

## Hydrolysis of Rice Syrup Meal Using Various Commercial Proteases

Chang-Won Kim<sup>1</sup>, Jin-Woo Park<sup>1</sup>, Hyuk-Joon Choi<sup>2</sup>, Bok-Kyung Han<sup>2</sup>, Seung-Seok Yoo<sup>3</sup>,  
Byung-Yong Kim<sup>1</sup>, Moo-Yeol Baik<sup>1</sup> and Young-Rok Kim<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Department of Food Science and Biotechnology & Institute of Life Science and Resources, Kyung Hee University, Yongin 446-701, Korea<sup>2</sup>Research & Development Department, BKbio Co. Ltd, Seongnam 462-819, Korea<sup>3</sup>Department of Culinary and Food Service Management, Sejong University, Seoul 143-747, Korea

Received February 6, 2011 / Accepted February 9, 2011

Rice syrup meal (RSM) was enzymatically hydrolyzed using eight commercial proteases (Protamex, Neutrase, Flavourzyme, Alcalase, Protease M, Protease N, Protease A, Molsin F) for 4 hr at optimum pH and temperature. Proteolytic hydrolysates were examined in supernatant and precipitate using Lowry protein assay, semimicro Kjeldahl method and gravimetric method using weight difference before and after enzymatic hydrolysis. Although RSM contains a high amount of protein (71.2%), only a very small amount of protein was hydrolyzed. Two proteases (Protease M and Protease N) were found to be the most effective in the hydrolysis of RSM protein. In Lowry method, 57.5 and 59.0 mg protein/g RSM were hydrolyzed after Protease M and Protease N treatments, respectively. In gravimetric method, 80.0 and 85.4 mg protein/g RSM were hydrolyzed after Protease M and Protease N treatments. In Kjeldahl method, 67.43 and 70.43 mg protein/g RSM were hydrolyzed after Protamex and Protease N treatments, respectively. For synergistic effect, two or three effective commercial proteases (Protease M, Protease N and Protease A) were applied to RSM at one time. The highest hydrolysis of RSM protein was observed in both Lowry protein assay (80.3 mg protein/g RSM) and gravimetric methods (153.2 mg protein/g RSM) when three commercial proteases were applied at one time, suggesting the synergistic effect of those proteases.

**Key words** : Rice syrup meal, rice protein concentrate, protease, Lowry protein assay, semimicro Kjeldahl method

## 서 론

쌀은 동남아시아 국가에서 주식으로 사용되는 주요 곡물로서 전 세계적으로 5,670만톤이 생산되며, 이중 약 91%가 아시아에서 생산된다[6]. 쌀의 생산량은 매년 증가하는 추세지만 서구화된 식습관에 의해 밀의 소비량은 증가하는 반면 상대적으로 쌀의 소비량은 낮아지고 이로 인해 잉여 쌀로 쌀 가공식품을 개발하는 연구가 활발하게 진행되고 있다. 또한 가공식품 제조 후 생성되는 쌀 가공부산물의 양도 쌀 가공식품의 증가와 함께 늘어나고 있다. Rhee 등[3]은 쌀 부산물을 이용하여 가식성 필름을 제조하였고 Gnanasambandam 등[9]은 쌀 도정 중 부산물로 생성되는 미강으로부터 단백질 농축물을 제조하였으며 Cho 등은 도정 부산물로부터 색소를 분리하거나[4] 떡 고물 및 소를 제작하였다[5]. 과거에는 쌀 단백질을 미강으로부터 알칼리 추출하여 등전점 침지법으로 제조하거나[9] 쌀을 분쇄하여 효소를 사용한 다음 전분질을 제거하는 것[16]이 주요 방법이었으나 기능성과 비용적인 문제가 있어서 다른 단백질들

에 비해 식품산업에 널리 이용되지 못하고 있다. 쌀 단백질의 새로운 활용방법으로서 Shih [21]는 쌀 가루를 효소 처리하여 전분을 제거함으로써 쌀 단백질 농축물을 제조하여 pullulan과의 혼합 가식성 필름을 제조하였다. Park 등[18]은 쌀 부산물을 초미세분쇄/공기분급을 이용하여 특성을 연구하였고, Gnanasambandam 등[8]은 쌀 도정 중 부산물로 생성되는 미강으로부터 가식성 필름을 제조하였으며, Jang 등[11]은 쌀 부산물을 파운드 케이크에 첨가하여 품질특성을 연구하였다.

