Korean Journal of Food Preservation Vol. 11. No. 4, pp.538~543 (2004) 한국식품저장유통학회지

Chitosan/Glutamic acid 처리가 현미의 발아에 미치는 영향

정규호 · 박난영[1] · 장상문[2] · 이주백[2] · 정용진[†]

계명대학교 식품가공학과, [1](주)계명푸덱스, [2]대구보건대학 호텔조리음료계열

Effects of Germination in Brown Rice by Addition Chitosan/Glutamic acid

Gyu-Ho Jung, Nan-Young Park[1], Sang-Moon Jang[2], Joo-Baek Lee[2] and Yong-Jin Jeong[†]

Department of Food Science and Technology, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

[1]Keimyung Foodex Co. Ltd., Daegu 704-701, Korea

[2]Department of Hotel Cooking and Beverage, Daegu Health College, Daegu 702-722, Korea

Abstract

To improve the levels of γ-aminobutyric acid (GABA) in germinated brown rice, chitosan and glutamic acid were treated during the brown rice germination. The GABA contents in germinated brown rices were 425.7 nmole/g and 637.0 nmole/g at germination temperature of 25℃ and germination time of 72 hrs. Response surface methodology(RSM) was used to monitor characteristics of germination from brown rices. As glutamic acid and chitosan concentration were increased, the GABA content was also increased. The ranges of optimum conditions were 105~160 ppm in chitosan concentration and 200~290 ppm in glutamic acid concentration. Predicted values at the optimized conditions were acceptable in comparison with experimental values.

Key words : brown rice, germination, γ-aminobutyric acid(GABA)

서 론

한국인의 식품 섭취는 총 섭취량의 반 이상을 백미를 비롯한 곡류로 섭취하고 있고(1) 최근에는 건강증진을 위하여 백미대신 현미를 섭취가 증가하고 있다(2). 현미는 백미에 비하여 2배 정도의 식이섬유를 공급할 수 있으며, 칼슘 및 철분 등의 무기질과 thiamin과 riboflavin 등의 비타민이 2배 이상 함유하고 있다(3,4). 현미에 많은 식이섬유는 수화력, 무기질, 지질과 결합성, 발효성 등을 들 수 있으며, 식물성 식이섬유는 음식물이 장을 통과하는 속도를 빠르게 한다(5). 이들 식이섬유의 섭취는 악성종양을 포함한 장관의 질환, 동맥경화증, 응혈성 심장질환, 비만증 그리고 당뇨병의 억제 효과가 있다. 또한 현미에 함유된 γ-oryzanol은 ferulic ester 화합물로서 항산화성, 혈청지질 저하효과, 콜레스테롤 저하, 혈당조절 기능, 돌연변이 억제효과가 있다고 보고된 바 있다(6). 현미는 발아할 때 각종 비타민, 칼슘, 무기질, 아미노산, 효소, 아라비녹실란의 함량이 높아지며, 특히 생리활성 물질인 감마아미노낙산(γ-aminobutyric acid, GABA)의 함량이 증가하는 것으로 나타났다(7,8). GABA는 동 · 식물계에 널리 분포되어 있는 비단백태 아미노산으로 동물의 경우 중추신경계의 주된 억제성 신경전달물질(Inhibitory Neurotransmitter)로서 잘 알려져 있다(9,10). 이러한 GABA는 많은 생리적인 메카니즘의 조절에 관여하여 동물의 경우 뇌의 혈류를 활발하게 하고 산소공급량을 증가시켜 뇌세포의 대사기능을 항진시키는 것으로 알려져 있으며, 특히 주목할 만한 것은 GABA가 연골의 혈관중추에 작용하여 우수한 혈압강하 작용을 하는 것이다(11). 또한 prolactin의 분비, 성장호르몬의 분비 조절에도 관여하며 혈압강하 및 통증완화 등에도 효과가 있는 것으로 알려져 있어 약리적으로 매우 관심이 높은 물질로 의약품으로서 뿐만 아니라 최근 기능성 식품 소재로서의 GABA에 대한 관심이 고조되고 있다(12). 키토산은 천연 고분자 물질로 그 자체는 항균력을 가지고 있으며(13,14), 배추 재배에도 키토산을 첨가하면 GABA 함량을 높인다는 결과(15,16)가 확인되었다. 그 외에 glutamic acid는 GABA, acetylcholine 등 여러 신경전달물질을 유리시킨다는 결과(17)가 있다. 본 연구에서는 주식으로만 널리 이용되어온 현미(brown rice)를 이용하여 기능성 성분인 GABA의 높은 발아

