산을 바탕으로 동물 사료로 이용되고 있지만 대부분 폐기 처리되고 있는 실정이다. 따라서 탈지미강의 식품소재로서의 이용을 위해 Sharif et al.(2009)은 탈지미강을 쿠키에 첨가하여 특성을 연구하였으며, Ghosh et al.(2008)은 탈지미강으로부터 산, 알칼리 분해방법을 이용하여 단백질 가수분해물을 추출하여 특성을 연구하였다. 그러나 건물기준 15%이상의 단백질 성분을 protease를 단일 혹은 혼합하여 가수분해하고 그 특성을 조사한 연구는 거의 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 상업적으로 쓰이는 효소들을 단일 혹은 혼합으로 탈지미강을 처리하여 불용성 쌀 단백질을 수용성 단백질로 수용화하고 이렇게 얻어진 가수분해물의 특성과 효소의 혼합에 의한 시너지효과를 연구하였다.

재료 및 방법

탈지미강

본 실험에 사용된 탈지미강은 세림현미에서 현미유를 제조한 후 생성된 부산물을 수거하여 -19°C에서 냉동 보관하면서 해동하여 사용하였다.

효소

이 실험에 사용된 효소들은 상업적으로 널리 사용되는 Protamex(novozyme, Bagsvaerd, Denmark), Neutrase(novozyme, Bagsvaerd, Denmark), Flavourzyme (novozyme,

Bagsvaerd, Denmark), Alcalase(novozyme, Bagsvaerd, Denmark), Protease M(amino, Nagoya, Japan), Protease N(amino, Nagoya, Japan), Protease A(amino, Nagoya, Japan) 그리고 Molsin F(Seishin, Noda, Japan)와 같이 총 8 가지의 효소를 구입하여 사용하였다.

시료의 수용성 성분 제거

탈지미강에 존재하는 수용성 성분을 제거하기 위해 탈지미강 100 g에 증류수 400 mL를 가하여 5분간 교반을 한 뒤 이를 20 분간 원심분리(3000 xg)를 하여 얻어진 침전물을 dry oven에 24 시간 동안 건조하여 무게를 측정하였다. 증류수를 가하여 수세하는 횟수에 따라 각각 무게를 측정 한 후 그 무게의 변화가 없을 때의 시료를 수용성 성분이 완전히 제거된 시료로 결정하여 마쇄 한 후 40 mesh의 표준체를 통과시켜 이후 실험의 시료로 사용하였다.

단일효소 처리

수용성 성분이 완전히 제거된 탈지미강 5 g에 증류수 (28.3 mL)를 첨가하여 15% 현탁액 형태로 제조하고, 1 N HCl 혹은 1 N NaOH를 사용하여 기존에 알려진 효소들의 최적 pH를 조절하고, 최적 온도에서 시료의 고형분 대비 0.1%의 효소를 첨가한 후 4 시간 동안 반응시켰다. 효소의 함량이 고형분 대비 0.1% 이상에서 생성되는 단백질의 함량 차이가 거의 없었기 때문에 고형분 대비 0.1%의 효소를 첨가하였다. 반응이 끝난 현탁액을 20 분간 원심분리 (3000 xg)를 하고 이때 얻어진 상등액과 침전물, 그리고 침전물의 건조 후 무게변화를 통하여 생성된 단백질의 양을 비교하였다(Fig. 1).