이러한 쌀을 효소처리 하여 물엿이나, 엿, 조청 등을 제조하고 부산물이 남게 되는데, 그 양은 하루에 25~30 ton으로 아주 많으며 영양적 가치 또한 높아서 폐기처분하지 않고 이들 대부분을 가축사료로 사용하고 있다. 하지만 쌀 부산물을 가축사료로 사용하는 방법 외에도 단백질 등을 추출하여 식품첨가물로써 활용하는 방안이 연구되고 있으며, 특히 쌀로부터 분리한 쌀 단백질은 식물성 단백질의 급원으로서 가장 많이 사용되고 있는 분리대두단백(Soy Protein Isolates, SPI)이나 우유단백(Whey Protein)과 달리 오랫동안 아시아에서 주식으로 사용된 쌀로부터 유래된 단백질로써 알레르기 작용이 거의 없고 필수아미노산이 풍부한 것으로 알려져 있다.

## \*Corresponding author

Tel : +82-31-201-3830, Fax : +82-31-204-8116,  
E-mail : youngkim@khu.ac.kr

쌀 시럽박은 당, 지방 등을 소량 함유하고 있지만 단백질과 식이섬유가 주성분을 이루고 있으며 단백질의 함량은 쌀이나 밀, 보리보다 높다. 따라서 쌀 부산물의 식품소재로서의 이용을 위해 Sharif 등[20]은 쌀 부산물을 쿠키에 첨가하여 특성을 연구하였으며, Ghosh 등[2]은 쌀 부산물로부터 산, 알칼리 분해방법을 이용하여 단백질 가수분해물을 추출하여 특성을 연구하였다. 그러나 건물기준 70% 이상의 단백질 성분을 protease로 단일 혹은 혼합 가수분해하고 그 특성을 조사한 연구는 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 상업적으로 쓰이는 단백질 분해 효소들을 단일 혹은 혼합으로 쌀시럽박에 처리하여 불용성 쌀 단백질을 수용성 단백질로 수용화하고 이렇게 얻어진 가수분해물의 특성과 효소의 혼합에 의한 시너지효과를 연구하였다.

### 재료 및 방법

#### 쌀 시럽박

본 실험에 사용된 쌀 시럽박은 (주)동희(Yongin, Korea)에서 물엿을 제조 후 생성된 부산물을 수거하여 -19℃에서 냉동 보관하면서 해동하여 사용하였다.

#### 효소

이 실험에 사용된 효소들은 상업적으로 널리 사용되는 Protamex (Novozyme, Bagsvaerd, Denmark), Neutrase (Novozyme), Flavourzyme (Novozyme), Alcalase (Novozyme), Protease M (Amino, Nagoya, Japan), Protease N (Amino), Protease A (Amino) 그리고 Molsin F (Seishin, Noda, Japan) 등 총 8가지의 효소를 구입하여 사용하였다.

#### 시료의 수용성 성분 제거

쌀 시럽박에 존재하는 수용성 단백질을 제거하기 위해 쌀 시럽박 100 g에 증류수 400 ml를 가하여 5분간 교반 후 이를 20분간 원심분리(3,000× g)를 하여 얻어진 침전물을 dry oven에 24시간 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 마쇄한 후 40 mesh의 표준체를 통과시켜 이후 실험의 시료로 사용하였다.

#### 단일효소 처리

수용성 성분이 완전히 제거된 쌀 시럽박 5 g에 증류수 (28.3 ml)를 첨가하여 15% 현탁액 형태로 제조한 후 1 N HCl 혹은 1 N NaOH를 사용하여 기존에 알려진 효소들의 최적 pH를 조절하고, 시료의 고형분 대비 0.1%의 효소를 첨가한 후 각 효소들의 최적 온도에서 4시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 현탁액을 20분간 원심분리(3,000× g)하고 이때

얻어진 상등액과 침전물, 그리고 침전물의 건조 후 무게변화를 통하여 생성된 단백질의 양을 비교하였다(Fig. 1).

#### 혼합효소 처리

단일효소 처리로 얻어진 결과를 토대로 가장 효과가 좋은 효소인 Protease M (M), Protease N (N) 그리고 Protease A (A)를 각각 다음과 같이 2개 또는 3개의 효소를 4가지의 방법(M+N, M+A, N+A, M+N+A)으로 혼합하여 단일처리와 같은 방법으로 최적 pH와 최적 온도에서 4시간 동안 반응한 후 20분 동안 원심분리(3,000× g)하여 상등액과 침전물을 분리, 분석하였다(Fig. 1).