[†]Corresponding author. E-mail : yjjeong@kmu.ac.kr,
Phone: 82-53-580-5557, Fax: 82-53-580-6477

조건을 확립하고자 chitosan과 glutamic acid 처리조건을 조사하였다.

재료 및 방법

재 료

본 연구에 필요한 현미는 경북상주에서 생산되는 일품벼로 도정한지 2주내의 현미를 사용하였다. Chitosan은 탈 아세틸화도 98% 이상인 고분자량(30만)의 것으로 (주)금호화성(Korea)에서 구입하여 사용하였으며, chitosan과 glutamic acid는 (주)대종(Korea)에서 구입하여 사용하였으며, 이 때 chitosan은 1% acetic acid 용액에 용해하여 사용하였다.

조단백 함량

발아현미의 에탄올 추출액의 조단백 함량은 Lowry법(18)에 의해 알카리성 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 시약을 반응시켜 750 nm에서 비색 정량하였다.

GABA 및 유리 아미노산 분석

발아현미 중의 GABA 및 유리아미노산 함량을 측정하기 위해 40 mesh로 마쇄된 시료 분말 2 g을 75% ethanol(v/v) 200 mL를 가한 다음 80℃로 유지된 water bath에 1시간 환류 냉각시켜 유리아미노산을 추출하였다. 추출액을 냉각, 여과 및 감압농축시켜 증류수로 100 mL가 되게 정용 한 후 50 mL를 취하여 동량의 25% trichloroacetic acid (TCA)용액을 가한 후 1시간동안 냉장 보관하면서 단백질을 침전시킨 다음 원심분리(3,000 rpm, 20 min)하였다. 이 액은 100 mL diethyl ether로 3회 반복 추출하여 지질, 색소 및 지용성 물질을 제거하여 수용액층은 감압 농축 건고시켜 loading buffer solution (0.2N lithium citrate, pH 2.2) 5 mL로 용해한 후 0.22 ㎛ membrane filter로 여과한 용액을 ninhydrin법으로 amino acid autoanalyzer(Biochem 20, Pharmacia Biotech. Ltd, England)을 이용해서 분석하였다(19).

현미의 발아조건에 따른 분석

현미의 발아조건을 알아보기 위하여 플라스틱 용기(485 × 330 × 70 mm)에 현미 200 g을 물(1000 mL)에 침지하여 각 온도별(20, 25, 30, 35℃)로 incubator에서 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 시간동안 각각 발아시켰다. 발아할 때 사용한 chitosan과 glutamic acid 용액들은 12시간마다 새로이 조제한 각각의 용액으로 교환해 주면서 발아시켰다. 증류수에서 발아된 현미를 건져내어 55℃ dry oven에서 열풍으로 6시간 동안 건조시킨 후 40 mesh로 마쇄하여 분석에 사용하였다.