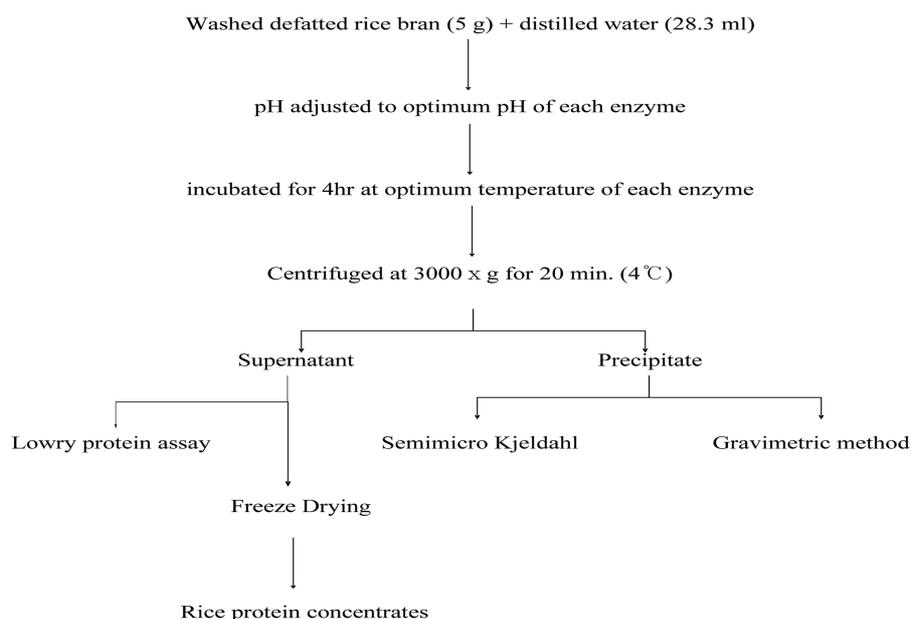


Fig. 1. Flow chart for the preparation of rice protein concentrates from defatted rice bran.

혼합효소 처리

단일효소 처리로 얻어진 결과를 토대로 가장 효과가 좋은 효소인 Protamex(Pro), Alcalase(Al) 그리고 Protease N(N)을 각각 다음과 같이 2 개 또는 3 개의 효소를(Pro+Al, Pro+N, Al+N, Pro+Al+N) 4 가지의 방법으로 혼합하여 단일처리와 같은 방법으로 효소별로 각각 고형분 대비 0.1%를 첨가한 후 최적 pH와 최적 온도에서 4 시간 동안 반응한 후 20 분 동안 원심분리(3000×g)하여 상등액과 침전물을 분리, 분석하였다(Fig. 1).

단백질 분석

단백질분석은 총 3 가지의 방법으로 분석하였다. 원심분리를 하여 얻어진 상등액중의 수용성 단백질은 TP0300-1KT Kit(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 사용하여 Lowry protein assay를 통하여 측정하였다(Lowry et al, 1951). 또한 침전물은 Digester(MBCM12, Raypa, Barcelona, Spain), Distiller(DNP1500, Raypa, Barcelona, Spain)와 Titrater(Akku-drive, Hirschmann Laborgerate, Eberstadt, Germany)를 사용하여 semimicro-Kjeldahl(AOAC, 1984)법으로 측정하였으며, 무게변화를 통한 불용성 단백질의 변화량을 알아보기 위해 원심분리를 하여 얻어진 침전물을 105°C의 Dry oven에서 24 시간 건조한 후 처음 시료의 무게와 건조된 침전물의 무게 차이를 이용하여 단백질 변화량을 계산하고 3 가지 방법의 값을 비교, 분석 하였다. 이때 각각의 분석 방법에 대한 계산식은 다음과 같다.

- Lowry protein assay(mg/g)

$$\frac{P \times (28.3 + E + C)}{S}$$

P = Protein contents(μg/mL)
 E = amounts of enzyme(mL)
 C = amounts of 1 N NaOH or HCl(mL)
 S = sample weight(g)

- Semimicro- Kjeldahl(mg/g)

$$\frac{1.4 \times T}{S} \times 5.95$$

S = sample weight(g)
 T = amounts of spending of 0.1 N HCl(mL)

- Gravimetric method(mg/g)

$$\frac{(S - W)}{S} \times 1000$$

S = sample weight(g)

W = weight of sample after drying(g)

수분함량

A.O.A.C. 방법에 따라 시료 2 g을 Forced convection dry oven(HB-502M, Hanbaek Scientific Co., Gyeonggi-do, Korea)을 이용하여 105°C에서 overnight한 후 무게를 측정하여 수분함량을 계산하였다.

조회분 함량

A.O.A.C. 방법에 따라 시료 1 g을 Electric muffle furnace(LMF 1200, Carbolite/Sheffield, Hope, England)를 사용하여 550°C에서 overnight한 후 무게를 측정하여 조회분 함량을 계산하였다.