#### 단백질 분석

단백질분석은 총 3가지의 방법으로 분석하였다. 원심분리하여 얻어진 상등액 중의 수용성 단백질은 TP0300- 1KT Kit (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 사용하여 Lowry protein assay를 통하여 측정하였다[14]. 또한 침전물은 Digester (MBCM12, Raypa, Barcelona, Spain), Distiller (DNP1500, Raypa, Barcelona, Spain)와 Titrater (Akku-drive, Hirschmann Laborgerate, Eberstadt, Germany)를 사용하여 semimicro-Kjeldahl [1]법으로 측정하였으며, 무게변화를 통한 불용성 단백질의 변화량을 알아보기 위해 원심분리를 하여 얻어진 침전물을 105℃의 Dry oven에서 24시간 건조한 후 처음 시료의 무게와 건조된 침전물의 무게 차이를 이용하여 단백질 변화량을 계산하고 3가지 방법의 값을 비교, 분석 하였다. 이때 각각의 분석방법에 대한 계산식은 다음과 같다.

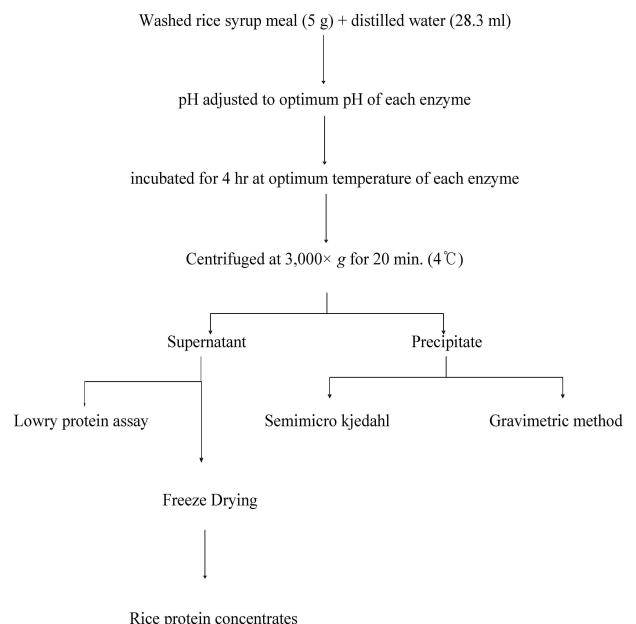


Fig. 1. Flow chart for the preparation of rice protein concentrates from rice syrup meal.

**-Lowry protein assay (mg/g RSM)**

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

P: Protein contents (mg/ml)

E: Amounts of enzyme (ml)

C: Amounts of 1 N NaOH or HCl (ml)

S: Sample weight (g)

**-Semimicro-Kjeldahl (mg/g RSM)**

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

S: Sample weight (g)

T: Amounts of 0.1 N HCl (ml)

**-Gravimetric method (mg/g RSM)**

$$\frac{(S - W)}{S} \times 1,000$$

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 overnight 처리한 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 overnight 처리한 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 ether 추출을 하는 Soxhlet extraction을 하여 조지방 함량을 계산하였다.

**SDS-PAGE analysis**

Protein sample은 SDS를 포함하는 polyacrylamide gel을 이용한 Laemmli [13]의 방법에 따라서 전기영동을 하였다. Separating gel은 10% acrylamide gel을 준비하였고, Running gel은 H<sub>2</sub>O 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'-tetramethylethylenediamine (TEMED) 0.002 ml의 조성으로 제조하였으며, Stacking gel은 H<sub>2</sub>O 0.68 ml, 30% acrylamidemix 0.17 ml, 1.0 M Tris (pH 6.8) 0.13 ml, 10% SDS 0.01 ml, 10% ammo-

nium 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 10분간 끓인 다음 12,000× g으로 1분간 원심분리 시켜서 층분리를 시킨 후 아래층을 gel에 loading하였다. 전기영동은 150 mA로 분리했으며, staining buffer (coomassie blue R-250 1.0 g, methanol 450 ml, H<sub>2</sub>O 450 ml, glacial acetic acid 100 ml)와 destaining buffer (methyl alcohol 100 ml, acetic acid 100 ml, H<sub>2</sub>O 800 ml)를 사용해서 염색과 탈색을 하였다.

**아미노산 분석**

시료 30 mg을 300 μl의 ddH<sub>2</sub>O에 녹인 후 10% TCA solution을 1:1의 비율로 첨가하고 10분간 원심분리(12,000× g)하여 단백질을 침전 시켰다. 지방을 제거하기 위해 hexane을 1:1의 비율로 첨가하여 지방을 녹인 후 5분간 원심분리(12,000× 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****일반성분 분석**

시료의 수용성 분획을 제거하기 위해 증류수로 수세를 하였고 수용성 분획의 제거는 수세 횟수에 따른 무게변화를 통해 알 수 있었다. 수세 횟수에 따른 무게 변화는 Fig. 2에 나타내었는데, 쌀시립박을 4회 이상 수세하여 건조하였을 때 처음무게기준 건물량 68.5%로써 그 무게 변화가 없는 것을 알 수 있었으며 3회 수세한 쌀 시립박을 취합하여 건조한 후 이 후 실험의 시료로 사용하였다.