발아조건 설정을 위한 실험계획

현미의 발아조건에 따른 연구에서는 반응표면분석법(response surface methodology, RSM)(20,21)을 이용하여 최적 발아조건의 예측과 우수한 기능성 성분을 모니터링하였다. 발아조건에 대한 실험계획은 중심합성계획(Table 1)에 의하여 설계하였고, 반응표면 회귀분석을 위해 SAS(statistical analysis system) program(22)을 사용하였다. 중심합성계획에 따라 발아용액에 대한 chitosan 함량(0~200 ppm) 및 glutamic acid 함량(0~400 ppm)은 -2, -1, 0, 1, 2의 5단계 부호화 하여 10구간으로 설정하여 실시하였다(Table 1). 또 발아특성에 관련된 종속변수(Yn)로서는 crude protein(Y_1), GABA 함량(Y_2)으로 하였으며, 최적 발아시료의 반응 특성 결과를 회귀분석에 사용하였다.

Table 1. Experimental design for crude proteins and GABA by immersion solution kinds and concentration of germination brown rices based on central composite design for response surface analysis

Germination condition[1)]			Crude protein (mg%)	GABA[2)] con. (nmol/g)
Exp. No	Chitosan (ppm)	Glutamic acid (ppm)		
1	150(1)	300(1)	428.33	1313.91
2	150(1)	100(-1)	459.07	874.40
3	50(-1)	300(1)	499.03	844.95
4	50(-1)	100(-1)	495.70	826.95
5	100(0)	200(0)	502.40	1339.52
6	100(0)	200(0)	501.03	1339.52
7	200(2)	200(0)	450.10	1244.57
8	0(-2)	200(0)	488.63	809.52
9	100(0)	400(2)	574.07	1063.75
10	100(0)	0(-2)	641.53	745.02

[1)]The number of experimental conditions by central composite design,
[2)]γ-aminobutyric acid.

결과 및 고찰

발아온도에 따른 조단백과 GABA 함량의 변화

발아온도에 따른 조단백과 GABA 함량의 변화를 분석한 결과, 발아온도가 올라갈수록 조단백 함량이 감소하다가 25℃ 이후로는 다시 증가하는 경향을 나타내었다(Fig. 1). 발아하지 않은 현미 중의 조단백 함량은 565.6 mg%로 나타나 25℃에서의 발아한 현미의 조단백 함량에 비하여 약 2.2배 높게 나타났으며 다른 온도구간에서의 발아한 현미의 1.4~

2.0배 높게 나타났다. 따라서 25℃에서 발아한 현미의 조단백 함량이 가장 낮게 나타나 25℃에서 발아한 현미가 단백질이 분해되어 아미노산으로 전이된 것으로 추측된다. 이는 Oh 등(23)의 연구 결과에서와 비슷한 경향을 나타내었으며 조단백 함량은 오히려 발아현미에서 더 낮은 경향을 나타내었다. 현미가 발아하여 성장하는 과정 중에 저장한 단백질을 분해하거나 특정 아미노산의 함량을 증진시키는 것으로 추정된다. 발아온도에 따른 GABA 함량의 변화는 현미를 72시간 침종하여 발아시킨 결과 발아하지 않은 현미에서 GABA 함량이 128.7 nmole/g 인데 비하여 GABA 함량이 모든 구간에서 시료 g당 2.5배 이상 증가하였다. 35℃ 발아구에서 GABA 함량이 가장 높게 나타났으나 25℃ 발아구에서도 GABA 함량이 3.3배 증가하여 크게 차이가 나지 않았으므로 25℃ 발아구가 적절한 것으로 나타났다.

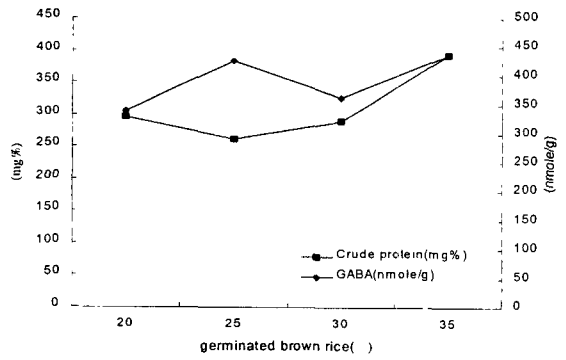

Fig.1. Changes of crude protein and GABA contents in brown rice depending on germination temperature.