조지방 함량

A.O.A.C. 방법에 따라 refrigerated circulator(Isotemp 1006p, Pittsburgh, PA, Fisher Scientific, USA)를 사용하여 ether추출을 하는 Soxhelt extraction을 하여 조지방 함량을 계산하였다.

SDS page

Protein sample은 SDS를 포함하는 polyacrylamide gel을 이용한 Laemmli(1970)의 방법에 따라서 전기영동을 하였다. Separating gel은 10% acrylamide gel을 준비하였고 running gel은 H₂O 1.9 mL, 30% acrylamidemix 1.7 mL, 1.5 M Tris(pH 8.8) 1.3 mL, 10% SDS 0.05 mL, 10% ammonium persulfate 0.05 mL, N, N, N', N'-tetramethylethylenedia-mine (TEMED) 0.002 mL의 조성으로 제조하였으며 stacking gel은 H₂O 0.68 mL, 30% acrylamidemix 0.17 mL, 1.0 M Tris(pH 6.8) 0.13 mL, 10% SDS 0.01 mL, 10% ammonium persulfate 0.01 mL, N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine (TEMED) 0.001 mL의 조성으로 제조하였다. Sample은 5 × sample buffer[60 mM Tris-HCl buffer (pH 6.8), 14.4 mM β-mercaptoethanol, 2%(w/v) SDS, 25%(v/v) glycerol, 0.1% (w/v) bromophenol blue]와 섞어서 10 분간 끓인 다음 12,000×g으로 1 분간 원심분리 시켜서 층분리를 시킨 후 아래층을 gel에 loading하였다. 전기영동은 150 mA로 분리했으며, staining buffer(coomassie blue R-250 1.0 g, methanol 450 mL, H₂O 450 mL, glacial acetic acid 100 mL)와 destaining buffer(methyl alcohol 100 mL, acetic acid 100 mL, H₂O 800 mL)를 사용해서 염색과 탈색을 하였다.

아미노산 분석

시료 30 mg를 300 μL의 ddH₂O에 녹인 후 10% TCA solution을 1:1의 비율로 첨가하고 10 분간 원심분리

(12000 ×g)하여 단백질을 침전 시켰다. 지방을 제거하기 위해 hexane을 1:1의 비율로 첨가하여 지방을 녹인 후 5분간 원심분리(12000 ×g)를 하고 침전된 침전물을 아미노산 분석시료로 사용하였다. Sample은 0.4 μm의 filter로 여과한 후 Amino Acid Analyzer(Hitachi L-8900, Tokyo, Japan)를 이용하여 분석하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 이상 반복 측정하고 SAS V8.02(SAS Institute, Inc. 2002)를 사용하여 분산 분석 및 Duncan 다범위 검증(Duncan's multiple range test)을 실시하였다.

결과 및 고찰

수세 횟수에 따른 중량 변화

시료의 수용성 분획을 제거하기 위해 증류수로 수세를 하였고 수용성분획의 제거는 수세 횟수에 따른 중량 변화를 통해 알 수 있었다. 수세 횟수에 따른 중량 변화는 탈지미강을 3회 이상 수세하여 건조하였을 때 처음 중량 기준 건물량 68.5%로써 더 이상 그 무게 변화가 없는 것을 알 수 있었으며 따라서 3회 수세한 탈지미강을 취합하여 건조한 후 이후 실험의 시료로 사용하였다.

일반성분 분석 및 특징 평가

탈지미강의 일반성분을 Table 1에 나타내었다. 탈지미강 내의 수분, 조단백질 및 조지방 함량은 각각 0.12%, 17.89%, 4.32%이었고 조회분 함량은 12.68%이었다. 이 결과는 일반적인 탈지미강에 비해 단백질의 함량은 상대적으로 비슷하지만 지방의 함량이 높은 것으로 나타나 수세를 통하여 수용성 성분을 제거하는 과정에서 수용성 단백질과 탄수화물이 제거되면서 상대적으로 지방의 함량이 높아진 것으로 생각된다.