쌀 시립박의 일반성분을 Table 1에 나타내었다. 쌀 시립박 내의 수분, 조단백질 및 조지방 함량은 각각 0.62%, 71.16%, 8.13%이었고 조회분 함량은 0.94%이었다. 쌀 시립박의 경우 쌀에 비해 단백질함량이 매우 높은 것을 알 수 있었는데, 이는 효소를 이용하여 쌀의 주성분인 전분을 당화시키는 과정에서 대부분의 전분이 제거되었기 때문에 상대적으로 단백질 함량이 높아지는 것을 확인할 수 있었다.

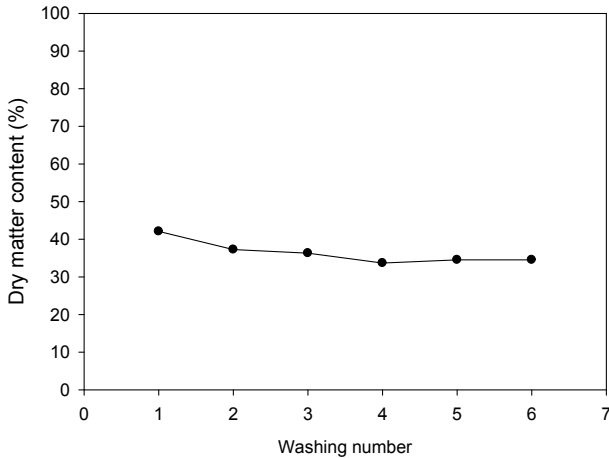


Fig. 2. Weight change of rice syrup meal during washing.

Table 1. Proximity composition (%) of rice and rice syrup meal

	Rice <sup>1)</sup>	Rice syrup meal
Crude Protein	6.12-8.67	71.16
Crude Lipid	0.35-0.45	8.13
Crude Ash	0.59-0.63	0.94
Moisture content	13.22-14.23	0.62
Carbohydrates	76.60-79.12	19.15

<sup>1)</sup>Data from Kum et al., 1995 [12].

단일효소 처리

단일효소 처리를 하였을 때 세가지 방법으로 측정된 단백질 함량의 변화를 Fig. 3에 나타내었다. Lowry protein assay, Kjeldahl protein assay 및 Gravimetric method 를 이용하여 수용성 단백질 생성량의 경향을 비교분석 하였다. 이때 Lowry, Kjeldahl 그리고 Gravimetric method의 경우 Protease N을 처리한 시료는 각각 59.02 mg/g RSM, 70.43 mg/g RSM, 85.36 mg/g RSM을 나타내었고 Protease A의 경우는 각각 27.17 mg/g RSM, 62.73 mg/g RSM, 58.31 mg/g RSM을 나타내었으며 Protease M의 경우는 각각 57.46 mg/g RSM, 53.32 mg/g RSM, 80.00 mg/g RSM을 나타냄으로써 같은 샘플에서도 측정 방법에 따라 수용성 단백질 함량에 약간의 차이가 있는 것으로 나타났다.

Lowry protein assay의 경우 Protease N이 가장 큰 분해 정도를 나타내었고 Protease M과 Protease A의 순으로 분해 정도가 큰 것으로 나타났으며, Protease M과 Protease N은 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. Gravimetric method의 경우 Lowry protein assay와 마찬가지로 Protease N이 가장 큰 분해 정도를 나타내었고 Protease M 그리고 Protease A의 순으로 분해 정도가 나타났다. Kjeldahl method의 경우 Protease N이 가장 큰 분해 정도를 나타내었고, Protease A가 두 번째로 큰 분해 정도를 나타내었으며, 다음으로는 Protamex가 높은 분해율을 나타냄으로써 앞의 두 방

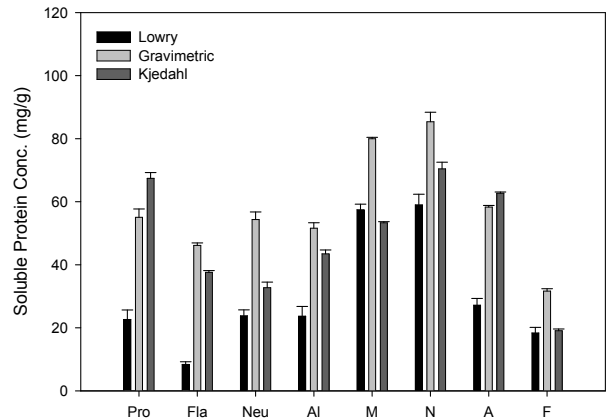


Fig. 3. Soluble protein contents of rice syrup meal after enzymatic hydrolysis with 8 commercial proteases. Pro: Protamex, Fla: Flavoruzyme, Neu: Neutrase, Al: Alcalase, M: Protease M, N: Protease N, A: Protease A, F: Protease F.