발아 시간에 따른 조단백과 GABA 함량의 변화

발아시간에 따른 조단백 함량과 GABA 함량의 변화는 발아시간이 경과할수록 조단백 함량이 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 2). 현미 발아과정에서 조단백 함량의 감소는 유리아미노산 함량의 증가와 밀접한 관계를 가진 것으로 여겨진다. 이는 Aurisano 등의 보고(24)에서와 마찬가지로 혐기적 조건에서 72시간 발아시킨 볍씨의 경우 단백질 함량은 감소하는 반면에 유리아미노산 함량은 증가하는 것으로 보고되었다. GABA 함량 변화에서 현미는 발아시간이 증가할수록 GABA의 함량이 증가하는 것으로 나타났다. 침지 후 48시간까지는 g당 2.7배로 서서히 증가하다가 48시간 이후에는 GABA 함량이 급격히 증가하였다. 60시간에서 72시간 사이에 가장 큰 증가를 나타냈으며 96시간에서 발아하지 않은 현미에 비해 6.6배까지 GABA의 함량이 증가하였다. 그러나 72시간 이후로 GABA 함량이 계속 증가하였으나 발아시간이 길어질수록 현미의 색상과 향이 변질될 우려가 있어 72시간이 가장 적절한 것으로 나타났다.

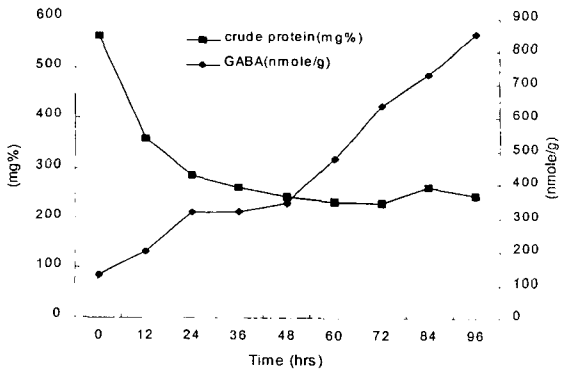

Fig. 2. Changes of crude protein and GABA contents in brown rice depending on germination time.

발아용액의 종류와 농도에 따른 조단백 함량의 변화

현미를 여러 조건에서 72시간 침지하여 발아시킨 후 조단백 함량을 측정한 결과 발아하지 않은 현미에 비하여 현미를 물에 침지, chitosan, glutamic acid, chitosan+glutamic acid에 용해하여 침지 하였을 때(Fig. 3), chitosan의 경우 100 ppm에서 가장 낮은 함량을 나타내었으며 이는 chitosan+glutamic acid에서도 같은 경향을 나타내었다. Glutamic acid의 경우 50 ppm에서 가장 낮은 함량을 나타내었으나, 전반적으로 100 ppm에서 가장 낮은 함량을 나타내었다. 따라서 침지액의 종류와 농도에 따른 발아현미의 경우 조단백 함량은 chitosan 처리구 100 ppm이 가장 낮게 나타났다. 특히 chitosan

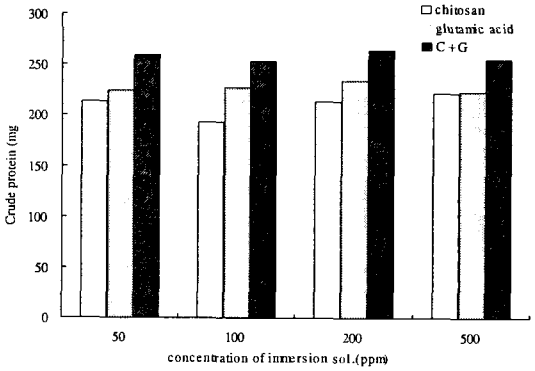

Fig. 3. Changes of crude protein and GABA depending on the kinds of immersion solutions and concentration during the germination of brown rice.