단일효소 처리

Fig. 2에서 알 수 있듯이 Lowry protein assay, Kjeldahl protein assay 및 Gravimetric method 3 가지 방법 모두 전체적인 그래프 패턴이 비슷한 형태를 나타내어 수용성 단백질 생성량을 비교 분석함에 있어서 3 가지 방법 모두 수

Table 1. Proximity composition of rice and rice defatted rice bran

	Rice ¹⁾	Defatted rice bran
Crude Protein (%)	6.12-8.67	17.89
Crude Lipid (%)	0.35-0.45	4.32
Crude Ash (%)	0.59-0.63	12.68
Moisture content (%)	13.22-14.23	0.12
Carbohydrates (%)	76.6-79.12	64.99

¹⁾ Data from Kum et al. (1995)

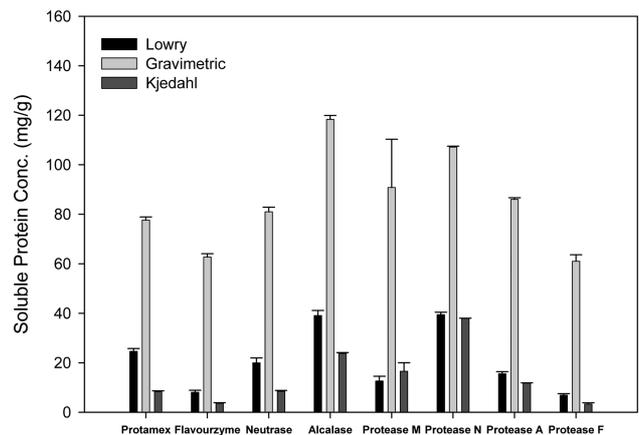


Fig. 2. Soluble protein contents of defatted rice bran after enzymatic hydrolysis with 8 commercial proteases.

용성 단백질의 생성량을 측정하는데 적절함을 확인 할 수 있었다. Lowry protein assay와 Kjeldahl protein assay의 값의 경우 Protamex를 처리한 시료는 24.57 mg/g, 8.40 mg/g값을 나타내었고 Alcalase의 경우는 39.05 mg/g, 23.80 mg/g으로 대부분 유사한 값을 나타낸 반면 Gravimetric method의 경우 비슷한 경향을 나타내었지만, 그 양은 다른 두 가지 방법에 비하여 훨씬 크게 나타났다. 이것은 크게 두 가지 이유를 들 수가 있는데 첫 번째는 효소반응을 진행하는 동안 수용성 성분을 제거하기 위한 수세과정에서도 제거되지 않았던 전분물질이 유리되어 수용성단백질 외의 물질이 용출되면서 Gravimetric method의 결과가 높아졌을 가능성이며, 두 번째는 assay 방법에 따른 오차이다. Lowry protein assay의 경우 일반적으로 단백질에 포함되어 있는 Tryptophan과 Tyrosine 두 아미노산의 평균량을 기준으로 단백질 함량을 계산하고, Kjeldahl의 경우 질소계수를 이용하여 시료의 단백질 함량을 계산하는데 탈지미강의 원료인 쌀에는 Tryptophan이 Lysine과 더불어 부족 아미노산으로 알려져 있으며, 탈지미강은 이미 착유과정이라는 가공과정을 거친 만큼 쌀의 질소계수와 차이를 보일 수 있으므로 두 가지 assay 방법에 오차가 있을 수 있고 이에 따라 모든 단백질 분석방법에 어느 정도의 차이가 존재한 것으로 생각된다.

Lowry 방법의 경우 Protease N이 가장 큰 분해 정도를 나타내었고 Alcalase, Protamex의 순으로 분해 정도가 큰 것으로 나타났다. 건조방법의 경우 Alcalase가 가장 큰 분해 정도를 나타내었고, 그 다음 Protease N, Protease M, Protease A의 순으로 분해 정도가 나타났으며, 특히 Alcalase와 Protease N, Protease M과 Protease A 그리고 Protamex의 경우는 각각 유의적으로 차이가 없는 것으로 나타났다. Kjeldahl method의 경우 Protease N이 가장 큰 분해 정도를 나타내었고, Alcalase가 두 번째로 큰 분해 정도를 나타내었으며, 다음으로는 Protease M이 높은 분해 정