법의 결과와는 다른 결과를 나타내었다. 3가지 방법에서 모두 효과가 좋았던 Protease N과 Protease A, 그리고 Kjeldahl method에서는 비록 분해율이 떨어졌지만 Lowry와 Gravimetric method에서 분해율이 좋았던 Protease M 이렇게 3가지 단백질 분해 효소의 효과가 좋음을 알 수 있었으며 3가지 효소 중 수용성 단백질 함량이 가장 높았던 Protease N의 경우 Gravimetric method로 측정하였을 때 전체 단백질 중 12%의 분해율을 나타내었다.

쌀 시럽박과 유사한 보리 부산물인 맥주박에 protease 처리를 한 Faulds 등[7]의 연구에서는 맥주박에 protease를 사용했을 경우 단백질의 26%가 분해되어 식품에 상업적으로 쓰이는 protease가 곡물에 있어서는 쌀 시럽박과 마찬가지로 높은 분해율을 나타내지 못하는 것을 보여주었다. 이러한 낮은 분해율은 곡물에 존재하는 다량의 섬유질 중 hemicellulose나 lignin과 같은 물질이 단백질과 complex를 형성하여 효소의 가수분해를 방해하는 것으로 알려져 있다[10]. 또한 이러한 현상의 주요 원인은 섬유질이 효소와 단백질의 binding site에 존재하거나 binding site를 둘러싸으로써 가수분해를 방해하는 것으로 생각된다. Faulds 등[7]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 Protease M, Protease N 및 Protease A 세가지 효소 중 두가지 혹은 세가지 모두를 혼합하여 쌀 시럽박의 단백질을

분해한 결과 단일에서 가장 효과가 좋았던 Protease N과 3 가지 효소 모두 혼합한 것을 비교하였을 때 Lowry protein assay의 경우 단일처리 한 것은 59.02 mg/g RSM, 혼합의 경우 75.96 mg/g RSM이며, Gravity method는 단일처리 한 것은 85.36 mg/g RSM, 혼합의 경우 147.51 mg/g RSM이다. Kjeldahl의 경우는 단일처리 한 것은 70.43 mg/g RSM이고, 혼합의 경우 93.80 mg/g RSM 으로 모든 방법에서 효소를 혼합하였을 때 상승효과가 있는 것으로 나타났다(Fig. 4). 또한 단일 처리에서 가장 분해능력이 높았던 Protease N에 비하여 효소들을 두 개씩 혼합하여 단백질을 분해하여도 이들 간의 유의적인 차이가 인정되어 상승효과가 뚜렷했음을 알 수 있었다. 이는 쌀 시럽박의 불용성 단백질 중 분해가 가능한 부분이 Protease N에 의해 완전히 분해되지 못하고 남은 단백질들이 다른 효소들에 의해 분해가 일어나기 때문으로 판단된다. 특히 상업적으로 사용되는 protease의 경우 크게 endo- 혹은 exo- 형태이며 서로 분해할 수 있는 아미노산이 틀리므로 Protease N이나 Protease M 혹은 Protease A가 각각 분해를 하지 못했던 아미노산을 분해하여 상승효과가 생긴 것으로 생각된다. Treimo 등[22]의 실험에서도 쌀 시럽박과 유사한 부산물인 맥주박에 carbohydrase를 혼합하여 처리하였는데 protease와 마찬가지로 단일 처리하였을 때 보다 상승효과가 있는 것으로 나타났다. 이는 곡물의 탄수화물의 경우 당뿐만 아니라 cellulose, hemicellulose, lignin 등이 존재하여 carbohydrase가 혼합이 될수록 cellulose 혹은 lignin 등이 분해되어 상대적으로 단백질의 노출부분이 증가 되고 효소가 반응할 수 있는 표면적이 증가하여 이런 상승 효과를 나타낼 수 있는 것으로 알려졌다. 또한 protease는 각각 가수분해 할 수 있는 고유의 특정 아미노산이 있는데 이러한 특정 아미노산이 곡물에 풍부하면 protease의 가수 분해 효과가 증가하는 것으로 알려져 있다[14].