Chitosan: germinated brown rice in chitosan,
Glutamic acid: germinated brown rice in glutamic acid,
C+G: germinated brown rice in chitosan/glutamic acid.

처리구의 경우 발아과정에서 발생하는 곰팡이 발생에 대한 chitosan 처리의 효과가 다른 처리구에 비해 낮게 나타난다(23)

는 결과와 마찬가지로 chitosan 처리구는 곰팡이의 생육을 억제하는 효과가 있는 것으로 추정된다. 발아현미 중의 GABA 함량을 증진시키기 위한 방법으로 glutamic acid을 사용함으로써 GABA 함량을 증가(25)시킨다는 결과를 토대로 chitosan+glu-tamic acid 처리구의 조단백 함량을 분석한 결과 chitosan+glut-amic acid 100 ppm 처리구가 가장 낮게 나타났다.

조단백과 GABA 함량에 대한 발아조건의 영향

이상과 같은 결과를 토대로 현미 발아조건에 따른 중심합성계획을 실시한 결과 발아현미의 조단백 함량에 대한 반응표면은 안장점 형태(Fig. 4)를 나타내었으며 조단백 함량에 대한 R2는 0.8081로 나타났으며 glutamic acid 함량이 조단백 함량에 더 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다(Table 2). 또한 발아현미의 조단백 함량은 glutamic acid 함량이 증가할수

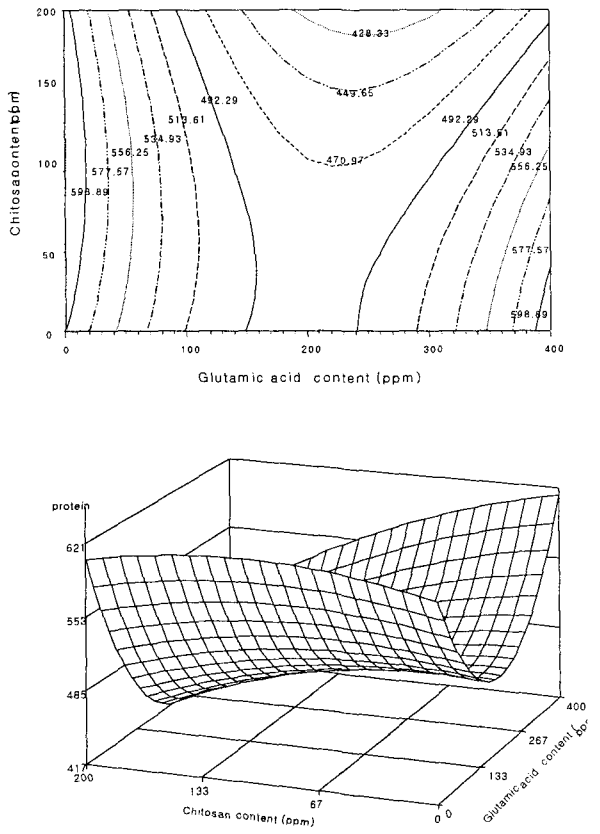

Fig. 4. Contour map(top) and response surface(bottom) for the effect of chitosan and glutamic acid on crude protein of germination brown rice.

록 감소하다가 200 ppm 이상에서는 다시 증가하는 경향을 나타내었으며, 최적 발아조건은 glutamic acid 190~300 ppm, chitosan 180 ppm 이상으로 나타났다. 발아현미의 GABA함량에 대한 반응표면은 최대점의 형태(Fig. 5)를 나타내었으며 R2는 0.8453으로 나타났으며, GABA 함량에 대한 유의성은 0.0889로서 유의수준 10% 이내에서 인정되었다(Table 2). 발아현미의 GABA 함량은 chitosan과 glutamic acid 함량이 증가할수록 증가하다가 일정 시점 이후로는 약간의 감소를 나타내었다(Fig. 5). GABA 함량에 대한 발아조건은 chitosan 216.48 ppm, glutamic acid 376.51 ppm일 때 최대값은 1,447.45 nmole/g으로 예측되었다(Table 3).