도를 나타내었다. 하지만 Lowry method와는 다르게 Protamex의 분해율이 떨어지는 것으로 나타났다. 따라서 세가지 방법 모두에서 유의적으로 분해 정도의 차이가 있었지만 3 가지 방법에서 모두 효과가 좋았던 Protease N과 Alcalase, 그리고 Kjeldahl method에서는 비록 분해율이 떨어졌지만 Lowry와 건조방법에서 분해율이 좋았던 Protamex 이렇게 3 가지 단백질 분해 효소의 효과가 가장 좋음을 알 수 있었다. 또한 단백질 분해율을 알아보기 위해 실제 침전물을 비교해서 전체 양과의 차이를 계산한 Kjeldahl의 경우 Protease N이 전체 단백질의 21.7%의 분해율을 나타내었다.

탈지미강과 유사한 보리부산물인 맥주박을 protease처리한 Faulds et al.(2008)의 연구에서는 맥주박에 Alcalase를 사용했을 경우 단백질의 26%가 분해가 되어 식품에 상업적으로 쓰이는 Alcalase가 곡물에 있어서는 탈지미강과 마찬가지로 높은 분해율을 나타내지 못하는 것을 보여주었다. 이러한 낮은 분해율은 곡물에 존재하는 다량의 섬유질 중 hemicellulose나 lignin과 같은 물질이 단백질과 complex를 형성하여 효소의 가수분해를 방해하기 때문인 것으로 알려져 있다(Iiyama et al., 1994). 또한 이러한 현상의 주요 원인은 섬유질이 효소와 단백질의 binding site에 존재하거나 binding site를 둘러싸므로써 가수분해를 방해하기 때문인 것으로 생각된다. Faulds et al.(2008)은 이런 단점을 보완하기 위해 맥주박에 Carbohydrase와 Protease를 혼합하여 처리하였지만 분해율이 크게 증가하지 않는다고 보고하였는데 이는 효소에 의해 분해가 잘 되지 않고 잔존하는 lignin이 다당류와 세포벽에 결합되어 있는 단백질과 지속적으로 결합하여 단백질의 가수분해가 방해를 받기 때문이라고 하였다.

혼합효소 처리

단일 효소처리를 하여 가장 높은 분해율을 나타낸 Protamex, Alcalase, Protease N 세가지 효소 중 두 가지 혹은 세가지 모두를 혼합하여 탈지미강의 단백질을 분해한 결과, Lowry protein assay의 경우 단일에서 가장 효과가 좋았던 Protease N과 3 가지 효소 모두 혼합한 것을 비교하였을 때 단일처리 한 것은 39.38 mg/g, 혼합의 경우 55.34 mg/g로, Gravimetric method는 각각 107.14 mg/g, 198.45 mg/g으로, Kjeldahl의 경우는 각각 37.94 mg/g, 42.92 mg/g으로 모든 방법에서 효소를 혼합하였을 때 상승효과가 있는 것으로 나타났다(Fig. 3). 가장 분해능력이 큰 Protease N 단독으로 처리한 것에 비하여 효소들을 두 개씩 혼합하여 단백질을 분해하여도 이들간의 유의적인 차이가 존재하여 상승효과가 있음을 알 수 있었다. 이는 탈지미강의 불용성 단백질 중 분해가 가능한 부분이 Protease N에 의해 완전히 분해되지 못하고 남은 단백질들이 다른 효소들에 의해 분해가 일어나기 때문으로 생각된다. 특히 상업적으로 사용