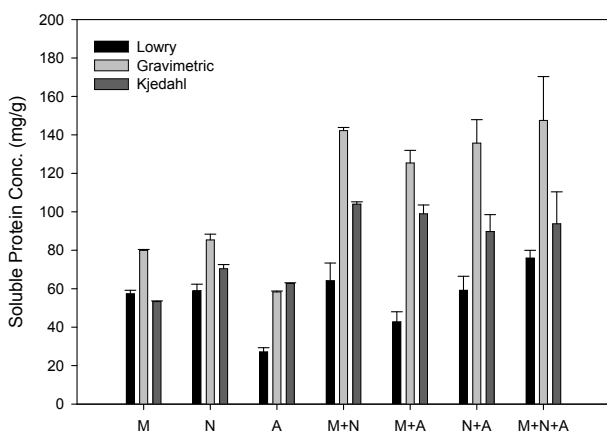


Fig. 4. Soluble protein contents of rice syrup meal after enzymatic hydrolysis with mixed proteases. M: Protease M, N: Protease N, A: Protease A.

#### 효소에 의해 분해된 단백질의 특성

효소를 이용하여 분리한 단백질의 특성을 확인하기 위하여 단일효소를 사용한 경우 수용성 단백질을 가장 많이 생성한 Protease M, Protease N, Protease A와 혼합효소에서 가장 효과가 좋았던 Protease M+Protease N+Protease A를 선택하여 SDS-PAGE를 하였다. 효소처리를 한 모든 시료에는 어떠한 밴드도 형성이 되지 않는 것을 확인할 수 있었는데(data not shown), 이것은 쌀 시럽박에 존재하는 단백질이 15 kDa 이하의 작은 크기의 polypeptide 혹은 amino acid의 형태로 분해가 된 것을 의미한다. Treimo 등[23]이 연구한 맥주박의 경우도 protease를 맥주박에 처리 하였을 경우 분자량이 10 kDa 미만의 polypeptide와 같은 물질들이 나타났고 대부분의 단백질은 1 kDa 미만의 작은 peptide나 amino acid의 형태로 분해가 되는 것을 알 수 있었다.

#### 아미노산 분석

단백질 분해 효소로 처리한 쌀 시럽박의 수용성 성분에 존재하는 아미노산의 조성을 분석한 결과를 Table 2에 나타내었다. 효소를 단일 혹은 혼합처리 하였을 때의 아미노산 조성은 특정 패턴을 보이지 않았으며 쓴맛을 유발하는 아미노산인 Leucine, Isoleucine, Valine, Phenylalanine, Arginine의 함량이 높은 것으로 보아 샘플의 쓴맛이 강할 것이라고 예상된다[17]. 필수 아미노산인 Phenylalanine, Valine, Leucine, Isoleucine 등의 함량은 일반 쌀에 비해 높게 나타내었으며 특히 곡물의 제 1 제한 아미노산인 Lysine의 경우 효소의 종류에 따라 그 값의 차이가 있었지만 Protease M의 경우 일반 쌀에 비해 높은 함량을 나타내는 것을 알 수 있었다. 특히 총 아미노산 함량의 경우 Protease M을 단일 처리하였을 때와 3가지 효소를 혼합하였을 때의 값이 비슷함을 확인할 수 있었는데, 이는 Protease M의 경우 단백질을 분해할 때 peptide와 amino acid를 동시에 생성하고 자신이 생성한 peptide를 또다시 amino acid로 분해하는 특성을 가지고 있으므로 이러한 특징으로 인해서 효소를 혼합하였을 때와 그 값이 비슷한 것으로 판단된다. 한편 효소처리 후 생성된 총 단백질 함량은 효소를 혼합할수록 증가하였지만 아미노산 함량은 단일과 비교하였을 때 비슷한 결과를 나타내었는데 이것 또한 Protease M의 특성으로 인해서 기인된 것으로 판단되며 상대적으로 효소를 혼합할수록 아미노산으로 분해되지 못한 polypeptide가 단일 처리에 비해 다량 존재할 것으로 생각된다.

#### 감사의 글

이 연구는 2007년도 경희대학교 연구비지원(KHU-20070777)에 의한 결과로 이에 감사드립니다.