Table 2. Polynomial equation calculated by RSM program for germinating brown rices

Dependent variable (Y_n)	The second order polynomial1)	R^2	Pro>F
Crude protein (Y_1)	$Y_1=599.200000+0.396719X_1-1.168274X_2-0.001817X_1^2$ $-0.001703X_1X_2+0.003009X_2^2$	0.8081	0.1314
GABA (Y_2)	$Y_2=599.8400+3.2734X_1+2.6204X_2-0.0259X_1^2$ $+0.0211X_1X_2-0.0095X_2^2$	0.8453	0.0889

1) X_1 : Chitosan content (ppm). X_2 : Glutamic acid content (ppm).

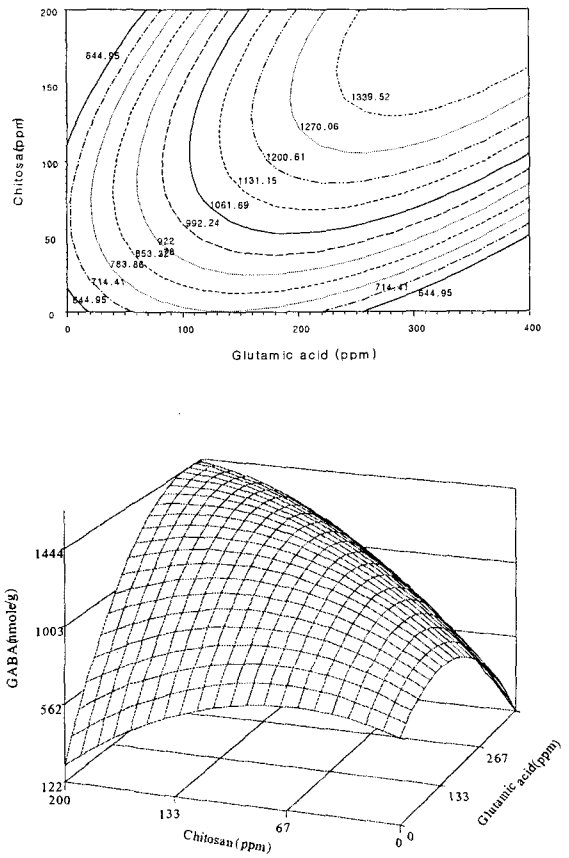

Fig. 5. Contour map(top) and response surface(bottom) for the effect of chitosan and glutamic acid on GABA contents of germination brown rice.

Table 3. Predicted levels of germination conditions for the maximum responses of crude protein and GABA by the ridge analysis

Responses	X_1[1)]	X_2[2)]	Max.[3)]	Morphology
Crude protein (Y_1)	100	200	473.35	Saddle
GABA (Y_2)	216.48	376.51	1,447.45	Max.

[1)]Chitosan content in the maximum response.

[2)]Glutamic acid content in the maximum response.

[3)]Maximum response.

최적생성 조건 예측

발아현미의 최적 생성조건을 위한 일환으로 중심합성계획에 의해 각각의 생성조건으로 반응변수인 조단백 함량과 GABA 함량을 각각 평가하고 이들의 상대적인 값을 chitosan 함량과 glutamic acid 함량으로 회귀분석한 결과를 contour map으로 나타내었다. 각각의 관능평가의 contour map을 모두 겹쳐서 그려본 결과(Fig. 6), 빗금친 부분은 최대조건 범위를 나타낸 것으로 chitosan 함량 105~160 ppm의 범위이고 glutamic acid 함량 200~290 ppm의 범위로 나타났다(Table 4).