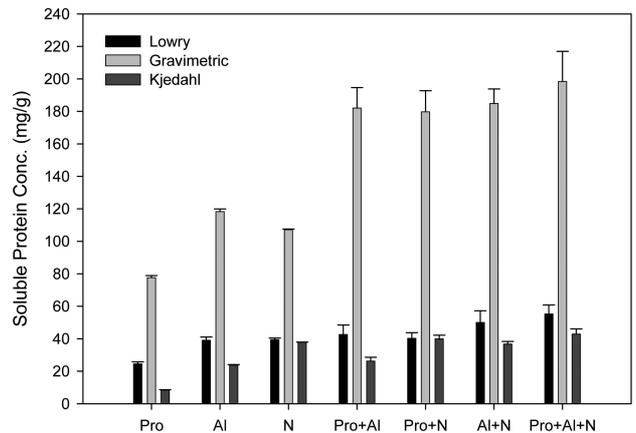


Fig. 3. Soluble protein contents of defatted rice bran after enzymatic hydrolysis with mixed proteases. (Pro : Protamex, Al : Alcalase, N : Protease N)

되는 protease의 경우 서로 분해할 수 있는 부분이 다르므로 Protease N이나 Alcalase 혹은 Protamex가 각각 분해를 하지 못했던 부분을 분해하여 상승효과가 생긴 것으로 생각된다.

한편 Faulds et al. (2008)은 탈지미강과 유사한 부산물인 맥주박에 carbohydrase와 protease를 혼합하여 처리하였을 때 분해율이 크게 증가하지 않는다고 보고한 반면, Treimo et al. (2009)은 carbohydrase 만을 혼합하여 처리하였을 경우 본 연구에서의 탈지미강에 처리한 protease와 마찬가지로 혼합 처리하였을 때 상승효과가 있는 것으로 보고하였다. 이는 곡물 중 탄수화물의 경우 당뿐만 아니라 cellulose, hemicellulose, lignin등이 존재하여 carbohydrase가 혼합이 될수록 각각의 부분을 분해할 수 있는 확률이 높아져서 이런 상승효과를 나타낼 수 있는 것 때문이라고 하였으며, 이러한 상승효과는 효소의 type 즉 endo, exo의 형태에 따라서 상승효과가 나타난다고 하였다(Treimo et al., 2009). 또한 protease는 각각 가수분해 할 수 있는 고유의 특정 peptide가 있는데 이런 peptide가 곡물에 풍부하면 protease의 가수분해 효과가 증가하는 것으로 알려져 있다(Lee, 2007).

효소에 의해 분해된 단백질 특성

효소를 이용하여 분리한 단백질의 특성을 확인하기 위하여 단일효소를 사용했을 때 수용성 단백질을 가장 많이 생성한 Protamex, Alcalase, Protease N과 혼합효소에서 가장 효과가 좋았던 Protamex + Alcalase + Protease N을 선택하여 SDS-PAGE를 하였다(data not shown). 효소처리를 한 시료에는 어떠한 밴드도 형성이 되지 않는 것을 볼 수 있었는데 이것은 탈지미강에 존재하는 단백질이 15 kDa미만의 작은 크기의 polypeptide 혹은 amino acid의 형태로 분해가 된 것을 의미한다. Treimo et al.(2008)이 연구한 맥

Table 2. Amino acid distribution (mg/L) of defatted rice bran concentrates

	Pro ¹⁾	Al ¹⁾	N ¹⁾	Pro+Al+N ²⁾
Phosphoserine	1,041.6	1,179.5	1,351.8	1,169.3
Phospho ethanol amine	452.7	1,567.7	621.4	810.6
Urea	7,638.4	0.0	12,174.2	4,147.8
Aspartic acid	402.3	514.6	439.2	655.9
Threonine	96.9	50.6	56.8	413.2
Serine	228.3	201.8	236.9	666.1
Glutamic acid	546.4	367.8	314.9	843.7
Sarcosine	643.9	332.6	832.6	2258.5
α-amino adipic acid	0.0	463.9	0.0	0.0
Glycine	260.4	262.9	331.6	507.3
Alanine	449.8	360.3	440.7	740.3
Citulline	228.0	171.7	269.2	612.4
α-amino-n-butyric acid	342.5	188.8	344.2	865.7
Valine	320.4	63.9	391.7	599.4
Cystine	901.2	494.2	769.3	1,251.2
Methionine	172.2	371.4	147.2	239.6
Cystathionine	607.0	148.6	584.6	1,072.2
isoleucine	1,460.7	546.2	1199.2	731.1
Leucine	611.0	151.6	346.8	584.0
Tyrocine	623.3	557.0	724.7	1,286.6
Phenylalanine	953.6	171.8	302.2	1,478.2
β-Alanine	580.2	798.2	536.6	908.3
β-amino isobutyric acid	2,205.1	1,686.8	2,481.3	3,620.7
β-amino-n-butyric acid	515.6	536.7	606.1	751.0
Ethanol amine	541.5	434.0	702.2	771.1
Ammonia	169.0	241.6	214.7	232.6
Hydroxylysine	232.8	284.3	356.2	519.8
Ornithine	367.2	370.2	461.3	627.2
Lysine	353.7	97.4	237.1	346.5
1-Methylhistidine	132.0	0.0	78.0	323.6
Histidine	113.9	30.9	26.5	111.0
3-Methylhistidine	306.0	127.0	96.5	704.8
Anserine	777.1	1,083.6	630.1	2,241.5
Carnosine	950.5	1,015.9	568.2	1,158.8
Arginine	887.5	430.0	725.5	699.8
Total free amino acids	26,112.6	15,303.4	29,599.4	33,950.0