Table 2. Amino acid distribution of defatted rice bran concentrates after various proteases treatment (mg/l)

	M <sup>1)</sup>	N <sup>1)</sup>	A1 <sup>1)</sup>	M+N+A <sup>2)</sup>
Phosphoserine	727.1	1156.3	936.9	1460.6
Taurine	274.5	0.0	0.0	0.0
Phospho ethanol amine	0.0	1408.1	0.0	0.0
Urea	0.0	0.0	0.0	0.0
Aspartic acid	8185.0	560.2	3723.3	4681.2
Threonine	4480.0	228.5	3394.5	5961.0
Serine	9355.0	280.8	3534.2	5259.4
Glutamic acid	16662.3	762.4	4544.3	8041.1
Sarcosine	4474.2	3499.6	3210.1	6160.1
a-amino adipic acid	1633.9	4008.8	1762.3	3216.1
Glycine	6088.3	392.6	1234.9	2115.1
Alanine	10119.8	1179.9	4064.5	6390.7
Citulline	1268.4	1191.4	895.2	1647.7
a-amino-n-butyric acid	2129.0	896.9	2245.8	3054.4
Valine	8726.0	1037.8	8801.8	13069.1
Cystine	4382.1	2160.0	3103.7	4823.8
Methionine	3459.9	232.0	1901.9	3572.9
Cystathionine	1664.9	2540.5	1722.9	3023.0
Isoleucine	8552.4	1812.7	8457.5	18548.4
Leucine	22755.9	2648.8	15322.9	30087.8
Tyrocine	15656.8	2511.6	7580.9	13085.6
Phenylalanine	18224.3	3462.3	15360.9	27632.3
b-Alanine	4458.8	5373.3	4735.2	7985.4
b-Amino isobutyric acid	8973.4	3007.4	1619.4	2969.5
b-Amino-n-butyric acid	2201.6	297.1	1171.5	1944.1
Ethanol amine	250.1	661.0	623.7	762.3
Ammonia	860.2	452.9	557.9	680.4
Hydroxylysine	29.9	710.8	528.8	825.6
Ornithine	408.3	1011.0	124.7	416.2
Lysine	7220.2	623.6	1834.8	3259.5
1-Methylhistidine	280.2	0.0	122.1	190.3
Histidine	4715.6	575.6	1771.4	2782.4
3-Methylhistidine	923.3	836.2	336.5	528.9
Anserine	3436.0	990.3	1169.0	2267.6
Carnosine	186.9	3781.1	783.3	1221.0
Arginine	40293.4	765.3	12383.5	21016.8
Hydroxy proline	0.0	0.0	0.0	0.0
Proline	5179.1	0.0	124.4	340.6
Total free amino acids	228236.8	51056.7	119684.8	209020.7

<sup>1)</sup>M: Protease M, N: Protease N, A: Protease A

<sup>2)</sup>M+N+A=Protease M+Protease N+Protease A

## References

1. AOAC. 1995. Official Method of Analysis. Association of Official Analytical Chemists (NO. 993.13), Arlington, VA, USA.
2. Bandyopadhyay, K., G. Misra, and S. Ghosh. 2008. Preparation and characterization of protein hydrolysates from Indian defatted rice bran meal. *J. Oleo Sci.* **57**, 47-52.
3. Cho, S. Y., J. W. Park, and C. Rhee. 1998. Edible films from protein concentrates of rice wine meal. *Korean J. Food Sci. Technol.* **30**, 1097-1106
4. Cho, M. K., S. H. Kim, and M. Y. Kang. 2008. Application of rice polishing by-products to processed rice food (I). *J. East Asian Soc. Dietary Life* **18**, 361-367
5. Cho, M. K., M. H. Kim, and M. Y. Kang. 2008. Application of rice polishing by-products to processed rice food (II). *J. East Asian Soc. Dietary Life* **18**, 331-336
6. FAO. 1998. FAO production Yearbook, Vol. 41, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
7. Faulds, C. B., J. A. Robertson, and K. W. Waldron. 2008.