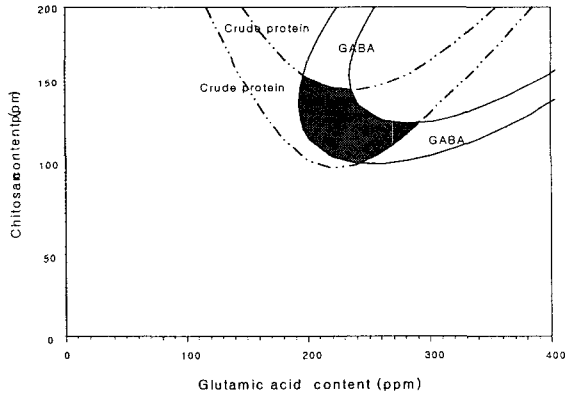

Fig. 6. Superimposed contour map for maximized response variables of crude proteins and GABA contents in germinated brown rice.

Table 4. The predicted ranges of germination conditions for the maximum response variables by superimposing of contour maps

Reaction condition	Range of optimum condition
Chitosan (ppm)	105~160
Glutamic acid (ppm)	200~290

최적 발아현미 생성조건 실증

발아현미의 최적 생성조건에 대한 반응표면을 서로 겹쳐 그려서 얻은 최적의 발아현미 생성조건 범위에서 나타난 임의의 조건을 chitosan 함량 132 ppm, glutamic acid 함량 245 ppm으로 정한 후 예측된 최적의 조건범위 내에서 동일조건으로 반복 실험한 결과 조단백 함량은 예측치 보다 조금 낮은 함량을 나타내었고 GABA 함량은 예측치 보다 함량이 높게 나타나 예측치 보다 더 좋은 결과를 나타내었다(Table 5).

Table 5. Predicted and experimental values of response variables at a given condition[1)] within the range of optimum conditions

Response variables	Predicted value	Experimental value
Crude protein (mg%)	459.22	448.36
GABA (nmole/g)	1,334.73	1,958.64

[1)]Samples were germinated in chitosan 132 ppm and glutamic acid 245 ppm.

요 약

현미(brown rice)를 이용하여 기능성 성분인 GABA의 고함량 발아조건을 효과적으로 활용한 최적조건을 설정하고자 조단백 함량과 GABA 함량을 분석하였다. 발아온도 25℃에서 조단백 함량과 GABA 함량은 260.9 mg%와 425.7 nmole/g으로 나타났으며 발아시간 72시간에서 조단백 함량과 GABA 함량이 230.6 mg%와 637.0 nmole/g으로 나타났다. chitosan과 glutamic acid 100 ppm을 혼합한 처리구에서 발아시킨 현미의 조단백 함량이 가장 낮게 나타나 이를 토대로 중심합성계획에 의해 발아현미 최적 생성조건을 예측하였다. 발아현미의 조단백 함량에 대한 반응표면은 안장점의 형태로 glutamic acid가 더 큰 영향을 미치며, GABA 함량에 대한 반응표면은 최대점의 형태로 나타났다. 발아현미의 최적 생성조건은 chitosan 105~160 ppm이며 glutamic acid 함량은 200~290 ppm의 범위로 나타났으며 예측된 범위에서 실험한 결과 예측치 보다 조금 높게 나타났다.

참고문헌

1. 한국농촌경제연구원. (1985) 식품수급표, p.10
2. Lee, H.J., Byun, S.M. and Kim, H.S. (1988) Studies on the dietary fiber of brown rice and milled rice. Korean J. Food Sci. Technol., 20, 576-584