¹⁾ Pro : Protamex, Al : Alcalase, N : Protease N

²⁾ Pro + Al + N = Protamex + Alcalase + Protease N

주박의 경우에도 Alcalase와 같은 protease를 맥주박에 처리 하였을 경우 분자량이 10 kDa미만의 polypeptide와 같은 물질들이 분류되었고 대부분의 단백질은 1 kDa 미만의 작은 peptide나 amino acid의 형태로 분해가 되는 것으로 보고되었다.

아미노산 분석

Table 2는 효소처리 한 탈지미강의 수용성성분에 존재하는 아미노산의 조성을 분석한 결과이다. 효소의 종류별 혹은 단일, 혼합처리 하였을 때의 아미노산 조성은 특정 패턴

을 보이지 않았으며 단맛 등의 맛의 발현에 영향을 주는 Glutamic acid나 Aspartic acid에 비해 쓴맛을 유발하는 아미노산인 Leucine, Isoleucine, Valine, Phenylalanine, Arginine의 함량이 높은 것으로 보아 샘플은 쓴맛이 강할 것으로 예상된다(Otagiro et al., 1985). 또한 총 아미노산의 경우 Protamex, Alcalase, Protease N, Protamex + Alcalase + Protease N의 값이 각각 0.0261 g/g, 0.0153 g/g, 0.0300 g/g, 0.0340 g/g으로써 모든 효소를 혼합하였을 때 총 아미노산의 함량이 가장 높은 것을 알 수 있었다.

요 약

쌀부산물인 탈지미강을 상업적으로 사용되는 8가지 protease를 최적화된 조건에서 단일 혹은 혼합 처리하여 수용성 단백질을 분리하였다. 이렇게 분리된 단백질을 Lowry, Kjeldahl 그리고 Gravimetric method 등 총 3가지 방법으로 분석을 한 결과 Protamex, Alcalase, Protease N이 가장 높은 분해율을 나타냈다. 3 가지 방법에서 모두 Protamex, Alcalase, Protease N이 가장 높은 분해율을 나타내었고, Gravimetric method의 경우 다른 두 분석방법인 Lowry, Kjeldahl method에 비해 더 높은 단백질 함량을 보였다. 또한 위의 단일처리결과를 바탕으로 3 가지 protease를 혼합하여 처리하였을 때 단일효소처리에 비해 상승효과가 나타나는 것을 알 수 있었는데, 이것은 protease의 경우 가수분해 할 수 있는 특정 peptide 혹은 amino acid가 있는데 각각의 protease가 분해하지 못하는 peptide 혹은 amino acid를 서로 분해해줌으로써 상승효과가 나타난 것으로 생각된다. 효소처리를 하여 얻어진 단백질의 사이즈를 알아보기 위해 SDS PAGE를 한 결과 어떠한 밴드도 형성이 되지 않았고 이는 분해된 단백질이 marker의 최소 사이즈인 15 kDa보다 작기 때문인 것으로 생각된다. 따라서 일반 단백질보다 사이즈가 작은 polypeptide나 amino acid로써 분해된 것을 뜻하고 실제로 섭취하였을 때는 신체에서 생성되는 단백질 분해효소인 trypsin이나 chymotrypsin의 분해 없이도 쉽게 흡수 할 수 있을 것이라 판단된다. 또한 효소의 종류가 많을수록 총 아미노산의 함량이 높아짐으로써 식품첨가물로서 활용도가 높은 단백질가수분해물로 분해되었음을 확인할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부(농림, 식품, 수산)기술개발사업의 지원에 의해 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