- Effect of pH in the solubilization of brewer's spent grain by microbial carbohydrases and proteases. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 7038-7043.
8. Gnanasambandam, R., N. S. Hettiarachchy, and M. Coleman. 1997. Mechanical and barrier properties of rice bran films. *J. Food Sci.* **62**, 395-398.
  9. Gnanasambandam, R. and N. S. Hettiarachchy. 1995. Protein concentrates from unstabilized and stabilized rice bran: preparation and properties. *J. Food Sci.* **60**, 1066-1069.
  10. Iiyama, K., T. B. T. Lam, and B. A. Stone. 1994. Covalent cross-links in the cell wall. *Plant Physiol.* **104**, 315-320.
  11. Jang, K. H., W. W. Kang, and E. J. Kwak. 2010. The quality characteristics of pound cake prepared with rice bran powder. *Korean J. Food Preserv.* **17**, 250-255.
  12. Kum, J. S., C. H. Lee, K. H. Baek, S. H. Lee, and H. Y. Lee. 1995. Influence of cultivar on rice starch and cooking properties. *Korean J. Food Sci. Technol.* **27**, 365-369.
  13. Laemmli, U. K. 1970. Celavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
  14. Lee, G. S. 2007. Enzymology. pp. 15-20, Daihak publishing company, Seoul, Korea.
  15. Lowry, O. H., N. J. Rosenbrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
  16. Morita, T. and S. Kiriya. 1993. Mass production method for rice protein isolate and nutritional evaluation. *J. Food Sci.* **58**, 1393-1396.
  17. Otagiro, K., Y. Noshio, L. Shinoga, H. Fukui, and H. Okai. 1985. Studies on a model of bitter peptides including arginine, proline and phenylalanine residues. *Agric. Biol. Chem.* **49**, 1019-1026.
  18. Park, D. J., K. H. Ku, and C. K. Mok. 1993. Microparticulation/Air classification of rice bran: Characteristics and Application. *Korea Food Research Institute* **25**, 769-774.
  19. SAS Institute, Inc. 2002. SAS User's Guide. Statistical Analysis Systems Institute, Cary, NC, USA.
  20. Sharif, M. K., M. S. Butt, F. M. Anjum, and H. Nawaz. 2009. Preparation of fiber and mineral enriched defatted rice bran supplemented cookies. *Pakistan J. Nutrition.* **8**, 571-577.
  21. Shih, F. F. 1996. Edible films from rice protein concentrate and pullulan. *Cereal Chem.* **73**, 406-409.
  22. Treimo, J., S. I. Aspomo, V. G. H. Eijsink, and S. J. Horn. 2008. Enzymatic solubilization of proteins in brewer's spent grain. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 5359-5365.
  23. Treimo, J., B. Westereng, S. J. Horn, P. Forsell, J. A. Robertson, C. B. Faulds, K. W. Waldron, J. Buchert, and G. H. Eijsink. 2009. Enzymatic solubilization of brewer's spent grain by combined action of carbohydrases and peptidases. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 3316-3324.

### 초록 : 쌀 시럽박의 단백질 가수분해 특성

김창원<sup>1</sup> · 박진우<sup>1</sup> · 최혁준<sup>2</sup> · 한복경<sup>2</sup> · 유승석<sup>3</sup> · 김병용<sup>1</sup> · 백무열<sup>1</sup> · 김영록<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>경희대학교 생명과학대학 식품공학과, <sup>2</sup>(주)비케이바이오 연구소, <sup>3</sup>세종대학교 호텔관광대학 외식경영학과)

쌀 부산물인 쌀 시럽박을 상업적으로 사용되는 8가지 protease로 최적화된 조건에서 단일 혹은 혼합 처리하여 수용성 단백질을 분리하였다. 이렇게 분리된 단백질을 Lowry, Kjeldahl 그리고 Gravimetric method 등 총 3가지 방법으로 분석을 한 결과 Protease M, Protease N, Protease A이 가장 높은 분해율을 나타내었다. 3가지 방법에서 모두 Protease M, Protease N, Protease A가 가장 높은 분해율을 나타내었지만, 특히 Gravimetric method의 경우 다른 두 분석방법에 비해 더 높은 단백질 함량을 보였다. 또한 위의 단일처리 결과를 바탕으로 3가지 protease를 혼합하여 처리하였을 때 단일처리와는 달리 상승효과가 나타나는 것을 알 수 있었다. 효소 처리를 하여 얻어진 단백질의 사이즈를 알아보기 위해 SDS-PAGE를 한 결과 어떠한 밴드도 형성이 되지 않았고, 이는 단백질이 마커의 최소사이즈 15 kDa보다 작은 것으로 생각할 수 있다. 아미노산분석의 경우 총 아미노산의 함량은 Protease M을 단일 처리하였을 때와 비슷함을 알 수 있었다. 이는 Protease M의 경우 단백질을 분해할 때 peptide와 amino acid를 동시에 생성하는 특성을 가지고 있지만 Protease N의 경우는 peptide만을 생성하는 특성을 가지고 있어서 상대적으로 Protease M을 처리하였을 때 총 아미노산의 함량이 Protease N에 비해 높음을 알 수 있었으며 이러한 특성으로 인해서 효소를 혼합하였을 때 총 아미노산의 함량은 같은 것으로 판단된다. 효소 처리 후 생성된 총 단백질 함량은 효소를 혼합할수록 증가하였지만 아미노산의 함량은 단일과 비교하였을 때 비슷한 결과를 나타내었는데 이것 또한 Protease M의 특성으로 인해서 기인된 것으로 판단되며 상대적으로 효소를 혼합할수록 아미노산으로 분해되지 못한 polypeptide가 단일 처리에 비해 다량 존재 할 것으로 판단된다.