3. Kim, I.S., Kwon, T.B. and Oh, S.K. (1988) Study on the chemical change of general composition, fatty acids and minerals of rape seed during germination. Korean J. Food Sci. Technol., 20, 188-193
4. Cho, S.H. (1998) Brown rice, In miraclulous diets, S.C. Baek, Ed., Ilyo-Shinmoon Publishing Co., Seoul, Korea, p.281-290
5. Cummings, J.H. (1978) Nutritional implications of dietary fiber. Am. J. Clin. Nutri., 31, 21-26
6. Chen, C., Pearson, A.M. and Gray, J.I. (1992) Effects of synthetic antioxidants(BHA, BHT and PG) on the mutagenicity of IQ like compounds. Food Chem., 43, 177-183
7. Lee, M.H. and Shin, J.C. (1996) New techniques for the cultivation of quality rice, In rediscovering korea rice and development direction. Korean Society of Rice Research Conference, Seoul, p.239-263
8. Nakagawa, K. and Onota. A. (1996) Accumulation of γ -aminobutyric acid(GABA) in the rice germ. Food Processing, 31, 43-46
9. Jean, K.T. (1981) Dietary GABA decreases body weight of genetically obese mice. Life Science, 29, 2535-2542
10. Mody, I.Y., Dekoninck, T.S. and Soltesz, I. (1994) Bringing the cleft at GABA synapses in the brain, Trends Neurosci., 17, 517-525
11. Ballanyi, K. and Grafe, P. (1985) An intracellular analysis of γ-aminobutyric acid-associated ion movements in rat sympathetic neurons. J. Physiol., 365, 41
12. Krogsgaard-Larsen, P. (1989) GABA receptors, In receptor pharmacology and function, M. Williams, R.A. Glennon and P.M. W.M. Timmermans Eds. Marcel Dekker, Inc., New York. 349-383
13. Kim, S.K.(1997) What is chitin · chitosan? In chitin · chitosan: basic and pharmacy, Ihwa Culture publishing Co. p.17-20
14. Lee, S.J., Uhm, J.Y. and Lee, Y.H. (1996) Effect of chitosan on the growth of Botryosphaeria dothidea, the casual fungus of apple white rot. Kor. J. Appl. Microbial. Biotechnol., 24, 261-267
15. Oh, S.H., Seo, K.W., Choi, D.S. and Han, K.S. (2000) Application effects of chitosan fertilizer on the growth of cabbage and GABA contents in the cabbage. J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol., 43, 34-38
16. Cha, Y.S. and Oh, S.H. (2000) Investigation of γ -aminobutyric acid in chinese cabbages and effects of the cabbage diets on lipid metabolism and liver function of rats administers with ethanol. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 29, 500-505
17. Alger, B.E. and Nicoll, R.A. (1982) Feed forward dendritic inhibition in rat hippocampal pyramidal cells studied in vitro. J. Physiol., 328, 105-123
18. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-269
19. 皮多野傳行. (1964) アミノ酸 自動分析法, 化學同人, 日本, p.79
20. Park, S.H. (1991) Modern experimental design. Minyoungsa Press, Seoul, Korea, p.573-626
21. Lee, G.D., Jeong, Y.J., Park, N.Y. and Kwon, J.H. (1999) Monitoring for the color formation of a doraji tea by soaking of threonine and sucrose solution and roasting. Korean J. Food Sci. Technol., 31, 938-944
22. SAS. (2001) SAS User Guide. version 8.1. Statistical Analysis System Institute, Cary, NC, USA.
23. Oh, S.H. and Choi, W.G. (2000) Production of the quality germinated brown rices containing high γ-aminobutyric acid by chitosan application. Kor. J. Biotechnol. Bioeng., 15, 615-620
24. Aurisano, N., Bertani, A. and Reggiani, R. (1995) Involvement of calcium and calmodulin in protein and amino acid metabolism in rice roots under anoxia. Plant Cell Physiol., 36, 1525-1529
25. Oh, S.H., Kim, S.H., Moon, Y.J. and Choi, W.G. (2002) Changes in the levels of γ-aminobutylic acid and some amino acids by application of a glutamic acid solution for the germination of brown rices. Kor. J. Biotechnol. Bioeng., 17, 49-53

(접수 2004년 10월 23일, 채택 2004년 11월 30일)