참고문헌

AOAC. 1995. Official Method of Analysis. Association of Official

- Analytical Chemists (NO. 993.13), Arlington, VA, USA.
- Bandyopadhyay K, Misra G, Ghosh S. 2008. Preparation and characterization of protein hydrolysates from Indian defatted rice bran meal. *J. Oleo Sci.* 57: 47-52.
- FAO, 1998, FAO production Yearbook, Vol 41, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Faulds CB, Robertson JA, Waldron KW. 2008. Effect of pH in the solubilization of brewer's spent grain by microbial carbohydrases and proteases. *J. Agric. Food Chem.* 56: 7038-7043.
- Gnanasambandam R, Hettiarachchy NS, Coleman M. 1997. Mechanical and barrier properties of rice bran films. *J. Food Sci.* 62: 395-398.
- Gnanasambandam R, Hettiarachchy NS. 1995. Protein concentrates from unstabilized and stabilized rice bran: preparation and properties. *J. Food Sci.* 60: 1066-1069.
- Iiyama K, Lam TBT, Stone BA. 1994. Covalent cross-links in the cell wall. *Plant Physiol.* 104: 315-320.
- Jang KH, Kang WW, Kwak EJ. 2010. The quality characteristics of pound cake prepared with rice bran powder. *Korean J. Food Preserv.* 17: 250-255.
- Juliano BO. 1985. Rice bran. In *Rice: Chemistry and Technology*. AACC, St. Paul, MN, U.S.A. 647.
- Kim SK, Kim IW, Han YI, Park HH, Lee KH, Kim ES, Cho MH. 1984. Calorie, mineral content and amino acid composition of Korean rice. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 13: 372-376.
- Kum JS, Lee CH, Baek KH, Lee SH, Lee HY. 1995. Influence of cultivar on rice starch and cooking properties. *Korean J. Food Sci. Technol.* 27: 365-369
- Laemmli UK. 1970. Celavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- Lee GS. 2007. *Enzymology*. *Daihak publishing company*, Seoul, Korea. pp. 15-20
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr A L, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Otagiro K, Nosho Y, Shinoga L, Fukui H, Okai H. 1985. Studies on a model of bitter peptides including arginine, proline and phenylalanine residues. *Agric. Biol. Chem.* 49: 1019-1026
- Park DJ, Ku KH, Mok CK. 1993. Microparticulation/Air classification of rice bran: Characteristics and Application. *Korean J. Food Sci. Technol.* 25: 769-774.
- SAS Institute, Inc. 2002. *SAS User's Guide*. Statistical Analysis Systems Institute, Cary, NC, USA.
- Sharif, Mian K, Butt, Masood S, Anjum, Faqir M, Nawaz Haq. 2009. Preparation of fiber and mineral enriched defatted rice bran supplemented cookies. *Pakistan J. Nutr.* 8: 571-577.
- Shih FF. 1996. Edible films from rice protein concentrate and pullulan. *Cereal Chem.* 73: 406-409
- Taira H. 1989. Fatty acid composition of indica-and japonica-types of rice bran and milled rice. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 66:1326.
- Treimo J, Aspmo SI, Eijssink VGH, Horn SJ. 2008. Enzymatic solubilization of proteins in brewer's spent grain. *J. Agric. Food Chem.* 56: 5359-5365.
- Treimo J, Westereng B, Horn SJ, Forssell P, Robertson JA, Faulds CB, Waldron KW, Buchert J, Eijssink GH. 2009. Enzymatic solubilization of brewer's spent grain by combined action of carbohydrases and peptidases. *J. Agric. Food. Chem.* 57: 3316-3324.